UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudios de secreción de IL-12 en macrófagos J774A.1

Angela Patricia Rojas Rojas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química.

Bogotá, D.C., Colombia

2012

Estudios de secreción de IL-12 en macrófagos J774A.1

Angela Patricia Rojas Rojas

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Doctor en Ciencias Química

Directora:

Marcela Camacho M.D, Ph.D.

Grupo de Investigación:

Biología y Biofísica de Membranas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biologia

Bogotá D.C., Colombia

2012

Agradecimientos

- Al Grupo de Biofísica y Biología de membranas. CIF-Universidad Nacional
- A la Profesora Marcela Camacho. Grupo de Biofísica y Biología de membranas. CIF. Universidad Nacional de Colombia
- A la Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química
- Al Profesor Alfonso Barreto. Pontificia Universidad Javeriana.
- Al Dr. Alejandro Caicedo. Diabetes Research Institute. Universidad de Miami.
- Al Dr. Alfredo Cáceres. Instituto Martínez Ferreira. Universidad de Córdoba. Argentina
- A Gladys Montoya, Adriana Urbina, Martha Lucía Posada, Grupo de Biofísica y Biología de membranas. CIF. Universidad Nacional de Colombia
- A la vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia por su financiación a través de los proyectos :
- Camacho M, Sánchez M, Gómez MP, Stuhmer W (2010) Estudios de la membrana de la vacuola parasitófora de *Leishmania*. 519-2010 Banco proyectos Salud-nacional Colciencias, 222851928951, Código Hermes 13002
- Camacho M, Rojas A. Estudios de secreción de IL-12 en macrófagos de la línea celular J774A.1. Convocatoria: "apoyo de la DIB a tesis de investigación en pos-grados" a proyectos de tesis y trabajos de investigación.2009. Código DIB. 8003314.

A mis padres, Manuela y Federico

CONTENIDO

RESÚMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN 1

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 2

3. HIPÓTESIS 2

4. OBJETIVOS 3

4.1 Objetivo general 3

4.2 Objetivos específicos 3

5. MARCO TEÓRICO 4

5.1 Ruta endocítica y tráfico vesicular 5

5.1.1 Rab GTPasas 5-8

5.1.2**.** Proteínas de membrana LAMP-1 y LAMP-2 8-9

5.1.3 Fagocitosis de partículas de látex como un modelo *in vitro* de fagosoma 9-10

5.1.4 Origen de la membrana fagolisosomal 10-12

5.2 Ruta secretora-biosintética y tráfico vesicular 12

5.2.1 Proteínas SNARE. 13

5.2.2 Cubiertas COP II 14-15

5.2.3 Proteínas cargo 16

5.2.4 Brefeldina A y transporte de proteínas 16-17

5.4 Ciclo de vida de *Leishmania* 17-18

5.4.1 IL-12 19-20

5.4.2 IL-12 y maduración de fagosomas 21

6. MATERIALES Y MÉTODOS 22

6.1. Modelo *Leishmania*-macrófago 22

6.2. Cultivo de *Leishmania amazonensis* 22

6.3. Cultivo de macrófagos J774A.1 23

6.4. Infección de macrófagos J774A.1 con *L. amazonensis* 23

6.5. Fagocitosis de perlas de látex 23

6.6. Ensayos de activación 24

6.7. Diseño de Primers 24-25

6.8. Evaluación de fragmentos por PCR 25

6.8.1. Purificación de productos de PCR 26

6.8.2. Cuantificación de productos purificados 26

6.9. Secuenciación de fragmentos de PCR 26

6.9.1 Análisis de secuencias 26

6.10 Clonación 26

6.10.1 Optimización inserto/vector (radio/molar) 26

6.10.2 Ligación y transformación 27

6.10.3 Selección de clones recombinantes 27

6.11 PCR de colonia 27

6.12 Purificación de DNA plasmídico 27

6.12.1 Recolección de bacterias 28

6.12.2 Lisis alcalina 28

6.12.3 Neutralización 28

6.12.4 Aislamiento de plásmidos 28

6.13 Cuantificación de plásmidos 28

6.14 Secuenciación y análisis de secuencias 28

6.15 Determinación de número de copias de plásmidos 28

6.16 Extraccción de RNA y síntesis de cDNA 29

6.17 Optimización de la concentración de primers para PCR en tiempo real 30

6.18 Confirmación de la amplificación específica 30

6.19 Elaboración de la curva standard para cuantificación absoluta 30

6.20 Análisis de la ubicación intracelular de IL-12 p40/70 y p40. Ensayos por microscopia confocal 30-31

6.20.1 Condiciones de exposición y análisis de imágenes (cuantificación de fluorescencia) 31

6.21 Secreción de citoquinas por citometría de flujo 32-33

6.22 Análisis estadístico 33

7 RESULTADOS Y DISUSIÓN 34

7.1. Cuantificación de IL-12 p70 en macrófagos primarios. 34-40

7.2. Cuantificación de IL-12 p70 en macrófagos de la línea celular J774A.1 40-45

7.3. Efecto de la infección por *L. amazonensis* 48 hpi en la secreción de IL-12 p70 en macrófagos J774A.1. 45-54

7.4. Efecto de la fagocitosis en la secreción de IL-12 p70 54-59

7.5 Cinética de la distribución de IL-12 p40/70 y p40. Caracterización de la ruta secretora en macrófagos J774A.1 59-63

7.5.1 Inhibición del tráfico vesicular de IL-12 63-65

7.6. Efecto de la infección por *L. amazonensis* 24 hpi en la distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1. Caracterización de la ruta secretora y endocítica 66-74

7.7 Efecto de la infección por *L.amazonensis* 48 hpi en la distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1 y ruta secretora. 75-78

7.8. Efecto de la fagocitosis en la distribución de IL-12 p40 y ruta secretora en macrófagos J774A.1 79-81

7.9. Modelos de tráfico vesicular y topología de IL-12 en infección por *L.amazonensis* 81-83

8 CONCLUSIONES 84

9 PERSPECTIVAS FUTURAS 85

A. Anexo: Plots de curvas estándar empleadas en la cuantificación de citoquinas por CBA 86

B. Anexo: Cuantificación de IL-12p70 por CBA 86

C. Anexo: Diseño de *primers* por Primer 3para las subunidades p40 y p35 de IL-12 87

BIBLIOGRAFÍA 88-106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de secreción de citoquinas en macrófagos primarios cepa ICR.

Figura 2. Perfil de secreción de citoquinas en macrófagos primarios cepa BALB/c

Figura 3. Secreción de citoquinas en macrófagos primarios ICR y en la línea celular J774A.1

Figura 4. Cinética de secreción de citoquinas en macrófagos J774A.1

Figura 5. Efecto de la infección por *L.amazonensis* 48h en la secreción de IL-12 p70 en macrófagos J774A.1

Figura 6. Efecto de la fagocitosis de partículs inertes en la secreciónde IL-12p70 en macrófagos J774A.1

Figura 7. Perfil de secreción de citoquinas en fagocitosis de macrófagos J774A.1

Figura 8. Producción de IL-12p40/70 y p40 en macrófagos J774A.1 sin estímulo

Figura 9. Cinética de la producción de IL-12p40/70 y p40 en macrófagos J774A.1

Figura 10. Producción de IL-12p40/70 en macrófagos peritoneales ICR

Figura 11. Inhibición del tráfico vesicular de IL-12p40 por BFA

Figura 12. Efecto de la infección por *L. amazonensis* 24hpi en la distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1

Figura 13. Efecto de la infección por *L. amazonensis* 24hpi en la distribución de IL-12 p40/70 en macrófagos J774A.1

Figura 14. Distribución de IL-12p40/SNAP-23 en macrófagos J774A.1 en infección por *L. amazonensis* 24hpi.

Figura 15. Distribución de IL-12 p40/LAMP-1 en macrófagos J774A.1en infección por *L.*

amazonensis 24 hpi.

Figura 16. Efecto de infección por *L. amazonensis* 48 hpi en la distribución de IL-12 p40/GM-130.

Figura 17. Efecto de fagocitosis F_1 en la distribución de IL-12 p40/GM-130

Figura 18. Efecto de fagocitosis F_2 en la distribución de IL-12 p40/GM-130

Figura 19. Modelos de tráfico vesicular y topología de IL-12 en infección por L. *amazonensis*

Figura 20. Retención intrcelular de IL-12p40 en fagocitosis de partículas de látex

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.Secuencia reportada de los fragmentos purificados correspondientes a las subunidades p40 y p35 de IL-12.

RESÚMEN

El tráfico de membranas en macrófagos activados es requerido para dos eventos críticos en la inmunidad innata, como son fagocitosis y secreción de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, no existe evidencia significativa a cerca de las rutas de secreción en macrófagos, excepto para IL-1 β (Andrei *et al.,* 2004) y TNF-α, en infección por *Cándida albicans* (Murray *et al.,* 2005) y *Leishmania amazonensis* (Montoya, 2010), a diferencia de la secreción en células endocrinas y neuroendocrinas donde la evidencia es muy amplia. Por lo tanto, ésta propuesta está basada en el convencimiento que sólo una comprensión adecuada de la secreción de mediadores químicos por parte del macrófago permitirá determinar qué respuestas son o no específicas de la infección por *Leishmania*.

Se evaluaron la secreción de IL-12p70 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos de la línea celular J774A.1 por ensayos de citometría de flujo, la localización y distribución de IL-12p40/ 70 y p40 por microscopía confocal en diferentes grupos experimentales: macrófagos activados con INF y LPS, infección por *Leishmania* y fagocitosis de partículas de látex que generan diferentes tamaños de fagosoma (28 μm^3, 136 μm^3 similar a la infección 48hpi y fagosomas grandes >370μm^3), para determinar el impacto del volumen del fagosoma sobre localización, distribución y secreción de IL-12. Nuestros resultados muestran que IL-12 no se produce de manera constitutiva en macrófagos J774A.1; se produce de manera regulada, inducida por estímulo con INF-γ y LPS. *L. amazonensis*, induce disminución de la producción de IL-12p70 y desactivación en macrófagos estimulados con INF-γ y LPS. IL-12p40/70 es retenida en compartimentos del RE-Golgi y compartimentos endolisosomales donde colocaliza con marcadores como CALNEXINA, SNAP-23 y LAMP-1 respectivamente. La colocalización de IL-12 con estos

marcadores, sugiere exocitosis de esta proteína mediada por: 1. vesículas secretoras por la ruta de secreción biosintética, 2. Lisosomas secretorios por la ruta endocítica, y 3. Exocitosis por fusión directa del RE con la MP.

INF-γ y LPS inducen la producción de IL-12p40 en fagocitosis de partículas de látex y, ésta es retenida a nivel perifagosomal, sin secreción del heterodímero p70. Estos resultados sugieren que la producción de IL-12 es parásito-inespecífica y que la inhibición de la secreción de IL-12 en fagocitosis puede ser el resultado del impacto del volúmen, donde fagosomas de gran tamaño de *Leishmania* o partículas de látex, retienen un pool intracelular de IL-12p40/70 con efectos en la exocitosis del heterodímero p70.

Palabras clave: *Leishmania*, macrófago, exocitosis, fagocitosis, tráfico vesicular

ABSTRACT

The membrane traffic in activated macrophages is required for critical events associated with innate immunity, like phagocytosis of pathogens and secretion of cytokines. The intracellular trafficking and secretion pathways of many of the proinflammatory cytokines has not been elucidated, except in the cases of IL-1 beta (Andrei et al., 2004) and TNF-α (Murray *et al*., 2005). Therefore, the secretory pathway of the proinflammatory cytokine IL-12, link between innate and adaptive immune response, was studied in the macrophage-cell line J774.A1 in different functional stages (rest, after phagocytosis and after classical activation) as well as after infection with the human pathogen *Leishmania amazonensis.* Secretion of IL-12p70 was evaluated by flow cytometry and localization and distribution of IL-12p40/70 and p40 by confocal microscopy. The results found show that IL-12 is not constitutively secreted and activation of the macrophage with INF-γ and LPS is required for its secretion. Infection with *L. amazonensis* deactivates macrophages and causes retention of this cytokine in compartments of the RE-Golgi and endocytic compartments where it co-localizes with the markers Calnexin, SNAP-23 and LAMP-1 respectively. This co-localization, suggests exocitosis of this protein by multiple pathways:1. Secretory vesicles by the biosyntetic secretory route, 2. Endocytic route b secretory lysosomes, and 3. Exocytosis by direct fusion of the ER with the PM. A similar result was found after phagocytosis of loads that generated pahgosomes of a volume equivalent to that of *L. amazonensis* infection, induced retention of IL-12 at periphagosomal level, without secretion of the p70 heterodimer.

These results suggest that large loads inside the macrophage promote retention of IL-12 therefore explaining lower secretion levels independent of the nature of the particle phagocytosed by the macrophage.

Key words: *Leishmania*, macrophage, exocytosis, phagocytosis, vesicular traffic

1. **INTRODUCCIÓN**

Las rutas de secreción de proteínas empleadas por macrófagos para la eliminación de patógenos intracelulares como *Leishmania*, no están ampliamente descritas. Existe muy poca evidencia en la literatura acerca de la secreción de citoquinas en macrófagos y su relación con componentes del tráfico vesicular. No hay caracterización de las rutas de secreción, excepto algunos estudios descritos para IL-1β y TNFγ (Eder, 2009; Murray *et al*., 2005) ni estudios cinéticos de secreción que nos permitan evaluar el comportamiento de estas proteínas en tiempos cortos (antes de las 24h de producción).

Los estudios de secreción de esta proteína en infección por *Leishmania* sólo se limitan a la evaluación de su producción en sobrenadantes de cultivo a las 8 horas (h), 19h, 24h o hasta 120h. Tampoco hay evidencia suficiente sobre el proceso de fagocitosis de partículas inertes y su relación con la expresión de genes de citoquinas.

En el caso de IL-12, solamente se conoce la localización de la subunidad p35 en compartimentos tempranos del Golgi, pero no hay información acerca del tráfico vesicular de IL-12 p40/70 luego de *trans*-Golgi hacia la membrana plasmática (MP). (Vaidanathan *et al*., 2003).

Creemos que la capacidad de secreción del macrófago es reducida por el impacto del volumen de la vacuola parasitófora en procesos de fagocitosis y que cargas fagocíticas de gran tamaño pueden alterar la expresión de genes que codifican para estas proteínas de manera inespecífica a la infección por *Leishmania.* Por lo tanto es de gran interés evaluar las rutas de secreción de IL-12 como una proteína fundamental en las respuestas proinflamatorias del macrófago frente a parásitos intracelulares y caracterizarlas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Leishmania, son parásitos intracelulares obligados de macrófagos que modulan la respuesta inmune. Dentro de las alteraciones atribuidas a *Leishmania*, en términos de la producción de moléculas efectoras, está la disminución de la producción de óxido nítrico (NO), secreción de TNF-α e interlequina 12 (IL-12 p40/70). Nuestra evidencia sugiere que el volumen de la VP se asocia con esta disminución y no sería específica de *Leishmania* ya que fagosomas de perlas de látex de volumen similar al de la VP (F_2) también disminuyen producción de NO (Niño, 2007) y secreción de TNF-α (Montoya, 2010). Esta disminución podría darse por alteraciones en los niveles de mRNA, niveles de proteína, degradación de la proteína o alteración en la distribución intracelular de iNOS, TNF-α o IL12. Nuestra evidencia muestra que la distribución de proteínas del citoesqueleto como actina y tubulina cambia con la infección por *Leishmania* y fagosomas F_2 y F_3, alterando indirectamente tráfico vesicular, sin que detectemos disminución en la cantidad de proteína presente (Chacon, 2010). En este estudio esperamos determinar a que nivel ocurre la disminución de la secreción de IL-12 p40/70 en macrófagos infectados y con fagosomas F_2 y F_3 así como identificar las rutas de secreción de esta proteína y caracterizarlas.

3. HIPÓTESIS

El tráfico vesicular de macrófagos es alterado por vacuolas parasitóforas de gran volumen y la infección por *Leishmania amazonensis* altera por esta razón la secreción de IL-12.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar cómo es la síntesis y secreción de IL-12 en macrófagos de la línea celular J774A.1

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

4.1.1 Evaluar niveles de mRNA, proteína y ubicación de IL-12 en macrófagos activados, respecto a organelos intracelulares y ruta secretoria

4.1.2 Evaluar mRNA, proteína y ubicación de IL-12 en macrófagos infectados por *L. amazonensis*

4.1.3 Determinar los niveles de secreción, proteína y ubicación de IL-12 en los grupos de fagocitosis con perlas de látex (F_1, F_2 y F_3).

5. **MARCO TEÓRICO**

Los macrófagos son células de la respuesta inmune innata con tráfico vesicular y rutas de secreción constitutiva y regulada. El tráfico vesicular es el proceso en células eucariotas encargado de la distribución y correcta ubicación de proteínas. En general, una proteína que va a ser secretada es transcrita en el núcleo (mRNA), traducida y sintetizada en ribosomas, retículo endoplasmático (RE) rugoso, translocada a la luz del RE, enviada en vesículas hacia el complejo de Golgi (CG) para maduración final, seguido de ubicación en procesos vesiculares, concentración y distribución celular hacia membrana plasmática (MP) en espera de la señal para secreción (Palade, 1974). Si son continuamente secretadas hacia la MP hacen parte de la ruta de secreción constitutiva, mientras que si su secreción está acoplada a una señal, hacen parte de la ruta de secreción regulada (Stephens, 1998). El ejemplo más estudiado de secreción regulada es la liberación de neurotransmisor, un proceso especializado en neuronas.

En macrófagos la secreción de efectores inmunológicos es un proceso de su ruta exocítica de secreción que puede ser constitutiva y/o regulada (Stow *et al.*, 2009). Así mismo, la señal específica que induce secreción regulada en macrófagos mejor estudiada es la generada por estimulación de lipopolisacárido bacteriano (LPS; revisado por Tsan y Gao, 2003). LPS liga receptores en la membrana del macrófago en donde los receptores *Toll-like* son importantes, en particular TLR4 (revisado por Tsan y Gao, 2003). Una vez ligado este receptor, su actividad kinasa intrínseca desencadena fosforilación de proteínas intracelulares y reclutamiento de MyD88 que se une a la kinasa asociada IL-1R para activar el factor NF-kB, que al ser liberado durante este proceso se transloca al núcleo en donde promueve la transcripción de muchos genes para la síntesis de efectores inmunológicos entre los que se evidencian IL-12 y otros (revisado

por Tsan y Gao, 2003).

5.1 **Ruta endocitica y trafico vesicular**

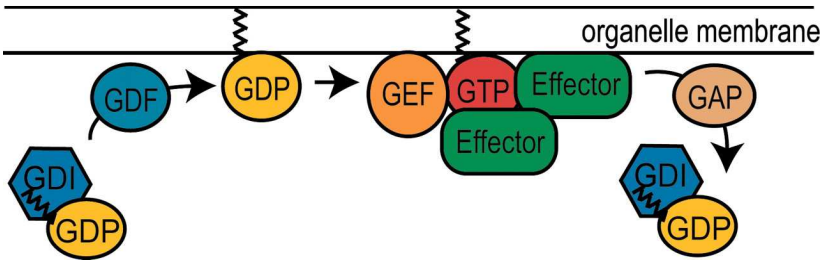
La organización del tráfico vesicular y sus rutas endocítica y exocítica están altamente reguladas en células eucariotas. Fagosomas generados por macrófagos luego de fagocitosis, serían parte de la ruta endocítica de esta célula y la membrana de este organelo resultaría de invaginación de la MP, fusión de membranas endosomales (revisado por Idone *et al.*, 2008) y de membrana de RE (Gagnon *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2005). A continuación, estos organelos sufren un proceso complejo de maduración, el cual comprende una serie de eventos de fusión con endosomas tempranos luego tardíos de la ruta endocítica para finalmente, formar un organelo con características lisosomales denominado fagolisosoma (Desjardins, 1995). El fagolisosoma contiene enzimas hidrolíticas y metabolitos de oxígeno que ayudan a la degradación de patógenos, generando antígenos que el macrófago presenta a otras células del sistema inmune para activar una respuesta inmune *específica* (Harding *et al.*, 1995; Germain, 1995). Para el caso particular de *Leishmania*, la vacuola parasitófora (VP) tiene características de fagolisosoma (pH ácido, enzimas proteolíticas) y marcadores de membrana que lo ubican en la ruta endocítica entre endosoma tardío y lisosoma (Antoine *et al.*, 1998; Russell, 1995).

5.1.1. **Rab GTPasas**

Rabs son una familia de proteínas pequeñas (20–29 kDa) de distribución ubicua, las cuales participan en cuatro procesos en el tráfico de membranas: 1. Fisión de vesículas, 2. movilización de vesículas, 3. *vesicle tethering* (acercamiento y anclaje), y 4. fusión de la membrana vesicular con una membrana blanco. Estos eventos son llevados a cabo por moléculas efectoras de unión

específica a Rabs en su estado unido a GTP confiriendo direccionalidad a los componentes en el tráfico vesicular.

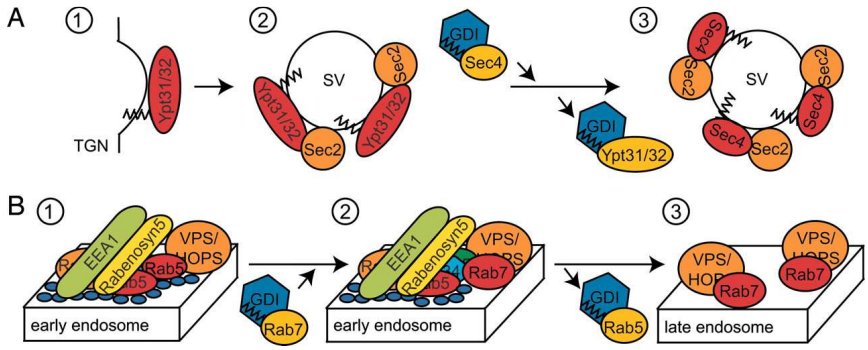
Rabs han sido identificadas en levaduras (incluyendo Sec4p y proteínas Ypt) y más de 60 proteínas han sido identificadas en células animales. Su alto número refleja la complejidad de los eventos de transporte vesicular en eucariotas. Rab GTPasas funcionan como un *switch* molecular, ciclando entre estados unidos a GTP o GDP. Este *switch* es controlado por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), los cuales disparan la unión de GTP, y proteínas GTPasa activantes (GAPs), acelerando la hidrólisis de la forma unida GTP a GDP. (revisado por Grosshans *et al*., 2006)



Ciclos de unión y desacoplamiento de Rab GTPasas en membranas. La forma inactiva de Rab unida a GDP (forma prenilada) es unida a GDI, la cual cubre el anclaje isoprenil manteniéndola en una forma citosólica soluble. La unión de Rabs a la membrana requiere la función de un GDF que disocia el complejo GDI-Rab y permite el anclaje prenil para ser insertado dentro de la membrana. Posteriormente, GEFs específicos intercambian la forma unida GDP por GTP permitiendo la activación de Rab GTPasas. La forma activa unida a la membrana se une a efectores específicos para realizar sus funciones en el tráfico de membranas. Finalmente, GAPs específicas inactivan Rabs acelerando la hidrólisis de la forma unida GTP en GDP. La forma inactiva unida a GDP puede entonces ser extraída de la membrana por GDI y es reciclada (revisado por Pfeffer y Aivazian, 2004).

Se han caracterizado ampliamente proteínas Rab asociadas a dominios de membrana

organelo- específicas en la ruta endocítica. Es así como endosomas tempranos contienen únicamente Rab5 o una combinación de Rab4 y Rab5, mientras que endosomas de reciclaje (ER) portan dominios diferentes de Rab4 y Rab11. Rab7 y Rab9 son compartidos con endosomas tardíos (revisado por Grosshans *et al*., 2006).



Cascadas Rab/conversión de Rabs. ***A***) Levadura Ypt31/32 forma una cascada con Sec2p y Sec4p en varios pasos del CG incluyendo vesículas secretoras (VS) del TGN a la MP. Caracterización bioquímica, muestra que Sec2p es un efector de Ypt31/32p, y éste es parcialmente responsable del reclutamiento de Sec2p en VS permitiendo la activación de Sec4p.(***B***) La conversión de Rab5 a Rab7 puede dirigir la maduración de endosoma temprano a (*early endosome* (EE)) a endosoma tardío. EE son parcialmente marcados en presencia de Rab 5 y sus efectores. Un efector de Rab 5 Vps11p, una subunidad de un complejo conservado clase C (VPS/HOPS) (1). Una segunda subunidad de éste complejo Vps39p, tiene actividad GEF hacia el ortólogo Rab7, Ypt7p (107). Por tanto, Rab5, VPS/HOPS clase C, y Rab7 parecen formar una cascada Rab en EE (**2**). La inactivación y reemplazo Rab5y sus efectores asociado con reclutamiento y activación de de Rab7 y sus efectores podría inducir maduración de EE a endosoma tardío.(revisado por Grosshans *et al*., 2006).

Estudios en macrófagos RAW 264.7 mutantes de Rab5 (Rab5(Q79L)) han permitido evaluar la participación de Rab5 en los eventos de maduración del fagosoma en procesos de fagocitosis de partículas de látex e infección por *Leishmania donovani* de acuerdo con la

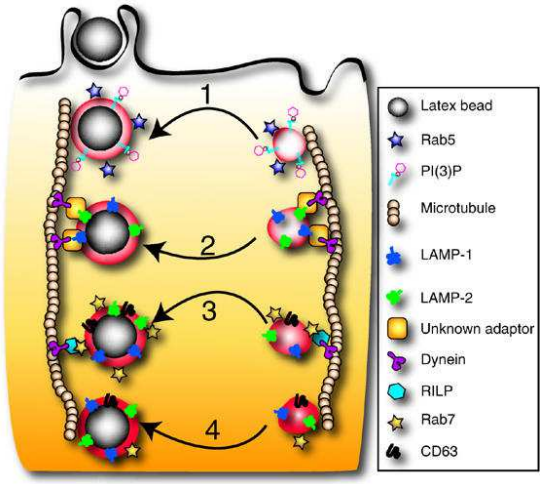
hipótesis ¨*kiss and run*¨ en un proceso de fusión temporal entre fagosomas y endosomas para intercambiar moléculas entre estos compartimentos (Desjardins, 1995; Storrie y Desjardins, 1996). En macrófagos mutantes Rab5 (Q79L) se observan eventos de fusión no controlados que inducen formación de VP gigantes, que contienen varios parásitos. Este fenómeno característico sólo de la infección por *L. amazonensis*, no se presenta en la infección por *L. donovani* y puede iniciar maduración de la VP que adquiere proteínas de membrana como LAMP1, pero por la brevedad del evento de fusión no llega a intercambiar otras moléculas necesarias para generar condiciones microbicidas para la muerte de *Leishmania.* Estos resultados identifican a Rab5 como una molécula clave en procesos de fusión de fagosoma/endosoma que de darse normalmente restringen crecimiento de parásitos intracelulares (Desjardins *et al*., 2000).

5.1.2. **Proteínas de membrana LAMP-1 y LAMP-2.**

El proceso de fusión de fagosomas con compartimentos de la ruta endocítica, moviliza proteínas integrales de membrana tales como H^+V-ATPasas para la acidificación del compartimento (Lukacs *et al.*, 1990) y proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP-1 y LAMP-2) (Eskelinen *et al.*, 2003). LAMP-1 y LAMP-2 muestran homología de secuencia y poseen dominios con propiedades bioquímicas y estructurales similares. Estas son proteínas transmembrana con un dominio largo luminal glicosilado y un dominio corto citosólico (Eskelinen *et al.*, 2003), que forman una capa continua de carbohidratos en la cara interna formando un glicocálix el cual contribuiría a la integridad estructural de la membrana lisosomal. Depleción de N-glicanos con endoglicosidasa H causa rápida degradación de LAMP-1 y LAMP-2, aunque sin cambios en la integridad lisosomal (Kundra y Kornfeld, 1999), lo que sugiere funciones alternativas para estos marcadores. LAMP-2 fue propuesta como receptor de una

chaperona que media el proceso de autofagia de proteínas citosólicas (Cuervo y Dice, 1996) y ha sido implicada en presentación de antígenos citoplasmáticos en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (Zhou *et al*., 2005).

Se ha propuesto que LAMP-1 y LAMP-2 pueden ser adquiridas en el proceso de maduración del fagosoma de forma independiente y antes de reclutamiento de Rab7. Las isoformas de LAMP promueven el anclaje de fagosomas en los microtúbulos por asociación con dineína/dianctina de manera directa o mediada por un adaptador. (Huynh KK *et al*, 2007)

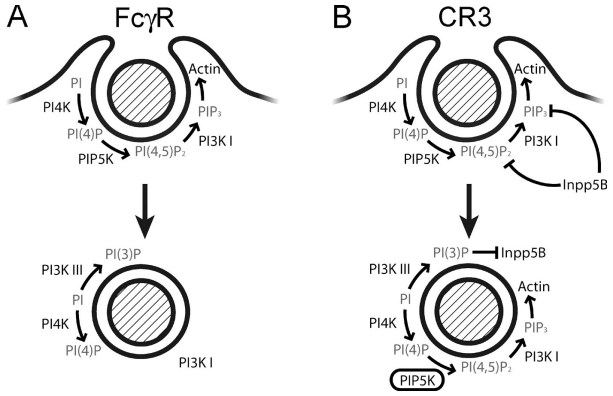


Tomado de: LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. EMBO J. EMBO J;26(2):313-324**.** Huynh KK et al, 2007.

5.1.3. **Fagocitosis de partículas de látex como un modelo *in vitro* de fagosoma**

La entrada de partículas inertes y la biogénesis del fagolisosoma en líneas celulares de macrófagos implica participación de proteínas y lípidos así como endosomas tempranos, tardíos y lisosomas. Una vez formado el fagolisosoma, este se caracteriza por la presencia de GTPasas pequeñas, bombas vacuolares de protones para acidificación e hidrolasas, así como proteínas de unión a actina presentes en varias etapas en la maduración del fagosoma (Desjardins *et al*.,

1994). La unión de la partícula inerte con el receptor de superficie de membrana, desencadena eventos de señalización intracelular transmembrana mediados por fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), para la polimerización de filamentos de actina, dirigiendo la extensión de seudópodos que rodean la partícula blanco. Se ha observado además que fagosomas formados por integrinas (receptores CR3 del complemento) junto con filamentos de actina, permiten la formación de ¨comet tails¨ que impulsan al fagosoma en formación dentro de la célula. La formación de colas de actina requiere la síntesis *de novo* de PI(3,4)P(2) y PI(3,4,5)P(3) en la membrana fagosomal por fosfoinositoles- 3-kinasas (PI3Ks) y reclutamiento de fosfatidilinositol fosfatasa Inpp5B. (Bohdanowicz M et al., 2010).



Tomado de ¨Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes¨. J Cell Biol. 2010; 191(5): 999–1012. Bohdanowicz M et al., 2010

5.1.4 **Orígen de la membrana del fagolisosoma**

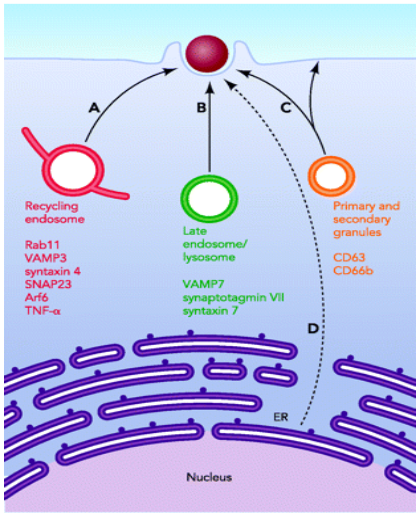
El origen de la membrana fagolisosomal es en su mayor parte de la MP. Nuestro grupo ha mostrado caída de la capacitancia del macrófago, una medida eléctrica indirecta del área de membrana y por tanto de la cantidad de la misma, luego de fagocitosis de partículas inertes o *L.*

amazonensis (Quintana *et al*., 2010; Holevisnsky, 1998). Esta caída implicaría donación de MP del macrófago para la formación del fagosoma o VP. Sin embargo, otras fuentes de membrana han sido sugeridas. Por ejemplo, se ha evidenciado que un porcentaje importante proviene de membranas sintetizadas de *novo* (Vicker, 1997). Además, a partir de medidas de capacitancia de la membrana del macrófago luego de fagocitosis de partículas, se ha propuesto que algunas endomembranas serían reclutadas en la superficie celular para la formación del fagosoma en un proceso denominado "exocitosis focal". La fuente de membrana en este proceso sería a partir de endosomas de reciclaje cercanos a la MP aumentando la disponibilidad en términos de cantidad de membrana para la formación del fagosoma (Bajno et al., 2000, Di et al.,2003). Más recientemente se ha sugerido que membranas del RE serían también usadas para la formación del fagosoma o la VP cuando cargas fagocíticas grandes requieren gran cantidad de membrana extra (Gagnon *et al*., 2002; Becker *et al*., 2005; Gueirard *et al*.,2007).

Así como se muestra diversidad en las fuentes de origen de la membrana fagosomal un número grande y variado de proteínas también participa en la génesis del fagosoma. Fagocitosis de partículas látex opsonizadas con antígenos de *Shigella flexnery* y *Listeria monocytogenes* ha permitido evidenciar un complejo de proteínas que participan en la internalización de estos microorganismos. Proteínas IpaB, IpaC, IpaD, Inl así como flotilina-1, una proteína de superficie en "*rafts*" lipídicos hacen parte del fagolisosoma. Sin embargo, *L. donovani* sobrevive en fagosomas deficientes en flotilina-1 indicando que estos microdominios juegan un papel importante dentro de las propiedades microbicidas contra parásitos intracelulares (Menard *et al*., 1996; Lecuit *et al*., 1997).

Otros componentes tales como Rab GTPasas (Rab11) y VAMP3 contenidos en endosomas de

reciclaje son translocados a la copa fagocítica portando moléculas cargo como TNF- α así como ARF6, dinamina y anfifisina. VAMP7 presente en endosomas tardíos es de igual forma translocada al fagosoma y se fusiona bajo regulacion de sinaptotagmina VII y sintaxina 7. De igual forma moléculas como CD63 y CD66 presentes en gránulos primarios de neutrófilos, han sido identificadas en la copa fagocítica.(Huynh KK *et al*, 2007).



Tomado de: Fusion, Fission, and Secretion During Phagocytosis. Physiology December 1, 2007 vol. 22 no. 6 366-372. Huynh KK et al, 2007

5.2 **Ruta secretora-biosintética y tráfico vesicular**

El transporte anterógrado y retrógrado de lípidos y proteínas en la ruta secretora-biosintética es un proceso fisiológico que ocurre a partir del RE, a través del complejo de Golgi: pre-Golgi, Golgi *stacks*, *trans* Golgi *network* (TGN) y organelos post-Golgi. Este proceso dinámico permite el mantenimiento de la integridad funcional de organelos y compartimentos a lo largo de la ruta secretora en células eucariotas, debido a que mantiene su identidad y estricta compartimentalización. El complejo de Golgi (CG) tiene un papel central en el tráfico de membranas: regulación de transporte, *sorting* y *targeting* (distribución y direccionamiento) de

moléculas. Lípidos y proteínas cargo se mueven de manera continua a través del CG en dirección anterógrada y retrógada para ser direccionados a diferentes destinos dentro y fuera de la célula (Jackson, 2009; Pavelka *et al.*, 2008). Así mismo, el TGN juega un papel importante en el empaquetamiento de moléculas cargo y distribución de proteínas hacia destinos como lisosomas, dominios de membrana plasmática o espacio extracelular. En todos los niveles de la ruta biosintética debe existir un contra-balance dado por la ruta retrograda, la cual permite el retorno de moléculas residentes que han escapado de sus compartimentos de origen permitiendo así un balance de membranas por reciclaje, de sus componentes y mantenimiento de la integridad funcional de organelos a lo largo de la ruta secretora (Sannerud *et al.*, 2003).

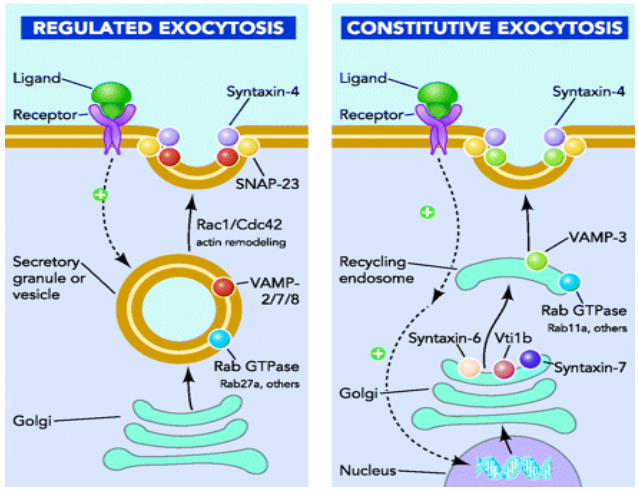
El tráfico vesicular es altamente regulado. Su especificidad y direccionalidad se da por interacciones de proteínas integrales de membrana que marcan cada compartimiento y garantizan interacción con otros. Dentro de estas proteínas hay varias familias que se describen a continuación.

5.2.1 **Proteínas SNARE**.

SNAREs son una superfamilia de proteínas de membrana pequeñas que catalizan procesos de fusión de membranas en dirección anterógrada entre RE-CG y MP. Comparten un motivo de 60 a 70 aminoácidos, denominado "SNARE *motif*", que permite la interacción entre miembros de la familia de proteínas R-SNAREs (en vesículas) y Q-SNAREs (en la membrana blanco). Esta división se ha hecho en con base en un residuo central funcional (arginina-R o glutamina-Q, revisado por Stanley y Lacy 2010).

El proceso de fusión se lleva a cabo, cuando las R-SNAREs y Q-SNAREs se encuentran próximas. (Sutton RB *et al* 1998). Después de la fusión, el complejo *trans*-SNARE es

rápidamente desensamblado a un complejo *cis*-SNARE que permite su ciclaje continuo para próximos eventos de fusión. Miembros de R-SNAREs incluyen proteínas de membrana asociadas a vesículas (VAMPs), mientras que Q-SNAREs se encuentran asociadas con sintaxinas y la familia de proteínas SNAP-25. Familias de proteínas que regulan el desensamblaje (Sec/Munc) y proteínas Rab, regulan la unión de proteínas SNARE y su desensamblaje (Rickman *et al*.,2010).



Tomado de Pathways for Cytokine Secretion. Physiology August 1, 2010 vol. 25 no. 4 218-229. Stanley y Lacy, 2010.

5.2.2 **Cubiertas COP II**

El transporte de moléculas cargo en la ruta secretora, es realizado por vesículas producto de la fisión a partir de un compartimento donante. Cubiertas de vesículas tales como COP II (***co**at **p**rotein complex*) son reclutadas en el RE transicional para coordinar el transporte de estas moléculas. Las cubiertas COPII dirigen una secuencia de eventos que incluyen auto-ensamblaje de membranas, selección de moléculas cargo, selección de proteínas SNARE (***SNA**P (Soluble NSF Attachment Protein **RE**ceptor)* y deformación de la membrana dentro del proceso de

fisión. Se ha evidenciado la participación de tres componentes para este proceso: Sar1 GTPasa (proteína de la familia Arf), subcomplejo Sec23/24 y subcomplejo Sec 13/31 (Bickford *et al.,* 2004).

La biogénesis de cubiertas COP II comienza cuando Sar 1 es activada por intercambio de GDP a un estado unido a GTP catalizado por un factor intercambiador de nucleótidos (GEF) en la membrana del RE. Como consecuencia de este evento ocurre reclutamiento del complejo heterodimérico Sec 23/24 y su interacción con Sar 1-GTP conformando un complejo pre-fisión unido a proteínas cargo en el lumen del RE. Seguido de esto, hay reclutamiento del heterodímero Sec 13/31 y polimerización de COP II en la superficie de la membrana generando una curvatura que deforma la membrana del RE y permite la formación de la vesícula. Finalmente, ocurre el proceso de fisión de la vesícula mediado por la hidrólisis de GTP (Antony *et al.,* 2001; Barlowe *et al.,* 2003).

La selección de moléculas cargo comienza con la formación de vesículas en donde el complejo Sec 23/24 – Sar 1 interactúa con señales específicas de *sorting* en la luz del RE que facilitan el movimiento unidireccional de las mismas y su reconocimiento específico por cubiertas COP II (Kuehn *et al.,* 1998). Es así como se han identificado señales de exportación desde RE (motivo DxE) que etiquetan la molécula cargo. Proteínas Bet 1 componentes de vesículas (v-) SNAREs se unen a Sec 24 a través de un motivo LxxLE mientras que proteínas Sed 5 componentes de (t-) SNAREs de membranas blanco contienen dos señales de *sorting*: un motivo Lxx/M-E y una secuencia YNNSNPF. Motivos Lxx/M-E y DxE se unen al mismo sitio en Sec 24 (sitio B) y la secuencia YNNSNPF se une al bolsillo hidrofóbico (sitio A) en el lado opuesto de Sec24 (Mossessova *et al.*, 2003).

5.2.3 **Proteínas cargo**

Las proteínas cargo pueden ser proteínas integrales de membrana, proteínas de unión a glicofosfatidil inositol (GPI), proteínas solubles de la luz del RE y/o proteínas residentes del RE. Estas proteínas permanecen como polipéptidos hasta que son correctamente plegadas y ensambladas formando multímeros para ser luego reconocidas y direccionadas fuera del RE (Pelham, 1996).

Las proteínas son inmovilizadas hacia el "sito de salida del RE" de manera transitoria, para regular exportación de las mismas. Proteínas integrales de membrana que contienen secuencias de unión a COP II en el dominio citoplasmático, pueden difundir al "sitio de salida del RE" donde interaccionan de manera directa con subunidades COP II, las cuales direccionan la proteína hacia compartimentos intermedios del RE (Kuehn *et al.*, 1998). Proteínas de la luz no poseen dominios citosólicos para interactuar con subunidades las COP II.

Una vez las proteínas cargo salen del RE en vesículas COPII son movilizadas hacia compartimentos del CG. El conocimiento de este transporte anterógrado vía RE-CG ha sido ampliamente estudiado empleando inhibidores de la ruta secretora como Brefeldina A.

5.2.4 **Brefeldina A y transporte de proteínas**

Brefeldina A (BFA) es un derivado fúngico capaz de inhibir el transporte temprano de proteínas entre RE y CG (Graham *et al.*, 1993), con efectos dramáticos en la estructura del Golgi (Rambourg *et al.*, 1995). El tráfico de moléculas cargo a través del CG requiere miembros de la familia de GTPasas Arf para reclutar complejos de cubierta y enzimas modificadoras de lípidos a sitios de membrana específicos, creando dominios para concentración de proteínas cargo y transporte. Este proceso es perturbado en presencia de BFA, la cual específicamente se une a Arf

1, resultando en la inhibición de la exportación de proteínas del RE y su relocalización hacia el RE (Nie *et al.*, 2003).

Arf funciona como un sistema de ensamblaje-transporte dependiente de energía para suplir cubiertas COP I a membranas (Donaldson *et al.*, 1992*a*; Orci *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1993; Rothman y Wieland, 1996). Cuando el intercambio de nucleótidos dentro de Arf es inhibido por BFA, las proteínas COP I son rápidamente reducidas en las membranas del CG (Donaldson y Klausner, 1994). En respuesta, ocurre la formación de una red de túbulos a lo largo de los microtúbulos que permite una mayor probabilidad de fusión con el RE. Posterior al evento de fusión podría ocurrir mezcla difusiva del CG y membranas del RE o absorción unidireccional de membranas del CG dentro del RE (Sciaky *et al.*, 1997).

Dado el mecanismo de acción de BFA, ambos: el bloqueo de procesos mediados por COP I y la tubulación del CG, crean desbalance en el área, consecuencia de la perturbación en el ciclaje de Arf en un proceso autónomo corriente abajo. Ambos eventos, pueden impactar el proceso de *sorting* en el sistema Golgi. Por lo tanto, en presencia de BFA las poblaciones de proteínas de cubierta COP I encargadas del reciclaje de componentes en las vesículas y la movilización de proteínas cargo a través de la ruta secretora, podrían mezclarse indiscriminadamente.

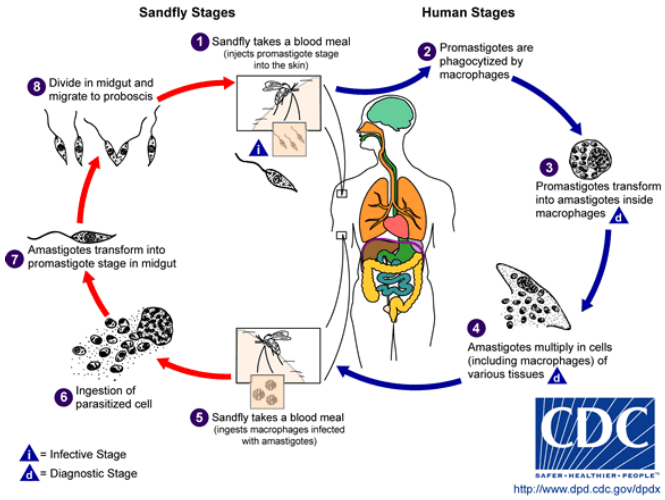
5.3. **Ciclo de vida de *Leishmania***

Leishmaniasis son un conjunto de manifestaciones clínicas (Leishmaniasis cutánea (LC), leismaniasis mucocutánes (MC), leishmaniasis difusa (LCD) y leishmaniasis visceral (LV)), transmitidas por vectores biológicos (flebotominos del género *Lutzomia*, para el nuevo mundo) y causadas por parásitos protozoarios intracelulares obligados del género *Leishmania*. Las

infecciones humanas son causadas por alrededor de 21 de 30 especies que infectan animales. Estas incluyen, complejo *L. donovani* (*L. donovani, Leishmania infantum,* y *Leishmania chagasi*); complejo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, y *Leishmania. venezuelensis*); *Leishmania tropica*; *L. major*; *Leishmania aethiopica*; y el subgénero *Viannia* con 4 especies (*L. (V.) braziliensis, Leishmania (V.) guyanensis, Leishmania (V.) panamensis*, y *Leishmania (V.) peruviana*). Las diferentes especies son indistinguibles morfológicamente, pero pueden ser diferenciadas por análisis de isoenzimas, métodos moleculares o anticuerpos monoclonales.

El ciclo de vida comienza cuando los flebotominos inyectan por picadura las formas infectivas del parásito (promastigotes) al huésped vertebrado. Los promastigotes son fagocitados por macrófagos y células dentríticas (CDs) residentes, donde se diferencian a formas amastigote que se multiplican por división simple e infectan otras células mononucleares fagocíticas.

Los artrópodos vectores son infectados con formas amastigote intracelulares tomadas en sus probóscides al picar de nuevo a un huésped vertebrado infectado. Dentro del vector, las formas amastigote se diferencian en formas promastigote en el intestino, las cuales migran de nuevo hacia la probóscide para continuar el ciclo.



Tomado de life cycle of Leishmania¨ spp. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm. ¨2009.

5.3.1. **IL-12**

Las citoquinas hacen parte del grupo de moléculas efectoras del sistema inmune para la eliminación de parásitos intracelulares como *Leishmania*. Su secreción puede ser constitutiva y/o regulada y su ruta intracelular está determinada por algunos de los procesos previamente descritos. IL-12 es un heterodímero que pertenece a una familia de citoquinas de la que hacen parte IL-23 e IL-27, conformado por dos subunidades p35 y p40 unidas por puentes disulfuro.[(Sieburth D *et al*., 1992; Kobayashi M et al., 1989). Estas subunidades se encuentran codificadas en dos cromosomas diferentes, cromosoma 3 y cromosoma 11 respectivamente, siendo entonces diferencialmente reguladas. La subunidad p35 es transcrita constitutivamente y regulada postraslacionalmente. (Aste-Amezaga M *et al*., 1998; Ma X et al.,1996), mientras que la subunidad p40 es regulada transcriptionalmente y su producción estimulada por productos bacterianos como LPS y CpG (Ma X et al.,1996; Hsieh CS etal., 1993).

El heterodímero IL-12p70 es una molécula biológicamente activa y es soluble junto con la subunidad p40. La subunidad p35 en contraste, no se secreta de manera independiente a p70 y se ha evidenciado como una subunidad transmembrana en compartimentos tempranos del Golgi (Vaidanathan *et al.,* 2003).

Las células presentadoras de antígeno (APCs) que producen en mayor proporción IL-12p70, corresponden a macrófagos y células dendríticas (DCs). Sin embargo CDs, monocitos y células CHO, secretan 10–1000 veces p40 comparado con p70,(Trinchieri G.,1998) haciendo difícil determinar aspectos como regulación, secreción y función del heterodímero.(D'Andrea A, 1992;Hayes *et al*.,1995)

Debido a las diferencias existentes en la producción estequiométrica de las subunidades de IL-12, se propone que existen dos vías diferentes para la producción de p40 y p75 donde cada

molécula cumpliría diferentes funciones: una vez las APCs han encontrado una señal de peligro activante (Matzinger P., 1994; *Janeway., 1989*), la secreción temprana de p40 (monómero u homodímero) puede servir como una molécula que influencie la respuestas efectoras del sistema inmune frente a procesos de infección, en contraste con p70 la cual sería una molécula producida de manera tardía y donde su inducción depende de manera directa de señales mediadas por IFN-γ producido por células T.

Células APCs producen p40 en respuesta a LPS sin producción de p70, sin embargo cuando las células son estimuladas con IFN-γ + LPS se induce la produción de p75.[Hayes *et al*., 1995; Snijders A *et al*., 1996,). Adicionalmente, IFN-γ regula fuertemente la expresion de mRNA de la subunidad p35, sin efecto en la expresión de mRNA de la subunidad p40 (Snijders A *et al*., 1996). La producción de p70 mediada por INF-γ y LPS ha sido evidenciada en diferentes tipos celulares como macrófagos peritonales, macrófagos derivados de medula ósea (MØ),(Bost KL and Clements JD.,1997; Flesch *et al*., 1995)células de microglia y CDs (Aloisi F *et al.*, 1997; Aloisi F *et al*., 1998). Es así como ratones doble mutantes para IFN-$\gamma^{-/-}$ responden ante productos bacterianos con la producción de grandes cantidades de p40 pero no p75. [Muraille *et al*., 1999; Sousa *et al.*,1997). Estos datos sugieren desde el punto de vista biológico, que la producción de p75 requiere interacciones con células Th1 productoras de IFN-γ. En ausencia de tales interacciones, las APCs son ineficentes productoras de p75.(revisado por Abdi 2002). Sin embargo Frucht*et al* propone el modelo 'Jump start model' el cual sugiere que p70 puede ser una señal temprana que promueve respuestas efectoras Th1 debido a la producción de IFN-γ por las mismas células APC.(Frucht *et al.*, 2001)

5.3.2 **IL-12 y maduración de fagosomas**

Se ha sugerido que debido a que múltiples modelos en infección de macrófagos inducen polarización de la respuesta inmune en términos de la inhibición de la producción de IL-12 y TNF-α y la inducción de la producción de IL-10, estas citoquinas probablemente tengan influencia sobre la modulación de distintos pasos en la vía endocítica y por lo tanto estarían regulando los procesos de maduración del fagosoma. (Citado por Batacharia et al., 2006) Estudios en *Salmonella*, muestran por inmunomicroscopia electrónica, que la maduración del fagosoma depende del balance entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias y la inducción de Rab GTP asas. El tratamiento de macrófagos con IL-6 induce específicamente la expresión de Rab 5 a través de la activación de señales intracelulares reguladas por kinasas, para la fusión del fagosoma con compartimentos tempranos de la ruta endocítica, mientras que IL-12 sobrerregula la expresión de rab 7 a través de la activación de p38 MAPK modulando el transporte lisosomal y la supervivencia dentro de los macrófagos.(Batacharia et al., 2006).

De otra parte, es controvertida la participación de receptores *Toll like* en el proceso de maduración del fagosoma. Evaluación cuantitativa por FRET, para determinar el grado de fusión de fagosoma/lisosoma, muestran que los perfiles generados por fagosomas conteniendo partículas con o sin ligandos para TLRs (Pam3Cys-Ser-(Lys)4 o LPS), no mostraban diferencias en la maduración. Sin embargo, mientras macrófagos deficientes en un único TLRs mostraban perfiles de maduración idénticos a los macrófagos silvestres, macrófagos deficientes en MyD88 mostraban una marcada depresión de fusión de fagosoma/lisosoma, lo que demuestra que la maduración del fagosoma es independiente de TLRs. (Yates y Russel, 2005)

6. METODOLOGÍA

6.1 *Modelo Leishmania-macrófago.*

Se eligió *L. (L) amazonensis* como modelo parasitario inicial por las ventajas experimentales y de mantenimiento que ofrece. Esta especie de *Leishmania* ha sido ampliamente estudiada, es fácil de mantener en cultivo, en su forma amastigote se divide rápidamente y produce VP de gran volumen. Esta especie genera la leishmaniasis difusa, la presentación cutánea más severa de la Leishmaniasis. Como célula hospedera se escogió una línea celular que se comporta como macrófagos y se derivan de la línea celular J774 (sarcoma reticular murino con características de macrófagos peritoneales de ratón (Ralph *et al.*, 1975). Esta línea celular es infectada en forma adecuada por *L. (L.) amazonensis.*

6.2 *Cultivo del parásito*

Se emplean parásitos de la especies *L. (L.) amazonensis* cepa (FLA/BR/67/PH8), donados por la doctora Nancy Gore Saravia (CIDEIM, Cali, Colombia). Los parásitos fueron sembrados en el estadio de promastigote a una concentración inicial de 10^6 células/ml en cajas de 25 cm^2 en medio TC-100 o Schneider suplementado con 5-10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB; Niño y Camacho, 2005). Los cultivos fueron mantenidos a 22,5 °C hasta alcanzar una densidad de 10^7 células/ml. Cuando los parásitos alcanzan su fase estacionaria, generan rosetas e infectan macrófagos fácilmente; en este punto son recolectados para generar RNA, para infección o diluidos para subcultivo.

6.3 *Cultivo de macrófagos*

Macrófagos peritoneales de ratón de la línea J774A.1 obtenidos a partir de ATCC (TIB 67) fueron mantenidos en monocapa en botellas de 25 cm^2 a 37 °C y 5% de CO_2, empleando medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% (v/v) de SFB (Danovo; Forero *et al*., 1999). La viabilidad de los cultivos se verificó mediante el ensayo de exclusión por azul tripán.

6.4 *Infección*

Células J774.A1 fueron expuestas*:* a promastigotes de *L. amazonensis* en fase estacionaria, en una proporción de 1:10 y mantenidas a 35 ºC y 5% CO_2 por 4 horas. El excedente de parásitos fue removido por lavado con RPMI. Posteriormente, los cultivos fueron mantenidos a 35 ºC y 5% de CO_2 por varios días.

6.5 *Fagocitosis*

Macrófagos J774.A1 (ATTC: TIB-67) fueron mantenidos en cultivo en monocapa a 80% de confluencia en cajas de 25 cm^2 en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con 10% SFB (Danovo) a 37 ^oC y en atmósfera de 5% de CO_2. Células en estas condiciones se les dio a fagocitar perlas de látex así: [F_1] Perlas de látex (PL) de 3,2 μm 1:10 macrófago:PL, [F_2] PL 6,4 μm en proporción 1:10, [F_3] PL 6,4 μm en proporción 1:20, incubadas a 35 ^oC, 5% CO_2 por 4 horas. Los parásitos o las PL que no entraron fueron removidos(as) por lavado con medio y los cultivos se mantuvieron a 35 ^oC, 5% CO_2 por distintos tiempos.

6.6 *Activación*

Macrófagos cultivados como se mencionó arriba fueron estimulados con 40 U/ml INF-γ y 10 ng/ml LPS por 24 horas. La activación fue medida por la producción de citoquinas como TNF-α, IL-6 y MCP-1 por ensayos de citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo en diferentes tiempos.

6.7 *Diseño de primers empleando Primer blast de ncbi y análisis.*

El diseño de *primers* para la subunidad p35 de IL-12 se realizó utilizando blast genómico y blast con mRNA, de acuerdo con las secuencias reportadas en el genbank: |NT_039240.7|Mm3_39280_37 y NM_008351.2 respectivamente . Se emplearon las siguientes condiciones: Tm: 57 60, 63, Máx self: 3.0, Máx 3´end: 1.0, GC %: hasta 50. *Forward primer*: ACACAGATAGGAAACAAAGAAAG; *reverse primer*: TATGAGAGAAGCGATGGAGG. El tamaño del producto esperado fue de 156pb.

El análisis de los *primers* diseñados, se realizó empleando el *software* Oligo Analyzer1.1.2. No se evidencia formación de auto-anillamientos ni formación de *loops*. Para el diseño de los *primers* correspondientes a la subunidad p40 de IL-12 se utilizaron las mismas condiciones empleadas para p35 con alineamientos en mRN**A** y blast genómico empleando las secuencias reportadas en el gen bank: NM_008352.2 y NC_000077.5|NC_000077 respectivamente. *Forward primer*: AATGGCGTCTCTGTCTGC**;** *reverse primer:* GCTGGTGCTGTAGTTCTC. El análisis empleando el *software* Oligo Analyzer1.1.2. no muestra formación de auto-

anillamientos, ni formación de *loops*. Adicionalmente se empleó el programa EMBOSS para corroborar los alineamientos.

6.8 *Evaluación de fragmentos por PCR*

La evaluación de los fragmentos correspondientes a las subunidades p40 y p35 de IL-12, se realizó por PCR convencional empleando geles de agarosa al 1,5 %. Se establecieron las siguientes condiciones para la amplificación del fragmento correspondiente a p40: Protocolo: denaturación: 95 ^{o}C - 30 s, anillamiento: 53,7 ^{o}C - 1 min, extensión: 72 ^{o}C - 45 s. Se empleó 1mM de $MgCl_2$. Las condiciones para la amplificación del fragmento correspondiente a p35 fueron: protocolo: 95 ^{o}C – 30 s, anillamiento: 55,2 ^{o}C – 1 min, extensión: 72 ^{o}C - 45 s. Se emplearon 2mM de $MgCl_2$.

6.8.1. Purificación de productos

Los productos fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión, empleando el kit (Wizard® PCR Preps DNA Purification System-Promega).

6.8.2.Cuantificación de productos de PCR purificados

La concentración de los fragmentos: p40 y p35 fue de 10µg/ul para cada uno. La cuantificación se realizó por fluorometría empleando el *kit* (Qubit™ dsDNA HS Assay Kits) o por cuantificación por nanodrop.

6.9 *Secuenciación de fragmentos purificados.*

Los productos purificados fueron secuenciados en el servicio: Ssigmol, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

6.9.1*Análisis de secuencias*

Se empleó el programa BLAST-*ncbi* http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ para realizar los alineamientos y el programa Chromas Lite 2.01 para observar la correspondencia de los picos con la secuencia de bases en fragmento. Los fragmentos obtenidos por PCR y purificados, corresponden a los productos esperados según homología de secuencias, con identidades entre el 90% y 99%. Referencias en *ncbi* para los alineamientos:Rv40 y Fw40: NT_096135, NW_001030461, Rv 35 y Fw35: NT_039240, NW_001030721

6.10 *Clonación*

Los insertos correspondientes a las subunidades p40 y p35 de IL-12 fueron ligados al vector pGEM-TEasy (Promega). La reacción de ligación (inserto-vector) se llevó a cabo en tubos estériles de 500 µl siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (Promega) y se incubó toda la noche a 4 ^{o}C para incrementar el número de colonias después de la transformación.

6.10.1 *Optimización inserto/vector (radio molar):*

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto} \times \text{inserto:vector}}{\text{kb size of vector}} = \text{ng inserto}$$

$$\frac{50\ \text{ng}/\mu\text{l} \times 0{,}2\ \text{kb}}{3{,}0\ \text{kb}} \times 3 = \text{ng inserto} = 9{,}9\ \text{ng}$$

6.10.2. *Transformación.*

Los tubos conteniendo las reacciones de ligación fueron centrifugados a 1000 rpm para recolectar el contenido. Se adicionaron 2 µl de cada
reacción a tubos estériles de 1,5 ml previamente colocados en hielo. Posteriormente, se descongelaron células competentes (JM109) en hielo (aproximadamente por 5 minutos). Se transfirieron luego 50 µl de células a los tubos que contienen previamente las reacciones de ligación. Se mezcló cuidadosamente y se colocó en hielo por 20 min. Posteriormente las células fueron sometidas a choque térmico por 2 minutos en baño de agua a 42 °C (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical manual).

6.10.3. *Selección de clones recombinantes*

Para la selección de clones recombinantes se utilizaron 2 placas de agar LB/ampicilina/IPTG/X-gal por cada reacción de ligación. Las placas fueron colocadas a 37 ^{o}C por 16 h y con el criterio blanco /azul se seleccionaron los clones (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Technical manual).

6.11. *PCR de colonia*

Los clones fueron evaluados por PCR convencional siguiendo el protocolo establecido previamente y chequeados por gel de agarosa al 1.5%,.

6.12. *Purificación de DNA plasmídico*

Una vez se confirmaron los clones recombinantes por PCR, se purificaron empleando el método de lisis alcalina que se describe a continuación:

6.12.1.*Recolección de bacterias*.

Se tomó una colonia blanca aislada y se sembró en 5 ml de medio LB/ampicilina en un tubo de 50 ml. El cultivo fue crecido durante toda la noche a 37 ^{o}C por 16 h. Posteriormente, se tomó 1,0 ml de cultivo y se creció de nuevo en 100 ml de medio de cultivo LB/ampicilina en botellas de 500 ml empleando las mismas condiciones anteriores. Luego se centrifugó a 8.000 g por 10 min a temperatura ambiente y el pellet se dispensó en un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó a temperatura ambiente, durante 3 min a 13.000 g. Se retiró el sobrenadante.

6.12.2 .*Lisis alcalina*.

Se resuspendió el pellet de bacterias en 100 µl de una solución isotónica (GTE: glucosa, Tris y EDTA) a 4 °C. Se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron al mismo tubo, 200 µl de la solución de lisis (NaOH, SDS) que está a temperatura ambiente y recién preparada. Se agitó suavemente con la mano por inversión del tubo (6 veces). Se incubó 5 min a 4 °C.

6.12.3 *Neutralización*

Se adicionaron al mismo tubo, 150 µl de la solución de neutralización (acetato potásico 3M, pH 4,8). Se agitó con la mano por inversión del tubo (6 veces) y se incubó 5 min a 4°C.

6.12.4 Aislamiento de plásmidos

Los agregados se precipitaron por centrifugación (10 min a 13.000 g y 4 °C) y el DNA plasmídico se colocó en un tubo limpio de 1,5 ml. Se añadió posteriormente 1 ml de etanol absoluto a 4 °C. Se mezcló con la mano por inversión del tubo (6 veces). Se incubó 15 min a 4 °C. Se precipitaron los plásmidos por centrifugación (10 min a 13.000 g y 4 °C), se retiró cuidadosamente el sobrenadante. Se añadieron al mismo tubo, 900 µl de etanol al 70% (4 °C). Se mezcló suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se precipitaron

nuevamente los plásmidos por centrifugación (10 min a 12.000 g y 4 °C), retirando cuidadosamente el sobrenadante. (Protocolo modificado de OUYANG *et al*., 2008)

6.13.*Cuantificación de plásmidos por nanodrop*:

La concentración de los plásmidos correspondientes a p40 fue de:10 µg/ul y 15µg/ul para p35.

6.14.*Secuenciación y análisis de secuencia.*

La secuenciación fue realizada por macrogen USA y SSigmol Col. El análisis de secuencia se realizó empleando el programa *blast de ncbi* para evaluar homologías de secuencias (megablast nr/nt).

6.15. *Determinación de número de copias de plásmidos*

Determinación del peso molecular:

(bp tamaño del producto. DNA de doble cadena) (330 daltons x 2 nt/bp) = X dal

(3015pb)(330330 daltons x 2 nt/bp)=1989900 g/mol

Determinación del peso equivalente a 1 copia:

(1989900 g/mol) / (6,023 x 1023 moléculas/mol) = $3{,}28 \times 10^{-18}$ g/moléculas

Concentración de plásmido = 1×10^{-4}g/ml

(1×10^{-4}g/ml)/($3{,}28 \times 10^{-18}$ g/moléculas) = **$3{,}0 \times 10^{13}$ moléculas de plásmido/ml**

6.16. *Extracción de RNA y síntesis de cDNA*

La extracción de RNA total se realizó mediante la utilización del reactivo Trizol siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen). El RNA total obtenido, fue tratado con DNAsa (RQ1-Promega) para eliminar contaminación con DNA genómico. La integridad del cDNA fue evaluada empleando gel de agarosa. Se empleó 1µg de RNA total como plantilla y la síntesis de

cDNA se hizo con el *kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). El cDNA fue empleado como plantilla para la amplificación de *primers* específicos para las subunidades p40 y p35 de IL-12.

6.17. *Optimización de la concentración de primers para PCR en tiempo real.*

p35 y p40	*Forward primer (nM)*		
Reverse primer (nM)	**200**	**100**	**50**
200	200/100	100/200	50/200
100	200/50	100/100	50/100
50	200/25	100/50	50/50

6.18. *Confirmación de la amplificación especifica.*

Evaluación de los productos obtenidos por PCR en tiempo real en la optimización de la concentración de *primers* a emplear de acuerdo con la tabla anterior. La formación o no de dímeros de primers fue evaluada por geles de agarosa al 1,5%.

6.19. *PCR en tiempo real. Elaboración de curva standard y cuantificación absoluta de RNAm de p40 y p35 de IL-12:*

Se empleó el *kit Light Cycler Fast Start DNA Master SYBr Green I* (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los ensayos fueron realizados en un equipo *Light Cycler 2.0 Instrument* (Roche), con el siguiente protocolo: 1:95,0 °C por 5:00 min, 2: 95,0 °C por 0:10, 3: 54,0 °C por 0:20, 4: 72,0 °C por 0:20,5: 35 ciclos, 6:72,0 °C por 1:00 min, 7: curva *melting* de 65 a 95 °C : Incremento: 0,5 °C por 0:05, 8: 40,0 °C por 0:30. Los productos amplificados fueron

evaluados por curvas de disociación. Las diluciones de los plásmidos para la elaboración de la curva estándar fueron de 10^5-10^9

6.20. *Análisis de la ubicación intracelular de IL-12 p40/70.*

Para realizar la localización intracelular de IL-12 p40/70 y p40, se empleó microscopía confocal. Se siembraron macrófagos J774A.1 en cajas de 24 pozos a una concentración de $1x10^5$ células por pozo sobre una laminilla. Se incubarob por 24 h a 37 ºC y 5% CO_2. Posteriormente, se lavaron 1X con PBS pH 7,4 (precalentado a 37 ºC) suplementado con 5% de SFB, seguido de fijación con paraformaldehido (descongelado a 42 ºC y precalentado a 37 ºC) a 2% en PBS pH 7,4 por 30 minutos a 37 ºC. Luego se lavó 3X con PBS pH 7,4 por 5 min c/u en agitación. Luego se colocó Tritón 0,1% -metanol 1% por 15 minutos. Se realizaron 3X lavados con PBS pH 7,4 por 5 min c/u en agitación y luego se adicionó glicina 100 mM por 10 minutos, para eliminar fluorescencia inespecífica del paraformaldehído. De nuevo se lavó 3X con PBS pH 7,4 e incubó con solución de bloqueo PBS pH 7,4 y 5% de SFB, por 1 hora a 37 ºC y 5% CO_2. Se adicionó luego el anticuerpo monoclonal anti IL-12 p40/70 o IL-12 p40 en solución de bloqueo a 37 ºC y 5% CO_2 durante 1 h o a 4 ºC toda la noche. Se realizaron lavados de acuerdo con la metodología descrita anteriormente y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG acoplada a Alexa 488 o 564 (Molecular Probes). Finalmente se lavó 3X con PBS pH 7,4 en agitación y se retirarom las laminillas las cuales fueron colocadas sobre láminas portaobjetos precubiertas con líquido de montaje (fluoromount-Sigma). La evaluación se realizó en un microscopio de epifluorescencia(Microscopio confocal. 60X. FV1000 Olimpus).

Se determinó la localización de IL-12 p40/70 y p40 como: perifagosomal, perinuclear, intrafagosomal, de membrana plasmática (MP) o de distribución homogénea en citoplasma. Para refinar los datos obtenidos se realizaron dobles marcajes empleando anticuerpos anti-Golgi-

GM130, anti-RE-Calnexina, anti-endosomas tardíos/lisosomas-LAMP-1, anti-vesículas de secreción t-SNAREs-SNAP-23, anti-MP-ICAM-1 empleando como anticuerpo secundario anticuerpos anti-IgG Alexa 488 o 564 (Molecular Probes). Por último se lavó de nuevo con PBS pH 7,4 y montó en lámina portaobjetos empleando fluoromount (Sigma) o PBS- glicerol. En todos los casos se adquirieron las imágenes y se observó la colocalización de IL-12 (Murray *et al*., 2005).

6.20.1. Condiciones de exposición y análisis de imágenes:

- Potencia de laser (488 y 543): 25%, ganancia: 90-110, tiempo de captura:10ms,

-Análisis de saturación: sobreexposición, frame lamda: separación de señales (captura secuencial)

-Tamaño de la imagen: 512, extensión: ids y tiff

- Análsis de cuantificación y colocalizacion: por Image J, no se realizaron ajustes en brillo ni contraste

6.21. *Secreción de IL-12 p70 por citometría de flujo:*

Se empleó el *kit citometric bead array* (CBA; Mouse inflammation kit; Becton Dickinson) para evaluar la secreción de IL-12 p70 en sobrenadantes de cultivo de los diferentes grupos experimentales y a diferentes tiempos de tratamiento con INF-γ y LPS. Los sobrenadantes fueron colocados con una mezcla de seis poblaciones de perlas con distintas intensidades de fluorescencia, las cuales han sido previamente recubiertas con anticuerpos de captura específicos para: IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ, TNF-α, and IL-12 p70. Las seis poblaciones son resueltas en el canal rojo (FL3 o FL4) de un citómetro de flujo Facs Canto-BD. Las perlas de captura, anticuerpos de detección conjugados a PE y los estándares recombinantes junto con las muestras

fueron incubadas formando un complejo sándwich. Seguido de la adquisición de los datos los resultados son graficados y tabulados empleando el software de análisis (BD CBA Array™ Software).

6.22. *Análisis estadístico*

Para cada conjunto de datos los resultados se muestran como media ± 1 desviacion estandar (DS). El nivel de significancia se estableció en un valor $p<0.05$. La distribución de cada conjunto de datos se evaluó mediante prueba de Shapiro -Wilk y prueba de homogeneidad de varianzas. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante pueba t Student o Mann-Whitney; las diferencias entre mas de dos grupos se evaluaron mediante análisis de varianza y prueba *post hoc* de Tukey, o prueba de Kruskal Wallis. Para evaluar el efecto de la interaccion de dos factores sobre una variable dependiente se utilizo análisis de varianza de dos vías. El análisis estadístico se realizo con la ayuda de paquetes especializados (Sigma stat® para Windows versión 3.11 e IBM SPSS statitics versión 20).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

IL-12 es una citoquina importante en vertebrados mamíferos para la diferenciación y expansión de células Th1 y la producción de INF-γ. La señalización vía IFN-γ en macrófagos, permite la activación y producción de mecanismos de defensa para control de crecimiento de bacterias y parásitos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes, Coxiella burnetti , Yersinia pestis* y *Leishmania spp.*, aumenta la presentación antigénica a través de la inducción de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), regula la expresión de moléculas CD40 y dirige eventos como fusión de fagosomas con lisosomas (Piedrafita *et al.,* 1999; Mosser, 2003; Olivier *et al.,* 2005)

De acuerdo con la importancia de esta citoquina y debido a que las vías de secreción y tráfico vesicular de IL-12 no se conocen en macrófagos, se evaluó el comportamiento de su producción en sobrenadantes de cultivo, su expresión en términos de mRNA y su localización intracelular en diferentes grupos experimentales.

7.1 Cuantificación de IL-12 p70 en macrófagos primarios.

La secreción del heterodímero p70 de IL-12 fue evaluada en sobrenadantes de cultivo de 24h en macrófagos primarios peritoneales de ratón de las cepas ICR y BALB/c como control de la producción de IL-12p70 para la línea celular J774A.1.

Se detectan niveles de alrededor de 50 pg/ml de secreción de IL-12 p70 en macrófagos ICR en condición basal, que indica producción constitutiva. Estos niveles reportados son bajos y no aumentaron luego de estimulación con INF-γ (1ng/ml) y LPS (10ng/ml) indicando que no habría secreción inducida de la misma ante un estímulo que lleva a activación clásica y en donde

esta citoquina es marcadora de este proceso (Fig. 1A). Sin embargo las barras de error son muy grandes y podrían estar enmascarando el efecto de activación de esta citoquina en vista que se vio el efecto esperado para otras (ver más adelante).

Sin embargo, la secreción baja de IL-12p70 encontrada en ICR, parece ser real en vista que se detectaron niveles altos de IL-6 y MCP-1, proteínas control del proceso de activación del macrófago, mostrando además el patrón típico de activación. Se detectaron niveles de secreción constitutiva de estas proteínas en macrófagos control (Fig. 1B y C) que aumentaron para IL-6 y MCP-1 entre 4 y 2 veces respectivamente luego de activación. IL-10 una citoquina que se regula negativamente luego de la activación (Mosser, 2003), presentó este patrón mostrando niveles basales cercanos a 350 pg/ml que desaparecen luego de estimulación con INF-γ y LPS (Fig. 1D).

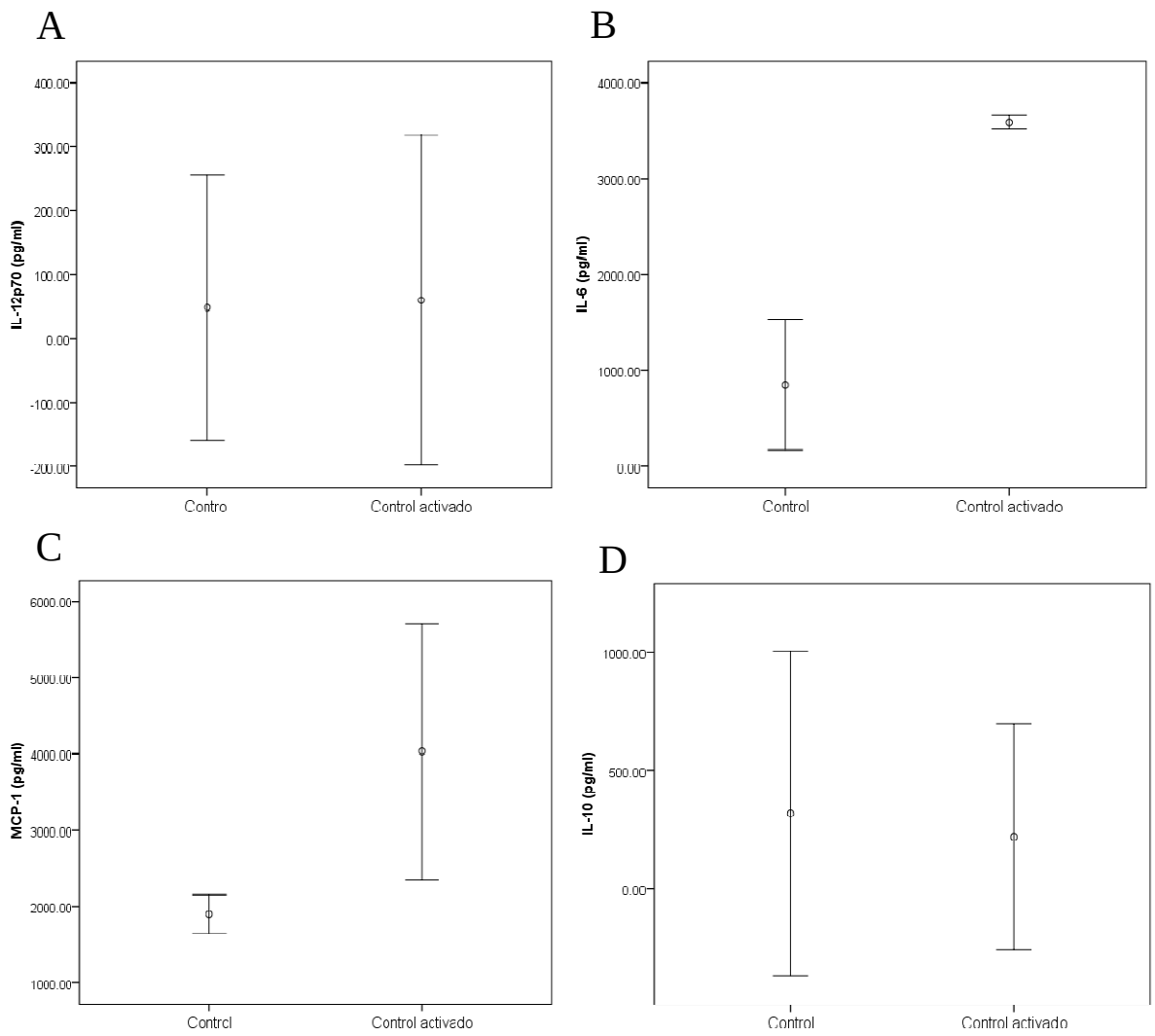


Figura 1. **Perfil de secreción de citoquinas en macrófagos primarios cepa ICR**. Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo de 24h. **A**. IL-12, **B**. IL-6, **C** MCP-1, **D**.IL-10. **Control**: macrófagos en reposo.**Control activado**: macrófagos estimulados empleando 10 ng/ml LPS + 10 ng/ml INF-γ. Los datos representan la media de 3 experimentos y las barras 1 desviación estándar.

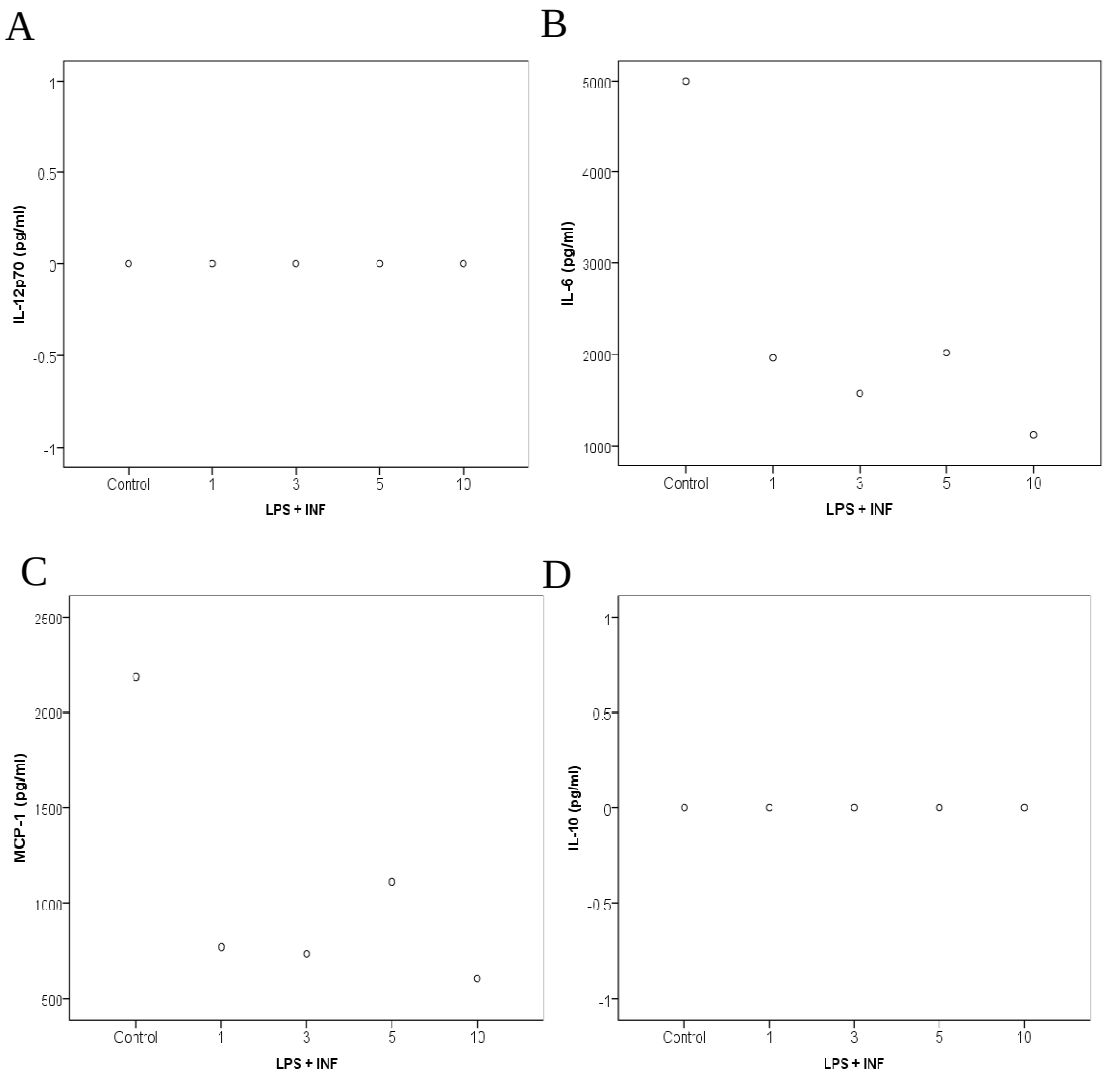


Figura 2. **Perfil de secreción de citoquinas en macrófagos primarios cepa BALB/c**. Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo de 24h. **A**. IL-12, **B**. MCP-1, **C**. IL-6, **D**.IL-10. **Control**: macrófagos en reposo. Tratamientos: **1**: 10 ng/ml LPS + 1,25 ng/ml INF-γ, **3**: 10 ng/ml LPS + 2,5 ng/ml INF-γ, **5**: 10 ng/ml LPS + 5 ng/ml INF-γ, **10**: 10 ng/ml LPS + 1ng/ml INF-γ. Los datos representan la media de 1 experimento.

Para ratones BALC/c, no se detectó secreción constitutiva como era de esperarse pero tampoco hubo secreción inducida de IL-12 p70 (Fig. 2A). En contraste con la cepa ICR la activación redujo a menos de la mitad niveles basales cercanos a 5000 pg/ml para IL-6 y de 2250 pg/ml para MCP-1 y esta reducción no siguió un patrón dosis-respuesta (Fig. 2B y C). Este resultado es paradójico. Para IL-10 no se detectó actividad alguna en ninguna de las condiciones estudiadas (Fig. 2D). Algunos niveles basales de las citoquinas estudiadas estuvieron por encima de los esperados; esto podría atribuirse a estimulación mecánica resultado del masaje peritoneal que se da para su obtención.

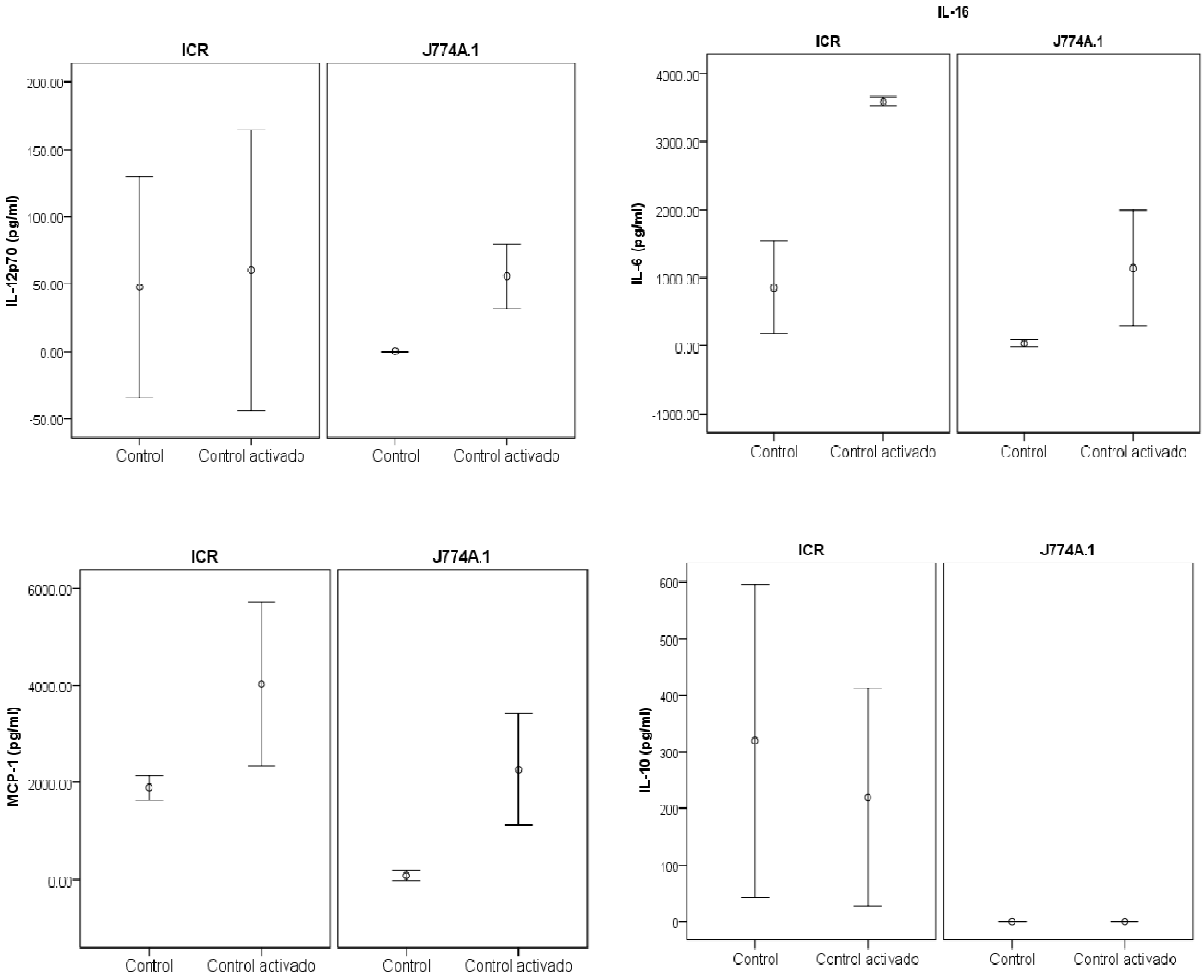


Figura 3. **Secreción de citoquinas en macrófagos primarios ICR y en la línea celular J774A.1.** Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo de 24h de marcrofagos ICR y J774A.1. **A**. IL-12, **B**. IL-6, **C.** MCP-1, **D**.IL-10. **Control**: macrófagos en reposo. **Control activado**: macrófagos estimulados empleando 10 ng/ml LPS + 1ng/ml INF-γ. Análisis no paramétrico: prueba de Mann-Whitney. Análisis para IL-12 no muestra diferencias significativas p=0.442 entre grupos, IL-6 p=0.02, MCP-1 p=0.059 e IL-10 p=0.043. Los datos representan la media de 3 experimentos y las barras 1 desviación estándar.

Al comparar la producción de algunas citoquinas entre macrófagos primarios ICR y macrófagos de la línea J774.A1 no se encuentran diferencias significativas (p=0.442) entre los niveles de secreción de IL-12p70 a las 24 post-estímulo (INF-γ y LPS; Fig. 3A). Sin embargo, es clara la inducción de la secreción de esta citoquina para J774.A1. Para las otras citoquinas IL-6, MCP-1 e IL-10 se observa la tendencia esperada luego de activación clásica de macrófagos con niveles de las citoquinas pro-inflamatorias más altos y regulación negativa de las no-proinflamatorias (Fig. 3).

7.2 **Cuantificación de IL-12 p70 en macrófagos de la línea celular J774A.1**

Una vez observada la secreción de las citoquinas IL-12, IL-6, MCP-1 e IL-10 de macrófagos primarios con respecto a la línea estudiada, se evaluó en mayor detalle la secreción de IL-12p70 en la línea celular J774A.1. Para esto se realizó la cinética de secreción a diferentes tiempos: 0, 2, 4, 6 y 24 horas luego de estímulo con INFγ y LPS en concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente (Fig. 4). En macrófagos en reposo, es decir sin estímulo (0h), no se observó secreción de IL-12p70. La cinética de secreción de IL-12p70 luego de activación clásica con INF-γ y LPS muestra que ésta es máxima a las dos horas pos-activación. No se detectó IL-12 entre las 2 y 4 horas, pero nuevamente a las 6 horas hay secreción con un pico a las 24 horas. Los niveles de IL-12 p70 aumentaron 3 y 2 veces a las 2h y 24h respectivamente, comparado con el control sin estímulo (Fig. 4A). (Rojas A y Camacho M, 2012). En contraste la secreción de TNF-α mostró un pico a las 2 horas de aproximadamente 2500 pg/ml que decreció progresivamente a menos de 500 pg/ml para las 24 horas (Montoya, 2010).

El comportamiento de esta cinética, podría reflejar una secreción bifásica donde el pico

inicial de IL-12 p70 sería resultado del estímulo INF-γ y LPS y luego, la segunda fase después de retirado el estímulo (a partir de las 2h), la secreción que podría ser producto de estimulación por parte de citoquinas inflamatorias tales como TNF-α secretada por el macrófago activado vía LPS- receptores *Toll-like* (Mosser, 2003). Existe evidencia de secreción bifásica para otras moléculas y está bien documentada para insulina. En este caso, la primera fase de la producción de esta hormona, involucra fusión de MP con un *pool* pequeño de gránulos pre-anclados a esta membrana en células beta de los islotes pancreáticos, seguido de exocitosis de la molécula cargo en respuesta a alteración de niveles de ATP. En la segunda fase existe la movilización de gránulos intracelulares inducidos exclusivamente por glucosa a sitios t-SNARE en la MP para permitir los pasos de anclaje y fusión para la exocitosis de insulina. Este proceso involucra además la reorganización de citoesqueleto y reciclaje de GTPasas de las familias Ras, Rho y Rab (Wang *et al.,* 2009).

Sin embargo, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, y teniendo en cuenta los resultados presentados, donde no se observa secreción constitutiva de IL-2p70, no habría vesículas de secreción pre-ancladas en la MP como se ha descrito para TNF-α en fagocitosis (Murray *et al.,* 2005), sino movilización posterior de vesículas hacia la MP en respuesta a estímulos como INF-γ y LPS en una primera fase y más tarde en respuesta a TNF-α en la segunda fase. El significado fisiológico de la secreción bifásica es más difícil de explicar en vista que no se encontraron precedentes en literatura para esta citoquina (Carrera *et al* 1996; Stebut *et al* 1998; Lapara *et al,* 2010; Shweash *et al*.,2011).

Para IL-6 se encontraron niveles basales bajos, alrededor de 300 pg/ml en macrófagos control en reposo. La estimulación con INF-γ y LPS genera aumento dosis respuesta para la

secreción de esta citoquina que es de 10 veces los niveles basales a las 2 horas, se duplica entre las 4-6 horas para volver hacia niveles basales a las 24 horas (Fig. 4B). MCP-1 pareciera presentar secreción constitutiva entre 1000 y 2000 pg/ml que no se altera con estimulación de dosis crecientes de INF-γ y LPS (Fig. 4C).

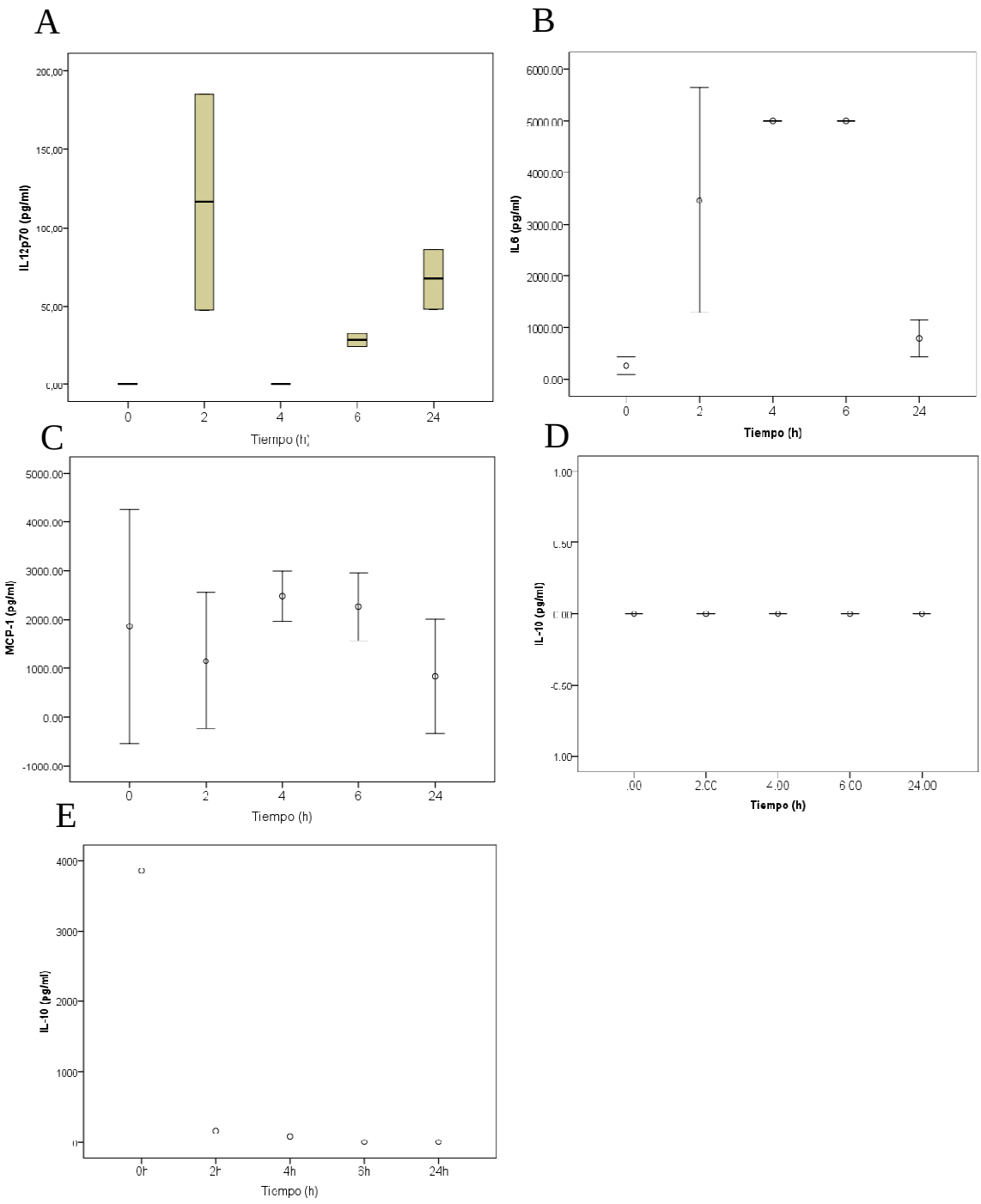


Figura 4. **Cinética de secreción de citoquinas en macrófagos J774A.1.** Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo. Macrófagos J774A.1 fueron activados o no por 2, 4, 6 y 24 horas (h) con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml). **A**. IL-12, **B**. IL-6, **C.** MCP-1, **D**.IL-10. **A**. *Box plot* representa la mediana de dos experimentos y percentiles 25 y 75 para cada uno de los tratamientos. **B-D**. Los datos representan la media de dos experimentos y las barras 1desviacion estándar. Análisis de varianza (ANDEVA de una via) P=0,181 entre tratamientos.

Debido a que la activación clásica de macrófagos se relaciona con inhibición de la producción de IL-10, se evaluó su producción en sobrenadantes de cultivo. En algunos casos no hubo secreción basal de esta citoquina y la estimulación no cambió este patrón (Fig. 4D). Se detectaron niveles basales de aproximadamente 4000 pg/ml que desaparecieron luego de estimulación con INF-γ y LPS (Fig. 4E). Este último resultado sugiere un fenotipo regulador de base en estos macrófagos que se asocia bien con la susceptibilidad que la cepa de la que vienen estas células, muestra a la infección por *Leishmania* (Alleva *et al.,* 1998).

Los resultados en la línea celular de macrófagos J774A.1 apoyan lo reportado en la literatura, donde la estimulación con INF-γ y LPS promueve secreción de IL-12 p70 (Hayes *et al.*, 1995; Snijders *et al.*, 1996; Cassatella *et al.,* 1995). La respuesta además es dosis dependiente puesto que se evidencia aumento en la producción de IL-12 p70 con concentraciones mayores de INF-γ (1ug/ml) y LPS (10ug/ml). Los niveles de secreción a las 24 h son 2 veces más comparado con pg/ml empleadas inicialmente (ver anexo B).

Los niveles de secreción de IL-12 p70 encontrados en este trabajo son bajos comparados con la secreción de otras citoquinas pro-inflamatorias. Estudios *in vitro* muestran concentraciones pequeñas para el heterodímero p70 al emplear diferentes tipos celulares, concentraciones diferentes de LPS, pre-tratamiento con INF-γ y la participación de otros tipos celulares efectores como células T. Es así como se reporta que las sub-unidades p40 y p35 son inducidas por LPS posterior a pre-tratamiento con INF-γ y, que la expresión regulada de la sub-unidad p35 controla los niveles de proteína IL-12 p70 activa en monocitos humanos purificados (Hayes *et al.*, 1995; Snijders *et al.*, 1996). Se sugiere además, que la expresión del heterodímero p70 es T-dependiente en CDs, en contraste con la subunidad p40, lo que indica que una

producción importante de heterodímero p70 podría darse sólo en presencia de células T y por lo tanto, interacciones como CD40 y CD40L serían fundamentales (Abdi *et al*., 2002). De otra parte, a pesar que se requiere una relación equimolar entre las subunidades p40 y p35 para la producción estequiométrica de heterodímero p70, se reporta que la secreción de p40 es 100-1000 veces superior a p70 en células CHO, monocitos y CDs (Trinchieri, 1998). Estos reportes explicarían los bajos niveles encontrados en la secreción y la detección posterior por inmunofluorescencia donde se buscó otra subunidad.

Los niveles de producción de IL-12 son bajos en cepas de macrófagos BALB/c, compatible con el concepto de que existe un déficit genéticamente programado, evidenciado en modelos de infección con *Leishmania major* y macrófagos BALB/c control (Alleva *et al.*, 1998), lo que sugiere que nuestra línea celular derivada de esta misma cepa BALB/c podría ser deficiente en la producción de L-12p70.

7.3 Efecto de la infección por *L. amazonensis* 48 hpi en la secreción de IL-12 p70 en macrófagos J774A.1.

La infección *per se* no induce producción de IL-12. Sin embargo, *L. amazonensis* regula en forma negativa (a una tercera parte) la secreción de IL-12 p70 de macrófagos J774A.1 activados, que sugiere que *Leishmania* modula esta respuesta (Fig.5A). (Rojas A y Camacho M, 2012; Rojas *et al*., 2009). La infección *per se* tampoco induce secreción de IL-6 (Fig. 5B). En contraste, MCP-1 se secreta a niveles similares a los inducidos por activación luego de la infección con este parásito (Fig. 5C) así como IL-10 (Fig. 5D). La estimulación con INF-γ y

LPS se constituye en estímulo de regulación positiva de IL-6 y regulación negativa de IL-10, mientras que para MCP-1 e IL-10 su efecto no sobrepasa el de la infección *per se* (Fig. 4). Estos resultados apoyan el efecto modulador de *Leishmania* sobre la producción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-12p70 e IL-6 y el favorecimiento de respuestas anti-inflamatorias mediadas por IL-10.(Rojas A y Camacho M, 2012)

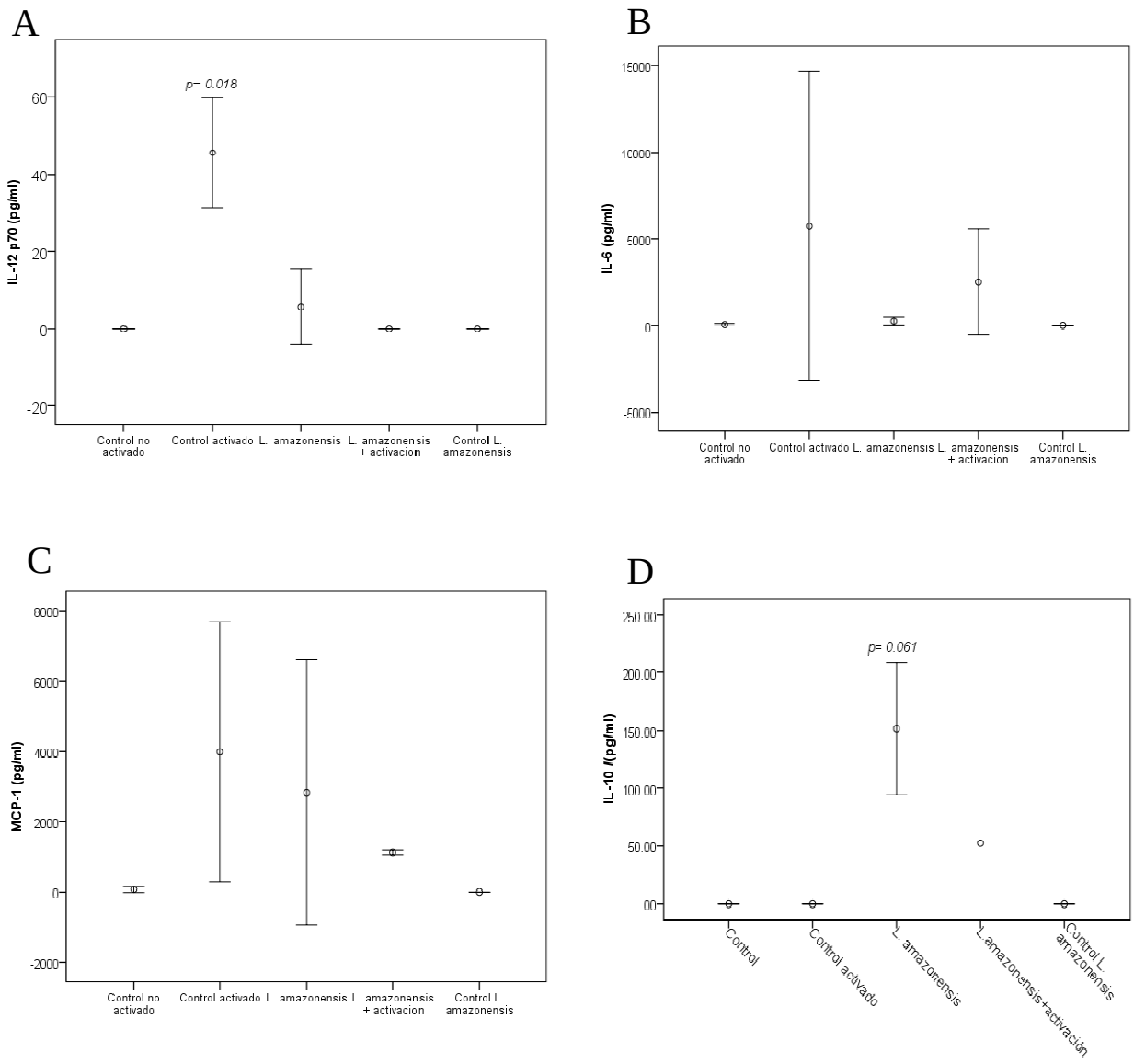


Figura 5. **Efecto de la infección por *L. amazonensis* 48 hpi en la secreción de citoquinas en macrófagos J774A.1**. Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo. **Control no activado (C)**: macrófagos J774A.1 sin estímulo**, Control activado (CA)**: macrófagos J774A.1 estimulados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml), ***L. amazonensis*** (I): macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* por 48h, ***L. amazonensis* + activación (IA)**: con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml), **Control *L. amazonensis (L)***: sobrenadante de cultivo de *L. amazonensis*. Los datos representan la media de 3 experimentos. Las barras representan 1 desviación estándar. En todos se hizo análisis de varianza y Kruskal-Wallis de una via. **A**. Secreción de IL-12 p70, p=0,018. **B**. Secreción de IL-6, p = 0,274: control activado y *L. amazonensis*. **C** Secreción de MCP-1, p=0.392: *L. amazonensis* y *L. amazonensis* + activación. **D**. Secreción de IL-10, p =0,061.

Estos resultados confirman reportes previos de la literatura para el modelo *Leishmania*, donde se observan niveles de IL-12 p70 bajos (20-40 pg/ml) a 24, 48 y 120 horas post-infección (pi) con promastigotes de *L. amazonenesis* y para monocitos humanos de sangre periférica provenientes de donadores clasificados como altos (HR) o bajos respondedores (LR) en términos de producción de INF-γ (Cohelho *et al.*, 2010). Se ha reportado también inhibición selectiva en la expresión de mRNA de IL-12 p40 así como disminución en la secreción de IL-12 mediada de manera específica por promastigotes metacíclicos de *L. major* en macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c (Carrera *et al.*, 1996).

Uno de los factores relacionados con la inhibición de la secreción de IL-12 en infección por *Leishmania*, es el fosfoglicano (FG), uno de los mayores componentes de superficie de *Leishmania*, el cual se ha descrito, inhibe selectivamente la síntesis de IL-12 (p40, p70) en macrófagos de ratón activados. Empleando FG sintetizado químicamente, se observó inhibición de la producción de IL-12 de manera dosis dependiente. A las concentraciones empleadas en el estudio, el FG no tuvo efecto sobre la producción de TNF-α o IL-6 en macrófagos activados.

La inhibición de la producción de IL-12 p40 se evidenció a nivel transcripcional, mostrando que el FG puede ser una molécula importante para el establecimiento y supervivencia de *Leishmania* en el macrófago (Piedrafita *et al.*, 1999).

Adicionalmente, ha sido bien descrita la producción de IL-10 en otros modelos tales como *Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Legionella pneumophilia* y *Yersinia pestis* regulando negativamente la producción de IL-12 y TNF-α, como un mecanismo de supresión común empleado por algunos patógenos intracelulares

para contrarrestar respuestas inmunes capaces de inducir su control y favorecer así su replicación y supervivencia en el macrófago (Redpath *et al.*, 2001), mientras patógenos intracelulares como *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* y *Listeria monocytogenes* directamente bloquean la translocación de NF-KB al núcleo impidiendo en forma directa la producción de IL-12 (Mosser y Karp, 1999; Hornef *et al.*, 2002).

En la infección por *Leishmania* se ha descrito que existe una supresión selectiva de la expresión de IL-12 p35/40 y la secreción de IL-12 p40/70. Esta disminución podría ser el resultado de una disminución en la transcripción o/y aumento en la degradación de mRNA, disminución en la síntesis o/y aumento en la degradación de proteína o alteraciones en la ubicación y secreción de la proteína. Varios estudios indican la incapacidad de las células huésped para producir IL-12 como un mecanismo primario por *default* que favorece el proceso de infección por *Leishmania*. (McMahon-Pratt and Alexander, 2004). Ademas ha sido bien establecido que tanto promastigotes como amastigotes de *Leishmania* inhiben de forma significativa la producción de IL-12 asociada con la activación celular (reviewed by Kima, 2007). Los mecanismos intracelulares a través de los cuales las especies de *Leishmania* regulan las respuestas celulares, incluida la production de IL-12 en macrofagos y otros tipos celulares no son claros aun y son objeto de estudio (Olivier et al., 2005). Asi mismo, se presentan resultados divergentes dependiendo de la especie del parasito estudiado, el estadio del parasito (promastigote o amastigote) y el tipo de celula huésped.

Se ha demostrado la inhibición de la expresión del mRNA de la subunidad p40 y secreción de la proteína IL-12 p40 en macrófagos de ratón de cepas susceptibles y resistentes, infectados con promastigotes de *Leishmania major*, junto con disminución en la expresión de

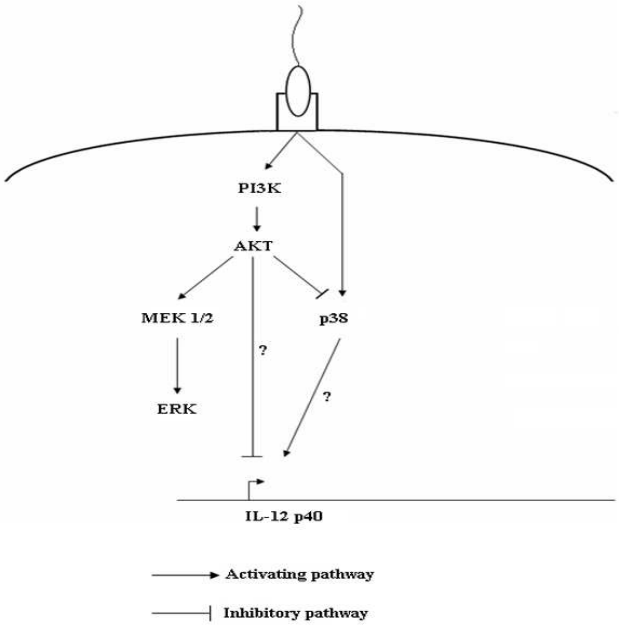
mRNA de la enzima a cargo de la generación de óxido nítrico (iNOS) y otras citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α; Carrera *et al*., 1997). Este resultado sugiere que *Leishmania* disminuye la secreción de IL-12 p40 por supresión de la expresión del mRNA pero contradice nuestros datos con relación a iNOS, en donde encontramos niveles similares de mRNA para esta enzima (Niño, 2007). Para fagocitosis también se ha descrito un fenómeno similar donde se evidencia que existe supresión de la transcripción del gen de las subunidades p40 y p35 de IL-12 mediado por receptores FcγR. Ensayos para evaluar la actividad del promotor empleando genes reporteros muestran supresión de la actividad y supresión de la expresión del mRNA de IL-12 p40 e IL-12 p35, en macrófagos activados que han fagocitado glóbulos rojos opsonizados con IgG pero no para TNF-α (Capiello *et al.*, 2001). De gual manera, la fagocitosis de parásitos opsonizados mediada por receptores FcR, induce la producción de IL-10 y la disminución de la regulación de la producción de IL-12. (Kane and Mosser, 2001; Thomas and Buxbaum, 2008). De manera similar se demuestra la supresión de la secreción de IL-12 p70 en fagocitosis mediada por receptores del complemento (C3R; Marth *et al*., 1997).

Se ha evidenciado que mientras IFN-γ es un inductor positivo de IL-12, receptores fagocíticos Fc y receptores de complemento, regulan negativamente la producción de IL-12 (Waggoner *et al.*, 2005; Marth y Kelsall, 1997; Braun y Kelsall, 2001; D'Andrea *et al.*, 1993).

De otra parte ensayos por citometría de flujo, muestran que señales de calcio pueden inhibir la secreción de IL-12 p70 en células dendríticas (CDs) maduras que expresan un fenotipo $CD83^{+}$ activadas con ionóforos de calcio. (Faries *et al*., 2001). Por lo tanto, respuestas que se asocian con la infección por *Leishmania* como fagocitosis por receptores Fc (Bauxbaum *et al*.,

2005) y C3R junto con la movilización de iCa^{+} (Eilam, 1985; Olivier, 1996) podrían también explicar la disminución en la expresión de IL-12 p35/40 y la secreción de IL-12 p40/70.

La infección por promastigotes de *Leishmania amazonensis* suprime la producción de IL-12 p70 en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMϕ). *Leishmania* activa la vía de señalización PI3K/Akt inhibiendo la transcripción de la subunidad p40. El uso de inhibidores específicos para PI3K y Akt corriente abajo revierte este proceso, permitiendo la producción de IL-12. Aunque MAP kinasa ERK (p44 and p42) fué trascientemente activada por la infección con *L. amazonensis*, la inhibición de MEK, una kinasa corriente arriba de ERK, con PD98059, no revierte este bloqueo de IL-12. De otra parte, la inhibición de otras MAP kinasas JNK y p38 así como el tratamiento de células con toxina pertussis que bloquea la señalización mediada por proteínas G no revierte la inhibición de la producción de IL-12. Interesantemente, la activación de la señalización por PI3K/Akt tiene efectos diferenciales en la activación de ERK y p38. De acuerdo con estos resultados, se propone que la infección de BMDM con promastigotes de *Leishmania* activa vías de señalización positivas y negativas que controlan la producción de IL-12. Señalización de PI3K activada por la infección es una vía de señalización negativa que previene la producción de IL-12. (Ruthland *et al.*, 2010)



Esquema hipotético de señales de transducción de PI3K/Akt y MAP kinasas que regulan la producción de IL-12 en macrófagos infectados por *L. amazonensis*. La activación de Akt modula diferencialmente la activación de ERK y p38, mientras que la inhibición de PI3K/Akt resulta en la inducción de p38. La inhibición de Akt suprime la activación de ERK. No obstante, la supresión de IL-12 no es relevante sobre la inhibición de ERK y ERK está influenciando Akt corriente abajo. Aunque p38 es negativamente regulado por Akt, la inducción de la producción de IL-12 es independiente de la activación de PI3K (Ruthland *et al.*, 2010).

Los efectos de la infección por promastigotes metaciclicos de *Leishmania mexicana* sobre la señalizacion de MAP kinasas en macrófagos de medula ósea de ratón, han demostrado el papel de receptores Toll like (TLR-4) en la inducción de la expresión de COX-2, iNOS y arginasa-1 como factores que contribuyen a la inhibición de la producción de IL-12 por la célula huésped (Muhannad Shweash et al, 2011). Es así como un aumento en la producción de PGE2 mediada por *Leishmania* via COX2 inhibe la capacidad del macrófago para producir IL-12. (Matte et al., 2001;Reiner and Malemud, 1985).

Receptores toll-like (TLRs) han sido implicados en el control de la infección por *Leishmania* para la transcripción de genes que codifican proteínas como IL-12, TNF alfa. Por ejemplo, TLR-2 y MyD88 en infección por *L. major* (De veer et al., 2003; Kavoosi et al., 2010) y *L.braziliensis* (Vargas-Inchaustegui et al., 2009), TLR-4 en infección por *L. major* (Kropf et al., 2004) y *L. pifanoi* (Whitaker et al., 2008) y TLR-9 en infección por *L.donovani*, *L. major* y *L. braziliensis* (Liese et al.2007; Schneider et al., 2007).

Leishmania mexicana y *Leishmania amazonensis* pueden mediar directamente la degradación del factor de transcripción NF-κB. (Cameron et al.,2004) y JAK/STATs (Xin et al., 2008), importantes en la transcripcion de genes para la producción de IL-12. Estos efectos son asociados a la expresión de una cisteína peptidasa B (CPB) derivada de amastigotes, (Abu-Dayyeh et al., 2010; Cameron et al., 2004) o a moléculas de superficie tales como el lipofosfoglicano(LPG) (Balaraman et al., 2005;Feng et al., 1999).

7.4 Efecto de la fagocitosis en la secreción de IL-12 p70

Para evaluar si el impacto del volumen del fagosoma contribuye con la disminución de la secreción de IL-12 p70 de manera específica o no, se realizaron ensayos de fagocitosis empleando perlas de látex que generan volúmenes de fagosoma más pequeños, iguales o superiores a la infección con *L. amazonensis* 48 hpi. Los resultados muestran que la fagocitosis de perlas de látex *per se*, no estimula secreción de IL-12 p70 en macrófagos J774A.1, en ninguno de los grupos experimentales, ni a diferentes tiempos post-fagocitosis (pf) y post-activación (pa) (Fig. 6).

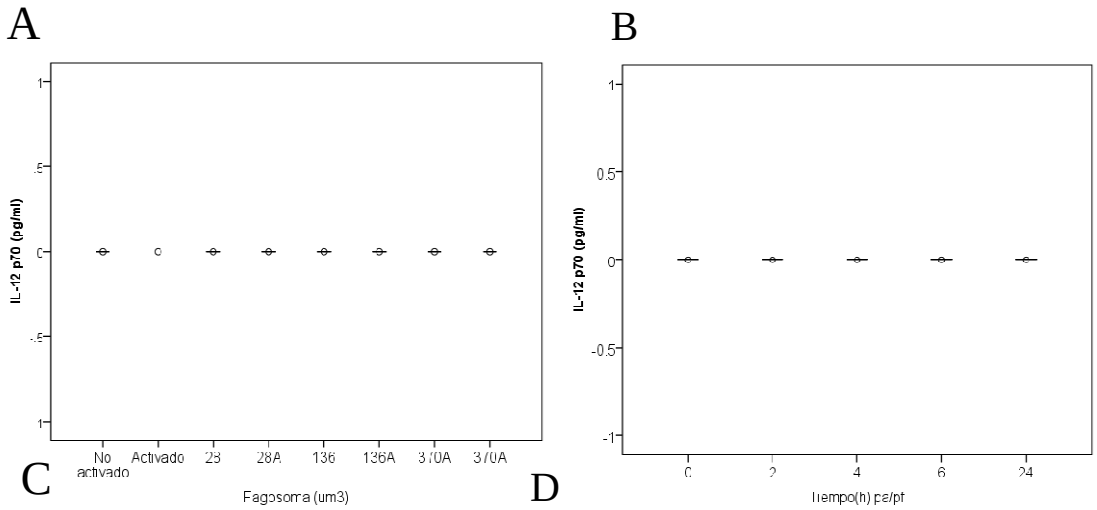


Figura 6. **Efecto de fagocitosis de partículas inertes en la secreción de IL-12p70 en macrófagos J774A.1**. Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo a las 0, 2, 4, 6 y 24 horas post-fagocitosis (pf) con perlas de látex que generan fagosomas de diferentes volúmenes: (28µm^3, 136µm^3 y 370µm^3), y post-estímulo (pa) con INF-γ (1µg//ml) y LPS (10 µg/ml). **A**. Secreción de IL-12p70/ tamaño del fagosoma, **B**. Secreción de IL-12p70/tiempo (h) pa/pf. **No activado**: Macrófagos J774A.1 en reposo, **A** y **Activado**: Macrófagos J774A.1 estimulados. Las barras representan el intervalo de confianza (IC 95%) para la media de 4 experimentos.

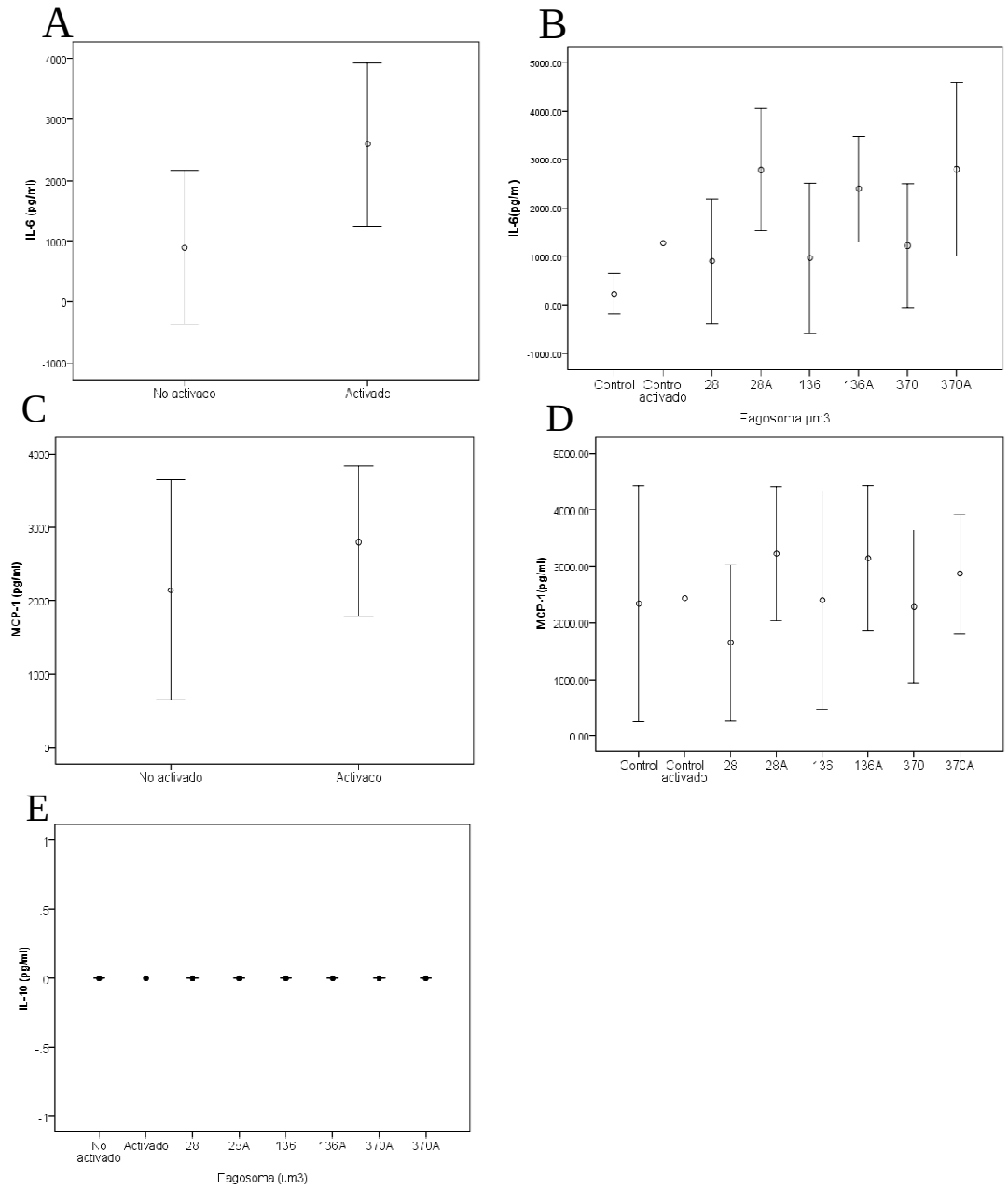


Figura 7. **Perfil de secreción de citoquinas en fagocitosis de macrófagos J774A.1**. Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo a las 24 h pos-fagocitosis (pf) con perlas de látex que generan fagosomas de diferentes tamanos: (28µm^3, 136µm^3 y 370µm^3). **No activado**: Macrófagos J774A.1 en reposo, **Activado**: Macrófagos J774A.1 estimulados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml),**A**: fagocitosis + estimulación con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml).**A**. Secreción de IL- 6, Análisis de varianza de una vía (Kruskal-Wallis), P=0,020. **B**. Secreción de IL-6/ fagosoma µm^3. Análisis de varianza de dos vías. P=0,014: F1 (28 y 28A), P=0,070: F2 (136 y 136A), P= 0,058: F3(370 y 370A), p=0,095 entre grupos. **B**.MCP-1, **C**. IL-10. Las barras representan la media de 4 experimentos con 1desviación estándar

Para evaluar si la ausencia de secreción de IL-12p70 era debida a la incapacidad de los macrófagos para activarse, se determinó conjuntamente la producción de IL-6 y MCP-1. Los niveles de secreción observados para estas proteínas en macrófagos no estimulados y luego de estimulación para cada uno de los grupos experimentales, evidencian activación del macrófago, independiente de la secreción de IL-12 p70 (Fig 7). Más aún se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos activados y no activados. La activación aumenta los niveles de secreción de IL-6 comparado con la fagocitosis *per se* para todos los grupos experimentales. Estos datos sugieren que si bien el proceso de fagocitosis no induce secreción de IL-12p70 en macrófagos J774A.1, no altera la respuesta de activación como sucede en infección y no se asocia con el tamaño del fagosoma (Fig. 6 y 7).(Rojas A y Camacho M, 2012)

La secreción de MCP-1 no muestra diferencias entre la fagocitosis *per se* y la fagocitosis + activación (Fig. 7B). Tampoco se observó secreción de IL-10 para ninguno de los grupos experimentales lo que mostraría que IL-10 es una proteína específicamente inducida por *L. amazonensis* (Fig. 7C).

En células C57BL y macrófagos de médula ósea, se evidencia secreción de IL-12 p40/70 en infección con *M. tuberculosis* y fagocitosis de perlas de látex de 1,2 µm y 3,1µm(Ladel *et al.*, 1997) lo que sugeriría producción diferencial de IL-12 de acuerdo con el tipo celular empleado y confirma nuestros hallazgos en donde macrófagos J774A.1 derivados de cepas BALB/c son fenotípicamente bajos productores de IL-12.

Un estudio comparativo entre la infección por *Leishmania* y la fagocitosis de partículas de látex empleada como control de la producción inespecífica de L-12, evidenció que *L. major* y

L. amazonensis suprimen los niveles de secreción de IL-12p40 en macrófagos C57/BL6 estimulados con LPS, 3.3 veces y 4.7veces respectivamente. En contraste, fagocitosis con perlas de látex suprime la producción de IL-12p40 solo 1.4-veces comparado con la infección. La producción de 12p70 (IL-12p40/IL-12p35) es disminuída 2-veces por *Leishmania amazonensis* en macrófagos estimulados con LPS a las 19 hrs, mientras *L. major* y fagocitosis de partículas de látex muestran poca supresión. Además la infección por *Leishmania* no induce niveles significativos de producción de otras citoquinas proinflamatorias, a diferencia de la infección por *Leishamania* + LPS, observandose una disminución parásito-específica de proteínas como IL-12, IL-17 e IL-6 donde *L. amazonensis* fué más supresiva que *L. major*. Además la producción de IL-1α, TNF-α y quimioquinas como MIP-1 yMCP-1 e IL-10, fue incrementada durante la infección por *Leishmania* de forma parásito-específica comparado con la fagocitosis de partículas de látex. (Lapara et al., 2010)

En resumen, *L. amazonensis* inhibe la secreción de IL-12p70 y modula la capacidad de activación del macrófago infectado post-estímulo con INF-γ y LPS. A su vez, la fagocitosis de partículas inertes, no estimula la secreción de IL-12p70, pero no inhibe el efecto de activación como si lo hace la infección. Con estos datos, el volumen del fagosoma no estaría alterando la secreción de de IL-12p70. (Fig.5 y 6). De igual manera, la secreción de IL-6 no es inducida por *L. amazonensis* pero a pesar de la presencia del parásito la estimulación logra activar el macrófago (Fig. 5). De la secreción de MCP-1 no es posible concluir nada en vista que se aumenta en todos los tratamientos con barras de dispersión muy grandes que de haber efecto lo estarían enmascarando (Fig. 5 y 7). Finalmente, se observa secreción de IL-10 en infección por *L.amazonensis* y la disminución de los niveles de producción en macrófagos infectados post-estímulo con INF-γ y LPS, al igual que en fagocitosis de partículas de látex, sugiriendo que la

producción de IL-10 es específica de la infección por *Leishmania* (Fig. 5 y 7).

7.5 Cinética de la distribución de IL-12 p40/70 y p40. Caracterización de la ruta secretora en macrófagos J774A.1.

Para determinar cómo es la distribución intracelular de IL-12 en el modelo de estudio se evaluaron los niveles de fluorescencia y localización de IL-12 p40/70 y p40 por microscopía confocal para cada uno de los grupos experimentales. Los resultados muestran que no hay expresión constitutiva de IL-12 p40/70 y p40 en macrófagos de la línea celular J774A.1, lo que confirma los hallazgos obtenidos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo (Fig. 8)**.**

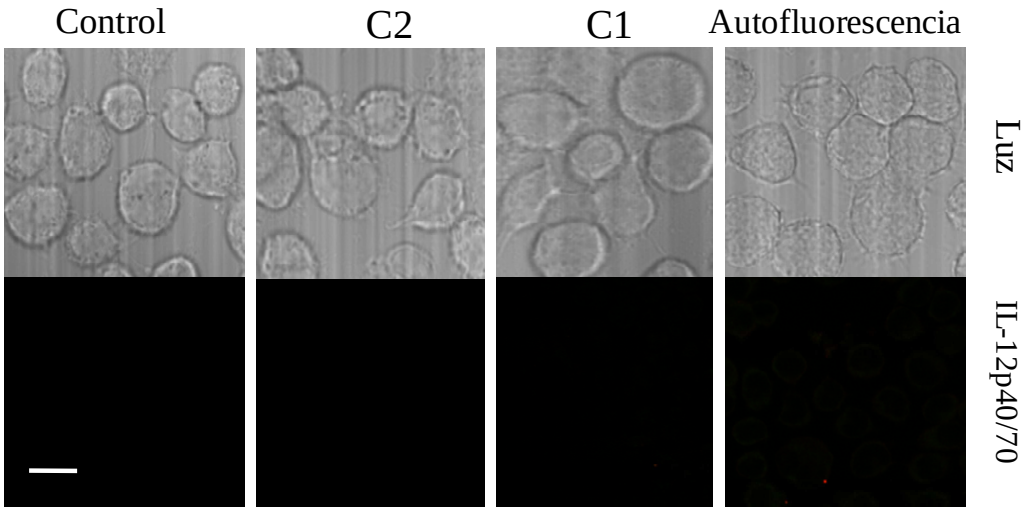


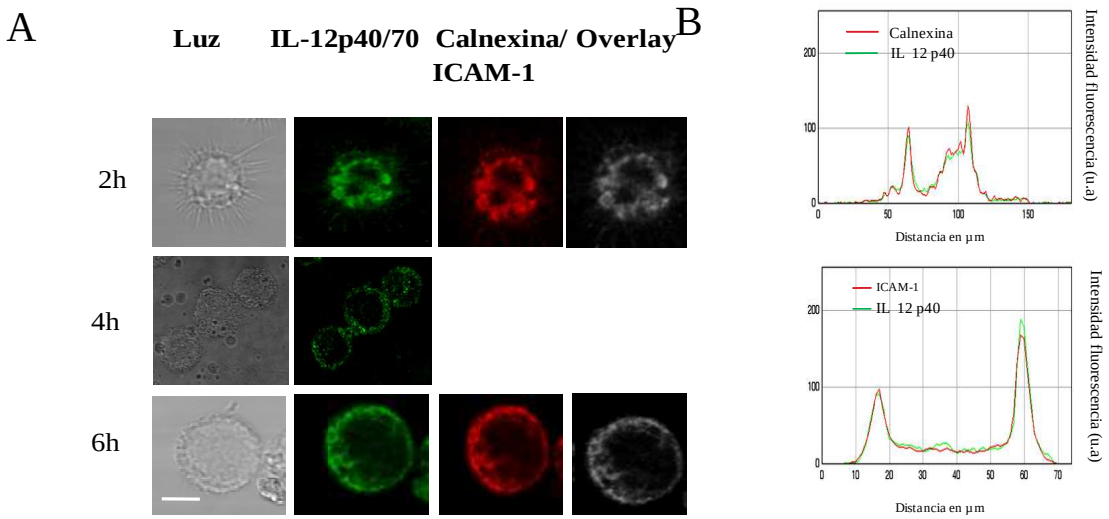
Figura 8. **Producción de IL-12 p40/70 y p40 en macrófagos J774A.1 sin estímulo.** Experimentos por microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal**. Control:** Macrófagos sin estímulo, **C1**: control de anticuerpo primario anti-IL-12p40/70 o anti-IL-12 p40 denaturado por 1 min a 60 ^{o}C, **C2**: control de anticuerpo secundario, **Autofluorescencia**: Control de autofluorescencia. Los datos representan 10 experimentos (n = 300 células). La barra representa 10µm.

Se observa expresión inducible de IL-12 p40 a 1h y 2h pos-activación estimulando con INF-γ (1µg/ml) y LPS (10 µg/ml) (Fig. 9). La distribución de IL-12 p40 es reticular. Análisis cualitativo de la fluorescencia muestra colocalización de IL-12 p40 con calnexina, lo que evidencia que esta proteína se localiza en retículo endoplasmatico (RE) en los tiempos evaluados (Fig. 9B-C). Calnexina es una proteína integral de membrana de 90 kDa localizada en el RE. Contiene en el extremo N-terminal, un dominio de unión a calcio (Ca^{2+}) el cual se extiende dentro de la luz del RE y posee un dominio corto acídico citosólico. Calnexina se asocia con varias proteínas a su paso a través del RE y forma complejos con otras proteínas residentes del RE involucradas en retención de proteínas Ca^{2+}-dependiente, actuando como chaperona. Su secuencia de aminoácidos es altamente conservada entre especies y es similar en secuencia a calreticulina, otra proteína de unión a Ca^{2+} encontrada en RE. A las 4 horas post-estímulo IL-12 p40/70 migra en vesículas observándose distribución submembranal y membranal respectivamente. A las 6 h pos-estímulo, IL-12 p40 se observa en MP (Fig. 9).

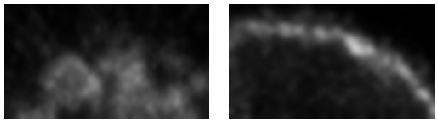
Análisis cualitativo de fluorescencia evidencia la colocalización de IL-12 p40, con una proteína integral de membrana derivada de la línea monocito-macrófago (ICAM-1) (Fig. 9B-C). En esta cinética, se observa expresión temprana de IL-12 p40/70 y p40 a partir de 1 h luego de estimulación con INF-γ y LPS localizándose probablemente vía RE-Golgi-MP en vesículas de secreción.

En macrófagos peritoneales cepa ICR, no se observó producción constitutiva de IL-12p40. En contrate, se evidencia producción regulada post-estímulo con INF-γ y LPS a las 4h. El patrón observado corresponde a localización en membrana plasmática (MP). La movilización de IL-12p40 en macrófagos primarios hacia la membrana se observó de manera más temprana comparada con macrófagos J774A.1, lo que nos permite establecer diferencias respecto a líneas

celulares establecidas (Fig. 10).



C



	Calnexina	ICAM-1
C. Pearson	0.72	0.82
* Plots (X= verde, Y=rojo)	n=46	n=33

Figura 9. **Cinética de la producción de IL-12 p40/70 en macrófagos J774A.1**. Experimentos por microscopía confocal. Macrófagos J774A.1 fueron activados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml) por 2h, 4h y 6h. **A**. **2h**; Localización de IL-12 p40/Calnexina en RE, **4h**: IL-12p40/70 en MP, **6h**: Localización de IL-12 p40/70/ICAM-1 en MP, **B**. Perfil de la fluorescencia para IL-p40/calnexina e IL-12p40/ICAM-1, **C**. Coeficiente de correlación de Pearson. Análisis cualitativo de colocalización por Image J. Los datos representan 3 experimentos (n = 100 células). Barra representa: 10 µm.

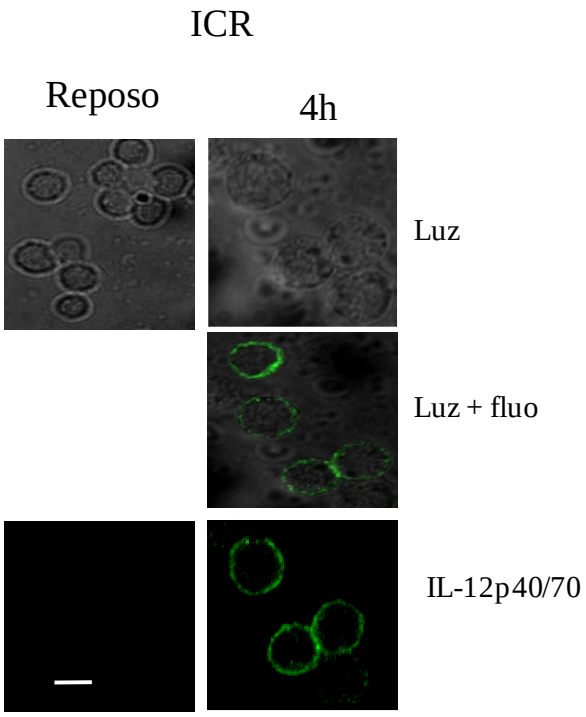


Figura 10. **Producción de IL-12 p40/70 en macrófagos peritoneales ICR**. Experimentos por microscopía confocal. Macrófagos ICR fueron activados o no con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml) por 4h. Localización de IL-12 p40/70 en MP, E. Los datos representan 3 experimentos (n = 100 células). Barra representa: 10 µm.

7.5.1. *Inhibición del tráfico vesicular de IL-12.* Para caracterizar la ruta de secreción de IL-12 p40 se empleó BFA como inhibidor del transporte entre el RE y complejo de Golgi (CG). BFA es un derivado de hongos el cual inhibe tráfico vesicular bloqueando exportación de proteínas de RE y causando desensamblaje del CG con subsequente fusión de las citernas *cis*-Golgi y *medial*-Golgi con el RE (Nie, 2003). La distribución normal del marcador GM-130 para *cis*-Golgi en macrófagos J774A.1 control, estimulados con LPS e INF-γ es juxtanuclear y compacta y colocaliza además con IL-12 p40 (Figs. 11A y D). El tratamiento con BFA 5µg/ml por 1 h, altera la morfología en "cinta" del CG y sugiere inhibición del tráfico vesicular de IL-12 p40 con acumulación de la proteína en *cis*-Golgi (Figs. 11B y E). Una vez es lavado el

tratamiento, se evaluó la recuperación celular a las 2 h, observándose disminución en la señal correspondiente a IL-12 p40 con distribución difusa en citoplasma sin colocalización con GM-130, debido a los cambios morfológicos del Golgi, evidenciado por distribución fragmentada del marcador GM-130 (Fig. 11C).

Se observan cambios significativos en la morfología celular, así como cambios en el patrón de marcaje del CG. Hay dispersión de la fluorescencia en el citoplasma observándose localización errónea para el marcador de *cis*-Golgi, sugiriendo redistribución de membranas del CG por fragmentación, probablemente asociados a subregiones del RE, debido a despolimerización de microtúbulos (Fig. 11C). Análisis cualitativo de fluorescencia muestra colocalización de IL-12 p40 con la proteína GM-130 marcador de *cis*-Golgi, sugiriendo que la secreción de IL-12 p40 depende de la ruta secretora clásica RE-Golgi (Figs. 11E y G). Análisis cuantitativo del porcentaje de distribución de fluorescencia en células tratadas con BFA, confirma colocalización de IL-12 p40 / GM-130 y muestra una distribución preferencialmente perinuclear característico del CG (Fig. 11F).

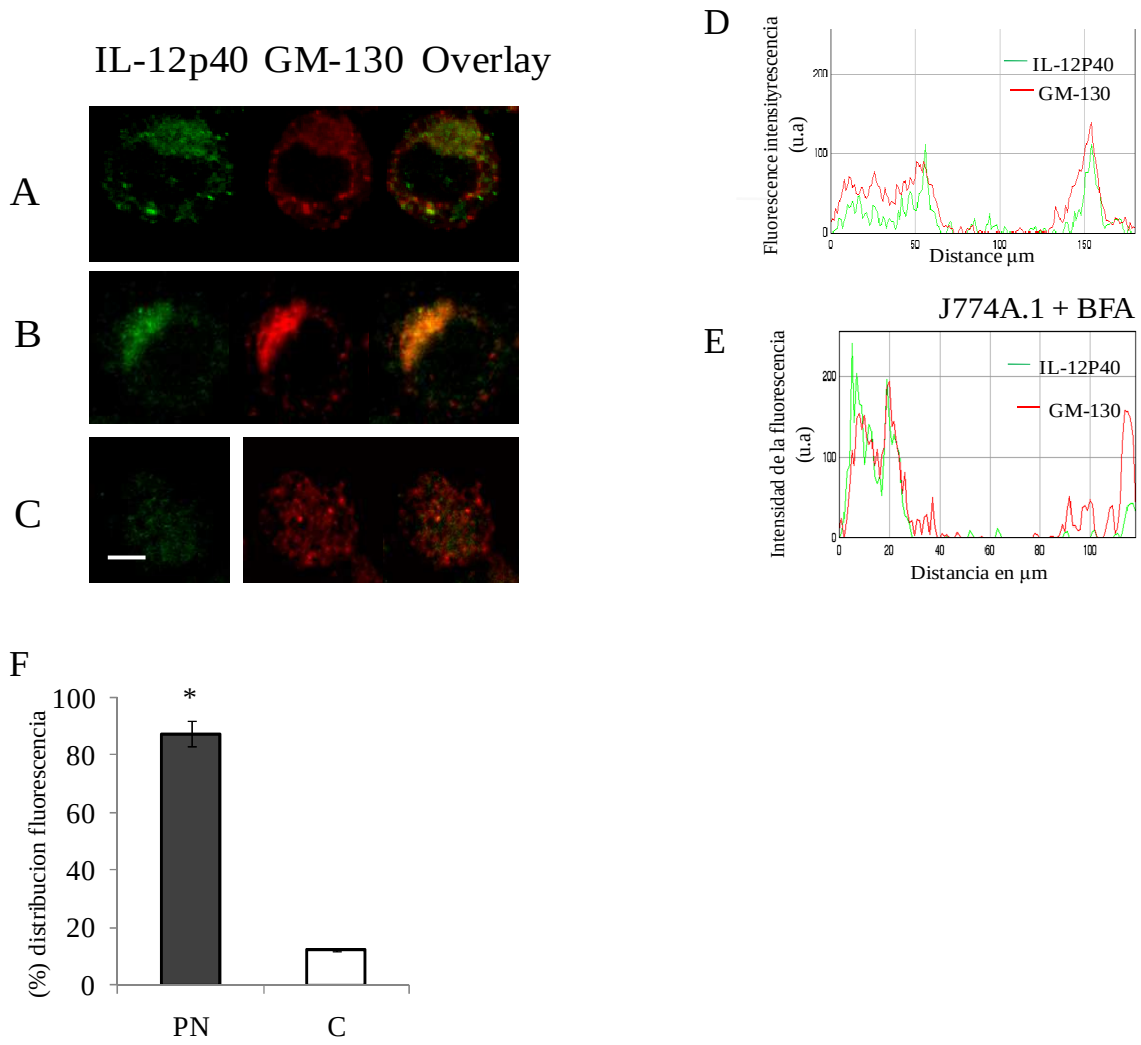


Figura 11. **Inhibición del tráfico vesicular de IL-12 p40 por BFA**. Ensayos por microscopía confocal. Macrófagos J774A.1 estimulados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml) por 2 h y tratados con BFA (5 µg/ml) por 30 min o 1h. **A**. Localización de IL-12 p40 / GM-130 en *cis*- Golgi en macrófagos control sin tratamiento con BFA, **B.** Distribución de IL-12 p40 / GM-130 en macrófagos tratados con BFA, **C.** Localización de IL-12p40/GM-130 2h después de retirado el tratamiento con BFA. **D y E**. Análisis cualitativo de colocalización y distribución de la fluorescencia por Image J, en macrófagos control y tratados con BFA respectivamente. Los datos representan 3 experimentos (n = 100 células). (*): T Student: $p<0,002$. Barra representa: 10 µm.

7.6 Efecto de la infección por *L. amazonensis* 24 hpi en la distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1. Caracterización de la ruta secretora y endocítica.

Para caracterizar la ruta de secreción de IL-12 p40 vía RE-Golgi-MP en infección por *Leishmania*, se emplearon los marcadores calnexina y SNAP-23. Se encontró que IL-12 p40 se distribuye de manera uniforme en citoplasma y a nivel submembranal, donde colocaliza con componentes del RE como calnexina la cual es una proteína especifica de RE (Fig. 12A). Esta colocalización se hace más evidente cuando los macrófagos infectados son estimulados con INF-γ y LPS (*Leishmania* + activación), observándose reubicación de IL-12p40/calnexina hacia MP en una distribución membranal (Fig.s 12A y C). La localización de IL-12p40/calnexina en MP, demuestra alteración en el patrón característico de distribución en red del RE, lo que sugiere que el efecto de la infección por *L. amazonesis* 24 hpi, es retención de IL-12 p40 vía RE-CG y alteración en la distribución reticular de componentes de la ruta secretora hacia la superficie celular. Análisis cualitativo de fluorescencia evidencia colocalización IL-12 p40/calnexina (Figs. 12B y D). IL-12p40/calnexina, se distribuye en MP en más del 60% de las células evaluadas lo que podría sugerir además, la disponibilidad del compartimento (RE) para la formación del fagosoma debido a su localización en MP (Fig. 12C). Marcaje de membranas de VP con anticuerpos para receptores de membrana de RE es positivo indicando que membrana de este compartimiento es donada para la formación de la VP. (Ndjamen B *et al*., 2010)

Existe evidencia respecto al reclutamiento del RE hacia la superficie celular donde parece que este se fusiona directamente con la MP para la formación de la copa fagocitica, en un proceso denominado " fagocitosis-mediada por RE", observado en fagocitosis por *Leishmania, Salmonella* y en fagocitocis de partículas de látex en macrófagos J774, respaldando así estos hallazgos por microscopia confocal para 24hpi. El mecanismo molecular de esta fusión ha sido

descrito, involucrando participación de Sec22 (RE-vSNARE) y Sso1/sec9c (MP-tSNARE) (McNew *et al*., 2000). De otra parte, se ha descrito que la fagocitosis mediada por RE es regulada en parte por phosphatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y es empleada para la internalización de partículas inertes y parásitos intracelulares (Gagnon *et al*., 2002). Así mismo, ensayos por inmunofluorescencia han mostrado no solo una fuerte asociación entre Calnexina y *Leishmania*, sino también en otros modelos como *Brucella* y *Legionella* mostrando la interacción de estos patógenos con el RE (Celli y Gorvel, 2004; Robinson y Roy, 2006; Fortier *et al.*, 2007). Estudios por microscopía electrónica en neutrófilos, muestran que promastigotes de *L. donovani* son dirigidos dentro de 2 tipos de compartimentos. Empleando ensayos citoquímicos con glucosa 6-fosfatasa, se evaluó la contribución de lisosomas en la formación de un compartimento lítico para la degradación rápida de patógenos y ensayos de fusión empleando parásitos genéticamente modificados carentes de LPG, donde se evaluaron compartimentos independientes de lisosomas y con participación del RE. Estos resultados demuestran la habilidad de *L. donovani* para eliminar el tráfico vesicular dentro de compartimentos derivados de lisosomas como un proceso de adaptación para el escape de la respuesta inmune en neutrofilos (Gueirard *et al*., 2008; Ndjamen *et al*., 2010)

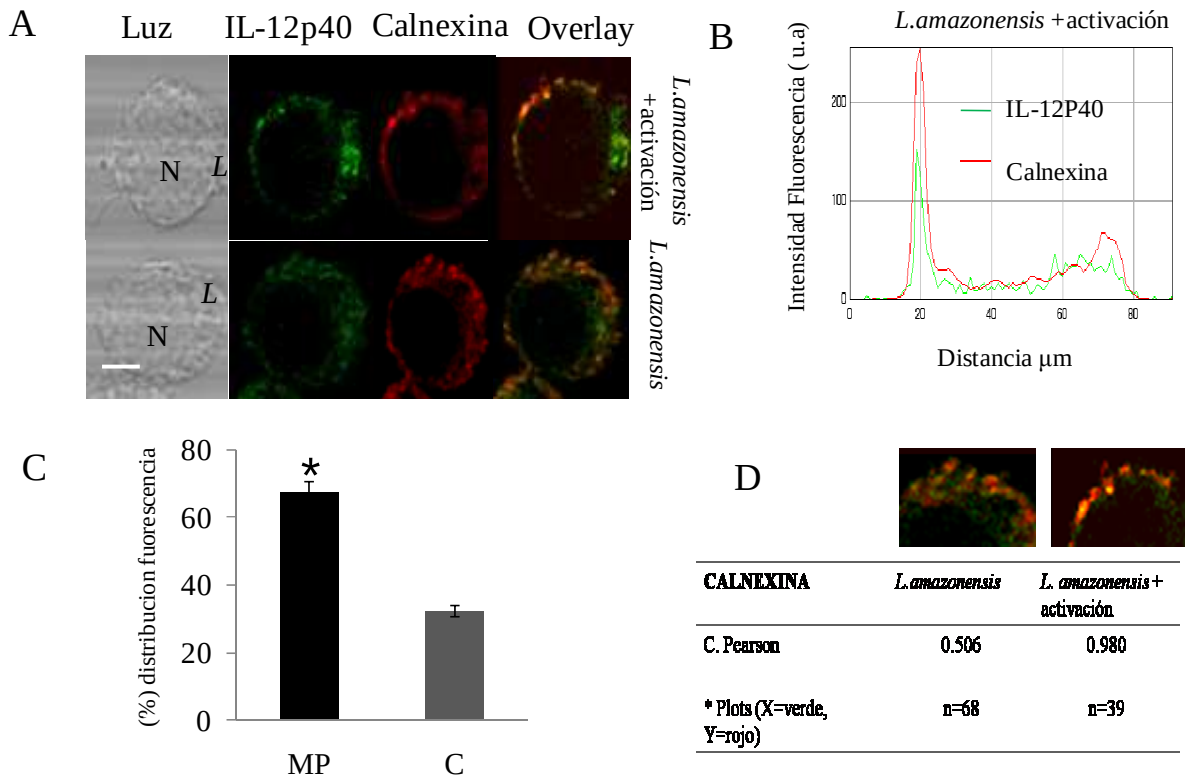


Figura 12. **Efecto de la infección por *L. amazonensis* 24 hpi en la distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1**. Ensayos por microscopía confocal. **A.** Distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* 24 hpi, ***L. amazonensis***: macrófagos infectados, ***L. amazonensis* + activación:** macrófagos infectados estimulados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml),**B**. Perfil de distribución de la fluorescencia de IL-12 p40 (verde) / calnexina (rojo), **C.** Porcentaje de distribución de IL-12 p40 / calnexina en MP. **D**. Coeficiente de correlación de Pearson para cada tratamiento. Análisis cualitativo de colocalización IL-12 / calnexina empleando el software Image J. Los datos representan 3 experimentos (n = 100). (*): T Student: p<0,002. Barra representa: 10µm.

De otra parte, se evidenció que *L. amazonensis* podría retener IL-12 p40/70 en compartimentos del Golgi, donde se observó el patrón perinuclear característico de este compartimiento. Estos resultados sugieren que el macrófago 24hpi podría además retener el heterodímero p70 como molécula biológicamente activa con implicaciones en la respuesta inmune para la eliminación de *Leishmania* (Figs. 13A y B).

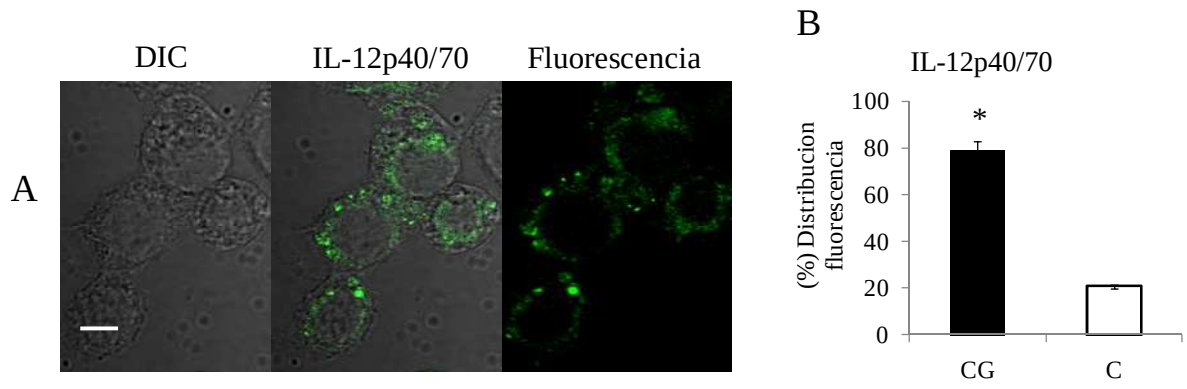


Figura 13. **Efecto de la infección por *L. amazonensis* 24 hpi en la distribución de IL-12 p40/70**. Ensayos por microscopía confocal. **A.** Distribución perinuclear de IL-12p40/70 en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* por 24h, **B**. Análisis de la distribución de fluorescencia. CG: complejo de Golgi (distribución perinuclear), C: Distribución citoplasmática. (*): T Student: $p<0,002$. Los datos representan 3 experimentos (n = 60 células). La barra representa 10μm.

Evaluación por ensayos de microscopía confocal y *Western blot*, empleando un constructo acoplado a GFP el cual contiene fragmentos de cDNA correspondientes a 2 isoformas de mRNA de diferente longitud (con o sin péptido señal) en células CV1, muestran que la subunidad p35 se acumula en compartimentos tempranos del CG como una proteína integral de membrana, mientras que IL-12 p40 se acumula como una proteína soluble. Se conoce que el ensamblaje de las subunidades p40 y p35 tiene lugar en RE, pero no existe evidencia acerca del

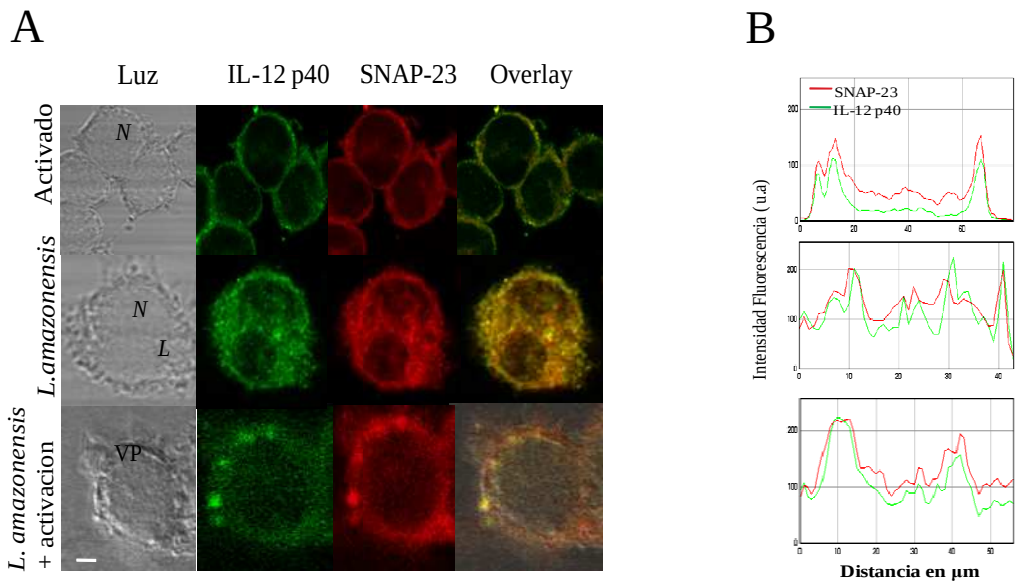
clivaje en *trans*-Golgi o post-Golgi para la secreción regulada del heterodímero p70 (Vaidanathan *et al*., 2003).

IL-12 p40 se distribuye en MP de macrófagos estimulados por 4 h con INF-γ y LPS, y colocaliza con SNAP-23 (Fig. 14). SNAP-23 pertenece a una familia de proteínas de membrana SNARE las cuales catalizan procesos de fusión de membranas y por lo tanto actúa como un marcador para vesículas de secreción. La infección con *L. amazonensis* altera la distribución de IL-12 p40/SNAP-23, observándose retención de IL-12p40 a nivel de citoplasma. A pesar que observamos localización de IL-12p40 en MP, es evidente que existe mayor distribución de la proteína a nivel intracelular (Fig. 14). Sin embargo, estímulo con INF-γ y LPS pos infección (*L. amazonensis* + activación) permite la movilización de IL-12p40/SNAP-23 hacia MP (Fig. 14). Estos resultados sugieren que el tráfico vesicular de IL-12 p40 se realiza vía RE-Golgi-SNAP-23 en vesículas de secreción. Análisis cualitativo del perfil de fluorescencia, evidencia la colocalización de IL-12 p40/SNAP-23 (Figs. 14B yC). Estos resultados sugieren que el efecto de la infección por *L. amazonensis* 24 hpi, es la retención de componentes de la ruta secretora en organelos citoplasmáticos. Este efecto indirectamente modularía respuestas que tendrían como consecuencia supervivencia del parásito dentro del macrófago, evitando la secreción de productos inflamatorios tales como IL-12 p40 y p40/70 en vesículas conteniendo SNAP-23, por la vía clásica de secreción y confirma los hallazgos de este estudio por citometría de flujo.

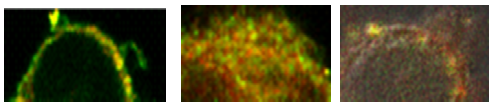
SNAP-23 es requerida para la secreción regulada de IL-12 p70 indicando un papel importante en tráfico anterógrado post-Golgi y fusión de vesículas secretoras con la MP. SNAP-23 es distribuida entre organelos del citosol y MP conjuntamente con IL-12 p40. La movilidad y distribución de v-SNAREs hacia MP para eventos de fusión es fundamental para la exocitosis de IL-12 p40 y p70. En infección por *Leishmania*, esta movilidad se altera ocasionando

probablemente inhibición en la formación de agregados (*clusters*) con proteínas como Syntaxinas teniendo efecto directo sobre la maquinaria de fusión para anclaje y exocitosis de vesículas conteniendo IL-12.

Para evaluar si IL-12 emplea rutas alternativas a la ruta secretora biosintética para su secreción, valoramos LAMP-1 como marcador de endosomas tardíos y lisosomas de la ruta endocítica. Los resultados muestran que IL-12 p40 colocaliza con componentes de la vía endocítica de macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonesis* 24 hpi, lo que sugiere rutas de secreción alternativas a RE-Golgi para IL-12 (Fig. 15). La distribución de IL-12 p40 / LAMP-1 es en vesículas citoplasmáticas en macrófagos infectados con *L. amazonensis*, coherente con la distribución de lisosomas en la célula (Fig. 15A). Una vez el macrófago infectado es estimulado con INF-γ y LPS, la distribución de IL-12 p40 / LAMP-1 se observa claramente en MP, lo que podría evidenciar movilización de IL-12 p40 por lisosomas secretorios (Fig. 15B). Análisis cualitativo de fluorescencia confirma colocalización de IL-12 p40 / LAMP-1 en macrófagos no estimulados o estimulados con INF γ y LPS (Fig. 15C y D).

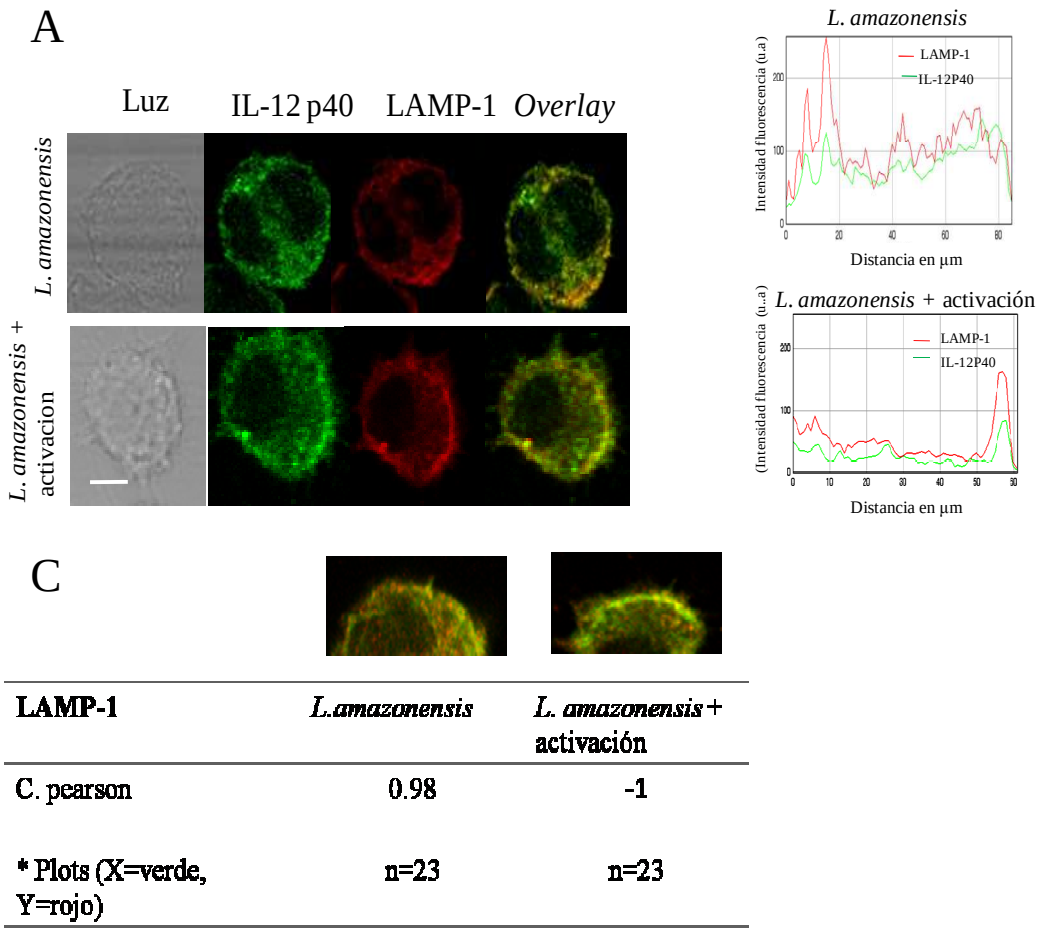


C



SNAP-23	*Activación*	*L.amazonensis*	*L. amazonensis* + activación
C. Pearson	0.892	0.807	0.931
* Plots (X= verde, Y=rojo)	n=39	n=42	n=24

Figura 14. **Distribución de IL-12 p40/SNAp-23 en macrófagos J774A.1 en infección por *L. amazonesis* 24 hpi**. Ensayos por microscopía confocal **A**. Distribución de IL-12 p40/SNAP-23 en macrófagos J774A.1 estimulados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml), ***L. amazonensis***: macrófagos infectados, ***L. amazonensis*** + activación: macrófagos infectados estimulados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml), **B**. Perfil de la distribución de la fluorescencia para IL-12 p40/SNAP-23 para cada uno de los tratamientos, **C.** Coeficiente de correlación de Pearson para cada uno de los tratamientos. Análisis de colocalización por Image J. Los datos representan 3 experimentos do (n = 200 células).La barra representa 10µm.



LAMP-1	*L.amazonensis*	*L. amazonensis* + activación
C. pearson	0.98	-1
* Plots (X=verde, Y=rojo)	n=23	n=23

Figura 15. **Distribución de IL-12 p40 / LAMP-1 en macrófagos J774A.1 en infección por *L. amazonesis* 24hpi. A**. Distribución de IL-12 p40 / LAMP-1, **B.** Perfil de distribución de fluorescencia para IL-12 p40 / LAMP-1, **C**. coeficiente de correlación de Pearson para cada tratamiento. ***L. amazonensis***: macrófagos no estimulados, ***L. amazonensis* + activación**: macrófagos J774A.1 activados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml). Análisis cualitativo de colocalización con Image J. Los datos representan 3 experimentos (n = 100 células). La barra representa 10 µm.

Muchas células presentadoras de antígeno son capaces de producir proteínas bajo secreción regulada en respuesta a estímulos externos mediada por lisosomas secretorios descritos como ruta alternativa de secreción no clásica (Olivier *et al*., 2005). Un ejemplo de ello, es IL-1β la cual es secretada por lisosomas secretorios, además de otras rutas propuestas en monocitos, macrófagos y CDs tales como: 1. producción por expulsión a partir de micro-vesículas de la MP, 2. fusión de cuerpos multivesiculares con MP y subsequente producción de IL-1β contenida en exosomas, 3. exportación de IL-1β a través de MP empleando específicamente transportadores de membrana, y 4. producción de IL-1β por lisis celular (Eder, *et al.,* 2009). Otros mecanismos de secreción son descritos para TNF-α mediada por endosomas de reciclaje (ER). Los ER son endosomas cercanos a la MP los cuales contienen TNF-α y se fusionan con el fagosoma en formación (Stow *et al.,* 2009; Montoya, 2010).

No se encontraron reportes en la literatura que permitan conocer las rutas de secreción para IL-12. Solamente existe evidencia de su tráfico vesicular RE- trans-Golgi (Vaidanathan *et al*., 2003), pero no se conoce como ésta se moviliza hacia MP. Es así como podemos decir que este seria el primer estudio que podría demostrar la secreción de esta proteína mediada por componentes de la ruta endocítica, alternativa a la secreción por ruta clásica. El hecho que los macrófagos posean diversas rutas de secreción para una misma proteína no implica una redundancia de eventos. Tal vez sean procesos sinérgicos que requieren la secreción rápida y abundante de proteínas para responder ante procesos inflamatorios y para nuestro caso, en el desarrollo de mecanismos de defensa frente a organismos intracelulares como *Leishmania*.

7.7 **Efecto de la infección por *L. amazonensis* 48 hpi en la distribución de IL-12 p40 y ruta secretora.**

IL-12p40 se distribuye en citoplasma de macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* 48hpi sugiriendo su localización posiblemente en compartimentos *medial*-Golgi, *trans*-Golgi o compartimentos endosomales (Fig. 16A). Una vez los macrófagos son estimulados con INF-γ (1 μg/ml) y LPS (10 μg/ml) por 2h (*Leishmania* + activación), no se observa producción de IL-12p40 (Fig. 16B-C). Cuantificación de fluorescencia, confirma los hallazgos cualitativos mencionados anteriormente y muestra diferencias estadísticamente significativas entre la infección por *L. amazonensis* comparado con macrófagos infectados con *L. amazonensis* + activación donde se observa disminución de la producción de IL-12 p40 a la mitad (Fig. 16D).

En contraste con algunos autores (Carrera *et al.,* 1996), en este trabajo no se evidenció supresión total de la producción de IL-12 p40/70 en infección por *Leishmania*, indicando que por lo menos en esta línea celular, la infección por *L. amazonesis* induce desactivación parcial del macrófago. De acuerdo con estos resultados, se puede sugerir que existe un impacto significativo generado por el volumen de la VP en la producción de IL-12 y su tráfico vesicular en contraste con la infección 24 hpi, y asociar los datos obtenidos por citometría de flujo, donde se encontró disminución en la secreción de p70, que se sugiere es debido a la retención intracelular de un *pool* correspondiente a la subunidad p40 y al heterodimero p70.

Adicionalmente, se detectó un incremento en el área del macrófago infectado cuando es estimulado con INF-γ y LPS (Fig. 16E). Las células infectadas tienen diámetros de 19,2 ± 0,36 μm (*n* 4 27), significativamente mayores que las células control (16,7 ± 0,28 mm, n 4 35), siendo esta diferencia mantenida a través del tiempo. El incremento en el tamaño celular puede resultar en la adición de nueva membrana a la MP o de procesos independientes de reciclaje tales como

"*ruffling*" de membranas para la formación del fagosoma o procesos de "*swelling*" que preceden a la fusión de vesículas secretoras con la MP para la exocitosis de proteínas. Antecedentes de nuestro laboratorio por electrofisiología, muestran que después de 24 hpi, una vez el parásito se ha establecido dentro de la VP en macrófagos J774A.1, se observa un incremento de la capacitancia (medida eléctrica indirecta del área de la MP) post-infección (Forero *et al*., 1999) y también post-activación (Camacho *et al*., 2008), lo que confirma el hallazgo de este estudio. Este resultado indica que el aumento del área celular se acompaña de un aumento de la membrana, que sería consistente con la mayor capacidad secretoria de un macrófago activado.

El aumento en el área de la membrana podría corresponder a contribución de membrana resultado de eventos de exocitosis para la secreción de TNF-α (Murray et al., 2005; Montoya, 2010) e IL-6 (Fig. 4) que podrían no ser recicladas de vuelta a la membrana. En *infección establecida* (24hpi-72hpi) observamos una habilidad reducida por parte del macrófago para secretar IL-12 (Rojas y Camacho, 2010), TNF-α (Montoya, 2010) y óxido nítrico (Niño, 2007). Esta alteración tendría efectos en la respuesta inmune y mejoraría la supervivencia del parásito dentro del macrófago.

Además del *aumento de capacitancia,* la *infección establecida* se encuentra acompañada por hiperpolarización de la membrana, incremento en la densidad de corrientes de entrada de potasio (Forero *et al.*, 1999) e incremento en la densidad de corrientes de salida de potasio (Camacho *et al*., 2008). La hiperpolarización de la membrana se ha asociado con baja secreción (Iwanir y Reuveny, 2008), incremento de iCa^{+2} (Mertz *et al*., 1992; Konig *et al*., 2006), producción de radicales de oxígeno (Gamaley *et al*., 1998), fusión de membranas célula-célula (Fischer-Lougheed *et al.,* 2001; Konig *et al*., 2006) y protección contra apoptosis (Dallaporta *et al.*, 1998; Dallaporta *et al.,* 1999). Se sabe que *Leishmania* retarda la respuesta de apoptosis del

macrófago (Aga *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2012; 2009; Clavijo *et al*., 2009) lo que podría indicar junto a la disminución de efectores inmunológicos desactivación del macrófago.

En contraste, el impacto de la *infección temprana* (12hpi) por *Leishmania* en las propiedades de membrana del macrófago, evidencia disminución de 29% de la capacitancia a las 3hpi, indicando que la membrana del fagolisosoma es donada por la MP. Además se observa despolarización de la membrana y disminución del coeficiente de variación de la capacitancia lo que sugiere una reducción en la tasa endocítica/exocítica del macrófago (Quintana et al, 2010). Este resultado junto con evidencia que indica menor cantidad de lisosomas en infección por *Leishmania* (Barbieri *et al.,* 1990) podría implicar alteraciones en tráfico vesicular que se iniciarían temprano luego de la infección por *Leishmania* y que se junto con una VP en expansión podrían contribuir a baja secreción de efectores inmunológicos.

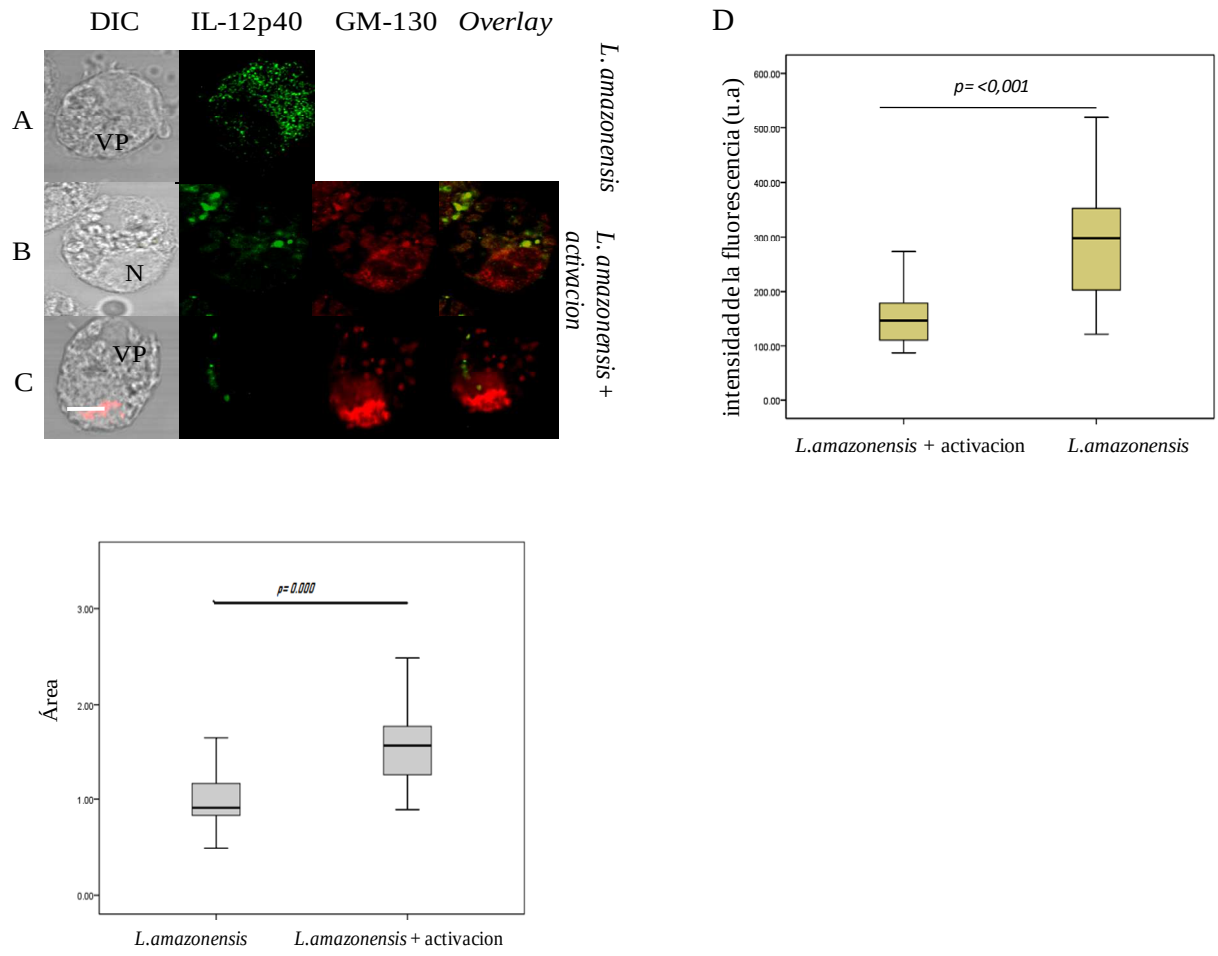
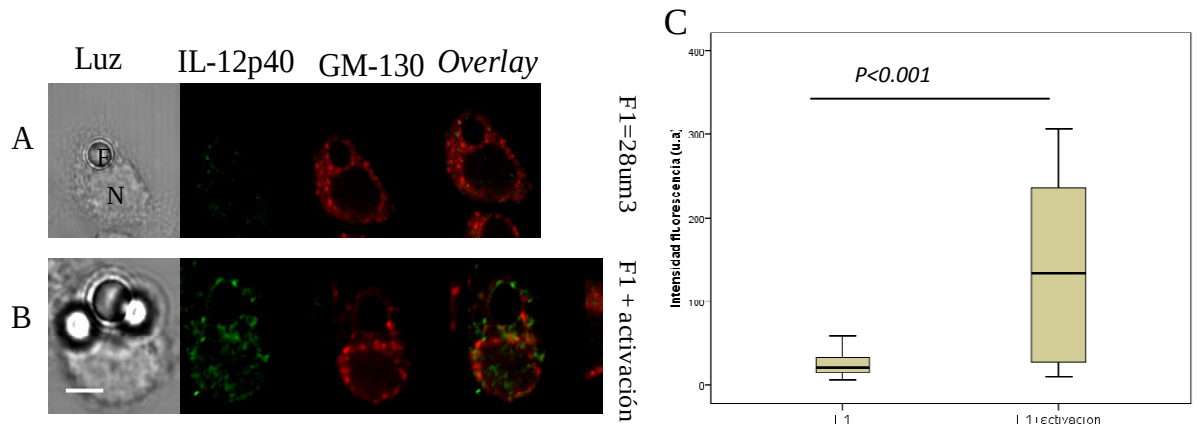


Figura 16. **Efecto de la infección por *L. amazonensis* 48 hpi en la distribución de IL-12 p40/GM-130**. Ensayos por microscopía confocal. **A**. Distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* 48 hpi (verde), **B**. Distribución de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1 activados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml) en infección por *L. amazonensis* 48 hpi. Marcaje con GM-130 (rojo). **C.** Marcaje con yoduro de propidio (rojo) (IP), **D**. Cuantificación de fluorescencia por Image J. Análisis no paramétrico: prueba de Mann-Whitney p= 0,05. ***L. amazonensis***: macrófagos no estimulados. ***L. amazonensis*** + activación: macrófagos activados con INF-γ (1µg/ml) y LPS (10µg/ml), **E**. Análisis de área por Image J. Prueba de Mann-Whitney p=0,00. Los datos representan 3 experimentos (n = 100 células). La barra representa 10µm.

7.8. **Efecto de la fagocitosis en la distribución de IL-12 p40 y ruta secretora.**

IL-12 p40 se produce en bajos niveles en fagocitosis (F_1) y se localiza a nivel perifagosomal y citoplasmático (Fig. 17A). En macrófagos J774A.1 estimulados con INF-γ (1 μg/ml) y LPS (10 μg/ml) por 2 h luego de fagocitosis (F_1 + activación), se observa aumento de 5 veces en la producción de IL-12 p40 comparado con macrófagos sin estimulo (Fig. 17B). Se observa baja colocalizacion de IL-12 p40 con *cis*-Gogi (GM-130), sugiriendo su distribución en *medial*-Golgi, *trans*-Golgi o compartimentos endosomales. Cuantificación de fluorescencia, muestra diferencias estadísticamente significativas entre grupos (Fig. 17C). Estos resultados nos permiten confirmar los datos por citometría de flujo donde no encontramos secreción de IL-12p70.

IL-12 p40 aumenta 2 veces su producción en macrófagos estimulados con INF-γ (1 μg/ml) y LPS (10 μg/ml) en fagocitosis (F_2) y se distribuye de manera perifagosomal (Fig. 18B), comparado con macrófagos no estimulados (Fig. 18A). No se observa colocalización con componentes del *cis*-Gogi (GM-130). Diferencias en la producción de IL-12 p40 en macrófagos estimulados con INF-γ y LPS, en fagocitosis de partículas de látex, permiten sugerir que el impacto del volumen del fagosoma contribuye a la inhibición de la producción de IL-12 como evento inespecífico de la infección por *Leishmania*. Es así como en fagosomas pequeños (F_1) el aumento de la producción de IL-12p40 es 4 veces mayor comparado con fagosomas grandes (F_2).



.

Figura 17. **Efecto de la fagocitosis F_1 en la distribución de IL-12 p40/GM-130**. Ensayos por microscopía confocal. **A**. **F_1**: Distribución de IL-12 p40/GM-130 en macrófagos J774A.1, **B**. **F_1+ activación**: Distribución de IL-12 p40/GM-130 en macrófagos J774A.1 activados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml), **C.** Cuantificación de fluorescencia por Image J. Prueba de Mann-Whitney P < 0,001. Los datos representan 1 experimento por triplicado (n = 60). La barra representa: 10 µm. Coeficiente correlación Pearson: -0.497 para (F_1 + activación).

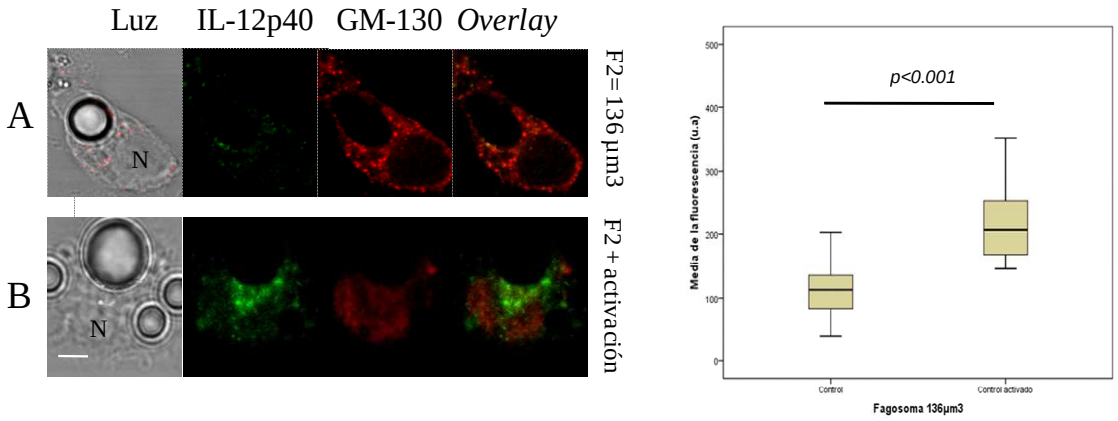


Figura 18. **Efecto de la fagocitocis F_2 en la distribución de IL-12 p40/GM-130**. Ensayos por microscopía confocal. **A**. **F_2**: Distribución de IL-12 p40/GM-130 en macrófagos J774A.1, **B**. **F_2 + activación**: Distribución de IL-12 p40/GM-130 en macrófagos J774A.1 activados con INF-γ (1 µg/ml) y LPS (10 µg/ml), **C**. Cuantificación de fluorescencia por Image J. Prueba de Mann-Whitney p<0,001. Barra representa: 10 µm. Los datos representan 3 experimentos (n = 100 células).

En resumen, la fagocitosis *per se* no induce de manera significativa la producción de IL-12 p40 y no impide la activación del macrófago luego del estímulo con INFγ y LPS donde ésta se acumula como un *pool* intracelular al igual que en infección por *Leishmania*. Por lo tanto, la producción es resultado del estímulo de activación. El tamaño del fagosoma en fagocitosis establece diferencias respecto a los niveles de producción de la subunidad p40 siendo evidente su disminución a medida que aumenta el volumen del mismo. La no distribución de IL-12p40 respecto a componentes tempranos del Golgi (*cis*-Golgi), podría indicar una localización en compartimentos posteriores (medial y *trans*-Golgi) o incluso compartimentos endolisosomales tanto en fagocitosis de partículas de látex como en infección por *Leishmania*.

7.9.**Modelos de tráfico vesicular y topología de IL-12 en infección por *L.amazonensis***

Debido a que no existen reportes en la literatura sobre las rutas de secreción que emplea el macrófago para la exocitosis de IL-12, este sería el primer estudio de caracterización de componentes de las rutas secretora *biosintética* y *endocítica* que participan en este proceso.
La regulación espacial de los componentes de la ruta secretora y endocítica es crucial para dirigir el tráfico de proteínas tales como IL-12. Distribución uniforme o no de estos componentes en el macrófago genera la formación de *pools* funcionalmente distintos donde podemos observar tres mecanismos diferentes de secreción de IL-12 siguiendo la vía 1. RE-MP, 2. vía RE-Golgi-MP en vesículas de secreción y 3. A través de lisosomas secretorios (Fig. 19).

Leishmania ocasiona cambios en la morfología del RE y localización errónea de sus componentes hacia MP para la contribución de membrana en el proceso de“ fagocitosis-mediada por RE” y distribuye IL-12p40 como un *pool* disponible en la superficie celular donde la exocitosis de esta proteína se llevaría a cabo por eventos de fusión directa entre RE con la MP en

macrófagos J774A.1 activados, como una ruta *no clásica* de secreción donde la capacidad de fusión del RE facilitaría la exocitosis temprana de IL-12 con efectos importantes dentro de la respuesta inmune en la infección por *Leishmania*.

La fusión del RE con la MP ha sido descrita no solo para fagocitosis de *Leishmania,* sino también para fagocitosis de partículas inertes en macrófagos J774 donde participan componentes como Sec22 (RE-vSNARE) y Sso1/sec9c (MP-tSNARE) (McNew JA *et al.*, 2000; Gagnon *et al.*,2002; Becker *et al.*,2005) y donde el proceso de fusión se ¨dispara¨ dependiendo del tamaño del fagosoma, siendo entonces fagosomas grandes conteniendo partículas > 3 µm donde este proceso se lleva a cabo con una importante contribución de membrana para la formación de fagosomas.

La exocitosis de IL-12p40 también podría llevarse a cabo vía RE-Golgi-MP en vesículas de secreción asociadas a vSNAP-23, donde ésta se moviliza desde el citoplasma hasta la MP. Sin embargo, desconocemos si su entrada en la ruta secretora comienza en RE o en CG. La identificación de proteínas SNARE- SNAP-23 en la secreción de IL-12p40 se constituye en un paso inicial en la caracterización de los complejos de proteínas Q-SNARES que participan en el proceso de fusión de membranas para la producción de ésta proteína en vesículas de secreción. La asociación de IL-12p40 con marcadores de la ruta endocítica, correspondientes a endosomas tardíos y lisosomas (LAMP-1) a nivel de citoplasma y membrana plasmática en macrófagos activados, sugiere rutas de secreción *no clásicas* empleadas por macrófagos J774A.1 para su exocitosis. (Rojas A y Camacho M, 2011)

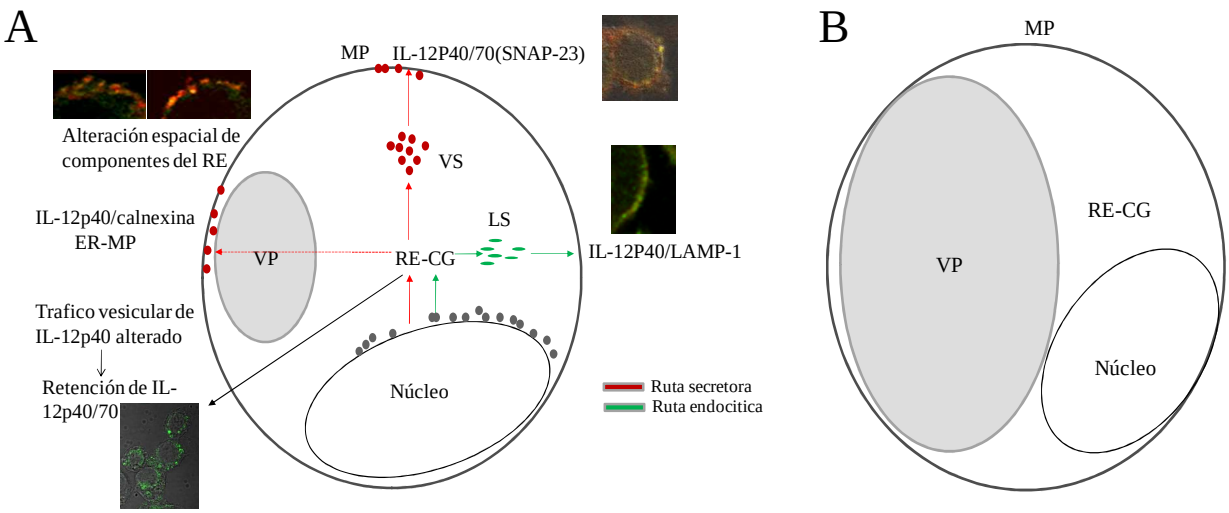


Figura 19. **Modelos de tráfico vesicular y topología de IL-12 en infección por *L. amazonensis***. **A.** Rutas de secreción propuestas para IL-12 en macrófagos J774A.1 24 hpi. Tráfico vesicular de IL-12 mediado por vesículas de secreción vía RE-Golgi y lisosomas secretorios. **B.** Inhibición de la producción de IL-12 p40 en macrófagos J774A.1 48 hpi. VS=Vesículas secretoras, LS= Lisosomas secretorios, RE= retículo endoplásmico, MP= membrana plasmática, CG= complejo de Golgi, VP=vacuola parasitófora.

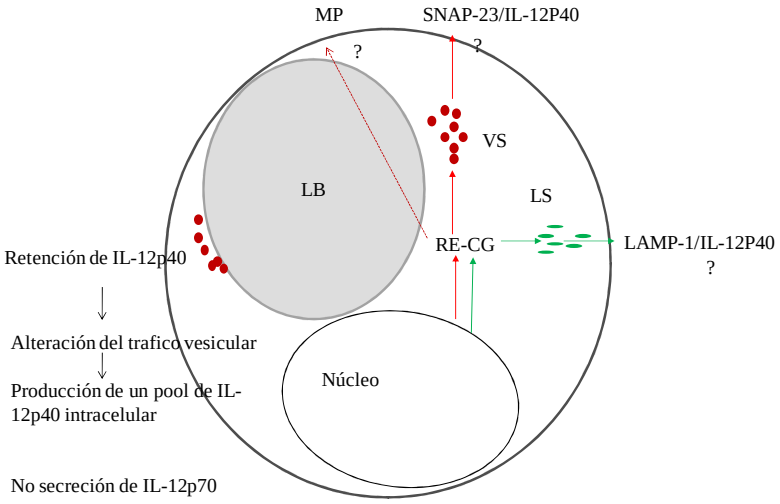


Figura 20. **Retención intracelular de IL-12p40 en fagocitosis de partículas de látex**. Patrón perifagosomal. VS=Vesículas secretoras, LS= Lisosomas secretorios, ER= retículo endoplásmico, MP= membrana plasmática, CG= complejo de Golgi, VP=vacuola parasitófora.

8. CONCLUSIONES

- La secreción de IL-12 p70 y la producción de la subunidad p40 son inducibles en macrófagos de la línea celular J774A.1 por estímulos con INF y LPS. No se evidencia producción constitutiva en macrófagos en reposo

- *L. amazonensis* 24hpi altera la distribución de IL-12 p40 y es retenida a nivel de RE-Golgi.

- El tráfico vesicular de IL-12 p40 en infección por *L. amazonensis* 24hpi podría llevarse a cabo por tres rutas de secreción: 1. Vía RE-Golgi-MP en vesículas de secreción conteniendo SNAP-23, 2. Vía lisosomas secretorios asociados a LAMP-1 por la ruta endocítica (*no clásica*) y 3. Exocitosis mediada por fusión directa del RE-MP.

- *L. amazonensis* 48hpi inhibe la producción de IL-12p40 y la secreción del heterodímero p70 induciendo desactivación del macrófago.

- IL-12p40 es producida en fagocitosis de partículas de látex en macrófagos activados como un *pool* intracelular con distribución perifagosomal sin secreción de IL-12p70

- El impacto del volumen de la vacuola parasitófora en fagosomas > 130 μm^3 asociados a infección por *Leishmania* 48 hpi o fagocitosis de partículas de látex retienen un *pool* intracelular de IL-12p40 sin secreción de IL-12p70.

- Existe una relación inversa entre el volumen de la VP y la respuesta secretora del macrófago. A mayor volumen menor secreción.

- Alteraciones del tráfico vesicular podrían ser debidas a fagosomas de gran volúmen como un factor inespecífico de la infección por *Leishmania*.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Complementar estudios de expresión de mRNA para las subunidades p35 y p40 de IL-12 por PCR en tiempo real

- Evaluar el efecto de la disminución de los niveles de expresión de SNAP-23 y LAMP-1 en los procesos de fusión para la exocitosis de IL-12p40/70 empleando siRNA.

- Caracterizar la vía de secreción biosintética con base en los complejos de proteínas SNARE que participan en el proceso asociados a SNAP-23

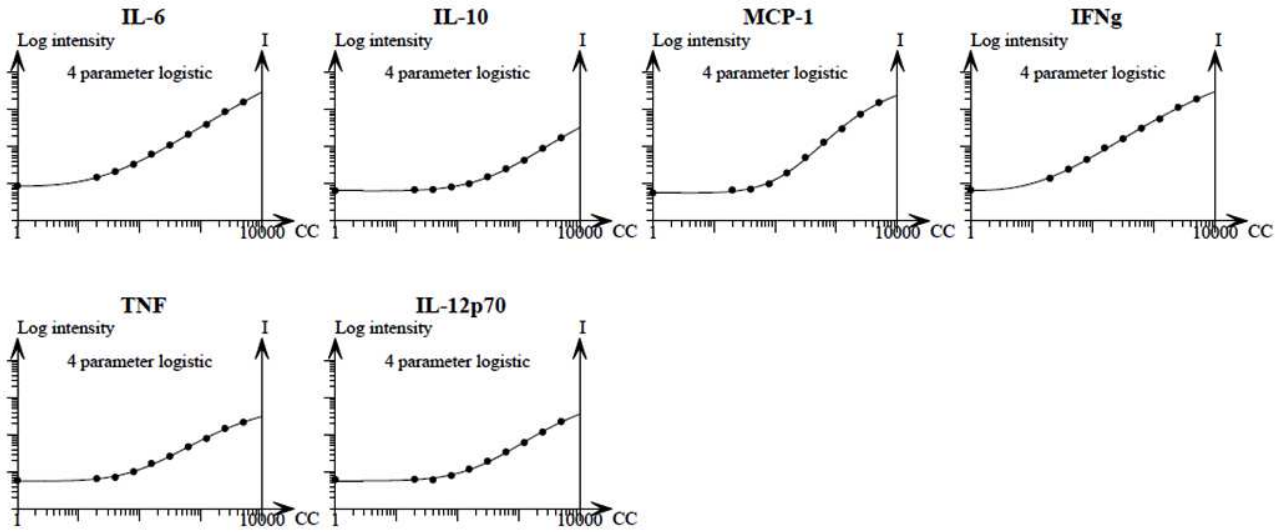
- Evaluar el proceso de exocitosis de IL-12 mediada por vesículas secretoras o lisosomas secretorios en células vivas empleando TIRF.

- Identificar Sec22 (RE-vSNARE) y Sso1/sec9c (MP-tSNARE) y su participación en la secreción de IL-12p40 por fusión de la MP con RE.

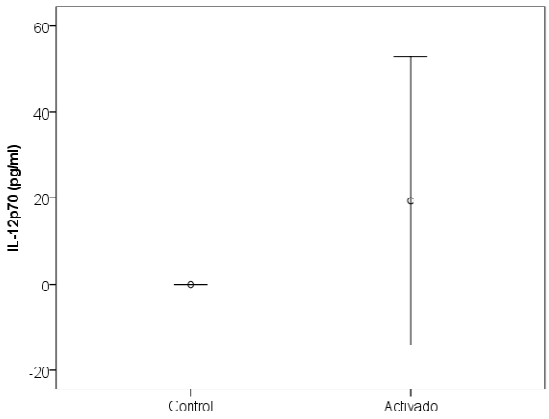
- Establecer un modelo de formación de fagosomas en expansión que semeje el proceso de fagocitosis de *Leishmania* respecto al incremento del volumen del fagosoma en el tiempo, empleando moléculas como dextrán.

- Evaluar la secreción bifásica de IL-12p70 empleando inhibidores de TACE (enzima convertidora de TNF) para alterar la secreción de TNF-α.

A. ANEXO. Plots de curvas estandar empleadas en la cuantificación de citoquinas por CBA.



B. ANEXO. Cuantificación de IL-12p70



Secreción de IL-12p70 en macrófagos de la línea celular J774A.1. Ensayos por citometría de flujo en sobrenadantes de cultivo de 24h. **Control**: macrófagos en reposo. **Control activado**: macrófagos estimulados empleando 10 ng/ml LPS + 1ng/ml INF-γ. Análisis no paramétrico: prueba de Mann-Whitney. No se observan diferencias significativas entre grupos. p=0.70. Los datos representan la media de 3 experimentos y las barras 1 desviación estándar.

C. ANEXO. Diseño de *primers* por Primer 3 para las subunidades p40 y p35 de IL-12

P40: Forward GTGGAATGGCGTCTCTGTCT, Reverse CGGGTCTGGTTTGATGATGT y

P35:Forward TCACGCTACCTCCTCTTTTTG, Reverse TCTTCAATGTGCTGGTTTGG

BIBLIOGRAFÍA

Abdi K. IL-12: the role of p40 versus p75**.**Scand J Immunol. 2002;56(1):1-11.

Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER, Mottram JC, Olivier M. Comparative study of the ability of Leishmania mexicana promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. Infect Immun. 2010;78(6):2438-45.

Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K., Solbach, W., Laskay, T., 2002. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite Leishmania major. Journal of Immunology 169 (2), 898–905

Al-Haddad A., Shonn MA., Redlich B., Blocker A., Burkhardt JK., Yu H., Hammer JA.,Weiss DG, Steffen W, Griffiths G, and Kuznetsov SA..Myosin Va Bound to Phagosomes Binds to F-Actin and Delays Microtubule-dependent Motility. Mol Biol Cell. 2001;12(9):2742–2755.

Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menendez Iglesias B, Adorini L. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. J Immunol 1997;159:1604–12.

Alleva DG, Kaser SB, Beller DI. Intrinsic defects in macrophage IL-12 production associated with immune dysfunction in the MRL/++ and New Zealand Black/White F1 lupus-prone mice and the Leishmania major-susceptible BALB/c strain. J Immunol. 1998;161(12):6878-84.

Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(26):9745-50.

Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous

vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. Trends Microbiol.1998;6(10):392-401.
Antonny B and Schekman R. ER export: public transportation by the COPII coach. Current Opinion in Cell Biology. 2001;13, Issue 4:438–443.

Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10[published erratum appears in J Immunol. 2000;164 (10): 5330]. J Immunol 1998;160:5936–44.

Bajno L, Peng XR, Schreiber AD, Moore HP, Trimble WS, Grinstein S. Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. J Cell Biol. 2000;149(3):697-706.

Balaraman S, Singh VK, Tewary P, Madhubala R. Leishmania lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. Mol Biochem Parasitol. 2005;139(1):117-27.

Barbieri CL, Brown K, Rabinovitch M. Depletion of secondary lysosomes in mouse macrophages infected with Leishmania mexicana amazonensis: a cytochemical study. Z Parasitenkd.1985;71(2):159-68.

Barlowe C .Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat.CELL. 2003;114(4):395-7.

Basic Local Alignment Search Tool. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

Becker T., Volchuk A., Rothman JE. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(11):4022-6.

Bhattacharya M, Ojha N, Solanki S, Chinmay K M, Madan R, Patel N, Krishnamurthy G, Kumar S, Sandip K B, and Mukhopadhyay A. IL-6 and IL-12 specifically regulate the

expression of Rab5 and Rab7 via distinct signaling pathways. EMBO J. 2006; 25(12): 2878–2888.

Braun MC, Kelsall BL. Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. Microbes Infect. 2001;3(2):99-107. Review

Buxbaum LU, Scott P. Interleukin 10 and Fc-Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. INFECTION AND IMMUNITY. 2005;73(4):2101-2108

Bohdanowicz M., Cosío G.,[1] Backer JM,[2] and Grinstein S. Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. J Cell Biol. 2010; 191(5): 999–1012

Bickford LC, Mossessova E, Goldberg J. Structural view of the COPII vesicle coat.Curr Opin Struct Biol. 2004;14(2):147-53.

Bost KL, Clements JD. Intracellular Salmonella dublin induces substantial secretion of the 40-kilodalton subunit of interleukin-12 (IL-12) but minimal secretion of IL-12 as a 70-kilodalton protein in murine macrophages. Infect Immun 1997;65:3186–92.

Cameron, P., A. McGachy., M. Anderson., A. Paul., Coombs G H., Mottram J. C., Alexander J., Plevin R.. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by Leishmania mexicana amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-B signaling pathway. J. Immunol. 2004;173: 3297-3304.

Cappiello G., Sutterwala FS., Trinchieri G., Mosser D M., and Ma X. Suppression of Il-12 transcription in macrophages following Fc gamma receptor ligation. J. Immunol. 2001;166:4498-4506

Carrera, L., Gazzinelli RT., Badolato R., Hieny S., Muller W., Kuhn R., Sacks DL. *Leishmania*

promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* 1996;*183*:*515*.

Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, D'Andrea A, Ma X, Trinchieri G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. Eur J Immunol. 1995;25(1):1-5.

Celli J, Gorvel JP. Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. Curr Opin Microbiol. 2004;7(1):93-7. Review.

Chevet E., Smirle J., Pamela H., Cameron DY., Thomas C., John JM. Calnexin phosphorylation: Linking cytoplasmic signalling to endoplasmic reticulum lumenal functions Seminars in Cell & Developmental Biology 21 (2010) 486–490

Chacón N. 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 Maestría en Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia

Clavijo LM. 2009. EVALUACION DEL IMPACTO DE LA INFECCIÓN DE Leishmania (Leishmania) amazonensis y Leishmania (Viannia) braziliensis SOBRE LA APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR DE MACRÓFAGOS J774.A1. Tesis de Maestría en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia

Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science. 1996 ;273(5274):501-3.

Dallaporta, B., Hirsch, T., Susin, S.A., Zamzami, N., Larochette, N., Brenner, C., Marzo, I., Kroemer, G., 1998. Potassium leakage during the apoptotic degradation phase. Journal of Immunology 160 (11), 5605–5615.

Dallaporta, B., Marchetti, P., de Pablo, M.A., Maisse, C., Duc, H.T., Métivier, D., Zamzami, N., Geuskens, M., Kroemer, G., 1999. Plasma membrane potential in thymocyte apoptosis. Journal of Immunology 162 (11), 6534–6542.

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med 1992;176:1387–98

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med. 1993;178(3):1041-8.

De Matteis MA, Di Campli A, D'Angelo G. Lipid-transfer proteins in membrane trafficking at the Golgi complex. Biochimica et Biophysica Acta 1771 (2007) 761–768

Desjardins M. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. Trends Cell Biol. 1995;5(5):183-6.

Desjardins M and Descoteaux A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 1997;185(12): 2061–2068

Di A., Nelson. DJ., Bindokas V., Brown M. Dynamin Regulates Focal Exocytosis in Phagocytosing Macrophages. Mol. Biol. Cell. 2003;14(5) 2016-2028.

De Veer, M.J., Curtis, J.M., Baldwin, T.M., DiDonato, J.A., Sexton, A., McConville, M.J., Handman, E., Schofield, L. MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. Eur. J. Immunol. 2003; 33: 2822–2831

Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. Nature. 1992;360(6402):350-2.

Donaldson JG, Klausner RD. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. Curr Opin Cell Biol. 1994;6(4):527-32.

Duclos S., Diez R, Garin J., Papadopoulou B., Descoteaux A., Stenmark H., and Desjardins M. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. Journal of Cell Science.2000;113: 3531-3541

Eder C. Mechanisms of interleukin-1β release. Review Article. *Immunobiology*. 2009; 214, Issue 7: 543-553

Eilam Y., El-On J., and Spira DT. *Leishmania major*. Excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes . *Experimental Parasitology*. 1985; 59 (2): 161-168.

Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. Trends Cell Biol. 2003;13(3):137-45. Review.

Faries, M. B., Bedrosian, I., Xu, S., Koski, G., Roros, J. G., Moise, M. A., Nguyen, H. Q., Engels, F. H., Cohen, P. A., Czerniecki, B. J. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development *Blood* 2001; 98:2489-2497

Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. J Immunol. 1999;163(12):6403-12.

Fischer-Lougheed, J., Liu, J.H., Espinos, E., Mordasini, D., Bader, C.R., Belin, D.,Bernheim, L.,

2001. Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. The Journal of Cell Biology.153 (4), 677–686

Flesch IE, Hess JH, Huang S et al. Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. J Exp Med 1995;181:1615–21.

FORERO ME, MARÍN M, LLANO I, MORENO H, CAMACHO M. *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. J.Membr Biol. 1999;170:173-180

Fortier A, de Chastellier C, Balor S, Gros P. Birc1e/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by Legionella pneumophila. Cell Microbiol. 2007;9(4):910-23.

Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. Trends Immunol. 2001;22:556–60.

Gagnon E, Duclos S, Rondeau C, Chevet E, Cameron PH, Steele-Mortimer O, Paiement J, Bergeron JJ, Desjardins M. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. Cell. 2002;110(1):119-31.

Gamaley, I.A., Kirpichnikova, K.M., Klyubin, I.V., 1998. Superoxide release is involved in membrane potential changes in mouse peritoneal macrophages. Free Radical Biology & Medicine 24 (1), 168–174.

Germain RN. Binding domain regulation of MHC class II molecule assembly, trafficking, fate, and function. Semin Immunol. 1995;7(6):361-72.

Gueirard P., Laplante A., Rondeau Ch., Milon G and Desjardins M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. Cellular Microbiology. 2008; 10(1): 100–111

Grosshans BL, Darinel Ortiz, and Novick P. Rabs and their effectors: Achieving specificityin membrane traffic. PNAS. 2006; 103(32):11821–11827. REVIEW

Graham TR, Scott PA, Emr SD. Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. EMBO J. 1993;12(3):869-77.

Harding CV. Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules. Trends Cell Biol. 1995;5(3):105-9.

Hayes MP, Wang J, Norcross MA. Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes. selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. Blood. 1995;86:646–50.

Holevinsky KO, Nelson D J. Membrane capacitance changes associated with particle uptake during phagocytosis in macrophages. Biophys J. 1998; 75(5): 2577–2586

Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat Immunol. 2002;3(11):1033-40. Review

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria- induced macrophages [see comments]. Science 1993;260:547–9.

Huang, F.P., Niedbala, W., Wei, X.Q., Xu, D., Feng, G.J., Robinson, J.H., Lam, C., Liew, F.Y. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. Eur. J. Immunol. 1998;28: 4062–4070.

Huynh KK, Eskelinen EL, Scott CC, Malevanets A, Saftig P, Grinstein S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. EMBO J. 2007;26(2):313-24.

Idone V, Tam C, Andrews NW. Two-way traffic on the road to plasma membrane repair. Trends

Cell Biol. 2008;18(11):552-9

Iwanir, S., Reuveny, E., 2008. Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology 456 (6), 1097–1108.

Jackson C. L. Mechanisms of transport through the Golgi complex. *Journal of Cell Science*. 2009;122: 443-452

Janeway CA Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1989;54:1–13.

Jayakumar A., Widenmaier R., Ma X., and McDowell MA. TRANSCRIPTIONAL INHIBITION OF INTERLEUKIN-12 PROMOTER ACTIVITY IN *LEISHMANIA* SPP.-INFECTED MACROPHAGES. *J Parasitol*. 2008; 94(1): 84–93.

Kane, M.M., Mosser, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. J. Immunol. 2001;166: 1141–1147.

Kassidy K Huynh,[1,2] Eeva-Liisa Eskelinen,[3] Cameron C Scott,[1,2] Anatoly Malevanets,[4] Paul Saftig,[5] and Sergio Grinstein.LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. EMBO J. 2007; 26(2): 313–324.

Kavoosi G., Ardestani S K., Kariminia A., Alimohammadian· MH. *Leishmania major* lipophosphoglycan: Discrepancy in toll-like receptor signaling. Experimental Parasitology 2010;124, Issue 2:214–218

Kawasaki M., Nakayama K and Wakatsuki S. Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. Current Opinion in Structural Biology. 2005; 15:681–689

Kima, P.E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. Int. J. Parasitol. 2007;37: 1087–1096.
Kobayashi M, Fitz L, Ryan M *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. J Exp Med 1989;170:827–45.

Konig, S., Béguet, A., Bader, C.R., Bernheim, L., 2006. The calcineurin pathway links hyperpolarization (Kir2.1)-induced Ca2+ signals to human myoblast differentiation and fusion. Development 133 (16), 3107–3114.

KOUWENHOVEN M., ZENCI VO., TELESHOVA N., HUSSEIN Y., YU-MIN HUANG, EUSEBIO A., AND LINK H.. Enzyme-Linked Immunospot Assays Provide a Sensitive Tool for Detection of Cytokine Secretion by Monocytes. 2001,1248–1257.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite Leishmania major. Infect Immun. 2004;72(4):1920-8.

Kuehn MJ, Herrmann JM, Schekman R. Nature. COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. 1998 Jan 8;391(6663):187-90.

Kundra R, Kornfeld S. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis**.** J Biol Chem. 1999;274(43):31039-46.

Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. Infect Immun. 1997;65(5):1936-8.

Lapara NJ., Kelly BL.,Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with Leishmania. Journal of Inflammation 2010, 7:8

Lecuit M, Ohayon H, Braun L, Mengaud J, Cossart P. Internalin of Listeria monocytogenes with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. Infect Immun. 1997 Dec;65(12):5309-19.

Liew Y. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans, European Journal of Immunology .1999; 29, Issue 1: 235–244.

Life cycle of Leishmania spp. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm.2009. Tomado en Mayo de 2012.

Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S. Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages. J Biol Chem. 1990;265(34):21099-107.

Manderson A P., Kay JG., Luke A.H, Darren L.B, and Stow J. Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFα. JCB. 2007;178 (1).

Ma X, Chow JM, Gri G et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. J Exp Med 1996;183:147–57.

Marth, T., and B. L. Kelsall. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. J. Exp. Med. 1997;185:1987-1995.

Matte, C., Maion, G., Mourad, W., Olivier, M. Leishmania donovani-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. Parasite Immunol. 2001; 23, 177–184

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol 1994;12:991–1045.

McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and

protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? Immunol Rev. 2004;201:206-24. Review.

McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T. H. & Rothman, J. E. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. (2000) *Nature* **407,** 153–159.

Ménard R, Dehio C, Sansonetti PJ. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of Shigella.Trends Microbiol. 1996;4(6):220-6.

Mertz, L.M., Baum, B.J., Ambudkar, I.S., 1992. Membrane potential modulates divalent cation entry in rat parotid acini. Journal of Membrane Biology 12 (2),183–193.

Montoya G, 2010. Factor de nerosis tumoral alfa en el modelo Leishmania-macrofago. Tesis de Doctorado en Ciencias Quimica. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia

Mosser DM. The many faces of macrophage activation. J Leukoc Biol. 2003;73:209–212

Mosser DM, Karp CL. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. Curr Opin Immunol. 1999;11(4):406-11.Review.

Mossessova E., Bickford LC., Goldberg J. SNARE selectivity of the COPII coat. Cell. 2003;114(4):483-95.

Muraille E, Pajak B, Urbain J, Moser M, Leo O. Role and regulation of IL-12 in the in vivo response to staphylococcal enterotoxin B. Int Immunol 1999;11:1403–10

Murshid A. and Presley J F. ER-to-Golgi transport and cytoskeletal interactions in animal cells. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. (2004) ;61: 133–145

Murray RZ, Kay JG, Sangermani DG, Stow JL.. A Role for the Phagosome in Cytokine

Secretion.SCIENCE. 2005; 310: 1492-1495

Ndjamen B, Kang BH, Hatsuzawa K, Kima PE. Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. Cell Microbiol. 2010 Oct;12(10):1480-94.

Nie Z, Hirsch D.S, Randazzo P.A. Arf and its many interactors. Curr. Opin. Cell. Biol. 15 (2003) 396–404.

Niño A y Camacho M. (2005). Impacto del volumen del fagosoma en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos murinos activados. Acta Biológica Colombiana. Vol 9:94-95.

Niño A. 2007. Efecto de la fagocitosis, la infección por Leishmania amazonensis y leishmania braziliensis sobre la traducción y localización intracelular de la enzima oxido nitrico sintetasa inducible en macrófagos murinos. Tesis de Maestria, Maestria en Bioquimica, Departamento de Quimica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

Olivier, M. 1996. Modulation of host cell intracellular Ca2+. Parasitol. Today 12:145-150.

Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. Clin. Microbiol. 2005; 18: 293–305.

Orcl L, Palmer DJ, Amherdt M, Rothman JE. Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatomer and ARF proteins from the cytosol. Nature. 1993;364(6439):732-4.

OUYANG, L., QIN, L., XU, Z., HE, J. and LIU, Q. (2008), A RAPID PLASMID PREPARATION METHOD BY THE DIRECT BOILING OF *ESCHERICHIA COLI* CELLS. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 16: 22–29.

Palade GE. Intracellular aspects of the process of protein secretion. Nobel Lecture, December 12, 1974

Palmer DJ, Helms JB, Beckers CJ, Orci L, Rothman JE. Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. J Biol Chem. 1993;268(16):12083-9.

Patterson GH., Hirschberg K., Polishchuk RS., Gerlich D., Phair RD., Lippincott-Schwartz J. Transport through the Golgi Apparatus by Rapid Partitioning within a Two-Phase Membrane System. Cell. 2008;133: 1055–1067.

Pavelka M, Neumüller J, Ellinger A. Retrograde traYc in the biosynthetic-secretory route . Histochem Cell Biol. 2008; 129:277–288.

Pelham HR . The dynamic organisation of the secretory pathway.Cell Struct Funct.1996;21(5):413-9.

Pfeffer, S. & Aivazian, D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004;5: 886–896.

Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ, Thomas E, Brewer J, Ferguson MA, Alexander J, Liew FY. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by Leishmania phosphoglycans. Eur J Immunol. 1999;29(1):235-44.

Piedrafita D., Proudfoot L., Nikolaev AV., Xu D., Sands W., Feng Gui-Jie, Thomas E., Brewer J., Ferguson M A. J., Alexander J, Foo Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. J Leukoc Biol. 2004;76(3):514-9.

Poltorak A, He X, Smirnova I et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4.Gene. Science.1998: 282 (5396): 2085-2088

Quintana E, Torres Y, Alvarez C, Rojas A, Forero ME, Camacho M. 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. 2010;124(3):258-64.
Ralph P, Prichard J, Cohn M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. J Immunol. 1975 Feb;114(2 pt 2):898-905.

Rammbourg A, Clermont Y, Jackson CL, Képès F. Effects of brefeldin A on the three-dimensional structure of the Golgi apparatus in a sensitive strain of Saccharomyces cerevisiae. Anat Rec. 1995;241(1):1-9.

Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. Trends Microbiol. 2001;9(2):86-92. Review.

Reiner NE, Malemud CJ. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with Leishmania donovani: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. J Immunol. 1985;134(1):556-63.

Rickman C.,Medine CN., Dun RA., Moulton DJ., Mandula O., Halemani ND.,¶ Rizzoli SO, Chamberlain LH., and Duncan RR. t-SNARE Protein Conformations Patterned by the Lipid Microenvironment. J Biol Chem. 2010 April 30; 285(18): 13535–13541

Robinson CG, Roy CR. Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing Legionella pneumophila. Cell Microbiol. 2006;8(5):793-805.

Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Ouaissi, A., Silvestre, R. and Estaquier, J. (2012), Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. Cellular Microbiology, 14: 325–333.

Rojas AR, Montoya GE, Chacón N, Camacho M. Large Phagocytic loads explain altered cytokine secretion and cytoskeleton distribution in macrophages infected with *Leishmania;* 49th American Society for Cell biolgy. Annual Meeting. San Diego CA. December 5-9.2009.687385

Rojas AR, Camacho M. Phagosome volumes similar to infection by *L. amazonensis*, altered the production of il-12 via er-golgi in phagocytosis of latex particles, and also could be secreted by endocytic pathway. ASCB. Annual Meeting dec 3-7, 2011.Denver, CO, USA.

Rojas AR, Camacho M.Volumen del fagosoma y secrecion de IL-12 en infeccion por *L. amazonensis* y fagocitosis. II SIMPOSIO DE INMUNOMODULACIÓN Y III ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGÍA. Medellín,26- 28 de abril de 2012.

Rothman JE, Wieland FT. Protein sorting by transport vesicles. Science. 1996;272(5259):227-34. Review.

Russell DG. Mycobaterium and Leishmania: stowaways in the endosomal network. Trends Cell Biol. 1995;5:125-128.

Ruhland A and Kima PE. Activation of PI3K/Akt signaling has a dominant negative effect on IL-12 production by macrophages infected with *Leishmania amazonensis* promastigotes**.** *Exp Parasitol*. 2009;122(1): 28–36.

Sannerud R, Saraste J, Goud B. Retrograde traffic in the biosynthetic-secretory route: pathways and machinery. Curr Opin Cell Biol. 2003;(4):438-45. Review.

Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJ, Cole N, Moreira JE, Terasaki M, Siggia E, Lippincott-Schwartz J. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. J Cell Biol. 1997;139(5):1137-55.

Shweash M., McGachy HA., Schroeder J., Neamatallah T., Bryant CE., Millington O., Mottram JC., James Alexander, Robin Plevin. Leishmania mexicana promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. Molecular Immunology. 2011;48: 1800– 1808

Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL-12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. Genomics 1992; 14:59–62

Snijders A, Hilkens CM, Van Der Pouw Kraan TC, Engel M, Aarden LA, Kapsenberg ML. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide- stimulated human monocytes is determined by the expression of the p35 subunit. J Immunol. 1996;156:1207–12.

Sousa CR, Hieny S, Scharton-Kersten T et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas [see comments]. J Exp Med 1997; 186:1819–29.

Stephens C. Protein secretion: getting folded proteins across membranes. Curr Biol. 1998;8(16):R578-81.

Stanley AC and Lacy P. Pathways for Cytokine Secretion. Physiology-2010; 25(4): 218-229
Stow JL, Low PC, Offenhäuser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. Immunobiology. 2009;214(7):601-12.

Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, and Mark CU. Uptake of *Leishmania major* Amastigotes Results in Activation and Interleukin 12 Release from Murine Skin–derived Dendritic Cells: Implications for the Initiation of Anti-*Leishmania* Immunity. The Journal of Experimental Medicine. 1998;188(8):1547–1552

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. *Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution. Nature 395: 347–353, 1998*

Suzumura A, Sawada M, Takayanagi T. Production of interleukin-12 and expression of its receptors by murine microglia. Brain Res 1998;787:139–42.

Takakuwa T, Knopf HP, Sing A, Carsetti R, Galanos C, Freudenberg MA. Induction of CD14 expression in Lpsn, Lpsd and tumor necrosis factor receptor-deficient mice. Eur J Immunol. 1996 Nov;26(11):2686-92

Thomas, B.N., Buxbaum, L.U. Fc gamma RIII mediates immunoglobulin G induced interleukin-10 and is required for chronic Leishmania mexicana lesions. Infect. Immun. 2008; 76, 623–631.
Trincheri G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of IL-12. Int.Rev. Immunol. 1998;16:365-96

Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. J Leukoc Biol. 2004;76(3):514-9.

Vaidyanathan H, Zhou Y, Petro TM, Schwartzbach SD. Intracellular localization of the p35 subunit of murine IL-12. Cytokine. 2003;21(3):120-8.

Vargas-Inchaustegui DA, Hogg AE, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Endsley JJ, Soong L. CXCL10 production by human monocytes in response to Leishmania braziliensis infection. Infect Immun. 2010;78(1):301-8.

Vicker, M. G. On the origin of the phagocytic membrane. (1977) *Exp. Cell Res.* **109,** 127–138

Yates RM and Russell DG. Phagosome Maturation Proceeds Independently of Stimulation of Toll-like Receptors 2 and 4 Immunity. 2005; 23: 409–417

Waggoner SN, Cruise MW, Kassel R, Hahn YS. gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. J Immunol. 2005;175(7):4706-14.

Wang Z and Thurmond DC. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis – roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE Proteins Journal of Cell Science.2009;122, 893-903

Whitaker SM, Colmenares M, Pestana KG, McMahon-Pratt D. Leishmania pifanoi proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. Infect Immun. 2008;76(5):2149-56. Epub 2008 Feb 25.

Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, Brutkiewicz RR, Blum JS. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. Immunity. 2005;22(5):571-81.

Yang Z., Zhang X., Darrah PA and Mosser DM. The Regulation of Th1 Responses by the p38 MAPK. J Immunol. 2010; 185(10): 6205–6213.