



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EFECTO DE LA FAGOCITOSIS, LA INFECCIÓN POR *Leishmania amazonensis* Y  
*Leishmania braziliensis* SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE FILAMENTOS DE  
ACTINA Y MICROTÚBULOS EN MACRÓFAGOS MURINOS

Marcos Nicolás Chacón Rojas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

BOGOTÁ. D.C

SEPTIMBRE 2010

EFECTO DE LA FAGOCITOSIS, LA INFECCIÓN POR *Leishmania amazonensis* Y  
*Leishmania braziliensis* SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE FILAMENTOS DE ACTINA Y  
MICROTÚBULOS EN MACRÓFAGOS MURINOS

Tesis de Grado presentada como requisito para optar al título de Maestría en Ciencias Bioquímica

Marcos Nicolás Chacón Rojas

Directora:

Maria Marcela Camacho Navarro, MD., Ph.D.  
Profesora Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia

Laboratorio de biofísica, Centro Internacional de Física  
Grupo de Biofísica y Biología de Membranas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
BOGOTÁ. D.C  
SEPTIMBRE 2010

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia que a través de su Alma Mater me permitió generar una formación más crítica y social.

A la vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por su financiación a través de los proyectos:

Camacho M, Cortés GT, Dueñas Z, Gómez C (2006) Impacto de los cambios en las propiedades de macrófagos infectados por *Leishmania* en habilidad para activarse y hacer apoptosis. Convocatoria Nacional de Investigación 2006, Modalidad 1 apoyo a proyectos de investigación, Marsupial.

Grupo Biofísica y Biología de Membranas (2006). Convocatoria Nacional de Investigación II semestre 2006. Modalidad 1. Reconocimiento a grupos de investigación consolidados (clasificados en categoría "a" en el sistema nacional de ciencia y tecnología).

Al centro internacional de Física, Laboratorio de Biofísica por permitir llevar a cabo las diferentes tareas cotidianas.

A la profesora Marcela Camacho que me permitió hacer parte del grupo de investigación Biofísica y Biología de Membranas y contribuyo a mi formación científica.

Al profesor Juan Carlos Gallego de la Universidad de Antioquia que me recibió en una pasantía en su laboratorio.

A mis compañeros y amigos del laboratorio especialmente a Laura, Yenny, Gladis y Ángela que me aportaron en gran medida a mi vida personal, profesional y académica a través de sus consejos y opiniones objetivas.

A mi familia por brindarme todo el apoyo, colaboración y cariño.

## **Resumen:**

Por inmunofluorescencia se estudió la distribución del citoesqueleto en macrófagos activados, con fagosomas de diferentes tamaños e infectados con *Leishmania*. También se evaluaron los niveles de actina y tubulina en los mismos grupos. Se encontró que fagosomas grandes alteran la distribución del citoesqueleto sin afectar niveles de actina y tubulina.

**Palabras clave:** Citoesqueleto, fagosomas, *Leishmania*, macrófagos.

## **Abstract**

Cytoskeleton distribution was studied in macrophages activated, with phagosomes of different size and infected with *Leishmania* parasites by immunofluorescence. We also evaluated actin and tubulin protein levels in the same groups. We found that big phasosomes alter cytoskeleton distribution without affect actin and tubulin levels.

**Keywords:** Cytoskeleton, phagosomes, *Leishmania*, macrophages.

# CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo general	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. HIPÓTESIS	6
5. MARCO TEÓRICO	7
5.1. Leishmaniosis	7
5.2. Macrófagos y sistema inmune	8
5.3. Infección de macrófagos por <i>Leishmania</i> sp	9
5.4. Tráfico vesicular	10
5.5. Citoesqueleto	12
5.6. Fagocitosis y maduración del fagosoma	14
6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
6.1. Cultivo de macrófagos	17
6.2. Cultivo de parásitos	17
6.3. Infección de macrófagos por <i>L. amazonensis</i> y <i>L. braziliensis</i>	17
6.4. Fagocitosis de partículas de látex	18

6.5. Activación de macrófagos	18
6.6. Marcaje de microfilamentos y microtúbulos por inmunofluorescencia	19
6.7. Determinación de los niveles de las proteínas	20
6.7.1. Extracción de proteínas por lisis celular	20
6.7.2. Precipitación de proteínas para luego concentrarlas	22
6.7.3. Separación de proteínas por Electroforesis en gel de Poliacrilamida (PAGE)	22
6.7.4. Electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa	22
6.7.5. Western blot para detectar las proteínas actina y tubulina del macrófago	23
6.7.6. Análisis de las intensidades de las bandas obtenidas por Western blot	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
7.1. DISTRIBUCIÓN DE CITOESQUELETO	25
7.2. NIVELES DE TUBULINA Y ACTINA	37
8. CONCLUSIONES	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Citoesqueleto de macrófagos de ratón J774.A1	26
Figura 2. Ensayo de activación de macrófagos J774.A1	27
Figura 3. Citoesqueleto de macrófagos activados con LPS e INF- $\gamma$	29
Figura 4. Citoesqueleto de macrófagos de ratón J774 del grupo de fagocitosis F1	29
Figura 5. Citoesqueleto de macrófagos de ratón J774 del grupo de fagocitosis F2	30
Figura 6. Citoesqueleto de macrófagos de ratón J774 del grupo de fagocitosis F3	30
Figura 7. VP de macrófagos infectados por <i>Leishmania braziliensis</i> 72 hpi y <i>Leishmania amazonensis</i> 24 hpi	32
Figura 8. VP de macrófagos J774.A1 en los diferentes tiempos de infección por <i>Leishmania braziliensis</i>	32
Figura 9. Citoesqueleto de macrófagos de ratón J774 infectados con <i>Leishmania amazonensis</i>	33
Figura 10. Citoesqueleto de macrófagos de ratón J774 infectados con <i>Leishmania braziliensis</i>	34
Figura 11. Western blot de $\gamma$ -tubulina y $\alpha$ -tubulina después de lisis con los buffers de lisis NP40, RIPA, 5P8	38
Figura 12. Western blot de actina después de lisis con los buffers de lisis NP40, 5P8, triton X-100 y RIPA	38
Figura 13. Niveles de las proteínas tubulina y actina determinados por Western blot	40
Figura 14. Examen de los residuales de niveles de actina en todos los grupos experimentales	41
Figura 15. Diagrama de cajas de niveles de actina	42

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Volúmenes de los fagosomas generados con los diferentes tratamientos (reportados por Niño et al,2003)	18
Tabla 2. Volúmenes de los fagosomas en los diferentes grupos experimentales (reportados en este trabajo)	31
Tabla 3. Cuantificación de proteína total en todos los grupos experimentales	39



## 1. INTRODUCCIÓN

Leishmania, es un protozooario que constituye un problema serio de salud pública en Colombia y otros países. Los parásitos del género *Leishmania* son patógenos responsables de un espectro diverso de enfermedades humanas diseminadas globalmente, las Leishmaniosis, cuyo mayor impacto se da en países en vías de desarrollo. Desde 1993, las zonas donde *Leishmania* es endémica se han expandido y ha habido un incremento en el número de casos reportados de infección conjunta de *Leishmania* y HIV-SIDA. Hasta la fecha, no hay una vacuna eficaz contra las Leishmaniosis y los tratamientos farmacológicos disponibles tienen problemas relacionados con resistencia del parásito, alto costo y toxicidad (Velez et al, 2005). En Colombia los casos por año de Leishmaniosis cutánea, se han duplicado en la última década y en mayo del 2005 una epidemia de esta enfermedad fue detectada en la Guajira (Informe epidemiológico nacional 2005 y 2009). El aumento de las Leishmaniosis puede explicarse por factores que alteran el ciclo natural de los vectores que transmiten esta enfermedad, el nivel de contacto de la población humana con estos y la biología del parásito y el huésped además de factores sociales y políticos. Desde las ciencias básicas se puede contribuir con estudios que aporten mayor comprensión sobre la fisiología de la relación *Leishmania* – macrófago. Es importante estudiar aspectos relacionados acómo los protozoarios intracelulares logran adaptarse a sus células huésped. En particular, los mecanismos que permiten que *Leishmania* se adapte a su célula huésped (macrófago) confinado en un compartimiento intracelular de gran volumen, llamado vacuola parasitófora (VP) donde las condiciones de pH y la presencia de altas concentraciones de enzimas proteolíticas lo convierten en uno de los ambientes más hostiles.

Las infecciones por *Leishmania amazonensis* (Liew et al,1993) y *Leishmania braziliensis* (Niño 2003, Niño y Camacho 2003, Niño y Camacho 2004) disminuyen la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos activados y ésta se asocia con un aumento del volumen de

la vacuola parasitófora. Hallazgos en cuanto a la ubicación intracelular de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), sugieren que el volumen de la vacuola parasitófora es un factor importante, el cual puede interferir en su correcta ubicación y podría reflejar alteraciones del tráfico vesicular (Niño et al, 2007).

Al comparar diferentes volúmenes de fagocitosis de partículas de látex se evidencian efectos contrastantes. El grupo que produce un volumen de fagosoma de  $22\mu\text{m}^3$  ( $F_1$ ), no reduce la producción de NO, indicando que la caída en NO, es específica de la infección. Para los grupos  $F_2$  y  $F_3$  de  $134\mu\text{m}^3$  y  $360\mu\text{m}^3$ , respectivamente donde los volúmenes del fagosoma son iguales o mayores al volumen de la vacuola que contiene a *L. amazonensis* la producción de NO se redujo en un 63% y en un 99%, respectivamente (Camargo 2000). Con estos resultados se puede concluir que el volumen del fagosoma se asocia con la disminución en la producción de NO. Cunha y colaboradores mostraron que la expresión de la sintasa de NO en macrófagos decae después de la ingestión de partículas de tinta (Cunha et al, 1993). Se ha argumentado que un control estricto de la producción de NO previene daño autoinmune, pero hasta donde se sabe esta es la primera vez que esta regulación negativa ha sido asociada con el volumen del fagosoma (Camacho et al, 2000, Camargo et al, 2000, Niño et al, 2003, Niño y Camacho 2003, Niño y Camacho 2004). Se ha descrito la colocalización de iNOS con partículas de látex como un proceso dependiente de actina, ya que al romper los microfilamentos con citocalasina D se inhibe el reclutamiento de iNOS a los fagosomas posiblemente por alteraciones en el citoesqueleto de actina (Milleret et al, 2004). Recientemente se ha demostrado que algunas proteínas de andamiaje de iNOS, como EBP50 (Ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50), interactúan con actina. Por otra parte, durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis* hay inhibición en el reclutamiento de esta proteína hacia fagosomas nacientes, lo cual no ocurre cuando hay fagocitosis de partículas de látex, indicando que es específico de la infección (Alexander et al, 2007).

Tanto en la infección por *L. amazonensis* como en fagocitosis de partículas de látex de gran tamaño se han observado alteraciones del tráfico vesicular. En el caso de la infección por *L. amazonensis* se ha evidenciado una disminución en la gemación de vesículas y en la generación de lisosomas secundarios (Barbieri et al, 1990), así como una alteración en el tráfico de proteínas desde el complejo de Golgi hasta la membrana plasmática (Misra et al.,

2005), mientras que en la fagocitosis de material inerte no digerible, se observa disminución o pérdida de la plasticidad de la red lisosomal (Knapp & Swanson, 1990). Por tanto, el volumen del fagosoma puede ser crítico en el resultado de la interacción entre *Leishmania* y su célula huésped. Peters y colaboradores mostraron que la liberación de un proteofosfolipido por *Leishmania mexicana*, puede contribuir a la expansión del fagosoma (Peters et al,1997). Sin embargo, sólo datos recientes pueden explicar por qué vacuolas enormes ofrecen ventajas. En macrófagos deficientes en actividad de Rab5 GTPasa, que está involucrada en una adecuada maduración del fagosoma, *Leishmania donovani* genera fagosomas gigantes, similares a los normalmente causados por *L. amazonensis*. Dentro de estos fagosomas gigantes la supervivencia del parásito fue considerablemente mejor (Duclos et al,2000). Los autores sostienen que las vacuolas enormes reducen la posibilidad de concentrar enzimas y radicales importantes y esta dilución favorece la supervivencia del parásito. En nuestro grupo tenemos evidencia que en cultivo in vitro se observa que la tasa de replicación de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* se asocia con el volumen del fagosoma, es decir, a mayor volumen mayor tasa de replicación.

El macrófago entre otras muchas funciones tiene la capacidad de secretar citoquinas que pueden actuar de manera autocrina, paracrina o endocrina; por tanto una alteración en tiempo o concentración de la producción de estos mediadores químicos puede definir el perfil de respuesta inmune y el resultado de la infección. Las alteraciones en tiempo y concentración de citoquinas, pueden deberse a un tráfico vesicular defectuoso mediado por la presencia de un fagosoma de gran tamaño que contiene al parásito. Siendo el citoesqueleto un componente importante del tráfico vesicular, es conveniente determinar si hay alteraciones tanto en los filamentos de actina como en los microtúbulos y cómo se relacionan éstas con la secreción de mediadores químicos, comparando volúmenes variables de fagosomas de *Leishmania* o partículas inertes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el impacto del volumen de la vacuola parasitófora en la distribución de los filamentos de actina y microtúbulos en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis*, *L. braziliensis*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la distribución de los filamentos de actina y los microtúbulos a diferentes tiempos en los grupos experimentales;
  - Macrófagos Control
  - Macrófagos Activados
  - Macrófagos Infectados con *Leishmania amazonensis*,
  - Macrófagos Infectados con *Leishmania braziliensis*
  - Macrófagos con fagosomas de diferentes tamaños.
2. Evaluar los niveles de las proteínas tubulina y actina en cada uno de los grupos experimentales.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los parásitos del género *Leishmania* son responsables de enfermedades conocidas como Leishmaniosis que en Colombia van en aumento y para las cuales no hay vacunas efectivas y los fármacos son ineficientes (Vannier-Santos et al, 2002). La aparición exponencial de resistencia de algunas cepas a la quimioterapia clásica para el tratamiento de Leishmaniosis y los altos costos de las medidas para el control de vectores transmisores de la enfermedad, hacen necesaria una mejor comprensión de la relación entre *Leishmania* y su célula huésped para la generación de herramientas para el control de este parásito (Cortazar et al, 2000). La supervivencia o no de *Leishmania* depende, entre otras, de la función de la membrana plasmática del macrófago junto con su tráfico vesicular dada su importancia en la capacidad del macrófago para señalizar al resto del sistema inmune. Por tanto, es importante explorar si volúmenes grandes de fagosomas alteran la distribución de los filamentos del citoesqueleto y por tanto el tráfico vesicular de efectores químicos por parte de macrófagos infectados, lo cual disminuiría la secreción y con esto se podría comprometer la respuesta inmune.

En la infección del macrófago por parte de la especie *Leishmania donovani* se han encontrado alteraciones en el citoesqueleto de actina. Rodeando al fagosoma que contiene a *L. donovani* se observa una acumulación de F-actina (luego de estimulación por lipofosfoglicano (LPG) del parásito) varias horas después de la fagocitosis, lo cual retarda la maduración del fagosoma, favoreciendo la supervivencia del parásito (Holm et al, 2001).

Esta podría ser una estrategia del parásito para sobrevivir a un ambiente tan hostil, como es el fagolisosoma con pH ácido y alto contenido de enzimas lisosomales. El amastigote carece de LPG, pero posee en la superficie un glicocáliz quimérico formado de glicolípidos del parásito y glicolípidos adquiridos del hospedero. Adicionalmente están presentes fosfolípidos como fosfatidilserina e inositolfosfoceramida del parásito, siendo estos últimos los más importantes en la protección contra hidrolasas lisosomales (Naderer et al, 2008). Al intervenir componentes tan importantes para la supervivencia del parásito como formación de la F-actina alrededor del fagosoma se podrían generar herramientas para controlar la infección.

Determinar la especificidad de estas respuestas permitiría saber qué procesos son específicos de la infección y por tanto susceptibles de intervención, además mejorará la comprensión sobre la naturaleza de la respuesta inmune.

#### 4. HIPÓTESIS

La presencia de grandes volúmenes de vacuola parasitófora induce alteraciones en la distribución de filamentos de actina y microtúbulos del macrófago durante la infección con *Leishmania*. Estas alteraciones son más acentuadas en macrófagos con vacuolas grandes, en las cuales se reclutan proteínas del citoesqueleto.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Leishmaniosis

Las Leishmaniosis son enfermedades parasitarias causadas por protozoarios del género *Leishmania* y transmitidas a través de la picadura de insectos de diferentes especies de la familia Phlebotominae. Los parásitos del género *Leishmania* se agrupan en dos subgéneros: *Viannia* y *Leishmania* (Lainson & Shaw, 1987). En el subgénero *Leishmania* están agrupadas todas las especies del viejo mundo y algunas del nuevo mundo. Las especies del subgénero *Viannia* se distribuyen exclusivamente en el nuevo mundo (Lainson & Shaw 1987, Grimaldi et al, 1989).

Las especies del género *Leishmania* son parásitos digenéticos cuyo ciclo vital incluye un huésped vertebrado y uno invertebrado, mostrando dos formas evolutivas: amastigote y promastigote. La transmisión al huésped vertebrado ocurre por picadura de la hembra vector infectada, que inyecta promastigotes metacíclicos. Una vez dentro del huésped mamífero, el parásito entra en el macrófago donde se transforma en amastigote replicativo (Alexander et al, 1999). Estos parásitos tienen gran impacto en la salud pública de regiones tropicales y subtropicales. Afectan 88 países de los cuales 72 son considerados como países en vía de desarrollo, incluyendo 13 menos desarrollados. La epidemiología de la enfermedad es compleja con 20 especies de *Leishmania* que son patogénicas para el hombre y 30 especies de vectores identificados hasta ahora.

Este protozoario produce diferentes formas clínicas que se manifiestan por compromiso visceral o tegumentario dependiendo de la especie implicada en la infección como del estado inmunológico del huésped. Las formas clínicas con compromiso tegumentario se dividen en tegumentaria del viejo mundo y americana (LTA). La LTA según la organización mundial de la salud se encuentra entre las diez enfermedades infecto parasitarias de mayor importancia, no solamente por la frecuencia sino también por las dificultades terapéuticas, las deformidades y las secuelas físicas que puede causar (WHO, 2004). Desde 1993, las zonas donde *Leishmania* es endémica se han expandido y ha habido un incremento en el número de

casos reportados de infección conjunta de Leishmania y SIDA. Hasta la fecha, no hay una vacuna eficaz contra estas enfermedades y los tratamientos farmacológicos disponibles tienen problemas relacionados con resistencia del parásito, alto costo y toxicidad (Velez et al, 2005).

## 5.2 Macrófagos y sistema inmune.

Los macrófagos son células con amplia capacidad fagocítica que, generan señales que regulan crecimiento diferenciación y muerte de otras células del sistema inmune. Además de su capacidad fagocítica son eficientes presentadores de antígenos tanto de origen intracelular como extracelular. Por tal motivo representan un puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida.

Seguido el estímulo endocítico el macrófago es capaz de liberar una gran variedad de productos incluyendo enzimas como lisosimas, proteinasas neutras, otros metabolitos que contribuyen a la inflamación y a la reparación del tejido. También liberancitoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias con efectos directos sobre el tipo de respuesta humoral, inducción de proliferación y diferenciación de linfocitos, y activación de macrófagos (Aderem et al, 1999).

Además de presentar antígenos y hacer fagocitosis los macrófagos cuentan con mecanismos dirigidos a la eliminación de patógenos intracelulares. Para esto se activan de forma clásica como respuesta a lipopolisacarido (LPS) bacteriano y citoquinas, particularmente interferón gamma ( $\text{IFN-}\gamma$ ) producido por células NK (natural killer) y linfocitos T (Roitt et al, 1991). Los macrófagos activados secretan a su vez factores involucrados en la eliminación de microorganismos y la regulación de la respuesta inflamatoria (Johnston, Kitagawa 1994; Langermans et al, 1994) como factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF-}\alpha$ ). Otros mecanismos microbicidas del macrófago son los oxígeno-dependientes, entre los cuales se encuentran la producción de intermediarios de oxígeno y nitrógeno, como peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y NO respectivamente (Langermans et al, 1994; Reiner et al, 1994), para lo cual la activación de los macrófagos es esencial.



Junto con los cambios descritos durante la activación algunas citoquinas pueden ejercer efectos sobre el citoesqueleto de células precursoras de macrófagos (células HL-60). En células HL-60 hay alteraciones en la progresión del ciclo celular y distribución de F-actina al ser expuestas a las citoquinas G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor) y GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). La distribución de F-actina cambia y se evidencia por el incremento del marcaje de F-actina en el citoplasma y disminución en la periferia celular (Grzanka et al, 2007). La importancia de proteínas del citoesqueleto durante la diferenciación de macrófagos es evidente cuando se induce con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) su diferenciación a partir de células HL-60.  $\beta$ -actina se trasloca desde el citoplasma hacia el núcleo favoreciendo el reclutamiento de RNA polimerasa II en algunos genes, para iniciar su transcripción. Estos resultados muestran que beta actina no solo es componente estructural de la célula sino también participa en la regulación de la transcripción durante la diferenciación de células HL-16 (Xu et al, 2010).

### 5.3 Infección de macrófagos por *Leishmania* sp

Al infectar al huésped mamífero, *Leishmania* interactúa con la matriz extracelular mediante receptores de laminina y activa la producción de anticuerpos dando como resultado su opsonización por proteínas del complemento; de esta manera los parásitos son reconocidos por receptores CI, CII y CIII, que se expresan en la superficie del macrófago (Antoine et al, 1998).

La fagocitosis de promastigotes y amastigotes es dependiente de la polimerización de actina. Cuando ocurre este proceso hay una aparición rápida de F-actina rodeando la vacuola parasitófora (VP). En el caso de la fagocitosis de *L. amazonensis*, *L. donovani* y *L. major* de 30 a 60 minutos después de la infección (en macrófagos derivados de médula ósea) la cubierta de F-actina se reduce considerablemente (Courret et al, 2002). Sin embargo, otros autores (Holm et al., 2001) proponen que durante las primeras dos horas post-infección en macrófagos derivados de médula ósea el compartimiento que contiene a *L. donovani* tiende a no fusionarse con compartimentos de la red endolisosomal, esta es una respuesta mediada por lipofosfoliglicano (LPG). El LPG del parásito retarda la despolimerización del citoesqueleto de actina que rodea el fagosoma evitando así su fusión temprana con endosomas.

Luego de 2 horas post-infección la VP adquiere características de endosoma tardío tales como: pH ácido, las hidrolasas cathepsina B, C, D, E, H, L y los marcadores lisosomiales LAMP1 y LAMP2 (Alexander et al,1999);esta maduración permite entonces denominarlo fagolisosoma. En cuanto a la morfología de la VP las especies de *Leishmania* se diferencian; algunas especies del subgénero *Leishmania* como *L. amazonensis* y *L. mexicana* presentan VP de gran volumen con varios parásitos en su interior, especies como *L. braziliensis* presentan una VP individual que rodea estrictamente al amastigote. A pesar de que muchos patógenos son eliminados en endosomas tardíos, *Leishmania* logra sobrevivir y multiplicarse al interior del macrófago al evadir los mecanismos microbicidas de estas células, que en primera instancia están programadas para destruirlo. Además induce cambios en el metabolismo del macrófago que favorecen la replicación del amastigote. El amastigote adquiere aminoácidos, poliaminas, purinas, vitaminas, esfingolípidos y otros nutrientes del lumen del fagolisosoma a través de endocitosis o de transportadores de membrana para satisfacer sus requerimientos nutricionales (Naderer et al,2008).

*Leishmania* spp. ha desarrollado mecanismos para evadir o interferir con el proceso de presentación de antígenos del macrófago, permitiendo resistir parcialmente a la respuesta inmune mediada por células T. El macrófago es su principal célula hospedera aunque también se ha observado la presencia de amastigotes de *Leishmania* dentro de células dendríticas. Las células dendríticas han sido descritas como potentes activadoras de linfocitos T vírgenes (naive). Sin embargo, algunas especies de *Leishmania* infectan células dendríticas sin inducir su maduración e impiden la migración, lo cual, puede retardar la respuesta inmune adaptativa ya que ambos procesos son necesarios para la activación de células T vírgenes (Antoine et al, 2004).

#### 5.4 Tráfico vesicular

El tráfico vesicular hace referencia a todos aquellos procesos y estructuras encargadas de la distribución y correcta ubicación de las proteínas en los diferentes compartimientos celulares. Dentro de los procesos se cuenta la secreción de proteínas que pueden ser de dos tipos: solubles o de membrana. Las proteínas integrales de membrana son insertadas en la

membrana del retículo endoplasmático rugoso durante su síntesis; algunas permanecen allí (proteínas estructurales o enzimas del retículo endoplasmático) y otras son enviadas hacia la membrana plasmática o a membranas del retículo endoplasmático liso, complejo de Golgi, lisosomas o endosomas. Las proteínas destinadas para secreción son empacadas en vesículas transportadoras que salen del retículo a manera de yemas y se fusionan unas con otras para formar una nueva cisterna cis del Golgi. Cada cisterna cis del Golgi, con su contenido proteico, se mueve desde la superficie cis hasta la superficie trans del complejo de Golgi, por un proceso no vesicular denominado progresión (cisternal progression). En todas las células, algunas proteínas solubles se mueven a la superficie celular en vesículas transportadoras y son secretadas continuamente (secreción constitutiva) y otras son almacenadas en vesículas secretoras y liberadas solamente después de una señal estimuladora (secreción regulada) (Burgess y Kelly, 1987).

Existen al menos tres tipos de vesículas recubiertas, cada una con diferente tipo de proteína de cubierta y transportan proteínas desde un organelo donador particular, a organelos-destino específicos. Así, vesículas con cubierta COP II (coat protein II), transportan proteínas desde el retículo endoplasmático al complejo de Golgi; vesículas cubiertas con clatrina se forman desde la membrana plasmática o desde el trans-Golgi y se mueven hacia endosomas tardíos; y finalmente vesículas con COP I (coat protein I) que dirigen el transporte retrógrado de proteínas dentro de las cisternas del Golgi y desde el Golgi hacia el retículo endoplasmático (Lodish et al, 2000). Durante la formación de estas vesículas, las subunidades proteicas de la cubierta se polimerizan alrededor de la cara citosólica de la vesícula en formación ayudándola a desprenderse de su organelo donante. Las proteínas cargo contienen secuencias señal cortas que permiten establecer el tipo específico de vesícula. Por último, en la formación de vesículas, proteínas de unión a GTP regulan la tasa de formación de vesículas (Lodish et al, 2000). Los mecanismos moleculares del tráfico vesicular involucran proteínas de la membrana del organelo donante, de las vesículas y de la membrana aceptora; ellas permiten la gemación y fusión de vesículas. Entre estas proteínas se cuentan proteínas SNARES, clatrina, COPs y Rabs.

Las proteínas SNARES (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adaptor protein receptor) son responsables del acercamiento de vesículas a la membrana aceptora y de la catálisis de la

fusión de las mismas. Funcionalmente son clasificadas como v-SNARES (SNARES de vesículas o del órgano donante) y t-SNARES (SNARES de la membrana blanco), la interacción entre v-SNARE y t-SNARE conduce a la formación de un complejo trans-SNARE, caracterizado por un entrecruzamiento de sus dominios helicoidales, que permiten el entrelazamiento de las membranas a fusionar (Pelham et al, 2001). La especificidad con la cual las SNARES interactúan, determinan la especificidad del acercamiento de la vesícula y de la fusión, de tal manera que definen la identidad de compartimientos y gobiernan la transferencia ordenada del material durante el transporte vesicular.

## 5.5 Citoesqueleto

El citoesqueleto es una red tridimensional de microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios que provee el soporte interno para las células, permite el movimiento a varios tipos de células, anclan los organelos internos e intervienen en la división celular. Es una estructura dinámica que mantiene la forma de la célula, facilita la movilidad celular por medio de cilios y flagelos y la formación de pseudópodos y desempeña un importante papel en el tráfico vesicular y en la división celular (Bray et al, 2001).

Los microtúbulos (MT) son cilindros huecos formados por dímeros de alfa-tubulina y beta-tubulina. Se polimerizan y despolimerizan añadiendo o sustrayendo dímeros en su extremo plus. Durante la división celular se encargan de mover los cromosomas, de ubicar o localizar los organelos, de dirigir el movimiento de la célula por flagelos o cilios a través de interacciones entre microtúbulos. Tienen una función muy importante en el tráfico vesicular, sirviendo como carriles para el movimiento de vesículas. Esta última función de los microtúbulos depende en gran medida de su polaridad y orientación, es decir, el extremo minus hacia el centro y el plus hacia la periferia de la célula. Este tráfico vesicular a través de microtúbulos está dirigido por proteínas motoras de las familias de dineínas y quinesinas, las cuales desplazan los organelos en dirección centrípeta (hacia el centro de la célula) y centrífuga (hacia la periferia de la célula), respectivamente. Las colas de las proteínas motoras permiten su asociación con receptores específicos de membrana en los organelos cargados, lo cual aumenta la especificidad de la dirección. Se ha identificado un receptor transmembranal para quinesina, llamada quinectina, que funciona como molécula adaptadora. Igualmente un

receptor para dineína, el complejo de dinactina. Los microtúbulos también son claves en la organización del complejo de Golgi, que se localiza cerca del centrosoma (Allanet et al, 2002).

Algunas GTPasas pequeñas marcadoras de compartimentos específicos como las Rab se han encontrado asociadas a proteínas motoras de microtúbulos. Rab4a interactúa con la región central de la cadena liviana citoplasmática de la dineína (Bielli et al, 2001). También se ha reportado que Rabfilina11, un efector de Rab11, se alinea a lo largo de los microtúbulos (Doerflinger et al, 2003) y Rab5 regula la movilidad del endosoma sobre los microtúbulos (Nielsen et al, 1999). Estas proteínas Rab se asocian con fagosomas tempranos y pueden ser fundamentales en el movimiento centrípeto promovido por los microtúbulos.

Los filamentos de actina (FA) se ensamblan a partir de monómeros de actina. Existen como filamentos o como redes que tienen un diámetro de 7 nm. Se polimerizan a partir del extremo plus y se despolimerizan por el extremo minus debido a las diferencias en la tasa de polimerización y despolimerización. Interactúan con otras proteínas filamentosas, permiten el cambio de la forma de la célula, la movilidad, la contracción y son importantes en la división celular, y en conjunto con las cadenas de miosina acoplan la acción muscular.

La movilidad y la distribución de los organelos no solo depende de los microtúbulos, también intervienen los filamentos de actina. Los filamentos de actina están asociados a los endosomas y los lisosomas. Se ha demostrado que endosomas y lisosomas se desplazan en una manera dependiente de N-WASP, Cdc42 y proteína quinasa C (PKC). El tráfico vesicular dado por actina depende de miosina, proteínas motoras de actina, dentro de las cuales es muy importante la miosina V. Se ha observado que los filamentos de actina permiten una movilidad más lenta y dirigida o localizada en una zona de la célula que generalmente corresponde a regiones adyacentes a la membrana plasmática, por tanto la movilidad mediada por filamentos de actina es lenta y direccional más que aleatoria (May et al, 2001).

El transporte a través de las dos vías, por MT y FA está coordinado en gran parte por la interacción entre las proteínas motoras de ambos sistemas. La miosina VA (MyoVA) permite el transporte de melanosomas y la organización del retículo endoplasmático liso. Sin embargo, no es la única proteína motora involucrada. A través de la región homóloga a AF-

6/con, MyoVA interactúa con la cadena pesada de una kinesina, lo cual indica que hay una coordinación entre el transporte de organelos basado en FA y en MT (Huang et al, 1999).

Se ha demostrado que tanto MyoVA como quinesina pueden unirse a vesículas sinápticas en rata (Futaki et al, 2004), también se ha reportado la colocalización en levaduras de MyoVA y Smy1 (proteína relacionada a la quinesina) en regiones de crecimiento polarizado en la célula. La ventaja de la interacción entre los 2 sistemas de transporte es la posibilidad de cambiar rápidamente de un transporte rápido de largo rango a través de MT a uno lento y más localizado mediado por FA tan solo activando una proteína motora y desactivando otra.

## 5.6 Fagocitosis y maduración del fagosoma

El proceso de fagocitosis es un proceso mediado por receptores Fc- $\gamma$  o receptores del complemento, en el cual las células fagocíticas como los macrófagos internalizan partículas o parásitos intracelulares (Aderem et al, 1999). La biogénesis del fagosoma ocurre por la formación de una red de actina que empuja la membrana plasmática alrededor de la partícula (May et al, 2001). Después de la internalización de la partícula, el fagosoma continúa madurando hasta convertirse en fagolisosoma, de manera que hay un cambio en la composición de proteínas específicas en la membrana del fagosoma (Desjardins et al, 1994).

El proceso de maduración depende de la interacción del fagosoma con la vía endocítica, la cual está organizada como un continuo de organelos que van desde endosomas tempranos hasta lisosomas. Los endosomas tempranos son organelos tubovesiculares que contienen en sus membranas Rab5 o EEA1 (early endosome antigen 1), el lumen es relativamente pobre en proteasas y tienen pH de 6,0 aproximadamente. De los endosomas tempranos, las moléculas destinadas para degradación pasan a endosomas tardíos. Los endosomas tardíos son multivesiculares, son más ácidos, alcanzando un pH de 5,5 y más enriquecidos en enzimas hidrolíticas que los endosomas tempranos, y con las proteínas integrales de membrana Rab7, Rab9, receptor de manosa-6-fosfato y LAMPs (lysosomal-associated membrane proteins), estos últimos son usados como marcadores de estos compartimentos. Los lisosomas son el paso final en la secuencia endocítica. Estos organelos contienen la mayoría de proteasas y lipasas activas, LAMPs y enzimas hidrolíticas como catepsina D son extremadamente ácidos

(pH menor de 5,5). La interacción entre fagosomas y endosomas comienza inmediatamente después de la formación del fagosoma. Se fusionan inicialmente con endosomas tempranos, seguido de endosomas tardíos y luego con lisosomas (Vieira et al, 2002).

El intercambio de material transportado por vesículas entre los compartimentos se da a través de los microtúbulos. La fagocitosis implica la pérdida de área de la membrana plasmática, por tanto debe existir un mecanismo que restablezca la cantidad de membrana en la superficie que se da a través del reciclaje de membrana de vuelta a la superficie celular donde se formó el fagosoma, lo cual se conoce como exocitosis focal (Mellman et al, 2000). Los MT participan en el proceso de fagocitosis al mediar el transporte de endosomas de reciclaje y vesículas del RER al sitio de formación del fagosoma para cubrir la disminución de membrana debida a la internalización. Además proveen la vía para el transporte del fagosoma durante su maduración preferentemente hacia el centro de la célula, aunque también pueden presentar cierto movimiento bidireccional tanto in vivo como in vitro (Blocker et al, 1997).

Luego de la fagocitosis los filamentos de actina (F-actina) que rodean al fagosoma se despolimerizan rápidamente, 4-5 minutos después de ensamblarse en el fagosoma (Liebl et al, 2009), liberándose del fagosoma, eliminando así la barrera física que impide la fusión con endosomas y lisosomas. Más aún, F-actina regula el comportamiento del fagosoma después de la internalización proporcionando vías para su movimiento durante la maduración (Vieira et al, 2002). Se han encontrado varias proteínas de unión a actina tales como anexinas, actinina y proteínas ERM en la membrana del fagosoma (Defacque et al, 2000). Varias isoformas de miosina son reclutadas al fagosoma en tiempos diferentes después de la internalización. La asociación con miosina V se incrementa continuamente después de la captación de la partícula, indicando su importancia más en la dinámica del fagosoma internalizado que en el mecanismo de internalización (Diakonova et al, 2002).

El transporte de organelos puede darse por proteínas motoras de actina y por proteínas motoras de los microtúbulos (Rogers et al, 2000). Los fagosomas pueden presentar 2 tipos de movimiento, uno lento en la periferia de la célula, que ocurre poco tiempo después de la fagocitosis y otro rápido que ocurre cuando el fagosoma alcanza el interior de la célula (Blocker et al, 1997). El transporte basado en microtúbulos es responsable del movimiento de

vesículas de largo rango, mientras que el movimiento de vesículas mediado por miosinas está restringido a un rango corto a lo largo de la actina cortical. La miosina V permite el anclaje de fagosomas al promover la interacción con F-actina y retrasar el cambio a la vía mediada por microtúbulos hacia la región périnuclear (Al Haddad et al, 2001).

En este trabajo se buscó valorar el impacto que el proceso de fagocitosis de un patógeno intracelular, *Leishmania* de una partícula inerte (de látex), tiene sobre la distribución intracelular y la cantidad de actina y tubulina. Para esto se determinó la distribución de proteínas por ensayos de inmunofluorescencia y la cantidad relativa por ensayos de western blot.



## 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 6.1 Cultivo de macrófagos

Macrófagos peritoneales de ratón de la línea J774A.1 obtenidos a partir de la ATCC (TIB 67) se mantuvieron en monocapa en botellas de 25 cm<sup>2</sup> a 35,5°C y 5% de CO<sub>2</sub>, empleando medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Danovo o Eurtroph) (Forero et al. 1999). La viabilidad de los cultivos se verificó mediante el ensayo de exclusión por azul Tripán.

### 6.2 Cultivo de parásitos

Se emplearon parásitos de las especies *L. amazonensis* cepa (FLA/BR/67/PH8) y *L. braziliensis* cepa (HOM/BR/75M2903), donados por CIDEIM, Cali, Colombia. Los parásitos se sembraron en el estadio de promastigotes a una concentración inicial de 10<sup>6</sup> células/ml en cajas de 25 cm<sup>2</sup> en medio Schneider's suplementado con 10% (v/v) de SFB (Niño & Camacho, 2005). Los cultivos se mantuvieron a 27° C hasta alcanzar fase estacionaria con formación de rosetas. En este punto se recolectaron para infección.

### 6.3 Infección de macrófagos por *L. amazonensis* y *L. braziliensis*

Se agregaron promastigotes en fase estacionaria en una proporción 1:10 (células a parásitos), a cultivos de macrófagos de un 80% de confluencia (8x10<sup>6</sup> macrófagos/ml), durante 4 horas a una temperatura de 35,5° C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente los cultivos se lavaron dos veces usando 10 ml de RPMI, con el propósito de retirar los parásitos no infectantes. Los cultivos se mantuvieron bajo las mismas condiciones empleadas para la realización de la infección durante 24 horas.

#### 6.4 Fagocitosis de partículas de látex

Para la obtención de los grupos de macrófagos con diferentes volúmenes de fagosoma se emplearon partículas de látex en diferentes proporciones y tamaños (Tabla 1)

Grupo	Diámetro de las partículas de látex	Macrófago/parásito o particular	Tamaño del fagosoma
F <sub>1</sub>	3,2 μm	1:10	22 ± 5μm <sup>3</sup>
F <sub>2</sub>	6,4 μm	1:10	134 ± 23μm <sup>3</sup>
F <sub>3</sub>	6,4 μm	1:20	360 ± 40μm <sup>3</sup>
L. amazonensis		1:10	133 μm <sup>3</sup>
L. braziliensis		1:10	50 μm <sup>3</sup>

Tabla 1. Tamaños de lo fagosomas generados con los diferentes tratamientos de infección con Leishmania y fagocitosis de partículas de látex. El grupo de fagocitosis F<sub>1</sub> produce una vacuola de volumen similar a la que alberga a L. braziliensis y el grupo F<sub>2</sub> produce una vacuola de volumen similar a la que alberga a L. amazonensis (Camargo et al, 2000).

Para obtener los diferentes grupos de fagocitosis se realizó el siguiente procedimiento. Los cultivos con un 80% de confluencia se expusieron a partículas de látex, en la proporción y el tamaño adecuado según el grupo a obtener. Luego de 4 horas de exposición, se realizaron tres lavados usando 10 ml de RPMI libre de suero. A continuación las células se resuspendieron y centrifugaron a 300 rpm durante 5 minutos para eliminar las partículas que no pudieron ser eliminadas mediante los lavados (Camargo et al, 2000, Niño et al, 2003).

#### 6.5 Activación de macrófagos

Se sembraron macrófagos en cajas de 6 pozos, a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. Luego de 24 horas, se estimularon, usando 40 U/ml de IFN  $\gamma$  de ratón (SIGMA) y 10 ng/ml de LPS de Echerichia coli (Sigma) en RPMI suplementado con 10 % de SFB. Los cultivos se mantuvieron a 35,5°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Unos de los productos de la activación clásica más sencillos de medir son los nitritos. Para verificar la activación se midió la

producción de nitritos 24 horas después de activar, mediante la reacción colorimétrica de Griess, añadiendo 50 µl de 0,1% de N-(1-naftil) etilendiamina en ácido fosfórico 5% y 50 µl de 1% de ácido sulfanílico en ácido fosfórico 5% para 100µl de muestra. Posteriormente se comparó el color rosado con una curva de calibración para determinar la concentración de nitritos de la muestra.

## 6.6 Marcaje de microfilamentos y microtúbulos para inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia se empleó la metodología de Gallego et al en 2007, en la que se busca preservar adecuadamente los elementos del citoesqueleto, usando el buffer de citoesqueleto (CBS) que consiste en 10mM MES, 138mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM EGTA y 0,32M sacarosa. En el CBS se prepara el fijador paraformaldehído que es un reactivo que forma puentes intermoleculares con los grupos amino libres de las proteínas de tal manera que las protege y permite preservar la estructura de la célula como si estuviera viva.

Los macrófagos se platearon en láminas para IFI por 20 minutos; luego se fijaron con paraformaldehído al 3,8% en CBS a 37°C por 20 minutos, se lavaron 5 veces con CBS. Luego se trataron con NH<sub>4</sub>Cl durante 10 minutos, se lavaron 3 veces con PBS. Se permeabilizaron por 20 minutos con 0,6 % de Triton X-100 en PBS (Phosphate buffered saline). Se bloquearon los sitios inespecíficos con 10% de SFB en PBS durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-actina, anti-tubulina) en dilución 1:200 durante 2 horas a 37°C. La ubicación espacial con respecto a los fagosomas se estudió haciendo marcajes dobles con anticuerpos específicos contra cada filamento y contra LAMP1 (anti-LAMP1, dilución 1:200), proteína encontrada en la membrana de compartimientos lisosomales. Los anticuerpos empleados fueron: anticuerpo monoclonal anti-actina de Sigma (código A4700) producido en ratón que reconoce un epítipo ubicado en el extremo C terminal de todas las isoformas de actina de una gran variedad de tejidos y especies, anticuerpo monoclonal anti-tubulina Zymed(32-2500) producido en ratón que reconoce todas las isoformas de alfa tubulina de una gran variedad de tejidos y especies y

anticuerpo anti-LAMP1 de Sigma (L1418) producido en conejo que reconoce los residuos 405 a 416 de LAMP1 humano, de ratón y rata. Luego se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488, Alexa 546 (1:500) y Hoechst (1:3000) (para tinción de los núcleos del macrófago y los parásitos) durante 1 hora a 37°C. Los cubre objetos se montaron sobre las láminas de IFI con Gel Mount (Sigma) y por último se examinaron en microscopio de fluorescencia.

## 6.7 Determinación de niveles de proteína

Los niveles de proteínas se pueden determinar por el ensayo Elisa (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), en el cual, se detectan antígenos inmovilizados mediante anticuerpos acoplados a enzimas que producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente. Los niveles también se pueden medir por Western blot, separando proteínas nativas y denaturadas por PAGE, luego transfiriéndolas a una membrana de nitrocelulosa, donde se detectan usando anticuerpos específicos para la proteína de interés. En este caso se usó Western blot, por ser una técnica que permite identificar claramente la proteína de interés al asignarle el peso molecular a la banda. Se pueden cuantificar relativamente las proteínas al medir las bandas por densitometría con alta sensibilidad, lo que permite análisis estadístico para detectar variaciones de cantidad relativa de proteína entre muestras. Es importante asegurar que todas las muestras sean sometidas a las mismas condiciones experimentales. Además se deben realizar varios experimentos independientes.

Los macrófagos de cada uno de los tratamientos: macrófagos control, activados, grupo de fagocitosis F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, infectados con *L. amazonensis* y *L. braziliensis* a diferentes tiempos (tabla 3) se sembraron en cajas de 6 pozos a una concentración de  $2 \times 10^6$  células por pozo. Se incubaron a diferentes tiempos, se extrajeron y se almacenaron a -20 °C o se hizo la lisis celular para extracción de proteínas.

### 6.7.1. Extracción de proteínas por lisis celular

En un tubo eppendorf de 1,5 ml se centrifugaron las células a 400 gravedades (g) durante 10

minutos, se lavaron con 200  $\mu$ l de PBS, se centrifugaron nuevamente y se agregaron 50  $\mu$ l de buffer de lisis. Se probaron cuatro buffers de lisis:

Buffer Tris-Tritón, que consiste en 10 mM de Tris, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X-100, 10% de glicerol, 0,1% de SDS, 0,5% de deoxicolato y pH 7,4. Este es un detergente que solubiliza la mayoría de las proteínas. Ideal para proteínas de citoplasma y asociadas al citoesqueleto.

Buffer RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay buffer), que consiste en 150 mM de NaCl, 1,0% de Triton X-100, 0,5% de deoxicolato de sodio, 0,1% de SDS (sodium dodecyl sulphate), 50 mM de Tris y pH 8,0. Este es un buffer altamente denaturante y da un bajo background. Útil para proteínas unidas a membranas.

Buffer NP40 (Nonidet-P40) que consiste en 150 mM de NaCl, 1,0% de NP-40 y 50 mM Tris, pH 8,0, es un buffer menos denaturante que RIPA pero da un background mayor (Harlow et al, 1988). Útil para proteínas unidas a membranas.

Buffer 5P8 que consiste en 5 mM de fosfato de sodio, 0,1 mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) y pH 8,0 es un buffer hipotónico que causa hemólisis, es usado para extraer proteínas asociadas al citoesqueleto.

Luego se transfirió el eppendorf a un recipiente con hielo y se rompió el pellet aspirando y expulsando el contenido con una jeringa de insulina 20 veces, luego se dejó 1 hora a 4 °C. Se centrifugó para separar el sobrenadante del pellet. En el sobrenadante permanecen las proteínas de interés, es decir, los elementos del citoesqueleto que son solubles en los buffers usados. Luego se cuantificó la proteína total con el kit Quant-iT de Invitrogen. El kit contiene un reactivo que al unirse a las proteínas fluoresce y puede ser medido por el fluorómetro Qubit usando patrones de proteína de concentración conocida.

Al final del ensayo de Western blot solo las muestras de proteínas lisadas con tritón X-100 y RIPA permitieron observar bandas densas y oscuras.

### 6.7.2. Precipitación de proteínas para luego concentrarlas

Se utilizó la técnica de precipitación con metanol-cloroformo en la que se busca volver insolubles las proteínas con metanol y remover los detergentes y lípidos de la muestra con cloroformo. A 100  $\mu$ l de muestra de proteínas lisadas se agregaron 400  $\mu$ l de metanol, 100  $\mu$ l de cloroformo y se mezcló con vórtex. Se agregaron 640  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada, se mezclaron y centrifugaron a 10000 gravedades (g) por 1 minuto. Con micropipeta se retiró la capa superior (las proteínas están entre las 2 fases del líquido: arriba esta la mezcla metanol/H<sub>2</sub>O, abajo está el cloroformo que es más denso y contiene restos de lípidos) dejando una pequeña cantidad de fase. Se agregaron 300  $\mu$ l de metanol, se mezclaron y centrifugaron a 10000 g por 2 minutos. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Se resuspendió el pellet en 10  $\mu$ l de buffer de lisis (Wessel et al, 1984).

### 6.7.3. Separación de proteínas por Electroforesis en gel de Poliacrilamida (PAGE)

En un tubo eppendorf se combinaron 7,5  $\mu$ l de la muestra con 7,5  $\mu$ l de buffer laemmli 2x (consiste en 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125 M Tris HCl, a pH 6,8). Se puso el tubo en agua hirviendo por 2 minutos y luego en hielo. Se preparó el gel de poliacrilamida al 10%, ya que con esta concentración se pueden separar proteínas de 43 y 55 KDa, que son los pesos de las proteínas de interés actina y tubulina, respectivamente. El gel de poliacrilamida consiste en gel de separación (dH<sub>2</sub>O, 30 % de acrilamida, 1,5M Tris pH 8,8, 10% SDS, 10% persulfato de amonio y TEMED) y gel de apilamiento o stacking (dH<sub>2</sub>O, 30% acrilamida, 1,0M Tris pH 6,8, 10% SDS, 10% persulfato de amonio y TEMED).

Se aplicaron las muestras en los pozos. Se corrió a 100 V (voltaje constante) durante 2 horas. El gel con las proteínas separadas se sometió a tinción con azul de Commassie para verificar el corrido de las proteínas y electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa.

#### 6.7.4. Electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa

Se cortaron 6 pedazos de papel Whatman y 1 pedazo de papel de nitrocelulosa del tamaño del gel. Se remojaron en buffer de transferencia por 10 minutos. Con unas pinzas se colocaron 3 pedazos de papel Whatman sobre la cámara de transferencia una por una. Luego se colocó un pedazo de nitrocelulosa y sobre la nitrocelulosa el gel. Se colocaron los otros 3 pedazos de papel Whatman, en cada postura se verificó que no quedaran burbujas. Se humedeció con buffer de transferencia. Se cerró la cámara de transferencia y colocaron los electrodos en la fuente de poder. Se transfirió a 6 V por dos horas. Luego se hizo tinción del papel de nitrocelulosa con rojo Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas antes de hacer el western blot.

#### 6.7.5. Western blot para detectar las proteínas actina y tubulina del macrófago

Se colocó el papel de nitrocelulosa en solución de bloqueo de sitios inespecíficos (PBS1X/0,2% tween 20/leche descremada 5%) a 37°C 1 hora. Se prepararon los anticuerpos primarios en solución de bloqueo a una concentración de 1:500 o 2 µg/ml.

Se incubó a 4°C toda la noche o 2 hora a 37°C, luego se lavó con solución de lavado (PBS/Tween 0,2%) 3 veces por 5 minutos cada uno. Se preparó el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa en solución de bloqueo a una concentración de 1:1000 o 1 µg/ml. Se incubó a 37°C durante dos horas luego se lavó 3 veces por 5 minutos cada uno. Finalmente se reveló con el kit de revelado para peroxidasa Vip Vector (Código: SK4600), cuya reacción consiste en polimerización oxidativa y el ciclado de DAB (sustrato de la peroxidasa), lo cual produce un precipitado marrón. Una vez revelada la membrana de nitrocelulosa se digitalizó con cámara fotográfica Sony Super HAD CCD DSC-F828 de 8 mega pixeles.

#### 6.7.6. Análisis de las intensidades de las bandas obtenidas por Western blot

El análisis de los ensayos de Western blot se realizó con el programa Image J®, que permite calcular la intensidad de las bandas obtenidas, lo cual es proporcional a la cantidad de

proteína. Con estas medidas se realizó una comparación entre todos los grupos experimentales en general y entre los grupos de infección con *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. Se utilizó la prueba estadística, análisis de varianza (ANDEVA) de una vía en el programa Minitab® 15.1.30.0 para realizar estas comparaciones.

Los experimentos de inmunofluorescencia para determinar la distribución intracelular y los de Western blot para determinar los niveles de las proteínas en los macrófagos sometidos a los diferentes tratamientos se realizaron a varias horas post-infección. En macrófagos activados a las 24 horas, debido a que en este momento es posible verificar la activación evaluando la producción de nitritos. En macrófagos infectados con *L. amazonensis* y *L. braziliensis* a las 6 y 12 horas post-infección porque se ha completado la fagocitosis. A las 24 horas los parásitos aún no se han replicado, a las 48 ya han comenzado a replicarse y aumenta el volumen de la vacuola parasitófora que finalmente a las 72 horas alcanza su máximo tamaño. Se seleccionó 48 horas post-fagocitosis en los grupos F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> porque en este momento el tamaño de las vacuolas que contiene a *L. amazonensis* es similar a las de los fagosomas de los grupos F<sub>2</sub> (Camargo et al, 2000).

Para los ensayos de Western blot se usaron extractos de parásitos de ambas especies *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en una cantidad de  $3 \times 10^6$  parásitos, equivalente al contenido de parásitos en una muestra de  $2 \times 10^6$  macrófagos infectados con *Leishmania*. Esto se hizo para estimar la contribución de actina y tubulina del parásito porque es probable que tenga marcaje positivo los anticuerpos anti-actina y anti-tubulina.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7. 1. DISTRIBUCIÓN DE CITOESQUELETO

El citoesqueleto de un eucariote se organiza en tres grupos de filamentos: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios. La función conjunta de estos garantiza organización intracelular, tráfico vesicular normal y por tanto distribución adecuada de proteínas al interior celular y procesos de secreción. En macrófagos los microfilamentos son fundamentales para el proceso de fagocitosis, así como para secreción de citoquinas e interleuquinas en combinación con microtúbulos, a cargo del transporte de vesículas de secreción hacia la membrana plasmática.

Para determinar la distribución intracelular del citoesqueleto se hicieron marcajes con anticuerpos anti-actina, componente básico de microfilamentos y anti-tubulina, componente básico de microtúbulos, que se observan en rojo. En macrófagos control los microfilamentos se distribuyen hacia la membrana plasmática con detección de algunos filopodios (Fig. 1A), mientras que el marcaje de microtúbulos es citoplasmático y perinuclear, con evidencia del centrómero (Fig. 1B). También se puede observar el marcaje punteado verde (marcados con anti-LAMP1) distribuido homogéneamente en todo el citoplasma, sugiriendo la presencia de vesículas, endosomas tardíos o lisosomas.

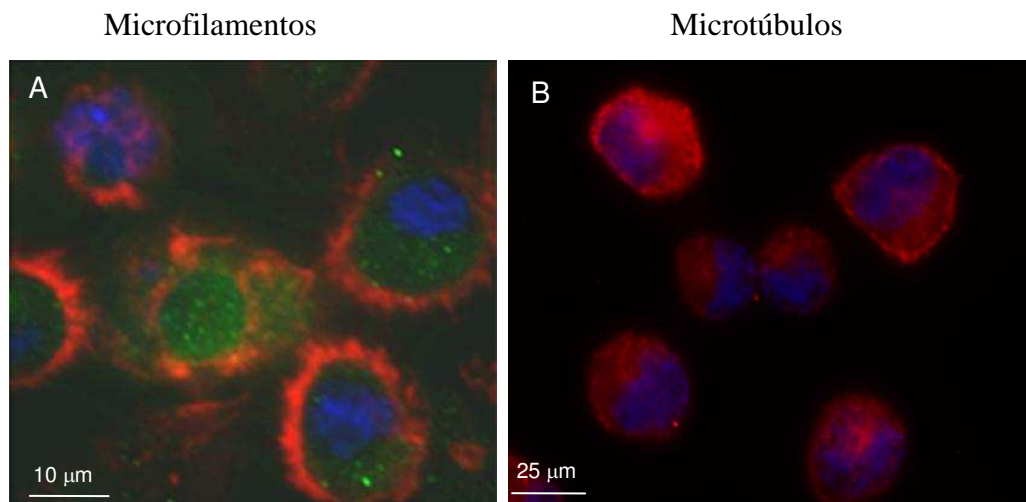


Figura 1. Citoesqueleto de macrófagos murinos J774. A. Microfilamentos marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a Alexa 546 (A, en rojo). B. Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546 (B, en rojo). Compartimentos lisosomales marcados con anticuerpo anti lamp1 producido en conejo y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Alexa 488 (en verde). Núcleo marcado con Hoescht 33258 (en azul).

Los macrófagos son una de las poblaciones celulares más heterogéneas del sistema inmune, presentes en todos los tejidos del cuerpo. Tienen funciones homeostáticas que incluyen reparación, modelación y angiogénesis de los tejidos, son efectores de la respuesta innata y están involucrados en el inicio y la regulación de las respuestas adaptativas a través del procesamiento y presentación de antígenos, la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas (Turpin et al, 1993).

La activación de los macrófagos es un proceso complejo y regulado que consiste en una serie de modificaciones morfológicas y bioquímicas que culminan con el aumento de la capacidad de la célula para ejercer sus funciones fisiológicas. La activación puede ser clásica o alternativa (Gordon et al, 2003).

En este trabajo se realizó activación clásica de macrófagos, la cual es inducida por citoquinas proinflamatorias como el  $\text{INF-}\gamma$  y/o moléculas microbianas como LPS, en este caso se utilizaron 40 U/ml de  $\text{INF-}\gamma$  de ratón y 10 ng /ml de LPS de *Echerichia coli*. Los macrófagos activados clásicamente producen NO a la vez que aumentan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y CD86, potenciando así su capacidad presentadora de antígeno. También llevan a cabo actividades antiproliferativas y citotóxicas que se producen,

en parte, como resultado de la secreción de NO y de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , interleuquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18 y quimioquinas (Klimp et al, 2002).

La activación alternativa de macrófagos inducida por citoquinas tipo Th2 como IL-4 o IL-13. Los macrófagos activados alternativamente no producen NO ni controlan el desarrollo de patógenos intracelulares. Aumentan la capacidad endocítica y fagocítica así como la expresión de varios receptores, favoreciendo en conjunto la función reparadora de tejidos del macrófago (de Waal Malefyt et al,1993).

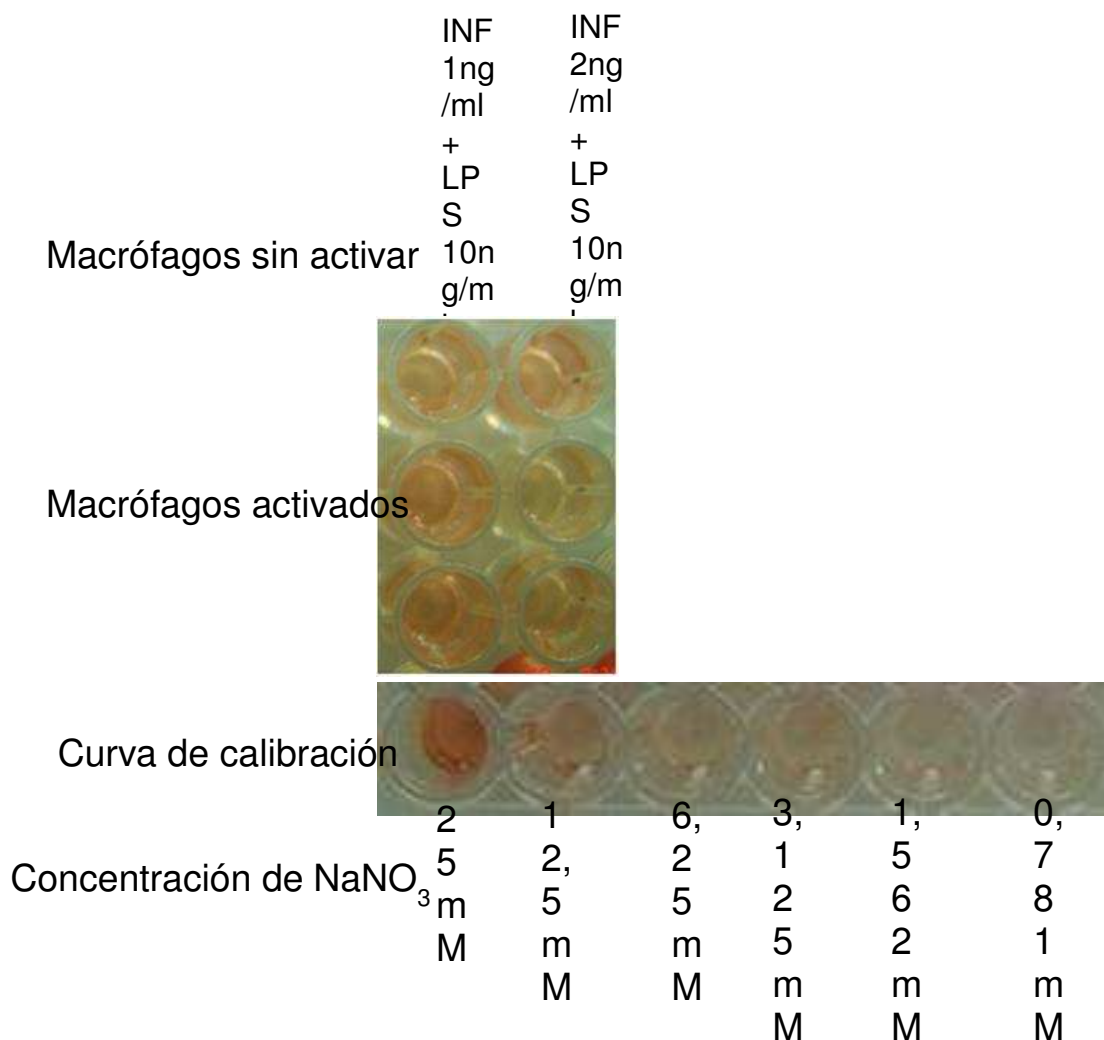


Figura 2. Ensayo de activación de macrófagos J774A.1. Se activaron  $5 \times 10^4$  células por pozo con INF 1ng/ml o 2ng/ml y LPS 10ng/ml sembrados en cajas de 96 pozos. Se realizaron 3 replicas. Se verifico la activación de los macrófagos por ensayo de Griess. En la parte inferior se muestra la curva de calibración para determinar la concentración de nitritos producido por las células activadas.

La activación clásica se verificó por el ensayo de Griess, en el cual se detectó la presencia de nitritos, evidenciada por el cambio de coloración. En todas las réplicas evaluadas se observó activación. La concentración de nitritos varió entre 12,5 mM y 25 mM para  $5 \times 10^4$  macrófagos por pozo (Fig. 2). La activación también se verificó detectando las citoquinas IL-12 y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante por citometría de flujo y Western blot y a nivel intracelular por inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos para cada citoquina (Montoya G. y Rojas A., comunicación personal).

La activación del macrófago se asocia con aumento de su capacitancia, es decir del área de la membrana (Camacho et al, 2008). Además se observa un aumento de volumen y prolongaciones, lo cual se evidencia con los marcajes de microfilamentos y de microtúbulos. Los microfilamentos se distribuyen hacia la membrana formando lamelipodios (estructuras anchas de forma laminar) diferente de los filipodios observados en los macrófagos control (Fig. 3A y 1A). Lo cual es coherente con lo reportado por Dave y colaboradores en 2009, quienes encontraron que luego de la activación clásica de macrófagos por LPS, la proteína CD148 (receptor de fosfatasa de tirosina) se concentra en áreas donde la membrana forma lamelipodios, donde se piensa que interviene en la reorganización del citoesqueleto de actina. En células RAW264.7 y macrófagos peritoneales, el citoesqueleto de actina tiene un papel importante durante los eventos inflamatorios mediados por LPS. Se ha encontrado que la ruptura del citoesqueleto de actina por citocalasina B regula negativamente repuestas inflamatorias como producción de óxido nítrico, liberación de prostaglandina E2 (PGE) y secreción de TNF- $\alpha$  (Kim et al, 2010).

En macrófagos activados los microtúbulos se distribuyen en todo el citoplasma similar a macrófagos control, sin embargo, las células al tener mayor volumen permiten verlos más esparcidos y se alcanzan a observar microtúbulos individuales (Fig. 3B).

Microfilamentos

Microtúbulos

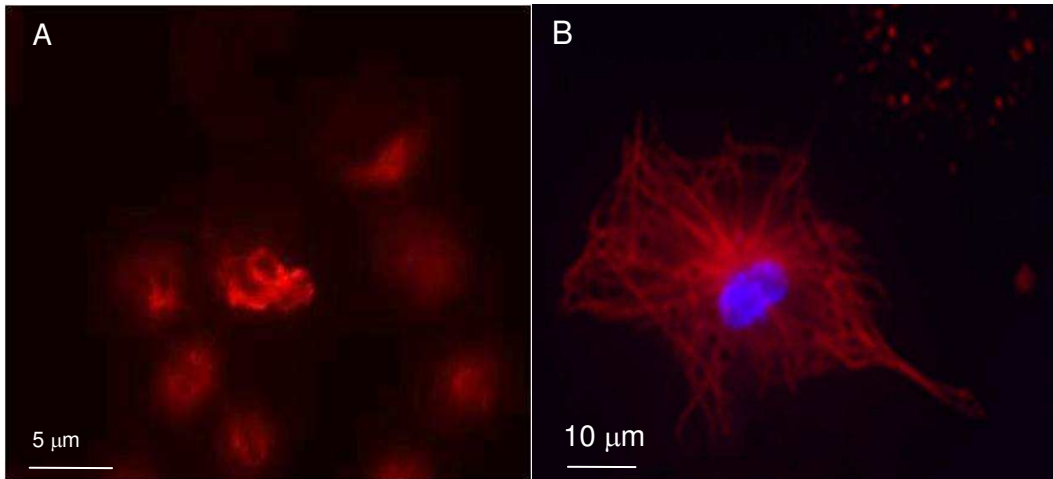


Figura 3. Citoesqueleto de macrófagos **activados** con LPS e INF- $\gamma$ . (A) Filamentos de actina marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. (B y C) Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Núcleo marcado con Hoescht 33258

También se activaron macrófagos  $F_2$  después de 24 horas de fagocitosis y se marcaron los microtúbulos por inmunofluorescencia a las 24 horas. Muestran una distribución similar a macrófagos activados sin partículas de látex (Fig. 4C).

Microfilamentos

Microtúbulos

Microtúbulos

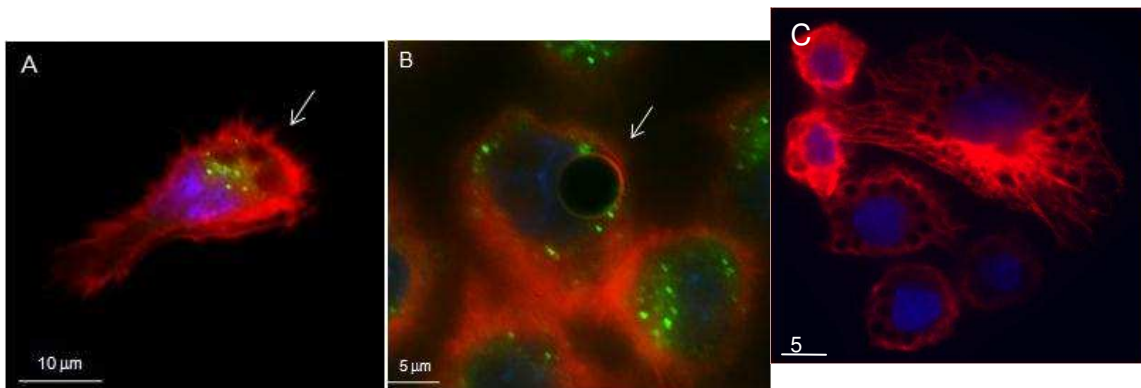


Figura 4. Citoesqueleto de macrófagos murinos J774 del grupo de fagocitosis  $F_1$ . (A) Filamentos de actina marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. (B) Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. (C) macrófagos activados después de 24 horas post fagocitosis de partículas de látex de 3.2  $\mu$ m de diámetro. Compartimentos lisosomales marcados con anticuerpo anti lamp1 producido en conejo y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Alexa 488. Núcleo marcado con Hoescht 33258. Se sometieron los macrófagos a partículas de látex de 3,2  $\mu$ m de diámetro en una proporción de 10:1 partículas:célula. Las flechas indican la ubicación de las vacuolas que contienen las partículas de látex.

### Microfilamentos

### Microtúbulos

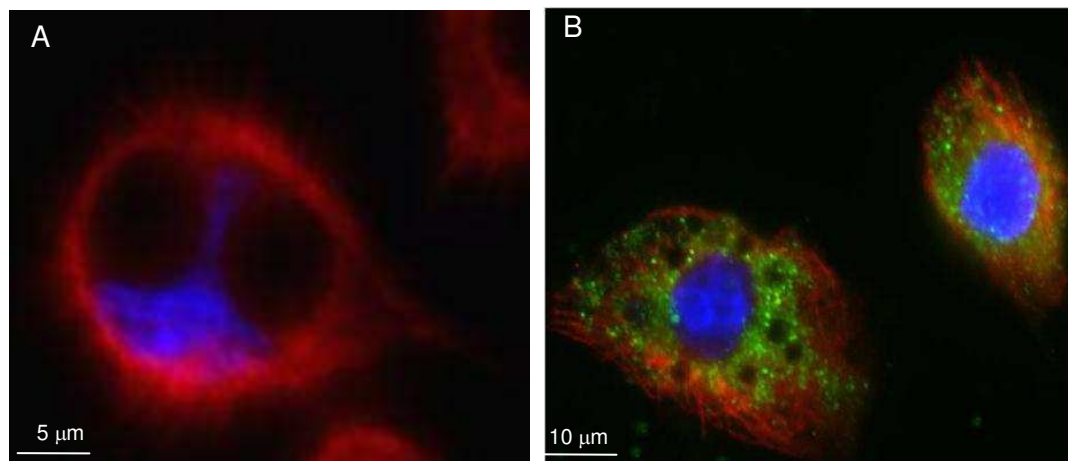


Figura 5. Citoesqueleto de macrófagos murinos J774 del grupo de fagocitosis  $F_2$ . Filamentos de actina marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Compartimentos lisosomales marcados con anticuerpo anti lamp1 producido en conejo y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Alexa 488. Núcleo marcado con Hoescht 33258. Se sometieron macrófagos a partículas de látex de 6,4  $\mu\text{m}$  de diámetro en una proporción de 10:1 partículas:célula.

### Microfilamentos

### Microtúbulos

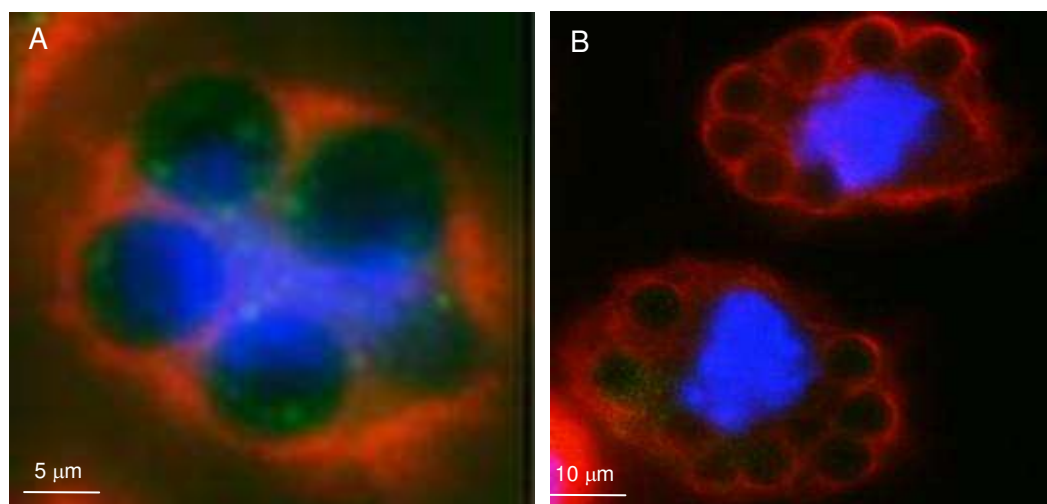


Figura 6. Citoesqueleto de macrófagos murinos J774 del grupo de fagocitosis  $F_3$ . Filamentos de actina marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Compartimentos lisosomales marcados con anticuerpo anti lamp1 producido en conejo y anticuerpo secundario anti conejo acoplado a Alexa 488. Núcleo marcado con Hoescht 33258. Se sometieron los macrófagos a partículas de látex de 6.4  $\mu\text{m}$  de diámetro en una proporción de 20:1 partículas:célula.

En los grupos de fagocitosis con partículas de látex se observa claramente el marcador de lisosomas, LAPM1 rodeando los fagosomas (Fig. 4, 5 y 6), lo cual sugiere incorporación de membranas lisosomales en la membrana del fagosoma e intercambio de proteínas entre estos

dos organelos, lo que le confiere al fagosoma características asociadas a lisosomas (Granger et al, 1990). Además hay evidencia de nuestro laboratorio que indica pH ácido en este compartimento (Cortazar et al, 2000).

Se pueden apreciar grandes diferencias en cuanto al tamaño del fagosoma, siendo los fagosomas del grupo F<sub>1</sub> (Fig.4) de 51 a 137  $\mu\text{m}^3$  (tabla 2), los del grupo F<sub>2</sub> (Fig.5) de 173 a 274  $\mu\text{m}^3$  y los del grupo F<sub>3</sub> (Fig.6) de 685 a 959  $\mu\text{m}^3$ . Estos valores de volúmenes de fagosomas fueron calculados en el programa Image J® y son similares a los reportados por Niño et al en 2003. La presencia de fagosomas grandes es decir, mayores a 137  $\mu\text{m}^3$  (en los grupos F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub>) causan una disminución en el espacio libre del citoplasma, el cual, ya es bastante reducido en el macrófago por tener un núcleo tan grande. Además los fagosomas aumentan su tamaño al añadir vesículas del tráfico vesicular, desplazando así, la organización celular. A medida que aumenta el tamaño del fagosoma los microfilamentos y microtúbulos van quedando restringidos a la periferia celular. En el grupo de fagocitosis F<sub>1</sub> (Fig.4) tanto microfilamentos como microtúbulos conservan la distribución similar a los controles, pero en los grupos F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> (Fig.5 y 6) los fagosomas ocupan gran parte del citoplasma desplazando los demás organelos incluyendo el citoesqueleto hacia la periferia. Adicionalmente los microtúbulos parecen asociarse a los fagosomas grandes como se observa en el grupo F<sub>3</sub> donde el marcaje de tubulina es más intenso alrededor de los fagosomas.

Grupos	Volúmenes de Fagosomas ( $\mu\text{m}^3$ )
F1	51-137
F2	173-274
F3	689-959
Infección con <i>L. amazonensis</i> (6 h)	95
Infección con <i>L. amazonensis</i> (24 h)	17
Infección con <i>L. amazonensis</i> (48 h)	63-71
Infección con <i>L. amazonensis</i> (72 h)	206-268
Infección con <i>L. braziliensis</i> (12 h)	15
Infección con <i>L. braziliensis</i> (24 h)	39
Infección con <i>L. braziliensis</i> (48 h)	22-57
Infección con <i>L. braziliensis</i> (72 h)	67-129

Tabla 2. Volúmenes en  $\mu\text{m}^3$  de los fagosomas en los diferentes grupos experimentales. Grupos de fagocitosis F1, F2 y F3, infección con *L. amazonensis* 6 horas post-infección, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi, infección con *L. braziliensis* 12 hpi, 24 hpi y 72 hpi.

Liebl y colaboradores en 2009 encontraron que en los macrófagos 30 minutos después de fagocitar partículas de látex de 3,0  $\mu\text{m}$  de diámetro se induce el ensamblaje de actina alrededor del fagosoma de manera transitoria. Esto implica la formación de una barrera que previene la fusión con lisosomas, por tanto, un retraso en la maduración del fagosoma.

Análisis paralelos indican que la polimerización de actina en macropinosomas induce compresión y propulsión que lleva a la constricción y escisión de macropinosomas. Estos resultados sugieren que la maduración de fagosomas individuales, así como la biogénesis y remodelamiento de macropinosomas está regulada por la dinámica de ensamblaje y desensamblaje de actina en las membranas. Nuestros resultados no muestran tal asociación entre fagosomas y filamentos de actina ya que el tiempo observado es de 48 hpi, y tales asociaciones ocurren principalmente al inicio de la formación del fagosoma.

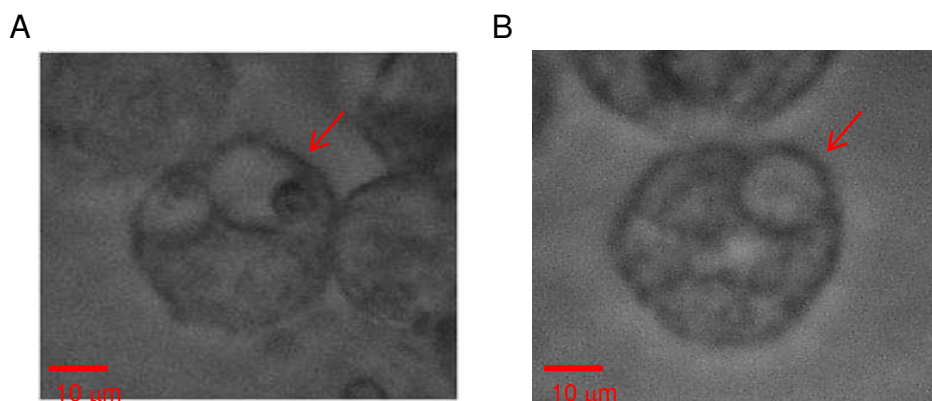


Figura7. VP de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis* 72 hpi (A) y *Leishmania amazonensis* 24 hpi (B).

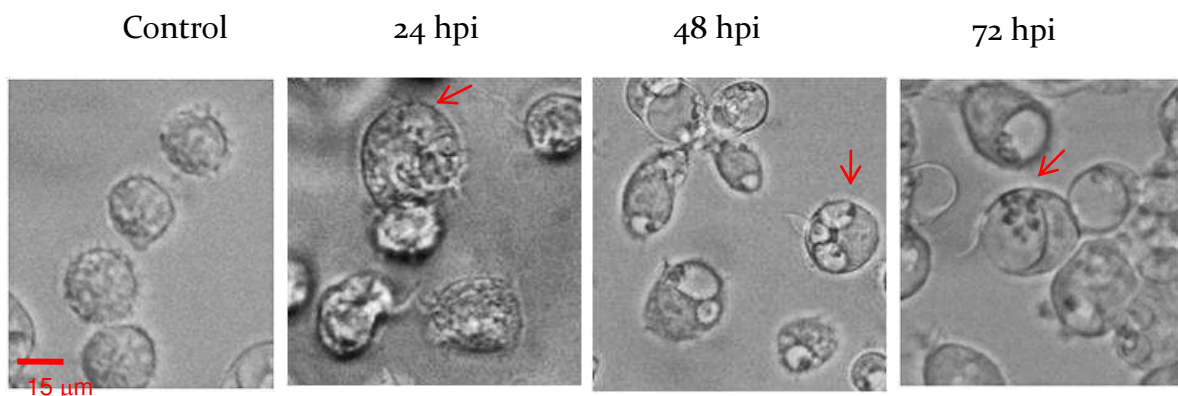


Figura8. Vacuola Parasitófora de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* a las 24, 48 y 72 horas post infección. Las flechas señalan las vacuolas y los parásitos dentro de éstas.





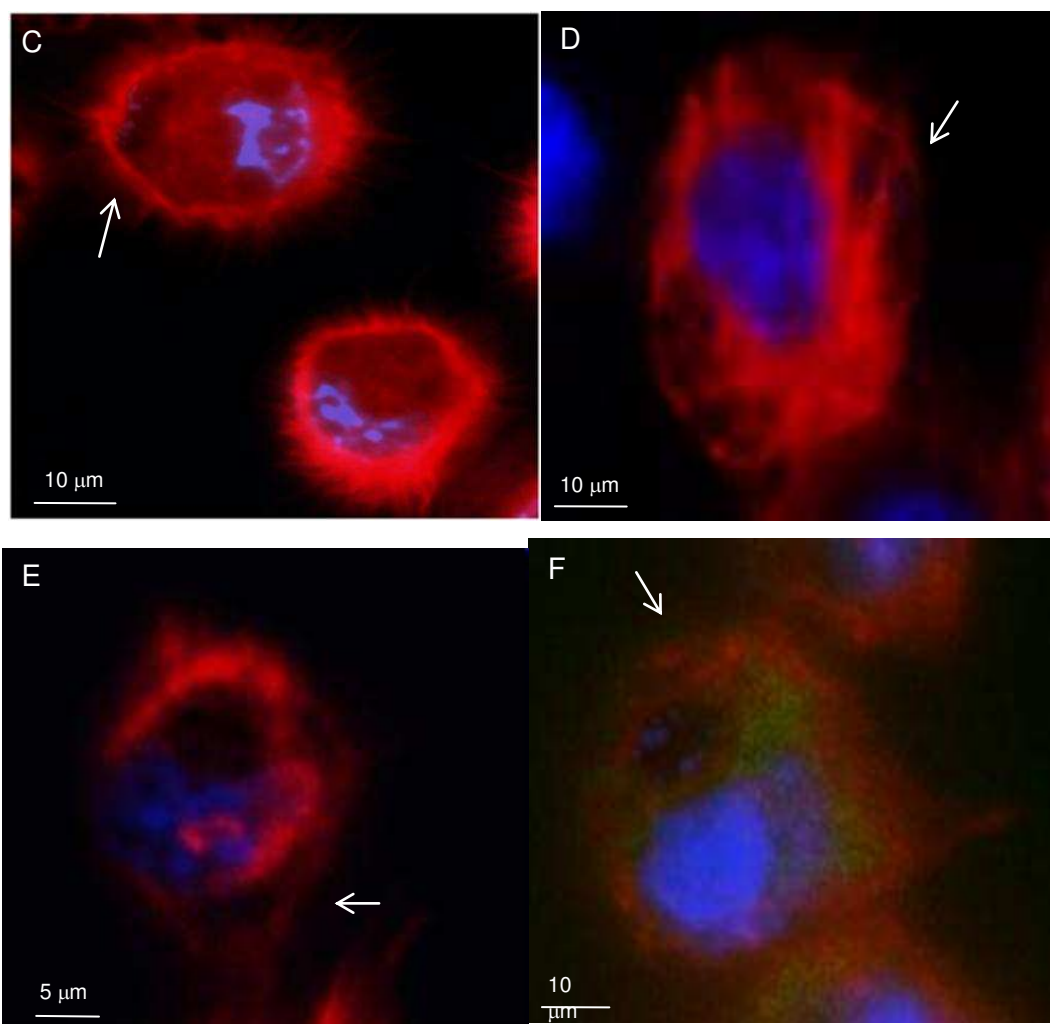


Figura 9. Citoesqueleto de macrófagos murinos J774 infectados con *Leishmania amazonensis*. (A) 24 horas post infección (hpi). (B) 6 hpi (C) 48 hpi (D) 48 hpi (E) 72 hpi (F) 72 hpi Filamentos de actina marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Núcleo marcado con Hoescht 33258. La infección se hizo a una MOI de 1:10 (1 macrófago por 10 parásitos). Las flechas indican la ubicación de las vacuolas que contienen a los parásitos.

Microfilamentos

Microtúbulos

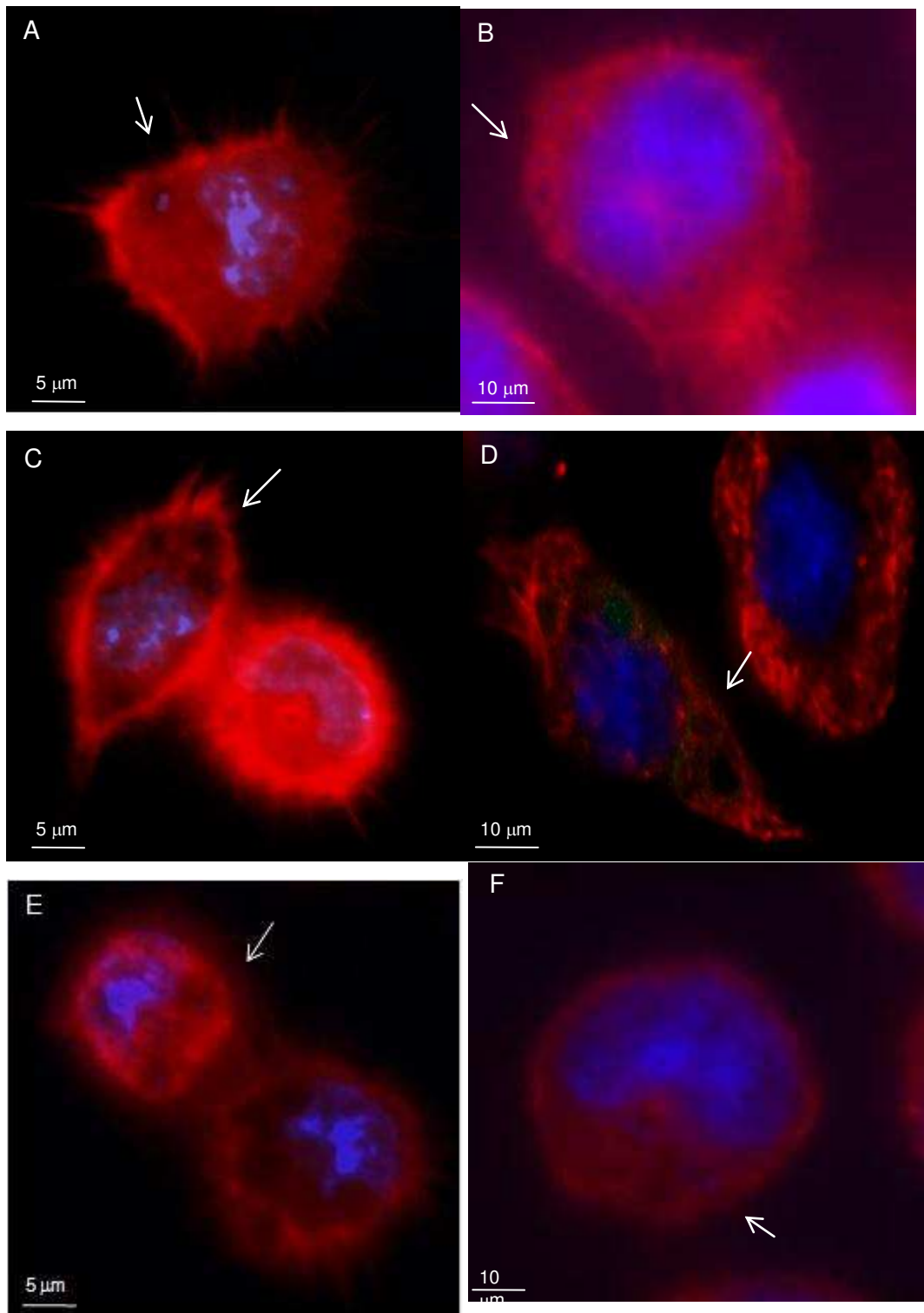


Figura 10. Citoesqueleto de macrófagos murinos J774 infectados con *Leishmania braziliensis*. (A) 12 horas post infección (hpi). (B) 24 hpi (C) 48 hpi (D) 48 hpi (E) 72 hpi (F) 72 hpi Filamentos de actina marcados con anticuerpo anti actina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Microtúbulos marcados con anticuerpo anti tubulina producido en ratón y anticuerpo secundario anti ratón acoplado a Alexa 546. Núcleo marcado con Hoescht 33258. La infección se hizo a una MOI de 1:10 (1 macrófago por 10 parásitos). Las flechas indican la ubicación de las vacuolas que contienen a los parásitos.

En macrófagos infectados y luego marcados por inmunofluorescencia se observa en infección con *L. amazonensis* que las VPs crecen más rápido que las que contienen *L. braziliensis* (comparación entre figuras 9 y 10) similar a lo reportado por Niño et al, 2003 y Fajardo et al, 2005. A las 48 hpi el tamaño de VPs que contienen *L. braziliensis* (Fig. 7 C y D) es similar al tamaño de los fagosomas del grupo F<sub>1</sub> (Fig. 4), mientras que a las 72 hpi los fagosomas que contienen *L. amazonensis* (Fig. 7 E y F) son similares al grupo de fagocitosis F<sub>2</sub> (Fig. 5).

En macrófagos infectados con *L. amazonensis* solo se observa una VP que parece ir aumentando en tamaño durante la infección (Fig. 9), coherente con lo reportado por Courret et al, 2002; León et al, 2005. En macrófagos infectados con *L. braziliensis* se observa más de un fagosoma por célula, lo cual sugiere que los parásitos se replican en fagosomas individuales (Fig. 10) coherente con lo reportado por Niño et al, 2003.

La relación entre proteínas y organelos de la célula hospedera con parásitos intracelulares ha sido ampliamente estudiada en varios modelos de infección. En infección por *Toxoplasma gondii* y *Trypanozoma cruzi* se ha encontrado que las proteínas localizadas en los sitios de contacto entre los parásitos y la célula hospedera están fosforiladas, además al inicio de la fagocitosis hay transferencia de componentes de la superficie de la célula hospedera a la superficie del parásito (de Souza et al, 1998). En células infectadas con *T. gondii* cuyas vacuolas no se acidifican (contrario a las que contienen *Leishmania* que maduran completamente y alcanzan un pH entre 4,7 y 5,2), se reclutan organelos como lisosomas, complejo de Golgi, filamentos de vimentina, microtúbulos y el centro organizador de microtúbulos alrededor de la vacuola parasitófora. El reclutamiento de lisosomas y vesículas en las proximidades de la vacuola posiblemente sirve para facilitar la adquisición de nutrientes desde el hospedero hacia el parásito (Coppens et al, 2006). *T. cruzi* es internalizado por el macrófago pero su desarrollo intracelular no ocurre en una vacuola como en *Leishmania* si no libre en el citoplasma. En el proceso de infección de *T. cruzi* son importantes los microtúbulos y los microfilamentos. En células tratadas con citocalasina D que interfiere en la dinámica de los microfilamentos, se favorece la unión del parásito a la célula, pero se bloquea su internalización. De la misma manera se inhibe la internalización de *T. cruzi* en macrófagos tratados con colchicina, que interfiere con los microtúbulos (Rosstolato et al, 2002). En nuestro modelo de infección la vacuola no parece asociarse con el citoesqueleto, por

el contrario este se ve desplazado por la presencia de una vacuola de gran tamaño. Es probable que esto mismo ocurra con otros organelos que normalmente están en el citoplasma.

La relación entre parásitos y citoesqueleto del hospedero también se ha estudiado en algunas bacterias. *Legionella pneumophila* luego de ser internalizada altera la organización de microfilamentos y el tráfico de proteínas hacia la mitocondria en la célula hospedera (Chong et al, 2009). Se ha encontrado que la toxina EdTx producida por *Bacillus anthracis*, causante del antrax, disminuye la respuesta inmune del hospedero al incrementar los niveles de cAMP, que via PKA y Epac alterando varias de las funciones claves del macrófago como la fagocitosis e interfiriendo con el remodelamiento del citoesqueleto (Yeager et al, 2009).

En la invasión por *Leishmania* y durante la fagocitosis  $F_1$  se observa una caída de la capacitancia del macrófago (Quintana et al. 2010), igual que para  $F_2$  y  $F_3$  (Rodríguez et al. 2005) sugiriendo que la membrana del fagosoma y la VP es donada por la membrana plasmática durante la entrada de partículas y parásitos. La membrana de la VP presenta actividad eléctrica similar a la de la membrana del macrófago y marcación positiva para Lamp1, receptores de rianodina e IP3 sugiriendo la presencia en ésta membrana no solo de membrana del macrófago luego del proceso fagocítico sino además de compartimientos endosomales, lisosomales y de retículo endoplasmático (Pérez et al, 2009). En cuanto al citoesqueleto, se observó que tanto microfilamentos como microtúbulos se distribuyen hacia la periferia del fagosoma o VP sugiriendo que la alteración de la distribución se asocia con el volumen del compartimiento y no con la naturaleza de lo fagocitado, es decir perlas de látex o *Leishmania*. Lo anterior parece indicar que la presencia del parásito no ejerce estímulo alguno en la remodelación del citoesqueleto del hospedero o que las vías usadas por *Leishmania* para alterar la distribución del citoesqueleto convergen con las usadas por el macrófago ante la presencia de una carga fagocítica inerte como las partículas de látex.

## 7.2. NIVELES DE TUBULINA Y ACTINA

Se midieron niveles de proteína para determinar si las alteraciones en la distribución del citoesqueleto se deben a reordenamiento de los microfilamentos y microtúbulos o a disminución en los niveles de las proteínas que los conforman, actina y tubulina, respectivamente.

Inicialmente se lisan las células para extraer las proteínas de interés, para esto se probaron cuatro buffers de lisis, NP-40, 5P8, Tritón X-100 y RIPA y luego se realizó un western blot para la identificación específica de actina y tubulina usando: anticuerpos anti  $\gamma$ -tubulina, anti actina y anti  $\alpha$ -tubulina en donde se observó que solo con tritón X-100 y RIPA dieron buenos resultados, es decir, se observaron bandas oscuras (Fig.11 y 12).

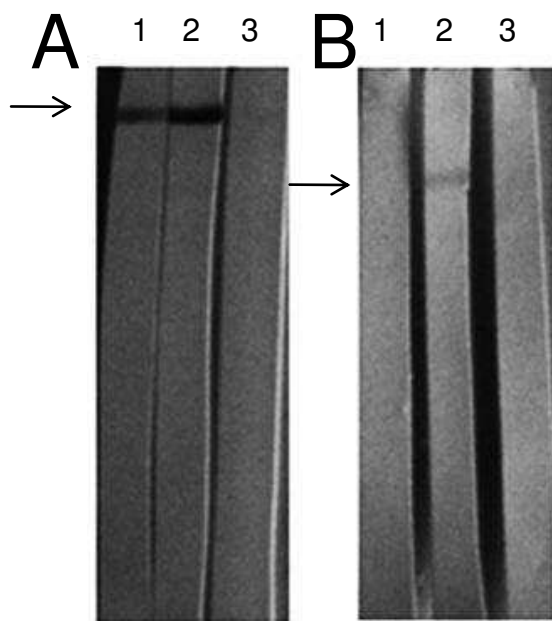


Figura 11. Western blot de  $\gamma$ -tubulina (A) y  $\alpha$ -tubulina (B) después de lisis con los buffers de lisis NP40 (1), RIPA (2) y 5P8 (3), las flechas señalan las proteínas.

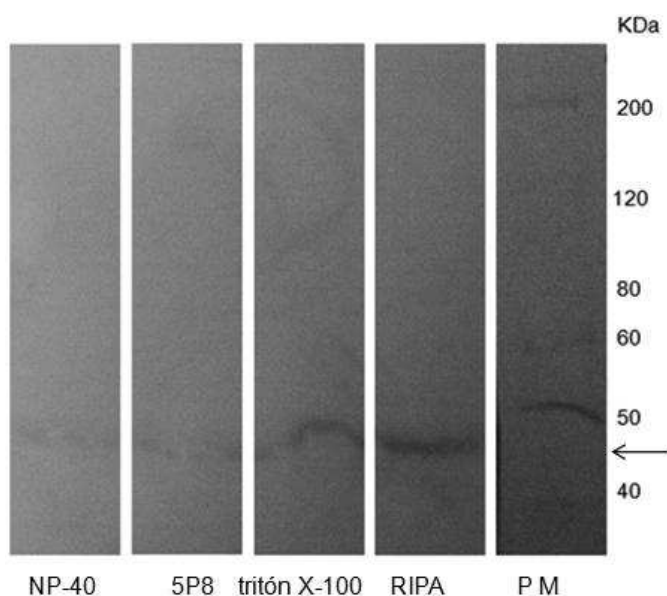


Figura 12. Western blot de actina después de lisis con los buffers de lisis NP40, 5P8, triton X-100 y RIPA, las flechas señalan las proteínas.

### Cuantificación de proteína total

Se cuantificó la proteína total en cada tratamiento con el kit para proteínas Quant-iT de Invitrogen. La cuantificación se realizó con el fin de unificar la cantidad de proteína agregada en los ensayos de electroforesis. Esto es importante ya que un exceso de proteína al inicio puede dar lecturas erróneas al momento de hacer comparación de cantidad de actina o tubulina entre todos los tratamientos.

La cantidad de proteína total encontrada en las muestras estuvo en un rango entre 3,5 y 4,3 mg/ml. Estas muestras luego se diluyeron de tal forma que todas quedaron en la misma concentración antes de someterlas a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

Todos los grupos		Infección con <i>L. amazonensis</i> / Infección con <i>L. braziliensis</i>			
MUESTRA	mg/ml	MUESTRA	mg/ml	MUESTRA	mg/ml
Macrófagos control	3,50	Macrófagos control	3,50	Macrófagos control	3,50
Macrófagos activados	3,70	6 h.p.i.	3,90	6 h.p.i.	4,26
F1	3,34	12 h.p.i.	4,07	12 h.p.i.	3,69
F2	3,77	24 h.p.i.	3,67	24 h.p.i.	4,33
F3	4,03	48 h.p.i.	3,82	48 h.p.i.	3,92
Infección con <i>L. amazonensis</i> (48 hpi)	3,82	72 h.p.i.	3,78	72 h.p.i.	4,03
Infección con <i>L. braziliensis</i> (48 hpi)	3,92				

Tabla 3. Cuantificación de proteína total en todos los grupos experimentales. Se tomaron muestras que contenían  $2 \times 10^6$  células y se cuantificaron con el kit para proteínas Quant-iT de Invitrogen.

Para evaluar y comparar los niveles de actina y tubulina se recolectaron muestras a partir de 3 experimentos independientes y se realizaron ensayos de Western blot. En la figura 13 se muestran los resultados de uno de los experimentos, en el cual se encontraron bandas de aproximadamente 55 KDa que corresponden a tubulina (flechas en Fig. 13 A, B y C) y de 43 KDa para actina (flechas en Fig. 13 D, E, F).

Se evaluó si la presencia de citoesqueleto del parásito podría alterar las medidas de tubulina y actina del macrófago en los grupos de infección. Esto se hizo con un experimento en paralelo, en el cual se tomó una muestra de  $3 \times 10^6$  parásitos (número equivalente al de una infección) y se evaluó por western blot. Se encontró que las proteínas provenientes de esta cantidad de parásitos no se pueden detectar (Fig. 13A, B, D y E, carril 7), por tanto, no afectarían la medida de tubulina y actina de los macrófagos. Como control positivo para actina se utilizó el péptido de bloqueo para el anticuerpo anti actina (Fig. 13, carril 13).



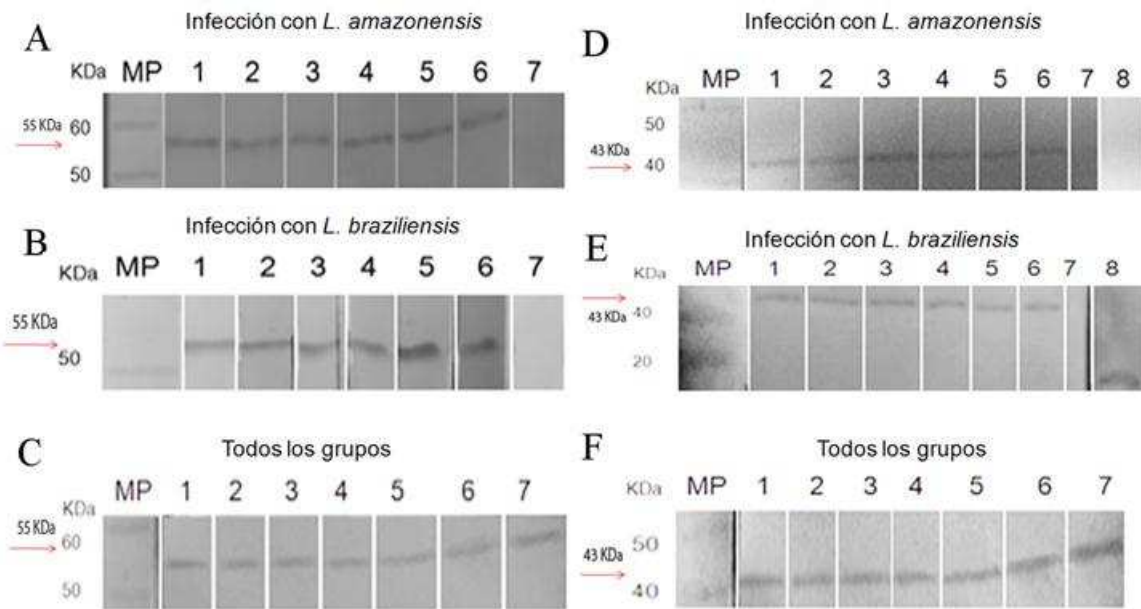


Figura 13. Niveles de las proteínas tubulina (A-C) y actina (D-F) determinados por Western blot con anticuerpos monoclonales anti-tubulina y anti-actina. Extractos de macrófagos ( $2 \times 10^6$  células) infectados con *L. amazonensis* (A y D) y *L. braziliensis* (B y E). **1.** Macrófagos control, **2.** 6 horas post-infección (hpi), **3.** 12 hpi, **4.** 24 hpi, **5.** 48 hpi, **6.** 72 hpi, **7.** Extracto de *Leishmania* ( $3 \times 10^6$  parásitos), **8.** Péptido de bloqueo de actina como control positivo. Comparación de los niveles de tubulina (C) y actina (F) entre: **1.** macrófagos control, **2.** activados, **3.** grupo de fagocitosis F<sub>1</sub>, **4.** grupo de fagocitosis F<sub>2</sub>, **5.** grupo de fagocitosis F<sub>3</sub>, **6.** 48 hpi con *L. amazonensis* y **7.** 48 hpi con *L. braziliensis*.

Los niveles de proteínas tubulina y actina son similares en todos los grupos experimentales (Fig. 13), como se puede observar la intensidad de las bandas en todos los tratamientos parece ser similar (Fig. 14). Esto se comprobó estadísticamente por medio de la prueba ANDEVA de una vía, estableciendo como hipótesis nula que los niveles de actina o tubulina son iguales entre todos los grupos experimentales. Antes de realizar la prueba ANDEVA se verificó el cumplimiento de los requisitos (distribución normal e independiente con media cero y varianza constante) mediante el examen de los residuales (Fig. 14, solo se muestra para actina en todos los grupos). El diagrama de cajas (Fig. 15) muestra como se distribuyen las medias de los tratamientos.

Niveles de actina en todos los grupos

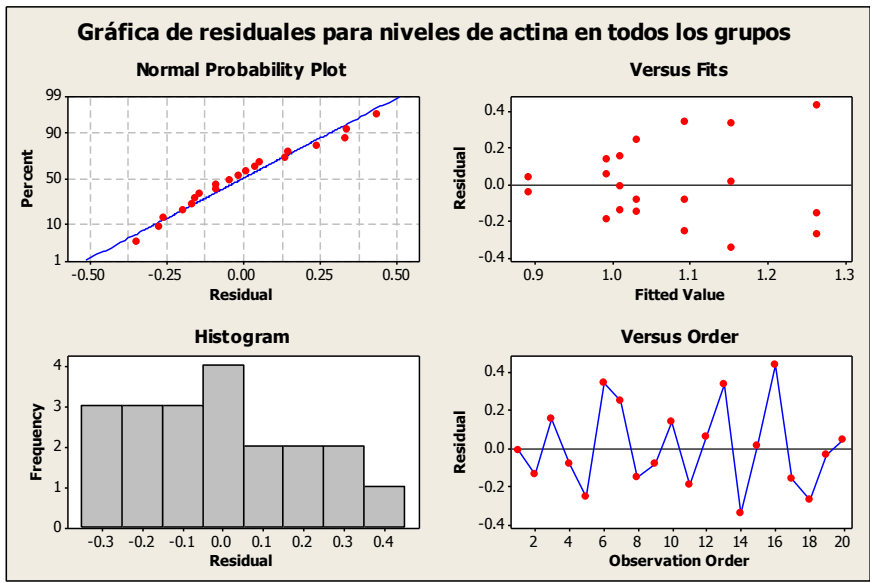


Figura 14. Examen de los residuos de niveles de actina en todos los grupos experimentales, indicando distribución normal, independencia y varianza constante.

Homocedasticidad  
Normalidad

The plot is used to detect non-linearity, unequal error variances, and outliers.  
Independencia

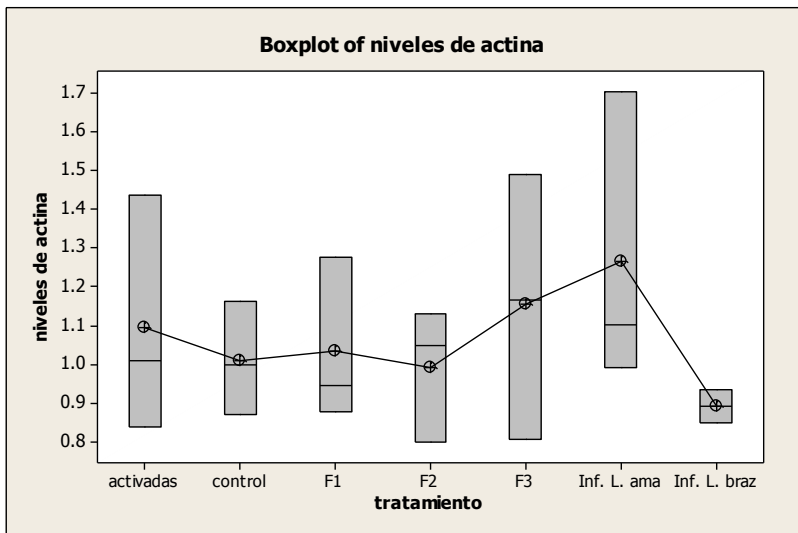


Figura 15. Diagrama de cajas de niveles de actina. Se muestra la distribución de los datos, los círculos en las barras indican la media de cada tratamiento. El experimento tiene 3 réplicas.

### One-way ANOVA: niveles de actina en todos los grupos

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamiento	6	1,445	0,241	0,58	0,742
Error	14	5,837	0,417		
Total	20	7,282			

S = 0,6457 R-Sq = 19,84% R-Sq(adj) = 0,00%

### One-way ANOVA: niveles de actina en Infección con *L. amazonensis*

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamiento	5	0,038	0,008	0,06	0,997
Error	12	1,531	0,128		
Total	17	1,569			

S = 0,3572 R-Sq = 2,43% R-Sq(adj) = 0,00%

### One-way ANOVA: niveles de actina en Infección con *L. braziliensis*

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamientos	5	0,0393	0,0079	0,10	0,990
Error	12	0,9272	0,0773		
Total	17	0,9665			

S = 0,2780 R-Sq = 4,06% R-Sq(adj) = 0,00%

### One-way ANOVA: niveles de tubulina en todos los grupos

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamiento	6	1,037	0,173	1,01	0,459
Error	14	2,405	0,172		
Total	20	3,442			

S = 0,4145 R-Sq = 30,14% R-Sq(adj) = 0,20%

### One-way ANOVA: niveles de tubulina en infección con *L. amazonensis*

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamiento	5	0,053	0,011	0,09	0,992
Error	12	1,389	0,116		
Total	17	1,442			

S = 0,3403 R-Sq = 3,65% R-Sq(adj) = 0,00%

### One-way ANOVA: niveles de tubulina en infección con *L. braziliensis*

Source	DF	SS	MS	F	P
tratamiento	5	0,195	0,039	0,31	0,895
Error	12	1,491	0,124		
Total	17	1,686			

S = 0,3525 R-Sq = 11,58% R-Sq(adj) = 0,00%

En todas las pruebas ANDEVA el valor p es mayor que 0,01, por tanto, no existe suficiente

evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, es decir, los niveles de actina y tubulina en los grupos experimentales parecen ser iguales, lo cual indicaría que la presencia de volúmenes grandes de fagosomas, causados por partículas de látex o infección por *Leishmania* no alteraría los niveles de las proteínas actina y tubulina.

Las alteraciones en los niveles de proteínas del citoesqueleto también se han evaluado en otras infecciones. En la infección de citomegalovirus en fibroblastos se ha observado que hay ruptura en los microfilamentos del fibroblasto, acompañado de alteraciones en los niveles de actina. Hay incremento de los niveles de actina a las 24 horas de infección y luego disminución a las 72 y 96 horas de infección (Jiang et al,2006). En nuestro modelo los niveles de actina parecen ser constantes durante la progresión de la infección, lo que puede estar variando es el grado de polimerización, ya que con el aumento del volumen de la vacuola parasitófora el citoesqueleto va quedando desplazado a la periferia de la célula. En células HeLa infectadas por *E. coli* hay alteración en el grado de polimerización de los microfilamentos. En células infectadas hay disminución de G-actina y esta disminución es mayor cuando la infección es adherente localizada que cuando es difusa, además citocalasina B inhibe el proceso de invasión, sugiriendo la importancia de la polimerización de actina para formar los microfilamentos en el proceso de infección (Karmaker et al,1996).

En infección por *Neisseria* en células epiteliales la proteasa IgA1 es indispensable para la supervivencia al degradar proteínas importantes para la acción microbicida de la célula. IgA1 es capaz de disminuir los niveles de LAMP1 junto con otras proteínas marcadoras de lisosomas como LAP y CDC63. En contraste, no hay degradación de otros componentes celulares como beta-tubulina y el receptor de factor de crecimiento epidermal (Ayala et al, 1998).

Las alteraciones en la distribución de microfilamentos y microtúbulos no parecen acompañarse de alteraciones en la cantidad de tubulina (Fig. 13A-C) y actina (Fig. 13D-F) en vista que la densidad de las bandas es similar para los grupos de infección por *Leishmania* y fagocitosis.

En infección por *Leishmania* y en fagocitosis de partículas de látex, la remodelación del citoesqueleto y la presencia de una vacuola parasitófora grande posiblemente conllevan a

alteraciones en el tráfico vesicular del macrófago, lo cual implica una disminución en su capacidad para responder adecuadamente a una infección. Las repuestas que se ven afectadas con la infección son las que se han mencionado en este texto, como producción de óxido nítrico (que necesita de la correcta ubicación de la enzima iNOS), secreción de citoquinas (TNF- $\alpha$  e IL-12) y presentación de antígenos, entre muchas otras que involucran el tráfico vesicular. Sería interesante evaluar como es la relación entre la vacuola parasitófora y los demás organelos involucrados en la secreción de efectores químicos como el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y endosomas.

Los logros más importantes de este trabajo son: La estandarización para el doble marcaje de citoesqueleto en macrófagos J774, que incluye un modo de fijar diferente al convencional de tal manera que se preservan estructuras nativas en la célula, lo cual es ideal para estudiar proteínas del citoesqueleto que son muy sensibles a cambios físicos y químicos. Gracias a esto se obtuvieron imágenes de citoesqueleto de excelente calidad. Además se hicieron dobles marcajes de citoesqueleto y lisosomas para observar la relación con los fagosomas y se obtuvieron imágenes de citoesqueleto en macrófagos control y activados (de esto hay poca información en la literatura).

Se determinó el impacto de fagosomas grandes sobre un elemento importante en la función de macrófagos, el citoesqueleto. Esto sirve como punto de partida para estudiar otros organelos y proteínas cuya distribución se espera que este alterada.

Se estandarizó la medición de las proteínas del citoesqueleto por western blot y comparaciones entre los grupos experimentales. Esta metodología puede usarse para comparar otras proteínas de interés para nuestro grupo de investigación, como citoquinas y moléculas de señalización intracelular que podrían disminuir en macrófagos infectados por *Leishmania*.

## 8. CONCLUSIONES

Nuestros resultados indican que la presencia de volúmenes mayores que  $173 \mu\text{m}^3$  al interior del macrófago, alteran la distribución intracelular de microfilamentos y microtúbulos. La alteración en la distribución se podría atribuir a redistribución espacial de estos componentes del citoesqueleto ante la presencia de fagosomas de gran volumen, independiente de la naturaleza de lo fagocitado (*Leishmania* o perlas de látex) y no por la cantidad de proteína disponible.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Al Haddad A, Shonn MA, Redlich B, Blocker A, Burkhardt JK, Yu H, Hammer JA. III, Weiss DG, Steffen W, Griffiths G, Kuznetsov SA. Myosin Va bound to phagosomes binds to F-actin and delays microtubule-dependent motility, *Mol. Biol. Cell* 12. 2001. 2742–2755.
- [2] Aderem A and Underhill, D, M. Mechanism of phagocytosis of macrophages. *Ann Rev Immunol*. 1999; 17: 593-623.
- [3] Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*. 1999; 112:2993-3002.
- [4] Alexander S. Davis, Isabelle Vergne, Sharon S. Master, George B. Kyei, Jennifer Chua, Vojo Deretic. Mechanism of Inducible Nitric Oxide Synthase Exclusion from Mycobacterial Phagosomes. *PLoS Pathog*. 2007;3(12):e186.
- [5] Allan VJ. Motoring around the Golgi. *Nat. Cell Biol*; 2002. 4, E236–E242
- [6] Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol*. 7: 1998. 392-401.
- [7] Antoine JC, Prina E, Courret, N, Lang, T. Leishmania spp.: on the Interactions They Establish with Antigen-Presenting Cells of their Mammalian Hosts. *Adv Parasitol*. 2004. Pages 1-68
- [8] Ayala P, Lin L, Hopper S, Fukuda M, So M. Infection of epithelial cells by pathogenic neisseriae reduces the levels of multiple lysosomal constituents. *Infect Immun*. 1998 Oct;66(10):5001-7.

[9] Blocker A, Severin FF, Burkhardt JK, Bingham JB, Yu H, Olivo JC, Schroer TA, Hyman AA, Griffiths G. Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules, *J. Cell Biol.* 137. 1997. 113–129.

[10] Bray D. *Cell Movements: From Molecules to Motility*, 2nd edn. New York: Garland Publishing. 2001.

[11] Camargo ME. Determinación de la producción de óxido nítrico en macrófagos J774.1 activados como respuesta al tamaño de la carga fagocítica de partículas de látex y *Leishmania amazonensis*. Trabajo de grado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Mención Meritoria. 2000.

[12] Coppens I, Dunn JD, Romano JD, Pypaert M, Zhang H, Boothroyd JC, Joiner KA. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):261-74.

[13] Cortázar T. Estudios de permeabilidad del fagosoma que contiene al protozoario *Leishmania amazonensis* (trabajo de grado). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2000.

[14] Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P and Antoine JC. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* 2002. 115, 2303-2316.

[15] Cunha FQ, Assreuy J, Moncada S, Liew FY. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology.* 1993. 79:408-411.

[16] Dave RK, Hume DA, Elsegood C, Kellie S. CD148/DEP-1 association with areas of cytoskeletal organisation in macrophages. *Exp Cell Res.* 2009 Jun 10;315(10):1734-44. Epub 2009 Mar 5.



[17] de Waal Malefyt, R, Figdor C, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennett B, Culpepper J, Dang W, Zurawski G, de Vries E. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol*. 1993. Dec 1;151(11):6370-81.

[18] de-Souza W, de-Carvalho TU, de-Melo ET, Soares CP, Coimbra ES, Rosestolato CT, Ferreira SR, Vieira M. The use of confocal laser scanning microscopy to analyze the process of parasitic protozoon-host cell interaction. *Braz J Med Biol Res*. 1998 Nov;31(11):1459-70. Review.

[19] Defacque H, Egeberg M, Habermann A, Diakonova M, Roy C, Mangeat P, Voelter W, Marriott G, Pfannstiel J, Faulstich H, Griffiths G, Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes, *EMBO J*. 19.2000.199–212.

[20] DesjardinsM, HuberLA, PartonRG, GriffithsG. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus, *J. Cell Biol*. 1994. 124. 677–688.

[21] Duclos S, Desjardins M. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol*. 2000; 2:365-377.

[22] Fajardo JC. Estudios sobre el impacto de la infección por *Leishmania braziliensis* en las propiedades de membrana de macrófago murino. Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Tesis de maestría. 2005.

[23] Gallego JC, Quintero C. POE: Inmunomarcaje de células infectadas: Marcaje de citoesqueleto y virus. 2007-05-28

[24] Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.

- [25] Granger B, Green S, Gabel C, Howe C, Mellman I, Helenius A. Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J Biol Chem*. 1990 Jul 15;265(20):12036-43.
- [26] Grimaldi GJr, Tesh RB, McMahon-Pratt D 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41: 687-725.
- [27] Grzanka A, Izdebska M, Litwiniec A, Grzanka D, Safiejko-Mrocicka B. Actin filament reorganization in HL-60 leukemia cell line after treatment with G-CSF and GM-CSF. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(3):191-7.
- [28] Harlow E, Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY: 1988), p 449.
- [29] Holm A, Tejle K, Magnusson K, Descoteaux A, Rasmusson B. 2001. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* 3 (7), 439–447.
- [30] Informe epidemiológico mensual. Ministerio de la Protección Social. Mes 02. 2009
- [31] Jiang YL, Lin MF, Zhao GS.[Impaired microfilament cytoskeleton rearrangement in cytomegalovirus infected cells]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006 Sep;35(5):501-6.
- [32] Karmaker S, Chaudhuri AG, Ganguly U. Comparison of cytosolic levels of calcium and G actin in diffuse and localised adherent *Escherichia coli*-infected HeLa cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1996 Jan 15;135(2-3):245-9.
- [33] Kim JY, Lee YG, Kim MY, Byeon SE, Rhee MH, Park J, Katz DR, Chain BM, Cho JY. Src-mediated regulation of inflammatory responses by actin polymerization. *Biochem Pharmacol*. 2010 Feb 1;79(3):431-43. Epub 2009 Sep 19.

- [34] Klimp A, de Vries E, Scherphof G, Daemen T. 2002. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. Nov;44(2):143-61.
- [35] Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (Eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, p.1-120.
- [36] Langermans J, Hazenbos W. and Furth, R. Antimicrobial Functions of Mononuclear Phagocytes. *J. Immunol. Metha*. 1994;174:185-194.
- [37] León S, Díaz JC, Corrales A, Camacho M (2005) La salida de *Leishmania amazonensis* de su célula hospedera está asociada con procesos de fusión de membranas. XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, 3 a 6 de noviembre. *Biomédica*; 2005;25(S1):173.
- [38] Liebl D, Griffiths G. Transient assembly of F-actin by phagosomes delays phagosome fusion with lysosomes in cargooverloaded macrophages. *J Cell Sci*. 2009. 122 (16), 2935-2945
- [39] Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. Fourth Edition. W. H. Freeman and Company. NY. 2000.
- [40] May R, Machesky L. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*. 2001;114,1061-1077
- [41] Mellman I, Quo vadis: polarized membrane recycling in motility and phagocytosis, *J. Cell Biol*. 149 (2000) 529–530.
- [42] Miller BH, Fratti RA, Poschet JF, Timmins GS, Master SS, Burgos M, Marletta MA, Deretic V. Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect Immun*. 2004 May;72(5):2872-8.

- [43] Naderer T, McConville MJ. The Leishmania–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008; 10(2), 301–308.
- [44] Niño A. Impacto del volumen del fagosoma en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos murinos activados. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Aprobada. Mención Meritoria. 2003
- [45] Niño A, Camacho M. Impacto del volumen del fagosoma en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos murinos activados. *Biomédica* 2003; 23(S1):50.
- [46] Niño A, Camacho M. Impacto del volumen del fagosoma en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos murinos activados. *Acta Biológica Colombiana*, 2004; 9:94-95.
- [47] Niño A, Lagos L, Camacho M. La disminución de óxido nítrico asociada a volúmenes grandes de fagosoma no se acompaña de alteraciones en el nivel de mensajero de la óxido nítrico sintasa. XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, 3 a 6 de noviembre. *Biomédica.* 2005; 25(S1):171
- [48] Pelham HR. SNAREs and the specificity of membrane fusion *Trends Cell Biol.* 2001;11: 99-101.
- [49] Pérez C, Stuhmer W, Camacho M (2009) Canales de cloruro y potasio en la membrana de la vacuola parasitófora de *Leishmania amazonensis*. XIV congreso colombiano de parasitología y Medicina Tropical, Medellín octubre 8-11. *Biomédica.* 29(S)193-194.
- [50] Peters C, Stierhof YD, Ilg T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immun* 1997; 65:783-786
- [51] Quintana E, Torres Y, Alvarez C, Rojas A, Forero ME, Camacho M. (2010) Changes in macrophage membrane properties during early *Leishmania amazonensis* infection differ from

those observed during established infection and are partially explained by phagocytosis. *Exp Parasitol.* 124:258–264.

[52] Reiner NE. Altered cell signalling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunol Today.* 1994;15:374-381.

[53] Rodríguez I, Lozano Y, Torres Y, Forero ME, Camacho M (2005) Los cambios en las propiedades de membrana de macrófagos infectados por *Leishmania* en las primeras horas postinfección (<12 horas) son similares al proceso de fagocitosis. XII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical, Bogotá, 3 a 6 de noviembre. *Biomédica* 2005;25(S1):172.

[54] Roitt, I. *Immunology Fundamentals.* 7 ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires. 1991.

[55] Rogers SL, Gelfand VI, Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton, *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000. 12. 57–62.

[56] Rosestolato CT, Dutra Jda M, De Souza W, de Carvalho TM. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct.* 2002 Apr;27(2):91-8.

[57] Turpin J, López-Berestein G. Differentiation, maturation, and activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by a continuum of maturation. 1993. 71-99.

[58] Vannier-Santos, M. Martiny, A. de Souza, W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Curr Pharm Des.* 2002. 8: 297-318.

[59] Varin A, Gordon S. Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology.* 2009 Jul;214(7):630-41.

[60] Vieira OV, Botelho RJ, Grinstein S. Phagosome maturation: aging gracefully. *Biochem. J.* 2002, 366, 689-704

[61] Wessel D, and Fugge, U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 1984, 138; 141-143

[62] WHO-World Health Organization 2004. On behalf of the special programme for research and training in tropical disease (WHO/TDR). *Disease Watch Focus: Leishmaniasis.*

[63] Xu YZ, Thuraisingam T, Morais DA, Rola-Pleszczynski M, Radzioch D. Nuclear translocation of beta-actin is involved in transcriptional regulation during macrophage differentiation of HL-60 cells. *Mol Biol Cell.* 2010 Mar;21(5):811-20. Epub 2010 Jan 6.

[64] Yeager LA, Chopra AK, Peterson JW. *Bacillus anthracis* edema toxin suppresses human macrophage phagocytosis and cytoskeletal remodeling via the protein kinase A and exchange protein activated by cyclic AMP pathways. *Infect Immun.* 2009 Jun;77(6):2530-43. Epub 2009 Mar 23.