UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio de la expresión de proteínas en el modelo *Leishmania*-Macrófago con énfasis en canales iónicos

Protein expression study in the model *Leishmania*-Macrophage with emphasis on ion channels

July Constanza Buitrago Gutiérrez

Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá D.C., Colombia

2014

Estudio de la expresión de proteínas en el modelo *Leishmania*-Macrófago con énfasis en canales iónicos

July Constanza Buitrago Gutiérrez

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Directora:

M.D. Ph.D., María Marcela Camacho Navarro

Línea de Investigación:

Propiedades de membrana en el modelo *Leishmania*-macrófago y otros modelos

Grupo de Investigación: Biofísica y

Biología de Membranas

Universidad Nacional de Colombia Facultad de

Ciencias, Departamento de Química Bogotá D.C.,

Colombia

2014

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño está tesis se las dedico a ustedes:

Abuelita Mariela y Abuelito Julio
Mamá y papá
Sergio

Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir siempre

Mahatma Gandhi

Agradecimientos

A Dios, por darme la vida y por guiarme por el buen camino. Gracias por permitirme haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Química por la formación académica, profesional y personal que me han brindado durante todo mi camino universitario. Por darme la oportunidad de tener grandes maestros, Carlos A. Trujillo, Elizabeth López, María Helena Ramírez.

A Colciencias por la financiación del proyecto "Estudios de la membrana de la vacuola parasitófora de *Leishmania*". Número 519-2010 Banco proyectos en Salud - Salud pública. Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la Salud.

Al Centro Internacional de Física por proporcionarme el acceso a sus laboratorios, reactivos y equipos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Walter Sthümer, quien junto con el apoyo de Colciencias me permitieron hacer una pasantía de 3 meses en el grupo de investigación Molecular Biology of Neuronal Signals del Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin (Göttingen – Alemania). A sus integrantes Víctor Díaz, Mona Elkhatieb, Farrah Zahed, Vincenzo Rómanie, Diana Liz.

Al Grupo de Investigación en Hormonas, a la Profesora Myriam Sánchez por darme acceso a su laboratorio, equipos necesarios para el desarrollo de una parte de este proyecto, además por su asesoría. A Susana Novoa, por la asesoría, apoyo y paciencia. A Andrea Rodríguez por su asesoría y apoyo. Gracias por su tiempo.

A la Dra. Magda Alvarado, investigador principal del Grupo Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica, LIBBIQ, por su apoyo y asesoría.

Al Grupo Biofísica y Biología de Membranas, a la Dra. Martha Lucía Posada, investigador principal del grupo y compañeros de grupo, Alejandra Viviescas, Marvin Carreño, Michel García, Oscar Parada y Abelino Vargas por sus aportes a este proyecto y compañía en el grupo.

A la profesora María Marcela Camacho, gracias por confiar en mis capacidades y cualidades y darme la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación Biofísica y Biología de Membranas. Gracias por su orientación, aportes y correcciones. Gracias por hacer parte de mi formación como científica. Gracias por el gran apoyo económico.

A mis grandes compañeros de grupo, mis amigos, grandes seres humanos y profesionales, Yenny Lozano, Lina García, Carolina Ochoa, Iván Navarrete, Cristina Zapata, Aura Echeverri, porque siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y una sonrisa. Los llevaré siempre en el corazón.

A mis colegas y amigos la Dra. Myriam Bendeck, Edna Ariza y Alejandro Gutiérrez, por su apoyo y confianza.

A mi familia, mis abuelos, mi mamá, mi papá y a mis hermanos, a ustedes quienes me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi constancia para conseguir mis objetivos. Gracias por creer en mí. Gracias por motivarme y darme la mano. Gracias por hacer que este sueño de ser científica esté y siga siendo realidad.

A un gran ser humano y profesional, quien Dios y la vida puso en mi camino. Gracias por tu apoyo, comprensión, paciencia, por creer en mí. Gracias por tu gran y sincero amor. Gracias por estar siempre a mi lado, Sergio.

Resumen

La caracterización de las propiedades eléctricas de las membranas implicadas en la interacción *Leishmania*-Macrófago, ha permitido describir la presencia y el cambio de ciertas corrientes iónicas producto de la función de ciertas proteínas. Los cambios de las corrientes iónicas de potasio en la membrana del macrófago como consecuencia de la infección, sugieren alteración en el patrón de expresión de proteínas entre macrófagos no infectados e infectados. Estos resultados nos llevaron a iniciar el estudio de la expresión de las proteínas responsables de las corrientes iónicas registradas en el modelo *Leishmania*-macrófago y los cambios en el proteoma después de la infección. En este estudio, se describen las mejores condiciones experimentales para la obtención de extractos de proteína total y extractos enriquecidos con proteínas de membrana, y se logra la detección de las proteínas Kir2.1, Kv1.5 y CLC3 en macrófagos, Kir2.1 en fagosomas y CLC en parásitos de *Leishmania* por *western blot*. La disminución en la expresión de Kir2.1 a medida que la infección progresa apoya la interpretación que la hiperpolarización reportada puede ser secundaria al aumento de las corrientes de salida de potasio voltaje dependientes. El análisis comparativo mediante electroforesis bidimensional (2DE) de los proteomas de macrófagos no infectados e infectados, muestra diferencias estadísticamente significativas en 58% de los *spots* de proteína detectados. A futuro su identificación por espectrometría de masas permitirá conocer las proteínas involucradas.

Palabras clave: *Leishmania*, Macrófago, fagosoma LBP, proteínas, canales iónicos, potasio, cloruro.

Abstract

The electrophysiological characterization of the membranes involved in the *Leishmania*-macrophage interaction, allowed describes the presence and exchange of certain ion currents set the function of certain proteins. The changes in the potassium ionic currents due to infection implicate alterations in the expression pattern of protein between non infected and infected cells. Thus, the expression of the proteins responsible for these ion currents in the *Leishmania*-macrophage model and changes in the proteome after infection was studied. The best conditions to obtain total and membrane extracts are shown, as well as detection by western blot of the Kir2.1, Kv1.5 and CLC3 in macrophage, Kir2.1 in phagosomes and CLC in *Leishmania* parasites. The expression of Kir2.1 decreases as infection progresses supporting the idea that the hiperpolarization previously reported may be attributed to increased outward voltage dependent potassium currents. Furthermore, the comparative analysis by two-dimensional electrophoresis (2DE) of the proteomes of non-infected and infected macrophages, shown statistically significant differences in 58% of the protein spots detected, whose identification by mass spectrometry will reveal the proteins involved.

Keywords: *Leishmania*, macrophage, phagosome, protein, ionic channel, potassium, chloride.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Lista de abreviaturas ..... **XVI**

Introducción **1**

1. Capítulo 1: La enfermedad y el agente etiológico **5**
1.1 Leishmaniasis 5
1.2 *Leishmania spp.* 8

2. Capítulo 2: Extractos de proteínas para el modelo *Leishmania*-Macrófago **11**
2.1 Importancia del estudio de las proteínas 11
2.2 Preparación de la muestra 12
2.3 Extractos de proteína total 13
2.3.1 Separación de proteínas por electroforesis 1D SDS-PAGE 13
2.3.2 Extracto de proteína total de macrófagos J774A.1 17
2.3.3 Extracto de proteína total de promastigotes de *Leishmania amazonensis* 19
2.3.4 Aislamiento y obtención de extractos de proteína total de fagosomas conteniendo perlas de látex (LBPs) 24
2.4 Extractos enriquecidos con proteínas de membrana 26
2.4.1 Extracto enriquecido con proteínas de membrana de macrófagos J774A.1 26
2.4.2 Extracto enriquecido con proteínas de membrana de promastigotes de *L. amazonensis* 32

3. Capítulo 3: Expresión de canales iónicos en el modelo *Leishmania*-Macrófago **37**
3.1 Expresión de canales iónicos en Macrófagos J774A.1 38
3.1.1 Detección de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1 43
3.1.2 Evaluación del nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1 con diferentes tiempos de infección con el parásito *L. amazonensis* 48
3.2 Detección de la proteína Kir2.1 en fagosomas LBPs 53
3.3 Expresión de una proteína CLC en promastigotes de dos especies de *Leishmania* 59

4. Capítulo 4: Expresión de proteínas en macrófagos infectados con *L. amazonensis* **65**
4.1 Perfil de proteínas en una dimensión (1D SDS-PAGE) 65

4.1.1 Expresión diferencial de proteínas en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* 65
4.2 Perfil de proteínas en dos dimensiones (2DE-IPG-SDS-PAGE) 70
4.2.1 Expresión diferencial de proteínas en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis* 70

5. Conclusiones y Perspectivas 87
5.1 Conclusiones 87
5.2 Perspectivas 88

A. Anexo: Cultivos 89

B. Anexo: Protocolos para obtención de extractos de proteína 91

C. Anexo: Protocolos para separación y análisis de proteínas 97

D. Anexo: Tabla de resultados del análisis de clases 103

Bibliografía 109

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis 6
Figura 1-2: Ciclo de vida de *Leishmania spp.* 9
Figura 2-1: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína soluble para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis* 17
Figura 2-2: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI obtenidos por tres procedimientos de lisis 18
Figura 2-3: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína total para promastigotes de *L. amazonensis* obtenidos por 7 procedimientos de lisis 21
Figura 2-4: Microscopía de luz de la fagocitosis de perlas de látex por macrófagos J774A.1 .24
Figura 2-5: Gel SDS-PAGE de los extractos enriquecidos con proteínas de membrana de macrófagos J774A.1 NI obtenidos por dos procedimientos 30
Figura 2-6: Gel SDS-PAGE de diferentes extractos del macrófago J774A.1 31
Figura 2-7: Gel SDS-PAGE de los extractos enriquecidos con proteínas de membrana para promastigotes de *L. amazonensis* obtenidos por tres procedimientos modificados 34
Figura 2-8: Gel SDS-PAGE de diferentes extractos de promastigotes de *L. amazonensis* 36
Figura 3-1: Inmunodetección de las proteínas Kir2.1, Kv 1.3, Kv1.5 y CLC3 en extractos de proteína total (EPT) y extractos enriquecidos con proteínas de membrana (EPM) de macrófagos J774A.1 40
Figura 3-2: Inmunodetección de la proteína-canal Kir2.1 en extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y macrófagos J774A.1 48 hpi. Membrana de nitrocelulosa 44
Figura 3-3: Gel SDS-PAGE de los extractos totales después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa empleando dos buffers de transferencia 45
Figura 3-4: Inmunodetección de la proteína-canal Kir2.1 en extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y HEK utilizando quimioluminiscencia y diferentes tiempos de incubación con los Ab1 47
Figura 3-5: Inmunodetección de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1 sometidos a dos condiciones experimentales 50
Figura 3-6: Inmunodetección de proteínas marcadores de membranas intracelulares en extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y fagosomas LBPs 55
Figura 3-7: Inmunodetección de la proteína CLC3 en extractos de proteína total de dos especies de *Leishmania* 61
Figura 3-8: Inmunodetección de la proteína CLC en extractos enriquecidos con proteínas de membrana de dos especies de *Leishmania* 63

Figura 4-1: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína soluble para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis*, en diferentes porcentajes de gel separador .67
Figura 4-2: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 a diferentes tiempos de infección con *L. amazonensis*.....69
Figura 4-3: Geles 2D de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48hpi con *L. amazonensis*.....72
Figura 4-4: Comparación manual entre los mapas proteómicos del macrófago J774A.1 y el macrófago J774A.1 48hpi con *L. amazonensis* para la selección del rango de pH 74
Figura 4-5: Geles 2D de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48hpi con *L. amazonensis* en la región ampliada de pH 5-8 y sus réplicas 75
Figura 4-6: Jerarquías para el análisis de imágenes en Melanie 7.0.....76
Figura 4-7: Efecto de la variación en el valor de los parámetros usados por el programa para la detección de *spots*.....77
Figura 4-8: Efecto de la curación en el emparejamiento automático de las réplicas para la infección 79
Figura 4-9: Gráfica del análisis factorial realizado al emparejamiento de la segunda jerarquía 81
Figura 4-10: Representación en diagrama del emparejamiento entre de las dos clases 81
Figura 4-11: Ejemplos de *spots* con expresión diferencial entre el grupo macrófago y el grupo infección 82
Figura 4-12: Ejemplos de *spots* expresados selectivamente en alguno de los dos grupos 84

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1: Condiciones experimentales para la detección de las proteínas Kir2.1 y α-tubulina por ensayos de *western blot* utilizando un método de revelado cromogénico. 43
Tabla 3-2: Condiciones experimentales para la detección de las proteínas Kir2.1 y α-tubulina por ensayos de *western blot* utilizando quimioluminiscencia. 46
Tabla 3-3: Mejores condiciones experimentales para la detección de las proteínas Kir2.1 y la proteína α-tubulina por ensayos de *western blot* utilizando quimiluminiscencia. 48
Tabla 3-4: Condiciones experimentales para la detección de las proteínas CLC3 y α-tubulina por ensayos de *western blot*. 61
Tabla 4-1: Cantidad de spots detectados en las imágenes de las réplicas de las muestras. Parámetros de detección *Smooth* 5, *Saliency* 80 y área mínima 5. 78
Tabla 4-2: Resultado final del emparejamiento entre imágenes de réplicas 79

Lista de abreviaturas

.

Abreviatura	Término
2DE	Electroforesis bidimensional
Ab1	Anticuerpo primario
Ab2	Anticuerpo secundario
APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de Suero Bovino
CLC3	Canal de Cloruro
DDF	Fraccionamiento diferencial de detergente
hpi	Horas post-infección
IEF	Isoelectroenfoque
Kir2.1	Canal de potasio rectificadores de entrada
Kv1.3-1.5	Canal de potasio dependiente de voltaje
L.	*Leishmania*
LBP	Fagosomas conteniendo perlas de látex
MVP	Membrana de la vacuola parasitófora
MW	Marcador de peso molecular
NI	No infectados
IP	Inhibidores de Proteasas
pI	Punto Isoeléctrico
RE	Retículo Endoplasmático
RT	Temperatura ambiente
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina
Vm	Potencia de membrana
VP	Vacuola Parasitófora

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad causada por un parásito protozoario perteneciente al género *Leishmania.* De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la leishmaniasis amenaza a cerca de 350 millones de personas en 88 países de todo el mundo (http://www.who.int/leishmaniasis/en/). *Leishmania spp.,* es un parásito intracelular obligado que infecta células de la línea fagocítica mononuclear de diversas especies de mamíferos (Alexander et al., 1999). Su ciclo de vida incluye un insecto vector, mosquitos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* y diferentes especies de mamíferos. En el flebótomo *Leishmania* se multiplica como promastigotes flagelados, una vez inoculado, el parásito es fagocitado por macrófagos y confinado en un compartimento conocido como vacuola parasitófora (VP) donde *Leishmania* se replica como amastigotes.

Nuestro grupo considera que la supervivencia de *Leishmania* en el macrófago es el resultado, entre otros factores, de la función integrada de las tres membranas que se encuentran en la forma intracelular del parásito, el amastigote: la membrana plasmática de la célula hospedera, la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) y la membrana plasmática de *Leishmania*. Los estudios han sido dirigidos hacia la caracterización funcional de las membranas dentro del modelo mediante medidas electrofisiológicas de las propiedades eléctricas pasivas y activas.

Con respecto a las propiedades eléctricas activas de la membrana plasmática del macrófago, se han descrito corrientes de Cl^-, de salida de K^+ (K^+ I_{out}) y de entrada de K^+ (I_{KIR}). Corrientes iónicas similares en macrófagos de ratón y otras líneas celulares han sido asociadas con transcripción de mRNA, expresión de proteínas y se atribuyen a la función de las proteínas-canal Kv1.3 y Kir2.1 (Vicente et al., 2003).

Debido a que se conoce que la permeabilidad de la membrana del macrófago afecta la supervivencia y multiplicación del parásito, ha sido de interés conocer cómo *Leishmania spp.*,

altera las funciones eléctricas de la membrana plasmática del macrófago. Nuestro grupo ha estudiado el impacto de la infección por *Leishmania* sobre las propiedades eléctricas de macrófagos infectados usando la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera. Se ha mostrado que la infección con *L. amazonensis* de la línea celular de macrófagos J774A.1 afecta su capacitancia, potencial de reposo y resistencia de membrana. También se registraron cambios en corrientes macroscópicas, resultado de la actividad de canales iónicos, cuando se altera la actividad de I_{Kir} y K^+ I_{out}. Los cambios encontrados dependen del tiempo post-infección (Forero et al., 1999; Camacho et al., 2008; Quintana et al., 2010). Alterar corrientes de K^+ puede comprometer la habilidad del macrófago para fagocitar, ser activado y presentar antígeno, es decir, que las corrientes podrían ser críticas en el control de infecciones por parte del macrófago (Marcela Camacho 2012).

Durante su ciclo de vida *Leishmania* se encuentra con diferentes ambientes cuya concentración iónica, osmolaridad, pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes varían. La adaptación a algunos de estos cambios requiere la expresión selectiva de proteínas especializadas en transporte: canales iónicos y transportadores. En promastigotes *L. major* se ha sugerido que una bomba de H^+ genera un gradiente iónico que favorece el transporte activo secundario de nutrientes, la cual requiere de corrientes de Cl^- para su función. (Vieira et al., 1994). La identidad de las moléculas que inducen estas corrientes no está determinada, pero corrientes aniónicas fueron registradas en bicapas en la membrana plasmática de *L. mexicana* (DiFranco et al., 1995) y luego de la micro-inyección de mRNA poliA de *L. amazonensis* (Arroyo, 2005; Lagos et al., 2007) y *L. braziliensis* (Garzón et al., 2009). Con la información disponible del genoma de *L. braziliensi*s el grupo ha mostrado transcripción de cuatro genes putativos CLC. Recientemente, se han clonado 3 de estos de *L. braziliensis* (Lozano et al., 2009), que son homólogos de los CLC intracelulares de mamíferos que se comportan como co-transportadores.

Como se mencionó, en el macrófago el crecimiento de *Leishmania* ocurre al interior de la vacuola parasitófora (VP). Estudios sobre *L. mexicana* y *L. amazonensis* han mostrado que estos organelos exhiben ciertas características de los compartimientos endocíticos tardíos de la célula hospedera. Tienen pH ácido (4,7 – 5,2) y contienen las hidrolasas lisosomales cathepsina D, B, H y L, los marcadores de membrana lisosomal LAMP1 y LAMP2, protón ATPasas y moléculas MHC clase II (Alexander et al., 1999; Rusell et al., 1992).

La permeabilidad de la membrana de la VP está determinada por la capacidad de este compartimento de interactuar con la vía endocítica y la expresión de transportadores en su membrana. Datos obtenidos durante estudios realizados en el grupo de investigación sugieren que las vacuolas parasitóforas de *L. amazonensis* pueden transportar iones desde el citosol de la célula hospedera. El secuestro de la sonda amarillo lucifer en la luz de la VP de *L. mexicana* se ha atribuido a la presencia de transportadores de aniones de la familia de glicoproteínas transportadoras ABC en la membrana del organelo y se confirmó en las VPs de *L. amazonensis* (Cortázar et al., 2006). En registros electrofisiológicos utilizando la técnica de *patch clamp* en configuración de VP-adherida, se detectaron dos corrientes iónicas: la primera corriente registrada es aniónica y su caracterización es típica de los canales de cloruro de la familia CLC. Esta corriente descrita podría contribuir en el mantenimiento de la electroneutralidad al interior de la VP ya que permite el paso de Cl^- que contrarrestaría el gradiente de potencial que induce la acumulación de protones. La segunda corriente es catiónica, los estudios preliminares sugieren que el canal tiene una alta selectividad por iones K^+ y que podría provenir de la membrana del macrófago. El comportamiento del canal se asemeja al comportamiento de los canales rectificadores de voltaje dependientes (KIR) que se encuentran en la membrana del macrófago (Pérez, 2008).

Los datos electrofisiológicos muestran cambios que pueden ser consecuencia de alteraciones en la expresión de canales iónicos. Estos resultados nos llevaron a estudiar la expresión de las proteínas del modelo *Leishmania*-Macrófago, el cual se inicia con el estudio de la expresión de los canales iónicos responsables de las corrientes iónicas registradas en el modelo que no han sido identificados, y posteriormente el estudio del proteoma después de la infección puesto que el impacto de la infección sobre las propiedades eléctricas de macrófagos infectados implica cambios en el patrón de expresión de proteínas entre macrófagos no infectados e infectados. En este sentido el objetivo general de este trabajo es:

- Estudiar la expresión de proteínas en el modelo *Leishmania*-Macrófago con énfasis en canales iónicos, para determinar su relación con los fenómenos eléctricos medidos en este modelo por electrofisiología.

La aproximación metodología utilizada en este trabajo comprendió el uso de las siguientes técnicas clásicas de análisis de proteínas: electroforesis en una dimensión SDS-PAGE,

electroforesis en dos dimensiones (2D; IEF-SDS-PAGE) y ensayos de inmunodetección por *western blot*. Los resultados y análisis se presentan en cuatro capítulos. En el **capítulo 1**, se hace una descripción de la enfermedad causada por *Leishmania* y su impacto en la sociedad, además de una descripción biológica del parásito *Leishmania*. En el **capítulo 2**, se describen las mejores condiciones experimentales para la obtención de extractos de proteína total y extractos enriquecidos con proteínas de membrana para macrófagos J774A.1 y el parásito *Leishmania*, además del aislamiento y obtención de un extracto de proteína total de fagosomas LBPs. En el **capítulo 3**, se describe la expresión de las proteínas responsables de las corrientes iónicas registradas en el modelo *Leishmania*-Macrófago: Kir2.1, Kv1.3, Kv 1.5 y CLC3 en macrófagos J774A.1, Kir2.1 en fagosomas LBPs como modelo alternativo a la vacuola parasitófora y CLC en dos especies de *Leishmania*. Finalmente, en el **capítulo 4**, se describe el patrón de expresión de proteínas de macrófagos J774A.1 después de la infección con *L. amazonensis*. Estos resultados permiten relacionar resultados obtenidos mediante la caracterización funcional por electrofisiología.

1. Capítulo 1: La enfermedad y el agente etiológico

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es causada por un parásito protozoario perteneciente al género *Leishmania*, el cual es transmitido por la picadura de un pequeño insecto vector, el flebotomiano, que en el nuevo continente pertenece al género *Lutzomia*. Existen 500 especies conocidas del flebótomo, pero sólo se ha encontrado que alrededor de 30 transmiten la leishmaniasis. La transmisión es más frecuentemente zoonótica: los parásitos (*Leishmania*) se transmiten desde un amplio depósito de animales salvajes (roedores pequeños, perros) por la picadura del flebótomo hembra. También puede ser antroponótica, el parásito se transmite por el flebótomo desde un hospedero humano infectado (http://www.who.int/tdr/publications/documents/leishmaniasis-life-cycle.swf).

De acuerdo con la WHO, la leishmaniasis amenaza a cerca de 350 millones de hombres, mujeres y niños en 88 países de todo el mundo. Se calcula una prevalencia mundial de 12 millones de personas infectadas, con una incidencia de 1-2 millones de casos nuevos por año (http://www.who.int/leishma-niasis/en/). Hasta hace poco, el impacto en la salud pública de la leishmaniasis fue subestimado. Durante los últimos 10 años, las regiones endémicas se han extendido y se ha producido un fuerte incremento en el número de casos de la enfermedad. Además no se registró un número importante de casos (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html).

En Colombia, esta enfermedad se presenta de forma endémica, en focos naturales localizados en su mayoría en zonas rurales que incluyen bosque seco y bosque húmedo tropical, con excepción de San Andrés Islas, Atlántico y Bogotá D.C., por lo que se estima que 10 millones de personas se encuentran en riesgo (INS, 2010).

En los últimos años se ha presentado un aumento en la incidencia de la leishmaniasis en Colombia. En la década de los años 90 se notificaron en promedio 6.500 casos por año y en los años 2005 y 2006 aumentaron a 20.000 (INS, 2010), incremento atribuido a diversos factores como ampliación en la urbanización no planeada, deforestación, desarrollo de asentamientos humanos no planificados, migración de población de áreas rurales a urbanas, desplazamiento forzado, limitaciones en el suministro de tratamientos asociado a la restricción en el uso de medicamentos específicos, diagnósticos inadecuados o tardíos y más recientemente la asociación de la leishmaniasis con la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Desjeux, 1999).

La enfermedad tiene un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales incluyen lesiones cutáneas, mucocutáneas o viscerales (Figura 1-1). La leishmaniasis cutánea es la forma más común, sin embargo, la leishmaniasis visceral es la forma más severa, en la cual órganos vitales del cuerpo son afectados.

Figura 1-1: Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. De izquierda a derecha, lesión cutánea, lesión mucocutánea y lesión visceral.

La leishmaniasis cutánea es producida por especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*; se asocia con mayor frecuencia a *L. (L) major, L. (L) trópica*, (en regiones de África, Medio Oriente, India y Sudán), *L. (L) chagasi, L. (L) amazonensis* y *L. (L) mexicana* (en América central y del sur). Usualmente produce úlceras en partes expuestas del cuerpo, como la cara brazos y piernas. Cuando las úlceras se curan, dejan cicatrices permanentes, que son a menudo causa de serios prejuicios sociales. De acuerdo al estado inmunológico del individuo

puede curarse de manera espontánea o presentar una forma diseminada denominada leishmaniasis cutánea difusa que afecta la mayor parte del cuerpo (Herwaldt, 1999).

En la leishmaniasis mucocutánea, producida por *L. (V.) braziliensis, L. (V.) guyanensis y L (V.) panamensis* (en América Central y del Sur) las lesiones pueden llevar a la destrucción parcial o total de las membranas de las mucosas de la nariz, la boca y la garganta y tejidos circundantes. Estas lesiones suelen ser desfigurantes y no se curan espontáneamente. Esta forma de leishmaniasis puede llevar a la víctima a ser rechazada por la comunidad (Herwaldt, 1999).

La leishmaniasis visceral, también conocida como "kala-azar", es producida por especies del complejo *Leishmania donovani*, que incluye las especies *L. donovani* (en Europa, norte de África y Asia), *L. infantum* y *L. chagasi* (en América central y del sur) se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso sustancial, hinchazón del bazo y el hígado y anemia. Si la enfermedad no es tratada, la tase de mortalidad en los países puede ser hasta de 100% en 2 años (Herwaldt, 1999).

En Colombia se presentan las tres formas clínicas de la enfermedad, siendo la más frecuente la leishmaniasis cutánea (98% de los casos) predominantemente en los departamentos de Antioquia, Caquetá, Guaviare, Meta, Putumayo, Nariño y Santander. La leishmaniasis mucocutánea (1% de los casos) en Antioquia, Meta, Guaviare, Caquetá, Nariño, Putumayo y la leishmaniasis visceral (menor al 1% de los casos reportados) endémica en el Valle de Río Magdalena principalmente en los departamentos de Bolívar, Córdoba, Sucre, Cundinamarca, Huila, Tolima y Santander (INS, 2011).

Teniendo en cuenta que no existe todavía ninguna vacuna eficaz para la prevención de cualquier forma de leishmaniasis, la poca o ninguna motivación que tiene la industria farmacéutica para invertir en la investigación y desarrollo de medicamentos para la leishmaniasis (lo que ha llevado a incluirla en el grupo de enfermedades huérfanas), y la aparición de cepas resistentes a la quimioterapia clásica, se exige una mejor comprensión de la fisiología del parásito y de las interacciones con su célula hospedera para el diseño de estrategias más efectivas, accesibles, seguras, eficientes, de corta duración y a un costo

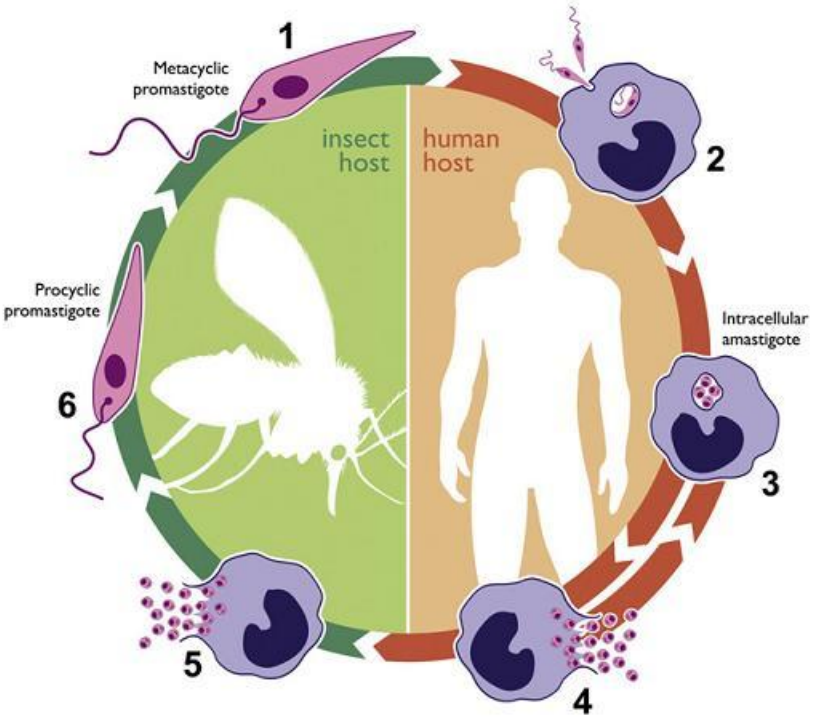
razonable para mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen esta enfermedad (http://pecet-colombia.org/worldcommunitygrid/drugsearch).

1.2 *Leishmania spp*.

Leishmania, es un parásito intracelular obligado que infecta células de la línea fagocítica mononuclear de diversas especies mamíferas (Alexander et al., 1999). Pertenece a la familia Trypanosomatidae, orden Trypanosomatida y clase Kinetoplastida. Posee tres subgéneros *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Croan et al., 1997), cada uno con diferentes complejos y especies separados por características bioquímicas y moleculares. Existen alrededor de 21 a 30 especies diferentes, las cuales son morfológicamente indistinguibles (http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/bio logy.html).

Su ciclo de vida (Figura 1-2) incluye un insecto vector, los mosquitos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* y diferentes especies de mamíferos. El ciclo de vida inicia cuando el insecto ingiere sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes, los cuales son liberados en el intestino del insecto vector; en este ambiente el amastigote se diferencia a promastigote. En el flebótomo *Leishmania* presenta una forma flagelar denominada promastigote que se multiplica en el intestino del insecto vector, posteriormente el parásito sufre metaciclogénesis, un proceso de diferenciación por el cual se generan promastigotes infectivos. Los parásitos migran a la probóscide del vector y son inoculados al hospedero mamífero mediante la picadura del insecto. En el interior del nuevo hospedero, los promastigotes son fagocitados por células mononucleares e incorporados en un compartimento ácido y rico en hidrolasas denominado vacuola parasitófora (VP) (Antoine et al., 1990; Russell et al., 1992), en su interior el parásito se diferencia a una forma inmóvil y redondeada, denominada amastigote (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Gossage et al., 2003). Durante su ciclo de vida *Leishmania* encuentra ambientes caracterizados por cambios en pH, composición iónica, entre otros, entornos que hacen necesario que el parásito exprese mecanismos reguladores para sobrevivir (Besteiro et al., 2007).

Figura 1-2: Ciclo de vida de *Leishmania spp.* Los promastigotes metacíclicos (1) son transmitidos por la picadura del flebótomo. Estos son fagocitados por macrófagos (2). Dentro de la VP del macrófago, los promastigotes se diferencian en amastigotes (3), los cuales se multiplican y salen de los macrófagos para infectar otras células (4). Durante otra picadura, el flebótomo ingiere macrófagos infectados (5); en el intestino del insecto los amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos (6) que se desarrollan en el intestino grueso o medio y migran a la probóscide como promastigotes metacíclicos, para continuar el ciclo. (Cuervo et al., 2010).



2. Capítulo 2: Extractos de proteínas para el modelo *Leishmania*-Macrófago

2.1 Importancia del estudio de las proteínas

La genómica es importante y ha sido útil en muchos aspectos, pero los datos genómicos se limitan a proporcionar información solo de los ácidos nucleicos. Sin embargo, las proteínas son las moléculas que llevan a cabo la función codificada en los ácidos nucleicos, y por lo tanto responsables de controlar la función y el metabolismo celular; mientras que los mRNAs son los intermediarios entre el gen y su respectiva proteína.

La idea de que los niveles del mRNA son indicadores de la respectiva expresión/abundancia de las proteínas, no siempre es correcta y la abundancia del mRNA no informa sobre las modificaciones post-traduccionales que pueden sufrir las proteínas y que pueden cambiar su función. Esto es especialmente cierto para los tripanosomátidos ya que estos organismos regulan la expresión y abundancia de sus proteínas post-transcripcionalmente (Paape & Aebischer, 2011).

Por lo tanto el estudio sistemático de las proteínas producidas por un organismo, permite su identificación y caracterización, dando una descripción detallada de su estructura, función y aportando en la comprensión del control de sistemas biológicos en la salud y las enfermedades. Así, los avances en los métodos y las tecnologías han catalizado la expansión del alcance de los estudios biológicos, desde el análisis bioquímico de una sola proteína hasta el análisis del proteoma global. Más aún es una fuente rica en información biológica porque las proteínas están involucradas en casi todas las actividades biológicas. En comparación con el estudio de los ácidos nucleicos, la complejidad experimental del estudio de las proteínas es mayor porque muchas son procesadas y modificadas en vías complejas y pueden ser el producto de un procesamiento (*splicing*) diferencial del mRNA; adicionalmente, la abundancia de las proteínas abarca un amplio rango (Patterson & Aebersold, 2003).

2.2 Preparación de la muestra[1]

La preparación de la muestra es vital en el análisis de las proteínas ya sea por técnicas clásicas o por técnicas más complejas, como las que incluye la proteómica. Los resultados de los experimentos dependen de las condiciones del material de partida. Por lo tanto, una preparación cuidadosa de la muestra es esencial para obtener resultados significativos y confiables, especialmente en un análisis de proteínas comparativo, donde se buscan diferencias entre una muestra control y una muestra experimental que pueden ser pequeñas. Durante la preparación de la muestra para estudios de proteínas es necesario optimizar el procedimiento para cada muestra particular. Además, todos los procedimientos aplicados deben ser tan simples como sea posible para evitar pérdida, degradación y modificaciones de la muestra.

La ruptura o lisis celular es uno de los pasos en la preparación de cualquier material biológico para el análisis de sus proteínas. Su aplicación en el procedimiento de preparación de la muestra, debe cambiar las propiedades físicas de la muestra sin ningún cambio en la química de los componentes. Los métodos de ruptura celular para el estudio de proteínas pueden ser: mecánicos o químicos.

Una vez obtenida la muestra, las proteínas presentes es esta deben estar disponibles para estudio, por lo que la solubilización es indispensable. Este procedimiento afecta la calidad de los resultados finales y determina el éxito del experimento completo. Romper las interacciones involucradas en la agregación de proteínas, debidas a puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, fuerzas van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas, permite la ruptura de las proteínas en polipéptidos individuales que facilitan su solubilización. La integración de las proteínas en las membranas y la formación de complejos con otras proteínas o ácidos nucléicos dificultan el proceso de manera significativa. Con el objetivo de evitar modificación en las proteínas, agregación o precipitación, el proceso de solubilización de la muestra implica el uso de compuestos caotrópicos (úrea o tioúrea), detergentes (CHAPS, Tritón X-100), agentes reductores (DTT/DTE) e inhibidores de proteasas en el buffer de lisis. Los compuestos caotrópicos rompen los puentes de hidrógeno y las

---

[1] Bodzon-Kulakowska et al., 2007
[2] Inhibidores de canales/transportadores de cloruro

interacciones hidrofílicas generando el des-plegamiento de la proteína y como consecuencia dejando sus grupos ionizables expuestos a la solución. Los detergentes sustituyen las interacciones hidrofóbicas permitiendo la extracción y solubilización de las proteínas. Los agentes reductores rompen los puentes disulfuro entre los residuos de cisteína ayudando en el des-plegamiento de la proteína. Finalmente, los inhibidores desactivan las proteasas endógenas que son liberadas durante la ruptura celular, cuya actividad enzimática no controlada generaría la degradación de las proteínas en un extracto.

Componentes como buffers, sales y detergentes que se incluyen en las soluciones de lisis frecuentemente interfieren con técnicas posteriores de separación de proteínas, inhiben el proceso de digestión o complican significativamente el análisis de datos, por lo tanto deben ser eliminados. Los métodos más utilizados para eliminar compuestos interferentes incluyen diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, precipitación de proteínas con ácido tricloacético (TCA) o con solventes orgánicos.

Por lo anterior y en función del objetivo general de este trabajo de investigación, este estudio inició con la búsqueda de metodologías que permitieran la obtención de extractos de proteína total y extractos enriquecidos con proteínas de membrana del modelo *Leishmania*-Macrófago. En el desarrollo del capítulo se mostrarán las diferentes estrategias experimentales ensayadas para la mejor obtención de los extractos mencionados.

2.3 Extractos de proteína total

2.3.1 Separación de proteínas por electroforesis 1D SDS-PAGE

Las proteínas pueden ser separadas y analizadas por medio de diferentes técnicas. La técnica más simple y ampliamente utilizada para separar proteínas es la electroforesis. Esta consiste en el desplazamiento de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. La aplicación más típica concierne la separación de macromoléculas que se encuentren mezcladas en una muestra; esto se basa en que si distintos compuestos depositados en un punto de un medio migran a velocidades diferentes, entonces al cabo de un cierto tiempo habrán recorrido distancias diferentes y por lo tanto se habrán separado unos de otros. Los determinantes fundamentales de la velocidad de migración en un campo eléctrico dado son: la carga de la molécula y su tamaño.

La técnica más ampliamente utilizada para separar proteínas es la electroforesis en gel de policrilamida con SDS (SDS-PAGE), que las separa por su masa. Para lograrlo tiene en cuenta dos pasos, el primer paso es cerciorarse de que las diferentes moléculas no difieran en cuanto a carga eléctrica, sino que posean una carga neta de la misma polaridad, que sea proporcional a su masa. En las proteínas, la composición de aminoácidos varía mucho, y éstos a su vez pueden diferir drásticamente tanto en la carga neta (que puede ser positiva, negativa o neutra) como en el peso molecular. Para enfrentar este problema, se aplica el detergente aniónico SDS, que se combina con las proteínas en una relación prácticamente constante: ~1.4 gramos de SDS por cada gramo de proteína. La carga introducida por el SDS es cuantitativamente mucho mayor que toda carga endógena que poseyera inicialmente la proteína, y proporcional a la masa del polipéptido; por consiguiente se obtiene una población de proteínas modificadas que son todas negativamente cargadas, y con una relación carga-masa aproximadamente constante. Esta primera medida uniformaliza la carga eléctrica de las proteínas, pero no ayuda a separarlas, ya que la constancia del cociente carga-masa hace que la movilidad de diferentes moléculas tienda a ser la misma: las más grandes son las que experimentan la mayor fuerza eléctrica, pero también sufren mayor fricción con el medio, y viceversa. Para superar este inconveniente el segundo paso que tiene en cuenta la técnica, es introducir un medio que proporcione un impedimento diferencial a moléculas de diferente tamaño: un gel constituido por acrilamida, con los intersticios ocupados por un líquido conductivo. Así las moléculas se verán selectivamente retardadas en su migración dependiendo de su tamaño, y, debido a sus diferentes velocidades, al cabo de un determinado periodo se encontrarán segregadas en posiciones distintas. La comparación con la migración de moléculas de referencia cuya masa sea conocida permite asignar un peso molecular a las moléculas que se han separado en la muestra (Nasi Enrico, 2010).

La muestra puede aplicarse directamente en la parte superior del gel en el cual ocurre la separación de las proteínas (gel separador). Sin embargo, en estos casos, la nitidez de las bandas producidas en el gel está limitada por el tamaño (volumen) de la muestra aplicada al gel. Básicamente, las bandas separadas serán tan amplias (o más amplias, debido a la difusión) como la banda de muestra aplicada al gel. Para ordenar la muestra se polimeriza un gel de apilamiento (gel concentrador) en la parte superior del gel separador. El propósito de este gel de apilamiento es concentrar la muestra en una banda fina antes de entrar en el gel separador, dando así bandas más nítidas de proteínas en este gel. Esta modificación permite

cargar volúmenes grandes de muestra al gel sin pérdida de resolución. El gel concentrador tiene un tamaño de poro muy grande (4% de acrilamida) que permite que las proteínas se muevan libremente y concentren, o apilen bajo el efecto del campo eléctrico (Walker, 1996). Por su parte, el tamaño del poro del gel separador es determinado por la concentración de monómeros (acrilamida), la cual se selecciona dependiendo del tamaño de las proteínas a ser analizado. Concentraciones bajas de acrilamida se utilizan para separar proteínas de alto peso molecular, mientras que concentraciones de acrilamida altas se utilizan para separar proteínas de bajo peso molecular (QIAGEN, Bench Guide).

Extractos de proteína soluble de macrófagos J774A.1 no infectados (NI) y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis* (ver Anexo B – Protocolo 1) fueron utilizados para ensayar diferentes condiciones experimentales en la separación de las proteínas por la técnica de electroforesis 1D SDS-PAGE. Esta técnica de separación clásica se utilizó para la visualización de las proteínas obtenidas después de seguir un protocolo de extracción, con el objetivo de determinar la calidad de los extractos. Un protocolo base se tomó como referencia para la elaboración de los geles, gel concentrador y gel separador (Acrilamida/Bis-acrilamida, buffer concentrador 4X, buffer separador 4X, TEMED y APS 10%) y preparación de los reactivos, buffer de carga 1X, buffer de corrida, solución de tinción (Azul de Coomassie) y solución decolorante.

Una vez obtenidos los extractos, estos fueron cuantificados por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). En este ensayo inicialmente los enlaces peptídicos de la proteína reducen los iones Cu^{2+} del sulfato cúprico a Cu^{+}. La cantidad de iones Cu^{2+} reducidos es proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución. Posteriormente, dos moléculas del ácido bicinconínico acomplejan cada ion Cu^{+}, formando un compuesto color púrpura que absorbe luz a una longitud de onda de 562nm. La cantidad de proteína en una muestra se determinada espectrofotométricamente por comparación con una solución de proteína de concentración conocida (Walker, 1996).

Utilizando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida se construyó una curva de calibración cuyo coeficiente de correlación al cuadraro (R^2: 0,998 - datos no mostrados) muestra que el método de cuantificación con BCA sigue la Ley de Lambert-Beer. Esta ley expresa la relación entre la absorbancia de luz monocromática (de

longitud de onda fija) y la concentración de un cromóforo en solución: la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, depende de la distancia que recorre la luz por la solución y de una constante denominada coeficiente de extinción ($A=\varepsilon bC$). De esta forma es posible calcular la concentración de un extracto proteico interpolando un valor de absorbancia en la curva de calibración.

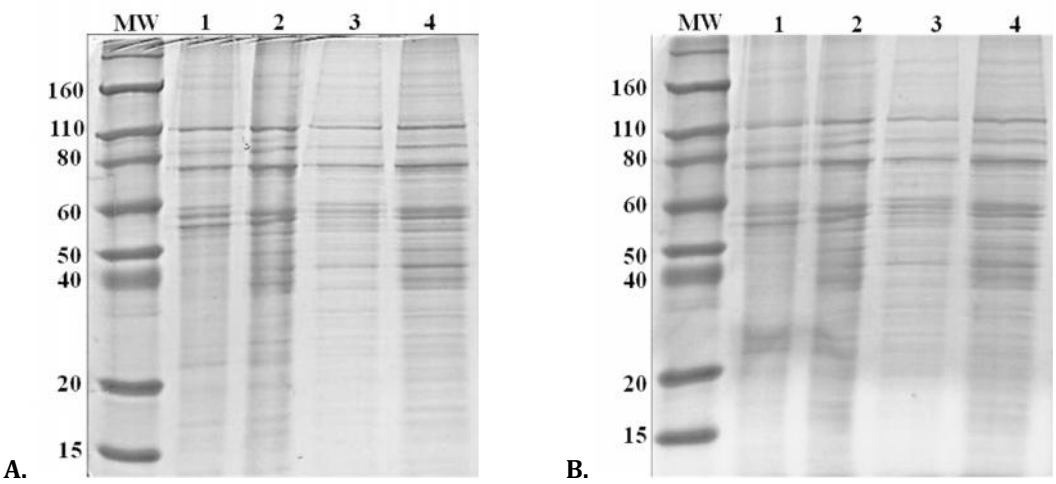
Una vez cuantificados, los extractos se sometieron a electroforesis 1D SDS-PAGE utilizando un gel concentrador de 3,9% y un gel separador de 10%, y ensayando dos condiciones: 1) Preparación de los dos geles (gel concentrador y separador) a partir del buffer correspondiente (buffer concentrador 4X, buffer separador 4X) con y sin SDS, y 2) tratamiento del extracto bajo condiciones desnaturalizantes o desnaturalizantes-reductoras. El tratamiento bajo condiciones desnaturalizantes se realizó mezclando el extracto de proteínas con el buffer de carga y posterior calentamiento a 92°C por 5 min, mientras que en el tratamiento bajo condiciones desnaturalizantes-reductoras se realizó el procedimiento anterior adicionando al buffer de carga β-mercaptoetanol (agente reductor).

De los perfiles electroforéticos mostrados en la Figura 2-1, se observa que en la región comprendida entre 15KDa y 40KDa hay una diferencia en la resolución de las bandas de proteínas, siendo para el gel que no contiene SDS mejor que para el gel que contiene SDS. Este resultado se debe a que el SDS tiene una concentración límite con el fin de evitar la formación de micelas, las cuales son interferencias en la separación y en la tinción con el colorante azul de Coomassie. Por tal razón, el resultado sugiere que la preparación de los geles se realice con los correspondientes buffers sin adición de SDS, sin embargo el detergente estará presente en el buffer de carga y el buffer de corrida, para mantener las condiciones desnaturalizantes.

Al comparar los perfiles electroforéticos de los carriles 2 y 4 en la Figura 2-1 A, los cuales corresponden al tratamiento del extracto bajo condiciones de desnaturalización o desnaturalización-reducción, respectivamente, se observa una diferencia en la linealidad de las bandas entre los pesos moleculares de 50KDa y 110KDa, las bandas del carril 2 tienen linealidad heterogénea en la cual los bordes son más gruesos. Esta comparación indica que existe diferencia entre los tratamientos aplicados al extracto, el tratamiento que incluye desnaturalización y reducción de las proteínas genera bandas con linealidad homogénea y

mejor resolución. Esta característica está relacionada con la presencia del β-mercaptoetanol, un agente reductor de puentes disulfuro que asegura que las proteínas queden más lineales y disponibles para que el SDS interactúe con ellas y les confiera una carga negativa uniforme.

Figura 2-1: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína soluble para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis*. Gel separador 10%. **A.** Gel sin SDS. **B.** Gel con SDS. **MW** (KDa). Marcador; **1.** Macrófago NI – tto. Desnaturalización; **2.** Macrófago 48 hpi – tto. Desnaturalización; **3.** Macrófago NI – tto. desnaturalización-reducción; **4.** Macrófago 48 hpi tto. desnaturalización-reducción. Macrófago NI 1,5ug, Macrófago 48 hpi 3 µg. tto.: tratamiento.



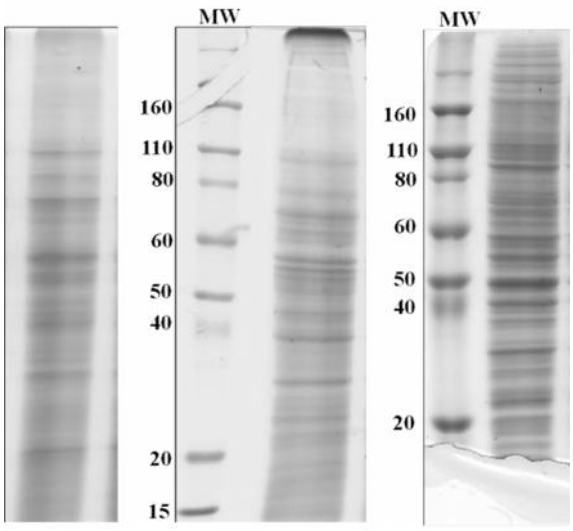
De esta manera, se concluye que los extractos de proteínas serán tratados bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, es decir, que el extracto será mezclado con el buffer de carga suplementado con β-mercaptoetanol, seguido de calentamiento a ebullición durante 10 min. Es importante resaltar, que aunque se observan diferencias en los perfiles electroforéticos entre el macrófago NI y el macrófago 48hpi, no es correcto dar conclusiones, porque la cantidad de muestra sembrada en los respectivos pozos no es la misma.

2.3.2 Extracto de proteína total de macrófagos J774A.1

Tres procedimientos de lisis fueron ensayados para obtener el extracto de proteína total de macrófagos J774A.1 NI (ver Anexo B - Protocolo 2), buffer de carga 1X cuya composición de sales y detergente del buffer de lisis permite el rompimiento de la membrana celular, y buffer RIPA utilizando dos composiciones diferentes del buffer de lisis, RIPA I y RIPA II. Este buffer es uno de los más utilizados en la lisis de células mamíferas para la extracción de proteínas citoplasmáticas, de membrana y nucleares. De la composición química de los tres buffers de

lisis se puede decir que proporcionan un ambiente químico para la solubilización de la gran diversidad de compuestos hidrofílicos (proteínas, carbohidratos) como hidrofóbicos (proteínas, lípidos) presentes en las células. Los extractos obtenidos con los buffers RIPA I y RIPA II una vez cuantificados fueron sometidos a electroforesis 1D SDS-PAGE (ver Anexo C - Protocolo 1) teniendo en cuenta las condiciones experimentales encontradas para la preparación de los geles (gel concentrador y gel separador) y tratamiento del extracto.

Figura 2-2: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI obtenidos por tres procedimientos de lisis. Gel separador 10%. **MW** (KDa). Marcador; **a.** Buffer de carga**; b.** RIPA I y **c.** RIPA II. 25ug de proteína/pozo para RIPA I y RIPA II.



a. **b.** **c.**

De los perfiles electroforéticos que se muestran en la Figura 2-2 para la muestra de macrófagos J774A.1 NI se puede decir que los tres procedimientos ensayados permiten la obtención de un extracto proteico con presencia de diversas proteínas en un amplio rango de peso molecular. El procedimiento buffer de carga y buffer RIPA I generan un perfil de proteínas similar, mientras que con el procedimiento buffer RIPA II se obtiene un mejor bandeo de proteínas de alto peso molecular y también de bajo peso molecular, por lo tanto es el procedimiento que permite obtener de las células la más alta representación de proteínas en el amplio rango de peso molecular. Este comportamiento se atribuye a dos características del buffer de lisis RIPA II: 1) el incremento en la concentración de NaCl de 150mM a 300mM genera una condición hipertónica en la cual la alteración del volumen celular dado por la migración del agua hacia el exterior de la célula genera debilitamiento de la membrana por estrés mecánico, es decir, que la célula se está sometiendo a una condición adicional a la

presencia del detergente para su lisis; 2) el incremento en la concentración del detergente Tritón X-100 de 0,5% a 1% aporta un mayor ambiente hidrofóbico para la solubilización de los lípidos de las membranas y la liberación del contenido de los organelos. La literatura reporta que bajas concentraciones del detergente Tritón con un buffer isotónico (como el buffer RIPA I) preserva la integridad nuclear y los microfilamentos, mientras que el uso del detergente con buffers hipotónicos o hipertónicos (como el buffer RIPA II) se utiliza para obtener preparaciones del citoesqueleto (Ramsby et al., 1999).

De esta manera, se concluye que para la obtención de un extracto de proteína total de macrófagos J774A.1 NI se utilizará el buffer de lisis RIPA II, cuyo procedimiento se encuentra descrito en el Anexo B – Protocolo 2. Es importante resaltar que este procedimiento no requiere pasos adicionales de purificación de las proteínas que puedan modificar la muestra, característica importante para estudios comparativos de análisis de proteínas.

2.3.3 Extracto de proteína total de promastigotes de *Leishmania amazonensis*

Una de las dificultades en nuestro laboratorio ha sido la obtención de un extracto de proteína total del parásito *Leishmania* cuyo perfil electroforético muestre representación de proteínas en todo el rango de peso molecular. La causa es la dificultad experimental que existe para lisar la membrana de los parásitos debido a la presencia de un glicocálix complejo en su membrana. Este glicocálix está compuesto principalmente por: lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicanos (PPG), glicoproteínas (GP63) y un grupo de glicoinositolfosfolípidos (Novozhilova & Bovin, 2010).

Con el objetivo de dar solución a esta dificultad se ensayaron diferentes procedimientos de lisis (ver Anexo B – Protocolo 4), para obtener el extracto de proteína total del parásito *Leishmania amazonensis* en su estadio promastigote. Se utilizaron promastigotes porque este estadio de *Leishmania* puede mantenerse en cultivo *in vitro* y generarse en grandes cantidades. Los procedimientos de lisis tienen en cuenta los siguientes principios fisicoquímicos de ruptura celular: lisis por detergentes, sonicación, ciclos de congelamiento-descongelamiento y lisis osmótica, los cuales fueron utilizados de manera individual o en combinación. La composición de los diferentes buffers usados en los procedimientos incluyó el uso de ciertos compuestos químicos que influyen en la solubilización de las proteínas

liberadas después de la lisis celular, ya que rompen las interacciones involucradas en la agregación de las proteínas, tales como puentes disulfuro, puentes de hidrógeno, fuerzas van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas.

Los extractos de proteína obtenidos con los diferentes procedimientos fueron sometidos a electroforesis 1D SDS-PAGE teniendo en cuentas las condiciones establecidas (ver Anexo C - Protocolo 1).

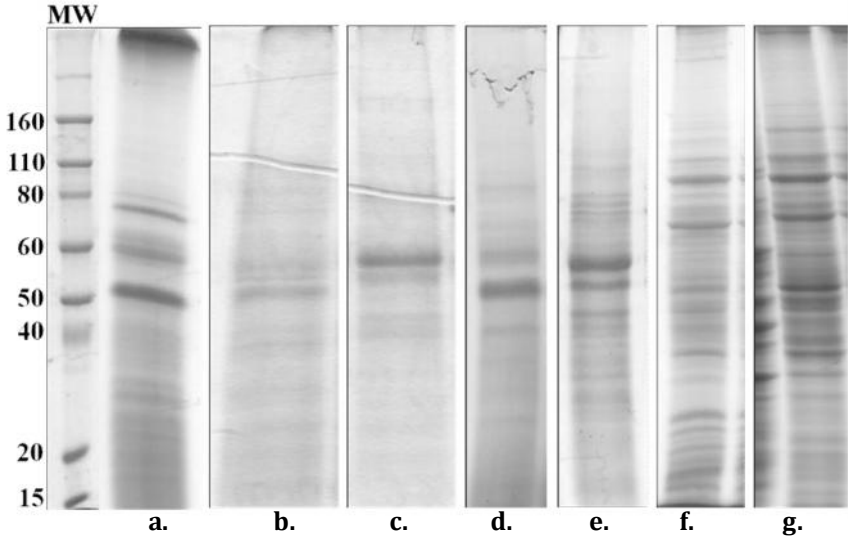
El primer procedimiento de lisis ensayado, que utiliza el buffer de carga 1X, permite el rompimiento de la membrana celular por disrupción con detergente. Estos comprometen la integridad de la membrana celular al penetrar la bicapa lipídica y formar micelas con fosfolípidos aislados y proteínas de membrana. El detergente SDS presente en el buffer de lisis interrumpe las interacciones hidrofóbicas entre los dominios hidrofóbicos de las proteínas, mientras que el agente reductor β-mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro intra- e intermoleculares y logra el des-plegamiento de las proteínas (Görg et al., 2004).

El perfil electroforético con el buffer de carga 1X (Figura 2-3, panel a) muestra pocas proteínas que se agrupan entre 50 y 80KDa y otras de bajo peso molecular (<35KDa), con resolución baja indicando lisis incompleta de los parásitos y sugiriendo que el SDS no es un detergente apropiado para desestabilizar la membrana celular. Como el SDS es un detergente aniónico que posee una cola de 12 átomos de carbono unida a un grupo sulfato, este grupo iónico podría reducir la solubilidad del detergente en la bicapa lipídica disminuyendo su penetración y limitando la liberación completa de las proteínas presentes en la célula.

Para optimizar la lisis se usaron protocolos descritos para *Leishmania*. Los dos procedimientos de lisis, buffer de Lisis I y buffer de Lisis II, son una adaptación de Góngora et al., 2003, Brotherton et al., 2010 y Leifso et al., 2007. Estos procedimientos también actúan mediante el principio de lisis química por la presencia del detergente zwitteriónico CHAPS. Sin embargo, a diferencia del buffer de lisis anterior, estos contienen úrea y tioúrea, que junto con el detergente mejoran la solubilización de proteínas de membrana. Estos agentes caotrópicos rompen los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofílicas evitando el plegamiento de las proteínas.

Los perfiles electroforéticos correspondientes a los procedimientos buffer de Lisis I (Figura 2-3, panel b) y buffer de Lisis II (Figura 2-3, panel c) muestran que aunque son notables ciertas bandas de proteínas estas no son nítidas, lo que puede atribuirse a la interferencia que genera la alta concentración de úrea presente que dificulta la saturación adecuada de las proteínas con SDS al debilitar su interacción (Rabilloud et al., 1997). Al comparar estos perfiles electroforéticos, el procedimiento buffer de Lisis I genera un barrido indicando degradación de las proteínas aisladas que podría ser resultado de tratamientos como la ebullición de las células que sigue este procedimiento. Además bajo estas condiciones también se está favoreciendo la carbamilación de proteínas. El mayor problema asociado con la úrea en una solución acuosa es que la úrea se encuentra en equilibrio con el isocianato, el cual reacciona con los grupos α-amino del extremo N-terminal y los grupos ε-amino de los residuos de lisina, generando artefactos en las proteínas; esta reacción se favorece con la temperatura (Görg et al., 2004; Bodzon-Kulakowska et al., 2007).

Figura 2-3: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína total para promastigotes de *L. amazonensis* obtenidos por 7 procedimientos de lisis. Gel separador 10%. **MW** (KDa). Marcador; **a.** Buffer de carga 1X; **b.** Buffer Lisis I; **c.** Buffer Lisis II; **d.** Buffer RIPA I; **e.** Buffer RIPA I – sonicación; **f.** PBS hipotónico/Tritón X-100; **g.** Buffer RIPA II.



Para disminuir la interferencia por úrea en la separación de las proteínas por SDS-PAGE una alícuota del extracto se mezcló con SDS al 20% P/V como sugiere Krieg et al., 2005. Esta modificación mostró bandas poco definidas, menor resolución, y se observó barrido y no separación (imagen no mostrada), indicando que aumentar la cantidad de SDS en el

tratamiento posterior de los extractos, no sólo no elimina la interferencia, sino que además satura el sistema. Los detergentes tienen cierta solubilidad en agua, y al exceder su concentración crítica forman micelas (agregados) que limitan la unión del detergente a la proteína denaturada y consecuentemente la carga negativa necesaria para su desplazamiento en el campo eléctrico generado en la electroforesis.

Muchos compuestos que son interferentes en la separación pueden ser eliminados mediante diferentes mecanismos, dentro de los que se cuenta la precipitación de proteínas con solventes orgánicos miscibles con agua. La capa de solvatación alrededor de la proteína disminuye después de la adición del solvente cuando este desplaza el agua de la superficie de la proteína para unirse a ella favoreciendo su agregación. Entonces, para eliminar la úrea del extracto total del parásito se realizó precipitación de las proteínas con acetona a -20°C, solubilizándolas posteriormente en el buffer carga 1X sin mejoría en la resolución y con menor cantidad de bandas (imagen no mostrada). Este resultado permite proponer que la poca cantidad de bandas no se debe solamente a la presencia de compuestos interferentes sino también a la baja representación de proteínas en los extractos obtenidos para el parásito debido a lisis incompleta.

El siguiente procedimiento de lisis ensayado, utiliza el buffer de lisis RIPA I, y genera ruptura celular por lisis química. Del perfil electroforético mostrado para el buffer RIPA I (Figura 2-3, d) se puede observar baja resolución de las bandas. Aunque se observan algunas bandas en la parte media del gel, están ausentes en gran proporción bandas de alto y bajo peso molecular, lo que podría sugerir una vez más que este procedimiento genera lisis incompleta de la membrana de los parásitos.

Todos los anteriores resultados muestran y permiten concluir que los procedimientos de ruptura cuyo principio es la alteración de la membrana celular por acción de un detergente, no son suficientes para lisar *Leishmania*. Por tal razón, los procedimientos que a continuación fueron ensayados incluyen pasos de ruptura mecánica para inducir lisis.

En el siguiente ensayo se decidió utilizar junto con el buffer RIPA I sonicación, un método mecánico en el cual las ondas ultrasónicas generadas interactúan con las células produciendo microburbujas de gas, cuya energía liberada después de la explosión/implosión lleva a

ruptura celular. La sonicación de las células se realizó en hielo para evitar degradación de las proteínas por el calor generado en la vibración del sistema. El perfil electroforético correspondiente a este procedimiento (Figura 2-3, e) muestra incremento en la cantidad de bandas de alto y bajo peso molecular cuya resolución y nitidez es mayor en comparación con los perfiles anteriores. Aunque se mejoró la representación de proteínas en el extracto al utilizar dos métodos de ruptura, lo que corresponde a una mejor lisis de los parásitos, aún están ausentes muchas bandas en todo el rango de peso molecular.

El siguiente procedimiento de lisis ensayado utiliza dos métodos de ruptura mecánicos: estrés mecánico por alteración de la presión osmótica con una solución hipotónica y ciclos de congelamiento-descongelamiento. El PBS hipotónico es una solución que tiene menor concentración de soluto con respecto al interior de la célula, y por lo tanto una mayor cantidad de agua. Siguiendo el gradiente de concentración, el agua migra al interior de la célula generando aumento de volumen que induce estrés mecánico sobre la membrana induciendo su ruptura. En los ciclos de congelamiento-descongelamiento la formación de grandes cristales de hielo sirven para romper la estructura de las membranas celulares. La presencia del detergente Tritón X-100 en el PBS hipotónico incrementa la solubilidad de las proteínas anfipáticas, como las proteínas de membrana, asegurando mayor representación de estas en el extracto.

El perfil electroforético correspondiente a este procedimiento de lisis (Figura 2-3, f) muestra mayor cantidad de bandas de peso molecular alto, intermedio y bajo en comparación a los perfiles anteriores, sin embargo dentro del perfil la cantidad de bandas de peso molecular alto es menor que la cantidad de bandas de peso molecular intermedio y bajo. Las bandas se observan con resolución y nitidez. Los dos anteriores resultados permiten afirmar que se logra lisis completa del parásito al combinar dos métodos de ruptura celular.

Finalmente, el último procedimiento ensayado utiliza el buffer RIPA II en el cual la concentración del NaCl con respecto al buffer RIPA I se incrementa de 150mM a 300mM, para generar diferencia de presión osmótica en la célula, que altera volumen celular y por estrés mecánico rompe la membrana. El perfil electroforético de este procedimiento (Figura 2-3, g) muestra al igual que el anterior, mayor cantidad de bandas en el rango de peso molecular en comparación a los perfiles anteriores, es decir, obtención de mayor

representación de proteínas en el extracto; las bandas se observan también con resolución y nitidez.

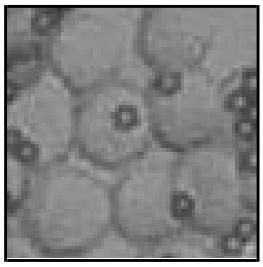
La baja cantidad de bandas de alto peso molecular se interpreta como menor abundancia de esta clase de proteínas en el parásito, la cual para muchas proteínas se encuentra por debajo del límite de detección del método de tinción

De esta manera, se concluye que la se logra lisis completa con métodos que incluyan además de detergente ruptura mecánica por efecto osmolar. Por tanto para la obtención de extractos de proteína total de promastigotes de *Leishmania* se utilizará el buffer de lisis PBS hipotónico/Tritón X-100 y RIPA II, cuyo procedimiento se encuentra descrito en el Anexo B – Protocolo 4. Estos protocolos no requieren pasos adicionales de purificación de las proteínas que puedan modificar la muestra, característica importante para estudios posteriores de análisis de proteínas.

2.3.4 Aislamiento y obtención de extractos de proteína total de fagosomas conteniendo perlas de látex (LBPs)

Se decidió trabajar con el modelo de fagocitosis de perlas de látex, como un modelo de estudio alternativo a la infección por *Leishmania* para el análisis de proteínas dado que una preparación con VPs sin contaminación con proteína del parásito no ha sido lograda. Teniendo en cuenta estudios anteriores en el grupo de investigación utilizando este modelo, se definieron las condiciones para la fagocitosis de perlas de látex de 3µm, que fueron: macrófagos J774A.1 con 72h de adherencia al frasco de cultivo, confluencia celular de 80%, exposición a perlas tratadas con luz UV por 15 minutos en medio de cultivo sin suero y en una dilución perlas: macrófago 10:1.

Figura 2-4: Microscopía de luz de la fagocitosis de perlas de látex por macrófagos J774A.1. Se observan macrófagos J774A.1 que han fagocitado perlas de látex de 3µm.



Una vez se establecieron las condiciones de la fagocitosis, dos metodologías descritas en literatura fueron ensayadas para el aislamiento de los fagosomas LBPs y posterior obtención de un extracto de proteína total. Las dos metodologías tienen en cuenta que la lisis celular es uno de los pasos más críticos para el aislamiento de los compartimentos fagosomales de los macrófagos. El éxito de este paso depende de la habilidad para lisar los macrófagos sin dañar la membrana fagosomal.

La primera metodología tiene en cuenta los procedimientos descritos por Desjardins et al. 1994 y Shui et al. 2008. En esta, las células resuspendidas en buffer se lisan en un homogenizador Dounce, en donde la fricción de las células contra la pared de un tubo de vidrio genera ruptura de la membrana celular. El sobrenadante obtenido por centrifugación se somete a un gradiente de sacarosa y ultracentrifugación para separar fagosomas. Este sistema de centrifugación en gradiente de densidad, consiste en la separación por flotación de las partículas en función de su densidad. Se construye un gradiente por etapas en el interior de un tubo al apilar sucesivamente volúmenes homogéneos de soluciones de diferente concentración. Al centrifugar, cada componente subcelular se desplazará hacia arriba o hacia abajo hasta que alcance una posición en la que su densidad sea igual a la de su entorno. Cada gradiente fue monitoreado por microscopía de luz para determinar la interface que contenía fagosomas. De la interface entre 10 y 25% de sacarosa se obtuvo un pellet de fagosomas que se utilizó para la obtención del extracto de proteína total por agitación en buffer SDS 4% en 50mM de Tris-HCl pH 8,0 y posterior centrifugación (ver Anexo B - Protocolo 6).

La segunda metodología tiene en cuenta el procedimiento descrito por Chakraborty *et al.* 1994, en donde la lisis celular combina ruptura por choque osmótico con ruptura mecánica de la membrana celular, a través del paso de una suspensión de macrófagos en el buffer de homogenización hipotónico por una aguja calibre 23G, el sobrenadante se somete a un gradiente de sacarosa y centrifugación. De la misma forma, como en la primera metodología después de monitorear por microscopía de luz el gradiente, se obtuvo un pellet de fagosomas de la interface entre 8 y 20% de sacarosa que se utilizó para la obtención del extracto de proteína total utilizando el buffer SDS 4% en 50mM de Tris-HCl pH 8,0 (ver Anexo B - Protocolo 6).

Los extractos de proteína total de los fagosomas LBPs obtenidos por las dos metodologías, fueron cuantificados y sometidos a ensayos de inmunodetección utilizando los marcadores de membranas intracelulares Golgin97 (complejo de Golgi), Calnexina (retículo endoplasmático) y LAMP-1 (lisosoma). Los resultados de estos experimentos se mostrarán y analizarán en el Capítulo 3, sección 3.2.

2.4 Extractos enriquecidos con proteínas de membrana

Uno de los obstáculos más grandes asociados con el análisis de un material complejo, como una muestra biológica, es el rango dinámico de la abundancia de las proteínas. Por lo tanto, antes del análisis, es aconsejable reducir la complejidad de la muestra mediante su fraccionamiento o enriquecerla con las proteínas de interés. Diferentes métodos pueden ser utilizados para lograr este objetivo. Esto es importante en un estudio proteómico, porque usualmente las proteínas de baja abundancia pueden tener información valiosa de los procesos celulares (Bodzon – Kulakwoska et al., 2007).

2.4.1 Extracto enriquecido con proteínas de membrana de macrófagos J774A.1

Aunque se cree que con el buffer RIPA II es posible obtener extractos de proteína total, en donde se incluyan proteínas de membrana, se decidió ensayar procedimientos para obtener un extracto enriquecido con proteínas de membrana, ya que esta clase de proteínas se encuentran en baja concentración con respecto a muchas proteínas citosólicas.

Las proteínas de membrana suelen ser enriquecidas por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, cromatografía de afinidad con lectina en combinación con centrifugación, perlas de sílice o biotinilación e interacción con estreptavidina inmovilizada. Aunque estos métodos permiten aislamiento de proteínas de membrana con alta pureza, sus desventajas son la baja eficiencia de recuperación, el uso de equipos especializados y la necesidad de grandes cantidades de muestra. En general, el detergente es el reactivo más comúnmente utilizado para la permeabilización de la membrana y el aislamiento de proteínas de membrana. Esto es debido a su propiedad anfipática, que consiste en poseer una cabeza polar o grupo cargado y una cadena hidrocarbonada hidrofóbica extendida, y por tanto la capacidad de formar micelas en solución acuosa (Bodzon – Kulakwoska et al., 2007; Hongsachart et al., 2008).

Dos procedimientos fueron seleccionados para la obtención de un extracto enriquecido con proteínas de membrana a partir de un cultivo de macrófagos J774A.1 NI (Ver Anexo B - Protocolo 3): Fraccionamiento diferencial de detergente (DDF siglas en inglés) y el Kit comercial Mem-PER. El primer procedimiento descrito por Ramsby & Makowski 1999, consiste en extracción secuencial desde células con buffers que contienen detergente para fraccionar proteínas. Es una técnica simple, altamente reproducible e independiente de ultracentrifugación. En general, el protocolo utiliza tres buffers de extracción: 1) Digitonina; 2) Tritón X-100 y 3) Tween-40/desoxicolato. Con estos es posible obtener 4 fracciones electroforéticamente distintas, que contienen: 1) proteínas citosólicas, 2) proteínas de membrana, 3) proteínas nucleares (de membrana y solubles) y 4) filamentos del citoesqueleto resistentes a detergente.

La Digitonina es un compuesto esteroideo que formaría un complejo con el colesterol de la membrana plasmática, permeabilizándola y generando liberación rápida de los componentes citosólicos solubles dejando intactos organelos pesados. Así que este es un método de extracción suave en comparación con otros. Tritón es un detergente no iónico que solubiliza lípidos de membrana y libera el contenido de los organelos. Bajas concentraciones del detergente en buffers isotónicos conservan la integridad nuclear y los microfilamentos. El desoxicolato es un detergente iónico que destruye la integridad nuclear, solubiliza la actina y otros elementos del citoesqueleto (Ramsby & Makowski 1999).

La parte experimental incluyó el uso de los buffers con Digitonina y Tritón X-100, ya que el interés se encuentra en las proteínas de membrana. Las proteínas presentes en el extracto obtenido con el buffer Tritón X-100 fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) con el objetivo de concentrarlas y eliminar compuestos interferentes del buffer de lisis en la electroforesis 1D SDS-PAGE. La solubilización del pellet de proteínas se realizó en SDS 5%.

En el perfil electroforético correspondiente al extracto obtenido con el primer procedimiento (Figura 2-5 A), se observan, una serie de bandas difusas, los carriles presentan ensanchamiento y por tanto no es de buena calidad. Es posible atribuir estas características a interferencia del detergente SDS que a alta concentración genera formación de micelas que afectan la separación de las proteínas o su tinción posterior. La justificación a esta interferencia se encuentra en que al llevar al cabo la disolución del pellet de proteínas

obtenido después de precipitar con TCA en una solución de SDS 5% y mezclar esta disolución con el buffer de carga, que también contiene SDS, se generó saturación del sistema con este compuesto provocando la formación de micelas.

El segundo procedimiento ensayado se seleccionó teniendo en cuenta reportes previos en los cuales se resalta el uso del kit Mem-PER® en comparación con otros procedimientos, como el DDF, para enriquecer fracciones en proteínas de membrana (Qoronfleh et al., 2002, Hongsachart et al., 2008). Las células son lisadas inicialmente con un detergente y luego un segundo detergente (Tritón X-114) es adicionado para solubilizar las proteínas de membrana. De la mezcla se separan las proteínas anfipáticas (Fracción hidrofóbica) de las proteínas hidrofílicas (Fracción hidrofílica) a partir de una partición de fase inducida por temperatura. Aunque este procedimiento permite la extracción de proteínas de membrana de manera directa y altamente eficiente, debe realizarse un procedimiento adicional en el tratamiento de la muestra para eliminar el detergente de la fracción hidrofóbica, porque su alta concentración interfiere con la separación de las proteínas por electroforesis SDS-PAGE (Figura 2-5 B, panel a).

En literatura se reportan diferentes procedimientos para purificar proteínas con el objetivo de eliminar compuestos presentes en el extracto que son interferentes en la separación, además que permiten concentrar las proteínas, si su representación en el extracto es baja. La precipitación es el procedimiento aplicado con mayor frecuencia permitiendo la eliminación de contaminantes tales como sales, lípidos, polisacáridos, detergentes, ácidos nucleicos, etc., que pueden interferir con métodos analíticos posteriores. Una de las dificultades con las proteínas de membrana se encuentra en la solubilización del pellet que se obtiene después de precipitarlas, porque es necesario que el buffer que se utilice contenga un detergente para mantenerlas en solución. Teniendo en cuenta lo anterior, cuatro procedimientos fueron seleccionados para la precipitación de las proteínas presentes en la fracción hidrofóbica y posterior solubilización del pellet: Fenol-acetona/Tritón X-100 0,5%, Acetona/Tritón X-100 0,5%, TCA/buffer de carga y Metanol-cloroformo/buffer de carga.

Los perfiles electroforéticos correspondientes a los procedimientos de precipitación y solubilización se muestran en la Figura 2-5 B (paneles b, c, d y e). Los paneles b y c de la Figura 2-5 B, muestran una muy baja recuperación de proteínas de la fracción hidrofóbica

después de precipitarlas con Fenol-acetona o acetona y solubilizar el pellet en Tritón X-100 0,5%. La explicación que se propone es que estos dos procedimientos de precipitación son efectivos para extraer proteínas de soluciones acuosas, porque la adición de solventes orgánicos miscibles en agua como la acetona, hace que la interacción del agua con las proteínas se reduzca y el agua entonces pasa a rodear las moléculas del solvente. El extracto del cual se quiere precipitar las proteínas no es una solución acuosa, por tal razón los dos procedimientos ensayados no son adecuados. Además, la precipitación con fenol-acetona puede generar artefactos en las proteínas o su degradación porque el procedimiento incluye un paso de calentamiento a 70°C.

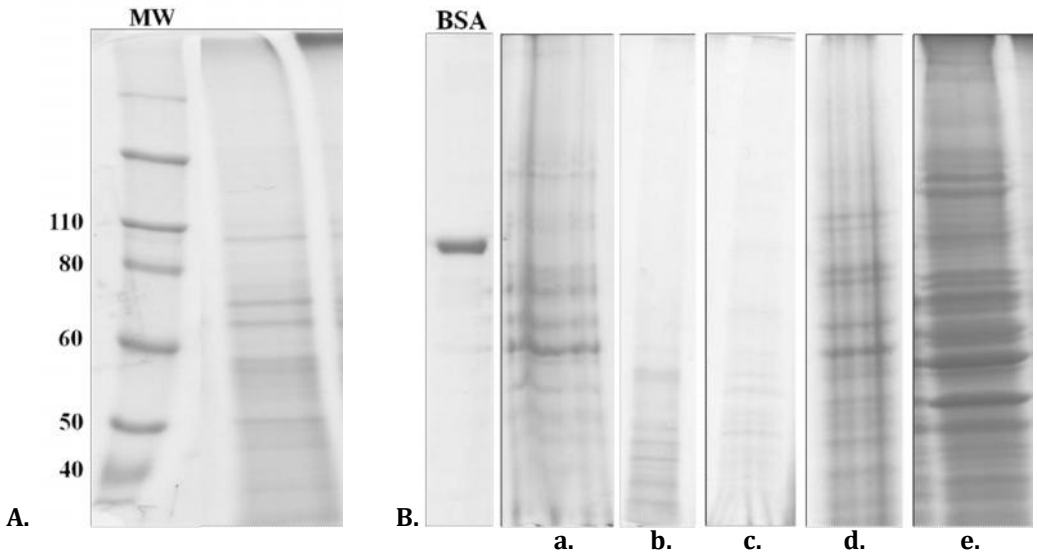
La precipitación con TCA muestra una mejor recuperación de las proteínas presentes en la fracción hidrofóbica (Figura 2-5 B, panel d), sin embargo se observa un corrimiento anormal dado por la presencia de una interferencia en la separación en forma de unas líneas verticales. Esta interferencia puede ser causada por la presencia de partículas sólidas presentes en la mezcla cargada al gel, que pueden corresponder a fracciones de proteínas que no lograron solubilizarse en el buffer, porque cuando no se elimina el TCA realizando varios lavados con acetona fría la solubilización posterior del pellet es menor.

Se empleó finalmente el método de Metanol/cloroformo para purificar las proteínas. La literatura lo describe como un método de precipitación cuantitativo de proteínas solubles así como de proteínas de membrana, en el cual se evita el calentamiento y condiciones ácidas durante la precipitación. Es un método efectivo para la eliminación de los lípidos de las membranas, los cuales generan distorsión en la electroforesis 1D SDS-PAGE, mejorando el perfil de proteínas sin pérdida cuantitativa de proteína (Wessel & Flügge, 1984). Se basa en una partición de fase mediante la conformación de un sistema terciario Agua/Metanol:Cloroformo, en el que las proteínas permanecerán precipitadas en la interface.

El perfil electroforético del panel e (Figura 2-5 B) muestra que el tratamiento de la fracción hidrofóbica con Metanol/cloroformo genera una muestra adecuada, elimina interferencias y permite obtener mayor cantidad de bandas con resolución y nitidez en comparación al perfil anterior. Este resultado muestra también que el procedimiento con TCA lleva a pérdida de muestra, la cual está relacionada con la dificultad en la solubilización del pellet después de la precipitación. Por lo tanto, el procedimiento de purificación con Metanol/cloroformo resulta

ser el más adecuado para eliminar el detergente presente en el extracto hidrofóbico que se obtiene con el kit Mem-PER.

Figura 2-5: Gel SDS-PAGE de los extractos enriquecidos con proteínas de membrana de macrófagos J774A.1 NI obtenidos por dos procedimientos: **A.** Fraccionamiento diferencial de detergente (DDF). Precipitación/solubilización de las proteínas con TCA/SDS 5%; Gel separador 8%. **B.** Kit Mem-PER; Gel separador 10%. **a.** Fracción hidrofóbica sin tratamiento. Procedimientos de precipitación/ solubilización de proteínas: **b.** Fenol-acetona/Tritón X-100 0,5%; **c.** Acetona/Tritón X-100 0,5%; **d.** TCA/buffer de carga; e. Metanol-cloroformo/buffer de carga. MW (KDa). Marcador; BSA. Albúmina de suero bovino.

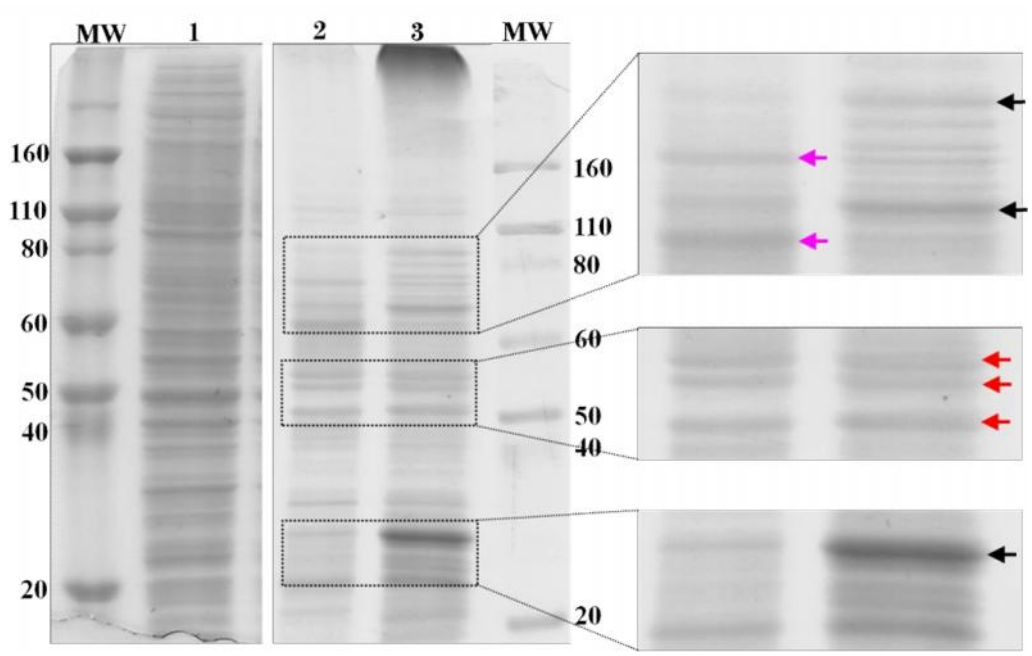


De esta manera, se concluye que una vez ha sido obtenido el extracto enriquecido con proteínas de membrana (fracción hidrofóbica) utilizando el kit Mem-PER, la purificación de las proteínas allí presentes debe realizarse con Metanol/cloroformo con el fin de minimizar la cantidad de detergente presente y obtener un perfil electroforético cuyo bandeo tenga mejor resolución y nitidez, y permita análisis posteriores.

El extracto enriquecido con proteínas de membrana del macrófago J774A.1 NI obtenido con las condiciones experimentales mencionadas en el párrafo anterior, fue comparado con la fracción hidrofílica y un extracto de proteína total. Los perfiles de proteínas de la fracción hidrofílica (Figura 2-6, carril 2) y la fracción hidrofóbica (Figura 2-6, carril 3) muestran diferencias claras comparados con el perfil de proteínas del extracto total (Figura 2-6, carril 1). La fracción hidrofóbica, la cual incluye muchas proteínas de membrana, muestra enriquecimiento por algunas proteínas cuya representación se reduce en la fracción

hidrofílica (algunos ejemplos se muestran en la sección ampliada con flechas negras en la Figura 2-6.) o viceversa (algunos ejemplos se muestran en la sección ampliada con flechas violetas en la Figura 2-6). Sin embargo, algunas proteínas que se encuentran en la fracción hidrofílica también permanecen en la fracción hidrofóbica, actuando como contaminantes (algunos ejemplos se muestran en la sección ampliada con flechas rojas en la Figura 2-6), esto debido a que el momento de la separación de las fases después de inducir su partición por calentamiento, debe realizarse muy rápido, porque si disminuye la temperatura se pierde resolución entre las dos fases porque se vuelven a homogenizar.

Figura 2-6: Gel SDS-PAGE de diferentes extractos del macrófago J774A.1. Gel separador 10%. **MW** (KDa). Marcador; **1.** Extracto de proteína total; **2.** Fracción hidrofílica; **3.** Fracción hidrofóbica.



A pesar de que se encontró un procedimiento para eliminar la interferencia del detergente en la separación de las proteínas por SDS-PAGE, el procedimiento presenta problemas de cuantificación. La cuantificación de la fracción hidrofóbica no puede realizarse directamente debido a que el detergente presente en el extracto interfiere con el método del BCA y aunque este puede eliminarse con Metanol/cloroformo, el pellet se solubiliza en un buffer coloreado (buffer de carga), por lo tanto un método colorimétrico no puede aplicarse. Para superar esta dificultad y teniendo en cuenta la importancia de conocer la concentración de proteínas en un extracto para realizar análisis comparativos, se decidió implementar una parte del

protocolo descrito por Shui et al., 2008 para la solubilización del pellet de proteínas y posterior cuantificación por BCA. En este protocolo después de precipitar las proteínas de la fracción hidrofóbica con Metanol/cloroformo, el pellet se solubiliza en buffer SDS 4% en Tris 50mM pH 8,0 por *vortex* en un agitador a 1400rpm durante 1h a 20°C. Luego, una solución de proteínas se obtiene después de centrifugar a 14000rpm por 15 min a 4°C. Esta metodología permitió la solubilización completa de las proteínas y su cuantificación posterior porque el SDS 4% no interfiere. Sin embargo el perfil electroforético de las proteínas solubilizadas muestra baja resolución y bandas difusas, características que se atribuyen a la posible saturación del sistema con SDS (imagen no mostrada). Esta interferencia podría eliminarse con una nueva precipitación de las proteínas, pero sería un paso adicional que generaría pérdida de muestra y posiblemente su modificación.

Se propone ensayar otros métodos de cuantificación de proteínas como el reportado por Henkel & Bieger, 1994, en el cual se realiza la determinación de las proteínas en una membrana de nitrocelulosa, por densitometría o por espectrofotometría. Una vez se supere esta dificultad, se propone también realizar análisis comparativos entre muestras de macrófagos no infectados e infectados en trabajos posteriores.

2.4.2 Extracto enriquecido con proteínas de membrana de promastigotes de *L. amazonensis*

De acuerdo con el método utilizado más frecuentemente para la preparación de proteínas de membrana, la extracción con detergente, dos procedimientos fueron seleccionados para la obtención de un extracto enriquecido con proteínas de membrana a partir de un cultivo de parásitos: Fraccionamiento diferencial de detergente (DDF siglas en inglés) y el Kit comercial Mem-PER (ver Anexo B - Protocolo 5). A pesar que son dos procedimientos descritos para la obtención de extractos enriquecidos con proteínas de membrana a partir de células mamíferas, su aplicación a los parásitos de *Leishmania* incluyó una modificación a cada uno de los dos procedimientos, dada la dificultad para romper la membrana plasmática del parásito y liberar su contenido interno. La modificación tiene en cuenta el resultado obtenido en la obtención del extracto de proteína total de parásitos, por el cual dos procedimientos de lisis permiten la obtención de un extracto de proteína total de parásitos de *L. amazonensis* en su estadio promastigote: PBS hipotónico y RIPA II.

El primer procedimiento ensayado, fraccionamiento diferencial de detergente (descrito por Ramsby & Makowski 1999, DDF), emplea una extracción secuencial desde células con buffers que contienen detergentes para fraccionar proteínas. Los parásitos fueron lisados inicialmente con PBS hipotónico con el fin de asegurar la ruptura adecuada de su membrana; posteriormente se siguió con el uso de los buffers Digitonina y Tritón X-100. Las proteínas presentes en el extracto obtenido con el buffer Tritón X-100 fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) y el pellet de proteínas se solubilizó en SDS 5%.

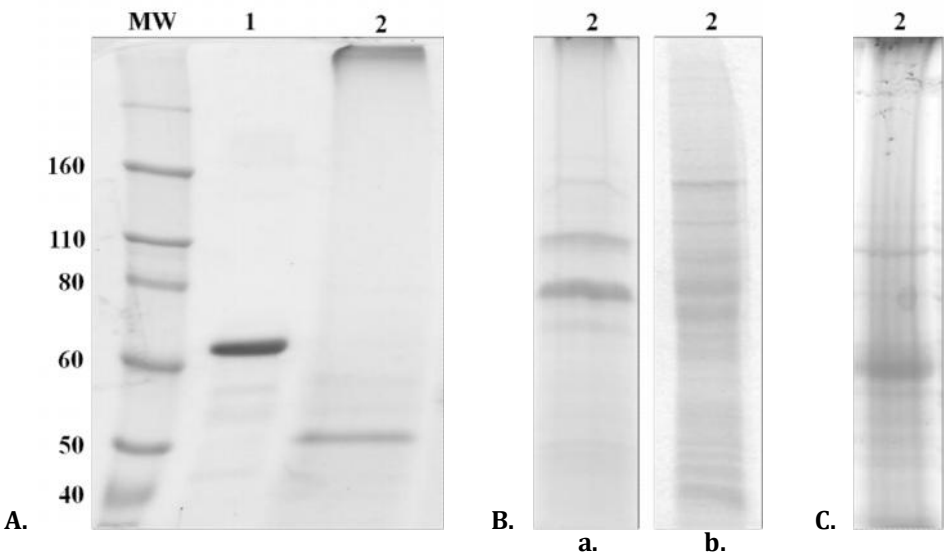
En el perfil electroforético correspondiente al primer procedimiento ensayado (Figura 2-7 A, carril 2) se observan pocas bandas por debajo de 60KDa, y sólo una banda por encima de 50KDa presenta una intensidad marcada mientras otras pocas son notables a una muy baja intensidad; además la calidad del perfil no es buena con pocas bandas difusas y ensanchamiento del carril. Estas características se atribuyen a la presencia de SDS en el sistema, ya que también fue un reactivo utilizado durante el procedimiento experimental llevado a cabo para obtener la muestra que fue sembrada en el gel.

La presencia de pocas bandas de proteína se atribuye a su baja concentración en el extracto antes de la precipitación con TCA, porque en un ensayo posterior se realizó la precipitación de las proteínas para un mayor volumen de extracto, sin éxito (imagen no mostrada). Por otro lado, se descartaron problemas con la lisis porque el extracto obtenido con PBS hipotónico y evaluado por SDS-PAGE, evidenció un perfil de proteínas con varias bandas indicando ruptura adecuada. A pesar que se validó la ruptura del parásito, el resultado obtenido para el fraccionamiento diferencial de detergente evidencia que no fue el procedimiento adecuado para el fraccionamiento de las proteínas de membrana, porque mostró presencia de pocas bandas.

El segundo procedimiento ensayado, kit Mem-PER®, se seleccionó teniendo en cuenta los resultados obtenidos para macrófago J774A.1 NI y algunos reportes en literatura, en los cuales se resalta el uso del detergente Tritón X-114 para el aislamiento de proteínas integrales de membrana de especies de L*eishmania* en el estadio promastigote (Murray et al., 1989; Garg et al., 2004). Sin embargo, cómo se mencionó se incluyó el paso de ruptura con PBS hipotónico/Tritón X-100; la mezcla luego se sometió a Tritón X-114 el cual es adicionado para solubilizar las proteínas de membrana. De la mezcla se separan las proteínas anfipáticas

(Fracción hidrofóbica) de las proteínas hidrofílicas (Fracción hidrofílica) a partir de una partición de fase inducida por temperatura. Se realizó un procedimiento posterior para el tratamiento de la muestra con el objetivo de eliminar el detergente de la fracción hidrofóbica. Teniendo en cuenta los resultados de la sección anterior, las proteínas fueron precipitadas con Metanol/Cloroformo y el pellet se solubilizó en buffer de carga y SDS 4% en Tris-HCl pH 8,0.

Figura 2-7: Gel SDS-PAGE de los extractos enriquecidos con proteínas de membrana para promastigotes de *L. amazonensis* obtenidos por tres procedimientos modificados. **A.** PBS hipotónico-Fraccionamiento Diferencial de Detergente (DDF). Precipitación/solubilización de las proteínas con TCA/SDS 5%; Gel separador 8%. **B.** PBS hipotónico-Tritón X-100-Kit Mem-PER; Gel separador 10%. Procedimientos de precipitación/solubilización de proteínas: **a.** Metanol-cloroformo/buffer de carga; **b.** Metanol-cloroformo/SDS 4% en Tris-HCl pH 8,0. **C.** RIPA II-Kit Mem PER; Gel separador 8%. Procedimiento de precipitación/solubilización de las proteínas con Metanol-cloroformo/buffer de carga. MW (KDa). Marcador; 1. BSA, 69 KDa; 2. *L. amazonensis* (promastigote).



Los perfiles electroforéticos en la Figura 2-7 B, muestran mayor cantidad de bandas de proteína en los extractos obtenidos utilizando el kit comercial Mem-PER, en pesos moleculares intermedios y bajos. Es evidente la diferencia entre los procedimientos de solubilización del pellet de proteínas utilizados después de la precipitación de las proteínas de la fracción hidrofóbica con Metanol/Cloroformo: buffer de carga (Figura 2-7 B, panel a) y SDS 4% en Tris-HCl pH 8.0 (Figura 2-7 B, panel b). El buffer SDS 4% en Tris-HCl pH 8.0, permite mejor solubilización de las proteínas precipitadas, que se muestra como mayor cantidad de bandas de pesos moleculares bajos e intermedios en el perfil electroforético. Es

importante resaltar que la calidad de este perfil electroforético no es buena, porque muestra bandas difusas que se atribuyen a alta concentración del detergente SDS en el sistema, producto del SDS 4% del buffer más el del buffer de carga.

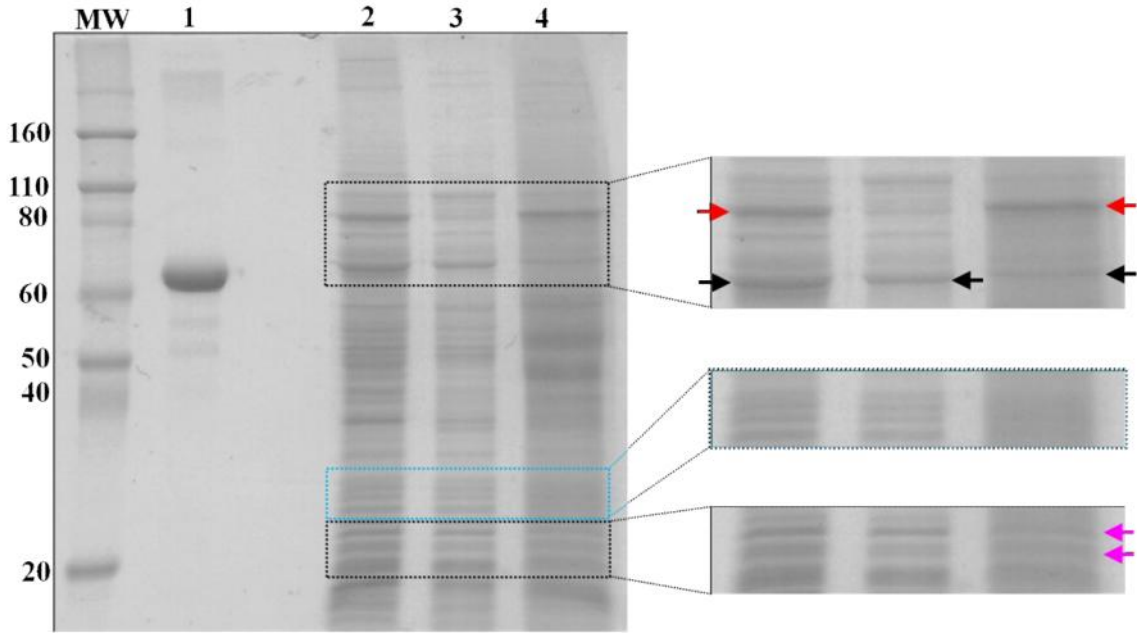
Teniendo en cuenta que el buffer RIPA II también permite la obtención de un extracto de proteína total del parásito, se decidió utilizar este procedimiento previo con el fin de comparar la calidad del extracto obtenido. Las proteínas obtenidas en la fracción hidrofóbica fueron precipitadas con Metanol/Cloroformo y el pellet se solubilizó en buffer de carga. La Figura 2-7 C, muestra el perfil electroforético correspondiente con bandas de peso molecular bajo e intermedio. Sin embargo hay un corrimiento anormal dado por la presencia de líneas verticales. Esta interferencia se atribuye a la solubilización incompleta del pellet de proteínas; a pesar que la mezcla fue centrifugada (*spin*) antes de ser cargada en el gel, quedaron partículas no solubles en el sobrenadante cargado en el pozo.

Con estos resultados se concluye que un extracto enriquecido con proteínas de membrana del parásito *L. amazonensis* se puede obtener con una modificación al Kit Mem-PER, la cual se basa en lisar inicialmente los parásitos con PBS hipotónico/Tritón X-100. Una vez han sido obtenidos los extractos estos deben ser tratados con Metanol/cloroformo con el fin de minimizar la cantidad de detergente presente y posteriormente solubilizar el pellet de proteínas en SDS 4% en Tris-HCl pH 8,0.

El extracto enriquecido con proteínas de membrana de *Leishmania* obtenido con las condiciones experimentales mencionadas en el párrafo anterior, fue comparado con la fracción hidrofílica y un extracto de proteína total. A pesar que el perfil electroforético de la fracción hidrofóbica muestra bandas difusas, este perfil (Figura 2-8, carril 3) y el perfil la fracción hidrofóbica (Figura 2-8, carril 4) muestran diferencias claras comparados con el perfil de proteínas del extracto total (Figura 2-8, carril 2) para el parásito. Puede verse una distribución de las proteínas presentes en el extracto total entre la fracción hidrofílica y la fracción hidrofóbica. La fracción hidrofóbica, muestra enriquecimiento por algunas proteínas cuya representación se reduce en la fracción hidrofílica (un ejemplo se muestra en el recuadro ampliado con una flecha roja en la Figura 2-8), mientras otras proteínas se enriquecen en la fracción hidrofílica (algunos ejemplos se muestra en el recuadro ampliado azul y se señalan con una flecha negra en la Figura 2-8). Por otro lado, algunas proteínas que

se encuentran en la fracción hidrofílica también permanecen en la fracción hidrofóbica (algunos ejemplos se señalan con flechas violetas en la Figura 2-8), actuando como contaminantes. Cómo se mencionó antes la separación de las fases debe realizarse rápido.

Figura 2-8: Gel SDS-PAGE de diferentes extractos de promastigotes de *L. amazonensis*. Gel separador 10%. **MW** (KDa). Marcador; **1.** BSA, 69 KDa.; **2.** Extracto de proteína total; **3.** Fracción hidrofílica; **4.** Fracción hidrofóbica. Proteína/pozo 25µg.



Es importante resaltar que aunque se logró la cuantificación de las proteínas de la fracción hidrofóbica con la modificación planteada en la sección anterior, el carril 4 en la Figura 2-8 pone en evidencia la baja calidad del perfil que se obtiene al llevar a cabo la modificación. Por lo tanto, se hace énfasis en la búsqueda de otros procedimientos de cuantificación de proteínas, como el que se planteó.

3. Capítulo 3: Expresión de canales iónicos en el modelo *Leishmania*-Macrófago

El interés de nuestro grupo se basa en el supuesto que la supervivencia de *Leishmania* en el macrófago es el resultado de la función integrada de las tres membranas que se encuentran entre la forma intracelular del parásito, el amastigote y su célula hospedera: la membrana plasmática del macrófago, la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) y la membrana plasmática de *Leishmania*.

Las membranas biológicas son un requisito importante para las células, y su principal función además de limitar es proporcionar una interface entre el ambiente interno y externo, y establecer intercambio controlado entre el interior y exterior de la célula, transportando selectivamente iones (canales iónicos) o moléculas como azúcares, aminoácidos, nucleótidos, etc. (transportadores). Debido a su naturaleza hidrofóbica el transporte de moléculas solubles en agua debe mediarse a través de proteínas de membrana, las cuales se encuentran integradas en la bicapa.

Los transportadores enlazan su sustrato y sufren una serie de cambios conformacionales para transferir el soluto enlazado. En los transportadores algunos facilitan el transporte por difusión simple a favor de un gradiente de concentración (transporte pasivo), mientras otros (bombas) conducen el movimiento en contra de un gradiente, utilizando la energía proporcionada por una reacción química (transporte activo primario) o acoplando el transporte de otro soluto a favor de su gradiente en un sistema co-transporte (transporte activo secundario). El acoplamiento puede ser en la misma dirección (simporte) o en dirección contraria (antiporte).

Los canales iónicos forman un poro hidrofílico que se extiende a lo largo de la bicapa y permiten el paso de iones a favor de su gradiente de concentración. El flujo a través de un

canal iónico puede medirse eléctricamente, como cambios en el potencial de membrana (Vm) o en la corriente (I), utilizando técnicas de electrofisiología. Una de esas técnicas, *patch clamp*, mide corrientes a través de una región de la membrana que contiene un canal iónico o varios. Puede medirse la amplitud y la duración de la corriente que fluye durante el tiempo que el canal está abierto, puede determinarse la frecuencia de apertura y cómo esta frecuencia es alterada por el Vm, ligandos, toxinas y otros agentes. Existen muy pocos estudios basados en estas medidas eléctricas para el modelo hospedero-patógeno, sin embargo nuestro grupo las utiliza para estudiar y caracterizar las membranas que están involucradas en la interacción hospedero-patógeno de *Leishmania*.

3.1 Expresión de canales iónicos en Macrófagos J774A.1

Algunos estudios han caracterizado la membrana plasmática del macrófago mediante sus propiedades eléctricas. Las propiedades eléctricas pasivas de la membrana del macrófago, capacitancia (Cm), resistencia (Rm) y potencial (Vm) han sido determinadas en diferentes líneas celulares. Diversos datos sugieren un Vm para el macrófago cerca al potencial de equilibrio del ion potasio (E_{K+}) (Gallin & Sheehy, 1985; Judge et al., 1994), aunque se sugiere la contribución de otros iones puesto que no es idéntico al E_{K+} en donde la contribución de la actividad de la bomba electrogénica Na^+/K^+ ATPasa podría ser importante (Gallin & Livengood, 1983). Se ha propuesto que el canal dependiente de voltaje Kv1.3 establece el Vm del macrófago (Mackenzie et al., 2003).

Con respecto a las propiedades eléctricas activas de la membrana plasmática del macrófago, se han descrito corrientes de Cl^-, de salida de K^+ (K^+ I_{out}) y de entrada de K^+ (I_{KIR}). Una gran conductancia a cloruro fue registrada en macrófagos J774 y macrófagos peritoneales (Randriamampita & Trautmann, 1987). En nuestro grupo existe evidencia que un tercio de la corriente de salida registrada en macrófagos J774A.1 es aniónica porque fue inhibida por DIDS[2] (Camacho et al., 2008).

La K^+ I_{out} parece ser el resultado de por lo menos tres tipos diferentes de canales: corrientes inactivantes, no inactivantes y dependientes de Ca^{2+} (Ca^{2+} K^+ I_{out}). La K^+ I_{out} es inhibida por 4-

[2]Inhibidores de canales/transportadores de cloruro

aminopiridina (4-AP) y tetraetilamonio (TEA; Gallin & Sheehy, 1985; Camacho et al., 2008), dos bloqueadores clásicos de canales de potasio y por margarotoxina, un inhibidor específico de Kv1.3 (Camacho et al., 2008). Se ha mostrado que la transcripción de genes específicos y la expresión de proteínas de los canales Kv1.3 y Kv1.5 están asociadas con la K^+ I_{out}.

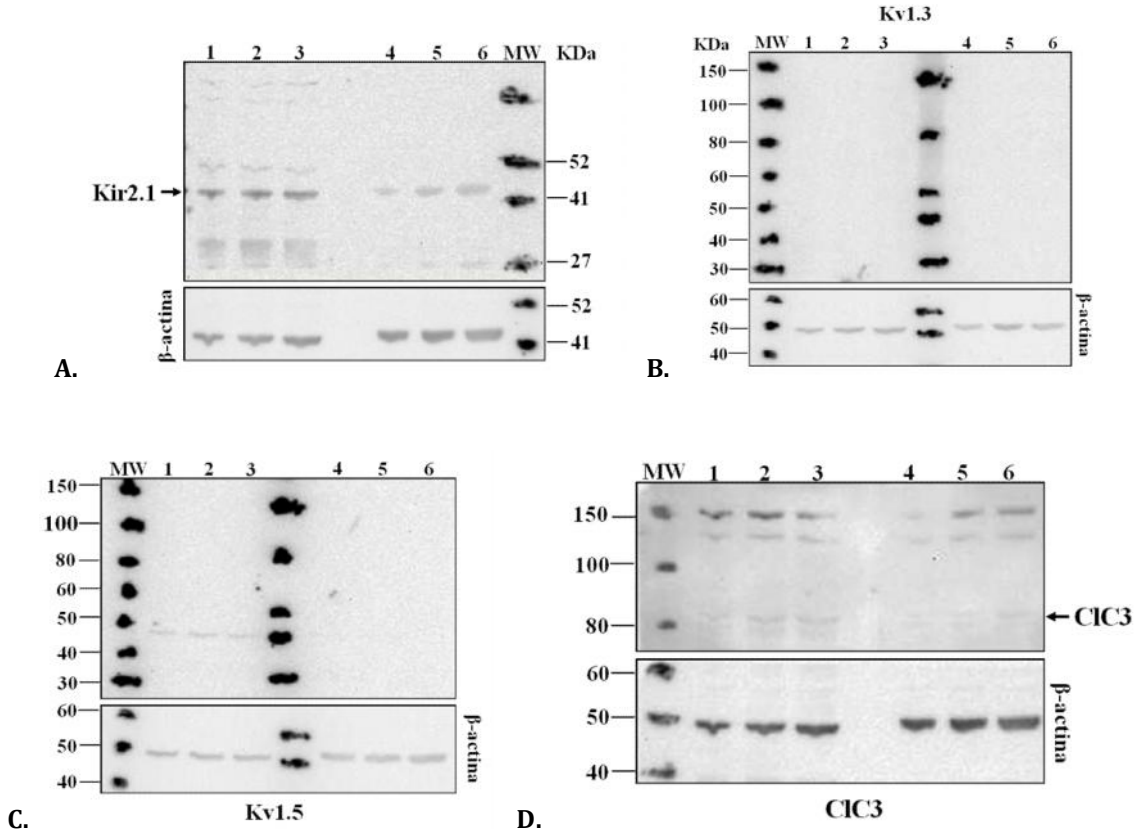
El grupo de Felipe caracterizó la respuesta electrofisiológica de macrófagos de médula ósea de ratón (BMDM) mostrando K^+ I_{out} y I_{KIR}. Las corrientes fueron asociadas con la transcripción de mRNA, expresión de proteínas y localización en la membrana plasmática del macrófago de Kv1.3 y Kir2.1, respectivamente (Vicente et al., 2003). En la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 también hay evidencia de la transcripción, expresión de proteína y localización de Kv1.3 y Kv1.5 (Vicente et al., 2006; Villalonga et al., 2007). Usando las mismas condiciones reportadas por Vicente et al., 2003, nuestro grupo amplificó productos de peso esperado para los canales Kir2.1 y Kv1.3 en células J774A.1 desde mRNA.

Teniendo en cuenta los reportes anteriores, el objetivo en esta parte del estudio es detectar las proteínas responsables de las corrientes iónicas descritas en macrófagos J774A.1 por *western blot*. Las proteínas de interés fueron Kir2.1, Kv1.3, Kv1.5 y CLC3.

Algunos de los resultados de los experimentos aquí descritos fueron obtenidos en la pasantía de investigación realizada en laboratorio Molecular Biology of Neuronal Signals dirigido por el Dr. Walter Stühmer, Max-Planck-Institut (MPI) für Experimentelle Medizin, (Göttingen – Alemania).

Extractos de proteína total y extractos enriquecidos con proteínas de membrana de muestras de macrófagos J774A.1 fueron obtenidos utilizando el buffer RIPA II y el kit comercial Mem-PER (Anexo B – Protocolo 2 y Protocolo 3), respectivamente. Las proteínas de la fracción hidrofóbica fueron precipitadas con Metanol/Cloroformo, posteriormente se siguió parte del protocolo descrito por Shui et al., 2008 para la solubilización del pellet de proteínas y cuantificación por BCA, de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 2. Una vez cuantificados los extractos, fueron sometidos a electroforesis SDS-PAGE y *western blot* para la detección de las proteínas Kir2.1, Kv1.3, Kv1.5 y CLC3, siguiendo las condiciones experimentales descritas en el Anexo C – Protocolo 3.

Figura 3-1: Inmunodetección de las proteínas Kir2.1, Kv 1.3, Kv1.5 y CLC3 en extractos de proteína total (EPT) y extractos enriquecidos con proteínas de membrana (EPM) de macrófagos J774A.1. Membrana de nitrocelulosa. **A.** Detección de Kir2.1; **B.** Detección de Kv1.3; **C.** Detección de Kv1.5 y **D.** Detección de CLC3. **MW** (KDa). Marcador; **1.** EPT (20 µg); **2.** EPT (30 µg); **3.** EPT (50 µg); **4.** EPM (20 µg); **5.** EPM (30 µg); **6.** EPM (50 µg). Condiciones experimentales Anexo C - Protocolo 3.



La Figura 3-1 A, muestra la detección de una banda del peso esperado, 48KDa, para la proteína Kir2.1 en los extractos de macrófagos J774A.1 evaluados. También puede verse que la proteína fue detectada tanto en los extractos de proteína total, como en extractos enriquecidos con proteínas de membrana. Sin embargo es notable que en los extractos de proteína total se detectaron otras bandas (Figura 3-1 A, carriles 1-3), mientras que en los extractos enriquecidos con proteínas de membrana hay una banda única (Figura 3-1 A, carriles 4-6). Las bandas de la Figura 3-1 A, carriles 1-3, cuyos pesos moleculares son menores o mayores a la banda de Kir2.1 pueden ser atribuidas a interacciones inespecíficas antígeno-anticuerpo asociadas con la complejidad del extracto total o también la calidad del anticuerpo utilizado, además de la sensibilidad del método de detección. Por otro lado, también es notable el cambio en la intensidad de la banda de la proteína de acuerdo con la cantidad de proteína cargada en el pozo, aunque es posible ver la banda de la proteína con

20µg de proteína, la banda es más visible al cargar entre 30-50µg de proteína, esta observación se sustenta con la proteína control de carga utilizada, β-actina, porque la intensidad de las bandas incrementa con la cantidad de proteína cargada (Figura 3-1 A).

La Figura 3-1 B, muestra que no hubo detección de la proteína Kv1.3 en los extractos de macrófago J774A.1 evaluados. Teniendo en cuenta que las proteínas de membrana se encuentran en baja concentración con respecto a muchas proteínas citosólicas, se decidió llevar a cabo un ensayo de inmunoprecipitación para concentrar la proteína de manera específica a partir del extracto de proteína total. Esta inmunoprecipitación se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el comerciante del kit comercial Protein G Magnetic Beads (Biolabs) partiendo de 500µg de proteína y utilizando 4µg del anticuerpo anti-Kv1.3 (SantaCruz Biotechnology, Inc - goat polyclonal). El extracto obtenido después de la inmunoprecipitación se sometió a *western blot* siguiendo el protocolo descrito en el Anexo C – Protocolo 3. No se observó la detección de alguna banda. Este resultado indicaría que de traducirse la proteína sería en poca cantidad.

La Figura 3-1 C, muestra la detección de una banda entre 40 y 50KDa, peso esperado, similar a la descrita para la detección de la proteína fusión Kv1.5. En macrófagos de médula ósea y de la línea Raw 264.7 se reporta su expresión y su asociación para generar heterodímeros con Kv1.3 (Vicente et al., 2006). Los resultados de la detección de Kv1.3 fueron negativos para macrófagos J774A.1. A pesar que hay evidencia de la presencia de transcritos para Kv1.3 (Marcela Camacho 2012) los resultados de este estudio sugieren que las corrientes de potasio voltaje dependiente en esta línea celular se pueden atribuir a la función de Kv1.5.

Con respecto a la proteína CLC3, la Figura 3-1 D, muestra la detección de una banda tenue (señalada con una flecha), cuyo peso molecular corresponde al reportado en literatura 85-90KDa. La membrana también muestra la detección de otras bandas de proteínas de peso molecular mayor, entre 120-150KDa, que podrían atribuirse a modificaciones post-traduccionales de la proteína-canal CLC3 o presencia de estructuras oligoméricas.

Los resultados anteriores indican que la proteína Kir2.1 contribuye con las corrientes rectificadoras de entrada de K^+ y está de acuerdo con los datos farmacológicos, electrofisiológicos y de transcripción encontrados en estudios previos de nuestro grupo de

investigación. La no detección de la proteína Kv1.3 no corresponde con los datos farmacológicos, electrofisiológicos y de transcripción reportados por nuestro grupo, porque eran evidencia de la función de la proteína Kv1.3. Para la proteína Kv1.5 no existen datos previos que evidencien su función en macrófagos J774A.1 pero se ha asociado con la conformación de heterodímeros junto con Kv1.3 en otros modelos (Vicente et al., 2006). Finalmente, la detección de la proteína CLC3 está de acuerdo con los datos farmacológicos y electrofisiológicos reportados en nuestro grupo; estos canales también habían sido descritos en esta línea celular por Randriamampita & Trautmann (1987). Estudios posteriores se sugieren para la detección de las proteínas Kv1.3 y Kv1.5 en la línea celular de macrófagos J774A.1, utilizando otras aproximaciones experimentales.

Debido a que se conoce que la permeabilidad de la membrana del macrófago afecta la supervivencia y multiplicación del parásito intracelular, se ha estudiado el impacto de la infección por *Leishmania* sobre las propiedades eléctricas de macrófagos infectados usando la técnica de *patch clamp* en configuración de célula entera. En el modelo de infección de macrófagos J774A.1 por *L. amazonensis* se encontró que la infección altera las corrientes de potasio de la membrana del macrófago (Forero et al., 1999; Camacho et al., 2008; Quintana et al., 2010).

Los cambios observados durante las primeras horas de infección (12 horas) están asociados con fagocitosis (Quintana et al., 2010). En infección establecida (más de 24 horas) los cambios observados son específicos de la infección. Se observa aumento de la densidad de I_{KIR} y de las corrientes de salida de potasio voltaje dependiente (Forero et al., 1999; Camacho et al., 2008). Alterar las corrientes de K^+ puede comprometer la habilidad del macrófago para fagocitar, para ser activado y para la presentación del antígeno, es decir, que las corrientes son críticas en el control de infecciones en el macrófago (Marcela Camacho 2012).

Estas alteraciones pueden ser el resultado de cambios en las propiedades de los canales que generan estas corrientes y/o en la cantidad expresada en la membrana de estos. Para iniciar los estudios de la contribución de canales específicos con las corrientes medidas se evaluó el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 por *western blot* en macrófagos J774A.1 después de la infección por *L. amazonensis* para determinar si cambios en su expresión explican los fenómenos registrados.

3.1.1 Detección de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1

Las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio del MPI para la detección de la proteína Kir2.1 por *western blot*, trataron de reproducirse en el laboratorio de Biofísica y Biología de Membranas utilizando un montaje clásico para la electroforesis SDS-PAGE (Anexo C- Protocolo 1) y las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 3-1 y el Anexo C - Protocolo 4).

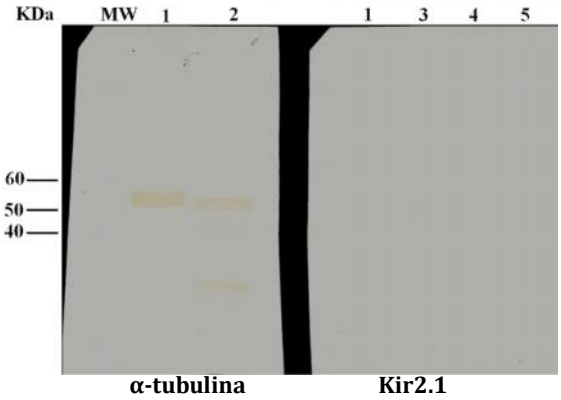
Tabla 3-1: Condiciones experimentales para la detección de las proteínas Kir2.1 y α-tubulina por ensayos de *western blot* utilizando un método de revelado cromogénico.

Condición Experimental		
Dilución Ab1	Anti-Kir2.1	1:200
	Anti-α-tubulina	1:200
Dilución Ab2	Anti-goat	1:5000
	Anti-mouse	1:2000
Tiempo de incubación Ab1		2h a RT
Tiempo de incubación Ab2		1h a RT
Método de Revelado		Cromogénico CN/DAB Substrate Kit

La Figura 3-2, muestra que bajo las condiciones tomadas como punto de partida para la inmunodetección se logró en las muestras evaluadas detección de una banda de 52KDa, peso esperado para la proteína α-tubulina. Sin embargo, puede verse que en el macrófago 48hpi se detectan además de esta banda bandas de peso molecular más bajo, las cuales se atribuyen a la presencia de proteínas del parásito en el extracto del macrófago. Se propone que el parásito puede estar afectando la estructura del citoesqueleto del macrófago, generando rompimiento de la proteína cuyos fragmentos están siendo detectados o que las bandas corresponden a la detección de las diferentes isoformas de esta proteína en el parásito.

Con relación a la proteína Kir2.1 no fue posible su detección en las muestras bajo las condiciones tomadas como punto de partida, lo que se atribuyó a baja eficiencia en la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, dilución alta del anticuerpo primario o secundario y baja sensibilidad del método de revelado.

Figura 3-2: Inmunodetección de la proteína-canal Kir2.1 en extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y macrófagos J774A.1 48 hpi. Membrana de nitrocelulosa. **MW** (KDa). Marcador; **1.** Macrófago (30µg); **2.** Macrófago 48hpi (50µg); **3-5.** Macrófago 48hpi, 20µg, 30µg y 50µg de proteína respectivamente. Condiciones experimentales Tabla 3-1 y Anexo C- Protocolo 4.

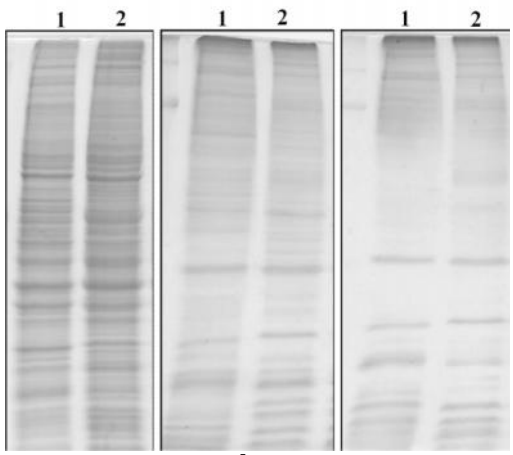


Teniendo en cuenta estas opciones y con el objetivo de encontrar condiciones experimentales que permitan la detección de la proteína Kir2.1 en las muestras y en nuestro grupo, fueron ensayados dos buffers de transferencia: el Buffer I utilizado por el laboratorio Molecular Biology of Neuronal Signals (composición 10mM $NaHCO_3$ – 3mM $NaCO_3$, SDS 0,01% y Metanol 20% a pH 9,22) y el Buffer II reportado en literatura por Kaur et al., 2009 (composición es 48mM Tris, 39mM Glicina, 0,037% SDS y Metanol 20% a pH 9,2). Esta condición fue ensayada teniendo en cuenta que muchas veces al final de un procedimiento de inmunodetección un resultado negativo puede estar dado por transferencia pobre de las proteínas del gel a la membrana. La selección de los dos buffers de transferencia, cuya composición difiere tiene en cuenta la naturaleza anfipática de la proteína de interés, Kir2.1. La eficiencia de la transferencia se evidenció por tinción de las membranas con rojo de Ponceau y por tinción del gel de poliacrilamida después de la transferencia con azul de Coomassie.

El perfil electroforético correspondiente a los extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y HEK (Figura 3-3, panel a, carril 1 y 2, respectivamente) muestra la obtención de una gran representación de proteínas de alto, medio y bajo peso molecular utilizando el buffer RIPA II, confirmando los resultados obtenidos previamente. Al comparar la tinción con azul de Coomassie de estos extractos y la tinción de los geles después de la transferencia utilizando el Buffer I o el Buffer II hay disminución en la tinción de las proteínas (Figura 3-3, panel b y c), confirmando el paso de estas del gel a la membrana. Adicionalmente, es evidente la diferencia en la eficiencia de la transferencia, donde es menor para el Buffer I

comparándolo con el Buffer II. Podría decirse que es necesario ensayar otros buffers de transferencia ya que los dos ensayados no generan transferencia completa de las proteínas del gel a la membrana, sin embargo es importante tener en cuenta que la alta cantidad de proteína sembrada en el gel (50µg) es también un factor limitante de la eficiencia de la transferencia. Teniendo en cuenta todo lo anterior, se seleccionó el Buffer II como buffer de transferencia para los ensayos de *western blot*, ya que garantiza la transferencia de la mayor parte de las proteínas sembradas en el gel a la membrana.

Figura 3-3: Gel SDS-PAGE de los extractos totales después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa empleando dos buffers de transferencia. Gel separador 10%. **a.** Perfil de proteínas del extracto total antes de la transferencia; **b.** Tinción con azul de Coomassie del gel después de la transferencia con el Buffer I; **c.** Tinción con azul de Coomassie del gel después de la transferencia con el Buffer II. **1.** Macrófago; **2.** HEK. 50ug de proteína/pozo.



a. **b.** **c.**

Además debido a que la representación de las proteínas de membrana dentro de una célula es baja con respecto a otras proteínas, se decidió reemplazar el método de revelado cromogénico por un método de quimioluminiscencia para incrementar la sensibilidad de la detección. La implementación de esta técnica se realizó inicialmente para la detección de la proteína α-tubulina en diferentes extractos de proteína total. El resultado del ensayo (imagen no mostrada) mostró la detección de una banda de peso molecular esperado (52 KDa), pero con alta intensidad lumínica, lo que generó sobreexposición de la película. Este resultado demostró la alta sensibilidad del método ofreciendo como ventaja el uso de una menor cantidad de proteína o diluciones altas de los anticuerpos primarios y secundarios contra la proteína de interés.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se decidió realizar la inmunodetección de la proteína Kir2.1 utilizando quimioluminiscencia. El ensayo se realizó con extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y células HEK (Human Embryonic Kidney), bajo las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 3-2 y el Anexo C - Protocolo 4.

Tabla 3-2: Condiciones experimentales para la detección de las proteínas Kir2.1 y α-tubulina por ensayos de *western blot* utilizando quimioluminiscencia.

Condición Experimental		
Buffer de Transferencia		Buffer II
Dilución Ab1	Anti-Kir2.1	1:200
	Anti-α-tubulina	1:2500
Dilución Ab2	Anti-goat	1:5000
	Anti-mouse	1:2000
Tiempo de incubación Ab1		2h a RT
Tiempo de incubación Ab2		1h a RT
Método de Revelado		Quimioluminiscencia

El extracto de las células HEK fue utilizado como control positivo porque es una línea celular en la que se ha reportado la presencia de la proteína Kir2.1. El resultado de este ensayo (imagen no mostrada) mostró en la membrana la detección de una banda de gran intensidad para la proteína α- tubulina y la no detección de Kir2.1 en las dos muestras. A pesar que se utilizó una dilución más alta del anticuerpo primario anti-α-tubulina, su detección continuó siendo muy intensa. Durante el desarrollo del ensayo se observó falla en el revelado de la película, porque una vez expuesta a la membrana no se observaron las bandas de la proteína α-tubulina después de fijar y revelar con los reactivos correspondientes, mostrando falla en esta parte del procedimiento. Por tal razón, se decidió realizar una nueva inmunodetección de la proteína Kir2.1, proponiendo las siguientes modificaciones: 1) incubación con el Ab1 anti-Kir2.1 toda la noche (ON) a 4°C, 2) dilución 1:2000 del Ab2 anti-goat, 3) dilución 1:5000 del Ab2 anti-mouse y 4) preparación de nuevas soluciones de fijación y revelado.

La Figura 3-4 A muestra la detección de bandas en el extracto de proteína del macrófago y las células HEK, en donde las bandas con mayor intensidad corresponden a las proteínas de interés, Kir2.1 y α-tubulina. Esta afirmación no puede soportarse con la asignación de los pesos moleculares a las bandas porque no está presente el marcador de peso molecular, sin embargo, la detección de una proteína en células HEK cuyo peso molecular es igual al de la

proteína detectada en la muestra de interés (macrófago) permite afirmar que es la misma proteína. Adicionalmente, se presenta un alto *background* representado por la presencia de otras bandas de proteínas que pueden atribuirse a interacciones inespecíficas y la sobreexposición de la película, mostrada como un fondo muy oscuro en la Figura 3-4 A.

Con el objetivo de disminuir el *background* se llevó a cabo la inmunodetección de la proteína Kir2.1 disminuyendo el tiempo de incubación con los Ab1, anti-Kir2.1 y anti-α-tubulina, a 2 horas a RT, manteniendo las demás condiciones experimentales iguales. Como lo muestra la Figura 3-4 B, bajo esta modificación experimental, se detectan las mismas bandas presentes en el ensayo anterior además de que se disminuyó el *background*. Sin embargo, siguen siendo notables ciertas bandas de peso molecular mayor a las bandas más intensas, las cuales se atribuyen a interacciones inespecíficas que pueden estar asociadas con la calidad del anticuerpo dada por la casa comercial.

Este resultado finalmente muestra que se encontraron las mejores condiciones para la detección de las proteínas Kir2.1 y α-tubulina (que se utilizó como proteína control de carga y transferencia), en extractos de proteína total para la muestra de interés y el control positivo, por ensayos de *western blot* utilizando quimioluminiscencia. Las condiciones experimentales se resumen en la Tabla 3-3.

Figura 3-4: Inmunodetección de la proteína-canal Kir2.1 en extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y HEK utilizando quimioluminiscencia y diferentes tiempos de incubación con los Ab1. **A.** Tiempo de incubación ON a 4°C; **B.** Tiempo de incubación 2h a RT. **1.** Macrófagos J774A.1; **2.** Células HEK. Proteína/pozo 50ug. Condiciones experimentales Tabla 3-2.

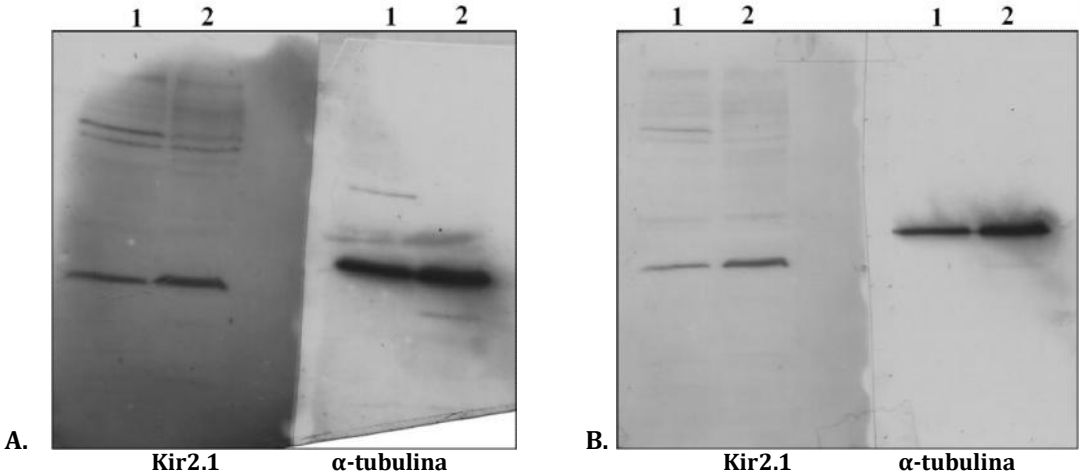


Tabla 3-3: Mejores condiciones experimentales para la detección de las proteínas Kir2.1 y la proteína α-tubulina por ensayos de *western blot* utilizando quimioluminiscencia.

Condición Experimental		
Buffer de Transferencia		Buffer II
Dilución Ab1	Anti-Kir2.1	1:200
	Anti-α-tubulina	1:2500
Dilución Ab2	Anti-goat	1:2000
	Anti-mouse	1:5000
Tiempo de incubación Ab1		2h a RT
Tiempo de incubación Ab2		1h a RT
Método de Revelado		Quimioluminiscencia

Una vez encontradas las mejores condiciones experimentales para la detección de la proteína Kir2.1, estas fueron utilizadas para evaluar el nivel de expresión de la proteína en macrófagos J774A.1 después de la infección con *L. amazonensis* por *western blot*.

3.1.2 Evaluación del nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1 con diferentes tiempos de infección con el parásito *L. amazonensis*

Algunas medidas realizadas sobre las propiedades eléctricas del macrófago están relacionadas con las condiciones de cultivo. En nuestro grupo existe evidencia que la adherencia a vidrio, un paso utilizado para diferenciar monocitos a macrófagos afecta críticamente las propiedades eléctricas de estas células. Las propiedades eléctricas pasivas de la línea celular de macrófago de ratón J774A.1, varían con el tiempo de adherencia al vidrio, en donde se incrementa la capacitancia de la membrana y se hiperpolariza (potencial más negativo que el potencial de reposo; Gallin & Sheehy, 1985; McKinney & Gallin, 1990; Camacho datos no publicados).

Las propiedades eléctricas activas en la membrana del macrófago también varían con el tiempo de adherencia al vidrio, I_{out} de gran amplitud son detectadas durante las primeras 8 horas post-adherencia con I_{KIR} mínimas. La amplitud tanto de I_{out} cómo de I_{KIR} es similar después de 24 horas post-adherencia, pero después de 48 horas post-adherencia la situación es inversa (Gallin & Sheehy, 1985; Randriamampita & Trautmann, 1987; McKinney & Gallin, 1990).

Nuestro grupo ha controlado esta condición experimental en los experimentos realizados durante el estudio del impacto de la infección por *L. amazonensis* sobre las propiedades eléctricas del macrófago J774A.1, por electrofisiología. Por tal razón, los experimentos a continuación evaluaron el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1 bajo diferentes tiempos de adhesión por *western blot*, antes de evaluar el nivel de expresión de Kir2.1 después de diferentes tiempos de infección.

El análisis de imágenes de las membranas se realizó en el programa ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). El análisis estadístico de los datos allí reportados fueron analizados en el programa estadístico SigmaStat 3.1 (Systat Software, Inc) utilizando un análisis de variancia en una vía (one way ANOVA) y el test Tukey, para determinar diferencias estadísticas con un nivel de significancia $p<0,05$. Las gráficas de cajas fueron obtenidas con el programa GraphPad Prim 6 (GraphPad Software, Inc).

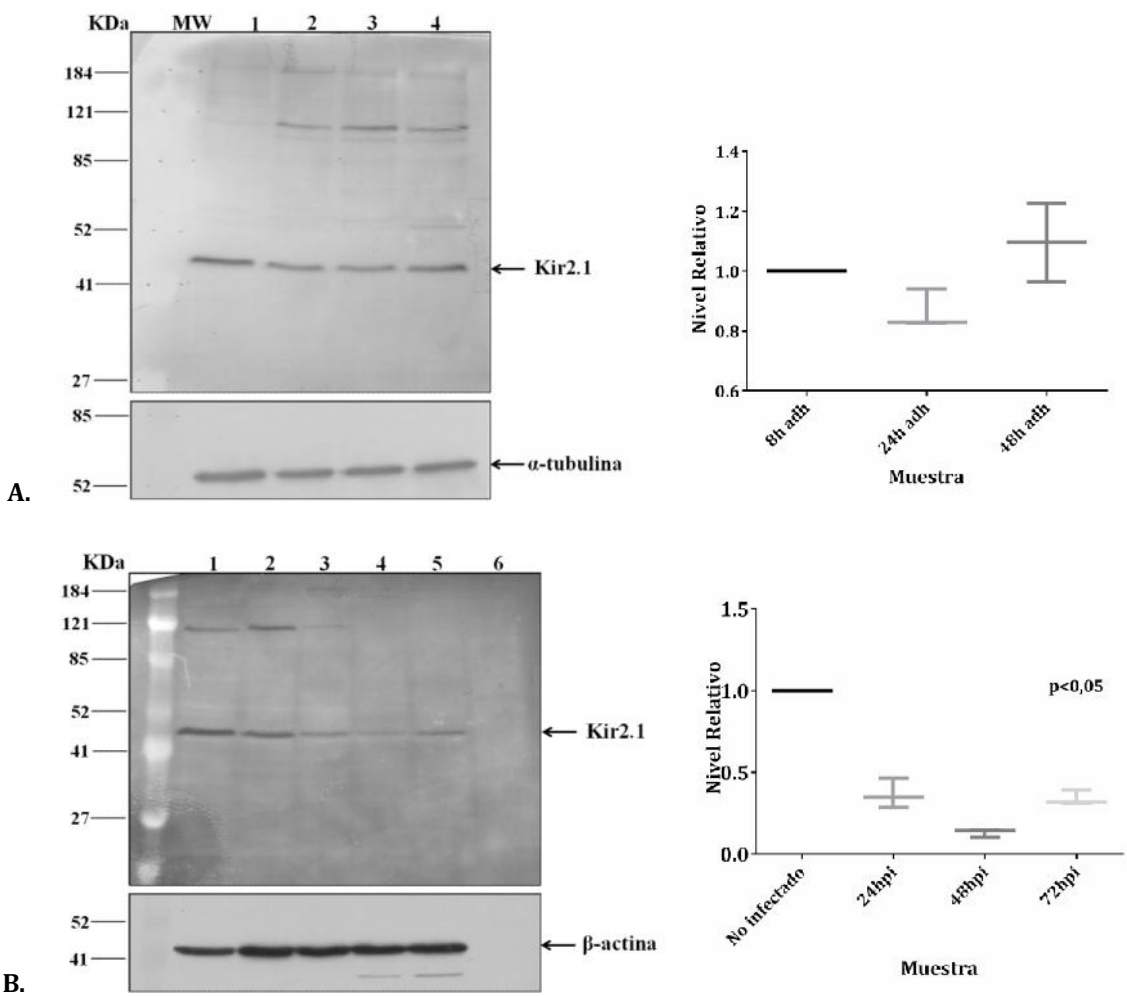
En la Figura 3-5 A (carriles 2, 3 y 4) se observa la detección de una banda en las muestras de interés la cual corresponde a la proteína Kir2.1, 48 KDa; adicionalmente la detección de una banda en células HEK cuyo peso molecular también corresponde al peso molecular reportado para Kir2.1 (48KDa), es igual al de la banda detectada en las muestras de interés, permitiendo confirmar que la banda detectada corresponde a la proteína Kir2.1.

Es notable la presencia de otra banda intensa cuyo peso molecular es mayor que la banda correspondiente a la proteína Kir2.1 y se encuentra entre 85 y 121 KDa. Podría corresponder a interacciones inespecíficas o multímeros dado que la banda tiene aproximadamente el doble del peso de la banda de la proteína Kir2.1. Teniendo en cuenta que muchas proteínas de membrana, como los canales, forman estructuras oligoméricas, se sugiere que esta banda también detectada corresponde a una estructura oligomérica del canal, la cual teniendo en cuenta el peso molecular aproximado, correspondería a su dímero. En literatura se reporta que la familia de canales clásicos Kir (Kir2.X) se presentan como complejos homoméricos (Hibino et al., 2010).

Al comparar el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en los macrófagos después de 8h, 24h y 48h de adherencia al frasco de cultivo, el gráfico de cajas en la Figura 3-5 A, muestra que hay un pequeña variación en el nivel de expresión de la proteína bajo esta condición

experimental de cultivo, el cual según el análisis estadístico de los datos no es estadísticamente significativo. De esta forma, se afirma que la adherencia al frasco de cultivo no afecta el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1.

Figura 3-5: Inmunodetección de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1 sometidos a dos condiciones experimentales. Gel separador 10%. **A.** Diferentes tiempos de adherencia: **1.** Control positivo: Células HEK; **2.** Macrófago 8h adherencia; **3.** Macrófago 24h adherencia; **4.** Macrófago 48h adherencia. **B.** Diferentes tiempos de infección: **1.** Control positivo: Células HEK; **2.** Macrófago NI; **3.** Macrófago 24hpi; **4.** Macrófago 48hpi; **5.** Macrófago 72hpi y **6.** *L. amazonensis*. Proteína/pozo 50ug. Condiciones experimentales Tabla 3-3 y Anexo C - Protocolo 4. Al lado de cada membrana se muestra el gráfico de cajas correspondiente al análisis estadístico de los datos. En las gráficas las barras representan la media ± SD del nivel de expresión relativo (ANOVA en una vía, test Tukey p<0,05). Los resultados representan res experimentos independientes.



Cómo se mencionó anteriormente, las propiedades eléctricas activas en la membrana del macrófago, que han sido caracterizadas en parte por las corrientes de entrada de potasio (I_{KIR}), varían con las condiciones de cultivo como el tiempo de adherencia. Para explicar las diferencias encontradas mediante mediciones por electrofisiología, se ha propuesto como posible explicación la síntesis y posterior inserción de nuevos canales en la membrana. El resultado obtenido muestra que el tiempo de adherencia al plástico no genera cambio en el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en macrófagos J774A.1.

A continuación se evaluó el nivel de expresión de Kir2.1 después de la infección con *L. amazonensis*.

Extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 recolectados después de 24, 48 y 72 horas post-infección (hpi) con el parásito *L. amazonensis*, fueron obtenidos por lisis de las células en el buffer RIPA II de acuerdo con los resultados obtenidos para la obtención del extracto de proteína total. En estos extractos se realizó la detección de la proteína Kir2.1 por *western blot* (ver Anexo C –Protocolo 4 - Tabla 3-3). Bajo estas condiciones experimentales se obtuvo una señal débil de la proteína Kir2.1 para las muestras de interés (imagen no mostrada), por lo tanto se decidió realizar la inmunodetección de la proteína Kir2.1 ajustando el tiempo de incubación con el Ab1 de 2h/RT a toda la noche (ON)/4°C.

Con esta modificación experimental se logró incrementar la señal de detección para la proteína Kir2.1 en las muestras (imagen no mostrada), pero se observó que la proteína α-tubulina, utilizada también como control de carga, no permitía llevar a cabo una comparación entre las muestras de interés, porque con el Ab1 anti-α-tubulina se observó superposición de bandas que generaron problemas en la interpretación de los resultados. Teniendo en cuenta este resultado, se decidió cambiar la proteína utilizada como control de carga, por β-actina. Experimentos previos fueron realizados para encontrar la dilución del Ab1 y Ab2 que permitieran la detección de una proteína cuyo peso molecular correspondiera con el reportado en literatura, 42KDa, estas diluciones fueron para el Ab1 anti-β-actina 1:2000 y para el Ab2 anti-mouse 1:8000. Con estas condiciones se decidió realizar la inmunodetección de la proteína Kir2.1 en macrófagos a diferentes tiempos post-infección utilizando β-actina como control de carga y transferencia.

En la Figura 3-5 B (carriles 1-6) puede verse la detección de una banda en las muestras la cual corresponde a la proteína Kir2.1, 48KDa, resultado confirmado por la detección de una proteína en células HEK. Al igual que en el anterior experimento es notable la presencia de otra banda cuyo peso molecular también es mayor y se encuentra entre 85 y 121 KDa, que se sugiere correspondería a un dímero del canal.

Al comparar el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 en macrófagos NI y macrófagos después de 24hpi, 48hpi y 72 hpi con *L. amazonensis*, el gráfico de cajas en la Figura 3-5 B, muestra que hay reducción en el nivel de expresión de la proteína Kir2.1 de los macrófagos después de la infección, el cual según el análisis estadístico de los datos es estadísticamente significativo ($p<0,05$). De esta forma, la infección de macrófagos por el parásito afecta la expresión de la proteína Kir2.1, induciendo disminución en su nivel de expresión. Es importante resaltar que la anterior afirmación corresponde únicamente a la proteína Kir2.1 presente en el macrófago, ya que el Ab1 utilizado para la inmunodetección de la proteína no detecta proteína alguna en el parásito (Figura 3-5 B, carril 6).

Como se ha mencionado estudios previos en nuestro grupo de investigación han evaluado el impacto de la infección de *Leishmania* sobre las propiedades eléctricas de los macrófagos mediante electrofisiología y se encontró que la infección por el parásito *L. amazonensis* altera las corrientes de K^+ (Forero et al., 1999; Camacho et al., 2008; Quintana et al., 2010). Teniendo en cuenta estos antecedentes, el resultado obtenido sustenta una de las conclusiones dadas en el estudio realizado por Quintana et al., 2010, en el cual se propone que los cambios observados después de 24hpi parecen ser específicos de la infección con *Leishmania*, porque la inmunodetección muestra que a tiempos de infección iguales o mayores a 24h por el parásito se está generando un cambio en el nivel de expresión de Kir2.1. Además este cambio podría ser sólo consecuencia de la infección por el parásito y no de una condición de cultivo, como el tiempo de adherencia.

Una vez establecida la infección por *Leishmania* (tiempos de infección >24h) la membrana del macrófago muestra incremento en la densidad de corriente de salida de K^+ (I_{out}, Camacho et al., 2008) y un incremento en la densidad de corriente de entrada de K^+ (I_{KIR}, Forero et al., 1999). La combinación de estos eventos induce hiperpolarización del macrófago. Teniendo en cuenta reportes previos y este estudio, se propone el siguiente mecanismo para explicar la

hiperpolarización encontrada en la membrana del macrófago J774A.1: la salida de K^+ lleva el potencial de membrana hacia el potencial de equilibrio para este ión y lo aleja del potencial de reposo medido para macrófagos J774.A1 (Forero et al., 1999) que se establece por la contribución de K^+ pero también de otros iones (Donnadieu & Trautmann, 1993; Ikejima et al., 1997). La salida de cargas positivas representadas por K^+ y la pérdida de entrada de este ión por menor cantidad de canales Kir2.1 se traducen en una diferencia de potencial más negativo que el potencial de reposo de estas células (hiperpolarizado). A pesar que en macrófagos se considera que los canales KIR establecen el Vm, y se reporta hiperpolarización inducida por fagocitosis atribuible a cambios en las I_{KIR} (Kouri, 1980; Gallin, 1986), nuestros datos indican otro escenario. Esta propuesta requiere ser validada por estudios posteriores en los cuales se evalúe el cambio en el nivel de expresión de los canales Kv1.5 que parecen ser responsables de K^+ I_{out} y se determine si hay contribución de Kv1.3.

Los canales Kir2.1 son modulados post-traduccionalmente por muchos factores. Forero et al., 1999 sugirieron modulación post-transcripcional de Kir2.1 y aumento del número de canales para explicar la hiperpolarización. El presente estudio muestra que efectivamente existe modulación en el nivel de expresión de la proteína Kir2.1, que podría ser post-transcripcional. Sin embargo, después de la infección el nivel de expresión de Kir2.1 disminuye, indicando que el incremento en la densidad de I_{KIR} no está relacionado por un aumento en el número de canales Kir2.1.

Importantes eventos de señalización han sido asociados con la hiperpolarización de los macrófagos, los cuales son importantes en la interacción macrófago-*Leishmania*, por ejemplo se plantea que una vez la infección se establece, una disminución en la capacidad de los macrófagos para secretar moléculas de señalización al resto del sistema inmune podría ser crucial para la supervivencia del parásito.

3.2 Detección de la proteína Kir2.1 en fagosomas LBPs

Los macrófagos en las especies vertebradas son células especializadas del sistema inmune que dentro de sus diferentes funciones, internalizan partículas en fagosomas, los cuales sufren un proceso de maduración complejo que involucra la fusión secuencial con compartimentos endosomales. Una vez maduros, los fagosomas degradan sus constituyentes

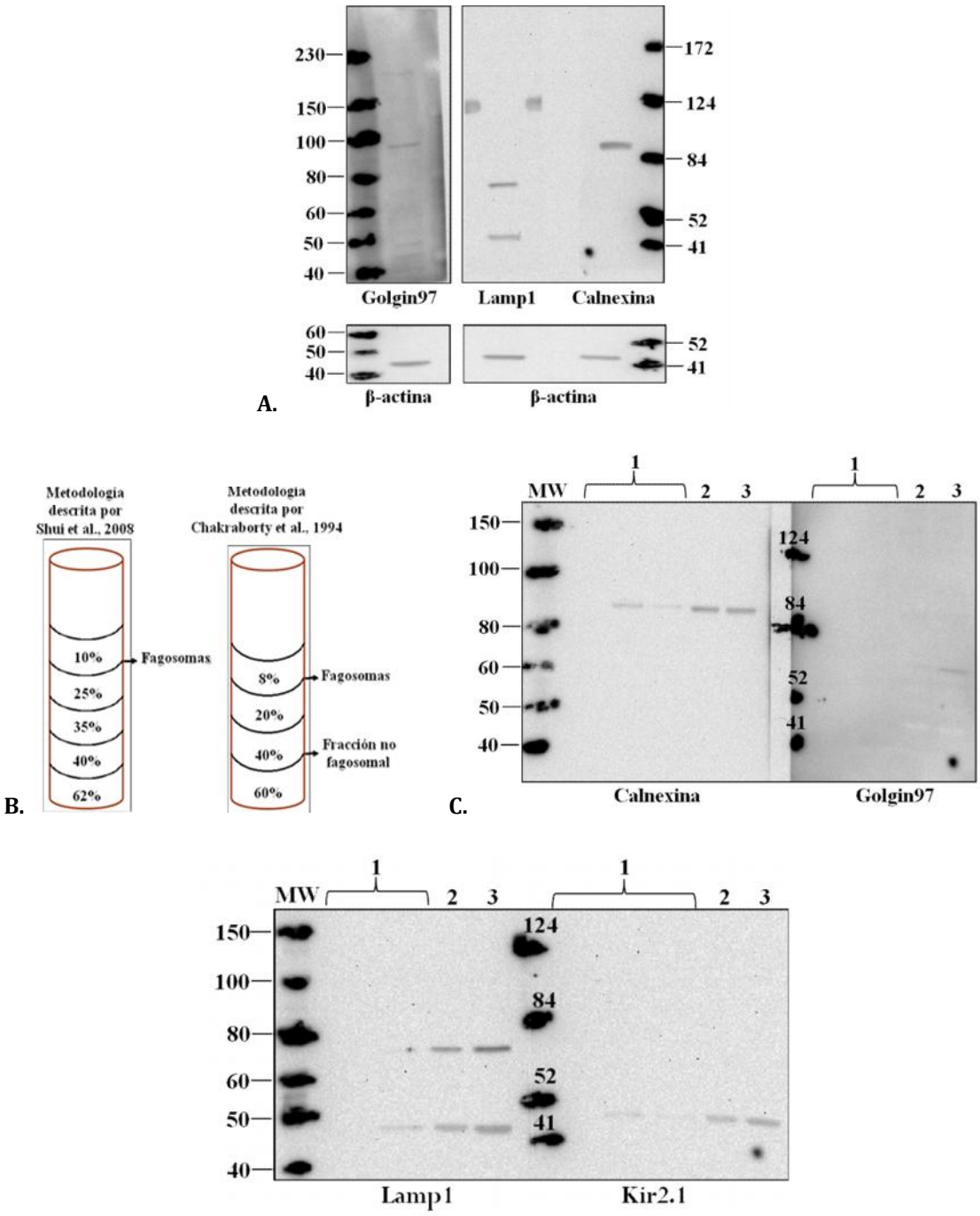
y facilitan la presentación de antígeno. Sin embargo, muchos patógenos son capaces de reducir estas funciones y sobrevivir dentro de los fagosomas, generando una enfermedad. La comprensión de la biogénesis y funciones del fagosoma ha sido estudiada a través del análisis de su contenido de proteínas.

Aunque es importante direccionar este proceso a nivel celular, los mecanismos detallados del proceso han surgido del uso de sistemas *in vitro*. El uso de partículas de látex como un sistema para imitar la interacción hospedero-patógeno durante una infección (latex-bead-containing phagosomes LBPs) ha permitido entender el proceso de la fagocitosis y la biogénesis fagolisosomal. Un primer análisis de lípidos y proteínas indicaron que la composición del fagosoma refleja una serie de interacciones entre fagosomas, endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas (Desjardins & Griffiths, 2003).

En el caso de los organelos, un requisito obvio para los ensayos *in vitro* y análisis bioquímicos es que los organelos sean tan puros como sea posible. Para la mayoría de organelos intracelulares, incluyendo fagosomas que contienen microorganismos, es muy difícil lograr este objetivo y una variable, y con frecuencia significativa, el grado de contaminación no se puede evitar (Desjardins et al., 2003). Por tanto como primera aproximación al estudio de las proteínas expresadas en la membrana de la vacuola parasitófora se trabajo con un modelo más sencillo evitando contaminación con proteínas del parásito.

Los resultados de los experimentos aquí descritos fueron obtenidos en la pasantía de investigación realizada en laboratorio Molecular Biology of Neuronal Signals dirigido por el Dr. Walter Stühmer, Max-Planck-Institut (MPI) für Experimentelle Medizin, (Göttingen – Alemania). Los extractos de proteína total obtenidos después de aislar fagosomas LBPs por dos metodologías (Anexo B - Protocolo 6; Figura 3-6 B) fueron sometidos a *western blot* con anticuerpos contra proteínas específicas consideradas marcadores de membranas intracelulares (Anexo C - Protocolo 3). Las proteínas fueron: Calnexina, Golgin97, y Lamp-1.

Figura 3-6: Inmunodetección de proteínas marcadores de membranas intracelulares en extractos de proteína total de macrófagos J774A.1 y fagosomas LBPs. **A.** Macrófagos J774A.1. Proteína/pozo 25ug. **C.** Fagosomas LBPs. **MW** (KDa). Marcador; **1.** Fagosomas LBPs obtenidos con la metodología descrita por Shui et al. 2008; **2.** Fagosomas LBPs obtenidos con la Metodología descrita por Chakraborty et al., 1994. **3.** Fracción no fagosomal. Extractos de proteína total. Proteína/pozo 5ug.



La detección del marcador de membrana lisosomal, Lamp1, en los extractos de proteína total de los fagosomas LBPs aislados (Figura 3-6 C) muestra que esta endomembrana está

asociada con la membrana del fagosoma y su presencia indica fusión fagosoma-lisosoma. Para este marcador de membrana se esperaba una banda de peso molecular de 120KDa, sin embargo la detección de esta proteína tiene un perfil que muestra dos bandas cuyos pesos moleculares 48KDa y 75KDa, coinciden con las dos bandas de proteínas detectadas en el macrófago J774A.1, célula utilizada como control positivo, indicando que es la misma proteína (Figura 3-6 A). La suma de los pesos moleculares de estas dos bandas es de 123KDa, el cual coincide con el peso molecular reportado en literatura para esta proteína. Esta observación particular plantea las siguientes preguntas de si las bandas corresponden a sub-unidades de la proteína Lamp-1 o son productos de su degradación. La detección de la proteína Lamp1 en la fracción no fagosomal responde a su presencia en los lisosomas de la línea celular estudiada.

La detección de Calnexina, una proteína integral de la membrana del retículo endoplasmático, en las fracciones fagosomales (Figura 3-6 C) sugiere la asociación entre este organelo y la membrana del fagosoma. De la misma forma, como Lamp1 la detección de esta proteína en la fracción no fagosomal responde a la presencia de este organelo en las células estudiadas. El peso molecular de la banda detectada corresponde al reportado en literatura, 90KDa, y al del control positivo (Figura 3-6 A), indicando que la proteína detectada en los fagosomas LBPs corresponde a Calnexina.

Medidas de capacitancia realizadas durante la fagocitosis de perlas de látex permitieron proponer que endomembranas eran reclutadas a la superficie celular para la formación del fagosoma (Holevinsky et al., 1998). Dependiendo de la naturaleza de la partícula ingerida, una variedad de compartimentos endocíticos aportan las membranas necesarias para la formación del fagosoma. Se ha reportado que el retículo endoplasmático (RE) puede también fusionarse con la membrana plasmática durante la fagocitosis (Gagnon et al., 2002). Becker et al., 2005, demostró que los macrófago J774 reaccionan hacia el reto de fagocitar partículas de gran tamaño (3µm) mediante la activación de un mecanismo de fusión, permitiendo acceder a la fuente más abundante de endomembranas, el retículo endoplasmático. Este proceso conocido como "fagocitosis mediada por el RE" no sólo es usado durante la internalización de perlas de látex inertes, sino también para la internalización de patógenos intracelulares, cómo *Salmonella* y *Leishmania*. Sin embargo, no es claro si la fagocitosis mediada por el RE proporciona sólo un reservorio de membranas o si también contribuye a las propiedades

funcionales de los fagosomas, por ejemplo proporcionando los lípidos y proteínas que pueden modular la señalización membranal (Desjardins et al., 2003, Becker et al., 2004).

Con respecto a la proteína integral de la membrana del complejo de Golgi, Golgin97 (Figura 3-6 C), no se detectaron bandas en las fracciones fagosomales. Es notable una banda de más de 50KDa en la fracción no fagosomal, cuyo peso no coincide con el observado en el control positivo, 97KDa. Este resultado podría sugerir que las fracciones fagosomales no se encuentran contaminadas con endomembranas del macrófago y que las proteínas Calnexina y Lamp1 son genuinas del fagosoma. Se hubiese esperado la detección de la proteína Golgin97 en la fracción no fagosomal, sin embargo es importante resaltar que las demás fracciones no fagosomales no fueron evaluadas.

Por otro lado, es notable la diferencia que se observa en la detección de las proteínas marcadores de endomembranas (Calnexina, Lamp1 y Golgin97) entre los extractos de proteína obtenidos con la metodología descrita por Shui et al. 2008 (Figura 3-6 C, carril 1) o por Chakraborty et al., 1994 (Figura 3-6 C, carril 2). En esta última hay mejor detección de las proteínas porque las bandas son más visibles. Adicionalmente, se obtiene una mayor concentración de proteínas en el extracto total de los fagosomas LBPs, que puede atribuirse a un aislamiento más adecuado de los fagosomas, ya que logra lisis de los macrófagos preservando la membrana fagosomal.

Estos resultados permitieron: 1) verificar que la fracción subcelular aislada corresponde a la fracción fagosomal porque se detectaron proteínas que la caracterizan, 2) mostrar que la membrana del fagosoma formado durante la fagocitosis de perlas de látex de 3μm por macrófagos J774A.1 es una mezcla de membranas que proviene de la membrana plasmática del macrófago, sus lisosomas y retículo endoplasmático, y 3) Sugerir que la fracción fagosomal no se encuentran contaminada con endomembranas del macrófago. De esta forma, se tiene certeza de que el extracto de proteína obtenido es representativo de este compartimento subcelular.

Leishmania entra a su célula hospedera por fagocitosis (Alexander y Russell, 1992). La vía normal de maduración de los fagosomas culmina en el lisosoma y la posterior degradación del contenido fagosomal, *Leishmania* debe sobrevivir a esta progresión. El crecimiento de *Leishmania* como amastigote en los macrófagos ocurre dentro las vacuolas parasitóforas

(VPs), formadas en el proceso de la fagocitosis. La VP es también un compartimento endolisosomal en el cual su membrana permite el intercambio de iones entre el lumen de la VP y el citoplasma de la célula infectada. Estudios sobre *L. mexicana* y *L. amazonensis* han mostrado que las VPs exhiben características de los compartimentos endocíticos tardíos de la célula hospedera, tienen pH ácido (4,7-5,2), contienen las hidrolasas lisosomales cathepsina D, B, H y L, los marcadores de membrana lisosomal LAMP1 y LAMP2, protón ATPasas y moléculas MHC clase II (Alexander et al., 1999; Rusell et al., 1992).

La permeabilidad de la membrana de la vacuola parasitófora (MVP) depende de los transportadores presentes en las membranas que se donan: la membrana plasmática del macrófago, las membranas endosomales y lisosomales, la membrana del RE y la membrana del parásito. Dentro de los posibles transportadores membranales presentes en la MVP se incluyen canales de K^+ y la familia de transportadores ABC (Cortázar et al., 2006)

Nuestro grupo de investigación ha registrado corrientes a través de la MVP (Cortázar et al., 2006; Pérez 2009) en VP inducidas por *L. amazonensis* en macrófagos J774A.1 utilizando la técnica de *patch clamp* en configuración de VP-adherida. Mediante estos registros electrofisiológicos el grupo identificó dos corrientes iónicas: la primera corriente registrada es voltaje dependiente, transporta aniones pequeños, no es inhibida por TEA o 4-AP[3], es inhibida por DIDS, SITS, ácido niflúmico[4] y por presencia de aniones grandes. Estas características son típicas de los canales de cloruro de la familia CLC. La segunda corriente es catiónica. Se observaron eventos voltaje dependiente e inhibibles por TEA y 4-AP. Los estudios preliminares sugieren que el canal tiene alta selectividad por iones K^+. Los hallazgos fisiológicos del grupo no han permitido caracterizar el tipo de moléculas que generan las corrientes registradas y su significado fisiológico.

La detección de la proteína-canal Kir2.1 en las fracciones fagosomales (Figura 3-6 C) sugiere la asociación entre la membrana plasmática del macrófago y la membrana del fagosoma, y podría corresponder a lo sugerido por Pérez, 2009 sobre la caracterización de la corriente catiónica registrada en la MVP, que el canal responsable podría provenir de la membrana del

[3] Inhibidores de canales de potasio
[4] Inhibidores de canales/transportadores de cloruro

macrófago. De ser así, se podría sugerir que Kir2.1 es la proteína que contribuye con la corriente catiónica registrada en la MVP, ya que la caracterización de esta corriente en el estudio de Pérez, 2008, se asemeja al comportamiento de los canales rectificadores de entrada de K^+ que se encuentran en la membrana del macrófago.

Estas características aunque no puede pueden extrapolarse directamente a la MVP generada por la infección de *Leishmania*, podrían servir de modelo de aproximación. Pérez, 2008 muestra la detección del canal receptor de IP3 (RIP3) y del canal receptor de Rianodina (RiR) los cuales son propios de la membrana del RE en la MVP (generada por *L. amazonensis*) y propone que su presencia podría ser el resultado del secuestro de éstos en esta membrana, para promover respuestas alteradas de calcio y/o protección contra apoptosis para el macrófago que contribuirían con la supervivencia del parásito. A futuro es necesario validar mediante otros experimentos que la fracción fagosomal aislada no presenta contaminación por endomembranas del macrófago, para soportar lo que se sugiere con estos resultados.

3.3 Expresión de una proteína CLC en promastigotes de dos especies de *Leishmania*

Durante su ciclo de vida *Leishmania* se adapta y prolifera en un ambiente donde las condiciones ambientales son drásticas, manteniendo su pH intracelular y osmolaridad en rangos fisiológicos. La adaptación a algunos de estos cambios requiere la expresión selectiva de canales iónicos y transportadores. En promastigotes *L. major* se ha sugerido que una bomba de H^+ y un canal de Cl^- contribuyen con el transporte activo secundario (Vieira et al., 1994). Con registros en bicapas se hicieron mediciones de conductancias aniónicas en la membrana plasmática de *L. mexicana*. Se describieron dos corrientes aniónicas, las cuales son consistentes con flujos aniónicos en *Leishmania i*nvolucrados con la supervivencia del parásito (DiFranco et al., 1995; Ponte-Sucre et al., 1998) y el transporte de electrones por enzimas rédox (Bera et al., 2005).

Nuestro grupo se ha interesado por el estudio de canales iónicos de *Leishmania*, particularmente los canales de cloruro asumiendo que son importantes en la supervivencia y adaptación del parásito al pH ácido de la VP. Registros electrofisiológicos directos sobre el parásito no han sido posibles debido a su tamaño pequeño, forma, movimiento y la presencia

de un glicocálix complejo en su membrana que interfiere con la formación del sello. Para superar esta dificultad se han utilizado ovocitos de anfibios (*Xenopus laevis* y *Bufo marinus*; Vargas et al., 2004) como un sistema de expresión heteróloga, para expresar el mRNA total de *Leishmania*. Utilizando ovocitos de *X. laevis* y *B. marinus* nuestro grupo de investigación ha estudiado corrientes iónicas inducidas después de la micro-inyección de mRNA poliA de *L. amazonensis* (Arroyo, 2005; Lagos et al., 2007) y *L. braziliensis* (Garzón et al., 2009). Tres tipos de corrientes de cloruro voltaje dependientes fueron registradas, donde una parece ser específica del mRNA del parásito inyectado. Esta corriente mostró sensibilidad a bloqueadores de canales de cloruro, DIDS y ácido niflúmico, y la disminución del Cl^- extracelular generó una alteración en la corriente indicando que la corriente registrada fue generada por los iones cloruro.

Con la información disponible del genoma de *L. braziliensis* el grupo ha mostrado transcripción de cuatro genes putativos CLC y clonado 3 de estos (Lozano et al., 2009), que son homólogos de los CLC intracelulares de mamíferos que se comportan como co-transportadores.

Para confirmar la expresión del canal CLC identificado por RT-PCR se utilizó la técnica de *western blot*. Extractos de proteína total de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* fueron obtenidos por lisis de los parásitos con el buffer PBS hipotónico/Tritón X-100 (T1) y RIPA II (T2; Anexo B - Protocolo 4) de acuerdo con los resultados obtenidos para la obtención de un extracto de proteína total para el parásito en estadio promastigote.

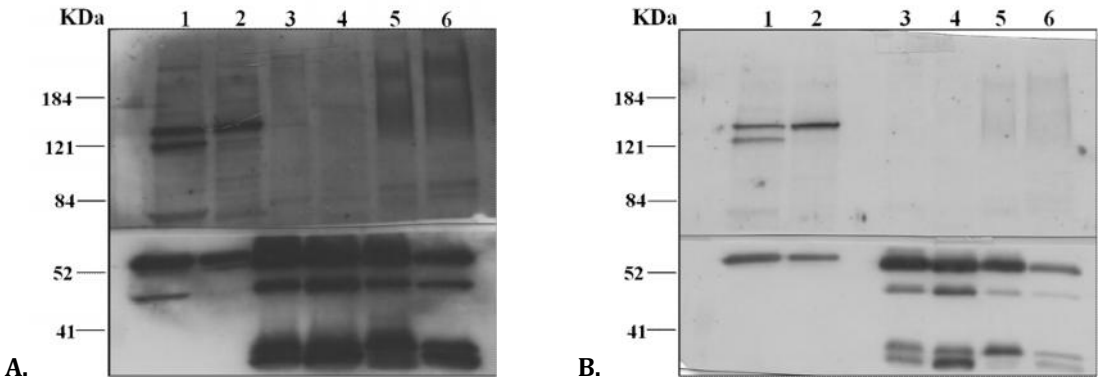
Las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio del MPI para la detección de la proteína CLC3 trataron de reproducirse en el laboratorio de Biofísica y Biología de Membranas utilizando un montaje clásico para la electroforesis SDS-PAGE (Anexo C - Protocolo 1) y las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 3-4 y el Anexo C - Protocolo 4).

Tabla 3-4: Condiciones experimentales para la detección de las proteínas CLC3 y α-tubulina por ensayos de *western blot*.

Condición Experimental			
Buffer de Transferencia		Buffer II	
		Dilución 1	Dilución 2
Dilución Ab1	Anti-CLC3	1:400	1:600
	Anti-α-tubulina	1:2500	1:4000
Dilución Ab2	Anti-rabbit	1:2000	1:2000
	Anti-mouse	1:5000	1:8000
Tiempo de incubación Ab1		2h a RT	
Tiempo de incubación Ab2		1h a RT	
Método de Revelado		Quimioluminiscencia	

La Figura 3-7 A, muestra que bajo las condiciones experimentales descritas en el párrafo anterior se logró la detección de bandas en las muestras. Las membranas fueron cortadas en dos pedazos, uno de ellos para la detección de la proteína CLC3 (parte superior) y el otro para la proteína α-tubulina, el control de carga y transferencia (parte inferior), debido a la diferencia entre los pesos moleculares de las proteínas. A pesar de lograr una detección se observa un alto *background*, por lo tanto se decidió realizar un nuevo experimento modificando las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios. La Figura 3-7 B, muestra que con la modificación planteada se logró disminuir el *background* del experimento anterior y mantuvo el perfil de las bandas más intensas.

Figura 3-7: Inmunodetección de la proteína CLC3 en extractos de proteína total de dos especies de *Leishmania*. Condiciones experimentales: **A.** Tabla 3-4 Columna Dilución 1 para Ab1 y Ab2. **B.** Tabla 3-4 Columna Dilución 2 para Ab1 y Ab2. **1.** Células HEK; **2.** Macrófagos J774A.1; **3.** *L. amazonensis* T1; **4.** *L. amazonensis* T2; **5.** *L. braziliensis* T1; **6.** *L. braziliensis* T2. Proteína/pozo 25ug. T1: PBS hipotónico/Tritón X-100 y T2: RIPA II.



El extracto de células HEK fue utilizado como control positivo porque es una línea celular en la que se ha reportado la presencia de la proteína CLC3 (Weylandt et al., 2001). En la membrana de este último experimento se logran las siguientes observaciones (Figura 3-7 B): la parte inferior muestra la detección de la misma banda en HEK, macrófago y las especies de *Leishmania* cuyo peso molecular corresponde al reportado en literatura, 52 KDa para la proteína α-tubulina. Sin embargo, es notable la detección de otras bandas de proteínas en las especies de *Leishmania*, la cual se atribuye a la presencia de diferentes isoformas de esta proteína estructural en el parásito (Gull. 1999). La parte superior muestra la detección de dos bandas de proteína entre 121KDa y 184KDa en células HEK y una banda en macrófagos, cuyo peso no corresponde con el peso molecular reportado para CLC3, 85-90KDa. Este resultado sugiere: 1) Que la banda detectada corresponde al reconocimiento por parte del anticuerpo de una proteína diferente en las células HEK y 2) modificaciones post-traduccionales de la proteína CLC3 o presencia de estructuras oligoméricas.

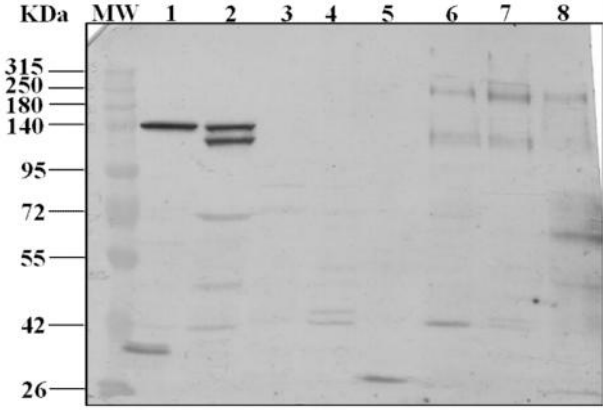
Para analizar la primera posibilidad se realizó un *blast* de proteínas utilizando la herramienta "*protein blast*" en la página del NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) entre el péptido utilizado para generar el anticuerpo y el genoma reportado para el humano, este *blast* reporta una identidad del 100% con la proteína CLCN3 y porcentajes menores contra otras proteínas CLC que incluyen otros canales e intercambiadores H^+/Cl^- reportados en humano, lo que indica que la identidad de la banda detectada corresponde a una proteína CLC. Por tal razón y teniendo en cuenta que el peso molecular de esta banda es mayor al peso esperado se sugiere modificaciones post-traduccionales o presencia de estructuras oligoméricas de la proteína CLC que están siendo reconocida en estas células.

Para los parásitos no se detectaron bandas definidas, pero en *L. braziliensis* se observan dos barridos, en donde el peso de uno de ellos corresponde al peso de las bandas detectadas en HEK y el macrófago. Esta detección sugirió expresión baja de la proteína, que resultaría en una poca representación de la proteína en el extracto total. Por lo tanto se decidió realizar un *western blot* sobre extractos enriquecidos con proteínas de membrana. Extractos enriquecidos con proteínas de membrana de muestras de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* fueron obtenidos por PBS hipotónico-Tritón X-100-Kit Mem-PER (Anexo B - Protocolo 5) de acuerdo con los resultados obtenidos para la obtención de un extracto enriquecido con proteínas de membrana para *L. amazonensis*.

La Figura 3-8 muestra la detección del bandeo mencionado para células HEK y macrófagos cuyo peso molecular es de 140KDa. En células HEK la segunda banda tiene un peso molecular de 120-121KDa (Figura 3-8, carril 2).

Para *L. amazonensis* no se logra detección de banda alguna, ni en el extracto total de proteína, ni en el extracto enriquecido con proteínas de membrana (Figura 3-8, carriles 3-5). En contraste, para *L. braziliensis* se observaron bandas, una de las cuales corresponde con la banda detectada en HEK cuyo peso molecular es de 120-121KDa, por lo que se sugiere expresión de CLC en este parásito. Por otro lado, es también notable la detección de una banda de aproximadamente 250KDa en los tres extractos de proteínas para *L. braziliensis*. Cómo se discutió anteriormente, se sugiere modificaciones post-traduccionales o presencia de estructuras oligoméricas de la proteína CLC que se está detectando.

Figura 3-8: Inmunodetección de la proteína CLC en extractos enriquecidos con proteínas de membrana de dos especies de *Leishmania*. **1.** Macrófago J774A.1; **2.** Células HEK; **3.** *L. amazonensis* ET; **4.** *L. amazonensis* Fracción hidrofílica; **5.** *L. amazonensis* Fracción hidrofóbica; **6.** *L. braziliensis* ET; **7.** *L. braziliensis* Fracción hidrofílica; **8.** *L. braziliensis* Fracción hidrofóbica. ET: Extracto de proteína total. Proteína/pozo 25ug. Condiciones experimentales Tabla 3-4 Columna Dilución 2 para Ab1 y Ab2, y Anexo C - Protocolo 4.



Es evidente que la intensidad de las bandas detectadas en el parásito *L. braziliensis* es baja lo que podría indicar baja expresión de la proteína CLC, sin embargo es importante tener en cuenta que el anticuerpo utilizado fue generado a partir de una región de aminoácidos del extremo C-terminal del canal CLCN3 humano. Al someter esta región a un *blast* de proteínas utilizando la herramienta "protein blast" en la página del NCBI contra el genoma reportado para *L. braziliensis* (MHOM/BR/75M2904, www.genedb.com) se reporta una identidad del

39% con una proteína tipificada como un canal de cloruro putativo tipo CLC (putative CLC-type chloride channel *L. braziliensis*). Esta baja identidad también podría explicar la baja detección de la proteína-canal. Para *L. amazonensis* no fue posible hacer la misma búsqueda porque su genoma no ha sido aún reportado.

La baja intensidad de la banda detectada en la fracción hidrofóbica para *L. braziliensis* se interpreta como una baja concentración de la proteína en el extracto enriquecido con proteínas de membrana, porque se hubiese esperado una detección mayor de la banda de 120-121KDa en este extracto comparado con el extracto de proteína total, pero lo que se observa es lo contrario. Esta observación sugiere que las proteínas de membrana del parásito presentan una baja solubilidad en el detergente que se utiliza y por lo tanto no se está realizando un enriquecimiento de las proteínas de membrana. Esta sugerencia se apoya al tener en cuenta que la membrana plasmática de *Leishmania* está compuesta principalmente por: lipofosfoglicanos (LPG), proteofosfoglicanos (PPG), glicoproteínas (GP63) y un grupo de glicoinositolfosfolípidos, grupos que se ubican en el exterior de la membrana de *Leishmania* que podrían interferir con la interacción entre el detergente y los fosfolípidos de la membrana para solubilizar las proteínas de membrana.

Es interesante notar que la proteína CLC que se está detectando se expresa en especies diferentes, es decir, en humano (HEK), ratón (macrófago) y parásito (*L. braziliensis*) y que además su expresión es diferente entre las especies de *Leishmania*. Si se consideran las funciones que se han descrito para el canal CLC el cual se ha encontrado acoplado a la bomba H^+- ATPasa tipo P se ha inferido que en *Leishmania* esta proteína puede ayudar a mantener electroneutralidad, debido a que disiparía el potencial de membrana generado por la activación de la bomba; además de mantener un gradiente electroquímico que favorezca la entrada de nutrientes. También podría contribuir de manera significativa a ajustar el Vm en el parásito para la toma de nutrientes y acumulación de aminoácidos requeridos para el proceso de osmoregulación. Se ha sugerido, que en los amastigotes la expresión de co-transportadores $H+/Cl^-$ podrían contribuir al flujo de salida de protones, aliviando los cambios de pH y concentrando Cl^- y otros iones importantes

4. Capítulo 4: Expresión de proteínas en macrófagos infectados con *L. amazonensis*

El fenómeno eléctrico descrito por nuestro grupo que caracteriza el impacto de la infección de *Leishmania* sobre las propiedades eléctricas de macrófagos infectados, y el cambio en el perfil de expresión de la proteína Kir2.1 entre macrófagos no infectados e infectados, muestran que la infección tiene un perfil de proteínas diferente al del macrófago no infectado. En este capítulo se estudia el cambio en el perfil de expresión de proteínas entre un macrófagos no infectado e infectado con *L. amazonensis* mediante electroforesis en una dimensión SDS-PAGE y electroforesis bidimensional (2DE; IEF-SDS PAGE).

4.1 Perfil de proteínas en una dimensión (1D SDS-PAGE)

4.1.1 Expresión diferencial de proteínas en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis*

Muchos estudios proteómicos centrados en la infección por *Leishmania* han considerado una serie de aspectos relacionados con la biología del parásito incluyendo la diferenciación del parásito, los mecanismos de resistencia a los medicamentos y la identificación de proteínas inmunogénicas para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, los eventos relacionados con la interacción *Leishmania*-hospedero han recibido poca consideración (Menezes et al., 2013). Por lo tanto, en esta parte del estudio el objetivo es realizar un primer acercamiento hacia la caracterización de la interacción mediante la descripción del cambio en el perfil de expresión de proteínas de macrófagos J774A.1 después de 48 horas de infección con *L. amazonensis*, utilizando la electroforesis 1D SDS-PAGE como técnica clásica de separación y análisis de proteínas.

Extractos de proteína soluble de macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis*, fueron separados por electroforesis SDS-PAGE teniendo en cuenta las siguientes condiciones experimentales: **1**) diferentes porcentajes del gel separador 6%, 8% y 12%, **2**) tratamiento de las muestras bajo condiciones desnaturalizantes – reducción y **3**) igual cantidad de proteína en los pozos.

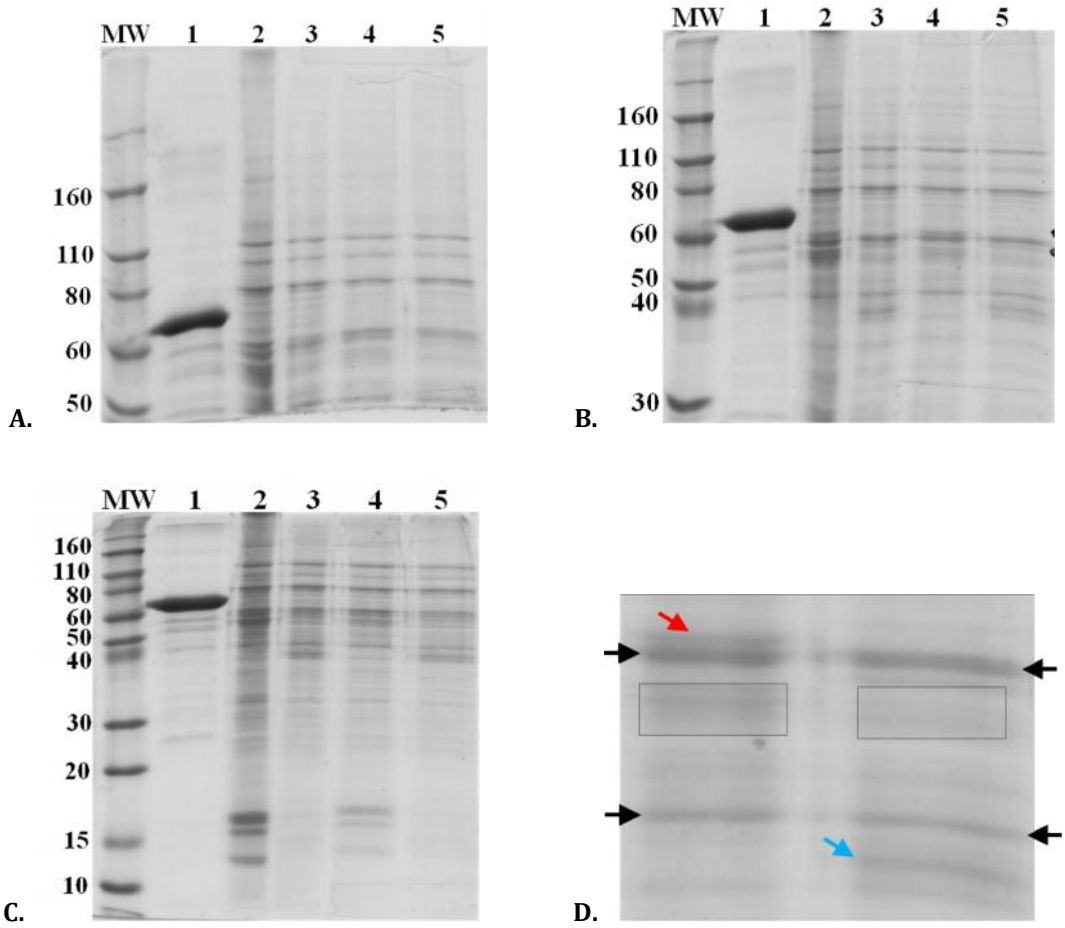
Los perfiles electroforéticos en la Figura 4-1, muestran que como era de esperarse dependiendo del porcentaje del gel separador se obtienen diferentes perfiles de proteínas para una misma muestra. En el gel separador la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros utilizada para preparar el gel. Así, si se requiere resolver componentes de alto PM, se utilizan geles entre 5% - 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ej. 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10-90KDa. Es importante mencionar que la introducción de una proteína pura de peso molecular conocido (en este caso albúmina de suero bovino BSA) facilita la ubicación de las bandas del marcador, ya que estas corren de forma diferente dependiendo del porcentaje del gel.

Para las muestras, el separador de 6% (Figura 4-1 A) resuelve mejor proteínas de peso molecular alto, mientras que un gel separador de 12% (Figura 4-1 C) lo hace para proteínas de peso molecular bajo. También se observa que seleccionar un porcentaje adecuado del gel separador, permite visualizar para un rango de peso molecular de interés una mayor cantidad de bandas de proteínas.

En las condiciones de separación de este experimento las proteínas más abundantes en los extractos solubles se encuentran en la región de peso molecular comprendida entre 40-110KDa, en la cual al comparar los perfiles electroforéticos entre macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48hpi se evidencian las siguientes características: 1) en gran proporción hay bandas que se encuentran tanto en el macrófago NI como en el macrófago 48 hpi (algunos ejemplos se señalan con flechas negras en la Figura 4-1 D); 2) hay bandas que se encuentran en el macrófago NI y no en el macrófago 48 hpi (un ejemplo se señala con una flecha roja en la Figura 4-1 D); y viceversa (un ejemplo se señala con una flecha azul en la Figura 4-1 D) y 3) hay bandas cuya intensidad cambia (algunos ejemplos se muestran en el

recuadro negro en la Figura 4-1 D). Una de estas características es muy notable en el gel separador de 12% (Figura 4-1 C) en la región de peso molecular comprendida entre 10 y 20 KDa, donde tres bandas sólo están presentes en el macrófago NI.

Figura 4-1: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína soluble para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis*, en diferentes porcentajes de gel separador. **A.** Gel separador 6%, **B.** Gel separador 8%, **C.** Gel separador 12%. **D.** Ampliación de la región entre 40-60KDa del gel separador 8%. **MW** (KDa). Marcador; **1.** BSA 69 KDa; **4.** Macrófago NI – tto. desnaturalización-reducción; **5.** Macrófago 48 hpi tto. desnaturalización-reducción. 5ug proteína/pozo.



Las características anteriores están de acuerdo con lo esperado, ya que las dos muestras son diferentes, además son evidencia experimental de que hay cambio en el perfil de proteínas entre un macrófago NI y un macrófago infectado con *L. amazonensis*.

A pesar de las diferencias encontradas en los extractos de proteína soluble, el siguiente ensayo fue dirigido hacia la comparación entre los extractos de proteína total del macrófago

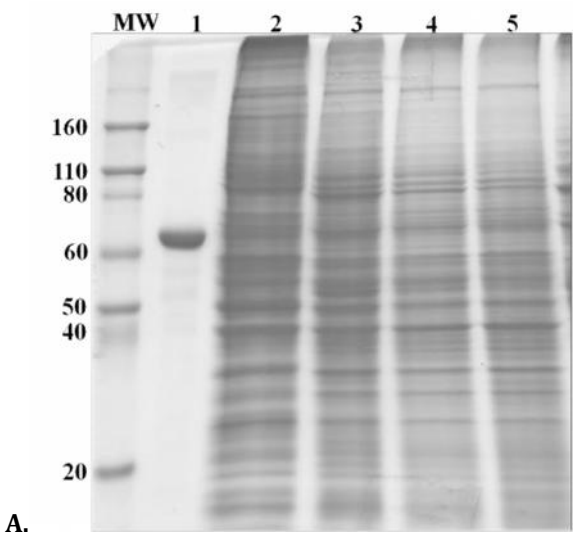
J774A.1 NI y el macrófago J774A.1 a diferentes tiempos de infección con *L. amazonensis*: 24hpi, 48hpi y 72hpi, porque en estos extractos se tiene mayor representación proteínas de bajo y alto peso molecular, en donde además de las citoplasmáticas es posible encontrar las de membrana. Los extractos de las diferentes muestras fueron obtenidos siguiendo el protocolo con buffer RIPA II (Anexo B -Protocolo 2). Los extractos obtenidos fueron cuantificados y posteriormente separados en una electroforesis 1D SDS-PAGE cargando la misma cantidad de proteína.

Es interesante notar que al comparar el perfil electroforético correspondiente al macrófago NI con los perfiles electroforéticos del macrófago a diferentes tiempos de infección con *L. amazonensis* hay un cambio en el perfil de las proteínas detectadas (Figura 4-2 A). El cambio a simple vista más notorio ocurre en la zona de proteínas de alto peso molecular, por encima de 110KDa, donde se observa disminución en la intensidad de muchas bandas que son detectadas con una mayor intensidad en macrófagos NI y que sugiere disminución de su expresión.

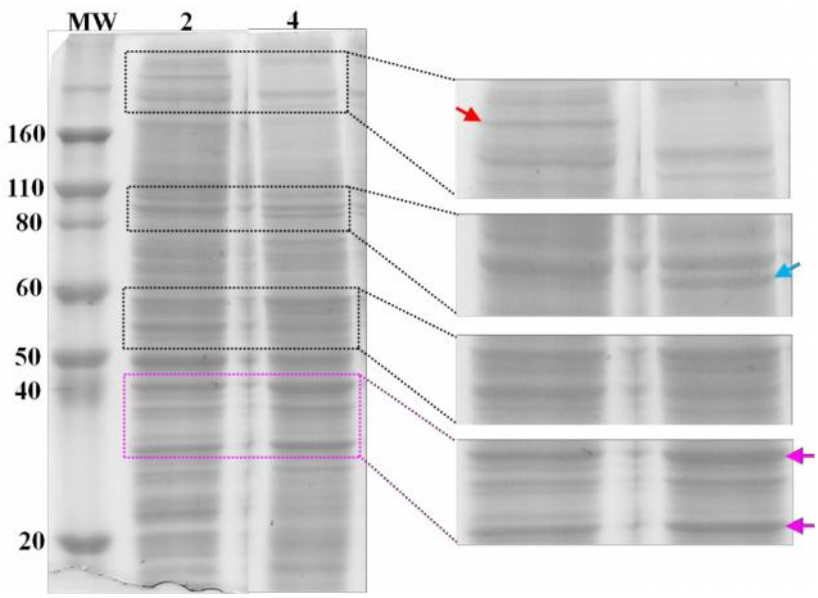
Al comparar los perfiles electroforéticos entre el macrófago NI y el macrófago 48hpi utilizando menor cantidad de proteína, para mejorar la resolución de las bandas, se evidencian tres características: 1) los perfiles de proteínas son similares, en gran proporción hay bandas de proteínas que se encuentran tanto en el macrófago NI como en el macrófago 48 hpi (algunos ejemplos se muestran en el recuadro ampliado sin flechas en la Figura 4-2 B); 2) hay bandas de proteínas que se encuentran en el macrófago NI y no en el macrófago 48 hpi (un ejemplo se señala en el recuadro ampliado con una flecha roja en la Figura 4-2 B) y viceversa (un ejemplo se señala en el recuadro ampliado con una flecha azul en la Figura 4-2 B) y **3**) hay bandas de proteínas cuya intensidad aumenta o disminuye en el macrófago 48 hpi (algunos ejemplos se señalan en el recuadro violeta ampliado con las flechas violeta en la Figura 4-2 B).

Todas las anteriores características están relacionadas con cambios en el nivel de expresión de las proteínas y por lo tanto, son evidencia experimental de la expresión diferencial de proteínas entre un macrófago NI y un macrófago infectado con *L. amazonensis*, en donde el perfil de proteínas del macrófago infectado podría estar representando la respuesta del macrófago y del parásito a la infección.

Figura 4-2: Gel SDS-PAGE de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 a diferentes tiempos de infección con *L. amazonensis*. Gel separador 10%. **A.** 40ug proteína/pozo. **B.** 20ug proteína/pozo. **MW** (KDa). Marcador; **1.** BSA 69KDa; **2.** Macrófago NI; **3.** Macrófago 24hpi; **4.** Macrófago 48hpi; **5.** Macrófago 72hpi.



A.



B.

4.2 Perfil de proteínas en dos dimensiones (2DE-IPG-SDS-PAGE)

4.2.1 Expresión diferencial de proteínas en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis*

Los estudios a gran escala han sido fundamentales para la identificación de nuevas funciones y redes de genes o de proteínas y para lograr un entendimiento más amplio de las respuestas de las células y/u organismos a una variedad de estímulos. Adicionalmente, estos estudios abren la posibilidad hacia la identificación de nuevos blancos para vacunas y estrategias terapéuticas. Cabe destacar, que entre las metodologías a gran escala, el análisis de la expresión de las proteínas es esencial, porque la identificación de ARN mensajero utilizando el análisis de microarreglos no siempre se corresponde con los niveles de expresión de proteínas. El análisis proteómico, es frecuentemente más apropiado para el estudio de los cambios en el perfil de expresión de genes correspondientes a una condición particular, como un estado de la enfermedad o la presencia de un patógeno en particular. (List et al., 2008).

En el campo de la proteómica la electroforesis bidimensional (2DE) es una técnica importante porque permite la separación de cientos de proteínas simultáneamente y es ampliamente utilizada para el análisis de mezclas complejas de proteínas extraídas de células, tejidos u otras muestras biológicas. Esta técnica separa las proteínas de acuerdo con dos propiedades independientes de las proteínas en dos pasos. En la primera dimensión, el isoelectroenfoque (IEF), las proteínas son separadas de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI) sobre un gel con gradiente inmovilizado de pH (tiras IPG) y en la segunda dimensión, la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), las proteínas son separadas de acuerdo a su peso molecular (O'Farrell, 1975). Cada *spot* en el gel de dos dimensiones corresponde a al menos una proteína. La técnica también es única en su capacidad para detectar las modificaciones post-traduccionales, que no se pueden predecir a partir de la secuencia del genoma. Sus aplicaciones incluyen el análisis de proteomas, la diferenciación celular, la detección de marcadores de una enfermedad, el descubrimiento de drogas, investigación en cáncer, entre otras.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la comparación de los perfiles de proteínas en una dimensión, se decidió utilizar la electroforesis bidimensional (2DE) como herramienta metodológica para generar los mapas proteómicos y realizar un mejor acercamiento hacia la caracterización de la interacción mediante la descripción del perfil de expresión de proteínas de macrófagos J774A.1 después de 48 horas de infección con *L. amazonensis*. Este tiempo de infección se seleccionó por el volumen de la VP y su comportamiento durante la purificación, además de que estudios proteómicos posteriores en el grupo se realizarán sobre la membrana de la vacuola parasitófora formada después de este tiempo de infección.

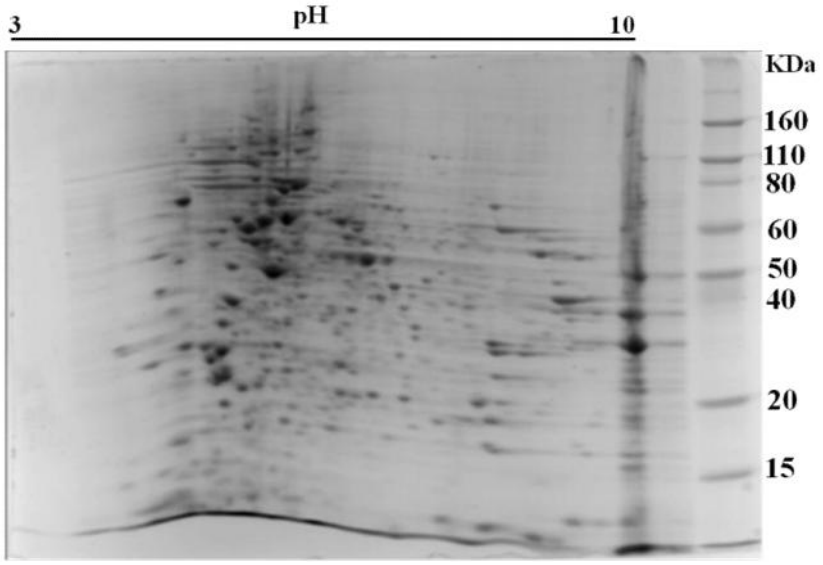
Los resultados de los experimentos aquí descritos fueron obtenidos bajo supervisión del Grupo de Investigación en Hormonas dirigido por la Dr. Myriam Sánchez, departamento de Química, Universidad Nacional – Sede Bogotá dentro del marco del Proyecto Camacho M, Sánchez M, Gómez MP, Stühmer W. (2010) "Estudios de la membrana de la vacuola parasitófora de *Leishmania*" (519-2010 Banco proyectos Salud - Nacional Colciencias, 222851928951, Código Hermes 13002).

Los extractos de proteína total para el macrófago J774A.1 NI y el macrófago J774A.1 48hpi con *L. amazonensis* obtenidos con el buffer RIPA (Anexo B - Protocolo 2) fueron separados por electroforesis bidimensional siguiendo el protocolo descrito en el Anexo C - Protocolo 2. Inicialmente se utilizaron tiras IPG de pH 3-10 con el fin de obtener un panorama global de los proteomas de las muestras. Las imágenes de los geles fueron obtenidas con el documentador VersaDoc™ (BioRad). La Figura 4-3 muestra el perfil proteómico de las muestras.

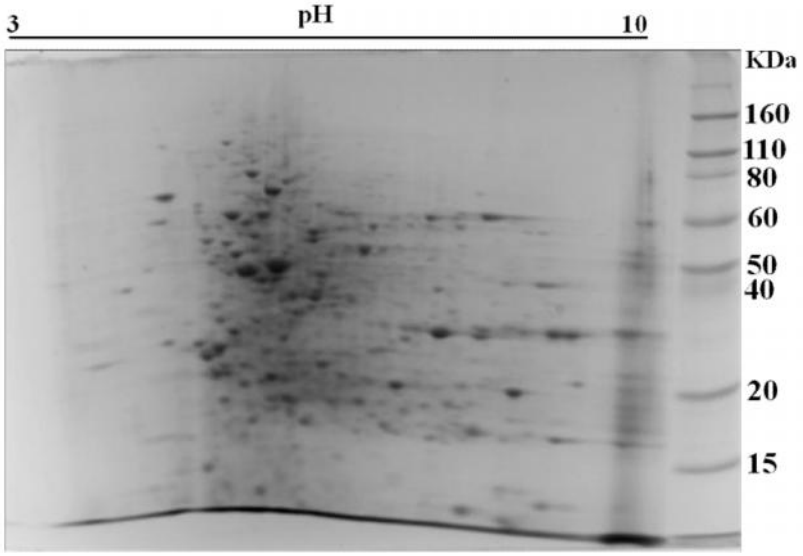
La metodología descrita para llevar a cabo la separación de las proteínas presentes en el extracto total de las muestras genera mapas proteómicos con buena representación y resolución de los *spots* de proteínas, porque pueden visualizarse puntos definidos los cuales parecen estar concentrados en una región de pI (Figura 4-3). También se pueden observar rayas horizontales (*horizontal streaking*) que acompañan algunos de los *spots*; esta característica es más notoria en el mapa proteómico del macrófago J774A.1 en la región de pH básico (Figura 4-3 A). Las causas se atribuyen a sub-focalización por tiempo de enfoque insuficiente, presencia de sustancias interferentes, impurezas o presencia de detergentes

iónicos; si el detergente SDS es usado en la preparación de la muestra su concentración final no debe exceder 0,25% después de la dilución en el buffer de rehidratación. Además, la relación detergente no iónico (CHAPS) detergente iónico debe ser mínimo 8:1 para asegurar eliminación completa de SDS de la proteína (2-D Electrophoresis GE Healthcare, 2004).

Figura 4-3: Geles 2D de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48hpi con *L. amazonensis*. **A.** Macrófago J774A.1 NI; **B.** Macrófago J774A.1 48hpi con *L. amazonensis*. 200ug Proteína/tira. Tiras IPG de 7cm pH 3-10 y gel separador 10%.



A.



B.

Aunque a primera vista la resolución de la electroforesis 2D parece impresionante, esta no representa la enorme diversidad de proteínas presentes en los proteomas de los eucariotas

superiores, en donde las modificaciones post-traduccionales y el procesamiento de empalme (*splicing)* diferencial del RNA, generan la expresión de un número mayor de proteínas que el número total de genes en sus genomas. Con muestras como los lisados totales de células, la electroforesis 2D resuelve sólo un pequeño porcentaje de todo el proteoma cuando se utilizan gradientes de pH de rango amplio (tiras IPGs 3-12). Se prefiere entonces, el uso de tiras IPGs con rangos más estrechos de pH (zoom en geles, por ejemplo, tiras IPGs 4-9, o 4-7) y/o ampliar la distancia de separación (tiras de hasta 24cm o incluso más) para mejorar la resolución, y en donde se reduzca la presencia de más de una proteína por *spot*, se mejore el análisis de la imagen, se logre la identificación inequívoca de las proteínas y sea posible la aplicación de una mayor cantidad de proteína para la detección de componentes de menor representación en el proteoma (Görg et al., 2004).

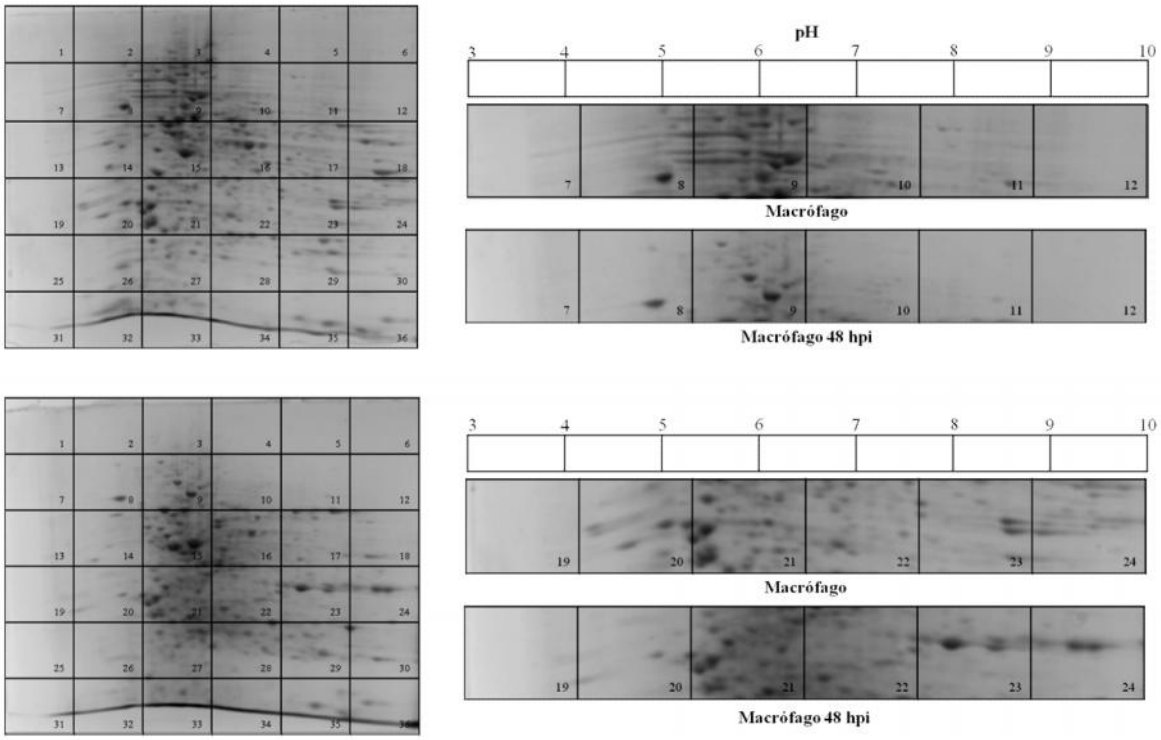
Por tanto dadas las diferencias en la expresión de las proteínas que se observan se decidió ampliar la región de pH de 5 a 8. La comparación manual permite observar cualitativamente un comportamiento diferente en cuanto al perfil de expresión de proteínas entre las muestras (Figura 4-4).

Para el isoelectroenfoque que se realizó en tiras IPG de 7cm, pH 5-8 (Bio-Rad), se mezcló un volumen correspondiente a 600µg de proteína para cada una de las muestras con un volumen de buffer de rehidratación necesario para llegar a un volumen total de 375µL, con el fin de realizar triplicado de las muestras sembrando 200ug de proteína/tira para cada una y verificar la reproducibilidad del método. Se siguió en mismo protocolo descrito en el Anexo C - Protocolo 2. Las imágenes de los 6 geles fueron obtenidas con el documentador VersaDoc™ (BioRad); para una mejor visualización de las imágenes dirigirse al CD adjunto a este documento que las contiene en formato digital en la carpeta Imágenes 2D rango de pH 5-8.

La Figura 4-5 muestra el perfil proteómico de las muestras y sus réplicas, en donde se observa un comportamiento similar del perfil de expresión entre replicas de una misma muestra lo que indica reproducibilidad del protocolo seguido para la electroforesis bidimensional. Se observa también buena resolución en la separación de las proteínas porque pueden visualizarse como puntos definidos (*spots*). Con el fin de dirigir la lectura de este análisis se hará referencia a las réplicas de las muestras con los nombre mostrados en la parte inferior de cada gel en la Figura 4-5.

Dentro del protocolo de la electroforesis bidimensional llevado a cabo en este estudio se planteó inicialmente que la reproducibilidad del método iba a verse afectada por la segunda dimensión, principalmente en la corrida de los geles dentro de la cámara, ya que se tenían disponibles dos cámaras cada una con capacidad de cuatro geles para las 6 muestras, por lo que fue necesario correr 4 de ellas en una de las cámaras (macrófago 1 y 2 e infección 1 y 2 en la Figura 4-5) y 2 en la otra (macrófago 3 e infección 3 en la Figura 4-5). Como las imágenes muestran un comportamiento similar del perfil de expresión entre las réplicas es posible afirmar que esta variable experimental no afectó la reproducibilidad del método.

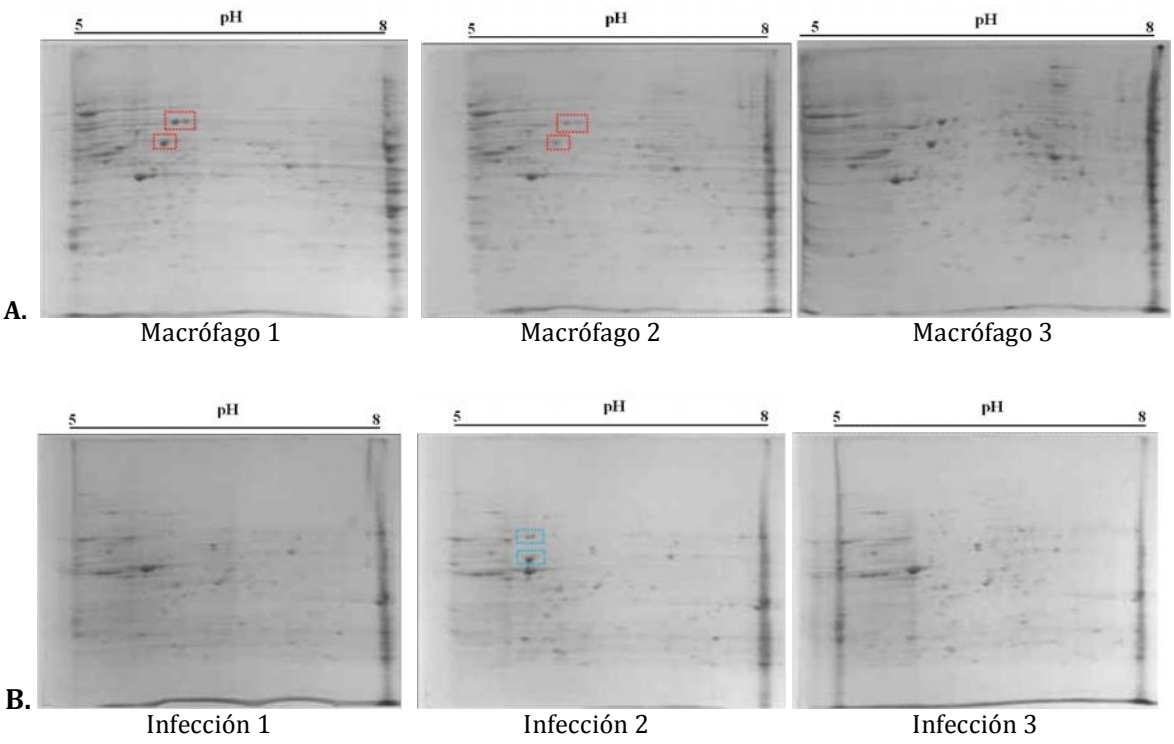
Figura 4-4: Comparación manual entre los mapas proteómicos del macrófago J774A.1 y el macrófago J774A.1 48hpi con *L. amazonensis* para la selección del rango de pH. Los geles aquí utilizados son los que se muestran en la Figura 4-3. En la parte derecha se muestra la ampliación de dos regiones de la cuadrícula dibujada sobre cada uno de los geles. La barra por encima de estas regiones corresponde a la división de la zona de pH 3-10 de la tira IPG utilizada, para ubicar las zonas correspondientes a los valores de pH mostrados en la barra y que se encuentran dentro del rango.



A pesar de la similaridad entre los perfiles de las réplicas, dos características son notables al observar los diferentes perfiles proteómicos, la primera se observa en las réplicas del macrófago J774A.1, macrófago 1 y 2 muestran un diferencia clara en la intensidad de los *spots* de proteínas señalados con los recuadros rojos en la Figura 4-5, cómo los perfiles corresponden a la misma muestra esta diferencia se atribuye a cantidad de proteína

adicionada en los carriles de la cámara de focalización, que puede estar asociada a errores de pipeteo por parte del experimentador. La segunda característica se observa en las réplicas del macrófago J774A.1 48hpi con *L. amazonensis*, la infección 2 muestra presencia de dos *spots* de proteínas señalados con los recuadros azules en la Figura 4-5 que no se evidencian en las otras dos réplicas, y se atribuye a contaminación presente en la cámara de focalización.

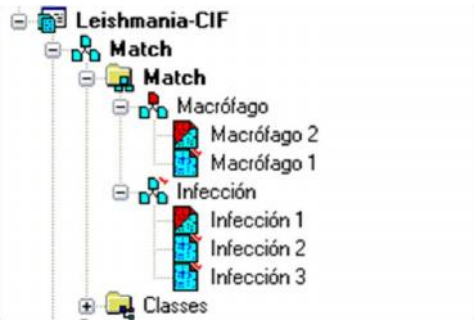
Figura 4-5: Geles 2D de los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 NI y macrófagos J774A.1 48hpi con *L. amazonensis* en la región ampliada de pH 5-8 y sus réplicas. **A.** Macrófago J774A.1 NI; **B.** Macrófago J774A.1 48hpi con *L. amazonensis*. 200ug Proteína/tira. Tiras IPG de 7cm pH 5-8 y gel separador 10%.



El análisis de las imágenes de los geles mostrados en la Figura 4-5 fue realizado en el programa Melanie 7.0 (*Swiss Institute of Bioinformatics*). Este programa hace uso de un sistema de jerarquías que permiten el emparejamiento y alineamiento entre imágenes de muestras corridas bajo las mismas condiciones experimentales (réplicas técnicas) hasta muestras bajo diferentes condiciones experimentales (diferente condición biológica). Inicialmente, las imágenes fueron seleccionadas, cargadas al programa y asignadas al proyecto llamado *Leishmania*-CIF. Dentro del proyecto, se establecieron las siguientes dos jerarquías: cada réplica perteneciente a la misma muestra (réplica técnica para macrófagos

J774A.1 NI o macrófagos J774A.1 48hpi con *L. amazonensis*) se asignó a la primera jerarquía (la menor), mientras que la segunda jerarquía se asignó a la diferencia entre la condición biológica de las muestras (macrófagos J774A.1 no infectados e infectados). Estas jerarquías se muestran en la Figura 4-6.

Figura 4-6: Jerarquías para el análisis de imágenes en Melanie 7.0

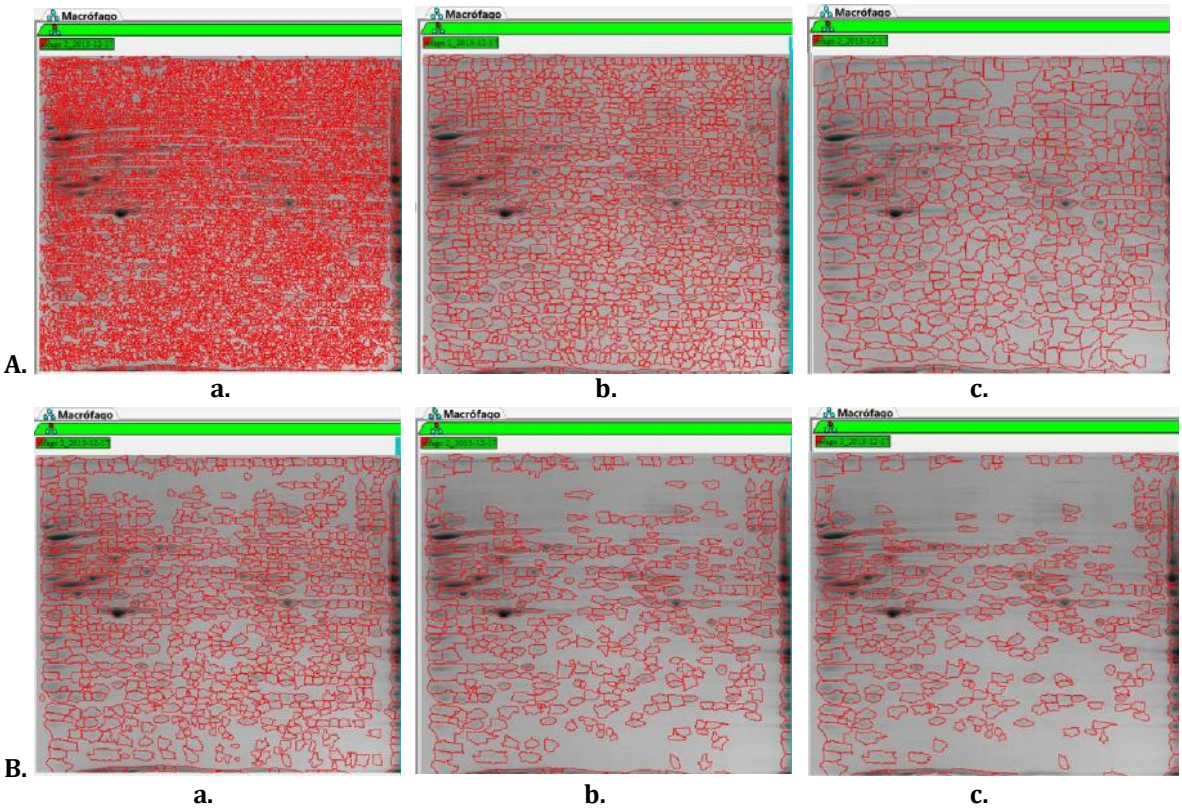


Posteriormente se detectaron los *spots* realizando modificación de cada uno de los siguientes parámetros usados por el programa para este proceso: 1) *Smooth*, este valor fija el número de veces que el programa suaviza la imagen antes de detectarlos, y debe ser optimizado para detectar todos los *spots* reales y dividir la mayor cantidad de *spots* superpuestos, evitando ruido que se filtra con los siguientes parámetros: 2) *Saliency*, este parámetro se basa en la curvatura del *spots* e indica que tanto se destaca de su ambiente. Los *spots* reales tienen valores altos de este parámetro mientras que artefactos y ruido de fondo tienen valores bajos. Aunque este parámetro filtra eficientemente *spots*, depende en gran medida de la calidad de la imagen y 3) Área mínima, después de establecer un valor adecuado para Saliency y filtrar todos los *spots* ruido, aún puede haber ruido en el gel que no puede ser eliminado sin suprimir *spots* reales, esto sucede a menudo con las partículas de polvo que se componen de unos pocos píxeles muy oscuros. Estos artefactos pueden eliminarse mediante el parámetro de área mínima. Se eliminan los *spots* que tienen un área menor que el límite dado (expresado en número de píxeles).

Inicialmente se determinó el valor de *Smooth*, luego el *Saliency* y por último el de área mínima, hasta encontrar la combinación de valores que permitiera la detección del mayor número de *spots* reales con el menor ruido de fondo. La Figura 4-7 muestra cómo la

variación en el valor del *Smooth* y *Saliency* afectan la detección de *spots*, mientras los demás parámetros permanecen constantes.

Figura 4-7: Efecto de la variación en el valor de los parámetros usados por el programa para la detección de *spots*. La misma imagen. **A.** Variación del *Smooth*: **a.** *Smooth* 2; **b.** *Smooth* 5; **c.** *Smooth* 9, los otros dos parámetros permanecen fijo (*Saliency* 1, Área mínima 5). **B.** Variación de *Saliency*: **a.** *Saliency* 20; **b.** *Saliency* 80; **c.** *Saliency* 120, los otros dos parámetros permanecen fijo (*Smooth* 5, Área mínima 5).



Los valores seleccionados para los parámetros de detección de *spots* fueron: *Smooth* 5, *Saliency* 80 y área mínima 5. Después de la detección automática de *spots* fue necesario hacer una revisión manual para eliminar *spots* ruido remanentes, como los detectados en los bordes de los geles o burbujas que quedaron en el momento de adquirir la imagen con el documentador. En la Tabla 4-1 se muestra la cantidad de *spots* detectados para cada una de las réplicas de las muestras.

Tabla 4-1: Cantidad de *spots* detectados en las imágenes de las réplicas de las muestras. Parámetros de detección *Smooth* 5, *Saliency* 80 y área mínima 5.

Imagen	Cantidad de *spots* detectados
Macrófago 2	211
Macrófago 1	199
Infección 1	179
Infección 2	182
Infección 3	172

Antes de continuar con el proceso del emparejamiento de imágenes, fueron seleccionados dos *spots* como marca (*landmark*; señalados en la Figura 4-8 con el número 1 y 2 dentro de recuadros verdes). Estos *spots* deben ser puntos pequeños, intensos y encontrarse en zonas que no presenten distorsión en la separación, y deben estar presentes en todas las imágenes para facilitar el emparejamiento de imágenes entre réplicas. Además, se seleccionó la imagen de referencia para cada grupo de muestras, el macrófago 2 para las réplicas del macrófago y la infección 1 para las réplicas de la infección. La imagen de referencia para el emparejamiento debe tener *spots* bien separados, no presentar distorsiones en el gel, pocas rayas y la mayor cantidad de *spots* reales detectados. Estas características sobresalen en las réplicas seleccionadas como imágenes de referencia (ver Figura 4-5 y Tabla 4-1). El algoritmo de emparejamiento siempre comienza desde la imagen de referencia y mira para cada *spot* en esta referencia si el spot correspondiente se encuentra en las otras imágenes.

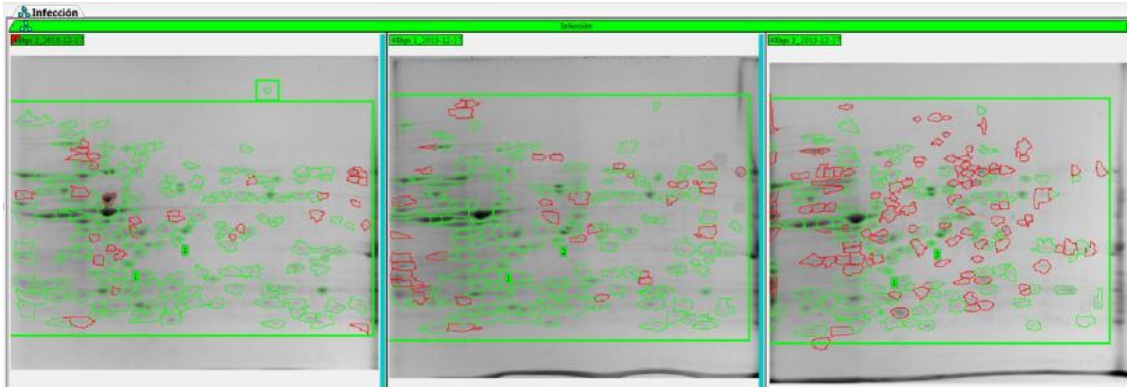
Teniendo todos los parámetros anteriores establecidos para todas las imágenes, se realizó el emparejamiento (*match*) automático en cada una de las dos jerarquías, que requirió curación manual del mismo utilizando las herramientas del programa. La Figura 4-8 muestra un ejemplo del efecto de la curación manual sobre el emparejamiento automático para las réplicas de la infección y la Tabla 4-2 el resultado final del mismo.

Una vez realizado el emparejamiento de imágenes en cada una de las dos jerarquías del proyecto se dio paso al análisis de datos. El análisis de datos para estudiar variaciones en la expresión de proteínas entre una serie de geles puede realizarse en dos niveles: 1) Análisis de geles, en el cual se estudian los cambios de expresión de proteínas dentro de un set de geles sin tener en cuenta las poblaciones y 2) Análisis de clases, para encontrar cambios significativos en la expresión de proteínas entre poblaciones de geles (clases). En el análisis de datos se compara un valor cuantitativo que caracteriza un *spot* entre geles, el cual puede

ser de intensidad, área, volumen o volumen relativo (%Vol). Para este análisis fue seleccionado el %Vol porque es un valor normalizado que se mantiene relativamente independiente de las variaciones debidas a la carga de proteína o el método de tinción al considerar el volumen total sobre todos los *spots* de la imagen.

Figura 4-8: Efecto de la curación en el emparejamiento automático de las réplicas para la infección. **A.** Emparejamiento automático de replicas; **B.** Emparejamiento de replicas después de la curación manual. El color verde indica los *spots* que fueron apareados mientras el color rojo indica los *spots* que no.

A.



B.

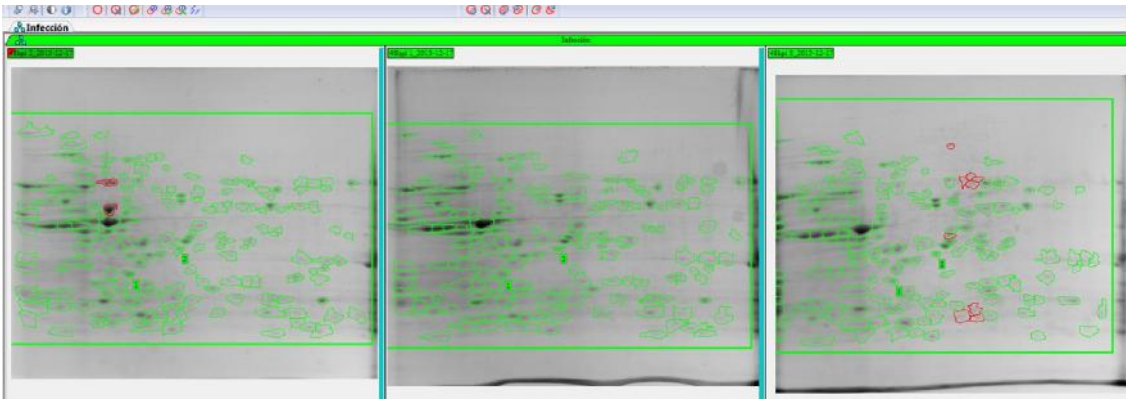


Tabla 4-2: Resultado final del emparejamiento entre imágenes de réplicas

Grupo	Imagen	% *Spots* apareados
Macrófago	Macrófago 2	86
	Macrófago 1	100
Infección	Infección 1	99
	Infección 2	97
	Infección 3	94

Para el análisis de geles del emparejamiento de la segunda jerarquía (diferente condición biológica) se usó el Análisis Factorial, una de las herramientas estadísticas que proporciona el programa. La herramienta de análisis factorial se utiliza para examinar las interrelaciones entre un gran número de variables (es decir, los valores de un *spot* para una serie de geles) y para explicar estas relaciones (por ejemplo, poblaciones de geles) en términos de factores subyacentes comunes (o asociaciones con modelos específicos de *spots*), en otras palabras, determinar la correlación de las imágenes analizadas.

En la gráfica del análisis factorial (Figura 4-9) se observa que los geles pertenecientes a cada grupo se encuentran alejados entre sí, es decir, mostrando una estratificación entre el grupo macrófago y el grupo infección, lo que evidencia que el perfil proteómico entre los dos grupos es estadísticamente diferente. Por otro lado, la gráfica muestra que los geles pertenecientes a cada grupo se encuentran agrupados mostrando que representan una misma población; también se observa que son muy próximos entre sí, lo que da certeza sobre la reproducibilidad del método porque el agrupamiento de las réplicas demuestra que presentan un comportamiento similar. Esto se ratifica con los resultados mostrados en la Tabla 4-2, porque las imágenes pertenecientes a una mismo grupo muestran una alta correlación entre ellas (≥85% de emparejamiento entre réplicas). Queda en evidencia que el análisis de datos permitió la verificación de la reproducibilidad del método utilizando herramientas estadísticas, apoyando la comparación cualitativa previa.

Teniendo certeza de la reproducibilidad del método y de la presencia de dos grupos cuyo perfil proteómico es estadísticamente diferente, se dio paso finalmente al análisis de clases, para encontrar cambios estadísticamente significativos en la expresión de proteínas entre las poblaciones de geles (clases). Las clases establecidas fueron dos: clase macrófago y clase infección. El resultado del análisis de clases de geles se muestra en forma de tabla en el Anexo D. Con el objetivo de revisar los *spots* de proteínas más interesantes se usó el test estadístico, Análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en ingles). La prueba paramétrica Análisis de varianza de una vía, evalúa la probabilidad de que las diferencias observadas entre dos muestras se deban al azar, se seleccionaron aquellos *spots* cuyo valor de p fuera inferior a 0,05. Estos resultados se muestran resaltados con color en gris en la tabla del Anexo D.

Figura 4-9: Gráfica del análisis factorial realizado al emparejamiento de la segunda jerarquía. La segunda jerarquía se asignó a la diferencia entre la condición biológica de las muestras, es decir, macrófagos J774A.1 no infectados y macrófagos J774A.1 infectados.

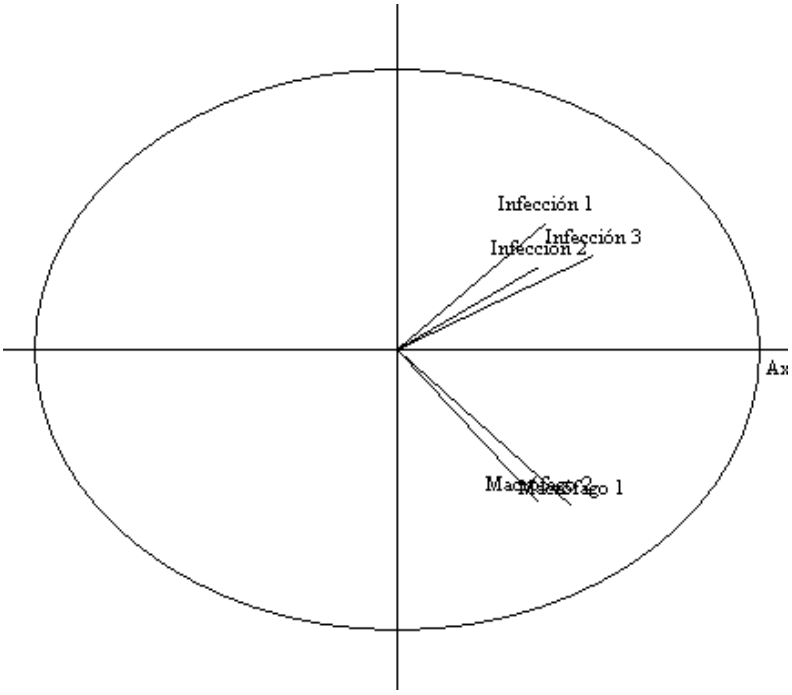
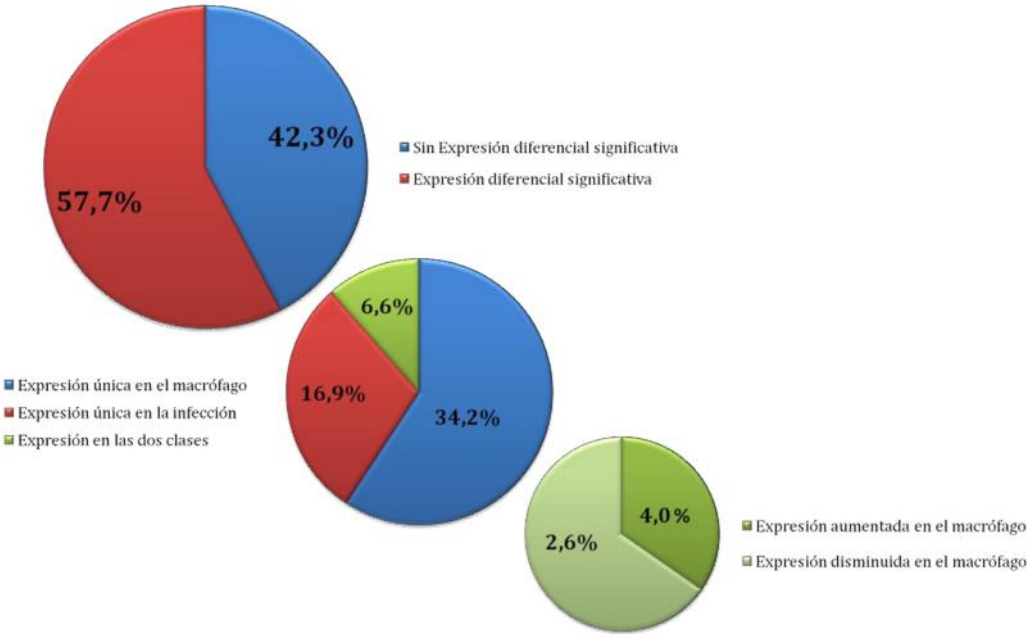


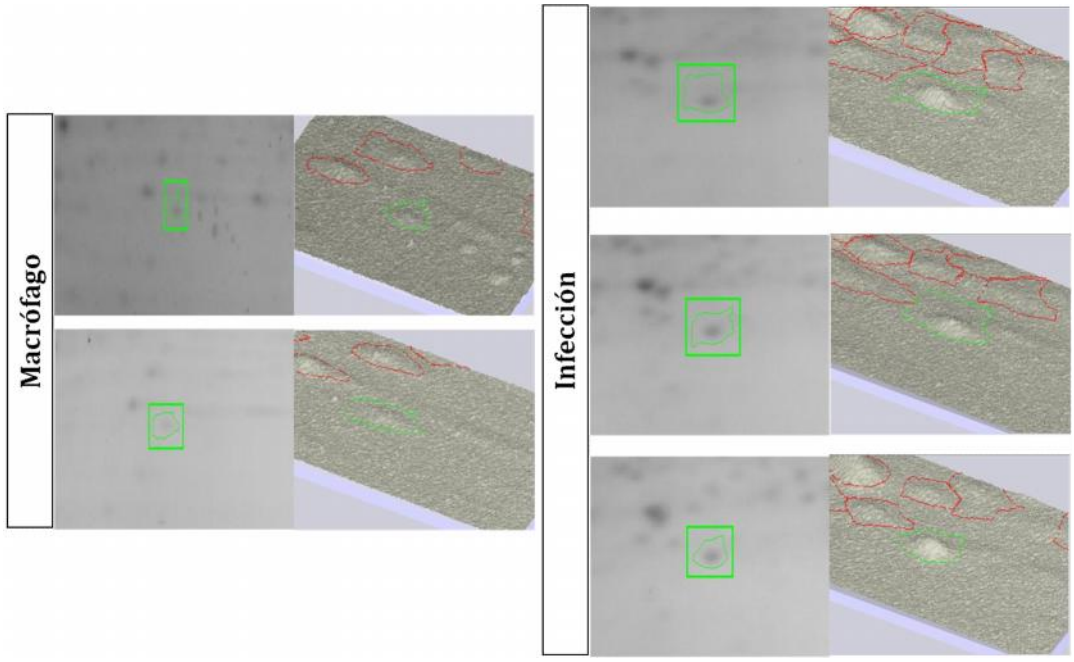
Figura 4-10: Representación en diagrama del emparejamiento entre de las dos clases.



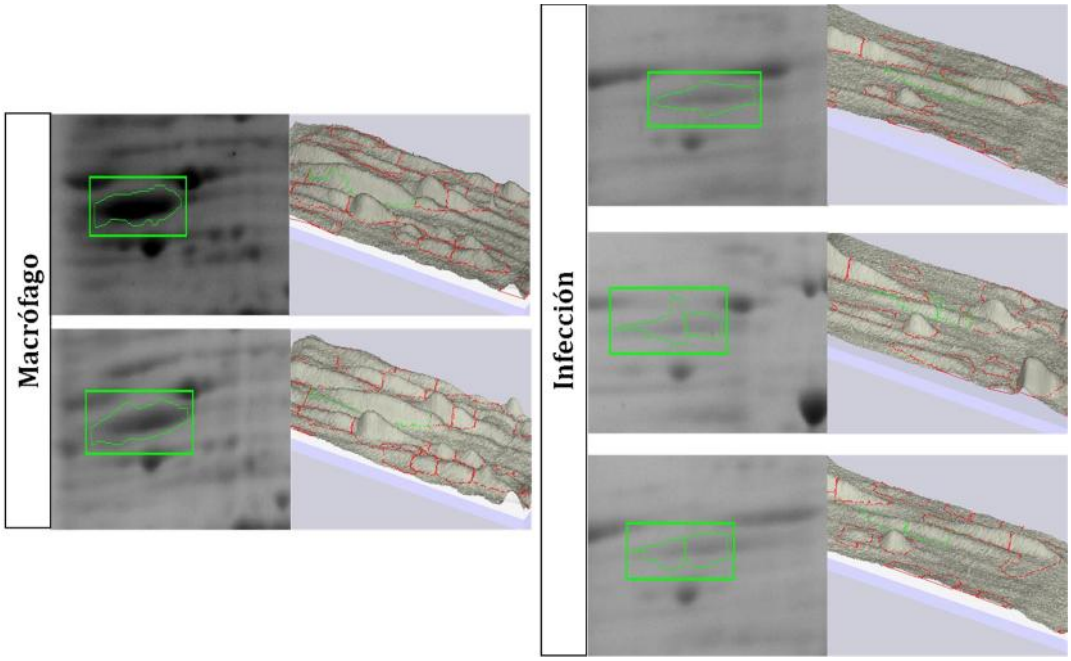
La cantidad de datos seleccionados con el test estadístico indican que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el 58% de los *spots* pareados (272 grupos en total) en el emparejamiento de la segunda jerarquía. Estas diferencias están relacionadas en mayor proporción con la expresión única de *spots* en alguna de las dos clases, 34,2% en el macrófago y 16,9% en la infección; y con cambios cuantitativos en el nivel de expresión de los *spots* compartidos por las dos clases, 6,6%. En estos cambios cuantitativos se encuentra que el 2,6% corresponde a *spots* cuyo nivel de expresión aumenta en el macrófago, mientras que el 4,0% restante son *spots* cuyo nivel de expresión disminuye en el macrófago. La Figura 4-10 muestra en diagrama esta la relación entre los *spots* pareados en las clases.

Algunos ejemplos de *spots* compartidos entre las clases y con expresión diferencial se muestran en la Figura 4-11.

Figura 4-11: Ejemplos de *spots* con expresión diferencial entre el grupo macrófago y el grupo infección. **A.** Match ID 15 (ANOVA 0,0301); **B.** Match ID 47 (ANOVA 0,0000134). En las imágenes, el color verde indica los *spots* que fueron apareados entre los dos grupos, se muestra también una vista 3D del *spot* para una mejor visualización de las diferencias de expresión.



A.



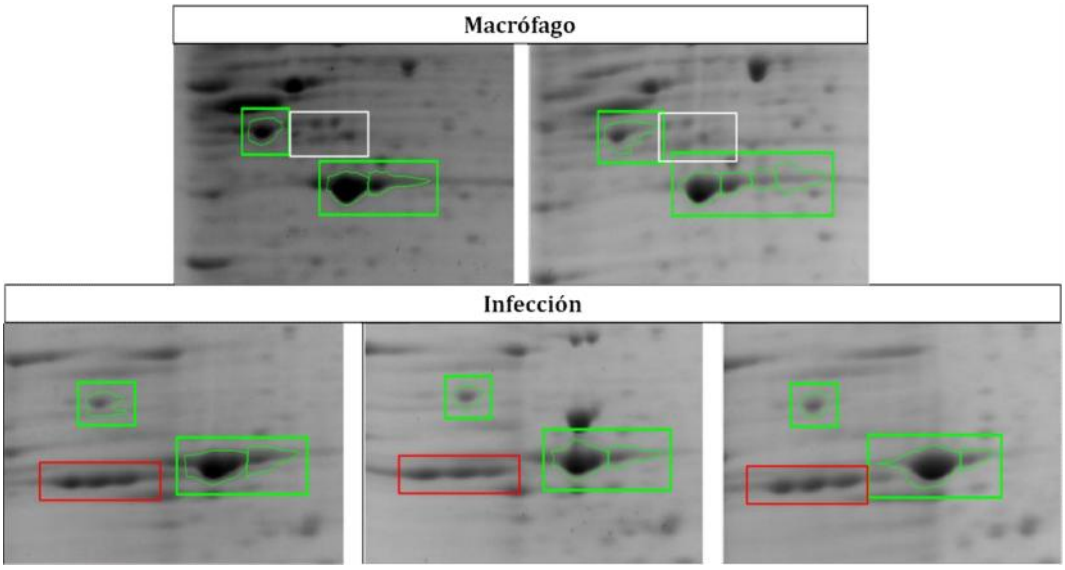
B.

Las diferencias mostradas anteriormente corresponden a cambios cuantitativos en los niveles de expresión de los *spots* que fueron apareados entre los dos grupos de muestras, sin embargo los perfiles proteómicos también permiten evidenciar *spots* que se encuentran en el macrófago no infectado pero no en infectados (un ejemplo se muestra en la Figura 4-12 A y C y viceversa (un ejemplo se muestra en la Figura 4-12 A, B y C)

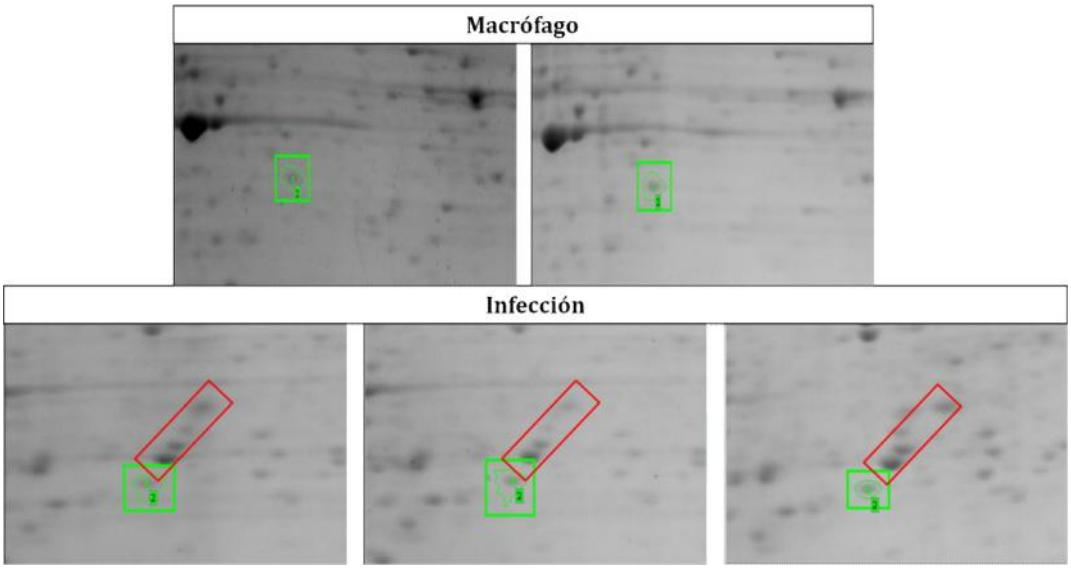
Los *spots* resaltados en la tabla del Anexo D se proponen como *spots* de proteínas interesantes para su identificación por espectrometría de masas en un estudio proteómico posterior del modelo, con el objetivo de establecer relación entre ellas y su posible papel en la interacción.

Todas las comparaciones anteriores se corresponden con las características mencionadas en las comparaciones de los perfiles de proteínas de macrófagos y macrófagos 48hpi realizadas en una dimensión. Por lo tanto, este estudio deja evidencia experimental de la diferencia en los proteomas del macrófago J774A.1 NI y el macrófago infectado con *L. amazonensis*, en donde las proteínas con expresión diferencial podrían estar representando la respuesta del macrófago y del parásito a la infección.

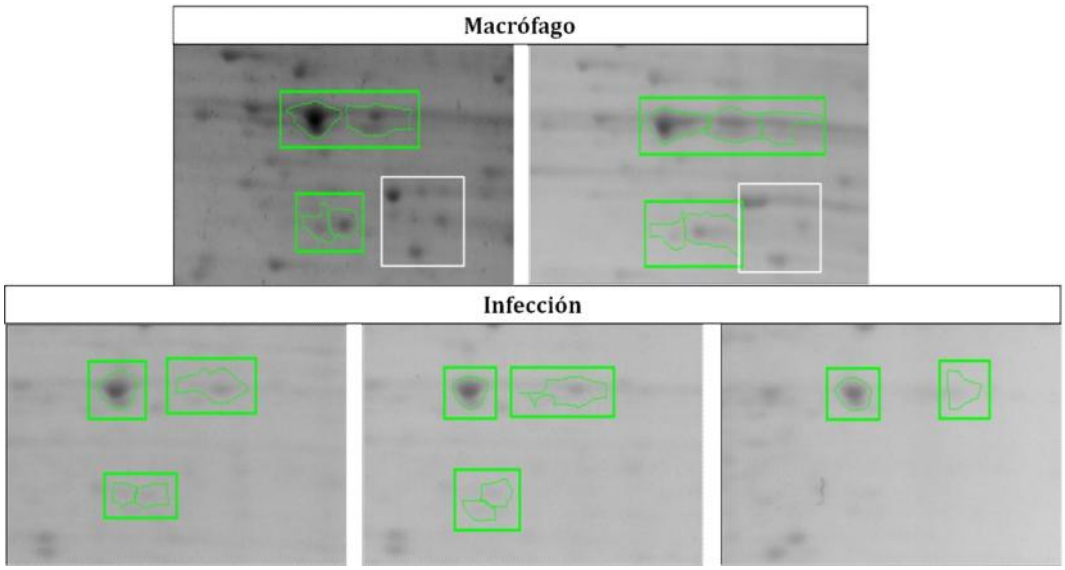
Figura 4-12: Ejemplos de *spots* expresados selectivamente en alguno de los dos grupos. En las imágenes, el color verde indica los *spots* que fueron apareados entre los dos grupos, el color rojo indica *spots* que se expresaron selectivamente en el grupo infección y en blanco *spots* que se expresaron selectivamente en el grupo macrófago.



A.



B.



C.

Menezes et al., 2013 reporta el primer estudio en el cual se evalúa la respuesta del macrófago a la infección por *Leishmania* empleando un análisis proteómico a gran escala. Utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) los niveles de expresión de proteínas en cultivos de macrófagos de ratón CBA no infectados e infectados después de 6 y 24 horas con *L. major* y *L. amazonensis* fueron evaluados. Basándose en los resultados obtenidos del análisis proteómico, se utilizó un análisis de redes biológicas para evaluar las distintas respuestas observadas en la infección de macrófagos CBA con las dos especies de *Leishmania*. Estos modelos de red revelaron que las proteínas con niveles elevados de expresión diferencial en macrófagos CBA pertenecen a una red biológica relacionada con el desarrollo celular y el metabolismo celular y podrían jugar un papel fundamental en la determinación del curso de la infección.

Sobre análisis proteómicos de expresión diferencial en macrófagos J774A.1 existen dos reportes en los cuales se evalúa la respuesta proteómica de esta línea celular de macrófagos de ratón después al tratamiento con la toxina letal de *Bacillus anthracis*, agente etiológico del ántrax: Chandra et al., 2005, utilizando electroforesis 2D y espectrometría de masas (MS-MALDI-TOF) revela expresión diferencial de proteínas involucradas con la respuesta a stress y la generación de energía, las cuales juegan un papel importante en la muerte celular de macrófagos mediada por la toxina. Posteriormente, Sapra et al., 2006, utilizando dos líneas celulares de macrófagos de ratón (J774A.1 y RAW264.7) y electroforesis diferencial en gel (DIGE) acoplada a nanoLC-MS, identifica un set de proteínas también involucradas con el

metabolismo energético y la respuesta al estrés, y además con la estructura del citoesqueleto, sugiriendo su uso potencial como biomarcadores para diagnóstico y terapia.

Este es el primer estudio en el cual se revela la expresión diferencial de proteínas en macrófagos J774A.1 infectados con *Leishmania amazonensis* utilizando electroforesis bidimensional. A futuro se requiere entonces la identificación de los *spots* de proteínas propuestos por espectrometría de masas para iniciar la comprensión del impacto de la infección sobre la función del macrófago.

5. Conclusiones y Perspectivas

5.1 Conclusiones

Se establecieron los protocolos para la obtención de extractos de proteína total y extractos enriquecidos con proteínas de membrana para macrófagos J774A.1 y promastigotes de *Leishmania*.

Se logró la identificación de las proteínas Kir2.1, Kv1.5 y CLC3 en macrófagos J774A.1, canales iónicos cuya función ha sido registrada por electrofisiología. No se observaron diferencias en el nivel de expresión de Kir2.1 asociadas a adherencia del macrófago en cultivo. En contraste se detectó disminución en su nivel de expresión 24, 48 y 72 horas post-infección con *L. amazonensis*. Esta disminución del nivel de expresión de Kir2.1, permitió proponer un mecanismo para explicar los cambios del potencial de membrana previamente reportados por estudios de electrofisiología.

Se evidenció que la membrana del fagosoma formada al fagocitar perlas de látex de 3µm por macrófagos J774A.1 es una mezcla de endomembranas.

Se sugiere que la proteína Kir2.1 podría provenir de la membrana del macrófago, además de que podría contribuir con la corriente catiónica registrada por electrofisiología en la MVP.

Se logró la identificación de una proteína CLC en promastigotes de *Leishmania*, cuya expresión es diferente entre las especies *L. amazonensis* y *L. braziliensis*.

Se realizó un primer acercamiento a la caracterización proteómica del modelo *Leishmania*-Macrófago en el cual se revela la expresión diferencial de proteínas en macrófagos J774A.1 infectados con *L. amazonensis*.

5.2 Perspectivas

Evaluar el nivel de expresión de las proteínas Kv1.3 y Kv1.5, responsables por las corrientes de salida de K^+ (K^+ I_{out}) en macrófagos J774A.1 después de la infección con *L. amazonensis*.

Realizar la identificación de los *spots* de proteínas resaltados en tabla del Anexo D por espectrometría de masas, para establecer su papel en la interacción *Leishmania*-Macrófago.

A. Anexo: Cultivos

Cultivo celular

La línea celular de macrófagos peritoneales de ratón J774A.1 fue obtenida del European Cell line and Hybridoma Bank Collection (EECACC No. 91051511) y la ATTC (TIB-67). Las células fueron mantenidas en monocapa en frascos de 25 cm^2 a 37°C y 5% CO_2, empleando medio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen).

Cultivo de parásitos

Se cultivaron parásitos de la especie *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (FLA/BR/67/PH8 y HOM/BR/75/M2903, respectivamente) en su estadio promastigotes, donados por la Dra. Nancy Gore Saravia (CIDEIM, Cali, Colombia), en frascos de 25cm^2 a 24°C en medio Schneider (Sigma) suplementado con 10% de FBS (Niño & Camacho, 2005). Los parásitos se cultivaron hasta alcanzar su fase estacionaria (formación de rosetas e infectividad eficiente) y se concentraron para la infección o se diluyeron para mantener el cultivo.

Infección de macrófagos con *L. amazonensis* y fagocitosis de perlas de látex

Cultivos celulares de macrófagos J774A.1 con un 80% de confluencia en la botella fueron expuestos a promastigotes de *L. amazonensis* en fase estacionaria o perlas de látex de 3µm diluidas previamente en medio sin suero, en una proporción 1:10 (células:parásitos/perlas) durante 4 horas a 37°C, 5% CO_2. El excedente de parásitos no infectantes o perlas de látex fue retirado con tres lavados usando RPMI libre de suero. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C y 5% CO_2 hasta 24, 48 y 72 horas post-infección (hpi), para su posterior recolección.

B. Anexo: Protocolos para obtención de extractos de proteína

Protocolo 1: Extracto de proteína soluble de macrófagos NI y macrófagos 48hpi

Células cultivadas en un frasco de 75cm^2 con medio o inoculadas con los parásitos a 48 hpi fueron recolectadas con policía y centrifugación a 1200 rpm por 5 min. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y el extracto fue obtenido siguiendo las instrucciones del kit comercial M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent suplementado con inhibidores de proteasas (IP, cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack Protease Inhibitor Cocktail, Roche). La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

Protocolo 2: Extracto de proteína total de macrófagos NI

Células cultivadas en un frasco de 75cm^2 con medio fueron recolectadas con policía y centrifugación a 1200 rpm por 5 min. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se sometieron a tres procedimientos de lisis:

1) Buffer de carga 1X (30mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Glicerol, 5,5% β-mercaptoetanol, 2%SDS y 0,01%Azul de bromofenol), el pellet de células fue re-suspendido en el buffer de carga 1X denaturante, la mezcla fue calentada a 92°C por 5 min y el sobrenadante recolectado por centrifugación a 13000rpm por 15 min.

2) RIPA I (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5%Tritón X-100) suplementado con IP, el pellet de células fue lisado con el buffer de lisis RIPA I por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 13000rpm por 15 min a 4°C. La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit.

3) RIPA II (50mM Tris-HCl pH 7,4, 300mM NaCl, 5mM EDTA, 1%Tritón X-100) suplementado con IP, las células fueron lisadas con el buffer de lisis RIPA II por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 13000rpm por 15 min a 4°C. La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit.

Protocolo 3: Extracto enriquecido con proteínas de membrana para el macrófago NI

Células cultivadas en una caja de 75 cm^2 con medio fueron recolectadas con policía y centrifugación a 1200 rpm por 5 min. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS frío. Dos procedimientos de lisis y enriquecimiento de proteínas de membrana se ensayaron, utilizando buffers suplementados con IP:

1) Fraccionamiento diferencial de detergente, las proteínas de membrana fueron extraídas siguiendo el procedimiento descrito por Ramsby & Makowski 1999, brevemente un pellet de células fue lisado con el buffer de extracción Digitonina (0,015%, pH 6,8) e incubadas en hielo por 10 min con agitación constante. Después de centrifugar a 480x*g* por 5min, el pellet fue re-suspendido en buffer de extracción Tritón X-100 (0,5%, pH 7,4) e incubado por 30 min con agitación constante. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 5000x*g* por 10 min. Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con TCA y solubilizadas en SDS 5%.

2) Mem-PER Kit, las proteínas de membrana fueron extraídas con el kit comercial Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del comerciante. Las proteínas de membrana aisladas en la fracción hidrofóbica fueron sometidas a diferentes procedimientos de precipitación y solubilización de proteínas: Fenol/acetona Tritón X-100 0,5% (Lab. Hormonas), Acetona/Reactivo B (1:4) con Tritón X-100 0,5%, TCA-buffer de carga (Thermo Scientific Tech Tip #8) y Metanol/cloroformo-buffer de carga (Wessel & Flügge, 1984, Hongsachart et al., 2008).

Protocolo 4: Extracto de proteína total para promastigotes de *L. amazonensis*

Cultivos de $1x10^7$ parásitos en estadio promastigote fueron recolectados por centrifugación a 2500rpm por 10 min. Luego, los parásitos se lavaron 3 veces con PBS frío y se sometieron a siete procedimientos de lisis, utilizando buffers suplementados con IP:

1) Buffer de carga 1X (30mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Glicerol, 5,5% β-mercaptoetanol, 2%SDS y 0,01%Azul de bromofenol), los parásitos fueron re-suspendidos en el buffer de carga 1X denaturante, la mezcla fue calentada a 92°C por 10 min y el sobrenadante recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min.

2) Buffer de Lisis I (7M úrea, 2M tioúrea y 4% CHAPS) los parásitos fueron re-suspendidos en el buffer Lisis I e incubados 30 min en hielo y 10 min en ebullición. El sobrenadante recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min a 4°C, fue sometido al procedimiento descrito por Krieg et al., 2005.

3) Buffer de Lisis II (7M úrea, 2M tioúrea y 4% CHAPS), los parásitos fueron re-suspendidos en el buffer de Lisis II e incubados 2h con vortex. El sobrenadante recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min a 4°C, fue sometido al procedimiento descrito por Krieg et al., 2005.

4) Buffer RIPA I (50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% Tritón X-100), los parásitos fueron lisados con el buffer de lisis RIPA I por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min a 4°C.

5) Buffer RIPA I-sonicación, después de incubar los parásitos durante 30 min con el buffer RIPA I, fueron sometidos a ruptura celular por sonicación en hielo utilizando pulsos de amplitud de 20% durante 30s con pausas de un minuto entre pulsos. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min a 4°C.

6) PBS hipotónico-Tritón X-100 (13,6mM NaCl, 0,27mM KCl, 0,4mM Na_2HPO_4, 0,15mM KH_2PO_4, 1% Tritón X-100), los parásitos fue lisados con el PBS hipotónico-tritón X-100 y choque térmico mediante 10 ciclos de congelamiento en N_2 líquido y descongelamiento a 37°C (adaptación de Cuervo et al., 2007). El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min.

7) Buffer RIPA II (50mM Tris-HCl pH 7,4, 300mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Tritón X-100), los parásitos fueron lisados con el buffer de lisis RIPA por 30 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 14000rpm por 20 min a 4°C.

Protocolo 5: Extracto enriquecido con proteínas para promastigotes de *L. amazonensis*

Cultivo de $1x10^7$ parásitos en estadio promastigote fueron recolectados por centrifugación a 2500 rpm por 10 min, luego los parásitos fueron lavados 3 veces con PBS frío. Tres procedimientos de lisis y enriquecimiento de proteínas de membrana fueron ensayados, utilizando diferentes buffers que fueron suplementados con IP:

1) Fraccionamiento diferencial de detergente, las proteínas de membrana fueron extraídas siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Ramsby & Makowski 1999, brevemente un pellet de parásitos fue lisado con PBS hipotónico (13,6mM NaCl, 0,27mM KCl, 0,4mM Na_2HPO_4, 0,15mM KH_2PO_4) y choque térmico mediante congelamiento en N_2 líquido y descongelamiento a 37°C durante 10 veces. El pellet obtenido después de centrifugar a 13000rpm por 15 min, fue re-suspendido en buffer digitonina pH 6,8 e incubado en hielo por 10 min con agitación constante. Después de centrifugar a 480x*g* por 5min, el pellet fue re-suspendido en buffer Tritón X-100 e incubado por 30 min con agitación constante. El sobrenadante obtenido al centrifugar a 5000x*g* por 10 min fue sometido a precipitación con TCA y el pellet se solubilizó en SDS 5% (Thermo Scientific Tech Tip #8).

2) Mem-PER Kit, las proteínas de membrana fueron extraídas siguiendo una modificación de las instrucciones del kit comercial Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Thermo Scientific). La modificación incluye el siguiente paso previo: el pellet de parásitos fue lisado con PBS hipotónico y choque térmico mediante congelamiento en N_2 líquido y descongelamiento a 37°C durante 10 veces. Con el pellet obtenido después de centrifugar a 13000rpm por 15min se siguió el procedimiento descrito por el comerciante. Las proteínas de membrana aisladas en la fracción hidrofóbica fueron sometidas a

precipitación con Metanol/cloroformo (Wessel & Flügge, 1984, Hongsachart, 2008) y dos procedimientos de solubilización: buffer de carga y SDS 4% en Tris-HCl pH 8,0 (Shui et al., 2008).

3) Mem-PER Kit, las proteínas de membrana fueron extraídas siguiendo una modificación de las instrucciones del kit comercial Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Thermo Scientific). La modificación incluye el siguiente paso previo: el pellet de parásitos fue lisado con el Buffer RIPA II (50mM Tris-HCl pH 7,4, 300mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Tritón X-100) por 30 min a temperatura ambiente. Con el pellet obtenido después de centrifugar a 14000rpm por 20 min a 4°C se siguió el procedimiento descrito por el comerciante. Las proteínas de membrana aisladas en la fracción hidrofóbica fueron sometidas a precipitación con Metanol/cloroformo (Wessel & Flügge, 1984, Hongsachart, 2008) y solubilizadas en el buffer de carga 1X.

Protocolo 6: Aislamiento de fagosomas LBPs (latex-bead-containing phagosomes) y obtención de un extracto de proteína total

El aislamiento de los fagosomas LBPs se realizó por dos procedimientos:

1) Metodología descrita por Shui et al. 2008 (Desjardins *et al*. 1994, Wetzel and Korn, 1969): después de 48 horas de la internalización de las perlas de látex, los macrófagos fueron lavados con PBS frío y recolectadas con policía. Posteriormente las células fueron lavadas con el buffer de homogenización (250mM sacarosa, 3mM Imidazol, pH 7,4, suplementado con PI) durante 5 minutos a 4°C. Las células recolectadas por centrifugación, fueron resuspendidas en 1mL de buffer de homogenización para someterlas a ruptura mecánica utilizando el homogenizador Dounce a 4°C. Para remover las células intactas, la suspensión se centrifugó a 1200rpm por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante el cual contiene los fagosomas LBPs, fue recuperado. Los fagosomas LBPs fueron aislados por flotación en un gradiente de sacarosa (todas las soluciones de sacarosa se prepararon %V/V en 3mM de imidazol, pH 7,4) como se describe: A 1mL del sobrenadante recuperado se le adicionó 1mL de una solución de sacarosa del 62%, resultado en una mezcla con un 40% de sacarosa. Esta solución del 40% fue puesta sobre un colchón de sacarosa del 62%, luego fueron adicionados 2mL de una solución de sacarosa al 35%, 25% y 10%, las diferentes soluciones fueron adicionadas sucesivamente evitando la mezcla entre ellas. Una vez formado el gradiente de sacarosa, este fue sometido a ultracentrifugación (Beckman Xl-90 Ultracentrifuge Rotor SW41Ti) a 100000xg durante 1 hora a 4°C. Después de monitorear con microscopía de luz las diferentes interfaces, una franja de fagosomas LBPs fue aislada de la interface entre 10 y 25% de sacarosa y re-suspendida en 12mL de PBS frío suplementado con IP. Los fagosomas LBPs fueron colectados por centrifugación a 40000xg durante 15 minutos a 4°C. El pellet de fagosomas LBPs fue solubilizado en el buffer 4% SDS en 50mM Tris-HCl pH 8,0, por vortex en un agitador Eppendorf a 1400rpm por 1 hora a 20°C, para la extracción de proteína total. El sobrenadante obtenido después de centrifugar la mezcla a 14000rpm durante 15 min a

4°C, que corresponde al extracto de proteína total de los fagosomas LBPs fue cuantificado y sometido a ensayos de *western blot*.

2) Metodología descrita por Chakraborty *et al.* 1994: después de 48 horas de la internalización de las perlas de látex, las células fueron recolectadas de la caja de cultivo con policía en 2,5mL del buffer de lisis (20mM HEPES, 0,5mM EGTA, 0,25M sacarosa, 0,1% gelatina, pH 7,0) suplementado con IP. Una vez en el medio de lisis, las células fueron sometidas a ruptura mecánica pasándolas a través de una jeringa con aguja calibre 23G en un tubo Falcon de 15 ml (5-20 veces) y sobre hielo. El procedimiento se controló por microscopía de luz hasta lograr el 90% de lisis celular. Para remover células intactas del homogenizado, la suspensión se diluyó a 5ml adicionando buffer de lisis y se centrifugó a 200xg por 10 minutos a 4°C. Los fagosomas presentes en el sobrenadante se aislaron por flotación en un gradiente de sacarosa, como se describe: el sobrenadante fue puesto sobre un gradiente de sacarosa que tenía un colchón inferior de 60% de sacarosa, más colchones de 2ml de sacarosa al 40% y 20% todos preparados en una solución de HEPES salino (30mM HEPES, 100mM NaCl, 0,5mM $CaCl_2$, 0,5mM $MgCl_2$, pH 7,0). Este gradiente se centrifugó a 700xg por 25 minutos a 4°C. Después de monitorear con microscopía de luz las diferentes interfaces, una franja de fagosomas LBPs fue aislada de la interface entre 8 y 20% de sacarosa y recolectada por centrifugación a 12000xg durante 25 minutos. El pellet de fagosomas LBPs fue solubilizado en el buffer 4% SDS en 50mM Tris-HCl pH 8,0 por vortex en un agitador Eppendorf a 1400rpm por 1 hora a 20°C, para la extracción de proteína total. El sobrenadante obtenido después de centrifugar la mezcla a 14000rpm durante 15 min a 4°C, que corresponde al extracto de proteína total de los fagosomas LBPs fue cuantificado y sometido a ensayos de *western blot*.

C. Anexo: Protocolos para separación y análisis de proteínas

Protocolo 1: Electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (1D-SDS-PAGE)

Los extractos de proteína total y los extractos enriquecidos en proteínas de membrana para macrófagos NI, macrófagos infectados y promastigotes de *L. amazonensis* o *L. braziliensis* fueron sometidos a electroforesis SDS-PAGE en la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad). La preparación de la muestra se realizó mezclando un volumen del extracto o pellet de proteínas con el buffer de carga 1X denaturante (30mM Tris-HCl pH 6,8, 5% Glicerol, 5,5% β-mercaptoetanol, 2%SDS y 0,01%Azul de bromofenol) y posterior calentamiento de la mezcla a 92°C por 5 min. Los extractos fueron corridos en el sistema de 2 geles de poliacrilamida, concentrador y separador, y resueltos en el buffer de corrida (25mM Tris-base, 192mM Glicina y 0,1% SDS). La electroforesis se sometió inicialmente a 80V durante 30 min y luego a 150V. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción del gel en solución de Azul de Coomassie.

Protocolo 2: Electroforesis bidimensional IPG-SDS-PAGE (2DE)
POE-P 1; POE-PII 2 y POE-PII 3 del Grupo de Investigación en Hormonas, Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, Departamento de Química

De los extractos de proteína total para macrófagos J774A.1 y macrófagos J774A.1 48 hpi con *L. amazonensis* se precipitaron 2mg de proteína con Metanol-cloroformo, el pellet de proteína obtenido se disolvió en 300µL del buffer de solubilización IEF (Urea 7M, tioúrea 2M, CHAPS 4%, anfolitos 0,2% BioLyte (Bio-Rad) y DTT 40mM) y los extractos obtenidos fueron cuantificados por determinación de proteínas en membrana de nitrocelulosa utilizando el reactivo Amidoblack 0,1%. El isoelectroenfoque se realizó en tiras IPG de 7cm, pH 3-10 No lineal (Bio-Rad) usando el dispositivo PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad) en dos pasos: 1) rehidratación pasiva de las tiras IPG secas, un volumen correspondiente a 200µg de proteína se mezcló con un volumen de buffer de rehidratación (Urea 7M, tioúrea 2M, CHAPS 2%, anfolitos 0,2% BioLyte (Bio-Rad), DTT 40mM, azul de bromofenol 0,02%) necesario para llegar a un volumen total de rehidratación de 125µL. La mezcla fue homogenizada y se centrifugó a 5000xg durante 1 minuto antes de aplicar a la tira. La muestra se sembró en un

carril de la cámara de focalización, se puso en contacto con el gel de la tira y se dio inicio al siguiente programa de isoelectroenfoque:

Voltaje (V)	Tiempo (horas)	Observaciones
0	2	Rehidratación pasiva
50	11	Rehidratación activa
200	1	Rampa rápida
500	1	Rampa rápida
1000	1	Rampa rápida
2000	1	Rampa rápida
4000	Hasta 15000 Vh	Rampa rápida
500	5	Paso de seguridad

Después del isoelectroenfoque, la tira se trasladó a una cubeta plástica, donde se realizó el equilibrio por reducción con DTT 130mM seguida de alquilación con yodoacetamida (IAA) 135mM, cada uno en 2,5mL de buffer de equilibrio (Urea 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375M pH 8,8, Glicerol 20%). Cada paso se realizó por 15 minutos con agitación moderada. La tira se acopló con la segunda dimensión usando un sello con solución de agarosa 1% (SDS 0.1%, azul de bromofenol 0.01%, Tris base 25mM, Glicina 0,19M). Finalmente la separación por peso molecular se llevó a cabo en condiciones denaturantes usando geles de poliacrilamida al 10%. Al igual que en la electroforesis unidimensional, se usó la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad), las condiciones de corrida fueron: 80V por 40 minutos, 100V por una hora y 120V hasta terminar la corrida.

La visualización de las bandas se realizó mediante tinción del gel en solución de Azul de Coomassie coloidal: El proceso comenzó con la incubación del gel en 20mL de una solución de etanol 50%, ácido fosfórico 2% por 16 horas, en seguida se realizaron tres lavados sucesivos con agua destilada de 20 minutos cada uno y se incubó por 1 hora en 25mL de una solución de etanol 18%, ácido fosfórico 2% y sulfato de amonio 15%. Finalmente se adicionó a esta solución, 200µL de solución de azul de Coomassie G-250 2% en etanol y se permitió la tinción por 4 días. El ruido de fondo se eliminó por lavados sucesivos con agua destilada durante 2 días.

Protocolo 3: *Western blot* para la inmunodetección de las proteínas Kir2.1, Kv 1.3, Kv 1,5 y ClC3 en el MPI

Extractos de proteína total y extractos enriquecidos con proteínas de membrana de macrófagos J774A.1 fueron obtenidos con el buffer RIPA II y el kit comercial Mem-PER, respectivamente. Los extractos fueron cuantificados utilizando el kit comercial Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). La muestra se mezcló con el buffer de carga NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) y con el agente reductor NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X). La mezcla fue calentada a 70°C durante 5 min y posteriormente sometida a electroforesis en un gel NuPAGE® 4-12% Bis-Tris utilizando el buffer de corrida NuPAGE® MOPS SDS Running

Buffer (20X) mezclado con el agente antioxidante NuPAGE® Antioxidant. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 150V durante 1 hora. Posteriormente, la proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amershann Hybond – GE Healthcare) en el buffer de transferencia 10mM $NaHCO_3$, 3mM $NaCO_3$, SDS 0,01% y Metanol 20% a pH 9,22, aplicando un gradiente de potencial: 10V-10min, 20V-10min, 30V-10min, 40V-10min, 50V-50min. La membrana de nitrocelulosa y el gel a transferir se equilibraron previamente en el buffer de transferencia durante 15 min. Al finalizar la transferencia, la membrana se dejó secando toda la noche a temperatura ambiente sobre una toalla de papel. Al día siguiente se realizó la detección con el siguiente procedimiento: a) Lavado de la membrana con agua desionizada por 10 minutos con agitación constante; b) Se retiró el agua y se trató la membrana con el reactivo Quentix Western Blot Signal Enhancer (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante; c) Bloqueo de la membrana por 1 hora en buffer TBST-caseína (Caseína 0,1%, Tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150mM y Tween 20 0,05% V/V); d) Incubación durante 2 horas con los anticuerpos primarios diluidos en TBST-caseína 0,1%:

Anticuerpos primarios	**Descripción**	**Dilución**
Anti - KIR2.1 (N-18)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal	1:200
Anti - KV1.3 (C-15)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal	1:200
Anti - KV1.5 (E-20)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal	1:200
Anti – CLC3N	Abcam Rabbit polyclonal	1:600
Anti – Actin (C-11)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal	1:1000

e) Siete lavados de la membrana con agua desionizada y un lavado durante 10 min con TBST; f) Incubación durante 1 hora con los anticuerpos secundarios diluidos en TBST-caseína 0,1%:

Anticuerpos secundarios	**Descripción**	**Dilución**
Anti – goat IgG H+L	BioRad	1:8000
Anti – rabbit IgG HRP	Amersham – GE Healthcare	1:7000

g) Siete lavados de la membrana con agua desionizada y un lavado durante 10 min con TBST; y h) Se dejó la membrana en contacto con el reactivo Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) por 5 min y por último se reveló en un revelador BIORAD.

Para la inmunodetección de las proteínas marcadores de membranas intracelulares en extractos de proteína total de fagosomas se siguió el mismo procedimiento anterior, con las siguientes modificaciones:

- Gel NuPAGE® 3-8% Tris-acetate
- Buffer de corrida NuPAGE® Tris-acetate SDS Running Buffer (20X)

Anticuerpos primarios	Descripción	Dilución
Anti - LAMP-1 (C-20)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal	1:200
Anti – golgin 97 (CDFX)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal	1:200
Anti - Calnexin	Enzo Life Sciences, rabbit polyclonal	1:2000

Anticuerpos secundarios	Descripción	Dilución
Anti – goat IgG H+L	BioRad	1:8000
Anti – rabbit IgG HRP	Amersham – GE Healthcare	1:7000

Protocolo 4: *Western blot* para inmunodetección de las proteínas Kir2.1 y CLC3 en el Laboratorio de Biofísica y Biología de Membranas

Una vez cuantificados los extractos, una cantidad de 50 µg de proteína de cada uno de los extractos fue re-suspendida en el buffer de carga 1X denaturante y sometida a electroforesis SDS-PAGE según Protocolo 1. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, mediante transferencia húmeda en el buffer de transferencia Buffer II (48mM Tris, 39mM Glicina, 0,037% SDS y Metanol 20% a pH 9,2) y un gradiente de potencial: 10V-10min, 20V-10min, 30V-10min, 40V-10min, 50V-50min. La membrana de nitrocelulosa y el gel a transferir se equilibraron previamente en el buffer de transferencia durante 15 min. Al finalizar la transferencia, la membrana se dejó secando toda la noche a temperatura ambiente sobre una toalla de papel. Al día siguiente se realizó la detección con el siguiente procedimiento: a) Lavado de la membrana con agua desionizada por 10 minutos con agitación constante; b) Bloqueo de la membrana por 1 hora en buffer TBST-leche 5% (leche descremada 5%, Tris-HCl 20mM pH 7,5, NaCl 150mM y Tween 20 0,05% V/V); c) Incubación con los anticuerpos primarios diluidos en TBST-leche5%:

Anticuerpos primarios	Descripción
Anti - KIR2.1 (N-18)	SantaCruz Biotechnology, goat polyclonal
Anti – CLC3N	Abcam Rabbit polyclonal
Anti – β - actin	Ambion, mouse monoclonal
Anti Alpha-tubulin	Invitrogen, mouse monoclonal

d) Siete lavados de la membrana con agua desionizada y un lavado durante 10 min con TBST; e) Incubación durante 1 hora con los anticuerpos secundarios diluidos en TBST-leche 5%:

Anticuerpos secundarios	Descripción
Donkey Anti-goat IgG HRP	abcam
Goat Anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen
Goat Anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen

f) Siete lavados de la membrana con agua desionizada y un lavado durante 10 min con TBST y g) Revelado de la membrana por el método por quimioluminiscencia utilizando el sustrato SuperSignal® West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Thermo Scientific).

D. Anexo: Tabla de resultados del análisis de clases

Match ID	Max	Fold	Match Count	Macrófago	Infección	Anova
0	0,2852	2,468	2	0,1156	0,2852	0,0235744
1	0,4142	1,275	2	0,3248	0,4142	0,8258610
2	0,5151	1,472	2	0,5151	0,3499	0,1720830
3	0,4989	1,377	2	0,3623	0,4989	0,0900542
4	1,0193	2,758	2	0,3696	1,0193	0,0149404
5	0,3501	1,039	2	0,3371	0,3501	0,8877470
6	0,8744	2,628	2	0,3327	0,8744	0,0043158
7	0,2897	1,111	2	0,2897	0,2607	0,7185880
8	5,5075	1,109	2	4,9679	5,5075	0,5921510
9	1,0076	1,432	2	0,7039	1,0076	0,4665140
10	0,8347	2,188	2	0,3815	0,8347	0,1716500
11	0,9932	2,137	2	0,4647	0,9932	0,1822510
12	0,8553	1,646	2	0,5197	0,8553	0,1687640
13	0,8799	1,350	2	0,8799	0,6518	0,5488100
14	0,3323	1,970	2	0,3323	0,1687	0,2621080
15	0,8988	3,426	2	0,2624	0,8988	0,0301097
16	0,6355	1,476	2	0,4307	0,6355	0,5196810
17	0,4261	1,149	2	0,4261	0,3709	0,6684640
18	0,5164	1,390	2	0,3714	0,5164	0,0801038
19	0,6087	2,522	2	0,2414	0,6087	0,0037546
20	0,4107	1,339	2	0,3067	0,4107	0,0408638
21	1,5526	5,921	2	0,2622	1,5526	0,1138480
22	0,6078	1,784	2	0,3407	0,6078	0,1182710
23	0,8561	2,141	2	0,3998	0,8561	0,3005250
24	0,5053	1,656	2	0,5053	0,3051	0,4319620
25	0,4072	1,581	2	0,2576	0,4072	0,6883500
26	0,4043	1,494	2	0,2705	0,4043	0,4160190
27	1,7018	19,114	2	0,0890	1,7018	0,0071111
28	0,7262	1,926	2	0,3770	0,7262	0,1361630
29	0,2823	2,805	2	0,2823	0,1007	0,2666510
30	0,4472	2,615	2	0,4472	0,1710	0,3172090
31	1,3138	1,861	2	1,3138	0,7060	0,0130418
32	0,5616	5,873	2	0,0956	0,5616	0,0168218
33	0,2106	1,571	2	0,2106	0,1341	0,2544680
34	0,5551	1,628	2	0,3410	0,5551	0,0527682
35	0,2379	1,547	2	0,1538	0,2379	0,5514060
36	0,5690	1,571	2	0,3622	0,5690	0,1195400

37	0,6943	2,991	2	0,2322	0,6943	0,1341720
38	1,2975	3,910	2	1,2975	0,3319	0,0691201
39	0,5803	1,137	2	0,5803	0,5102	0,6847710
40	0,3894	1,804	2	0,3894	0,2159	0,0919101
41	1,1761	1,914	2	1,1761	0,6144	0,0350279
42	1,8320	1,648	2	1,1117	1,8320	0,2508880
43	2,1580	1,295	2	2,1580	1,6657	0,2258840
44	0,5460	2,187	2	0,2497	0,5460	0,4626380
45	0,4861	1,517	2	0,3204	0,4861	0,4335340
46	1,0571	2,019	2	1,0571	0,5234	0,2760970
47	2,8012	3,250	2	2,8012	0,8618	0,0000134
48	0,4496	1,782	2	0,4496	0,2523	0,0339580
49	0,4669	1,255	2	0,4669	0,3718	0,6904480
50	0,8202	3,026	2	0,8202	0,2711	0,0721819
51	0,5807	2,034	2	0,5807	0,2854	0,1491250
52	0,4386	2,509	2	0,1748	0,4386	0,0010802
53	0,3033	1,332	2	0,2277	0,3033	0,1239020
54	0,6080	1,970	2	0,3085	0,6080	0,0056416
55	0,4714	1,005	2	0,4693	0,4714	0,9610000
56	0,3073	1,078	2	0,3073	0,2852	0,9031200
57	2,3240	2,165	2	2,3240	1,0732	0,0633194
58	0,3316	1,046	2	0,3316	0,3170	0,9320950
59	0,2440	2,245	2	0,2440	0,1087	0,1579060
60	0,8244	9,121	2	0,0904	0,8244	0,0339391
61	0,4779	1,617	2	0,2956	0,4779	0,6302460
62	0,8159	5,400	2	0,8159	0,1511	0,0347726
63	0,4210	2,204	2	0,1910	0,4210	0,1249690
64	0,7422	2,764	2	0,7422	0,2685	0,0071165
65	0,4145	4,470	2	0,4145	0,0927	0,0712701
66	0,5905	2,985	2	0,5905	0,1978	0,0353161
67	0,3992	1,017	2	0,3992	0,3925	0,9804080
68	0,2363	1,417	2	0,1668	0,2363	0,6450760
69	0,1870	1,254	2	0,1870	0,1491	0,7657980
70	0,2062	1,056	2	0,1953	0,2062	0,9407060
71	0,6577	2,010	2	0,6577	0,3272	0,1154090
72	0,8074	1,655	2	0,8074	0,4877	0,1642680
73	0,5722		1		0,5722	0,0131394
74	0,8181		1		0,8181	0,0020243
75	0,8655		1		0,8655	0,0487951
76	0,8188		1		0,8188	0,1014280
77	0,6771		1		0,6771	0,2217620
78	0,4824		1		0,4824	0,2306220
79	0,6071		1		0,6071	0,0772149
80	0,6224		1		0,6224	0,0725932
81	0,9120		1		0,9120	0,0185930
82	0,5227		1		0,5227	0,0018178
83	0,5855		1		0,5855	0,0201121
84	0,4214		1		0,4214	0,0722497
85	2,4713		1		2,4713	0,0065170
86	0,7966		1		0,7966	0,2079390

87	0,3791		1		0,3791	0,0257543
88	0,3615		1		0,3615	0,0073315
89	1,3876		1		1,3876	0,0092333
90	0,5451		1		0,5451	0,1018670
91	0,7418		1		0,7418	0,0804195
92	1,0273		1		1,0273	0,0267314
93	0,8480		1		0,8480	0,0101080
94	0,2996		1		0,2996	0,0013054
95	0,7697		1		0,7697	0,0103451
96	0,4641		1		0,4641	0,1993590
97	0,5449		1		0,5449	0,0414988
98	0,2987		1		0,2987	0,1537320
99	0,4115		1		0,4115	0,0001886
100	1,8770		1		1,8770	0,0002191
101	1,4407		1		1,4407	0,0253442
102	1,2386		1		1,2386	0,0352694
103	0,7024		1		0,7024	0,0151492
104	1,6942		1		1,6942	0,1227240
105	0,2789		1		0,2789	0,0286977
106	0,3285		1		0,3285	0,0370419
107	0,2694		1		0,2694	0,0924626
108	0,3140		1		0,3140	0,1789430
109	0,2659		1		0,2659	0,0002757
110	0,2596		1		0,2596	0,0498112
111	0,2337		1		0,2337	0,0103229
112	0,6291		1		0,6291	0,0347514
113	0,4827		1		0,4827	0,1297930
114	0,3112		1		0,3112	0,0031987
115	0,2200		1		0,2200	0,0165024
116	0,2029		1		0,2029	0,0090957
117	0,8374		1		0,8374	0,0066879
118	0,3635		1		0,3635	0,0259438
119	0,3682		1		0,3682	0,0817488
120	0,3350		1		0,3350	0,0669277
121	0,1893		1		0,1893	0,2191020
122	0,2347		1		0,2347	0,1279700
123	0,2891		1		0,2891	0,1459480
124	0,2915		1		0,2915	0,0705283
125	0,2393		1		0,2393	0,0647342
126	0,3349		1		0,3349	0,2529470
127	0,3657		1		0,3657	0,2390600
128	0,4551		1		0,4551	0,0000693
129	0,4726		1		0,4726	0,2208910
130	0,1870		1		0,1870	0,2341540
131	0,5925		1		0,5925	0,0252885
132	0,2918		1		0,2918	0,2305080
133	0,4814		1		0,4814	0,0671332
134	0,2253		1		0,2253	0,2758540
135	0,4323		1		0,4323	0,2215470

136	0,1136		1		0,1136	0,2427430
137	0,2978		1		0,2978	0,3481360
138	0,1096		1		0,1096	0,2469520
139	1,7009		1		1,7009	0,0039165
140	0,7821		1		0,7821	0,0111549
141	0,1162		1		0,1162	0,2373450
142	0,1788		1		0,1788	0,2566180
143	0,2356		1		0,2356	0,2213290
144	0,1797		1		0,1797	0,0000016
145	0,1521		1		0,1521	0,2611200
146	0,1219		1		0,1219	0,2300840
147	0,7990		1		0,7990	0,0072705
148	0,0929		1		0,0929	0,2279210
149	0,1384		1		0,1384	0,2210130
150	0,8447		1		0,8447	0,0783654
151	0,2263		1		0,2263	0,2206440
152	0,9168		1		0,9168	0,3610140
153	0,3823		1		0,3823	0,1680360
154	1,0597		1		1,0597	0,0025397
155	0,2414		1		0,2414	0,0498551
156	1,8049		1		1,8049	0,2564380
157	1,3334		1		1,3334	0,0016018
158	0,2639		1		0,2639	0,0060874
159	0,2441		1		0,2441	0,0000015
160	1,2307		1		1,2307	0,0013245
161	0,2013		1		0,2013	0,2191040
162	0,2940		1		0,2940	0,2215280
163	0,2731		1		0,2731	0,1058720
164	0,1126		1		0,1126	0,0516973
165	0,1607		1		0,1607	0,0089434
166	0,6325		1		0,6325	0,0002932
167	0,4236		1		0,4236	0,0247745
168	0,3364		1	0,3364		0,0597412
169	2,6589		1	2,6589		0,0026436
170	0,3350		1	0,3350		0,0037197
171	0,5254		1	0,5254		0,0086377
172	1,9566		1	1,9566		0,0147635
173	0,2886		1	0,2886		0,0000000
174	0,2246		1	0,2246		0,0000422
175	0,5381		1	0,5381		0,0093712
176	0,2086		1	0,2086		0,0045844
177	0,1551		1	0,1551		0,0030341
178	1,1004		1	1,1004		0,0059934
179	0,3076		1	0,3076		0,0010501
180	0,3011		1	0,3011		0,0020527
181	0,3442		1	0,3442		0,0025938
182	0,4602		1	0,4602		0,0459121
183	0,2461		1	0,2461		0,0279565
184	0,2833		1	0,2833		0,0275553
185	0,3231		1	0,3231		0,0004988

186	0,2779		1	0,2779		0,0005083
187	0,2049		1	0,2049		0,0059998
188	0,2364		1	0,2364		0,0036062
189	0,9057		1	0,9057		0,1290500
190	0,4390		1	0,4390		0,0034828
191	0,5785		1	0,5785		0,0644996
192	0,6317		1	0,6317		0,0002719
193	0,2504		1	0,2504		0,0000000
194	0,3476		1	0,3476		0,0030196
195	0,2345		1	0,2345		0,0011410
196	0,6293		1	0,6293		0,0037023
197	0,2645		1	0,2645		0,0001659
198	0,3781		1	0,3781		0,0010840
199	0,2774		1	0,2774		0,0135942
200	0,3349		1	0,3349		0,0000218
201	1,3241		1	1,3241		0,0000214
202	0,2058		1	0,2058		0,0081959
203	0,6303		1	0,6303		0,0019802
204	0,3220		1	0,3220		0,0001985
205	0,3908		1	0,3908		0,0140297
206	0,1854		1	0,1854		0,0015274
207	0,3679		1	0,3679		0,0029867
208	0,2274		1	0,2274		0,0106983
209	0,1044		1	0,1044		0,0002845
210	0,1243		1	0,1243		0,0035916
211	0,2331		1	0,2331		0,0063085
212	0,3359		1	0,3359		0,0000658
213	0,2988		1	0,2988		0,0000124
214	0,2485		1	0,2485		0,0061374
215	0,1867		1	0,1867		0,0042489
216	0,2699		1	0,2699		0,0002112
217	1,4815		1	1,4815		0,0007883
218	0,2340		1	0,2340		0,0341377
219	0,3758		1	0,3758		0,0009729
220	0,2156		1	0,2156		0,0004383
221	0,3330		1	0,3330		0,0651158
222	0,2198		1	0,2198		0,0027853
223	0,6949		1	0,6949		0,0521841
224	0,9669		1	0,9669		0,0734052
225	0,4364		1	0,4364		0,0046276
226	0,8505		1	0,8505		0,0241574
227	0,7461		1	0,7461		0,0015922
228	0,2975		1	0,2975		0,0002593
229	0,8127		1	0,8127		0,0034720
230	0,8992		1	0,8992		0,0794322
231	0,3313		1	0,3313		0,0093550
232	0,2878		1	0,2878		0,0009188
233	0,3334		1	0,3334		0,0027810
234	0,7343		1	0,7343		0,0436871

235	0,1499		1	0,1499		0,0056880
236	0,2544		1	0,2544		0,0168839
237	0,4500		1	0,4500		0,0199674
238	0,4550		1	0,4550		0,0000083
239	2,8648		1	2,8648		0,0003183
240	0,2553		1	0,2553		0,0769538
241	1,8587		1	1,8587		0,0074650
242	0,2408		1	0,2408		0,0061929
243	0,9114		1	0,9114		0,0000014
244	0,1713		1	0,1713		0,0022824
245	0,8265		1	0,8265		0,0148210
246	1,0173		1	1,0173		0,0825165
247	0,1409		1	0,1409		0,0395599
248	0,1789		1	0,1789		0,0254763
249	0,1562		1	0,1562		0,0318311
250	0,1397		1	0,1397		0,0729023
251	0,0873		1	0,0873		0,0040457
252	0,1868		1	0,1868		0,0283643
253	0,1482		1	0,1482		0,0002123
254	0,3291		1	0,3291		0,0004439
255	0,1414		1	0,1414		0,0027376
256	0,1929		1	0,1929		0,0257501
257	0,4252		1	0,4252		0,0130411
258	0,3320		1	0,3320		0,0004618
259	0,6568		1	0,6568		0,0292074
260	0,3817		1	0,3817		0,0254371
261	0,1462		1	0,1462		0,0000182
262	0,2543		1	0,2543		0,0016237
263	0,1559		1	0,1559		0,1235190
264	0,1019		1	0,1019		0,0074696
265	7,0635		1	7,0635		0,0000000
266	0,4571		1	0,4571		0,0075064
267	0,1026		1	0,1026		0,0003565
268	0,1314		1	0,1314		0,0001296
269	0,2319		1	0,2319		0,0070707
270	0,1953		1	0,1953		0,0000561

Bibliografía

Alexander J., Satoskar A.R., Rusell D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci*. 1999; 112: 2993-3002.

Antoine JC., Prina E., Jouanne C., Bongrand P. Parasitophorous Vacuoles of *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages Maintain an Acid pH. *Infect. Immun.* 1990; 58 (3): 779-787.

Antoine J.C., Prina E., Lang T., Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *T. Micro.* 1998; 6 (10): 392-401.

Arroyo R. Expresión heteróloga de ARNm poli(A) de *Leishmania* (Trypanosomatidae) en ovocitos de anfibio (*Bufonidae*). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 2005.

Becker T., Volchuk A., Rothman J.E. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *PNAS*. 2005; 102 (11): 4022-4026.

Bench Guide. Protocols, hints and tips for molecular biology labs. 1017778. © 2001 QIAGEN 2001.

Bera T., Lakshman K., Ghanteswari D., Pal S., Sudhahar D., Islam M.N., Bhuyan N.R., Das P. Characterization of the redox components of transplasma membrane electron Patch Clamp Technique transport system from *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 725(3):314-326.

Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 1063-1075.

Bodzon-Kulakowska A., Bierczynska-Krzysik A., Dylag T, Drabik A., Suder P., Noga M., Jarzebinska J., Silberring J. Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B*. 2007; 849: 1-31.

Brobey R.K.B., Mei F.C., Cheng X., Soong L. Comparative Two-dimensional Gel Electrophoresis Maps for Promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *Braz J Infect Dis*. 2006; 10(1): 1-6.

Brotherton M-C., Racine G., FoucherA., Drummelsmith J., Papadopoulou B., Ouellette M. Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum*. *J of Prot Researh*. 2010; 9: 3842-3853.

Camacho M., Forero M.E., Fajardo C., Niño A., Morales P., Campos H. *Leishmania amazonensis* infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by altering their outward potassium currents. *J. Exp Para*. 2008; 120: 50-56.

Chakraborty P., Sturgill-Koszycki S., Rusell D.G. Isolation and Characterization of Phatogen-Containing Phagosomes. *Method Cell Biol*. 1994; 45: 261-276.

Chandra H., Gupta P.K., Sharma K., Matto A.R., Garg S.K., Gade W.N., Sirdeshmukh R., Maithal K., Singh Y. Proteome analysis of mouse macrophages treated with anthrax lethal toxin. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1747: 151-159.

Cortázar T. Estudios de permeabilidad del fagosoma que contiene al protozoario *Leishmania amazonensis* (Trabajo de Grado). Bogotá - Universidad Nacional de Colombia. 2000.

Cortázar T., Hernández J. Echeverry M.C., Camacho M. Papel de la vacuola parasitófora de macrófagos de ratón infectados por *Leishmania amazonensis* en la adquisición de moléculas. *Biomédica.* 2006; 26: 26-37.

Croan D., Morrison D.A., Ellis J.T. Evolution og the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Mol Biochem Parast*. 1997; 89: 149-159.

Cuervo P., Batista de Jesus J., Junquiera M., Mendoca-Lima L., González LJ., Betancourt L., Grimaldi G., Barbosa G., Fernandes O., Cupolillo E. Proteome Analysis of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectroscopy. *Mol Biochem Parasit*. 2007; 154: 6-21.

Cuervo P., Domont GB., De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J. proteomics*. 2010; 73: 845-867.

Desjardins M., Huber L.A., Parton R.G., Griffiths G. Biogenesis of Phagolysosome Proceeds through a Sequencial Series of Interactions with the endocytic Apparatus. *J Cell Biol*. 1994; 124 (5): 677-688.

Desjardins M., Griffiths G. Phagocytosis: latex leads the way. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15: 498-503.

Desjeux P: Global control and Leishmania HIV co-infection. Clin Dermatol. 1999; 17: 317-325.

DiFranco M, Villarreal A, Ponte-Sucre A, Quinonez M, Drujan D, Dagger F. Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *Leishmania mexicana* into planar bilayers. *Acta Cient Venez.* 1995; 46(3): 206-207.

Forero ME, Marín M, Corrales A, Llano I, Moreno H, Camacho M. *Leishmania amazonensis* infection induces changes in the electrophysiological properties of macrophage-like cells. *J Membr Biol*. 1999; 170(2):173-180.

Gallin EK., Sheehy PA. Differential expression of inward and outward potassium currents in the macrophage-like cell line J774.1. *J Physiol*. 1985; 369: 475-479.

Gagnon E., Duclos S., Rondeau C., Chevet E., Cameron P.H., Steele-Mortimer O., Paiement J., Bergeron J.J.M, Desjardins M. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into Macrophages. *Cell*. 2002: 110: 119-131.

Gallin, E.K. Ion channels in leukocytes. . *Leukocyte Biol*. 1969; 39: 241–254.

Garg R., Srivastava J.K., Pal A., Naik S., Dube A. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania* promastigotes and evaluation of their prophylatic potencial in hamsters againts experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*. 2004; 23: 1189-1196.

Garzón C, Stuhmer W, Camacho M. Corrientes aniónicas de *Leishmania* expresadas en ovocitos de Xenopus laevis luego de la inyección de mRNA. *Biomédica*. 2009; 29(S):177-178.

Góngora R., Acestor N., Quadroni M., Fasel N., Saravia N., Walker J. Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* using two-dimesional polyacrilamide gel electrophoresis and associated technologies. *Biomédica*. 2003; 23: 153-60.

Görg A., Weiss W., Dunn M. Current two-dimentional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004; 4: 3665-3685.

Gossage S., Rogers M.E., Bates P.A. Two separates growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*. 2003; 33: 1027-1034.

Gull K. The Cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 1999; 53: 629-55

Henkel A.W., Bieger S.C. Quantification of Proteins Dissolved in a Electrophoresis Sample Buffer. *Anal Biochem*. 1994; 223: 329-331.

Herwaldt BL: Leishmaniasis. Lancet 1999; 354: 1191-1199.

Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function and Physiological Roles. *Physiol Rev*. 2010; 90: 291-366.

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

Hongsachart P., Sinchaikul S., Phutrakul S., Wongkham W., Chen S-T. Comparative Membrane Extraction Methods for Identifying Membrane Proteome of SW900 Squamous Lung Cancer Cell Line. *Chiang Mai J. Sci.* 2008; 35(3): 467-482.

Helbing A.O., Heck A.J.R., Slijper M. Exploring the membrane proteome-challenges and analytical strategies. *J Prot*. 2010; 73: 868-878.

Ilgoutz SC, McConville M.J. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol*. 2001; 31: 899-908.

Instituto Nacional de Salud: Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Sistema de Vigilancia en Salud Pública. Archivo Informes Finales de la vigilancia de eventos de interés en salud pública por evento: Boletín epidemiológico. 2010.

Instituto Nacional de Salud: Boletín Epidemiológico Semanal (semana 40); 2011.

Jentsh T.J. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J. Physiol*. 2007; 578.3: 663-640.

Judge S.I., Montcalm-Mazzilli E., Gallin E.K. IKir regulation in murine macrophages: whole cell and perforated patch studies. *Am J Physiol*. 1994; 267(6): 1691-1698.

Kaur J., Bachhawat A. A modified *Western Blot* protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Anal Biochem*. 2009; 384: 348-349.

Kouri J., Noa M., Diaz B., Niubo E. Hyperpolarization of rat peritoneal macrophages phagocytosing latex particles. *Nature*. 1980; 283: 868–869.

Krieg RC., Dong Y., Schwamborn K., Knuechel R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS-PAGE. *J Biochem Bioph Meth*. 2005; 65: 13-19.

Lagos M LF, Moran O, Camacho M. *Leishmania amazonensis*: Anionic currents expressed in oocytes upon microinjection of mRNA from the parasite. *Exp Parasitol*. 2007; 116(2):163-170.

Leifso K., Cohen-Freue G., Dogra N., Murray A., McMaster W.R. Genomic and Proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigotes and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasit*. 2007; 172: 35-46.

List EO., Berryman D.E., Bower B., Sackmann-Sala L., Gosney E., Ding J., Okada S., Kopchick J.J. The use of Proteomics to Study Infectious Diseases. *Infectious Disorders- Drug target*. 2008; 8: 31-45.

Lozano Y, Gómez C, Posada ML, Camacho M. Canales de cloruro CLC de *Leishmania*. *Biomédica*. 2009; 29(S):184.

Lozano Y. Estudios de un canal de cloruro en Leishmania y su importancia en la fisiología del parásito. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. 2012.

Lye L., Owens K., Shi H., Furta S.M.F., Vieira A.C., Turco S.J., Tschudi C., Ullu E., Beveley S.M. Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. *PLos Pathog*. 2010; 6 (10): 1-13.

Mackenzie A.B., Chirakkal H., North R.A. Kv1.3 potassium channels in human alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 285(4): L 262-268.

Marcela Camacho (2012). Electrical Membrane Properties in the Model Leishmania-Macrophage, Patch Clamp Technique, Prof. Fatima Shad Kaneez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0406-3, InTech, DOI: 10.5772/38075.

Menezes J.P.B., Almeida T.F., Petersen A., Guedes C., Mota M., Lima J., Palma L., Buck G., Krieger M., Probst C., Veras P. Proteomic analyisis reveals differentially expresed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major. Microb Infect.* 2013; 15: 579-591.

McKinney LC., Gallin EK. Effect of adherence, cell morphology, and lipopolysaccharide on potassium conductance and passive membrane properties of murine macrophage J774.1 cells. J Membr Biol. 1990; 116(1):47-56.

Murray P.J., Spithill T.W., Handman E. Characterization of Integral Membrane Proteins of *Leishmania major* by Triton X-114 Fractionation and Analysis of Vaccination Effects in Mice. *Infect Immun.* 1989; 57 (7): 2203-2209.

Nasi Enrico. Introducción a la Biofísica, métodos eléctricos y ópticos. 2010.

Novozhilova N.M. Bovin N.V. Structure, Functions and Biosynthesis of Glycoconjugates of *Leishmania* spp. Cell Surface. *Biochemistry (Moscow)*. 2010; 75(6): 686-694.

O'Farrell P. High resolution two-dimentional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975; 250(10): 4007-4021.

Paape D., Aebischer T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. To the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. *J. Proteomics*. 2011; 74: 1614-1624.

Patterson SD. & Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. Nature. 2003; 33: 311-323.

Pérez C. Estudio de Corrientes iónicas de la membrana de la vacuola parasitófora que contiene al parásito *Leishmania amazonensis* (Tesis Maestría en Ciencias – Bioquímica). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2009.

Ponte-Sucre A., Campos Y., Fernandez M., Moll H., Mendoza-León A.. *Leishmania sp*.: growth and survival are impaired by ion channel blockers. *Exp Parasitol*. 1998; 88(1): 11-19.

Qoronfleh MW., Benton B., Ignacio R., Kaboord B., Selective Enrichment of Membrane Proteins by Partition Phase Separation for Proteomics Studies. *J Biomed Biotchenol*. 2003: 249-255.

QIAGEN. Bench Guide: Protocols, hints, and tips for molecular biology labs. 2001. www.qiagen.com/literature/litrequest.asp.

Quintana E., Torres Y., Álvarez C., Rojas A., Forero M.E., 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. *J. Exp Para*. 2010; 124: 258-264.

Rabilloud T., Adessi C., Giraudel A., Lunardi J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with inmobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1997; 18 (3-4): 307-16.

Ramsby M. & Makowski G. Differential Detergent Fractionation of Eukaryotic Cells. *Proteomics Protocols Handbook*. 1999; 37-48.

Randriamampita C, Trautmann A. Ionic channels in murine macrophages. *J Cell Biol*. 1987; 105(2):761-769.

Rochett A., McNicoll F., Girard, J., et al. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 140: 205-220.

Russell D.G., Xu S., Chakraborty P. Intracelular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania Mexicana*-infected macrophages. *J. Cell Sci*. 1992; 103: 1193-1210.

Sacks D., Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature.* 2002; 2: 845-858.

Sapra R., Gaucher S.P., Lachmann J.S., Buffleben G.M., Chirica G.S., Comer J.E., Peterson J.W., Chopra A.K., Singh A.K. Proteomic analysis of murine macrophages trated with *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Microb Pathogenesis*. 2006; 41: 157-167.

Shui W., Sheu L., Liu J., Smart B., Petzold C.J., Hsieh T., Pitcher A., Keasling J.D., Bertozzi C.R. Membrane proteomics of phagosomes suggest a connection to autophagy. *PNAS*. 2008; 105 (44): 16952-16957.

Stiles JK, Hicock PI, Shah PH, Meade JC. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999; 93: 781–807.

Thermo Scientific Pierce – Electrophoresis Technical Handbook. Version 2. Thermo Fisher Scientific Inc. 1601925 03/10. © 2010.

Vargas R, Botero L, Lagos L, Camacho M. *Bufo marinus* oocytes as a model for ion channel protein expression and functional characterization with electrophysiological studies. *Cel Physiol Biochem*. 2004; 14(486):197-202.

Vicente R, Escalada A, Coma M, Fuster G, Sánchez-Tilló E, López-Iglesias C, Soler C, Solsona C, Celada A, Felipe A. Differential voltage-dependent K^+ channel responses during proliferation and activation in macrophages. *J. Biol Chem*. 2003; 278(47): 46307-46320.

Vicente R., Escalada A., Villalonga N., Texidó L., Roura-Ferrer M., Martín-Satué M., López-Iglesias C., Soler C., Solsona C., Tamkun M.M., Felipe A. Association of Kv1.5 and Kv1.3 contributes to the major voltage-dependent K^+ channel in macrophages. *J Biol Chem*. 2006; 281(49): 37675-37685.

Vieira L, Lavan A, Dagger F, Cabantchik ZI. The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. J Biol Chem. 1994; 269(23):16254-16259.

Villalonga N., Escalada A., Vicente R., Sánchez-Tilló E., Celada A., Solsona C., Felipe A. Kv1.3/Kv1.5 heteromeric channels compromise pharmacological responses in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 352(4): 913-918.

Walker J.M. SDS Polyacrilamide Gel Electrophoresis of Proteins. The Protein Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1996.

Walker J.M. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. The Protein Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 1996

Wessel D. & Flügge U. A method for the Quantitative Recovery of protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Anal Biochem*. 1984; 138: 141-143.