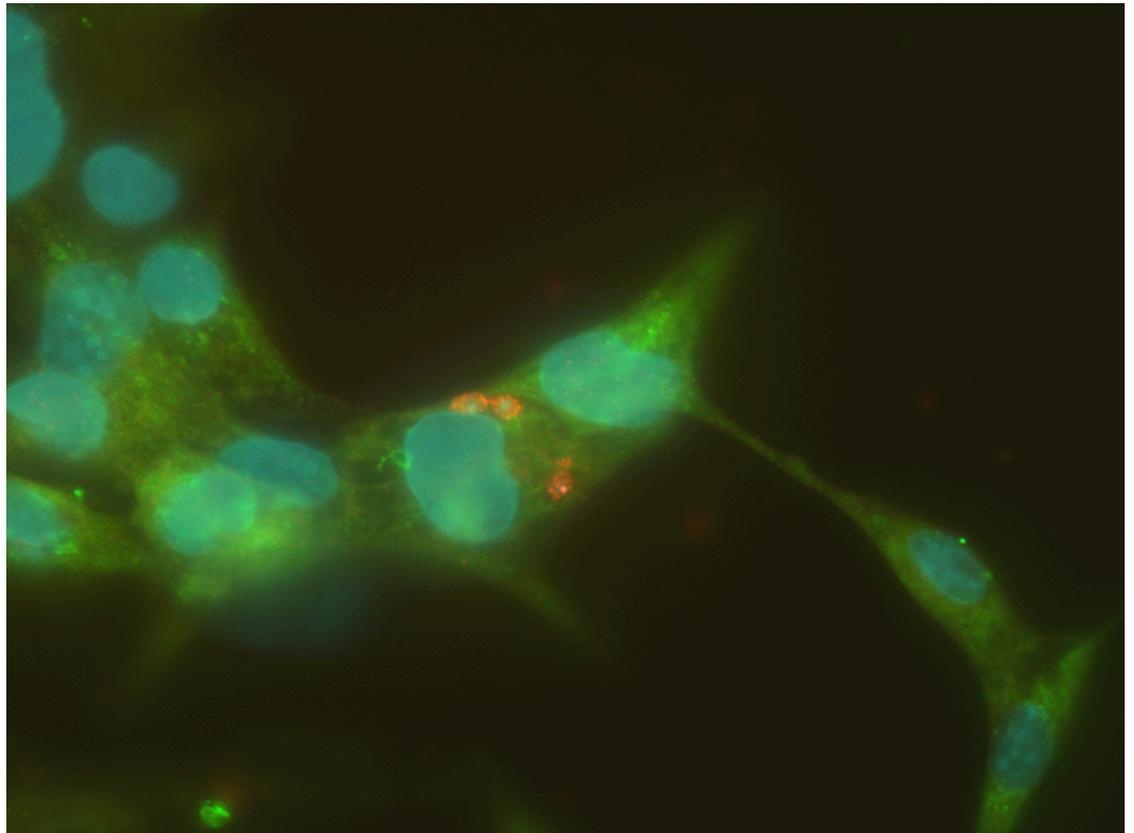


Montevideo,
Uruguay
2021

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA
PEDECIBA QUÍMICA – FACULTAD DE QUÍMICA

*Mecanismos redox de control y
persistencia parasitaria en la
infección por Trypanosoma cruzi.*



Carlos Damián Estrada Sosa

Orientadores: Dra. Lucía Piacenza

Dr. Rafael Radi

Departamento de Bioquímica - Facultad de Medicina

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)

Universidad de la República

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ANEXO – ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
<i>Enfermedad de Chagas y formación de oxidantes por el huésped vertebrado</i>	2
ENFERMEDAD DE CHAGAS	2
<i>Fases y progresión de la enfermedad</i>	3
<i>Patogenia de la enfermedad de Chagas</i>	3
CICLO DE VIDA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
<i>Establecimiento de la infección en el huésped vertebrado</i>	6
RESPUESTA OXIDATIVA DEL HUÉSPED VERTEBRADO	8
<i>Respuesta Inmune innata, primera línea de defensa del huésped vertebrado</i>	8
ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO Y DEL NITRÓGENO	11
<i>Especies reactivas del oxígeno</i>	12
<i>Señalización redox mediada por ROS</i>	27
<i>Especies reactivas del nitrógeno</i>	30
<i>Establecimiento de la infección y relevancia del sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i></i>	38
ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN	38
<i>Miocarditis crónica Chagásica</i>	38
SISTEMA ANTIOXIDANTE DE <i>T. CRUZI</i> – FACTORES DE VIRULENCIA	41
<i>Factores de virulencia</i>	41
<i>Sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i></i>	42
OBJETIVO	50
<i>Objetivos específicos:</i>	50
<i>CAPÍTULO 1: Rol de Fe-SODA y MPx de <i>T. cruzi</i> en modelos de infección celular y animal</i>	51
RESUMEN	52
RESULTADOS	53

Anexo - Abreviaturas

DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y ESTRÉS OXIDATIVO EN CARDIOMIOCITOS INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i>	53
<i>Función mitocondrial en cardiomiocitos infectados por T. cruzi</i>	53
<i>Generación de oxidantes en cardiomiocitos infectados por T. cruzi</i>	55
<i>Activación del factor de transcripción FOXO</i>	56
CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN PARASITARIA EN CARDIOMIOCITOS. INDUCCIÓN DE LA MCP EN AMASTIGOTAS INTRACELULARES.	57
<i>Rol del H₂O₂ en el control de la proliferación y MCP de amastigotas.</i>	57
<i>Rol del *NO en el control de la proliferación y la MCP de amastigotas.</i>	58
<i>Inducción de la MCP en T. cruzi por exposición a H₂O₂: Generación intra-mitocondrial de radical O₂^{*-}.</i>	61
MCP EN CEPAS SALVAJES DE <i>T. CRUZI</i> Y COMPROMISO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CARDIOMIOCITOS.	64
<i>Función mitocondrial de cardiomiocitos infectados por cepas salvajes TcVI y TcI.</i>	65
<i>MCP mediada por *NO y H₂O₂ en cepas salvajes de T. cruzi.</i>	66
CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN PARASITARIA EN MACRÓFAGOS. INFECCIÓN EN EL MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	67
<i>Control de la proliferación por macrófagos inmunoestimulados.</i>	67
<i>Infección en el modelo murino de la enfermedad de Chagas por parásitos salvajes y Fe-SODA.</i> ..	68
<i>Exposición de fosfatidilserina en el inóculo infectivo de parásitos salvajes y Fe-SODA</i>	69
DISCUSIÓN	72
CAPÍTULO 2: Restablecimiento del fenotipo virulento en modelos de infección celular y animal por la sobreexpresión de CPx en T. cruzi	78
RESUMEN	79
RESULTADOS	80
VIRULENCIA EN DIFERENTES CLONES DE LA CEPA DE <i>T. CRUZI</i> C8C3	80
<i>Infecciones en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.</i>	80
<i>Niveles de enzimas antioxidantes en los clones de alta y baja virulencia de la cepa C8C3</i>	81
RECUPERACIÓN DEL FENOTIPO VIRULENTO EN EL CLON C8C3LVIR POR LA SOBREENSPRESIÓN DE CPX.....	83
<i>Generación de parásitos C8C3lvir sobreexpresantes de CPx</i>	83
<i>Incremento en la proliferación de parásitos CPx sobreexpresantes en modelos celulares.</i>	84
<i>CPx factor de virulencia en infecciones al modelo murino.</i>	85
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	88
MATERIALES Y MÉTODOS	90

Anexo - Abreviaturas

REACTIVOS.....	90
CULTIVO DE PARÁSITOS Y DIFERENCIACIÓN EN EL ESTADIO INFECTIVO.....	92
<i>Cultivo de parásitos</i>	92
<i>Diferenciación en tripomastigotas metacíclicos</i>	93
<i>Western blot de enzimas antioxidantes</i>	93
CULTIVO DE CARDIOMIOCITOS E INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i>	94
<i>Purificación y cultivo de cardiomiocitos</i>	94
<i>Infección a cardiomiocitos por T. cruzi</i>	95
<i>Potencial de membrana mitocondrial en cardiomiocitos infectados por T. cruzi</i>	95
<i>Consumo de oxígeno en cardiomiocitos infectados por T. cruzi</i>	96
<i>Producción de H₂O₂ por cardiomiocitos infectados con T. cruzi</i>	97
RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN CARDIOMIOCITOS INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i>	97
<i>Activación del factor de transcripción FOXO</i>	97
<i>Expresión de los genes diana de FOXO</i>	98
MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN <i>T. CRUZI</i>	98
<i>Purificación de amastigotas intra-cardiomiocitos</i>	98
<i>Fragmentación del ADN y producción de radical superóxido en amastigotas intra-cardiomiocitos</i>	99
<i>Inducción de la MCP en epimastigotas de T. cruzi tratados con H₂O₂</i>	100
<i>Producción de radical superóxido en epimastigotes tratados con H₂O₂</i>	101
CULTIVO DE MACRÓFAGOS E INFECCIÓN POR <i>T. CRUZI</i>	102
<i>Cultivo de macrófagos</i>	102
<i>Infección a macrófagos por T. cruzi</i>	103
INFECCIÓN EXPERIMENTAL A RATONES.....	103
ÉTICA EN EL USO DE ANIMALES EN EL LABORATORIO.....	104
ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	104
AGRADECIMIENTOS.....	105
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
ARTÍCULO.....	139

ANEXO – ABREVIATURAS

2

2-OH-E⁺ 2-hidroxi-etidio.

3

3-NO₂-Tyr 3-nitrotirosina.

3-Cl-Tyr 3-clorotirosina.

4

4-HNE 4-hidroxinonenal.

8

8-oxoG 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanina.

α

αKGDH α-cetoglutarato deshidrogenasa.

A

AA Antimicina A.

ACN Acetonitrilo.

AV Anexina-V.

APx-CcP Ascorbato citocromo c peroxidasa.

AQP Acuaporina.

Asc Ascorbato.

B

BHI Medio de cultivo “*brain heart infusion*”.

C

CO₃^{•-} Radical carbonato

C_P Cys peroxidática

C_R Cys resolutive

CaM Calmodulina.

cGMP GMP cíclico.

Anexo - Abreviaturas

Cit c	Citocromo c.
CoQ	Coenzima Q.
complejo I	Complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa.
complejo II	Complejo succinato:ubiquinona oxidoreductasa.
complejo III	Complejo ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa.
Complejo IV	Complejo citocromo c oxidasa.
CPx	Peroxirredoxina citosólica.

D

DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DHE	Dihidroetidio.
dhAsc	Dihidroascorbato.
DMEM	Medio de cultivo " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> "
dPBS	Solución " <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i> "
DUOX	" <i>Dual oxidase</i> "

E

E ⁺	Etidio.
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial.

F

FAD	Flavín adenín dinucleótido.
FMN	Flavín mononucleótido.
Fe-SODA	Superóxido dismutasa mitochondrial.
Fe-SODB	Superóxido dismutasa citosólica.
FS	Fosfatidil-serina.
FCCP	Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona.

G

G418	Geneticina.
GSH	Glutación.
GSSG	Glutación disulfuro.
Glo I-II	Glioxalasa I y II.
GPx	Glutación peroxidasas.
Grx	Glutarredoxina.

Anexo - Abreviaturas

GspS Glutathionil-espermidina sintasa.

H

H₂O₂ Peróxido de hidrógeno.

HCO₄⁻ Peroximocarbonato.

HOCl Ácido hipocloroso

HRP Peroxidasa de rábano picante

HBSS *"Hanks' balanced salt solution"*.

I

IFN- γ Interferón-gamma.

IL-1 beta Interleuquina-1 β

iNOS Óxido nítrico sintasa inducible.

IP yoduro de propidio.

L

L[•] Radical lipídico.

LOO[•] Radical lipoperoxilo.

LOONO Ácido graso oxidado y nitrosilado.

LONO₂ Ácidos grasos nitrados.

L-NAME N ^{ω} -Nitro-L-arginina metil ester.

LPS Lipopolisacárido.

M

MAC *"Membrane attack complex"*.

MCP Muerte celular programada.

MDA Malondialdehído.

Met-SO Metionina sulfóxido.

MPO Mieloperoxidasa.

MPx Peroxirredoxina mitocondrial.

MSR Metionina sulfóxido reductasa.

N

Anexo - Abreviaturas

*NO	Óxido nítrico.
*NO ₂	Dióxido de nitrógeno.
NO ₂ ⁻	Nitrito.
NO ₃ ⁻	Nitrato.
NADH	Nicotin adenin dinucleótido.
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato.
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i> .
NF-κB	<i>“Nuclear factor-κB”</i> .
NOC-18	[2,2'-(hidroxinitrosohidrazino) bis-etanamina].
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal.
NOS	Óxido nítrico sintasa.
NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible.
NOX	NADPH oxidasa.
NOX2	NADPH oxidasa-2.

O

O ₂ ^{*-}	Radical superóxido.
HO ₂ [*]	Radical perhidroxilo.
*OH	Radical hidroxilo.
ONOO ⁻	Peroxinitrito anión.
ONOOH	Ácido peroxinitroso.
ONOCO ₂ ⁻	Nitroso-peroxo-carboxilato.
Oligo	Oligomicina.

P

PARP1	poli(ADP-ribosa) polimerasa 1.
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
Prx	Peroxirredoxina.

Q

Q [*]	Radical ubisemiquinona.
----------------	-------------------------

R

Anexo - Abreviaturas

RNS	Especies reactivas del nitrógeno.
ROS	Especies reactivas del oxígeno.
RNH ₂	Guanidino de la arginina.
RSH	Sulfhidrilo o tiol.
RS ⁻	Tiolato.
RSOH	Ácido sulfénico.
RS [•]	Radical tílo.
RSOO [•]	Radical sulfinilo.
RSNO	Nitrosotiol.
RSeH	Selenol.
RSeOH	Ácido selénico.
RnR	Ribonucleótido reductasa.
ROT	Rotenona.

S

SFB	Suero fetal bovino.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SHF	suero humano fresco.
SOD	Superóxido dismutasa.

T

TFA	Ácido trifluoroacético.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α .
TR	Tripanotona reductasa.
Trx	Tiorredoxina.
TrxR	Tiorredoxina reductasa.
TS	Tripanotona sintetasa.
TS ₂	Tripanotona oxidada.
T(SH) ₂	Tripanotona reducida.
TST	Tripanotona S-transferasa.
TXN	Triparredoxina.
TXN-S ₂	Triparredoxina oxidada.
Tyr [•]	Radical tirosilo.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* es considerada por la OMS como una enfermedad desatendida. A pesar de ser endémica en América Latina, se ha propagado y reportado con mayor frecuencia en zonas no endémicas acompañando la migración de poblaciones. La OMS ha estimado entre 6–7 millones de personas infectadas. A pesar de una respuesta inmune importante, *T. cruzi* logra evadir la misma persistiendo de forma crónica en los tejidos del huésped. Entre 30–40 % de los pacientes infectados desarrollan la enfermedad de Chagas crónica presentando trastornos cardíaco, digestivo, neurológico o mixtos. Variables como la carga parasitaria durante la fase aguda, el serotipo del parásito, la respuesta inmune montada y la presencia o ausencia de reinfección pueden influenciar el compromiso cardíaco durante la fase crónica. La cardiomiopatía chagásica se caracteriza por la persistencia del patógeno, presencia del infiltrado inflamatorio y destrucción progresiva de las células normales del miocardio. Los macrófagos y neutrófilos desempeñan un rol fundamental en el control de la proliferación y diseminación parasitaria a través de la fagocitosis, producción de especies reactivas y destrucción del parásito internalizado. El reconocimiento e internalización de *T. cruzi* por células fagocíticas determina la activación y ensamblaje del complejo enzimático NOX2 con la consiguiente producción intrafagosomal de grandes cantidades de radical $O_2^{\cdot-}$. Asimismo, la infección induce la inmunoestimulación mediada por citoquinas proinflamatorias promoviendo la expresión de la iNOS con la consecuente producción de $\cdot NO$. La producción simultánea de los radicales $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot NO$ lleva a la generación de peroxinitrito ($ONOO^-/ONOOH$), molécula con potente efecto citotóxico contra *T. cruzi*. El establecimiento de la infección dependerá de la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune montada por el huésped y sobrevivir al ambiente oxidativo, caracterizado por la presencia de H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$, $\cdot NO$ y peroxinitrito. *T. cruzi* posee un sistema antioxidante altamente eficiente para la detoxificación de especies reactivas, el cual se compone por una red de enzimas antioxidantes y tioles de bajo peso molecular. En esta tesis, evaluaremos el rol de los oxidantes generados por el huésped vertebrado en el control de la proliferación parasitaria y de las enzimas antioxidantes parasitarias Fe-SODA, CPx y MPx en la virulencia y persistencia de la infección en modelos celulares (cardiomiocitos y macrófagos) y en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas y formación de oxidantes por el huésped vertebrado.

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanomeasis americana es una dolencia potencialmente mortal causada por el parásito protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), la cual se describió por primera vez hace más de un siglo por el médico e investigador Carlos Chagas ¹. A pesar de ser una enfermedad endémica en América Latina, se ha propagado y reportado con mayor frecuencia en zonas no endémicas como Estados Unidos, Canadá, diversos países europeos y asiáticos; acompañando la migración de poblaciones entre América Latina y otros continentes ²⁻⁸. La organización mundial de la salud (OMS) ha estimado entre 6 y 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* ⁹. La transmisión de la enfermedad puede ser vectorial por insectos triatomíneos (principal vía en regiones endémicas) o no vectorial en pacientes que han recibido transfusión de sangre, trasplante de órganos, por vía congénita y vía oral por el consumo de alimentos o bebidas contaminados con *T. cruzi* ¹⁰⁻¹³. Actualmente, existen dos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad, nifurtimox (NFX) [(RS)-n-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina] y benznidazol (BZ) [n-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida], los cuales se encuentran disponibles comercialmente desde hace aproximadamente 50 años ¹⁴. Ambos fármacos son indicados tanto para la fase aguda como la fase crónica de la enfermedad. No obstante, dichos fármacos presentan una alta eficiencia administrados al inicio de la infección, mientras que durante la fase crónica poseen una baja eficiencia, deteniendo parcialmente el avance de la enfermedad. Además, dichos fármacos pueden generar efectos adversos complejos que llevan a la interrupción del tratamiento ^{14,15}. En este contexto, frente a la ausencia de vacuna para la enfermedad de

Chagas, la OMS ha propuesto como método preventivo el control vectorial y cribado de sangre en transfusiones y donación de órganos ⁹.

Fases y progresión de la enfermedad

La fase aguda de la enfermedad de Chagas se caracteriza por un gran número de parásitos circulantes en el torrente sanguíneo (parasitemia), dura aproximadamente de 3–8 semanas y generalmente, de forma asintomática o con síntomas leves e inespecíficos (fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolor muscular, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico). El 10% de los pacientes pueden presentar miocarditis y/o meningoencefalitis severas durante la fase aguda. La respuesta inmune adaptativa desencadenada por la presencia del parásito eventualmente controla la fase aguda de la infección, pero a menudo falla en la eliminación del parásito. Variables como la carga parasitaria durante la fase aguda, el serotipo del parásito, la respuesta inmune y la presencia o ausencia de reinfección pueden influenciar el compromiso cardíaco durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas ¹⁶. A pesar de una respuesta inmune importante, *T. cruzi* logra evadir la misma persistiendo de forma crónica en los tejidos del huésped. Luego de 10–20 años de la primera infección, entre el 30–40 % de los pacientes infectados desarrollan la enfermedad de Chagas crónica tanto en su manifestación cardíaca, digestiva como digesto-cardíaca.

Patogenia de la enfermedad de Chagas

El tejido cardíaco es uno de los principales blancos de invasión de *T. cruzi*, 20–30 % de los pacientes presentan miocarditis crónica chagásica. La cardiomiopatía chagásica se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio y destrucción progresiva de las células del miocardio, repercutiendo en la acumulación de colágeno a nivel intersticial y en alteración del sistema de conducción especializado ¹⁷. Dicha cardiomiopatía es compleja e involucra diversos factores dentro de los cuales podemos destacar la evasión parasitaria de la respuesta inmune montada por el huésped vertebrado, la interacción patógeno-huésped dependiente de factores genéticos (codificados por el huésped y el parásito) y procesos de auto-reactividad con generación de auto-anticuerpos ¹⁸. Pacientes infectados con tratamiento inmunosupresor presentan un gran aumento en la parasitemia demostrando el rol central de los mediadores

inmunes generados por el huésped en el control de la proliferación y persistencia parasitaria ¹⁶. Además, se ha observado una correlación positiva entre la inflamación y presencia de *T. cruzi* junto con la ausencia del parásito en zonas sanas del tejido cardíaco, apoyando la hipótesis de daño ocasionado por la presencia del patógeno durante la fase crónica de la enfermedad. La respuesta inflamatoria asociada a la persistencia parasitaria en bajos niveles genera una respuesta autoinmune en el tejido cardíaco debida a la estimulación antigénica continua o por miméticos de proteínas cardíacas y no cardíacas del huésped ^{19,20}. En cortes histológicos de corazones crónicos chagásicos se puede observar la destrucción de células del miocardio, fibrosis difusa, edema, infiltrado de células mononucleares y cicatrización del sistema de conducción. La progresión de la destrucción de las fibras cardíacas y la intensa fibrosis por reemplazo de miocitos muertos predispone al paciente a la insuficiencia cardíaca y arritmias ventriculares ¹⁶.

La manifestación digestiva presente en 15–20 % de los pacientes, se caracteriza por la dilatación del tracto gastrointestinal, en particular esófago y colon (principalmente sigmoide y recto) y desórdenes funcionales de vaciado gástrico, tránsito intestinal y evacuación de colon y vesícula ²¹. La inflamación crónica del plexo entérico y la degeneración de neuronas intestinales conducen a la pérdida del tono y subsecuente dilatación ^{22,23}.

En suma, la respuesta inmune aguda junto con la persistencia parasitaria son determinantes del daño a tejidos y órganos del huésped durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra el huésped invertebrado artrópodo hematófago triatomino donde el estadio no-infectivo epimastigota prolifera y se diferencia al estadio infectivo no-replicativo tripomastigota metacíclico a nivel del recto del insecto. Durante este proceso denominado metaciclogénesis, el parásito sufre importantes cambios tanto bioquímicos como morfológicos que le permiten adaptarse para invadir y sobrevivir en el ambiente hostil del huésped vertebrado. Los tripomastigotas metacíclicos, presentes en las heces del huésped triatomino, invaden el huésped vertebrado a través de las mucosas y/o heridas producidas en la piel, infectando diferentes tipos celulares incluyendo macrófagos, cardiomiocitos, fibroblastos y células musculares entre otras (Figura 1) ²⁴.

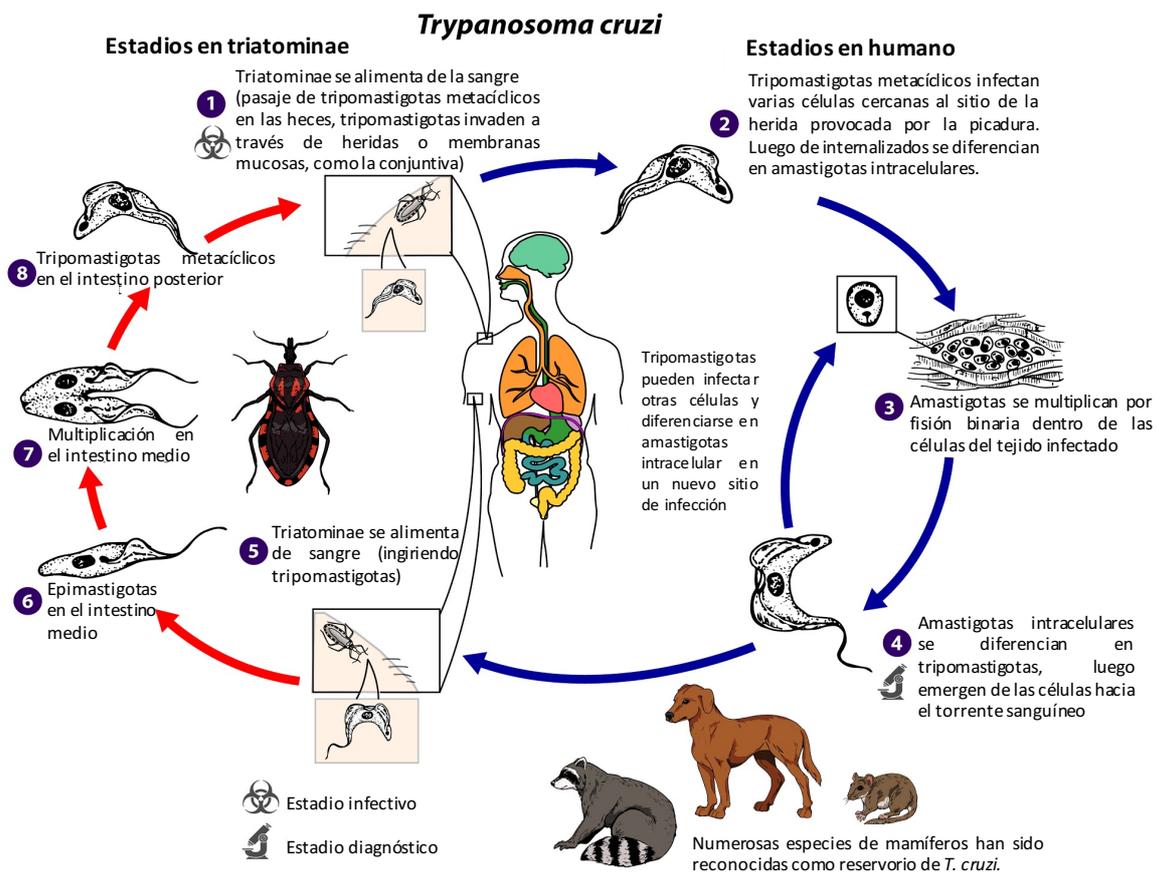


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, CDC).

Establecimiento de la infección en el huésped vertebrado

Invasión y escape de células fagocitos profesionales

Los macrófagos residentes en la piel y el tejido sub-mucoso, junto con los neutrófilos reclutados al sitio de invasión, forman parte de la primera línea de defensa en la respuesta inmune innata del huésped vertebrado ^{25,26}. Inicialmente, *T. cruzi* se adhiere a la membrana celular de fagocitos profesionales, donde se recubre por la membrana celular en el proceso de fagocitosis, invadiendo así el citosol dentro de la denominada vacuola parasitófora o fagosoma. A continuación, dicha vacuola se fusiona con los lisosomas, resultando en la liberación del contenido presente en este último dentro de la vacuola parasitófora ^{27,28}. Luego de la invasión, el estadio tripomastigota metacíclico debe sobrevivir y evadir el ambiente oxidativo generado dentro del fagolisosoma de los macrófagos activados para poder establecer la infección ²⁹. Aquellos parásitos que logren persistir a la acción microbicida de los macrófagos y neutrófilos podrán lisisar la vacuola parasitófora, diferenciarse al estadio amastigota y replicarse en el citosol celular. Esta serie de eventos, liberación de la vacuola y diferenciación al estadio amastigota, se encuentra señalizada de manera pH-dependiente a través del reclutamiento de lisosomas ^{27,30-32}. La disminución del pH induce la liberación de la neuraminidasa de la superficie de *T. cruzi*, la cual posteriormente remueve los residuos de ácido siálico de la membrana vacuolar, convirtiéndola en sensible a la acción de la proteína Tc-TOX ³³. Esta última, activa a pH bajos (pH 5,5), forma un poro en la membrana fagosomal y contribuye junto con otras enzimas secretadas en el escape de *T. cruzi* hacia el citosol ^{27,33-36}.

Invasión y escape de células no-fagocitos profesionales

T. cruzi es capaz de invadir un amplio rango de células nucleadas, desde fagocitos profesionales a células no fagocíticas. No obstante, células no fagocíticas como las musculares son el principal blanco durante la colonización del huésped vertebrado. Luego de la metacicloogénesis, los tripomastigotas metacíclicos expresan un conjunto de proteínas de superficie ausentes en el estadio epimastigota, las cuales resultan esenciales para la infección del huésped vertebrado³⁷. Recientemente, se ha propuesto un modelo de invasión de células no fagocíticas por *T. cruzi*. Dicho modelo propone una serie de pasos o eventos que se describen a continuación de forma resumida: **i)** El estadio tripomastigota de *T. cruzi* posee en la superficie o secreta factores que se unen a receptores presentes en la superficie de la célula huésped, conllevando a la transducción de señales que induce la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares. Simultáneamente, el parásito genera una pequeña herida sobre la membrana plasmática de la célula huésped provocando un flujo de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citoplasma. **ii)** El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmática en la célula huésped induce el reclutamiento y fusión de lisosomas en el sitio de anclaje de *T. cruzi* con liberación del contenido presente en el lumen lisosomal. **iii)** Se produce la liberación al medio extracelular de la enzima esfingomielinasa ácida, catalizando el clivaje de esfingomielina en ceramida, induciendo la endocitosis del parásito. **iv)** Durante el proceso de endocitosis, *T. cruzi* es internalizado en una vacuola formada por membrana plasmática y posiblemente parte de membrana lisosomal. **v)** En el medio intracelular, la membrana de la vacuola parasitófora se fusiona con más lisosomas, resultando la misma recubierta con marcadores lisosomales. Luego, *T. cruzi* permanece temporalmente dentro de la vacuola derivada de la membrana lisosomal^{38,39}. Finalmente, el escape de la vacuola parasitófora hacia el citosol y la posterior diferenciación al estadio replicativo amastigota ocurre a través de un mecanismo dependiente de la acidificación de la vacuola³¹.

Respuesta oxidativa del huésped vertebrado

Respuesta Inmune innata, primera línea de defensa del huésped vertebrado.

Los macrófagos y neutrófilos cumplen un rol fundamental en el control de la proliferación y diseminación parasitaria a través de la fagocitosis, producción de especies reactivas y destrucción del parásito internalizado ^{25,26,40,41}. Durante el proceso de reconocimiento e internalización de *T. cruzi* por fagocitos profesionales, el complejo enzimático NADPH oxidasa 2 (NOX2) asociado a la membrana plasmática se ensambla con las subunidades citoplasmáticas y se activa llevando a la producción intrafagosomal de grandes cantidades de radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) durante un tiempo sostenido de 60–90 min, a través del proceso denominado “estallido respiratorio” ^{42–45}. Además, la infección por patógenos induce la estimulación de fagocitos profesionales mediada por citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β) promoviendo la expresión de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS, NOS2) con la consecuente producción de óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) ^{46–50}. En este contexto inflamatorio, el radical $O_2^{\bullet-}$ generado puede seguir diferentes vías: **i)** Dismutar de forma espontánea o por acción de las enzimas superóxido dismutasas (SODs) con la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ^{51,52}, **ii)** a pH ácido, protonarse rindiendo el correspondiente radical neutro perhidroxilo (HO_2^{\bullet}) capaz de difundir hacia el patógeno ^{53,54} o **iii)** reaccionar con $^{\bullet}NO$ generando peroxinitrito ($ONOO^-/ONOOH$) (reacción controlada por difusión), molécula con potente efecto citotóxico contra *T. cruzi* ^{40,42,55}. El peroxinitrito puede reaccionar con elementos de la superficie del patógeno o difundir dentro de este promoviendo su toxicidad ⁵⁶. El poder citotóxico del peroxinitrito en *T. cruzi* ha sido demostrado por la completa destrucción de la estructura parasitaria (Figura 2), así como la detección de oxidación y nitración de residuos de tirosina de proteínas dentro del fagosoma de macrófagos murinos inmuoestimulados ⁵⁵.

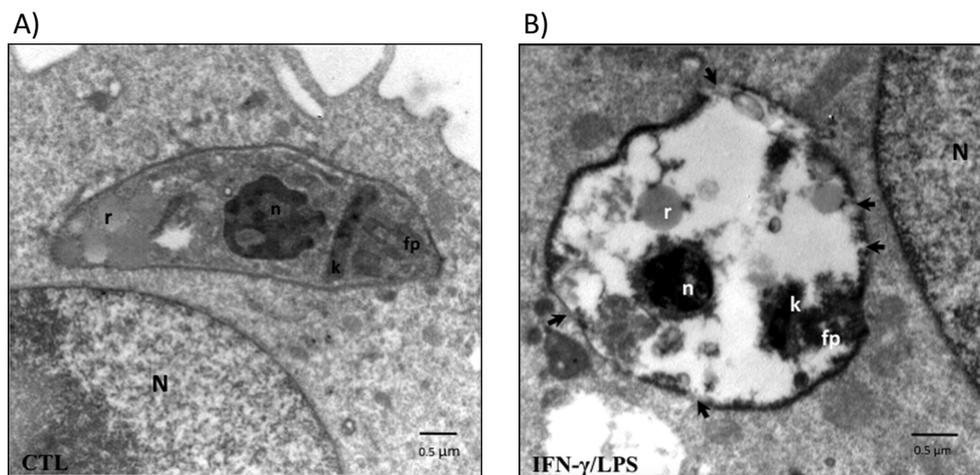


Figura 2. Microscopía electrónica de macrófagos infectados con *T. cruzi*. (A) Macrófagos no-inmunoestimulados (CTL) y (B) Macrófagos inmunoestimulados con interferón- γ y lipopolisacáridos (IFN- γ /LPS); 1 h post-infección con *T. cruzi*. Las flechas en el panel derecho indican la interrupción o daño de la integridad de membrana. N y n: son el núcleo del macrófago y *T. cruzi*, respectivamente; k: kinetoplasto; fp: bolsillo flagelar; r: reservosomas. (Adaptado Alvarez M.N. et al., 2011) ⁵⁵.

En particular, la dosis letal (DL_{100}) para *T. cruzi* por peroxinitrito (0,6 fmol/parásito) es significativamente menor que la reportada para H_2O_2 (50-100 fmol/parásito) ⁵⁶. Luego del estallido respiratorio, el complejo NOX2 se desactiva, mientras que la producción de $\cdot NO$ por la iNOS se mantiene durante varias horas (~ 24 h) ⁵⁷. En este contexto, el $\cdot NO$ puede difundir dentro del parásito fagocitado reaccionando con blancos parasitarios induciendo toxicidad a través de un desbalance energético, inhibición de la síntesis de ADN, formación de S-nitrosotioles, oxidación de proteínas y finalmente muerte celular del patógeno ⁵⁶. Los macrófagos deficientes en iNOS son altamente susceptibles a la infección por *T. cruzi*, posiblemente debido a la incapacidad de generar peroxinitrito en ausencia de $\cdot NO$ ⁵⁸. De esta manera, el control parasitario previo a la evasión, escape del fagosoma y establecimiento del parásito en el citosol celular, depende en gran medida de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, como: $O_2^{\cdot -}/HO_2^{\cdot}$, H_2O_2 , $\cdot NO$ y $ONOO^-$ (Figura 3) ^{54,55,59,60}.

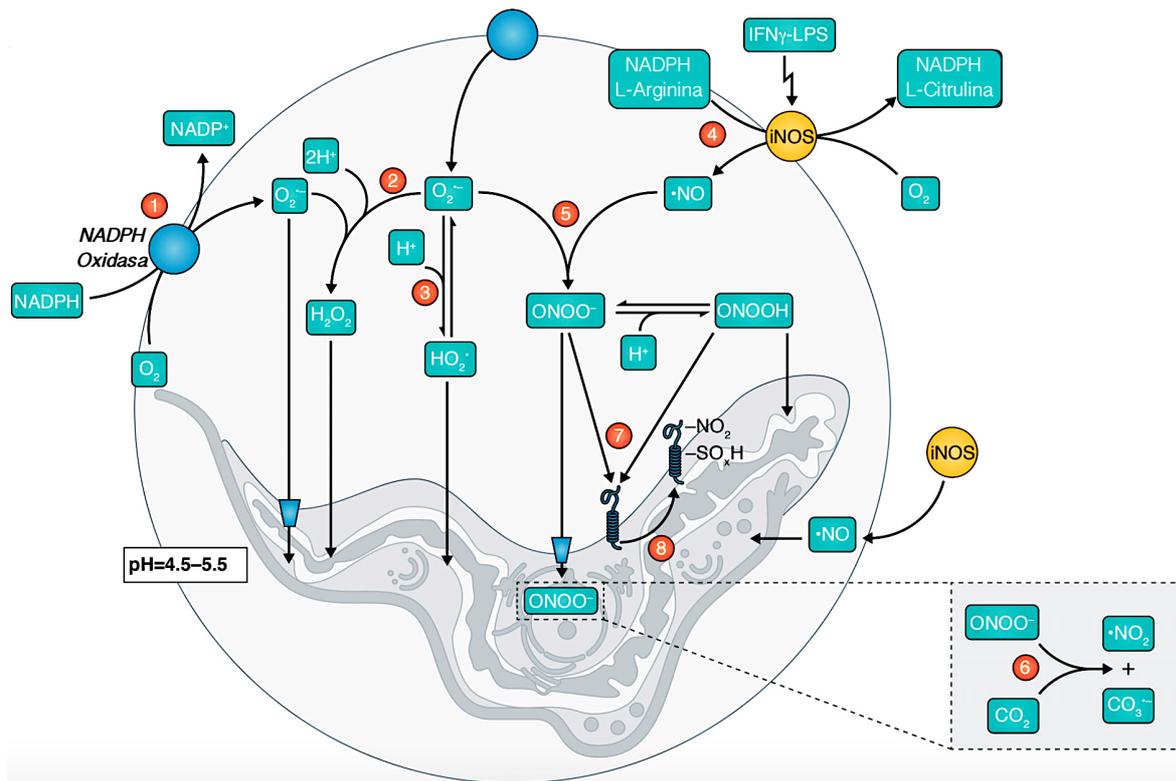


Figura 3. Producción intrafagosomal de especies reactivas derivadas del oxígeno y nitrógeno por macrófagos infectados. (1) La activación de la NADPH oxidasa (NOX) (círculo azul) anclada en la membrana de la vacuola parasitófora conlleva a la producción de $O_2^{\bullet-}$. (2) El $O_2^{\bullet-}$ dismuta a H_2O_2 o (3) se protona generando HO_2^{\bullet} (radical perhidroxilo). (4) La estimulación del macrófago induce la expresión de la iNOS (círculo amarillo) y la consecuente producción de $\bullet NO$. (5) La producción simultánea de los radicales $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$ y la reacción controlada por difusión entre ambos determinan la generación de $ONOO^-$, el cual se encuentra en equilibrio con la forma protonada $ONOOH$. (6) El $ONOO^-$ difunde a través de la membrana parasitaria y reacciona con CO_2 generando las especies $CO_3^{\bullet-}$ (radical carbonato) y $\bullet NO_2$ (radical dióxido de nitrógeno). (7) Las especies $ONOO^-$ y $ONOOH$ promueven la oxidación y (8) nitricación de proteínas. Las especies $O_2^{\bullet-}$ y $ONOO^-$ difunden hacia dentro del parásito a través de canales aniónicos (trapezoides azules). (Adaptado Piacenza L. et al., 2019)⁵⁶.

A continuación describiremos en mayor profundidad las principales características y blancos de reacción de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno, responsables del control parasitario.

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno.

Las especies reactivas pueden clasificarse en dos grandes grupos denominados especies reactivas derivadas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*) y del nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species, RNS*) (Figura 4). A pesar de ser agrupadas bajo un mismo término ROS o RNS, las especies en cuestión difieren en sus propiedades químicas y físicas. Estas especies se pueden clasificar como: *ij*) oxidantes fuertes o débiles, *ii*) radicalarias o no radicalarias, *iii*) cargadas o neutras y *iv*) de alta o baja permeabilidad de membrana. Además, la capacidad de reaccionar con los diferentes antioxidantes varía entre las diferentes especies. Las especies radicalarias participan en reacciones de oxidación por un electrón mientras que las no radicalarias participan en oxidaciones por dos electrones. Cabe destacar que el impacto biológico depende de la especie y del compartimento celular donde se genere la misma ⁶¹⁻⁶³.

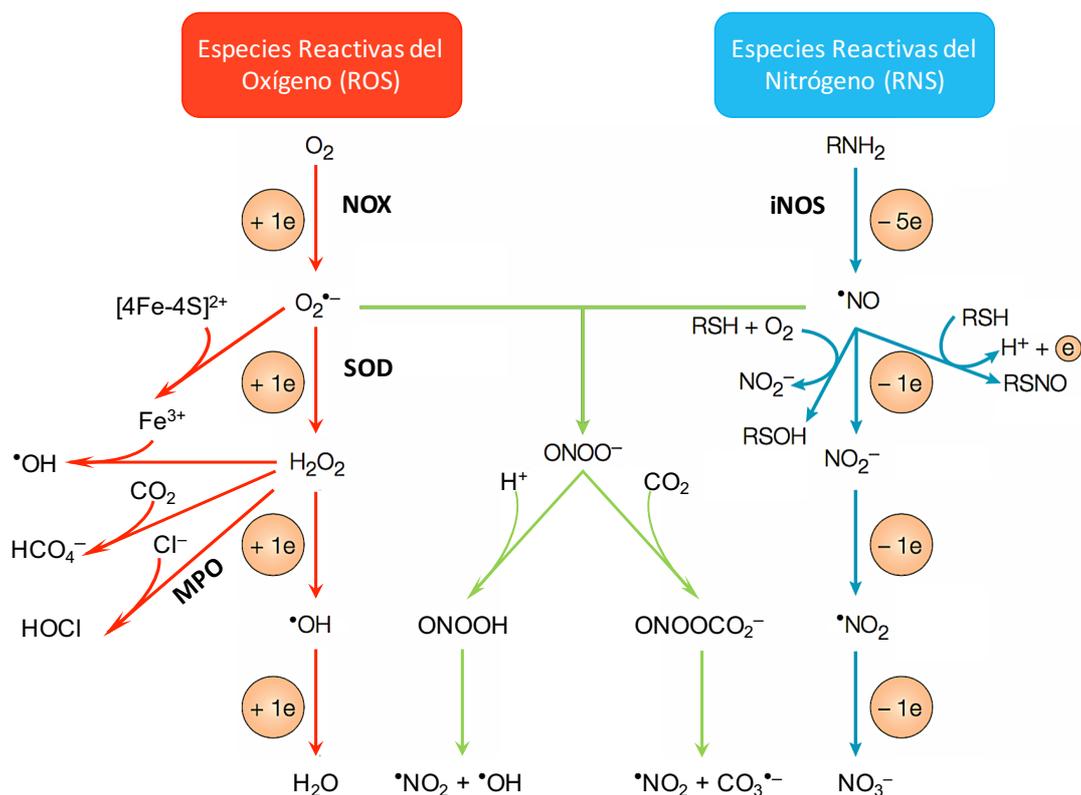


Figura 4. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno producida por células de mamíferos en respuesta a la infección por *T. cruzi* y la estimulación por citoquinas proinflamatorias. NOX: NADPH oxidasa, iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, SOD: superóxido dismutasa, MPO: mieloperoxidasa, O₂: oxígeno, O₂^{•-}: radical superóxido, H₂O₂: peróxido de hidrógeno, •OH: radical hidroxilo, HCO₄⁻: peroximonocarbonato, HOCl: ácido hipocloroso, H₂O: agua, RNH₂: grupo guanidino de la arginina, •NO: óxido nítrico, RSH: grupo sulfhidrilo, RSOH: ácido sulfénico, RSNO: nitrosotiol, NO₂⁻: nitrito, •NO₂: radical dióxido de nitrógeno, NO₃⁻: nitrato, ONOO⁻: peroxinitrito anión, ONOOH: ácido peroxinitroso, CO₂: dióxido de carbono, ONOOCO₂⁻: nitroso-peroxo-carboxilato, CO₃^{•-}: radical carbonato. (Adaptado Fang F.C. et al., 2004) ⁶⁴.

Especies reactivas del oxígeno

El término ROS abarca un amplio rango de especies reactivas generadas a partir de la reducción del oxígeno molecular (O_2). El O_2 puede aceptar cuatro electrones a través de cuatro pasos de reducción por un electrón, rindiendo de manera secuencial los productos: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$ (radical hidroxilo) y H_2O (Figura 5).

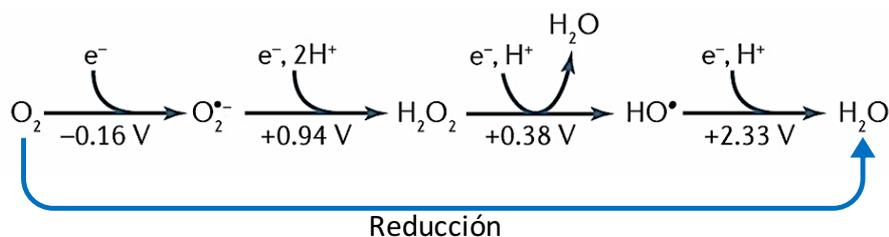


Figura 5. Estados de reducción del oxígeno molecular con sus respectivos potenciales de reducción estándar (E^0). Radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\bullet OH$) y agua (H_2O). (Adaptado Imlay J.A. et al., 2013) ⁶⁵.

Radical superóxido

El radical aniónico $O_2^{\bullet-}$ se genera a través de la reducción univalente de O_2 (Ecuación 1).



El O_2 es un diradical estable que posee dos electrones (e^-) desapareados en orbitales pi antienlazantes (π^*) (Figura 6), los cuales puede interaccionar con electrones desapareados de metales de transición o radicales orgánicos llevando a la generación $O_2^{\bullet-}$.

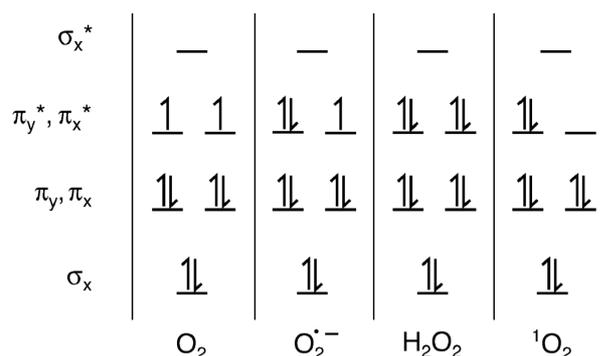


Figura 6. Diagrama de orbitales moleculares del O_2 , $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y 1O_2 (oxígeno singulete). (Adaptado Imlay J.A. et al., 2003) ⁶⁶.

El $O_2^{\bullet-}$ puede reducirse a H_2O_2 ($E^0(O_2^{\bullet-}/H_2O_2) = +0,94V$) o bien puede actuar como agente reductor, oxidándose y rindiendo O_2 ($E^0(O_2/O_2^{\bullet-}) = -0,35V$). La carga negativa del $O_2^{\bullet-}$ repercute directamente en una baja permeabilidad de membrana. A pesar de que el $O_2^{\bullet-}$ puede atravesar membranas biológicas a través de canales aniónicos dicho proceso es poco

eficiente. De esta manera, los principales blancos de reacción quedan limitados a los presentes en el sitio de producción ⁶³.

Radical perhidroxilo

La especie aniónica $O_2^{\bullet-}$ se encuentra en equilibrio con la forma protonada HO_2^{\bullet} ($pK_a = 4,69 - 4,88$) ^{53,67}. El HO_2^{\bullet} es un oxidante fuerte y neutro capaz de atravesar las membranas biológicas. A pH 7, el HO_2^{\bullet} representa menos del 1 % ⁶⁸, limitando así su impacto a nivel citoplasmático. No obstante, dentro del fagosoma (pH= 5–6) en donde se genera una alta concentración de $O_2^{\bullet-}$ producto de la activación de la NADPH oxidasa (como discutiremos posteriormente), la concentración de HO_2^{\bullet} se torna relevante ^{41,69,70}. La generación de HO_2^{\bullet} a nivel del fagosoma contribuye a la permeación y posterior desprotonación del mismo dando $O_2^{\bullet-}$ dentro del citoplasma del patógeno fagocitado ⁵⁴.

Fuentes biológicas de radical superóxido

Los sistemas biológicos pueden generar $O_2^{\bullet-}$ a partir de fuentes exógenas o endógenas. Las principales fuentes exógenas son las radiaciones UV e iónicas y xenobióticos con actividad redox. Asimismo, el $O_2^{\bullet-}$ se puede generar de manera endógena por enzimas (ej: xantina oxidasa) y complejos multienzimáticos especializados (NADPH oxidasas), como producto secundario del metabolismo (cadena respiratoria) y asociado a determinadas condiciones patológicas ^{42,63,71–74}.

A continuación describiremos algunas de las fuentes endógenas de $O_2^{\bullet-}$ más relevantes desde el punto de vista biológico.

Mitocondria

La mayor parte del O_2 consumido por la mitocondria se reduce a H_2O por el complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, la respiración celular es una de las principales fuentes fisiológicas de $O_2^{\bullet-}$. El flujo de formación de $O_2^{\bullet-}$ depende de las concentraciones locales del potencial donador de electrones y del O_2 y de la constante de reacción de segundo orden que presentan los mismos ⁷⁵.

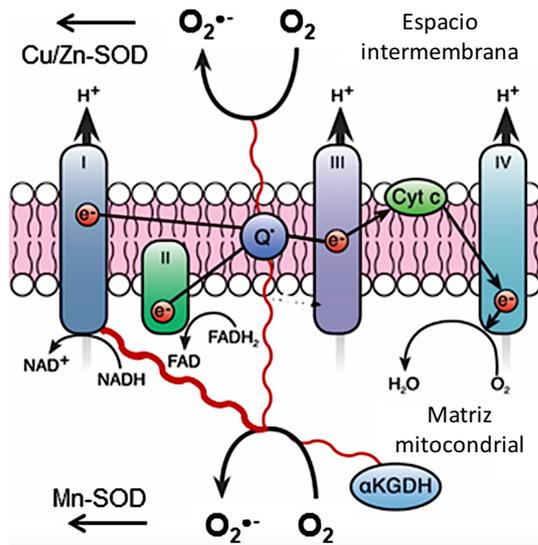


Figura 7. Producción mitocondrial de radical superóxido. La principal fuente de $O_2^{\bullet-}$ es el complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa), representado por una línea roja más gruesa, y en menor medida el radical ubisemiquinona (Q^{\bullet}) y como producto de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KGDH). La enzima Mn-SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ generado en la matriz mitocondrial, mientras que la Cu/Zn-SOD dismuta el $O_2^{\bullet-}$ generado en el espacio intermembrana. (Adaptado Winterbourn C.C. et al., 2020) ⁶³.

Se estima que entre 0,01–0,35 % del O_2 consumido en la respiración mitocondrial deriva en la formación de $O_2^{\bullet-}$ ^{76,77}. No obstante, en condiciones patológicas se puede observar un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ a nivel de la matriz mitocondrial, asociado a una disfunción mitocondrial ^{72,78}. Existen varios centros a nivel mitocondrial capaces de generar $O_2^{\bullet-}$, uno de los principales sitios es el complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) (Figura 7), pero también los complejos succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II) y ubiquinona:citocromo c oxidoreductasa (III) son capaces de producir $O_2^{\bullet-}$ ^{76,78,79}. La producción de $O_2^{\bullet-}$ por transporte reverso de electrones en el complejo I responde a cambios en la concentración de O_2 , la magnitud de la fuerza protón-motriz y del estado redox de los *pools* de NADH (nicotin adenin dinucleótido) y CoQ (coenzima Q) ⁸⁰.

NADPH oxidasas

Las enzimas NADPH oxidasas (NOXs) son complejos proteicos asociados a membrana que catalizan la transferencia de un electrón proveniente del NADPH al O_2 , reduciendo este último a $O_2^{\bullet-}$. El flujo de electrones unidireccional desde el NADPH hasta el O_2 se produce a través de la membrana, y por tanto, el $O_2^{\bullet-}$ se libera al otro lado de la membrana (Figura 8) ⁸¹. La familia de las enzimas NOX se compone por 5 miembros (NOX1–5) mientras que la familia homóloga DUOX (*dual oxidase*) presenta 2 miembros (DUOX1–2). Los miembros de la familia NOX-DUOX se caracterizan por contener citocromo b y una flavoproteína y difieren en las subunidades reguladoras, localización celular y mecanismos de activación ^{82,83} (Figura 7).

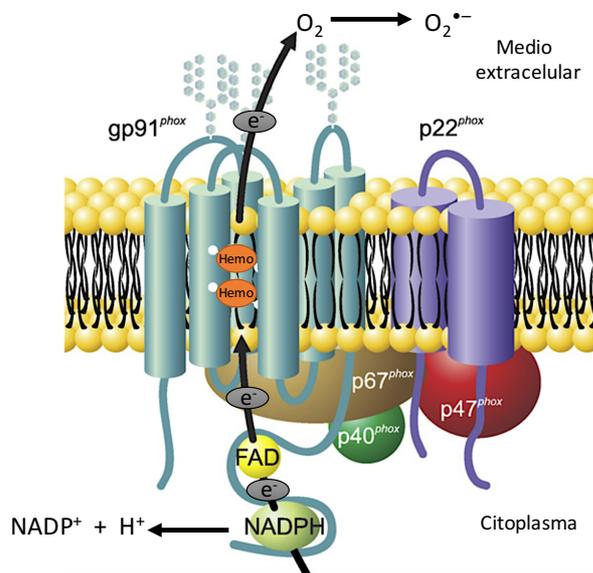
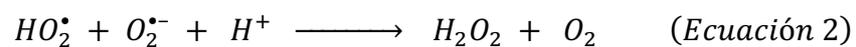


Figura 8. NADPH oxidase 2 ensamblada en la membrana de fagocitos profesionales. El complejo NOX2 está constituido por un heterodímero, localizado en la membrana, de gp91^{phox} (flavocitocromo b₅₅₈) y p22^{phox}. La activación induce el reclutamiento de las subunidades citosólicas (p40^{phox}, p47^{phox} y p67^{phox}) hacia la membrana. El NADPH se oxida al transferir de a un electrón (2e⁻/NADPH) a través de la membrana vía el FAD y dos Hemos no equivalentes. Estos e⁻ son aceptados por el O₂, reduciéndose a O₂^{•-} en la superficie externa de la membrana. (Adaptado Nauseef W.M. et al., 2014) ⁸⁴.

Las NOXs participan de diversas funciones fisiológicas dentro de las cuales podemos destacar: defensa contra patógenos, procesamiento postraduccional, señalización celular, regulación de la expresión génica y diferenciación celular. Además, la deficiencia o aumento en la actividad NOX se puede asociar con una amplia variedad de procesos patológicos ⁷¹. A pesar de que todos los miembros de la familia NOX-DUOX generan O₂^{•-}, NOX4 y DUOX 1–2 reducen el O₂^{•-} a H₂O₂ antes de que sea liberado del sitio activo ⁸⁵. De esta manera, las diferentes isoformas NOXs contribuyen a la generación local de O₂^{•-} y H₂O₂ en los diferentes compartimentos celulares donde pueden desencadenar una respuesta fisiológica o patológica ⁸⁶.

Detoxificación del radical superóxido

El $O_2^{\bullet-}$ es un radical inusual, a pesar de presentar un gran potencial de reducción, oxida relativamente pocos compuestos biológicos⁸⁷. Esto se explica parcialmente por la presencia de la carga negativa que limita la reacción con centros ricos en electrones y por la rápida dismutación tanto espontánea como catalizada por las diferentes isoenzimas de superóxido dismutasas (SODs)⁸⁸. La reacción de dismutación espontánea ocurre entre los radicales superóxido y perhidroxilo, más que entre dos radicales superóxido (Ecuación 2).



Por lo tanto, el $O_2^{\bullet-}$ presenta una mayor velocidad de dismutación espontánea a pH 4,8, mientras que a pH > 10 exhibe un tiempo de vida media mayor. A nivel fisiológico, la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ ocurre principalmente a través de la reacción catalizada por las isoenzimas SODs⁶³.

Superóxido dismutasas

Las diferentes isoformas de SODs cumplen un rol esencial protegiendo a la célula de efectos deletéreos desencadenados por el $O_2^{\bullet-}$. Las diferentes isoenzimas catalizan la eliminación de $O_2^{\bullet-}$ con la consiguiente generación de H_2O_2 y O_2 . Existen 3 familias de SODs, las cuales pueden contener centro metálico de Cu/Zn (cobre/zinc), Mn (manganeso) o Fe (hierro) y Ni (níquel)⁸⁹. Las diferentes SODs presentan un mecanismo catalítico similar y una elevada constante de reacción de segundo orden ($k \approx 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)⁵¹. En mamíferos se encuentran las isoformas Cu/Zn-SOD (SOD1) presente en núcleo, citoplasma y espacio intermembrana mitocondrial y la Mn-SOD (SOD2) presente en la matriz mitocondrial. La isoforma Fe-SOD, se encuentra ausente en vertebrados y presente en microorganismos como por ejemplo *E. coli* y *T. cruzi*. De esta manera, las isoformas de Fe-SODs resultan ser un interesante blanco quimioterapéutico para el diseño de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas^{90,91}. No obstante, el sitio activo de las Mn-SOD y de las Fe-SOD se encuentra conservado y ambas isoformas presentan una alta homología estructural^{89,92}, lo cuál dificulta la búsqueda de inhibidores específicos.

Reacción con antioxidantes

Otra mecanismo de evasión del daño ocasionado por $O_2^{\bullet-}$ es la reacción directa con moléculas antioxidantes. A pesar de que el $O_2^{\bullet-}$ presenta una velocidad de reacción considerable con ascorbato, la reacción con glutatión reducido (GSH) y otros antioxidantes clásicos es lenta ^{63,93,94}.

Efectos citotóxico del radical superóxido

La gran velocidad de dismutación del radical $O_2^{\bullet-}$ por las SODs limita los blancos biológicos de reacción, como mencionamos previamente. Sin embargo, en condiciones patológicas en las que se observa un incremento en la producción de $O_2^{\bullet-}$ otras reacciones se pueden tornar relevantes. Cabe destacar la reacción con enzimas que presentan clústeres hierro-azufre (Fe-S) o centros con metales de transición y con otras especies radicalarias ⁶⁶.

A continuación describiremos algunas de la reacciones del $O_2^{\bullet-}$ con mayor relevancia biológica asociadas a los efectos tóxicos o deletéreos de dicha especie.

Inactivación de Proteínas con clúster Fe-S

El $O_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con clústeres Fe-S presentes en diferentes deshidratasa como la aconitasa y la fumarasa, inactivando rápidamente a dichas enzimas ($k \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ^{95,96}. El mecanismo de reacción involucra la atracción electrostática del $O_2^{\bullet-}$ al clúster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ expuesto al solvente, la protonación del $O_2^{\bullet-}$ convirtiéndose en un oxidante univalente fuerte y la abstracción de un electrón. La oxidación del clúster de Fe-S lo vuelve inestable conllevando a la pérdida del átomo de hierro ferroso (Fe^{2+}) que participa en la coordinación del sustrato, generando así la especie $[3\text{Fe-4S}]^+$ e inactivando a la enzima (Figura 9) ^{65,97}.

Por otra parte, el Fe^{2+} liberado puede reaccionar con H_2O_2 (producto de la dismutación de $O_2^{\bullet-}$) generando como producto $\bullet\text{OH}$ a través de la denominada reacción de Fenton ^{62,66,98}. En la sección correspondiente al H_2O_2 profundizaremos en la reacción de Fenton y retomaremos la inactivación de enzimas con cluster Fe-S.

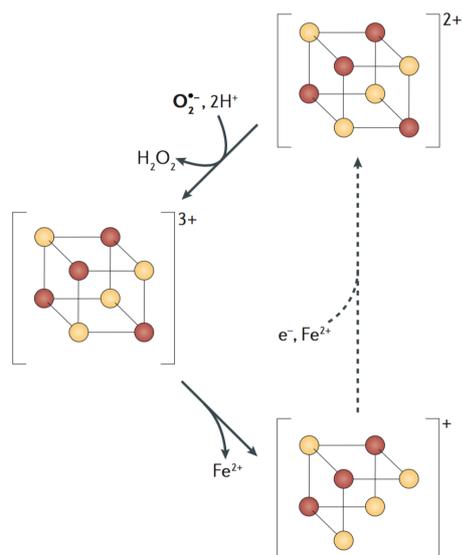


Figura 9. Inactivación de enzimas con clústeres Fe-S por O₂^{•-}. La oxidación del clúster [4Fe-4S]²⁺ por O₂^{•-} determina la formación de H₂O₂ y la conversión del clúster a la forma inestable [4Fe-4S]³⁺, el cual posteriormente libera un átomo de Fe²⁺ produciendo la inactivación de la enzima deshidratasa. La línea punteada representa los pasos involucrados en la reparación del clúster [4Fe-4S]²⁺. (Adaptado Imlay J.A. et al., 2013) ⁶⁵.

Reacción con radicales

El O₂^{•-} reacciona con otros radicales (ej: radical fenoxilo) a una velocidad cercana al límite de difusión. La reacción entre especies radicalarias se puede considerar un mecanismo de reparación o “*quenching*” del radical a través del cual se genera el compuesto original (Figura 10A). Sin embargo, la adición de O₂^{•-} puede generar el hidroperóxido correspondiente como producto secundario de oxidación (Figura 10B). La contribución relativa de estas reacciones depende de los potenciales reducción de estas ⁹⁹.

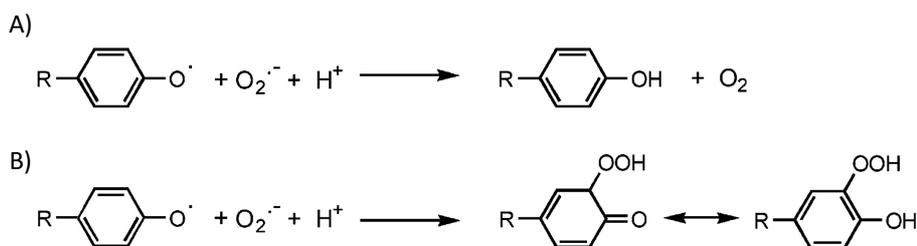


Figura 10. Reacción entre los radicales superóxido y fenoxilo. (A) Reacción de reparación y generación del compuesto original. (B) Reacción de adición con formación del hidroperóxido correspondiente. (Adaptado de Winterbourn C.C. & Kettle A.J., 2003) ⁹⁹.

Actualmente, existen diversas sondas redox diseñadas para la detección de O₂^{•-} basadas en reacciones del tipo radical-radical, las cuales profundizaremos en la sección detección de radical superóxido.

Reacción con metales de transición, hemo- y metaloproteínas

Los metales de transición con actividad redox, como hierro y cobre, pueden aceptar o donar electrones. Por lo tanto, dichos metales pueden generar o eliminar radicales libres, actuando como pro- o anti-oxidantes respectivamente. En este sentido, se ha reportado la reducción del hierro en estado férrico (Fe^{3+}) presente en hemoproteínas como citocromo c (cit c) por $\text{O}_2^{\bullet-}$ ^{63,100,101}. Además, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con varios estados de oxidación de la enzima mieloperoxidasa presente en el neutrófilo, así como con la hemoglobina y la catalasa aunque la reacción con estas últimas es lenta ^{41,63}. Por último, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede inactivar enzimas no-redox de *E. coli* que utilizan el Fe^{2+} como cofactor catalítico (ej: ribulosa-5-P, 3-epimerasa y treonina deshidrogenasa) ¹⁰².

Detección de radical superóxido

Se han desarrollado sondas de detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ como la lucigenina o el dihidroetidio (DHE o HE) basadas en el mecanismo de reacción del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ ^{103,104}. A pesar de la disponibilidad de diferentes sondas para la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ cabe destacar que se debe considerar el sistema generador de dicha especie reactiva para seleccionar correctamente la sonda y el método de detección a utilizar. En este sentido, existe una amplia bibliografía que destaca la especificidad del DHE para la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en sistemas biológicos con respecto a otras sondas que pueden presentar artefactos ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La principal ventaja de utilizar la sonda DHE es la formación del producto específico de reacción con $\text{O}_2^{\bullet-}$, denominado 2-OH-etidio (2-OH- E^+) (Figura 11), el cual se puede detectar por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *high performance liquid chromatography*) o cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masa (LC-MS, *liquid chromatography - mass spectrometry*). La reacción del DHE con oxidantes de un electrón genera el intermediario radical catiónico $\text{DHE}^{\bullet+}$, el cual puede generar diferentes productos dependiendo de las condiciones de reacción. En presencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se genera la adición del mismo al intermediario $\text{DHE}^{\bullet+}$ produciendo específicamente 2-OH- E^+ , mientras que en ausencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se genera etidio (E^+) o productos diméricos (DHE-DHE, DHE- E^+ y E^+ - E^+) (Figura 11) ¹⁰⁸.

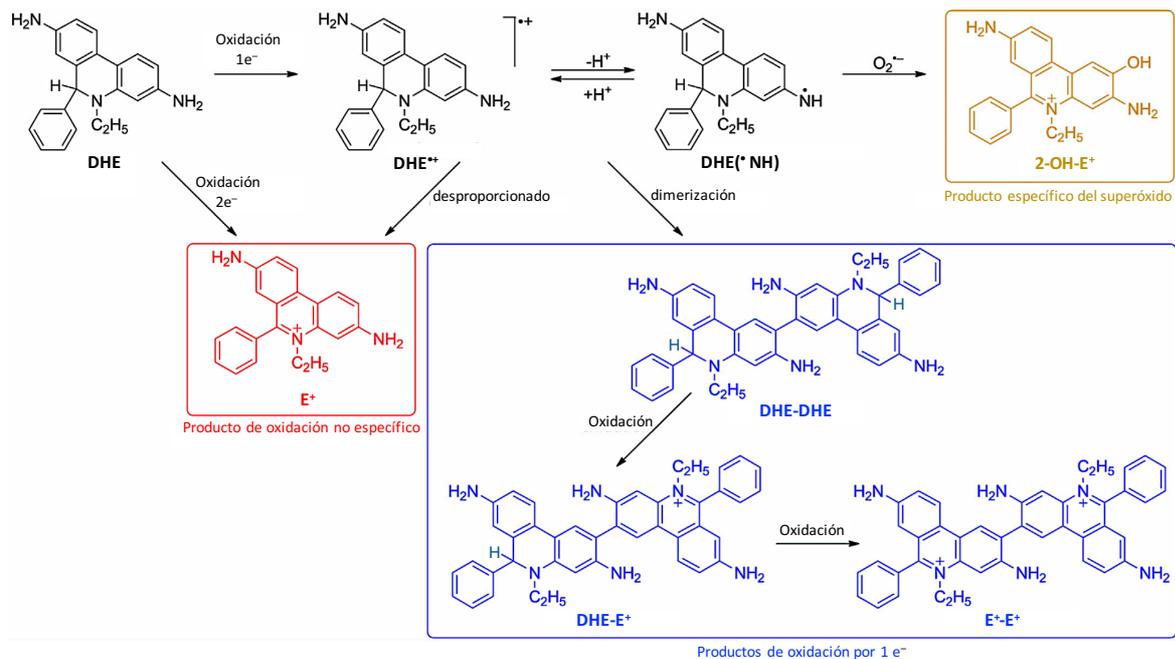


Figura 11. Vías de oxidación por uno y dos electrones de la sonda dihidroetidio. (Adaptado Michalski R. et al., 2014) ¹⁰⁹.

Peróxido de hidrógeno

El H₂O₂ es una especie no radicalar derivada de la reducción del O₂ (ROS) (Figura 4 y 5). A pesar de que el H₂O₂ es un oxidante fuerte de dos electrones presenta una alta energía de activación que limita sus blancos biológicos, siendo relativamente estable. Los principales blancos de reacción son centros con metales de transición y compuestos o moléculas que contienen azufre y selenio ^{86,110}.

Fuentes biológicas de H₂O₂

Las principales fuentes biológicas de H₂O₂ son la familia de enzimas NOXs y la cadena de transporte de electrones, en asociación con las SODs ^{75,86,111}. Además, el H₂O₂ se puede generar por varias oxidasas presentes en diferentes compartimentos celulares, principalmente a nivel de retículo endoplasmático y el peroxisoma (Figura 12) ⁸⁶

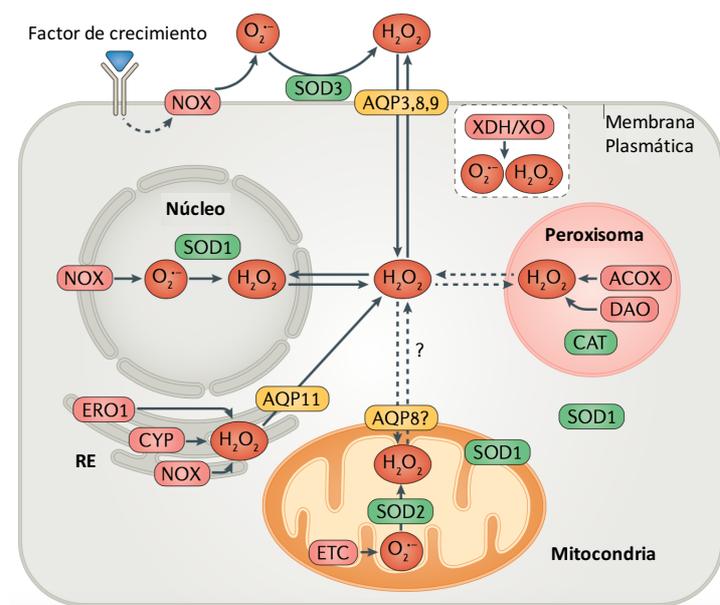


Figura 12. Generación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en los diferentes compartimentos celulares. Las membranas de los compartimentos limitan la difusión de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , por consiguiente las concentraciones de dichas especies varía entre los diferentes compartimentos celulares. La xantina deshidrogenasa /oxidasa (XDH/XO) es una enzima del hígado que se puede encontrar en sangre, la actividad oxidasa puede producir tanto $O_2^{\bullet-}$ como H_2O_2 . ACOX: acil-CoA oxidasa, CAT: catalasa, CYP: citocromo P450, DAO: d-aminoácido oxidasa, RE: retículo endoplasmático, ERO1: oxidorreductasa 1 de retículo endoplasmático, ETC: cadena de transporte de electrones, AQPs: acuaporinas. (Adaptado Sies H. & Jones D.P., 2020)⁸⁶.

Detoxificación del peróxido de hidrógeno

Reactividad con tioles

La reacción del H_2O_2 con tioles genera como producto inicial ácido sulfénico, el cual es una especie transitoria que generalmente reacciona con otro tiol formando el disulfuro correspondiente. Asimismo, el ácido sulfénico se puede oxidar rindiendo progresivamente los ácidos sulfínico y sulfónico, respectivamente. El H_2O_2 presenta una mayor velocidad de reacción con la forma aniónica tiolato (RS^-) con respecto a la reacción con la forma protonada del tiol (RSH). Por lo tanto, a pH fisiológico los tioles con menor pK_a presentan una mayor reactividad con H_2O_2 . El glutatión (GSH) y la mayoría de los tioles presentan un $pK_a > 8$, pero una minoría de tioles proteicos poseen pK_a bajos y se encuentran en la forma tiolato a pH fisiológico¹¹⁰. El H_2O_2 reacciona lentamente con glutatión (GSH), metionina (Met) y cisteína (Cys); no obstante, la reactividad del mismo con residuos de Cys de proteínas específicas puede aumentar considerablemente ($\approx 10^7 M^{-1}.s^{-1}$) dependiendo de la estructura de la proteína y el ambiente⁸⁶. La constante de reacción con H_2O_2 para tioles proteicos con bajo pK_a se encuentran en el rango de $20-200 M^{-1}.s^{-1}$, mientras que las peroxirredoxinas y las glutatión peroxidasas presentan una constante de reacción varios órdenes de magnitud mayor ($10^6-10^8 M^{-1}.s^{-1}$), lo cual no se puede explicar únicamente por la presencia del grupo tiolato¹¹⁰. Estas características determinan la especificidad y selectividad de la señalización redox mediada por H_2O_2 ⁸⁶, como discutiremos posteriormente.

Detoxificación catalítica

A concentraciones de H_2O_2 mayores a las fisiológicas (≤ 100 nM) se genera la oxidación inespecífica de biomoléculas (ADN, ARN, lípidos y proteínas) que pueden producir daño o alteraciones en la respuesta celular de manera reversible o irreversible. En general, estas alteraciones se encuentran asociadas al desarrollo de un proceso patológico, el cual puede ocasionar la detención del crecimiento y muerte celular (Figura 13) ⁸⁶.

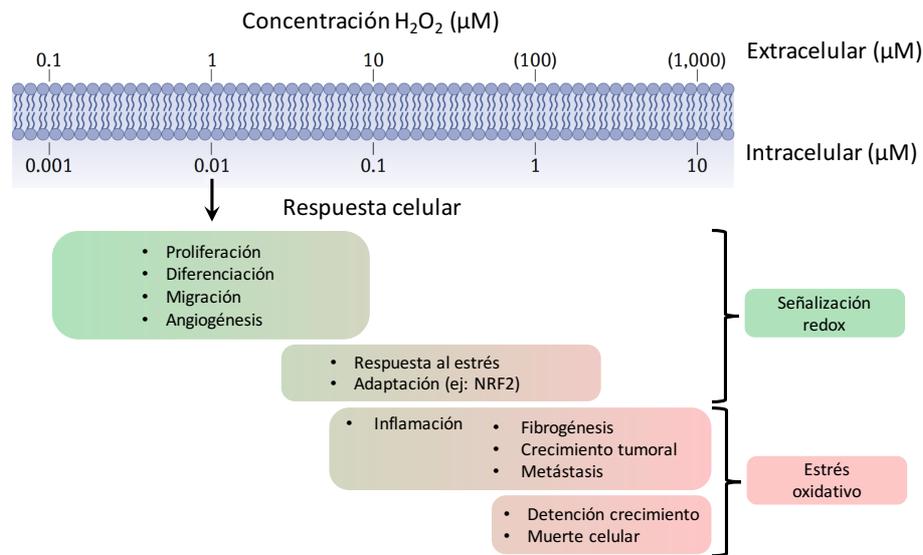


Figura 13 Respuesta celular con respecto a la concentración estimada de H_2O_2 . El rango de concentraciones de H_2O_2 fisiológica intracelular es hasta 100 nM. Los recuadros verdes denotan procesos de señalización redox (fisiológico, predominantemente beneficioso), mientras que los recuadros rosados representan procesos asociados a estrés oxidativo (deletéreos). Se estima un gradiente de concentraciones desde el medio extracelular al intracelular de 100 veces. No obstante, el gradiente varía con el tipo celular, localización dentro de la célula y la actividad de enzimas sumideros ¹¹². (Adaptado Sies H. & Jones D.P., 2020) ⁸⁶.

Por lo tanto, la detoxificación catalítica de H_2O_2 llevada a cabo por enzimas altamente especializadas denominadas peroxirredoxinas (Prx) y glutatión peroxidadas (GPx) resulta esencial para el mantenimiento de la integridad celular ^{113,114} (Figura 14). Las altas constantes de velocidad de reacción con H_2O_2 (10^5 – 10^8 $\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) y la localización en los diferentes compartimentos celular de Prxs y GPxs contribuyen a mantener la concentración de H_2O_2 en bajos niveles ¹¹⁵. Las Prxs se caracterizan por contener un residuo de cisteína (Cys) esencial para el ciclo catalítico denominada Cys peroxidática (C_P). Se clasifican en función de la ausencia o presencia de un segundo residuo de Cys que participa en la formación del disulfuro con la C_P , denominado Cys resolutive (C_R). De esta manera, las Prxs de 1-Cys carecen de C_R en su secuencia aminoacídica, las Prxs atípicas de 2-Cys contienen las C_P y C_R en la misma subunidad, mientras que las Prxs típicas de 2-Cys contiene los residuos de C_P y C_R en subunidades

adyacentes en el oligómero ensamblado. La reducción del disulfuro C_P-C_R es dependiente del sistema Trx/TrxR/NADPH (tioredoxina/tioredoxina reductasa/NADPH)¹¹⁶ (Figura 14A).

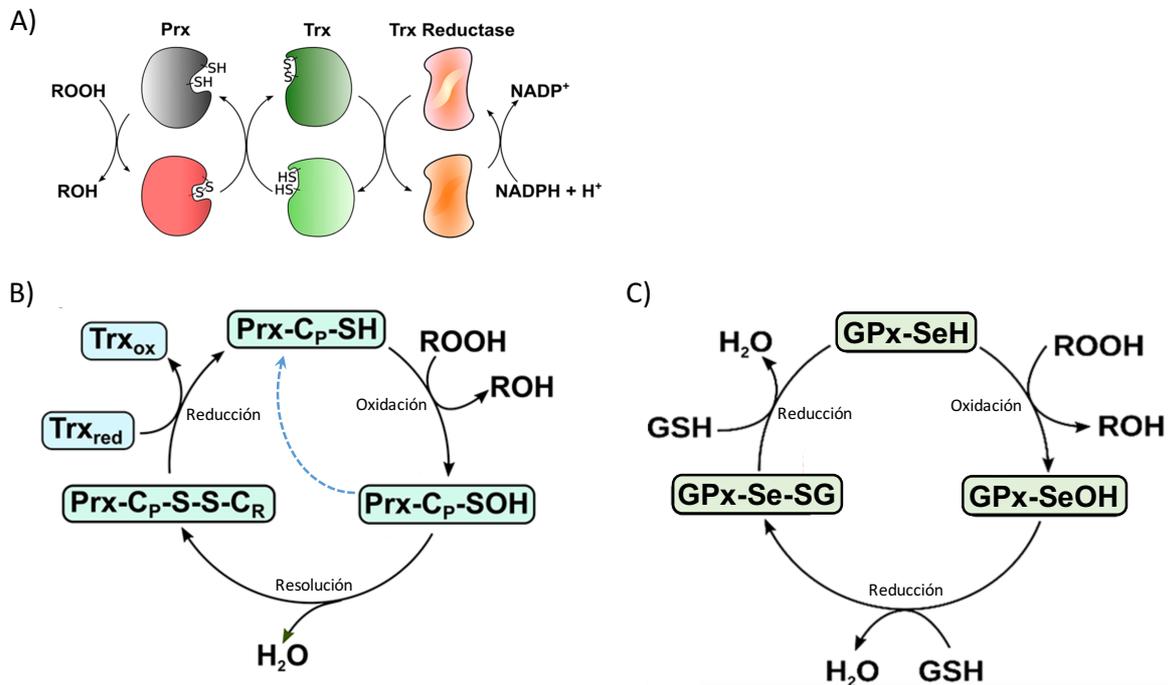


Figura 14. Ciclo catalítico de las peroxirredoxinas y glutatión peroxidadasas. (A) Reducción del hidropéroxido (ROOH) por la Prx y flujo de electrones asociado a dicho proceso. **(B)** Ciclo catalítico de Prx: reducción del ROOH y oxidación del tiol (RSH) a ácido sulfénico (RSOH), resolución (condensación del RSOH con la C_R) y reducción dependiente de Trx. En Prx 1-Cys (carentes de C_R) la reducción ocurre directamente sobre el RSOH (línea celeste punteada). **(C)** Ciclo catalítico de Se-Cys GPx: Reducción de ROOH y oxidación del selenol (RSeH) a ácido selénico (RSeOH) y reducción de este último por 2 moléculas de GSH. Prx: peroxirredoxina, GPx: glutatión peroxidada, Trx: tioredoxina, Trx reductasa: tioredoxina reductasa. (Adaptado Zeida A. et al., 2019)¹¹⁵.

Las GPx pertenecen a la familia tiol/selenocisteína peroxidadasas. En mamíferos las GPx1–4 y GPx6 en humanos son proteínas que poseen un residuo de selenocisteína (Se-Cys) en el centro catalítico, mientras que las GPx5, GPx7 y GPx8 poseen residuos de Cys en lugar de Se-Cys. Estas últimas pertenecen a las denominadas CysGPx, las cuales en su mayoría son dependientes de reductores redoxinas como Trx en lugar de GSH¹¹⁵. Además, la hemoproteína catalasa contribuye con la remoción H₂O₂ a través de dos mecanismos catalíticos: la dismutación del H₂O₂ en H₂O y O₂ (reacción catalítica) o la reducción del H₂O₂ a H₂O acoplada a la oxidación de un compuesto dador de hidrógeno (reacción peroxidativa)

Efectos citotóxicos del peróxido de hidrógeno

Inactivación de proteínas con clúster hierro-azufre

Al igual que el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 puede alcanzar el sitio activo de enzimas deshidratasas que presentan cluster $[4Fe-4S]^{2+}$ y oxidar el mismo, probablemente a través de dos pasos de reacción. La oxidación del clúster genera la pérdida de un átomo de Fe^{2+} e inactivación de la enzima, como comentamos previamente.

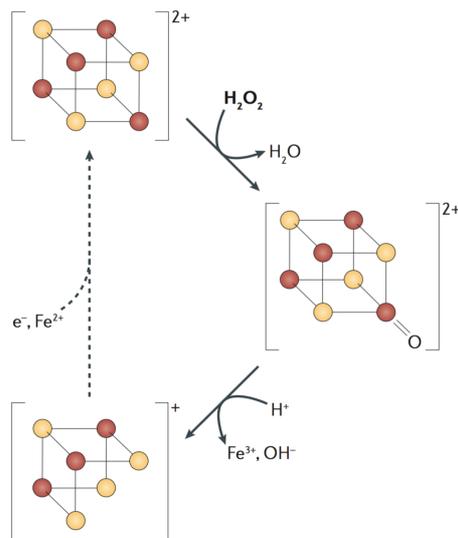
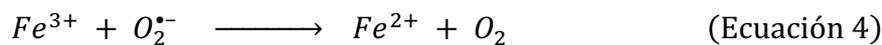
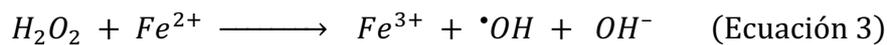


Figura 15. Inactivación de enzimas con clústeres Fe-S por H_2O_2 . La oxidación del cluster $[4Fe-4S]^{2+}$ por H_2O_2 genera probablemente la especie transitoria oxoferrilo, la cual abstrae un segundo electrón del cluster y se libera Fe^{3+} . La línea punteada representa los pasos involucrados en la reparación del cluster $[4Fe-4S]^{2+}$. (Adaptado Imlay J.A. et al., 2013) ⁶⁵.

No obstante, cabe destacar que la velocidad de reacción del clústeres $[4Fe-4S]^{2+}$ con H_2O_2 ($k \approx 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$) es más lenta en comparación con la reacción con $O_2^{\bullet-}$ ⁸⁸. Además, el ataque químico del cluster $[4Fe-4S]^{2+}$ por $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 origina intermediarios diferentes (Figuras 9 y 15, respectivamente) ⁶⁵.

Reacción de Fenton y generación de radical hidroxilo ($\bullet OH$)

Los centros con metales de transición presentes en complejos de Fe de bajo peso molecular, hemoperoxidasas y otras metaloproteínas con actividad redox (ej: proteínas con centros Fe-S) pueden reaccionar con H_2O_2 generando especies radicalarias a través de la denominada reacción de Fenton. La constante de reacción con H_2O_2 depende del complejo metálico y en general se encuentra en dentro del rango de $5-20 \times 10^3 M^{-1} \cdot s^{-1}$ ^{88,118}. La oxidación del Fe^{2+} por H_2O_2 a través de la denominada reacción de Fenton origina los productos Fe^{3+} y $\bullet OH$ (Ecuación 3). Finalmente el Fe^{3+} se debe reducir a Fe^{2+} para volver a ser activo.



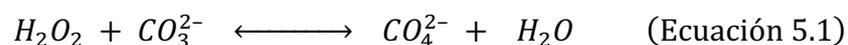
Algunos complejos con Fe^{3+} se pueden reducir por $O_2^{\cdot-}$ a través de la denominada reacción de Haber-Weiss (Ecuación 4), sin embargo, reductores como ascorbato y GSH serían más relevantes ^{88,118}.

Radical hidroxilo

El radical $\cdot OH$ se caracteriza por ser extremadamente reactivo y por tanto inespecífico ($E^0(\cdot OH/H_2O) = 2,33 \text{ V}$), reacciona a una velocidad cercana al límite por difusión con un gran número de moléculas blanco ^{88,118}. La presencia de Fe^{2+} determina el sitio de producción y por lo tanto de toxicidad mediada por $\cdot OH$ ^{88,118}, aunque el mismo también puede ser generado por la homólisis de ácido peroxinitroso o nitroso-peroxo-carboxilato, como profundizaremos en la sección de especies reactivas del nitrógeno. Considerando la alta reactividad, parece improbable que el $\cdot OH$ generado dentro del fagosoma genere un daño selectivo al patógeno internalizado ⁵⁶. Sin embargo, la generación sitio específica de $\cdot OH$ se ha propuesto como mecanismo de daño al ADN, iniciador de procesos de peroxidación lipídica y toxicidad ^{56,86,88}.

Peroximonocarbonato

La reacción del H_2O_2/HOO^- con dióxido de carbono/anión carbonato (CO_2/CO_3^{2-}) genera como producto peroximonocarbonato (HCO_4^-) (Ecuación 5), el cual se caracteriza por ser una especie más reactiva que el H_2O_2 , siendo capaz de reaccionar de forma más rápida con GSH o Met ¹¹⁹⁻¹²¹.



A concentraciones fisiológicas de CO_2/HCO_3^- un bajo porcentaje de H_2O_2 se encuentra como HCO_4^- , sin embargo, el mismo es suficiente para aumentar la velocidad de oxidación de blancos biológicos en 2-3 órdenes de magnitud con respecto al H_2O_2 ¹²².

Ácido hipocloroso

El ácido hipocloroso (HOCl) es sintetizado por la mieloperoxidasa (MPO) de neutrófilos. Dicha enzima posee un grupo hemo catiónico y se almacena en los gránulos azurofílicos. La activación del neutrófilo induce la liberación de dicha enzima dentro del fagosoma o al medio extracelular. La MPO reacciona rápidamente con H_2O_2 ($k= 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) y en presencia de haluros de cloro (Cl^-) se produce ácido hipocloroso (HOCl) ($pK_a= 7,4$) (Ecuación 6) ⁴¹.



El HOCl es un oxidante fuerte de dos electrones ($E^0(\text{HOCl}/Cl^-)= 1,28 \text{ V}$) ¹²³. Los principales blancos de reacción son residuos de Met y Cys, seguidos de aminas, disulfuros y triptófano. Asimismo, el HOCl reacciona lentamente con Tyr rindiendo el producto 3-cloro-tirosina (3-Cl-Tyr) ⁴¹. La reacción del HOCl con aminas rinde la correspondiente cloramina, las cuales pueden difundir dentro del patógeno y reaccionar con una mayor selectividad que el HOCl con grupos tioles de diferentes enzimas ^{41,124}. Una vez depletados los grupos aminos, el HOCl puede reaccionar con $O_2^{\bullet -}$ originando $\bullet OH$. Se ha reportado que el HOCl forma parte de la primera línea de defensa oxidativa contra patógenos, de manera directa o vía cloraminas. La mayoría de los patógenos fagocitados por neutrófilos mueren por un mecanismo MPO-dependiente. No obstante, pacientes deficientes en MPO raramente presentan problemas en el control de patógenos. De esta manera, se destaca el sinergismo existente entre los mecanismos de defensa oxidativos y no oxidativos. Este último se compone por proteínas citotóxicas y enzimas digestivas (defensinas, serin proteasas, lactoferrina) que se encuentran en gránulos citoplasmáticos, los cuales son liberados dentro del fagosoma ^{41,125,126}. Además, a nivel extracelular se ha descrito para neutrófilos la formación de NETs (*neutrophil extracellular traps*) que consisten en la liberación de gránulos y proteínas con actividad microbicida asociados a cromatina ¹²⁷.

Señalización redox mediada por ROS

La exposición a ROS no implica necesariamente un efecto biológico tóxico o deletéreo. La célula puede responder a la presencia de estas especies a través de una vía regulada de señalización redox. La respuesta celular que desencadena dicho proceso depende de varios factores como: La naturaleza del oxidante, el nivel de producción y el compartimento celular donde se originó la especie reactiva. Es importante destacar que la señalización redox se genera a concentraciones sub-tóxicas y regula un amplio rango de procesos celulares que incluyen la actividad metabólica, crecimiento, diferenciación y muerte celular programada ^{86,128–130}.

Peróxido de hidrógeno y radical superóxido – Mediadores redox

El rol señalizador del H₂O₂, a concentraciones fisiológicas, implica la oxidación reversible de proteínas blanco, induciendo una alteración en la proteína a nivel de la actividad, localización e interacciones. El H₂O₂ participa en la señalización de diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación, diferenciación, migración y angiogénesis ^{131,132}. Asimismo, el O₂^{•-} derivado de la activación de enzimas NOXs puede desencadenar o iniciar la activación de procesos de señalización mediado por receptores. A pesar de que frecuentemente el O₂^{•-} se considera únicamente precursor del H₂O₂, la generación específica de O₂^{•-} sugiere una participación directa en procesos mediados por señalización redox. A diferencia del H₂O₂, el O₂^{•-} no se caracteriza por ser un oxidante eficiente de tioles, por consiguiente no tendrá un rol relevante en los proceso de señalización tiol-dependiente. Sin embargo, existe evidencia que vincula directamente al O₂^{•-} en procesos de señalización celular a través de la reacción con metaloproteínas con actividad redox ^{133,134}.

La concentración intracelular de H₂O₂ se mantiene regulada y a bajos niveles dentro del rango 1–100 nM. Mientras que la concentración total de O₂^{•-} se mantiene aproximadamente en 10⁻¹¹ M, siendo por lo tanto menor a la concentración de H₂O₂ (≈10⁻⁸ M) ¹¹⁷. No obstante, la concentración local de O₂^{•-}/H₂O₂ en los diferentes compartimentos celulares depende de la actividad de los sistemas presentes que participan en la generación y eliminación de dichas especies. De esta manera, la concentración de H₂O₂ depende de la generación del mismo inducida por un determinado señalizador metabólico, factores de crecimiento o citoquinas

(Figura 12) en conjunto con la remoción mediada por sistemas reductores altamente eficientes ⁸⁶.

Acuaporinas – Canalización de peróxido de hidrógeno.

Debemos tener presente el rol de la familia de acuaporinas (AQPs), concretamente las AQPs 3, 8, 9 y 11, para las cuales se ha reportado actividad peroxiporinas. Estas AQPs facilitan el transporte y difusión del H₂O₂ entre los diferentes compartimentos y hacia el exterior de la célula ¹³⁵. Se ha postulado la expresión regulada de AQPs como mecanismo de direccionamiento del H₂O₂, promoviendo así la especificidad en la señalización celular. En este sentido, se ha demostrado que las AQPs 3 y 8 facilitan el transporte del H₂O₂ derivado de la NOX2 asociados a procesos de señalización celular ^{136,137}.

Señalización por reducción e intercambio de tioles

El rol señalizador redox del H₂O₂ se ha estudiado y caracterizado ampliamente para la oxidación selectiva de residuos de Cys presentes en proteínas que participan en la regulación de una vía de señalización ^{86,110,138-141}. Este mecanismo de señalización implica la oxidación de grupos tiolato presentes en la proteína blanco, los cuales reaccionan con H₂O₂ con varios órdenes de magnitud mayores que los tioles presentes en otras proteínas ^{110,115}. Los blancos fisiológicos susceptibles a oxidación pueden actuar como “switches” moleculares, participando en diferentes niveles de regulación celular frente a una respuesta al estrés. Las Prx, pueden transferir la oxidación mediada por H₂O₂ a otras proteínas blanco que reaccionan muy lentamente de forma directa con H₂O₂. Ejemplos de estos son: la reacción de la Prx1 y/o 2 con el factor de transcripción STAT3, la reacción de Prx2 con la proteína MEKK4 que participa en la vía de señalización p38-MAPK y la regulación de la señalización de FOXO3 por Prx1 ¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Otros mecanismos de señalización redox

Se han postulado otros mecanismo de señalización redox a través de la oxidación reversible de residuos de Met, selenoproteínas, centros metálicos, y lípidos ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸.

Finalmente, se han reportado otras especies reactivas que participan en procesos de señalización redox como el óxido nítrico, sulfuro de hidrógeno, peroximonocarbonato y lípidos oxidados ^{86,110}.

Especies reactivas del nitrógeno

Al igual que las ROS, el término RNS incluye especies tanto radicalarias como no radicalarias dentro de las que podemos destacar: $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, peroxinitrito y nitrosoperoxo-carboxilato (ONOOCO_2^-) entre otros.

Óxido nítrico

El $\cdot\text{NO}$ es una molécula pequeña, radicalar, neutra e hidrofóbica, capaz de permear las membranas biológicas. A pesar de que el $\cdot\text{NO}$ es un oxidante débil ($E^0(\cdot\text{NO}, \text{H}^+/\text{HNO}) = -0,80 \text{ V}$), puede dar origen a especies altamente reactivas¹⁴⁹, como discutiremos a continuación. El $\cdot\text{NO}$ es un mediador fisiológico que ejerce diversas funciones en tejidos y órganos, dentro de las que podemos destacar vasodilatador, neurotransmisor y participación en la respuesta inmune celular. A nivel del endotelio, la difusión del $\cdot\text{NO}$ se puede ver limitada por su rápida reacción con la oxihemoglobina, disminuyendo así su concentración en el tejido local¹⁵⁰.

Producción biológica de óxido nítrico

La producción de $\cdot\text{NO}$ se lleva a cabo principalmente por la presencia de óxido nítrico sintasas (NOS, *nitric oxide synthase*). Existen tres isoformas de la NOS: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducibles (iNOS) (Figura 16A)^{46,47,50,151,152}. Todas las isoenzimas NOS catalizan la conversión de L-arginina, NADPH y O_2 en los productos L-citrulina, NADP^+ y $\cdot\text{NO}$ (Figura 16C)

153

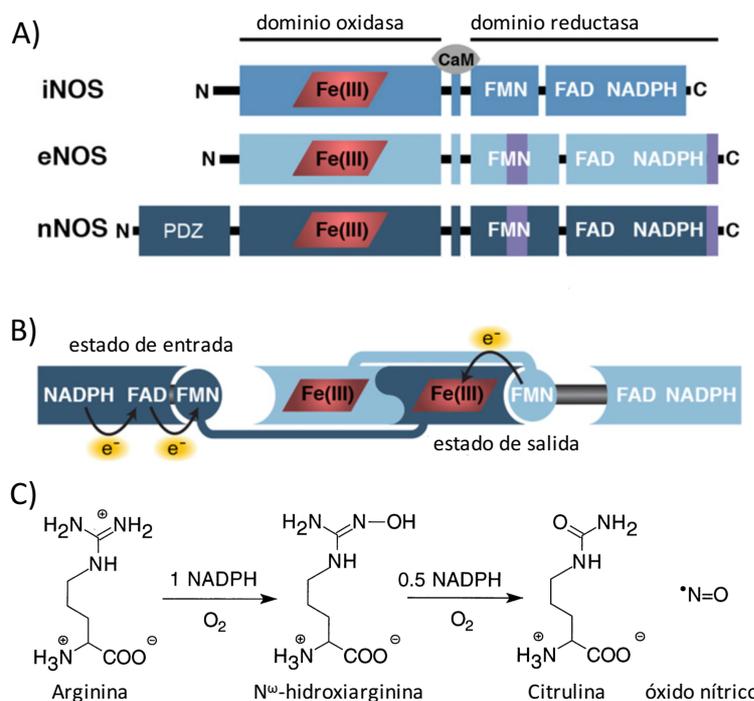


Figura 16. Óxido nítrico sintasa. (A) Los monómeros de las isoenzimas NOS poseen dos dominios, uno oxidasa y otro reductasa. El dominio oxidasa posee un grupo hemo como cofactor (rojo), mientras que el dominio reductasa se divide en los subdominio: sitios de unión de NADPH/FAD y sitio de unión de FMN. La calmodulina (CaM) se une a un pequeño segmento helicoidal presente entre los dominios oxidasa y reductasa. La isoforma iNOS carece de la hélice autoinhibitoria en el subdominio FMN y en la extensión del C-terminal (violeta), presentes en las isoformas eNOS y nNOS. La nNOS posee además un dominio PDZ en la extensión del N-terminal. **(B)** Flujo de electrones a través de los homodímeros NOS. El subdominio NADPH/FAD interactúa con el subdominio FMN permitiendo la transferencia de electrones entre los

cofactores de flavina (estado de entrada). El subdominio FMN interactúa con el hemo del dominio oxidasa permitiendo la transferencia de electrones. **(C)** Reacción catalizada por las isoenzimas NOS. (Adaptado Campbell M.G. et al., 2014) ¹⁵⁴.

Blancos biológicos del óxido nítrico

El $\bullet\text{NO}$ puede regular la función de diferentes proteínas a través de la reacción con grupos prostéticos hemos y cofactores metálicos, dando origen al correspondiente complejo nitrosil-ferroso ¹⁵⁵. Dentro de las hemoproteínas blanco podemos destacar a la guanilato ciclasa (GC). El $\bullet\text{NO}$ se une fuertemente al Fe^{2+} del grupo hemo de la GC llevando a la producción de GMP cíclico (cGMP) como segundo mensajero que activa a proteínquinasas (PKG) en las células blanco y es considerado el principal mecanismo de transducción de señal mediado por $\bullet\text{NO}$ ¹⁵⁶. De igual manera, el $\bullet\text{NO}$ puede inhibir de manera reversible a la citocromo c oxidasa (CIV) determinando la inhibición de cadena respiratoria con la generación sitio específica de $\text{O}_2^{\bullet-}$ ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

El $\bullet\text{NO}$ puede a su vez, detener la propagación de radicales asociada a procesos de peroxidación lipídica a través de reacciones de terminación, generando una variedad de nitroso- y nitro-ácidos grasos derivados ¹⁶⁰. La oxidación de ácidos grasos insaturados presentes en membranas biológicas o lipoproteínas se inicia por la abstracción de un electrón y la formación del radical lipídico (L^\bullet), el cual reacciona rápidamente con O_2 rindiendo el correspondiente radical peroxilo (LOO^\bullet), clave en la propagación de procesos de peroxidación lipídica. El LOO^\bullet puede reaccionar con otros ácidos grasos insaturados adyacentes (oxidando

a los mismos) o reaccionar rápidamente con $\cdot\text{NO}$ rindiendo el correspondiente ácido graso oxidado y nitrosilado (ej: LOONO). Este último intermediario puede evolucionar generando una serie de ácidos grasos nitrados (ej: LONO₂)^{150,161}.

Otros blancos biológicos relevantes para el $\cdot\text{NO}$ son las especies radicalares como $\text{O}_2^{\cdot-}$, RS^{\cdot} (radical tiílo) y Tyr^{\cdot} (radical tirosilo), con las cuales presenta una constante de velocidad cercana al control por difusión ($1\text{--}10 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)^{162–164}. La reacción de terminación del $\cdot\text{NO}$ con especies radicalarias (ej: RS^{\cdot}) no repara directamente el radical como ocurre con los antioxidantes (glutatiión, ascorbato, tocoferol), sino que genera un producto intermediario transitorio (ej: RS-NO) con una actividad biológica distinta. Frecuentemente, estos productos intermediarios pueden ser reparados generando el compuesto original a través de la reacción con diferentes antioxidantes¹⁵⁶.

Peroxinitrito

La producción simultánea de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ deriva en la formación de peroxinitrito (ONOO^- / ONOOH) a través de una reacción controlada por difusión ($k= 4\text{--}16 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)^{163,165–167}. Dicha reacción se caracteriza por ser lo suficientemente rápida para competir con la dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ catalizada por las diferentes isoformas de SODs^{168,169}. El peroxinitrito es un oxidante altamente reactivo, capaz de efectuar oxidaciones por uno o dos electrones ($E^0(\text{ONOO}^-/\cdot\text{NO}_2)= 1,4 \text{ V}$ y $E^0(\text{ONOO}^-/\text{NO}_2^-)= 1,2 \text{ V}$) y presenta una vida media corta. El término peroxinitrito engloba tanto la especie ácido peroxinitroso (ONOOH) como su base conjugada peroxinitrito anión (ONOO^-), debido a que ambas especies se encuentran en equilibrio y coexisten a pH fisiológico ($\text{pK}_a= 6,8$). No obstante, ONOOH y ONOO^- se diferencian en estabilidad, permeabilidad de membrana y reactividad^{116,170}. La formación de peroxinitrito y de oxidantes derivados del $\cdot\text{NO}$ se ha asociado a diversos procesos fisiopatológicos como aterosclerosis, hipertensión, neurodegeneración, cáncer, inflamación y sepsis^{116,156,171}. Por otra parte, se ha descrito la participación del peroxinitrito y la presencia de nitrotirosina en proteínas en procesos normales de envejecimiento^{156,172,173}.

Fuentes biológicas de peroxinitrito

Previamente mencionamos que la activación simultánea de las enzimas NOS y NOX lleva a la formación de los radicales $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$, los cuales pueden reaccionar generando como producto ONOO^- . Asimismo, otra fuente biológica relevante es la mitocondria como discutiremos a continuación.

Generación mitocondrial de peroxinitrito

El $\cdot\text{NO}$, al ser un radical neutro, puede difundir a la mitocondria y competir con el O_2 por la unión al grupo hemo de la citocromo c oxidasa (complejo IV), inhibiendo así de manera reversible el complejo IV de la cadena respiratoria. Dicha inhibición desencadena un aumento de la fuga de electrones y formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$, y por tanto, formación de ONOO^- (Figura 17) ^{29,174,175}. Además, la formación sitio específica de ONOO^- determina la oxidación, nitración y S-nitrosilación de los complejos I y II, originando simultáneamente la inhibición de los mismos ¹⁵⁰.

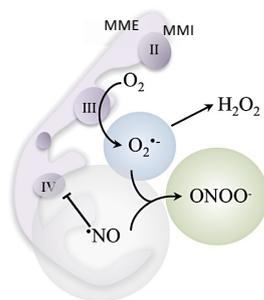


Figura 17. Producción mitocondrial de peroxinitrito. El $\cdot\text{NO}$ inhibe el complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) desencadenando la producción $\text{O}_2^{\cdot-}$. La producción simultánea de ambos radicales determina la formación intramitocondrial de ONOO^- . MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna. (Adaptado de Piacenza L. et al., 2013) ¹⁷⁶.

Homólisis del ácido peroxinitroso

En solución acuosa, el ONOOH es inestable y en ausencia de blancos moleculares isomeriza a nitrato (NO_3^-) a través de la formación de los radicales intermediarios $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ que se recombinan generando NO_3^- o difunden en solución (Figura 18) ¹¹⁶.

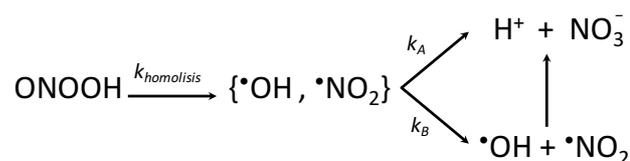


Figura 18. Homólisis del ácido peroxinitroso. (Adaptado de Ferrer-Sueta G. et al., 2018) ¹¹⁶.

El rendimiento para la producción de $\cdot\text{OH}$ a partir de la homólisis de ONOOH se estima $\leq 30\%$, mientras que el resto directamente isomeriza a NO_3^- ¹¹⁶. Los radicales libres $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$ adquieren un rol importante en la oxidación de membranas biológicas y lipoproteínas, en donde los reductores directos de peroxinitrito se vuelven escasos y se favorecen las oxidaciones por un electrón a través de procesos en los que participan radicales lipídicos ¹⁷⁷.

Reacción del peroxinitrito anión con $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$

En un contexto biológico, el ONOO^- reacciona rápidamente con $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ($k = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) generando el aducto transitorio nitroso-peroxo-carboxilato (ONOOCO_2^-). La homólisis de este aducto genera los radicales $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$ con un rendimiento de $\approx 35\%$ (Figura 19) ^{116,178}. En la mitocondria, principal fuente de CO_2 (producto del catabolismo), el peroxinitrito puede reaccionar y generar de manera sitio específica los radicales $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$. Estos radicales pueden reducir el ubiquinol a ubisemiquinona favoreciendo la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a nivel mitocondrial ¹⁷⁹.

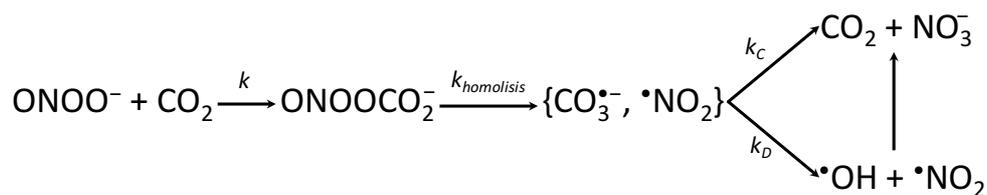


Figura 19. Reacción entre el anión peroxinitrito y dióxido de carbono. (Adaptado de Ferrer-Sueta G. et al., 2018) ¹¹⁶.

Debido a la alta concentración de CO_2 en sistemas biológicos (1–2 mM) y al equilibrio con HCO_3^- , el CO_2 se considera el principal blanco de reacción para el peroxinitrito ¹⁶⁹. No obstante, el ONOO^- puede difundir y alcanzar el patógeno internalizado dentro del fagosoma de macrófagos previo a reaccionar con CO_2 ⁴². Dentro del patógeno internalizado, la reacción entre ONOO^- y CO_2 se vuelve relevante y determina la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Figura 3). Este último radical participa en reacciones de oxidación por un electrón, por ejemplo en la oxidación de tirosina (Tyr) con la consiguiente formación de radical Tyr^{\cdot} , paso clave en la nitración ¹⁸⁰.

Nitrotirosina

A pesar de que el peroxinitrito no es capaz de reaccionar directamente con residuos de Tyr, los radicales secundarios derivados del mismo (u otros oxidantes de un electrón) pueden generar el intermediario Tyr[•]. Este último reacciona con una constante de velocidad cercana al límite por difusión con [•]NO₂ rindiendo el producto estable 3-nitrotirosina (3-NO₂-Tyr) ¹⁵⁰. Dependiendo del rol y localización del residuo de tirosina, la incorporación de un grupo nitro puede generar cambios en la estructura y función de proteínas relevantes en el contexto de una determinada patología ¹⁵⁰. La nitración de tirosinas usualmente adiciona una carga negativa e incorpora un sustituyente de mayor volumen, afectando así la distribución de carga local y/o la conformación de la proteína.

Además, se ha reportado que la nitración de residuos de tirosina puede producir la pérdida o ganancia de función en la proteína.

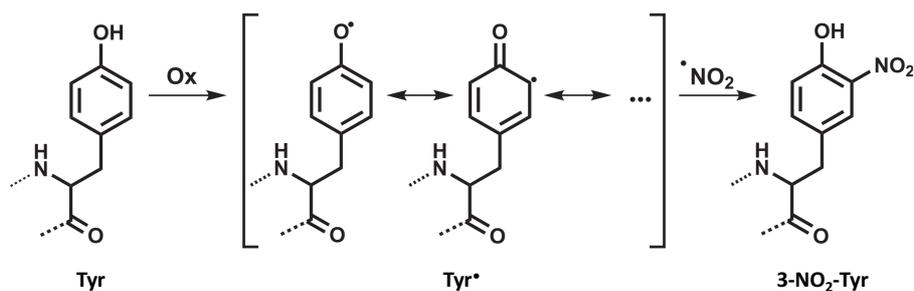


Figura 20. Formación de 3-nitrotirosina. La oxidación de la tirosina (Tyr) por un oxidante de un electrón (Ox) genera el intermediario radical tirosilo (Tyr[•]), el cual reacciona con el radical dióxido de nitrógeno ([•]NO₂) formando así el producto estable 3-nitrotirosina (3-NO₂-Tyr). La nitración de residuos de Tyr provoca una reducción del pK_a del grupo OH fenólico de 10,5 a 7-7,5. (Adaptado Radi R., 2018) ¹⁵⁰.

La nitración de tirosinas se considera un biomarcador del estado oxidativo y de la progresión de diversas enfermedades ¹¹⁶. En este sentido, se ha reportado la nitración de tirosinas en proteínas de *T. cruzi* mediada por peroxinitrito derivado de macrófagos activados ⁵⁵.

Detoxificación de peroxinitrito y radicales secundarios

Reacción con tioles

El peroxinitrito reacciona con tioles a través de la oxidación por dos electrones rindiendo el correspondiente ácido sulfénico ¹¹⁶. Cabe destacar que el ONOO⁻ reacciona con tioles de bajo peso molecular más rápido (tres órdenes de magnitud mayor) que el H₂O₂ ¹⁷⁰. La participación de los tioles de bajo peso molecular (ej: GSH) en la modulación de reacciones dependientes

de peroxinitrito como la nitración de Tyr dependen de procesos redox de un electrón como la reducción de los radicales $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{Tyr}\cdot$ ¹¹⁶.

Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas de mamíferos y tripanosomátidos poseen un tiol altamente reactivo con peroxinitrito ^{116,181}. Las diferentes peroxirredoxinas presentan una constante de reacción de segundo orden del rango $10^6\text{--}10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (a pH fisiológico), es decir, 3–4 órdenes de magnitud mayor que el GSH. Estas enzimas funcionan como óxido-reductasas capaces de reducir por dos electrones el peroxinitrito a nitrito (NO_2^-), detoxificando y eliminando los efectos citotóxicos del mismo. Las tioredoxinas, proteínas relacionadas y compuestos que presentan tioles pueden reducir los tioles oxidados de las peroxirredoxinas a su estado nativo (Figura 14A-B) ¹¹⁶.

La alta eficiencia en la detoxificación de peroxinitrito, derivado de macrófagos y neutrófilos activados, esencial para la evasión o eliminación de los efectos deletéreos generado por dicho oxidante, han llevado a postular a las peroxirredoxinas y peroxidases de microorganismos como factores de virulencia ^{55,182}.

Efectos citotóxicos del peroxinitrito y radicales secundarios

Reacción con proteínas con centros metálicos

La reacción del peroxinitrito con proteínas que poseen centros con metales de transición es compleja y puede generar diversos productos. Las hemoperoxidasas y hemotiolato proteínas que contienen el átomo de hierro pentacoordinado tienden a presentar una constante de reacción de segundo orden con peroxinitrito en el rango de $10^5\text{--}10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, mientras que las hemoproteínas que contienen el átomo de Fe hexacoordinado o proteínas con metales no hemo presenta constantes de reacción menores ¹¹⁶. Dentro de la familia de hemoperoxidasas humanas, se ha caracterizado la reacción de la mieloperoxidasa con peroxinitrito, la cual se oxida por un electrón rindiendo compuesto II y $\cdot\text{NO}_2$. Debido a la elevada velocidad de reacción con peroxinitrito y la abundancia en neutrófilos (500 μM), la mieloperoxidasa se considerada un excelente blanco para dicho oxidante ¹⁶⁹.

Asimismo, se ha descrito la reacción del peroxinitrito con otras proteínas que presentan centros con metales de transición como la Cu/Zn, Mn y Fe-SODs, las cuales se nitrán en residuos de tirosina, causando la inhibición de las mismas ¹⁸³⁻¹⁸⁵.

Inhibición de proteínas con clúster hierro-azufre

El peroxinitrito, al igual que $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , puede reaccionar rápidamente con el clúster $[4Fe-4S]^{2+}$ presente en deshidratasas. El átomo de hierro (Fe_α) que no se encuentra coordinado por residuos de cisteína, unido únicamente a átomos de azufre inorgánicos se caracteriza por ser sensible a peroxinitrito. La ausencia de un cuarto residuo de cisteína ligado al clúster y una carga neta positiva ($2+$) lo hacen accesible y vulnerable a oxidantes aniónicos de un electrón como el $ONOO^-$. La reacción del peroxinitrito con este tipo de clúster Fe-S induce la liberación del Fe_α lábil, generando la disrupción del cluster al estado $[3Fe-4S]^+$ y la inactivación de la enzima.

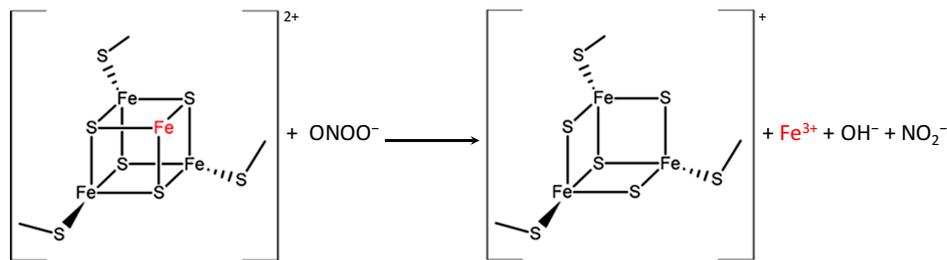


Figura 21. Reacción del peroxinitrito con el cluster $[4Fe-4S]^{2+}$. (Adaptado de Ferrer-Sueta G. et al., 2018) ¹¹⁶.

La aconitasa mitocondrial presenta una constante de velocidad de segundo orden con peroxinitrito de $1,4 \times 10^5 M^{-1} \cdot s^{-1}$ (pH= 7,6 y 25 °C), mientras que con $O_2^{\bullet-}$ presenta una $k \approx 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$ ¹¹⁶.

A continuación describiremos las características del sistema antioxidantes de *T. cruzi* y la relevancia del mismo en la colonización y establecimiento de la infección en los tejidos del huésped vertebrado.

Establecimiento de la infección y relevancia del sistema antioxidante de *T. cruzi*.

Establecimiento de la infección

Los parásitos que logran evadir el sistema inmune del huésped posteriormente invaden y colonizan otros órganos, como el corazón y tracto digestivo, diseminando la infección y favoreciendo la progresión de la misma hacia la fase crónica de la enfermedad.

Miocarditis crónica Chagásica

La miocarditis crónica chagásica se caracteriza por la presencia de pseudo-quistes de nidos de amastigotas en las fibras cardíacas y por un infiltrado inflamatorio acompañado de la presencia de citoquinas y quimoquinas (Figura 22). La presencia de nidos de amastigotas en conjunto con la respuesta inflamatoria montada promueven el remodelado del tejido cardíaco.

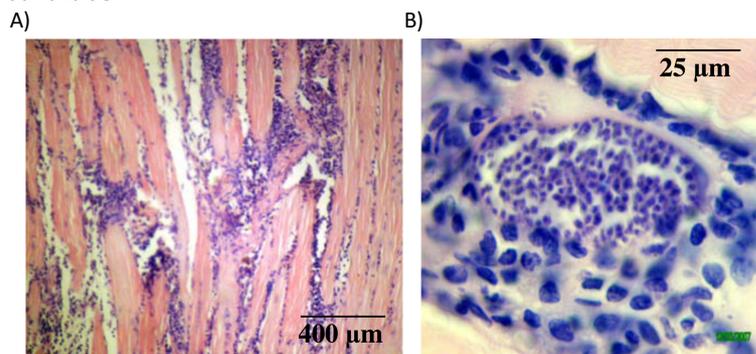


Figura 22. Micrografía de tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi*. En (A) y (B) se observan secciones de tejido cardíaco de ratón infectado con *T. cruzi* a diferente magnificación. En (B) se puede observar el nido a amastigotas rodeado por el infiltrado inflamatorio. (Adaptado Piacenza L. et al., 2009)⁵⁹.

Se han reportado alteraciones en proteínas asociadas al citoesqueleto, contractilidad celular, homeostasis del Ca^{2+} , uniones gap, uniones adherentes y matriz extracelular. Estas alteraciones repercuten directamente en la integridad del tejido así como en el sistema de conducción cardíaco, conllevando a una cardiomiopatía arritmogénica^{186–188}. Esta alteración del ritmo cardíaco (arritmia) se puede evidenciar fácilmente a través de un electrocardiograma, en el cual se observa una prolongación del potencial de acción asociado

con alteraciones en la salida de K^+ ¹⁸⁸. Además, se observó para el modelo murino un aumento del espesor del tabique interventricular y de la masa ventricular, disminución de la pared posterior en ventrículo izquierdo y síntesis de colágeno desproporcionada ¹⁸⁹.

Estrés nitro-oxidativo en cardiomiocitos infectados

La invasión de cardiomiocito por *T. cruzi* induce la generación de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquina-1 β (IL-1 β), responsables de la inducción de la iNOS (tanto de forma autocrina como paracrina) con la consecuente generación de \bullet NO ¹⁹⁰⁻¹⁹³. En este contexto, la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno generan un estrés nitro-oxidativo a nivel del miocardio que podría desencadenar la muerte de cardiomiocitos y la falla cardíaca crónica, observada en pacientes con enfermedad de Chagas. Mediante la utilización de ratones *knock out* se ha demostrado el rol esencial del eje IL-12/IFN- γ /iNOS y el efecto antagonista de la IL-4 en el control de la infección por *T. cruzi*, carga parasitaria del tejido cardíaco e inflamación, demostrando la importancia del \bullet NO en el control de la enfermedad ^{194,195}. Considerando que el \bullet NO es un oxidante débil, resulta poco probable que sea el responsable del control parasitario. Sin embargo, esta especie puede difundir varios diámetros celulares e interactuar con blancos parasitarios llevando a la inactivación sostenida de diferentes enzimas con centros Fe-S y grupos prostéticos hemo involucradas en la bioenergética celular (ej: aconitasa y citocromo c oxidasa). Nuestro grupo ha reportado que el \bullet NO tiene la capacidad de inhibir la respiración mitocondrial parasitaria a través de la inactivación de la citocromo c oxidasa, favoreciendo la producción de radical $O_2^{\bullet-}$ y posteriormente la generación de peroxinitrito de forma sitio específica ^{176,196}.

En pacientes y en el modelo crónico murino de la enfermedad de Chagas se han encontrado proteínas nitradas en lesiones cardíacas, así como la formación de aductos de 4-hidroxinonenal (4-HNE), malondialdehído (MDA) y carbonilo ¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Estas modificaciones o marcadores estables de la presencia de estrés nitro-oxidativo resultan en la generación de antígenos cardíacos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune a través de anticuerpos, repercutiendo en la patogénesis de la enfermedad ¹⁹⁸. Además, se ha reportado la presencia de proteínas plasmáticas nitradas y elevados niveles de MPO (enzima capaz de llevar a cabo la nitración proteica) en plasma de pacientes con enfermedad de Chagas ²⁰⁰. De esta manera, el establecimiento de un estrés nitro-oxidativo en el huésped vertebrado puede

ser responsable, en parte, del daño colateral producido en los tejidos infectados. Considerando los antecedentes previamente descritos se ha postulado que la patogenia de la cardiomiopatía chagásica es resultado de la presencia de nidos de amastigotas en conjunto con la respuesta inmune montada por el organismo hospedero.

Disfunción mitocondrial en cardiomiocitos infectados

A nivel del miocardio, en el modelo murino y en cardiomiocitos infectados con *T. cruzi* se ha reportado una disfunción mitocondrial caracterizada por la disminución del potencial de membrana mitocondrial, aumento en la formación de ROS y de aductos oxidados a nivel mitocondrial ^{189,201}. La deficiencia de MnSOD en el modelo murino exacerba la tasa de producción de ROS a nivel mitocondrial y el estrés oxidativo en el miocardio, caracterizado por un aumento en la producción de H₂O₂ y de aductos oxidativos ²⁰². Asimismo, se ha reportado para cardiomiocitos infectados un aumento en la expresión de la poli(ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) así como la PARilación de proteínas ²⁰³. PARP1 posee diferentes roles dentro de los que podemos destacar la participación en procesos de reparación del ADN e inflamación vía NF-κB (*nuclear factor-κB*) ^{190,204}. Sin embargo, se ha postulado que la sobreexpresión de PARP-1 se asocia con una disminución del ADN mitocondrial (ADNmt), de la expresión de genes codificados por ADNmt y la respiración mitocondrial, promoviendo la generación de ROS a nivel mitocondrial ²⁰³.

Por otra parte, se ha postulado la activación temprana de mTOR en cardiomiocitos humanos infectados por *T. cruzi*, acompañada de un aumento en la biogénesis mitocondrial y fosforilación oxidativa ²⁰⁵.

Sistema antioxidante de *T. cruzi* – Factores de virulencia.

Factores de virulencia

En general los factores de virulencia se definen como moléculas producidas por un determinado patógeno, cuya pérdida altera específicamente la virulencia sin afectar la viabilidad ²⁰⁶. Estos factores de virulencia pueden favorecer la invasión, establecimiento y desarrollo del patógeno, evasión de la respuesta inmune y eventualmente generar daño en el huésped. La virulencia es una propiedad del patógeno expresada únicamente en el huésped susceptible, el desenlace de la enfermedad dependerá de la interacción huésped-patógeno. Por consiguiente, la virulencia del patógeno no se debe considerar de manera aislada del huésped ^{207,208}.

En la literatura se han descrito diferentes factores de virulencia para *T. cruzi*, los cuales pueden participar a diferentes niveles en la interacción huésped-patógeno, como: **i)** La sobrevida al ambiente oxidativo generado dentro del fagolisosoma (ej: enzimas antioxidantes, tioles no proteicos) ^{29,56}; **ii)** La reparación de macromoléculas oxidadas (ej: metionina sulfóxido (Met-SO) ^{209,210} y 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanina (8-oxoG) ^{211,212}; **iii)** La resistencia y evasión de la respuesta inmune (ej: inactivación del sistema complemento, supresión de diferenciación de células T, generación de microvesículas); **iv)** La adhesión e invasión celular (ej: cruzipaína, transialidasa, etc.); **v)** El escape del fagolisosoma (ej: transialidasa, Tc-TOX o proteína formadora de poro) y **vi)** La diferenciación celular y proliferación (ej: proteosoma, calpaína) ^{213,214}.

El desarrollo de herramientas bioinformáticas y moleculares ha sido esencial para la identificación de factores de virulencia en patógenos. En particular, *T. cruzi* presenta una gran variabilidad genética y bioquímica entre diferentes cepas salvajes que determina diferencias en la virulencia. La secuenciación del genoma ha mostrado una arquitectura genómica compleja en *T. cruzi*, caracterizada por un alto grado de secuencias repetidas así como retrotransposones ^{215,216}. Estas características han limitado el silenciamiento de genes como estrategia para la validación de los factores de virulencia. Alternativamente, se han generado

parásitos sobreexpresantes de factores de virulencia candidatos mediante la utilización de vectores de expresión.

Sistema antioxidante de *T. cruzi*

El establecimiento de la infección por *T. cruzi* depende de la capacidad del parásito para evadir la respuesta inmune montada por el huésped y sobrevivir al ambiente oxidativo, caracterizado por la presencia de H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet NO$ y peroxinitrito. *T. cruzi* posee un sistema antioxidante altamente eficiente en la detoxificación de especies reactivas, el cual se compone por una red de enzimas antioxidantes y tioles de bajo peso molecular ⁵⁶.

Tioles de bajo peso molecular

Los tioles de bajo peso molecular presentes en parásitos tripanosomátidos son: GSH, GSH-espermidina, ovotiol A (N1-metil-4-mercaptohistidina) y tripanotiona $[T(SH)_2]$, N1,N8-bis-glutationilespermidina], siendo la $T(SH)_2$ el más representado en los diferentes estadios. La concentración total de tioles de bajo peso molecular en *T. cruzi* varía entre diferentes cepas y en los diferentes estadios (epimastigota, tripomastigota y amastigota) ^{217,218}. El sistema metabólico redox centralizado en $T(SH)_2$ resulta esencial para la sobrevivencia de parásitos tripanosomátidos, razón por la cual ha sido ampliamente estudiada su biosíntesis y utilización, así como potenciales blancos para el desarrollo de drogas antiparasitarias ²¹⁹. En *T. cruzi* la concentración de $T(SH)_2$ en el estadio epimastigotas (cultivados en presencia de poliaminas) varía entre 1,5–2,0 mM, mientras que en tripomastigotas y amastigotas es de 0,5 mM y 0,12 mM, respectivamente ²²⁰.

Tripanotiona

La $T(SH)_2$ es un ditiol compuesto por dos moléculas de GSH unidas covalentemente a una molécula de espermidina ²²¹. La síntesis de $T(SH)_2$ involucra la unión covalente de manera secuencial de dos moléculas de GSH a los grupos amino (NH_2) de la espermidina (Figura 23). Este proceso ocurre en dos pasos catalizados por la misma enzima denominada tripanotiona sintasa (TS) e implican el consumo de dos moléculas de ATP ²²². Además, *T. cruzi* posee el gen

que codifica la enzima glutationil-espermidina sintasa (GspS) ²²³. Sin embargo, la reacción catalizada por la GspS no sería relevante *in vivo* ²²⁰.

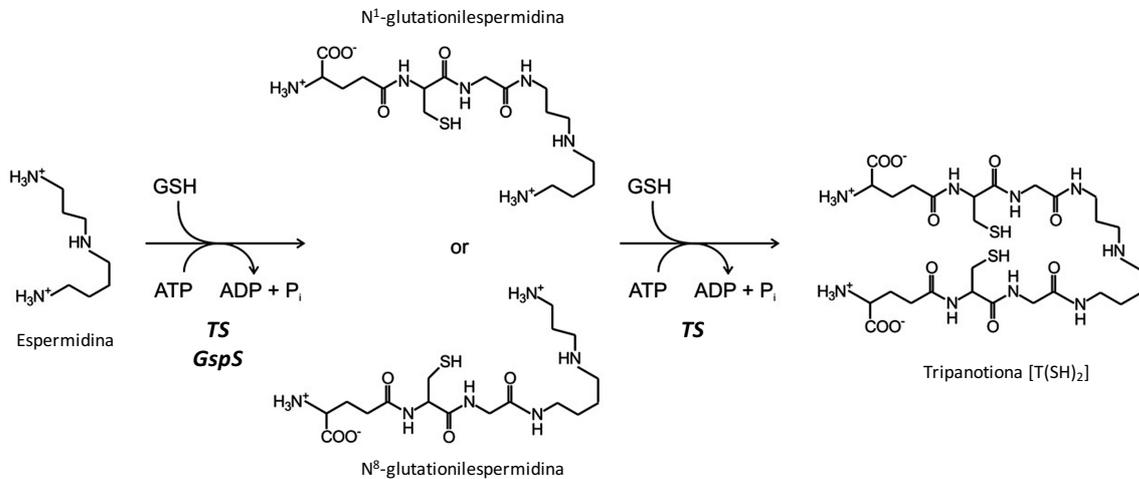


Figura 23. Biosíntesis de tripanotona. La T(SH)₂ se sintetiza a través de dos pasos consecutivos, en los cuales el grupo carboxilato de la glicina de cada molécula de GSH se une covalentemente a uno de los grupo amino terminal de la espermidina. Dicho proceso consume dos moléculas de ATP y es catalizado por la enzima tripanotona sintasa (TS). GspS: glutationil-espermidina sintasa. (Adaptado Irigoín F. et al., 2008) ²²⁰.

La T(SH)₂ reemplaza a el GSH en la mayoría de las reacciones de intercambio tiol-disulfuro de la célula ²²⁰. La mayor reactividad de la T(SH)₂ se explica por la presencia del ditiol, cuyos pK_a(s) coinciden con el pH intracelular (pK_a≈ 7,4), mientras que el GSH presenta un pK_a= 8,3 ²²⁴. La presencia del ditiol favorece la formación de puentes disulfuro intramoleculares luego de la oxidación por uno o dos electrones; previniendo así la formación de radical sulfinilo (RSOO[•]) (en oxidaciones por un electrón), especie capaz de propagar la oxidación a otras moléculas. La T(SH)₂ puede reaccionar con diferentes moléculas blanco de forma directa y/o indirecta a través de reacciones dependientes de triparredoxina (TXN). La tripanotona se mantiene en su estado reducido [T(SH)₂] por la flavoenzima dependiente de NADPH, tripanotona reductasa (TR) (Figura 24).

La T(SH)₂ puede donar electrones a diferentes vías; dentro de las que podemos destacar las reacciones redox de dos pasos que participan en la descomposición de oxidantes como: H₂O₂, ONOO⁻ y diversos hidroperóxidos (orgánicos de cadena corta, de ácidos grasos y de fosfolípidos). En este proceso, la T(SH)₂ entrega los equivalentes de reducción a moléculas intermediarias como GSSG, dehidroascorbato (dhAsc) o TXN oxidada (TXN-S₂), los cuales en su

estado reducido puede transferir electrones a diferentes enzimas parasitarias: peroxidasas, reductasas, glioxalasas y transferasas (Figura 24)^{220,225,226}.

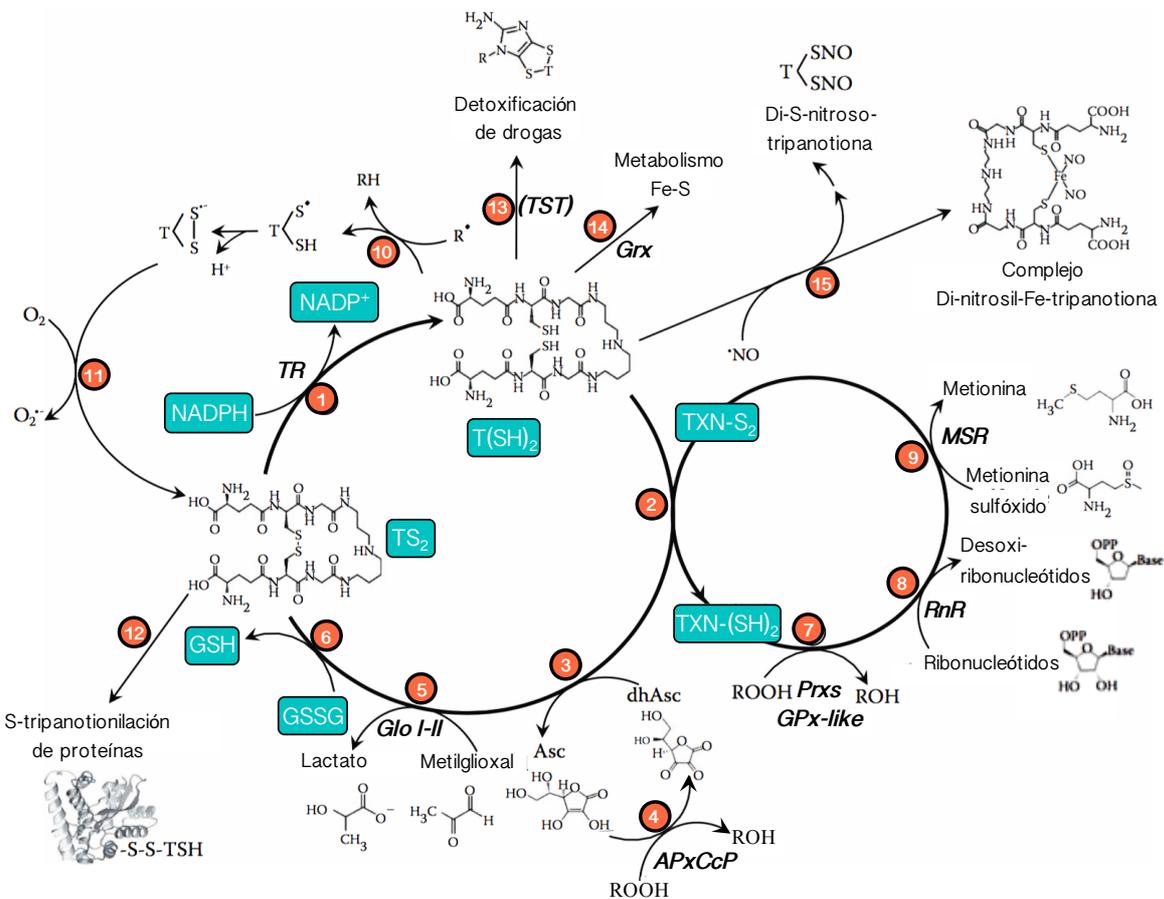


Figura 24. Reacciones dependientes de tripanotona. Reducción de la tripanotona disulfuro (TS₂) catalizada por la tripanotona reductasa (TR) a expensas de NADPH (1). Reducción directa por T(SH)₂ de: triparredoxina oxidada (TXN-S₂) (2), dihidroascorbato (dhAsc) (3), el ascorbato (Asc) resultante se puede utilizar como sustrato reductor de (APxCcP) (4). La T(SH)₂ reacciona con metilglioxal generando un bis-hemitiacetel, el cual puede ser metabolizado a lactato por las glioxalasas I y II (Glo I-II) (5) y reduce el glutatión disulfuro (GSSG) (6). TXNs catalizan la transferencia de electrones desde la T(SH)₂ a diferentes proteínas blanco involucradas en la detoxificación de peróxidos por peroxirredoxinas (Prxs) y glutatión peroxidasas-like (GPx-like) (7), permite la síntesis de ADN y proliferación vía ribonucleótido reductasa (RnR) (8) y la reparación de proteínas por la metionina sulfóxido reductasa (MSR) (9). La reacción directa de la T(SH)₂ con radicales libres (R[•]), actuando como *scavenger* y/o en reacciones de reparación, determina la formación transitoria de radical tílo (RS[•]) en la tripanotona, el cual se combina rápidamente con el tiol vecino rindiendo el radical aniónico disulfuro tripanotona (10). Este último, en presencia de O₂ (u otros sustratos oxidantes), evoluciona a la forma estable de TS₂ con la concomitante producción de O₂^{•-} (11). Las proteínas pueden experimentar S-tripantionilación (12), proceso que podría ser catalizado por la glutarredoxina (Grx). Asimismo, la T(SH)₂ tiene un rol central en la detoxificación de arsénico, drogas que contienen antimonial y compuestos nitroheterocíclicos a través de reacciones complejas que implican catálisis enzimática [tripanotona S-transferasa (TST) o TXN] (13). T(SH)₂ puede coordinar clúster hierro-azufre y transferirlo a Grxs (14) y en presencia de [•]NO puede formar complejos dinitrosil-hierro tripanotona o dinitroso tripanotona (15). (Adaptado Hugo M. et al., 2018)²²⁵.

El *pool* de tioles de bajo peso molecular juega un rol importante en la defensa antioxidante de *T. cruzi* a través de la reacción directa con especies radicalares como el [•]NO₂ o CO₃^{•-} y en la reparación de radicales proteicos como Tyr[•] y Cys[•]. A pesar de que los tioles no proteicos

pueden reaccionar directamente con oxidantes no radicalares, como el H_2O_2 y el peroxinitrito, la contribución a la detoxificación de los mismos *in vivo* sería minoritaria teniendo en cuenta la alta eficiencia del sistema de enzimas antioxidantes en *T. cruzi* ²²⁰.

Enzimas antioxidantes

El control parasitario, previo a la evasión del fagosoma y establecimiento del *T. cruzi* en el citosol celular, depende en gran medida de la producción de especies oxidantes. De ésta manera, los niveles de enzimas antioxidantes parasitarias al momento de la invasión serán determinantes de la resistencia parasitaria a éstas especies para poder establecer la infección. En los últimos años, análisis proteómicos y bioquímicos mostraron la inducción de enzimas antioxidantes durante el proceso de metacicloogénesis reforzando la hipótesis de la pre-adaptación del parásito para una infección efectiva ^{59,227,228}. Asimismo, se ha reportado que cepas salvajes de *T. cruzi* con un mayor contenido de enzimas antioxidantes se correlaciona con una mayor carga parasitaria y una mayor virulencia en el modelo agudo de infección a ratones ⁵⁹.

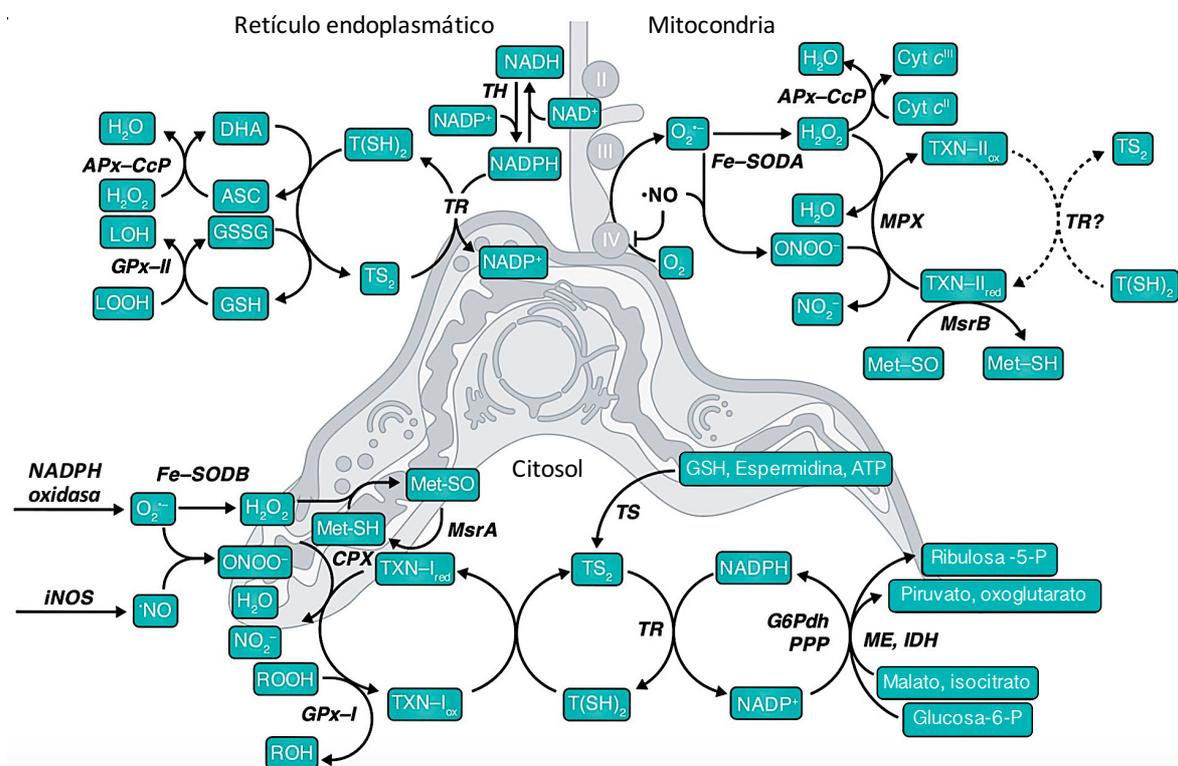


Figura 25. Sistema de antioxidante de *T. cruzi*. Las defensas antioxidantes de *T. cruzi* se componen de un sofisticado sistema de vías interconectadas en donde los equivalentes de reducción del NADPH son canalizados a diferentes sistemas enzimáticos a través de la $T(SH)_2$ mediante el ciclo redox $TXN/T(SH)_2/TR$. El NADPH puede derivar de la vía de las pentosas fosfato (PPP), isocitrato deshidrogenasa (IDH), enzima málica (ME) y $NAD(P)^+$ transhidrogenasa (TH). (Adaptado Piacenza L. et al., 2019) ⁵⁶.

Las defensas antioxidantes de *T. cruzi* se componen de un sofisticado sistema de vías interconectadas en donde los equivalentes de reducción del NADPH (derivado de la vía de las pentosas fosfato) son canalizados a diferentes sistemas enzimáticos a través de la T(SH)₂ y las triparredoxinas (TXN I y II) (Figura 24-25) ^{220,225}. *T. cruzi* presenta dos isoformas de TXNs, una citosólica (TXN-I) y otra transmembrana (TXN-II) anclada a la superficie del retículo endoplasmático y mitocondria con el dominio redox orientado hacia el citosol ²²⁹. Debido a las características únicas del sistema antioxidante parasitario en comparación con el huésped vertebrado es valorado como un buen blanco quimioterapéutico.

A continuación, se resumen las principales características del sistema de enzimas antioxidantes de *T. cruzi*, compuesto por Fe-superóxido dismutasas y diferentes peroxidasas y su relación con la virulencia parasitaria.

Peroxidasas

Se han descrito 5 peroxidasas en *T. cruzi* que difieren en localización celular, especificidad por sustrato y mecanismo de acción.

Glutación peroxidasas

Las glutatión peroxidasas (GPxs) I y II pertenecen a la subfamilia de las hidropéroxido fosfolípido glutatión peroxidasas (PHGPx, *phospholipid hydroperoxide GPx*), carecen de selenocisteína y reemplazan este residuo por cisteína en la triada catalítica ^{230,231}. A pesar de carecer de la enzima glutatión reductasa, *T. cruzi* puede restituir esta actividad mediante el ciclo redox TXN/T(SH)₂/TR (Figura 24) ^{230,231}. La GPx-I se localiza a nivel del citosol y glicosomas, mientras que la GPx-II se localiza en el retículo endoplásmico (Figura 25) ^{232,233}. Ambas GPxs pueden metabolizar hidropéroxidos de ácidos grasos o fosfolípidos (Figura 24-25) pero no H₂O₂. Además, únicamente la GPx-I puede metabolizar alquil-hidropéroxidos de cadena corta ²³¹. Ambas pueden utilizar GSH como reductor, mientras que GPx-I puede utilizar además TXN (Figura 25), siendo de 8–15 veces más eficiente en la metabolización de peróxidos. De esta manera, las GPxs pueden funcionar como *scavengers* de equivalentes de reducción de diferentes sustratos dependiendo del contexto celular ²³¹. La sobreexpresión de las isoformas GPx I y II protegen a *T. cruzi* (estadio epimastigota) frente al agregado exógeno de H₂O₂ a pesar de no detoxificar dicho oxidante de forma directa ^{231,232}. Estos resultados sugieren que la

protección conferida por ambas enzimas es mediada por la metabolización de hidroperóxidos lipídicos de membrana generados en cadenas de lipoperoxidación ^{231,233}.

Ascorbato/citocromo c peroxidasa

T. cruzi posee una hemoperoxidasa híbrida tipo A capaz de utilizar ascorbato y/o citocromo c (APx-CcP) como sustratos reductores para la detoxificación de H₂O₂ ^{234,235}. La APx-CcP se encuentra localizada en la membrana del retículo endoplasmático y mitocondria en los diferentes estadios del ciclo de vida de *T. cruzi* y en la membrana celular en los estadios infectivos (Hugo et al., 2017). Además, los parásitos sobreexpresantes de APx-CcP son más resistentes a la toxicidad mediada por H₂O₂ con respecto a sobreexpresantes de las peroxirredoxinas. Sin embargo, no se observó diferencia en la citotoxicidad mediada por peroxinitrito con respecto a la cepa salvaje para el estadio epimastigota ²²⁸. Parásito *knock-out* para la APx-CcP son más sensibles al H₂O₂ y presentan una disminución significativa en la capacidad de infectar células de mamífero. Sin embargo, no se observaron diferencias en la susceptibilidad al tratamiento con nifurtimox, así como tampoco en la replicación, diseminación o tropismo de tejidos en la fase crónica de la enfermedad para el modelo murino. Aunque la APx-CcP no resulte esencial para el establecimiento de la infección en la fase crónica ²³⁶, parásitos sobreexpresantes de dicha enzima resultan más virulentos en el modelo murino durante la fase aguda de la infección ²³⁴.

Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas de *T. cruzi* citosólica (CPx) y mitocondrial (MPx) detoxifican peroxinitrito ($k = 1,0 \times 10^6$ y $k = 1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente) y H₂O₂ ($k = 3,0 \times 10^7$ y $k = 6,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente) y otros hidroperóxidos orgánicos de cadena corta ^{181,228,237,238}. Los niveles de expresión de la CPx y MPx aumentan con la diferenciación del estadio epimastigota al tripomastigota metacíclico. En el modelo murino se observó una correlación directa entre los niveles de peroxirredoxinas presentes en cepas salvajes más virulentas que presentan una mayor parasitemia, daño a tejidos y cardiomiopatía sintomática ^{59,239}. Asimismo, parásitos sobreexpresantes de peroxirredoxinas presentan una mayor virulencia en modelos de infecciones a cultivos celulares de fagocitos profesionales y células no-fagocíticas ²⁴⁰. La sobreexpresión de CPx puede neutralizar los efectos citotóxicos del peroxinitrito, favoreciendo la supervivencia de *T. cruzi* en el ambiente oxidativo generado dentro del fagosoma

de macrófagos activados⁵⁵. La sobreexpresión de CPx lleva a menores niveles de 3-NO₂-Tyr en los estadios epimastigotas y tripomastigota metacíclicos de *T. cruzi* expuestos a peroxinitrito²²⁸.

Fe-superóxido dismutasas

Finalmente, *T. cruzi* contiene exclusivamente superóxido dismutasas dependientes de Fe (isoforma ausente del huésped vertebrado que presenta las isoformas dependientes de Mn y de Cu/Zn) que detoxifican el radical O₂^{•-} generado a nivel del citoplasma (Fe-SODB-1), mitocondria (Fe-SODA y Fe-SODC) y glicosomas (FeSODB-2)^{184,241}. La Fe-SODs de *T. cruzi* dismutan rápidamente el O₂^{•-} ($k = 4,5 - 7,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)¹⁸⁴ favoreciendo la supervivencia del parásito en el huésped vertebrado a través de diversos mecanismos, los cuales incluyen: la eliminación del efecto citotóxico del O₂^{•-}/HO₂[•] a nivel mitocondrial y citosólico dentro del fagosoma de macrófagos; Inhibición y/o competencia en la formación de ONOO⁻ en parásitos expuesto a [•]NO; y modulación de la inducción de la muerte celular programada por señalización redox^{54,242,243}.

A pesar de la gran homología estructural entre las isoformas Fe-SODs de *T. cruzi* presentan diferencias en la susceptibilidad a peroxinitrito. La Fe-SODB citosólica ha demostrado ser altamente resistente a la inactivación por dicho oxidante en comparación con la isoenzima mitocondrial Fe-SODA¹⁸⁴. Parásitos sobreexpresante de la isoforma citosólica presentan una mayor resistencia a la muerte dentro del fagosoma de macrófagos inmunoestimulados, potenciando así la proliferación intracelular con respecto a la cepa salvaje. Además, se observó que la mayor infectividad presentada por parásitos sobreexpresantes de Fe-SODB con respecto a la cepa salvaje desaparece en macrófagos phox^{-/-} (carentes de actividad NOX2), demostrando el rol del O₂^{•-}/HO₂[•] en el control de la infección⁵⁴.

Resultados previos mostraron que la sobreexpresión de la Fe-SODA protege a *T. cruzi* de la muerte apoptótica dándole un rol central al O₂^{•-} en la señalización redox del proceso de muerte y mostrando el rol central de la Fe-SODA parasitaria como modulador del proceso de muerte celular programada (MCP)²⁴³. La interacción del [•]NO con blancos parasitarios mitocondriales puede llevar a la inhibición de la cadena de transporte de electrones con la consecuente generación de O₂^{•-} y desencadenar o disparar la inducción de la muerte celular parasitaria²⁹. El estímulo de MCP mediado por suero humano fresco (SHF) produce la

externalización temprana de fosfatidil-serina (FS) y la depleción de tioles de bajo peso molecular; con un aumento del flujo de glucosa a través de la vía de las pentosas fosfato. El ensamblaje del complejo MAC (*membrane attack complex*) en la superficie del parásitos induce la entrada y acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, inhibición de la respiración y aumento de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$, disparador de la MCP ^{29,243,244}. No obstante, parásitos sobreexpresante de Fe-SODA son resistentes a la MCP, mostrando de manera fehaciente el rol del $\text{O}_2^{\bullet-}$ como inductor del proceso ²⁴³.

De esta manera, la capacidad antioxidante parasitaria y en especial la presencia de Fe-SODs presentan un rol preponderante en la regulación redox parasitaria determinando el destino de los mismos hacia la proliferación o muerte por apoptosis. Por otro lado, la dismutación de radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ por las Fe-SODs lleva a una menor biodisponibilidad del mismo para la formación de ONOOH.

OBJETIVO

Determinar la capacidad del H_2O_2 y del $\cdot NO$ y especies relacionadas derivados de la célula huésped de difundir y reaccionar con blancos parasitarios llevando al control de la infección. Definir la importancia de los sistemas antioxidantes de *T. cruzi* en la virulencia y persistencia en modelos celulares (cardiomiocitos y macrófagos) así como en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.

Objetivos específicos:

1. Determinar y caracterizar el estrés oxidativo generado en cardiomiocitos infectados con *T. cruzi*.
2. Definir la capacidad del H_2O_2 y el $\cdot NO$ de inducir la MCP en *T. cruzi* y la relevancia de estos oxidantes en el control de la proliferación parasitaria.
3. Determinar el rol de las enzimas antioxidantes mitocondriales (Fe-SODA y MPx) de *T. cruzi* en el destino parasitario hacia la proliferación o muerte.
4. Evaluar la asociación existente entre los niveles de enzimas antioxidantes (Fe-SODA, MPx y CPx) de *T. cruzi* con un fenotipo más infectivo en modelos celulares y animal.

Capitulo 1: Rol de la Fe-SODA y MPx de T. cruzi en modelos de infección celular y animal

RESUMEN

En este trabajo, mostramos que la infección de cardiomiocitos por *T. cruzi* lleva al establecimiento de un estrés oxidativo que se caracteriza por: *i)* Disfunción mitocondrial temprana, *ii)* Generación de H_2O_2 y *iii)* Translocación nuclear del factor de transcripción FOXO3, con aumento en la expresión de sus proteínas mitocondriales dianas (Mn-SOD y Prx3). La estimulación de cardiomiocitos con citoquinas proinflamatorias (TNF- α /IL-1 β) promovió una mayor eficiencia en el control de la proliferación de amastigotas intracelulares. Los oxidantes generados por el huésped ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y $ONOO^-$) son capaces de controlar la proliferación parasitaria a través de la inducción de la MCP en el estadio amastigota. En este ambiente, caracterizado por la formación de oxidantes, se detectó un mayor número de amastigotas apoptóticas. No obstante, parásitos sobreexpresantes de las enzimas mitocondriales Fe-SODA o MPx presentan un incremento en la proliferación y una disminución de amastigotas apoptóticas con respecto a parásitos salvajes (CL-Brener) en infecciones a cardiomiocitos estimulados. En infecciones a macrófagos, se observa una mayor proliferación de parásitos sobreexpresantes de Fe-SODA mientras que en el modelo murino se observa una disminución en la parasitemia en comparación con la cepa salvaje. Para comprender esta discrepancia, se evaluó la presencia de fosfatidilserina (FS) en los inóculos infectivos y se observó que los tripomastigotas metacíclicos sobreexpresantes de Fe-SODA presentaban una menor exposición de FS que la cepa salvaje. Una mayor exposición de FS mimetiza a células apoptóticas y llevan al macrófago a adoptar un fenotipo resolutivo (anti-inflamatorio), mientras que una menor exposición determinan la activación clásica en macrófagos (proinflamatoria). En conclusión, los mediadores redox difusibles derivados de cardiomiocitos son capaces de controlar la proliferación de amastigotas intracelulares mediante la inducción de la MCP. No obstante, sobreexpresantes de Fe-SODA logran evadir la MCP evidenciando el rol central del radical $O_2^{\bullet-}$ a nivel mitocondrial en la inducción del proceso de muerte en amastigotas de *T. cruzi*. Finalmente, el grado de exposición de FS en los inóculos infectivos (cepa salvaje vs Fe-SODA) podría estar influenciando la respuesta de los macrófagos en el sitio de inoculación, favoreciendo la evasión de los parásitos salvajes respecto a los sobreexpresantes de Fe-SODA.

RESULTADOS

Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*

Se evaluó la función mitocondrial y la generación de oxidantes (en particular H_2O_2) en cardiomiocitos primarios post-infección con *T. cruzi* a las 24–48 h (relación de infección parásito:célula, 5:1). Se evidenció que la infección de cardiomiocitos primarios por *T. cruzi* genera una disfunción mitocondrial en etapas tempranas de la infección, llevando a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mm}$), una disminución de la máxima capacidad respiratoria (MRR), una disminución del índice de control respiratorio (RCR) y una disminución de la capacidad respiratoria de reserva (SRC). Además, la disfunción mitocondrial se acompaña de un aumento en la producción de H_2O_2 .

Función mitocondrial en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*

Se evaluó el $\Delta\Psi_{mm}$ de cardiomiocitos control e infectados utilizando la sonda JC-1 y se analizó por microscopía de epifluorescencia. Los cardiomiocitos infectados con tripomastigotas salvajes CL-Brener (24 h) presentan una disminución en la fluorescencia mitocondrial roja (agregados-J intra-mitocondriales) y un aumento en la fluorescencia verde citoplasmática (monómeros-J) con respecto al cultivo de cardiomiocitos no infectados. Esto muestra una pérdida temprana del potencial de membrana mitocondrial luego de la infección por *T. cruzi* (Figura 26A), como se mostró anteriormente. Además, se evaluó la función mitocondrial de cardiomiocitos control e infectados (24 h) utilizando el analizador de consumo de O_2 SeaHorse, antes y después de la adición de los fármacos (oligomicina, FCCP y AA-Rot) (Figura 26B). Se determinó el índice de control respiratorio (RCR) como la relación entre el consumo de O_2 en presencia de FCCP y de oligomicina. Dicho índice se utilizó como indicador de la función mitocondrial en cardiomiocitos²⁴⁵. Se observó una disminución del RCR en cardiomiocitos infectados, siendo aún mayor en cardiomiocitos infectados con parásitos sobreexpresantes

Resultados capítulo 1: Rol de Fe-SODA y MPx de T. cruzi en modelos de infección celular y animal

de Fe-SODA y MPx con respecto a la cepa salvaje CL-Brener (Figura 26C). De igual manera se observó una disminución del SRC y MRR indicativos de una pérdida de la reserva bioenergética y del $\Delta\Psi_{mm}$, respectivamente. Por lo tanto, la infección de cardiomiocitos por parásitos sobreexpresantes Fe-SODA y MPx genera una disfunción mitocondrial mayor en comparación a los infectados con la cepa salvaje. Este resultado sugiere un mayor daño celular posiblemente debido a la capacidad de estos parásitos sobreexpresantes de enzimas antioxidantes mitocondriales de evadir la muerte celular programada (MCP) y generando infecciones más severas.

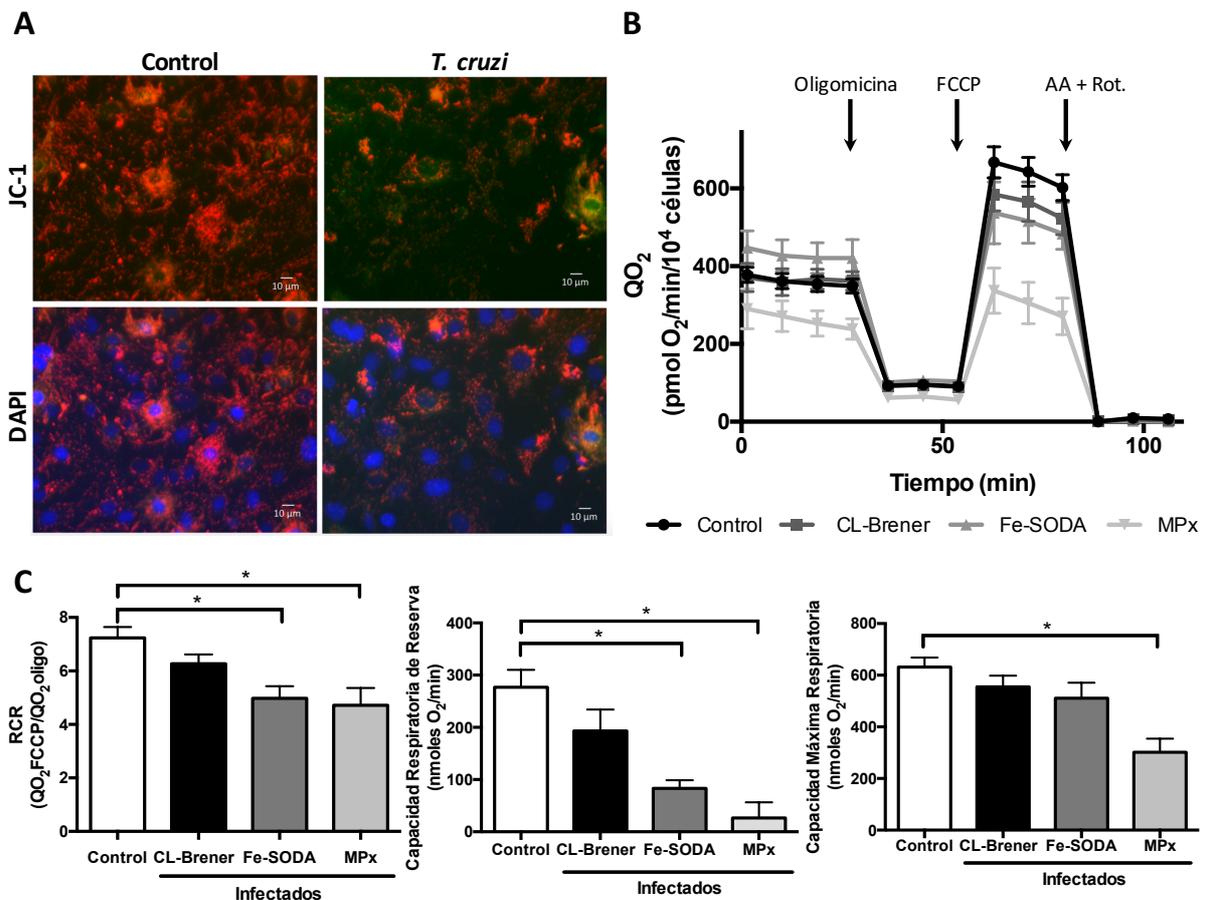


Figura 26. Función mitocondrial en cardiomiocitos primarios infectados por *T. cruzi*. (A) Cardiomiocitos primarios se infectaron con *T. cruzi* (CL-Brener, relación parásito:células, 5:1) durante 24 h y se evaluó el potencial de la membrana mitocondrial utilizando JC-1 (5 μ M, 30 min) mediante microscopía de fluorescencia (panel superior, 400 \times). Se utilizó DAPI (5 μ g/ml) para la tinción nuclear de cardiomiocitos (panel inferior). (B) Cardiomiocitos primarios se infectaron como en el panel (A) utilizando tripomastigotes de *T. cruzi* salvajes (CL-Brener) y sobreexpresantes (Fe-SODA y MPx). La función mitocondrial se evaluó 24 h post-infección utilizando un analizador del consumo de O₂ (SeaHorse XFe24) frente a la adición de los diferentes compuestos a 37 $^{\circ}$ C. (C) Los parámetros respiratorios [índice de control respiratorio (RCR), capacidad respiratoria de reserva (SRC) y capacidad máxima respiratoria (MRR)] de cultivos de cardiomiocitos control e infectados se calcularon como se describió en la sección de Materiales y Métodos. (RCR = QO₂FCCP/QO₂oligo; SRC = QO₂FCCP – QO₂basal; MRR = QO₂FCCP). Los resultados son la media de tres experimentos independientes. *, denota diferencia estadística con p < 0,05.

En resumen, los resultados indican que en nuestras condiciones experimentales a las 24 h post-infección, se produce una disfunción mitocondrial en los cardiomiocitos primarios.

Generación de oxidantes en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*

La producción de oxidantes en cardiomiocitos (H9c2 y/o primarios) se evaluó midiendo la acumulación de H_2O_2 en sobrenadantes de cultivos control e infectados, estimulados o no con citoquinas proinflamatorias. La estimulación con citoquinas proinflamatorias incrementó la producción de H_2O_2 , siendo aún mayor el incremento por la infección por *T. cruzi*, tanto en cardiomiocitos de la línea celular H9c2 como en cardiomiocitos primarios (Figura 27A-B). No se observaron diferencias significativas en la velocidad de producción de H_2O_2 en cardiomiocitos primarios a las 48 h post-infección con parásitos salvajes o sobreexpresantes de Fe-SODA, o por el tratamiento con citoquinas (Figura 27C).

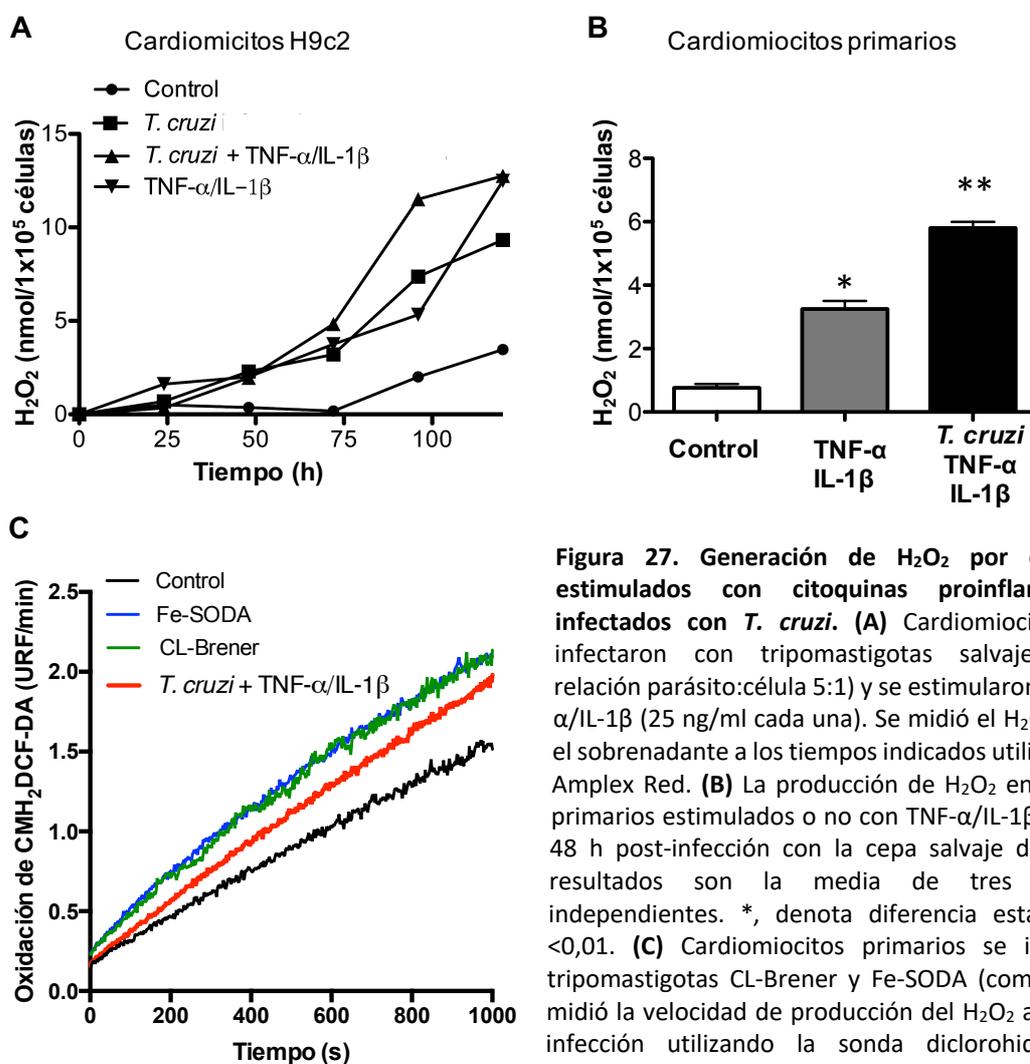


Figura 27. Generación de H_2O_2 por cardiomiocitos estimulados con citoquinas proinflamatorias y/o infectados con *T. cruzi*. (A) Cardiomiocitos (H9c2) se infectaron con tripomastigotas salvajes (CL-Brener, relación parásito:célula 5:1) y se estimularon o no con TNF- α /IL-1 β (25 ng/ml cada una). Se midió el H_2O_2 presente en el sobrenadante a los tiempos indicados utilizando la sonda Amplex Red. (B) La producción de H_2O_2 en cardiomiocitos primarios estimulados o no con TNF- α /IL-1 β se midió a las 48 h post-infección con la cepa salvaje de *T. cruzi*. Los resultados son la media de tres experimentos independientes. *, denota diferencia estadística con $p < 0,01$. (C) Cardiomiocitos primarios se infectaron con tripomastigotas CL-Brener y Fe-SODA (como en (A)) y se midió la velocidad de producción del H_2O_2 a las 48 h post-infección utilizando la sonda diclorohidrofluoresceína (H_2DCF , 30 μM , $\lambda_{ex} = 420$ nm and $\lambda_{em} = 520$ nm).

Activación del factor de transcripción FOXO

El establecimiento de un estrés oxidativo, observado en los cardiomiocitos infectados, puede inducir una respuesta antioxidante con la activación del factor de transcripción FOXO3 y el consiguiente aumento en la expresión de sus genes diana.

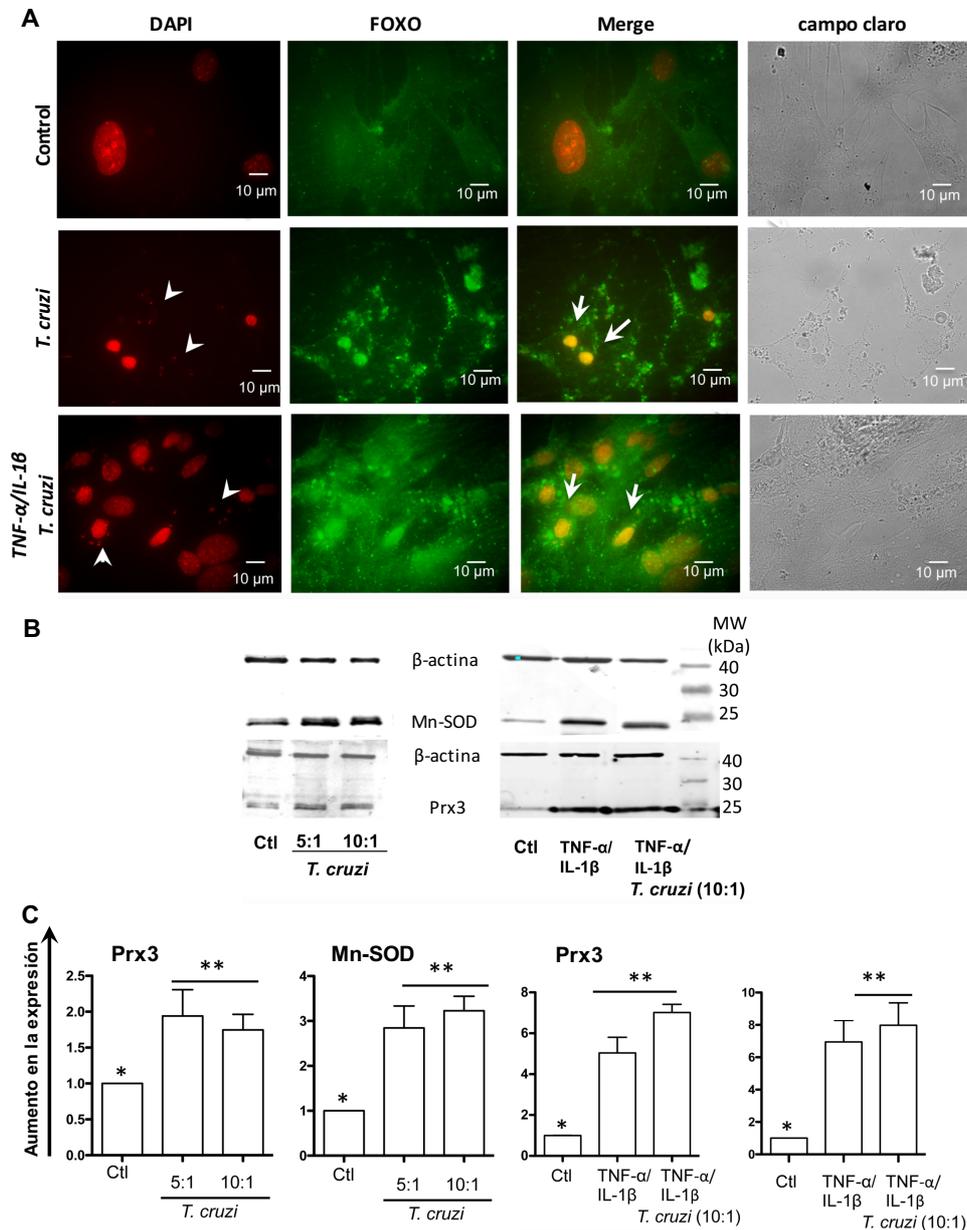


Figura 28. Activación de FOXO3 y expresión de genes blanco en cardiomiocitos primarios infectados. (A) Cardiomiocitos primarios se infectaron con tripomastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener, relación parásito:célula, 5:1) durante 12 h en ausencia o presencia de TNF- α /IL-1 β (25 ng/ml cada una). La inmunolocalización de FOXO3 se realizó mediante anticuerpos primario de ratón anti-FOXO3 (Abcam) en conjunto con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Alexa-488 (panel central izquierdo, fluorescencia verde). El ADN se visualizó con DAPI (primera columna, fluorescencia roja) y merge de las imágenes (panel central derecho, fluorescencia amarilla). Las puntas de flecha blancas señalan el ADN del parásito en cardiomiocitos infectados. Las flechas blancas indican la localización nuclear de FOXO3 en cardiomiocitos infectados. **(B)** Análisis de la expresión de Mn-SOD y Prx3 por western blot en cardiomiocitos control e infectados por *T. cruzi* después de 24 h. **(C)** Aumento relativo de la expresión de Mn-SOD y Prx3 con respecto a la condición control utilizando la expresión de β -actina como el control de carga. Los resultados son la media \pm SD (n =3). ** denota diferencia estadísticamente significativa con respecto a *, con p <0,05.

Se evaluó la activación y translocación nuclear de FOXO3 en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi* mediante microscopía de inmunofluorescencia. A las 12 h post-infección, se observó una localización nuclear de FOXO3 en cardiomiocitos infectados con *T. cruzi* y/o estimulados con citoquinas proinflamatorias (Figura 28A). Simultáneamente, se observó un aumento en la expresión proteica de las enzimas mitocondriales dianas, manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) y peroxirredoxina-3 (Prx3), en cultivos infectados por *T. cruzi* (Figura 28B-C).

Control de la proliferación parasitaria en cardiomiocitos. Inducción de la MCP en amastigotas intracelulares.

Rol del H₂O₂ en el control de la proliferación y MCP de amastigotas.

Los resultados previos muestran el establecimiento de un estrés oxidativo en cardiomiocitos infectados con *T. cruzi* acompañado de la generación de H₂O₂, el cual sería capaz de difundir y alcanzar el amastigota intracelular, controlando de esta manera la proliferación parasitaria. Para evaluar esta hipótesis, se infectaron cardiomiocitos primarios estimulados o no con citoquinas proinflamatorias. A diferencia de los cardiomiocitos no estimulados, en los estimulados con TNF- α /IL-1 β se controló parcialmente la infección por parásitos salvajes (CL-Brener), sin embargo, no lograron controlar la proliferación de amastigotas intracelulares sobreexpresantes de Fe-SODA o MPx (Figura 29A). El aumento en la proliferación parasitaria y por lo tanto en el número de amastigotas intracelulares podría explicar el mayor compromiso de la función mitocondrial descrito anteriormente (Figura 26C). Se evaluó la inducción de la MCP en amastigotas intracelulares de la cepa salvaje (CL-Brener, 96 h post-infección) mediante la técnica TUNEL y se visualizó por microscopía de inmunofluorescencia la presencia de amastigotas apoptóticos (Figura 29B). Se observó un aumento de la producción de O₂^{•-} por amastigotas intracelulares en cardiomiocitos estimulados con TNF- α /IL-1 β con respecto a los no estimulados (Figura 29C). Estos resultados se podrían explicar por el aumento en la producción de H₂O₂, el cual difundiría alcanzando la mitocondria de los

amastigotas intracelulares generando un aumento sitio específico de la producción de $O_2^{\bullet-}$, responsable de inducir la MCP ²⁴³.

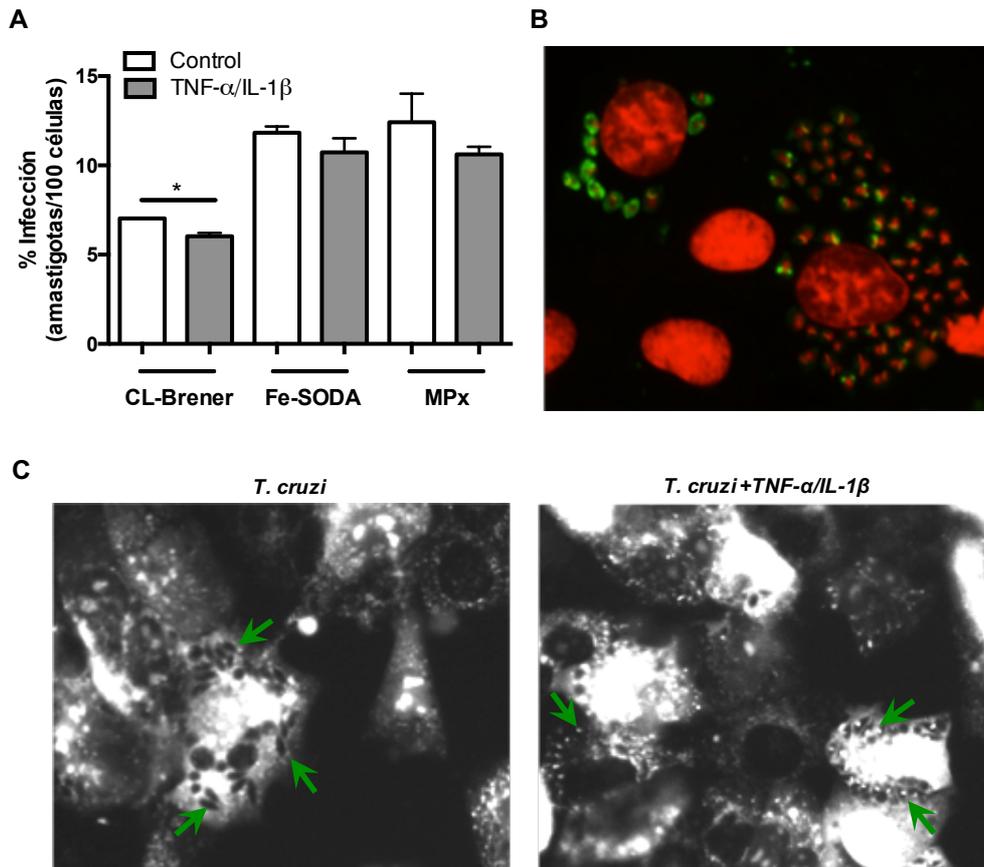


Figura 29. Control de la proliferación parasitaria en cardiomiocitos e inducción de la MCP en amastigotas intracelulares mediada por H_2O_2 . (A) Cardiomiocitos primarios estimulados o no con TNF- α /IL-1 β (25 ng/ml cada uno) se infectaron con tripomastigotas salvajes (CL-Brener) o sobreexpresantes Fe-SODA o MPx (relación parásito:célula, 5:1) durante 48 h y se evaluó la infección mediante conteo de amastigotas intracelulares (DAPI). Los resultados se expresan como amastigotas intracelulares/100 cardiomiocitos; se contaron al menos 1000 cardiomiocitos. * denota diferencia estadística con $p<0,05$. (B) La fragmentación del ADN (marcador de apoptosis) se evaluó en amastigotas intracelulares de la cepa CL-Brener (72 h post-infección) mediante la técnica TUNEL (Click-iT®-TUNEL Alexa fluor 488, Invitrogen, en verde) y se visualizaron los núcleos con DAPI (en rojo) por microscopía de fluorescencia. (C) La producción de $O_2^{\bullet-}$ se evaluó en amastigotas intracelulares de la cepa CL-Brener en cultivo de cardiomiocitos estimulados o no con TNF- α /IL-1 β . Las flechas verdes indican amastigotas intracelulares.

Rol del $\bullet NO$ en el control de la proliferación y la MCP de amastigotas.

Evaluamos el rol del $\bullet NO$ como posible mediador redox capaz de desencadenar la MCP en amastigotas intracelulares y por tanto, controlar la proliferación parasitaria. Con este fin, expusimos cardiomiocitos (H9c2) infectados con *T. cruzi* a flujos fisiológicamente relevantes de $\bullet NO$ mediante el uso de un dador de $\bullet NO$ ([NOC-18]= 0,5 mM; 0,15 μM $\bullet NO$ /min). De igual forma a lo observado en cultivos de cardiomiocitos primarios estimulados con TNF- α /IL-1 β

Resultados capítulo 1: Rol de Fe-SODA y MPx de *T. cruzi* en modelos de infección celular y animal

(Figura 29A), los cardiomiocitos H9c2 expuesto a $\ast\text{NO}$ controlaron la proliferación de la cepa salvaje CL-Brener pero fueron ineficientes en controlar la proliferación de sobreexpresantes Fe-SODA (Figura 30A). Previamente, nuestro grupo ha reportado que la sobreexpresión de la Fe-SODA en el estadio epimastigota de *T. cruzi* genera resistencia a la inducción de la MCP utilizando suero humano fresco (SHF) como estímulo de muerte^{243,244}. Considerando estos antecedentes en conjunto con los resultados previos que muestran que parásitos sobreexpresantes Fe-SODA y MPx presentan porcentajes de infección mayores con respecto a la cepa salvaje, planteamos la hipótesis de que parásitos Fe-SODA y MPx serían más resistentes a la inducción de la MCP.

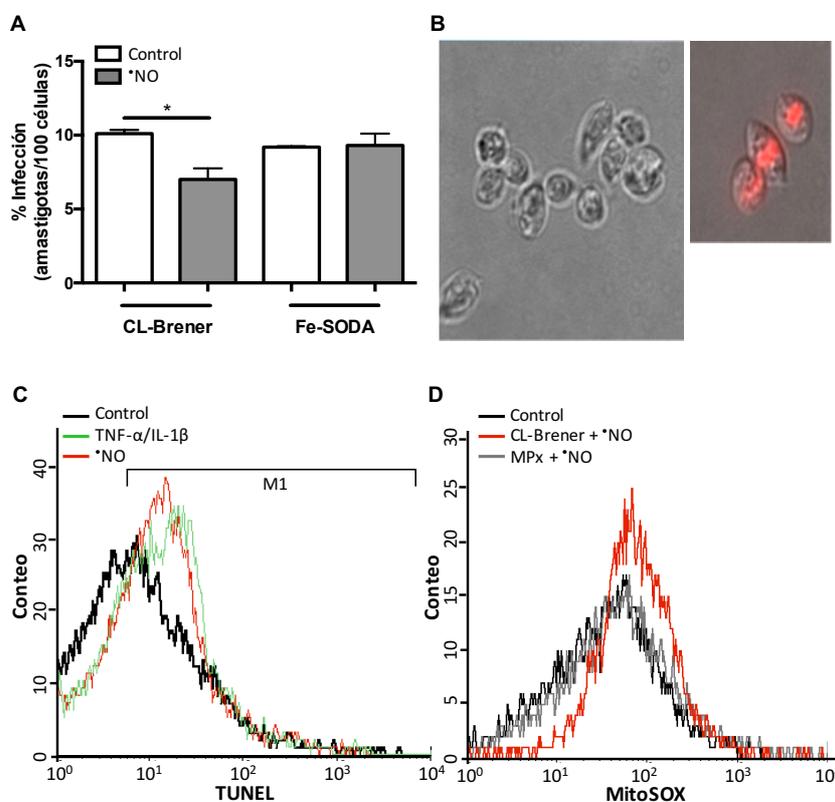


Figura 30. Control de la proliferación parasitaria en cardiomiocitos e inducción de la MCP en amastigotas intracelulares mediada por $\ast\text{NO}$. (A) Cardiomiocitos H9c2 se infectaron con tripomastigotas CL-Brener o sobreexpresante Fe-SODA (relación parásito:célula, 5: 1) y se expusieron o no a NOC-18 (0,5 mM) durante 48 h. La infección se evaluó por conteo de amastigotas intracelulares (DAPI). Los resultados se expresan como amastigotas intracelulares / 100 cardiomiocitos. Se contaron al menos 1000 cardiomiocitos. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$. (B) Imagen representativa de amastigotas de *T. cruzi* purificados de cultivo de cardiomiocitos. A la izquierda se muestra campo claro y a la derecha el merge

con JC-1. (C) El ensayo de TUNEL se analizó por citometría de flujo en amastigotas intracelulares CL-Brener purificados de cardiomiocitos H9c2 72 h post-infección en presencia o ausencia de TNF- α /IL-1 β (25 ng/ml cada uno) o NOC-18 (0,5 mM). El aumento en la población M1 con respecto a la condición en ausencia de citoquinas proinflamatorias y NOC-18 se consideró como TUNEL positivo. (D) Amastigotas intracelulares de CL-Brener y sobreexpresantes MPx se purificaron de cultivos de cardiomiocitos infectados (como en (C) en ausencia de $\ast\text{NO}$ y TNF- α /IL-1 β) y precargaron con MitoSOX (5 μM , 30 min). Posteriormente, se expusieron o no a NOC-18 (0,5 mM) durante 3 h. La oxidación de la sonda MitoSOX en amastigotas intracelulares se analizó mediante citometría de flujo.

Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, se purificaron amastigotas intracelulares a homogeneidad a partir de cultivos de cardiomiocitos infectados (Figura 30B) control, estimulados con citoquinas proinflamatorias o expuestos a flujos de $\ast\text{NO}$. Finalmente, se realizó el ensayo de TUNEL como marcador de MCP. Amastigotas salvajes CL-Brener

Resultados capítulo 1: Rol de Fe-SODA y MPx de *T. cruzi* en modelos de infección celular y animal

purificados de cultivos de cardiomiocitos estimulados con citoquinas proinflamatorias presentaron un aumento en la detección de amastigotas TUNEL positivos ($15 \pm 5\%$) con respecto al cultivo no estimulado (Figura 30C). Este resultado es consistente con la menor tasa de proliferación observada previamente (Figura 29A). Además, se observó un aumento de parásitos TUNEL positivos en amastigotas purificados de cultivos de cardiomiocitos expuestos a NO con respecto a los controles (Figura 30C). Por lo tanto, estos resultados demuestran el rol del NO como inductor de la MCP en amastigotas intracelulares. Previamente, nuestro grupo ha reportado la capacidad del NO de inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial y por consiguiente el consumo de oxígeno en el estadio epimastigota ¹⁷⁶. Considerando este antecedente, amastigotas intracelulares CL-Brener y MPx purificados de cultivos de cardiomiocitos (control) se expusieron a NO (0,5 mM NOC-18; 3 h) y se evaluó la oxidación de la sonda MitoSOX mediante citometría de flujo. Se observó un aumento en la oxidación de MitoSOX para la cepa salvaje; mientras que sobreexpresantes MPx exhiben una menor oxidación de la sonda debido a la detoxificación de ONOO^- generado por la producción simultánea de NO y $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figura 30D).

De esta manera, se observó, al igual que para el estadio epimastigota, la capacidad del NO de difundir hasta alcanzar la mitocondria de amastigotas de *T. cruzi* generando un aumento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$. No obstante, los sobreexpresantes de Fe-SODA y MPx mostraron ser resistentes a la inducción de la MCP, destacando así el rol del $\text{O}_2^{\bullet-}$ y/o peroxinitrito derivados de la mitocondria en la señalización del proceso en el estadio amastigotas (Figura 31A-B).

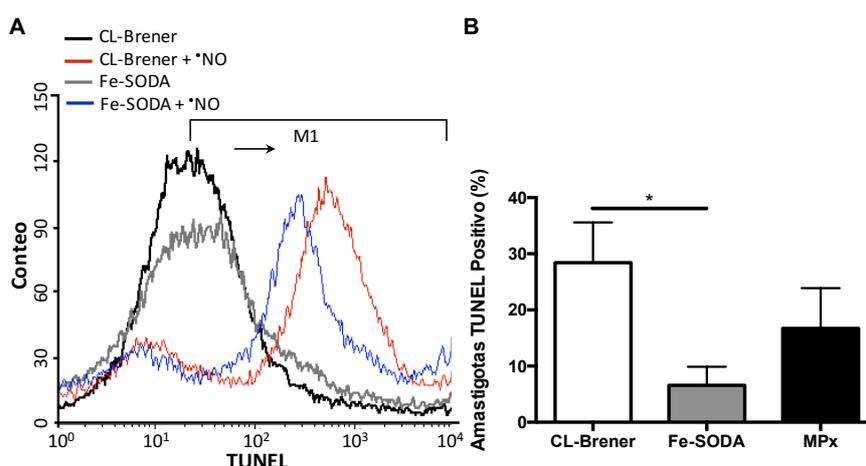


Figura 31. Parásitos sobreexpresantes Fe-SODA y MPx resisten parcialmente la inducción de la MCP mediada por NO . (A) Cardiomiocitos (H9c2) se infectaron con *T. cruzi* salvaje (CL-Brener) o sobreexpresantes (Fe-SODA y MPx) (relación parásitos:células, 5:1) en presencia o ausencia de NOC-18 (0,5 mM) durante 72 h. Los amastigotas

intracelulares se purificaron y se evaluó la fragmentación del ADN por ensayo de TUNEL mediante citometría de flujo. El aumento en la población M1 se tomó como positivo. (B) Amastigotas TUNEL positivos para la cepa salvaje (CL-Brener) y sobreexpresantes (Fe-SODA y MPx) (M1 en (A)) en presencia de NOC-18 (0,5 mM). Los resultados se expresan como el porcentaje de amastigotas TUNEL positivos y representan la media de tres experimentos independientes. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$.

Inducción de la MCP en *T. cruzi* por exposición a H₂O₂: Generación intra-mitocondrial de radical O₂^{•-}.

Los resultados previos muestran que los cardiomiocitos estimulados con citoquinas proinflamatorias producen mayores cantidades de H₂O₂ y son más eficientes en controlar la proliferación parasitaria. Por lo tanto, evaluamos la capacidad del H₂O₂ de inducir la MCP en el estadio epimastigota de *T. cruzi* exponiendo a los parásitos CL-Brener (3 x 10⁸ epimastigotas.ml⁻¹) a H₂O₂ (300 μM durante 10 min a 28 °C) en PBS (pH 7,4).

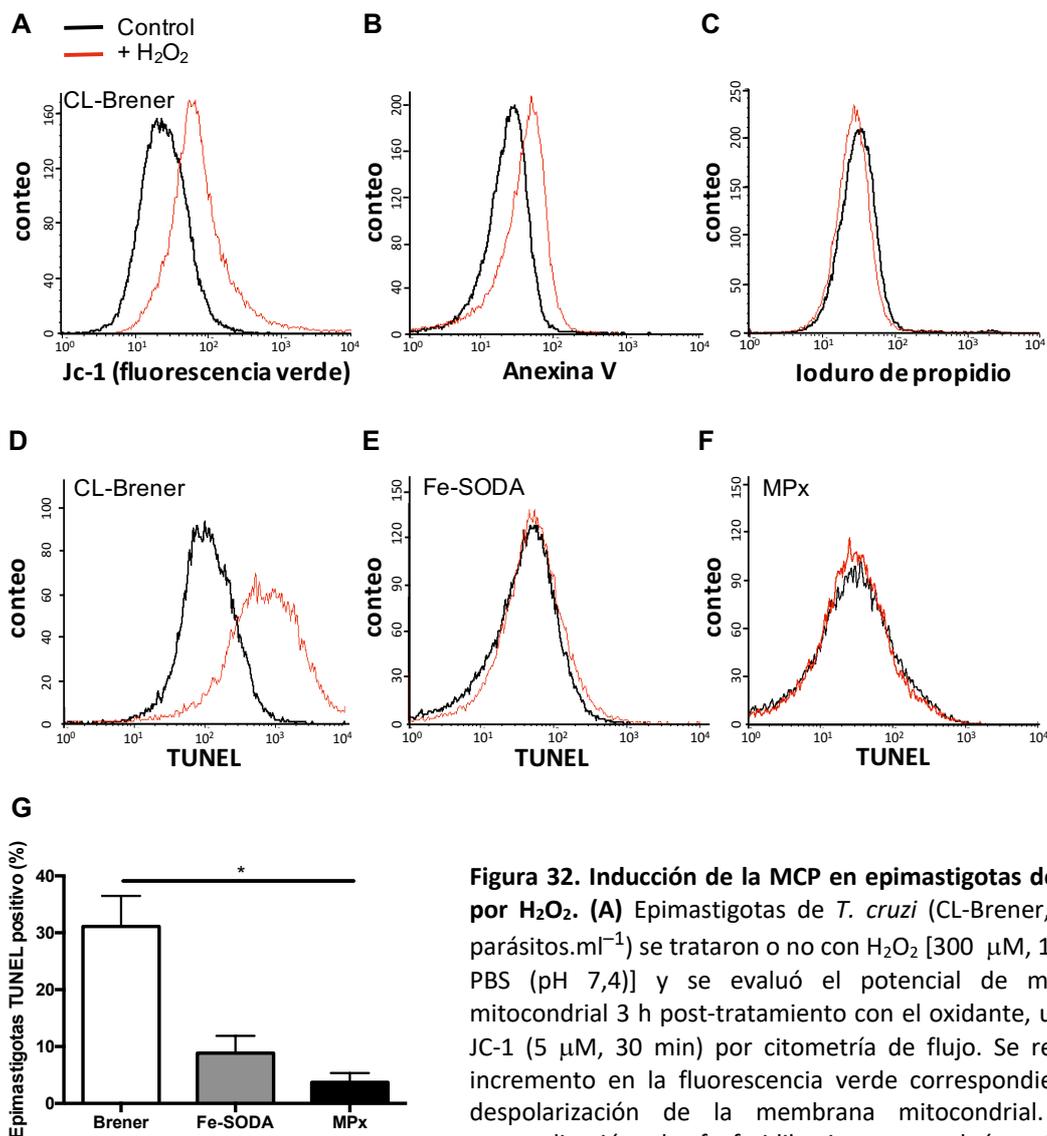


Figura 32. Inducción de la MCP en epimastigotas de *T. cruzi* por H₂O₂. (A) Epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener, 3 × 10⁸ parásitos.ml⁻¹) se trataron o no con H₂O₂ [300 μM, 10 min en PBS (pH 7,4)] y se evaluó el potencial de membrana mitocondrial 3 h post-tratamiento con el oxidante, utilizando JC-1 (5 μM, 30 min) por citometría de flujo. Se registró el incremento en la fluorescencia verde correspondiente a la despolarización de la membrana mitocondrial. (B) La externalización de fosfatidilserina se evaluó a 3h post-tratamiento con H₂O₂ mediante tinción con anexina v-Alexa-488 y se registró por citometría de flujo. (C) La integridad de la membrana plasmática de epimastigotas se evaluó mediante la internalización de IP a las 24 h post-tratamiento con H₂O₂. (D, E y F) El ensayo de TUNEL se analizó por citometría de flujo en parásito salvajes (CL-Brener, D), sobreexpresantes Fe-SODA (E) y MPx (F) a las 24 h post-tratamiento con H₂O₂. (F) Epimastigotas TUNEL positivos para la cepa salvaje (CL-Brener) y los sobreexpresantes (Fe-SODA y MPx) 24 h post-tratamiento. Los resultados se expresan como el porcentaje de epimastigotas TUNEL positivos y representan la media de cinco experimentos independientes. * denota diferencia estadística con p<0,05.

Los resultados se expresan como el porcentaje de epimastigotas TUNEL positivos y representan la media de cinco experimentos independientes. * denota diferencia estadística con p<0,05.

Inmediatamente después del tratamiento con el oxidante, los parásitos se lavaron e incubaron en medio completo (BHI suplementado) o PBS durante diferentes períodos de tiempo (3–24 h). A tiempos cortos, 3 h post-tratamiento con H_2O_2 , se evidenció una disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mm}$) junto con la externalización de fosfatidilserina (FS) sobre la cara externa de la membrana plasmática del parásito con el mantenimiento de la integridad de la misma (Figura 32A-C). A las 24 h post-tratamiento, se observó un incremento en la población TUNEL positivo en parásitos salvajes ($\approx 30\%$) (Figura 32D, G). Estos resultados concuerdan con los datos mostrados previamente donde se observó la activación de PARP γ y la muerte apoptótica en epimastigotas de *T. cruzi* expuestos a H_2O_2 en las mismas condiciones experimentales²⁴⁶. Sin embargo, parásitos sobreexpresantes Fe-SODA y MPx son capaces de evadir la inducción del estímulos de muerte desencadenado por H_2O_2 , como se observó mediante ensayo de TUNEL (Figura 32E-G). Se estudio la función mitocondrial en parásitos tratados con H_2O_2 , así como la generación de $O_2^{\cdot-}$. La función mitocondrial de parásitos tratados o no con H_2O_2 se evaluó a las 4 h post-tratamiento utilizando un analizador del consumo de O_2 (SeaHorse XFe24)²⁴⁷. A continuación, se muestra un experimento representativo de parásitos CL-Brener después de las adiciones de las diferentes drogas (Figura 33A).

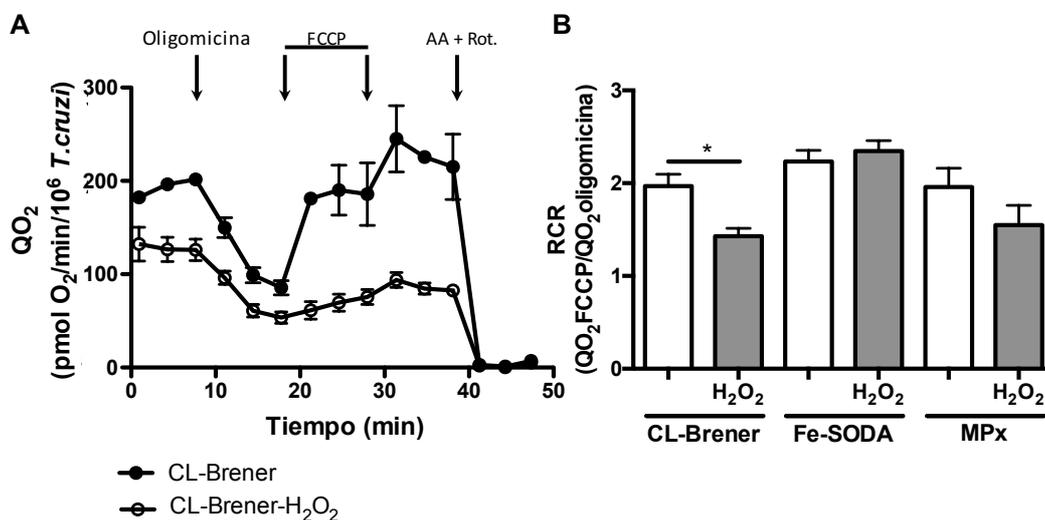


Figura 33. Función mitocondrial en epimastigotas de *T. cruzi* después del tratamiento con H_2O_2 . (A) Experimento representativo de la función mitocondrial en epimastigotas salvajes (CL-Brener) utilizando un analizador Seahorse (XFe24) a 4 h post-tratamiento con H_2O_2 (círculos abiertos) o no (círculos rellenos, control). (B) RCR de epimastigotas control y tratadas para la cepa CL-Brener y sobreexpresantes Fe-SODA y MPx. El RCR se calculó como se describió previamente en la sección de materiales y métodos ($QO_2FCCP/QO_2Oligomycin$). Los resultados representan la media de tres experimentos independientes. *, denota diferencia estadística con $p < 0,05$.

A las 4 h post-tratamiento, el valor de RCR en epimastigotas salvajes (CL-Brener) disminuyó significativamente, mientras que en parásitos sobreexpresantes de Fe-SODA y MPx no se observaron cambios significativos (Figura 33B). Este resultado refuerza aún más la capacidad de estos parásitos sobreexpresantes de Fe-SODA y MPx de resistir al daño mitocondrial generado por el tratamiento con H₂O₂ como se observó previamente para el tratamiento con SHF ²⁴³.

Se analizó el producto de oxidación específico por O₂^{•-} del dihidroetidio (DHE), el 2-OH-etidio (2-OH-E⁺), mediante la técnica analítica HPLC acoplado con detección fluorescente como se describió recientemente ²⁴⁸. A continuación, se muestra un cromatograma representativo de parásitos salvajes (CL-Brener) expuestos o no a H₂O₂ (Figura 34A).

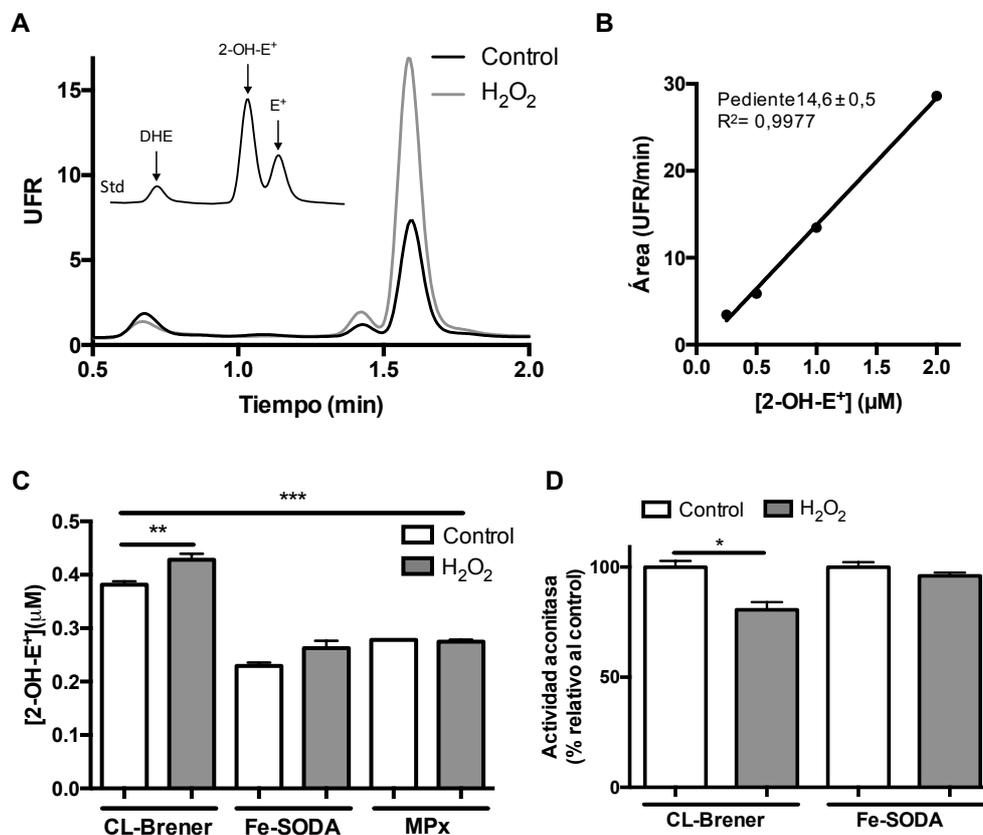


Figura 34. Generación de radical superóxido en epimastigotas de *T. cruzi* tratados con H₂O₂. (A) Epimastigotas CL-Brener [3×10^8 parásitos.m⁻¹ en PBS (pH 7,4)] se precargaron con DHE (50 μM, 30 min a 28 °C) antes del tratamiento con H₂O₂. Después de 3 h de la exposición al oxidante, se realizó la extracción orgánica de los productos de oxidación del DHE de extractos de parásitos (tratados o no con H₂O₂) y se analizó mediante HPLC con detección fluorimétrica. Se muestra un cromatograma representativos de parásitos salvajes control (línea continua), tratados con H₂O₂ (línea discontinua) y estándares (*inset*). (B) Curva de calibración para el estándar 2-OH-E⁺ (0–2 μM). (C) Detección de 2-OH-E⁺ en epimastigotes salvajes (CL-Brener) y sobreexpresantes (Fe-SODA y MPx) tratados y no con H₂O₂ (3 h post-tratamiento). Los resultados representan la media de cinco experimentos independientes. **, *** denota diferencia estadística con p<0,05 y p<0,01, respectivamente. (D) La actividad enzimática de la aconitasa en parásitos CL-Brener y Fe-SODA (tratados y no con H₂O₂ a las 3 h post-tratamiento) se determinó espectrofotométricamente siguiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm en presencia de cis-aconitato (0,5 mM). La actividad se midió en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) a 37 °C. Los resultados representan la media de cinco experimentos independientes. * denota diferencia estadística con p<0,01.

Resultados capítulo 1: Rol de Fe-SODA y MPx de *T. cruzi* en modelos de infección celular y animal

Se observó un aumento en la detección de 2-OH-E⁺ a las 3 h post-tratamiento en parásitos salvajes (CL-Brener) indicativo de un aumento de la generación O₂^{•-} mitocondrial (Figura 34A, C). Cabe destacar que en parásitos sobreexpresantes de Fe-SODA y MPx no se observó un aumento significativo en los niveles de 2-OH-E⁺ luego del tratamiento con H₂O₂. Además, los niveles basales de O₂^{•-} detectados en parásitos CL-Brener son mayores (Figura 34C), mostrando la capacidad de los parásitos sobreexpresantes de Fe-SODA y MPx para detoxificar O₂^{•-} y H₂O₂ respectivamente, evadiendo así la inducción de la MCP (Figura 32E-G).

Finalmente, se determinó la actividad de la enzima mitocondrial sensible a O₂^{•-}, la aconitasa, con el fin de evidenciar un aumento en la producción de O₂^{•-} en parásitos tratados con H₂O₂. Después de 3 h post-tratamiento con H₂O₂, se observó una inactivación significativa de la actividad aconitasa total (20 ± 2 %) en parásitos CL-Brener, mientras que la actividad no se afectó en parásitos sobreexpresantes Fe-SODA (Figura 34D). La actividad aconitasa mitocondrial representa el 60 % de la actividad aconitasa total del parásito y, por lo tanto, la inactivación de la aconitasa mitocondrial en estas condiciones experimentales debe ser superior al 20 %, posiblemente > 40 %²⁴³. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el radical O₂^{•-} adquiera el rol de mediador redox disparador o responsable de la inducción de la MCP^{243,244}.

MCP en cepas salvajes de *T. cruzi* y compromiso de la función mitocondrial en cardiomiocitos.

La gran diversidad biológica, bioquímica y genética presente entre diferentes cepas de *T. cruzi* ha determinado que sean clasificadas en seis grupos o unidades discretas de tipificado (DTUs, “discrete typing units”) denominadas TcI–TcVI. Algunos autores consideran Tcbat (asilado de murciélago) como un séptimo linaje^{249–251}. Las cepas pertenecientes a las diferentes DTUs pueden presentar diferencias en la tasa de infección, cinética de invasión, inducción de apoptosis, tropismo, etc. En este sentido, se ha reportado en infecciones a cardiomiocitos que la cepa Dm28c (TcI) presenta una mayor proliferación y una menor tinción de amastigotas TUNEL positivos con respecto a la cepa Y (TcII). Además, cardiomiocitos infectados por la cepa

Dm28c presentan una mayor pérdida del potencial de membrana mitocondrial y tinción TUNEL positivo con respecto a los infectados por la cepa Y²⁵².

Función mitocondrial de cardiomiocitos infectados por cepas salvajes TcVI y TcI.

Nos propusimos evaluar la función mitocondrial de cardiomiocitos primarios infectados por las cepas salvajes CL-Brener y Dm28c pertenecientes a diferentes DTUs, TcVI y TcI respectivamente. Se evaluó la función mitocondrial en cardiomiocitos primarios control e infectados con las cepas salvajes CL-Brener o Dm28c (relación parásito:célula 5:1) a las 24 h post-infección utilizando el analizador del consumo de O₂ (SeaHorse XFe24), antes y después de la adición de los fármacos (oligomicina, FCCP y AA-Rot) (Figura 35A). Se determinó el índice de control respiratorio (RCR) y se utilizó como indicador de la función mitocondrial en cardiomiocitos. Se observó una disminución del RCR en cardiomiocitos infectados como se describió previamente, siendo significativamente mayor en cardiomiocitos infectados con parásitos Dm28c (Figura 35B).

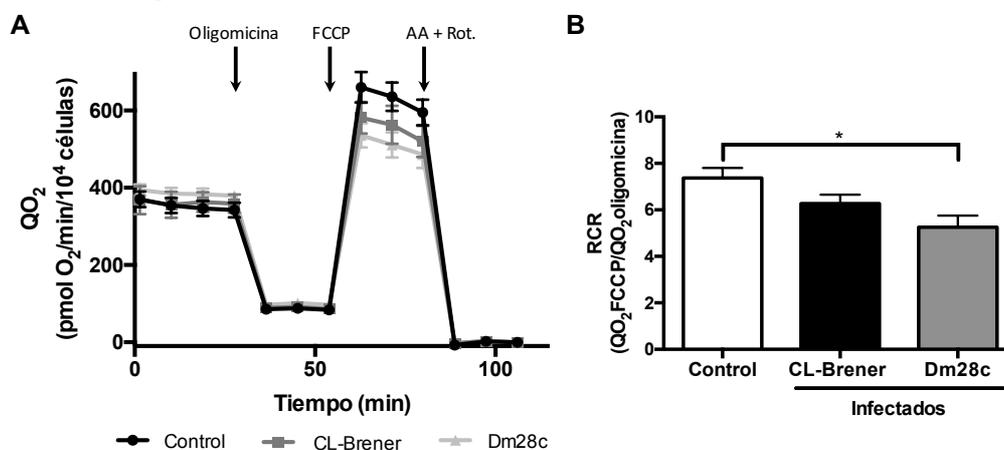


Figura 35. Función mitocondrial en cardiomiocitos primarios infectados por cepas salvajes de *T. cruzi*. (A) Cardiomiocitos primarios se infectaron con *T. cruzi* (CL-Brener o Dm28c, relación parásito:células, 5:1) y se evaluó la función mitocondrial 24 h post-infección utilizando un analizador del consumo de O₂ (SeaHorse XFe24) frente a la adición de los diferentes compuestos a 37 °C. (B) El índice de control respiratorio (RCR) de cultivos de cardiomiocitos control e infectados se calculó como se describió en la sección de Materiales y Métodos. (RCR = QO₂FCCP/QO₂Oligomicina). Los resultados son la media de tres experimentos independientes. *, denota diferencia estadística con p<0,05.

El mayor compromiso en la función mitocondrial de cardiomiocitos infectados por la cepa Dm28c se podría explicar por un aumento en la proliferación parasitaria, como se observó previamente en cultivos de cardiomiocitos infectados con parásitos sobreexpresantes de Fe-SODA y MPx (Figuras 26C y 29A).

MCP mediada por $\bullet\text{NO}$ y H_2O_2 en cepas salvajes de *T. cruzi*.

Se evaluó la fragmentación del ADN como marcador de la MCP en amastigotas intracelulares purificados de cardiomiocitos infectados en presencia y ausencia de un dador de $\bullet\text{NO}$ (NOC-18; 0,5 mM) para ambas cepas salvajes. El tratamiento con el dador de $\bullet\text{NO}$ genera un aumento en la detección de amastigotas TUNEL positivo en ambas cepas. No obstante, parásitos Dm28c presentan una menor detección de amastigotas TUNEL positivos con respecto a la cepa CL-Brener (Figura 36).

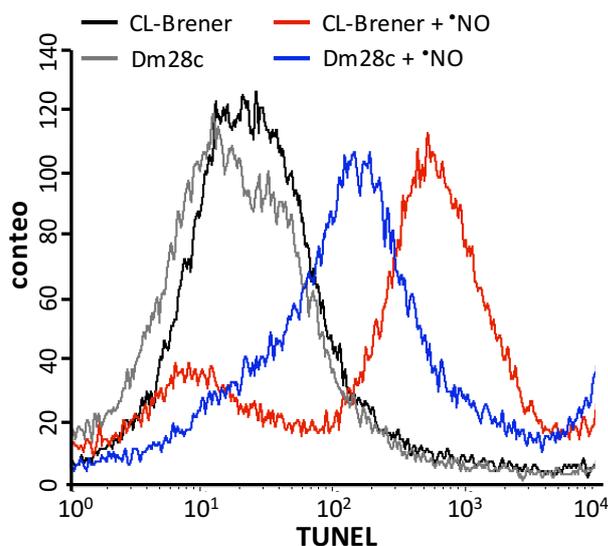


Figura 36. Inducción de la MCP mediada por $\bullet\text{NO}$ en amastigotas de cepas salvajes. Cardiomiocitos (H9c2) se infectaron con la cepa salvaje CL-Brener o Dm28c (relación parásitos:células, 5:1) en presencia o ausencia de NOC-18 (0,5 mM). Se purificaron amastigotas intracelulares a las 72 h post-infección y se evaluó la fragmentación del ADN por ensayo de TUNEL mediante citometría de flujo. Se muestra los histogramas representativo de tres experimentos independientes.

Por otro lado, se evaluó la capacidad del H_2O_2 de inducir la MCP en epimastigotas de la cepa Dm28c, como se describió previamente para CL-Brener. Parásitos Dm28c (3×10^8 epimastigotas. ml^{-1}) se expusieron a H_2O_2 [300 μM ; 10 min a 28°C en PBS (pH 7,4)]. A las 3 h post-tratamiento con H_2O_2 , no se evidenció la externalización de FS sobre la cara externa de la membrana plasmática ni la pérdida de la integridad de la misma (Figura 37A-B). A las 24 h post-tratamiento se observó un incremento en la población TUNEL positivo ($\approx 3\%$) (Figura 37C) significativamente menor al observado en parásitos salvajes CL-Brener (Figura 32D, G). Cabe destacar que el tratamiento con H_2O_2 induce un aumento en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en parásitos Dm28c, sin embargo, los niveles detectados son significativamente menores a los observados para la cepa CL-Brener (Figura 37D). Estos resultados están de acuerdo con la mayor virulencia reportada para la cepa Dm28c con respecto a otras cepas salvajes²⁵².

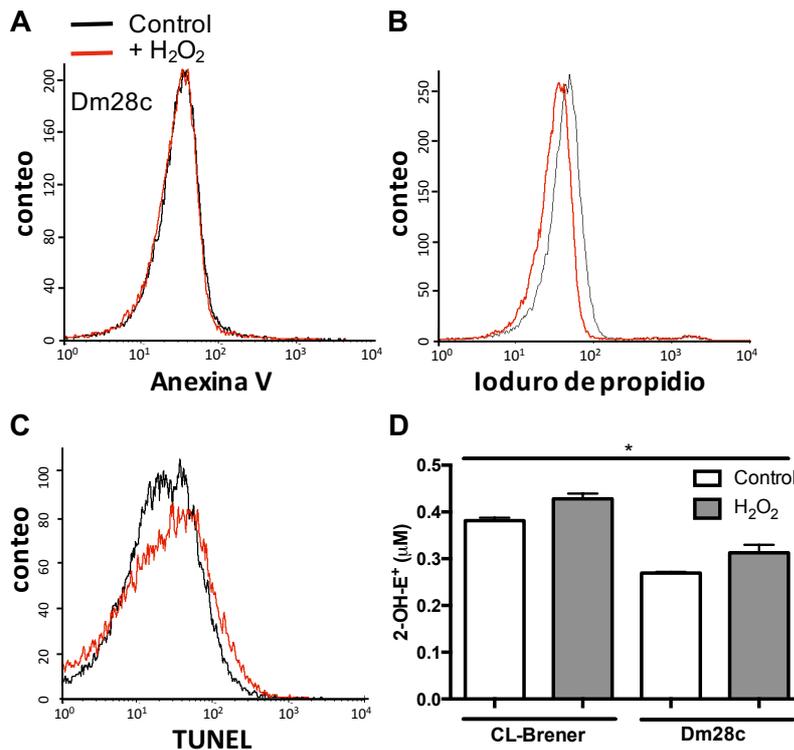


Figura 37. Inducción de la MCP en epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c por H₂O₂. (A) Epimastigotas de *T. cruzi* (Dm28c, 3×10^8 parásitos.ml⁻¹) se trataron o no con H₂O₂ [300 μ M, 10 min en PBS (pH 7,4)]. A las 3 h post-tratamiento con el oxidante, se evaluó la externalización de FS mediante tinción con anexina v-Alexa-488 utilizando citometría de flujo. (B) La integridad de la membrana plasmática en epimastigotas se evaluó mediante la internalización de IP a 24 h post-tratamiento con H₂O₂. (C) El ensayo de TUNEL se evaluó por citometría de flujo en parásitos Dm28c a 24 h post-tratamiento. (D) Detección de 2-OH-E⁺ en epimastigotes salvajes (CL-Brener y Dm28c) tratados y no con H₂O₂ (3 h post-tratamiento). Los resultados son la media de cinco experimentos independientes. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$.

Control de la proliferación parasitaria en macrófagos. Infección en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.

Control de la proliferación por macrófagos inmunoestimulados.

Los macrófagos junto con los neutrófilos reclutados al sitio de invasión forman parte de la primera línea de defensa en la respuesta inmune innata del huésped vertebrado. Estos fagocitos profesionales cumplen un rol fundamental controlando la proliferación y diseminación parasitaria a través de la fagocitosis y destrucción del parásito internalizado^{24,56,253}. El control parasitario, previo a la evasión del fagosoma y establecimiento del parásito en el citosol celular, depende en gran medida de la producción de $\cdot\text{NO}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ y ONOO^- ^{29,54,55}. Recientemente, nuestro grupo ha reportado que parásitos sobreexpresante de la isoforma citosólica Fe-SODB presentan una mayor resistencia a la muerte dentro del fagosoma de macrófagos inmunoestimulados, potenciando así la proliferación intracelular con respecto a

la cepa salvaje ⁵⁴. Nos propusimos evaluar el rol de la sobreexpresión de la Fe-SODA en infecciones a macrófagos. Para ello, se infectó la línea celular de macrófagos J774A.1 (ATCC) estimulados o no con LPS/IFN- γ (relación parásito: célula, 5:1) y se evaluó la proliferación por conteo de amastigotas intracelulares (DAPI). A diferencia de lo observado en cultivos de cardiomiocitos, no se observó una diferencia significativa en la proliferación por parásitos Fe-SODA tanto en macrófagos estimulados como no estimulados con respecto a la cepa salvaje (Figura 38).

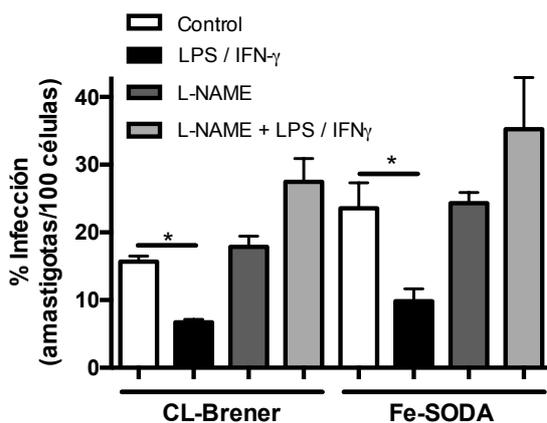


Figura 38. Control de la proliferación parasitaria por macrófagos estimulados. La línea celular de macrófagos (J774A.1) control y estimulados para la inducción de la enzima iNOS [IFN- γ (200u.ml⁻¹)/LPS (3 μ g.ml⁻¹)] se infectaron con tripomastigotas de la cepa salvaje (CL-Brener) o sobreexpresantes Fe-SODA (relación parásito:célula, 2:1) en presencia o ausencia de L-NAME (inhibidor de la iNOS) durante 24 horas. Se evaluó la proliferación parasitaria por conteo de amastigotas intracelulares (DAPI). * denota diferencia estadística con $p < 0,05$.

Infección en el modelo murino de la enfermedad de Chagas por parásitos salvajes y Fe-SODA.

Se evaluó la infección en el modelo murino (BALB/c) de la enfermedad de Chagas mediante determinación de la parasitemia en sangre de ratones infectados con la cepa salvaje (CL-Brener) y sobreexpresantes Fe-SODA. Se observó un mayor conteo de tripomastigotas sanguíneos en el pico de parasitemia para la cepa salvaje con respecto a sobreexpresante Fe-SODA (Figura 39). Además, se observó una mayor severidad de la enfermedad en ratones infectados por la cepa CL-Brener a través de indicadores de estrés como piloerección, ojos semicerrados, disminución de la movilidad y muerte prematura, con respecto a ratones infectados por los sobreexpresantes Fe-SODA.

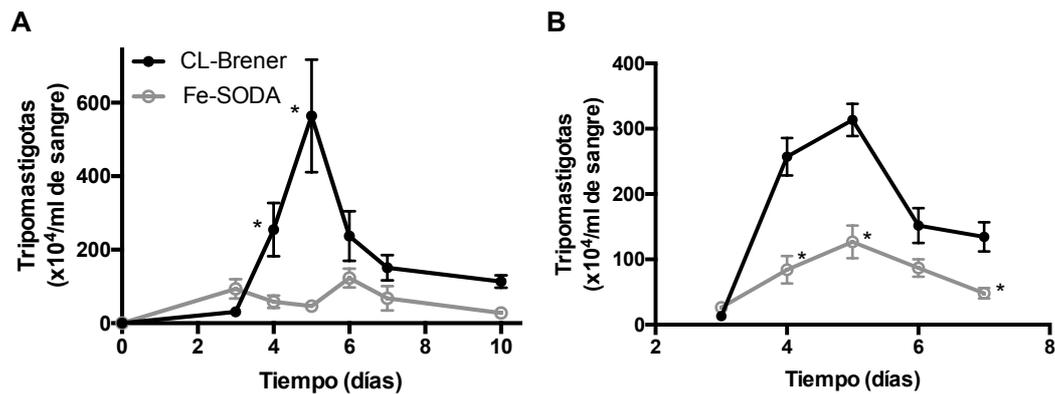


Figura 39. Parasitemia en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. (A) Grupos independientes de 5 ratones hembras (6-8 semanas) se infectaron intra-peritonealmente con 2×10^7 tripomastigotas de la cepa salvaje (CL-Brener) o sobreexpresantes Fe-SODA. La parasitemia se evaluó diariamente por el conteo de tripomastigotas presentes en sangre (obtenida de la vena caudal de la cola) utilizando microscopía de campo claro. (B) Grupos independientes de 5 ratones machos se infectaron con 1×10^7 tripomastigotas como en (A). Los resultados representan la media de cinco ratones para uno de 3 experimentos independientes. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$

Exposición de fosfatidilserina en el inóculo infeccioso de parásitos salvajes y Fe-SODA

Recientemente, se describió que patógenos intracelulares utilizan el mimetismo apoptótico para modular la respuesta inmune del huésped, generando un contexto favorable para el establecimiento de la infección. Este mecanismo consiste en la exposición estable de FS en la cara externa de la membrana celular del mismo modo que ocurre de forma temprana en el proceso de muerte por apoptosis. La exposición de FS en estos patógenos es una “señal” para su internalización por parte de macrófagos sin llevarse a cabo la activación clásica y citotóxica de los mismos, que constituyen una de las primeras líneas de defensa contra estos patógenos²⁵⁴. El mimetismo apoptótico en tripanosomatídeos se reportó por primera vez en amastigotas de *Leishmania amazoniensis* en donde se describió la exposición de FS como estrategia para persistir en el macrófago infectado²⁵⁵. Considerando estos antecedentes en conjunto con los resultados previos que muestran que parásitos sobreexpresantes Fe-SODA expuestos a oxidantes (*NO , H_2O_2 y ONOO^-) exhiben menores niveles de FS en la membrana celular parasitaria en el estadio epimastigota e inclusive presentan niveles menores de amastigotas apoptóticos con respecto a la cepa salvaje (CL-Brener), planteamos la hipótesis de que la ausencia o disminución de parásitos apoptóticos y/o miméticos podría determinar una menor virulencia en la etapa aguda de la infección a ratones. Se evaluó la exposición de FS en la membrana celular de tripomastigotas salvajes (CL-Brener) y sobreexpresantes Fe-SODA expuesto o no a SHF mediante la tinción con anexina-V y análisis por citometría de flujo. Se

observó una menor exposición de FS en la cara externa de la membrana celular de parásitos sobreexpresantes Fe-SODA con respecto a la cepa salvaje luego del tratamiento con SHF (Figura 40).

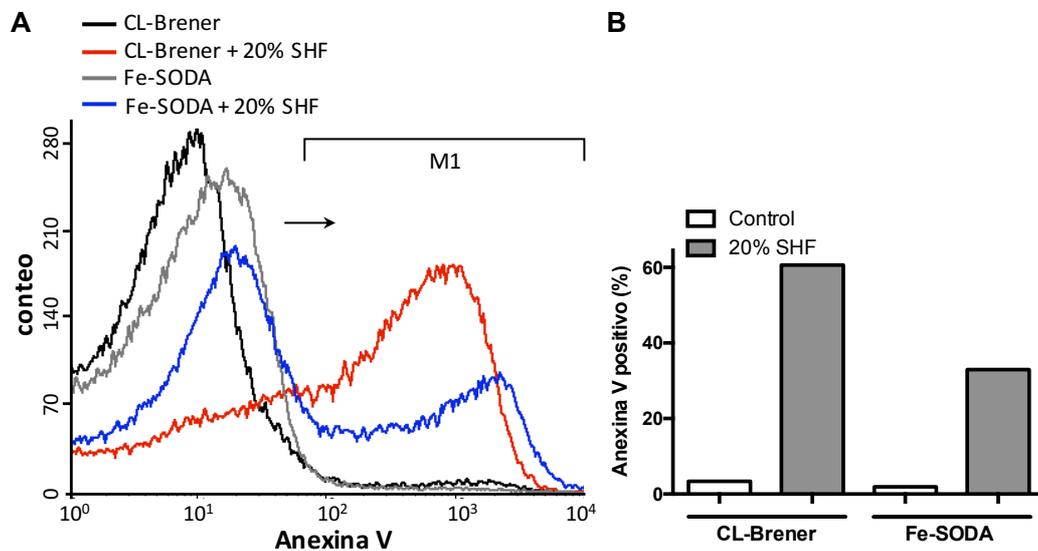


Figura 40. Exposición de FS en tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* salvajes y sobreexpresantes Fe-SODA. Epimastigotas (en fase exponencial de cultivo) de la cepa salvaje (CL-Brener) y sobreexpresantes Fe-SODA se diferenciaron en tripomastigotas metacíclicos (infectivos) por diferenciación química en medio artificial de orina de triatomineo (TAUP-3AAG, 4 días a 28°C). Los tripomastigotas metacíclicos resultantes se expusieron o no a SHF (20 % durante 1h a 37 °C). Posteriormente, se evaluó la exposición de FS en la membrana plasmática parasitaria mediante el marcaje con anexina-V conjugado a Alexa Fluor 488 y análisis por citometría de flujo.

Por otro lado, se purificaron tripomastigotas del sobrenadante de cultivo de celulares (VERO) infectados con la cepa salvaje y se expusieron o no a SHF. Posteriormente, se depletaron los parásitos con FS mediante la utilización de un kit comercial conteniendo esferas magnéticas conjugadas a anexina-V (Apoptotic cell isolation kit, BioVision) y se confirmó la depleción de parásitos del inóculo infeccioso mediante citometría de flujo utilizando anexina-V conjugada a Alexa Fluor 488 (Figura 41A). Luego, se infectaron ratones BALB/c con tripomastigotas CL-Brener expuestos a SHF y depletados o no de parásitos que exponen FS (CL-Brener-DFS) y se evaluó la infección durante la fase aguda de la enfermedad mediante determinación de la parasitemia en sangre. Se observó un mayor conteo de tripomastigotas sanguíneos en el pico de parasitemia para la cepa CL-Brener control con respecto a la misma depletada en parásitos que exponen FS en el inóculo infeccioso (Figura 41B). Por lo tanto, planteamos la hipótesis que la depleción de parásitos que exponen FS del inóculo infeccioso generaría una respuesta proinflamatoria más aguda repercutiendo en la disminución de la parasitemia en sangre. Luego de finalizado el pico de la parasitemia se aislaron macrófagos peritoneales, como fue

Resultados capítulo 1: Rol de Fe-SODA y MPx de *T. cruzi* en modelos de infección celular y animal

descrito previamente ²⁵⁶. Se observó, un menor porcentaje de células adherentes (eventualmente macrófagos) aisladas del lavado peritoneal de ratones infectados con tripomastigotas CL-Brener-DFS con respecto al control (CL-Brener) a las 48hs post-lavado peritoneal (Figura 41C). Además, cabe destacar que se observó una disminución en el conteo de amastigotas intracelulares en los cultivos celulares aislados de ratones infectados con CL-Brener-DFS (Figura 41D).

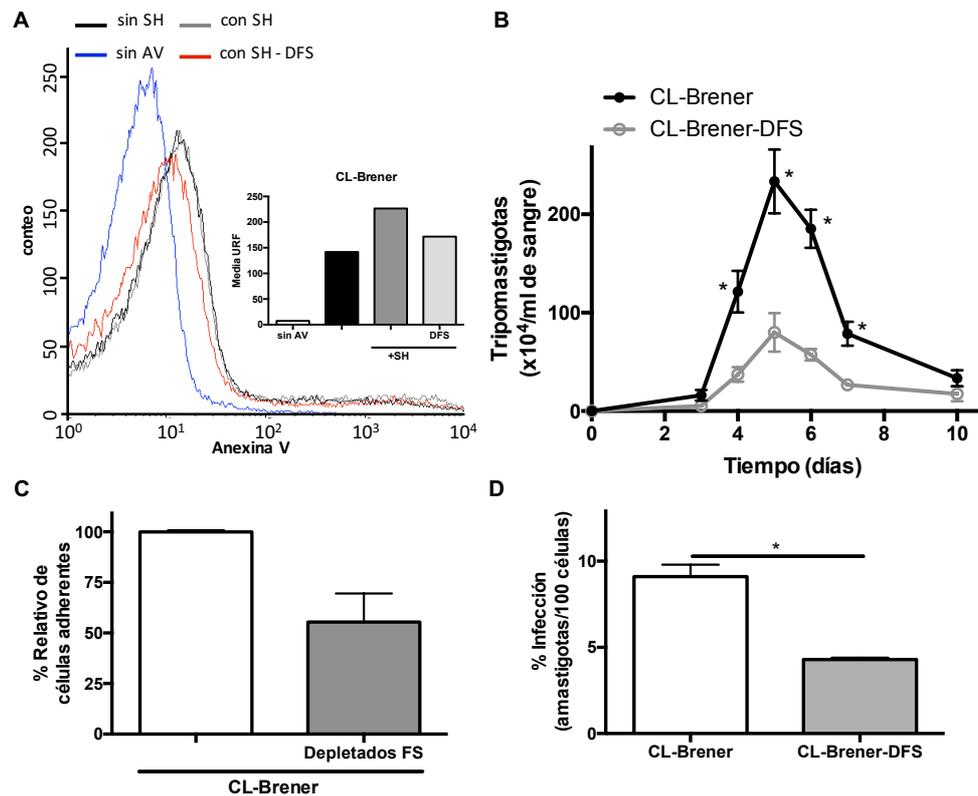


Figura 41. Infección de ratones BALB/c con *T. cruzi* CL-Brener control o depletados de FS. (A) Tripomastigotas CL-Brener aisladas del sobrenadante de cultivo celular (VERO) se expusieron o no a SHF (20 % durante 1h a 37 °C). El inóculo infeccioso (expuesto a SHF) se depletó de parásitos que exponen FS y se confirmó la disminución de la exposición de FS por citometría de flujo mediante el marcaje con anexina-V conjugado a Alexa Fluor 488 [azul: tripomastigotas sin teñir; negro: tripomastigotas no expuestas a SHF; gris: tripomastigotas expuestas a SHF (control); rojo: tripomastigotas expuestas a SHF y depletados en FS]. Media de URF para cada uno de los histogramas (*inset*). (B) Grupos independientes de 5 ratones hembras (6-8 semanas) se infectaron de manera intraperitoneal con tripomastigotas (1×10^7) de la cepa CL-Brener control o depletados en parásitos que exponen FS en la membrana plasmática (CL-Brener-DFS). La parasitemia se evaluó diariamente por el conteo de tripomastigotas presentes en sangre (obtenida de la vena caudal de la cola) utilizando microscopía de campo claro. Los resultados representan la media de cinco ratones. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$. (C) Se realizaron lavados peritoneales de ratones infectados y se aislaron las células adherentes. Se representa el % de células adherentes relativo al control para los cultivos celulares obtenidos por lavado peritoneal de ratones infectados con CL-Brener y CL-Brener-DFS (48 hs post-purificación). (D) Conteo de amastigotas intracelulares en células adherentes (macrófagos) obtenidas de lavados peritoneales (DAPI).

Estos resultados indicarían que ratones infectados con un inóculo depletado en parásitos que exponen FS en la membrana plasmática lograrían controlar parcialmente la infección por *T. cruzi*, destacando la importancia de parásitos apoptóticos o miméticos en el inóculo infeccioso para el éxito de la infección y persistencia parasitaria.

DISCUSIÓN

La etapa crónica de la enfermedad de Chagas se caracteriza por la persistencia de *T. cruzi* con una baja parasitemia y baja carga en tejidos, siendo uno de los más afectados el tejido cardíaco. El control de la proliferación y la persistencia parasitaria depende de la virulencia de la cepa y de la respuesta inmune montada por el huésped como se ha demostrado en pacientes con tratamiento inmunosupresor¹⁶. A pesar de la respuesta inflamatoria del huésped vertebrado, *T. cruzi* es capaz de evadir la misma y persistir en los tejidos. Los mecanismos implicados en el control de la proliferación parasitaria en cardiomiocitos no han sido completamente dilucidados, pero podrían implicar la secreción de citoquinas proinflamatorias en conjunto con la generación de $\cdot\text{NO}$ por células cardíacas, endoteliales o del infiltrado inflamatorio presente en el tejido infectado^{193,257}.

El aumento en la síntesis de citoquinas por cardiomiocitos infectados podría ser responsable del incremento en la generación de oxidantes (como H_2O_2) producto de la disfunción mitocondrial y posiblemente de la activación de la enzima NOX4^{190,193,258,259}. Asimismo el aumento en la actividad NOX4 podría determinar la oxidación de proteínas mitocondriales exacerbando la disfunción mitocondrial en cardiomiocitos²⁶⁰. Estos antecedentes son consistentes con los resultados de este trabajo en los que observamos que la infección de cardiomiocitos primarios por *T. cruzi* (CL-Brener) genera una disfunción mitocondrial temprana (Figura 26) acompañada de un aumento en la producción de H_2O_2 (Figura 27). Evidenciamos la activación del factor de transcripción FOXO3, producto de la presencia de un estrés oxidativo^{261,262}, así como el aumento en la expresión de las correspondientes enzimas antioxidantes mitocondriales dianas, MnSOD y Prx3 (Figura 28). Las especies reactivas del oxígeno, particularmente el H_2O_2 , pueden promover la señalización redox celular o la citotoxicidad de forma concentración dependiente^{86,140}. En *T. cruzi*, se ha mostrado que el H_2O_2 es capaz de modular el desarrollo intracelular, promoviendo o comprometiendo la proliferación de amastigotas^{243,263–265}. En nuestras condiciones experimentales, los cardiomiocitos estimulados con citoquinas proinflamatorias son capaces de controlar parcialmente la proliferación de amastigotas intracelulares salvajes (CL-Brener). Sin embargo, dichos cardiomiocitos son incapaces de controlar la proliferación de parásitos sobreexpresantes de las enzimas mitocondriales Fe-SODA y MPx (Figura 29A). Estos resultados

muestran que, en un contexto proinflamatorio, caracterizado por un aumento en la generación de oxidantes, se puede llevar a la inducción de la MCP parasitaria. En el estadio epimastigota (no infectivo) de *T. cruzi* se ha demostrado que la sobrecarga de calcio y la generación intramitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ participan en la inducción de la MCP^{243,244}. Evaluamos entonces, la presencia de amastigotas apoptóticos en cultivos de cardiomiocitos infectados con la cepa salvaje (Figura 29B) y la producción intramitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ en los mismos. Cabe destacar que la estimulación con citoquinas proinflamatorias de cultivos de cardiomiocitos infectados determinó un aumento en la producción intramitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ en el estadio amastigota (Figura 29C). Se purificaron amastigotas intracelulares (Figura 30B) y se evaluó la MCP. El control de la proliferación de parásitos salvajes observado en cardiomiocitos estimulados con citoquinas proinflamatorias (Figura 29A), se acompañó de un aumento en la detección de amastigotas intracelulares apoptóticos (Figura 30C).

De igual forma, se exploró el rol del $^{\bullet}NO$ en el control de la proliferación y en la inducción de la MCP en amastigotas. Considerando la baja inducción de iNOS en cardiomiocitos observada en nuestras condiciones²⁶⁶ y que en el tejido cardíaco infectado existen otras fuentes de $^{\bullet}NO$, se recurrió a la adición de flujos externos de $^{\bullet}NO$. Para ello, expusimos a cultivos de cardiomiocitos infectado a flujos fisiológicos de $^{\bullet}NO$ (0.15 $\mu M/min$) y se evaluó la proliferación de amastigotas salvajes y de Fe-SODA, observándose una disminución significativa únicamente para la cepa salvaje (Figura 30A). Más aún, en la cepa salvaje se observó un aumento en la detección de amastigotas apoptóticos purificados de cultivos de cardiomiocitos expuestos a $^{\bullet}NO$ (Figura 30C).

Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que tanto el H_2O_2 como el $^{\bullet}NO$ pueden difundir y alcanzar el amastigota intracelular llevando a la inducción de la MCP en los mismos. En particular, parásitos sobreexpresantes de la Fe-SODA se mostraron más resistencia a la MCP, incluso, en presencia de flujos de $^{\bullet}NO$ (Figura 31). Estos resultados confirman el rol del $O_2^{\bullet-}$ mitocondrial generado en los parásitos como disparador del proceso de muerte celular, como se mostró anteriormente para el estadio epimastigota^{243,244}. Se observó un aumento en la oxidación del MitoSOX luego de la exposición a $^{\bullet}NO$ en parásitos salvajes ausente en los sobreexpresantes de MPx lo que indica la generación mitocondrial de $O_2^{\bullet-}$ y peroxinitrito en estos amastigotas (Figura 30D). De esta manera, el $^{\bullet}NO$ puede difundir dentro de la mitocondria de *T. cruzi* e inhibir de forma reversible el complejo IV de la cadena respiratoria,

determinando la generación sitio específica de $O_2^{\bullet-}$ y la consiguiente formación de $ONOO^-$ por la presencia simultánea $^{\bullet}NO$ y $O_2^{\bullet-}$ ¹⁷⁶.

La presencia de amastigotas intracelulares apoptóticos se reportó previamente en infecciones experimentales *in vitro* e *in vivo* con *T. cruzi* ^{252,267,268}. No obstante, el o los mediadores generados por el huésped responsables de la inducción de la MCP del parásito no han sido determinados. En este contexto, utilizando cardiomiocitos primarios, mostramos la capacidad de dos mediadores redox difusibles derivados del huésped, H_2O_2 y $^{\bullet}NO$, de activar la MCP en amastigotas intracelulares. Por otro lado, el H_2O_2 también desencadenó la MCP en el estadio epimastigota del parásito (Figura 32) evidenciando el proceso de MCP. La función mitocondrial en epimastigotas tratados con H_2O_2 también se afectó y presentó una caída significativa en el valor de RCR a las 4 h post-tratamiento con el oxidante (Figura 33). En estas condiciones experimentales, se observó además un aumento en la generación de $O_2^{\bullet-}$ mediante la detección analítica específica del 2-OH- E^+ (Figura 34A,C). Cabe destacar que parásitos Fe-SODA y MPx se mostraron ser más resistentes a la inducción de la MCP (Figura 32E-G), sin presentar una disminución del RCR (Figura 33B) ni aumento de la generación de $O_2^{\bullet-}$ (Figura 34C) significativos. El hecho de que parásitos Fe-SODA se muestren más resistentes manifiesta la participación del $O_2^{\bullet-}$ generado a nivel mitocondrial en *T. cruzi* en la inducción del proceso de muerte. Asimismo, la detoxificación de $O_2^{\bullet-}$ por la Fe-SODA limita la generación de peroxinitrito en presencia de $^{\bullet}NO$ y, por lo tanto, disminuye el daño mitocondrial ocasionado por este oxidante. La mayor resistencia a la MCP observada en parásitos sobreexpresantes de MPx muestra la participación del $ONOO^-$ y H_2O_2 en la inducción de la MCP y en el control de la proliferación parasitaria.

Los blancos celulares de reacción asociados a procesos de señalización inducidos por $O_2^{\bullet-}$, ya sea en células de mamíferos o parásitos, aún son desconocido. No obstante, la contribución del $O_2^{\bullet-}$ en la fase de inicio del proceso de muerte celular ha sido reportado ^{244,269-272}. En sistemas biológicos, el $O_2^{\bullet-}$ puede actuar como un oxidante univalente con la familia de enzimas que contienen clusters $[4Fe-4S]$, siendo su blanco preferencial las deshidratasas ²⁶⁹. La oxidación del clúster Fe-S produce la liberación de Fe^{3+} con la consecuente inactivación de la enzima. La reacción posterior del Fe^{3+} con H_2O_2 determina la generación de $^{\bullet}OH$, el cual es altamente oxidante y capaz de producir daño oxidativo sitio específico sobre el ADN mitocondrial del parásito ^{51,273}. Además, en presencia de $^{\bullet}NO$, se formará peroxinitrito en las mitocondrias parasitarias, produciendo modificaciones oxidativas en proteínas, lípidos y ADN

^{116,150}. Previamente, nuestro grupo ha reportado que la inducción de la MCP por exposición a SHF en epimastigota de *T. cruzi* conduce a una inactivación $O_2^{\bullet-}$ -dependiente de la aconitasa, mientras que sobreexpresantes Fe-SODA atenúan la inactivación de dicha enzima ²⁴³. En nuestras condiciones experimentales, utilizando H_2O_2 como inductor de la MCP, también se observó la inactivación de la aconitasa (Figura 34D) en parásitos salvajes. Mientras que en parásitos Fe-SODA no se afectó la actividad aconitasa y los mismos resultan resistentes al estímulo de MCP, destacando el rol del $O_2^{\bullet-}$ generado a nivel mitocondrial en la señalización temprana de la MCP en *T. cruzi*.

La respuesta redox desencadenada durante la infección de cardiomiocitos pueden diferir entre cepas de *T. cruzi*, las cuales pueden ser muy variables en infectividad y tropismo tisular ^{24,263}. En particular, evaluamos la respuesta de cardiomiocitos infectados por cepas salvajes pertenecientes a diferentes DTUs, CL-Brener (TcVI) y Dm28c (TcI). Se observó que la cepa Dm28c genera un compromiso mayor de la función mitocondrial en cardiomiocitos (Figura 35). Asimismo, parásitos Dm28c se mostraron más resistentes a la inducción desencadenada por mediadores redox difusibles, *NO H_2O_2 , en los estadios amastigota (Figura 36) y epimastigotas (Figura 37) de *T. cruzi*. Estos resultados son consistentes con reportes previos que atribuyen una infectividad y resistencia a la apoptosis substancialmente mayor para la cepa Dm28c con respecto a otras cepas salvajes (Y) ²⁵².

La secuencia de eventos propuesta luego de la invasión/infección de *T. cruzi* CL-Brener en cardiomiocitos y la relevancia del contenido mitocondrial de Fe-SODA y MPx en el balance redox parasitario, determinantes de la muerte celular o proliferación, se ilustran en la Figura 42. En resumen, los resultados obtenidos anteriormente esclarecen los posibles mecanismos involucrados en el control de la proliferación de amastigotas de *T. cruzi* en cardiomiocitos, identificando al H_2O_2 y/o al *NO como mediadores redox difusibles de la MCP en el parásito. En este contexto oxidativo, parásitos sobreexpresantes Fe-SODA y MPx capaces la detoxificar $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 /peroxinitrito respectivamente (o limitando la formación de peroxinitrito) se muestran más resistentes a la inducción de la MCP. Por lo tanto, los niveles de Fe-SODA y MPx presentes en *T. cruzi* podrían contribuir a la supervivencia y virulencia del parásito en el tejido cardíaco durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

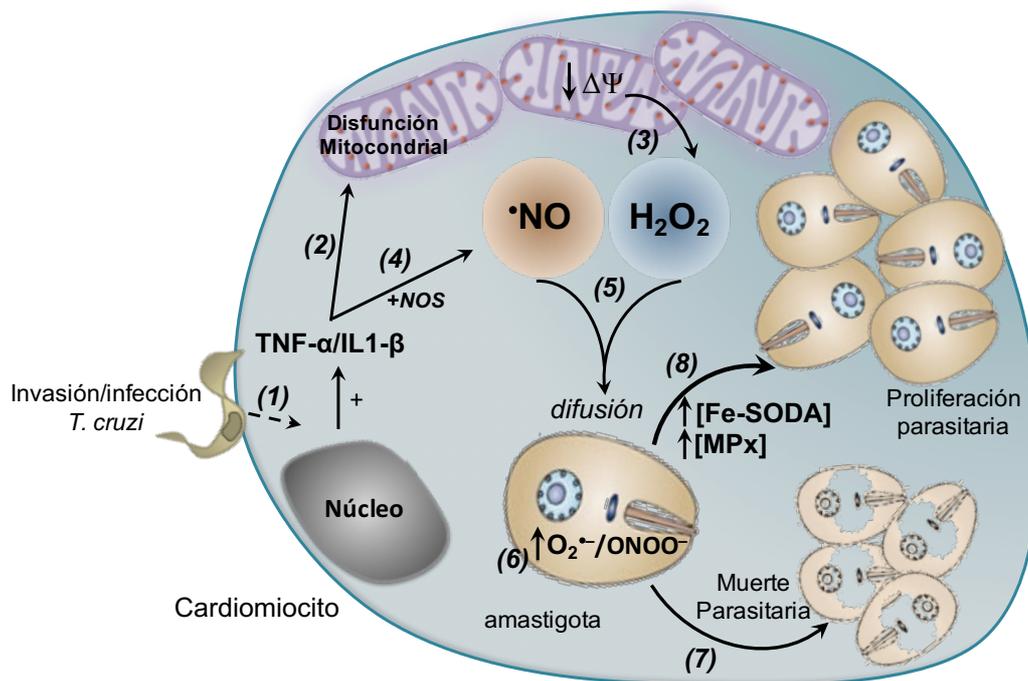


Figura 42. Control de la proliferación de *T. cruzi* en cardiomiocitos. Secuencia de eventos propuesta para el control de la proliferación parasitaria en infecciones de cardiomiocitos por *T. cruzi*: **(1)** Interacción, invasión e infección de tripomastigotas de *T. cruzi* en cardiomiocitos induce la síntesis y secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β ¹⁹³) que pueden actuar de forma autocrina y paracrina. **(2)** Alteración del metabolismo mitocondrial en cardiomiocitos mediada por citoquinas proinflamatorias²⁰¹. **(3)** Generación de O₂^{•-}, producto de la disfunción mitocondrial, y posteriormente de H₂O₂. **(4)** Inducción de la actividad NOS mediada por citoquinas proinflamatorias en cardiomiocitos e incremento de la producción de •NO. El •NO puede inhibir la cadena de transporte de electrones mitocondrial a nivel de la citocromo c oxidasa, aumentando la producción de O₂^{•-} por este orgánulo¹⁷⁶. **(5)** Tanto el •NO como H₂O₂ son moléculas neutras y difusibles capaces de alcanzar y alterar el metabolismo mitocondrial de los amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. **(6)** Ambos mediadores redox, H₂O₂ y •NO, determinan un incremento en la producción de O₂^{•-} mitocondrial, disparador de la MCP en *T. cruzi*^{243,244}. En presencia de •NO, mediante una reacción controlada por difusión con el O₂^{•-} se formará ONOO⁻ de manera sitio específica en las mitocondrias del parásito y contribuirán a la muerte parasitaria. **(7)** Finalmente, en amastigotas de *T. cruzi* se induce la MCP o **(8)** evaden dicho proceso a través de la detoxificación de O₂^{•-}/ONOO⁻ a nivel mitocondrial por la Fe-SODA y MPx respectivamente.

Previamente, nuestro grupo describió que la sobreexpresión de la Fe-SODB citosólica lleva a estos parásitos a tener una mayor resistencia a la muerte dentro del fagosoma de macrófagos estimulados, favoreciendo la proliferación de amastigotas⁵⁴. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la proliferación de amastigotas Fe-SODA en infecciones a macrófagos estimulados con respecto a la cepa salvaje (Figura 38). A pesar de la gran homología estructural entre ambas isoformas, las Fe-SODs presentan diferencias en la susceptibilidad a la inactivación por peroxinitrito, siendo la Fe-SODB altamente resistente en comparación con la Fe-SODA¹⁸⁴. Estos antecedentes, podrían explicar parcialmente que no se hallan observado diferencias significativas en parásitos que sobreexpresan a la Fe-SODA con

respecto a la cepa salvaje. Nos propusimos evaluar el rol de la Fe-SODA en el modelo murino de la enfermedad de Chagas durante la fase aguda. De forma inesperada, se observó una disminución en el pico de parasitemia en ratones infectados con Fe-SODA respecto a la cepa salvaje (Figura 39).

De forma reciente, se ha descrito que patógenos intracelulares utilizan el mimetismo apoptótico (exposición de FS) para modular la respuesta inmune del huésped, generando un contexto favorable para el establecimiento de la infección^{254,255}. La exposición de FS en estos patógenos es una “señal” para su internalización por parte de macrófagos llevando a su activación alterna anti-inflamatoria^{254,274–276}. Considerando estos antecedentes en conjunto con los resultados obtenidos, que muestran a parásitos sobreexpresantes Fe-SODA son capaces de inhibir el proceso de muerte, se evaluó la presencia de amastigotas apoptóticos y/o miméticos en el inóculo infectivo utilizado en infecciones a ratón. Se observó que parásitos Fe-SODA presenta niveles menores de exposición de FS en la cara con respecto a la cepa salvaje (Figura 40). Esto podría determinar una modulación diferencial de la respuesta de macrófagos frente a la infección por la cepa salvaje y Fe-SODA, consistente con una menor parasitemia en el modelo murino observada en los parásitos Fe-SODA. Es interesante destacar que la exposición a suero fresco aumenta la exposición de FS en tripomastigotas de cultivo, observación que no se había realizado anteriormente. Se observó que la depleción de parásitos que exponen FS en la membrana plasmática del inóculo infectivo para la cepa CL-Brener (CL-Brener-DFS) genera una disminución en la parasitemia durante la fase aguda de la enfermedad (Figura 41). Los resultados obtenidos son congruentes con la utilización del mimetismo apoptótico por *T. cruzi* como estrategias de evasión de la respuesta inflamatoria, asociada a eventos iniciales que determinan el establecimiento de la infección.

Finalmente, planteamos que las diferentes isoformas de Fe-SODs tendrán distintos roles durante la fase aguda y crónica de la enfermedad. La isoforma Fe-SODB favorecería la evasión de la respuesta inmune, caracterizada por una extensa producción de oxidantes, a través de la detoxificación de $O_2^{\bullet-}$ y/o peroxinitrito⁵⁴. Mientras que la Fe-SODA, más sensible a oxidantes, podría estar involucrada en mecanismos de señalización de la MCP en la fase crónica de la enfermedad.

*Capítulo 2: Restablecimiento
del fenotipo virulento en
modelos de infección celular
y animal por la
sobreexpresión de CPx en T.
cruzi.*

RESUMEN

La cepa de *T. cruzi* aislada de humano, denominada C8C3 se ha mantenido desde su aislamiento por más de 30 años a través de pasajes por infecciones a ratón (C8C3 $_{hvir}$) o en medio axénico (C8C3 $_{vir}$); repercutiendo en la pérdida del fenotipo virulento por esta última. Recientemente, se ha reportado que el clon de alta virulencia (C8C3 $_{hvir}$) posee mayores niveles de expresión de cruzipaína (principal cisteín proteasa de *T. cruzi*), proteína reguladora del complemento (CRP) y transialidasa con respecto al clon de baja virulencia (C8C3 $_{vir}$). Considerando el rol de dichas enzimas en la interacción huésped-patógeno (evasión de la respuesta inmune, adhesión e invasión celular y escape del fagolisosoma) han sido consideradas como factores de virulencias determinantes del fenotipo más virulento presentado por el clon C8C3 $_{hvir}$. En un contexto oxidativo, como el fagosoma, el contenido antioxidante de *T. cruzi* resulta determinante para el éxito de la infección tanto en modelos celulares de cultivos de macrófagos y cardiomiocitos como en el modelo murino de la enfermedad de Chagas. Por lo tanto, se evaluaron los niveles de enzimas antioxidantes para las variantes de alta y baja virulencia de la cepa C8C3. Se observó un aumento en la expresión de las peroxirredoxinas mitocondrial (MPx) y citosólica (CPx) en la variante C8C3 $_{hvir}$ con respecto a la C8C3 $_{vir}$. Con el objetivo de definir si el aumento en la expresión de peroxirredoxinas (en particular la isoforma citosólica) determina o contribuye a un fenotipo más virulento se transfectó el clon C8C3 $_{vir}$ con el plásmido pTREX conteniendo la secuencia codificante de la CPx. Finalmente, comprobamos que la sobreexpresión de CPx restablece parcialmente el fenotipo virulento en el clon C8C3 $_{vir}$ tanto en infecciones a cardiomiocitos y macrófagos como durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas.

RESULTADOS

Virulencia en diferentes clones de la cepa de *T. cruzi* C8C3

En colaboración con el Dr. Jorge González de la Universidad de Antofagasta (Chile), comenzamos a trabajar con la cepa de *T. cruzi* C8C3 aislada de humano ²⁷⁷, la cuál se ha mantenido en pasajes por ratón (*C8C3hvir*) y de forma axénica (*C8C3lvir*) desde su aislamiento hace más de 30 años ²⁷⁸. Se evaluó y comparó la capacidad infectiva tanto en modelos celulares como en el modelo animal de la enfermedad de Chagas para ambos clones de la cepa C8C3.

Infecciones en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.

Se infectaron ratones de la cepa BALB/c (grupos independientes de 5) de forma intraperitoneal con tripomastigotas (2×10^7) obtenidos del sobrenadante de cultivo de células VERO, de los clones de alta (*C8C3hvir*) y baja (*C8C3lvir*) virulencia. La infección se evaluó mediante conteo de parasitemia en sangre y curva de supervivencia. Se observó una disminución en el pico de la parasitemia de la cepa *C8C3lvir* con respecto al clone *C8C3hvir* (Figura 43A). Además, el 80 % de los ratones infectados por el clone *C8C3hvir* se murieron a los 11 días post-infección (Figura 43B), mientras que el 100 % de los ratones infectados por el clon de baja virulencia permanecieron vivos hasta el momento de la eutanasia (25 días). De esta manera, confirmamos que los cultivos de *T. cruzi* mantenidos mediante pasaje en medio axénico (*C8C3lvir*) perdieron su virulencia con respecto a los mantenidos por pasajes en ratón (*C8C3hvir*), como fue descrito de forma reciente ²⁷⁸.

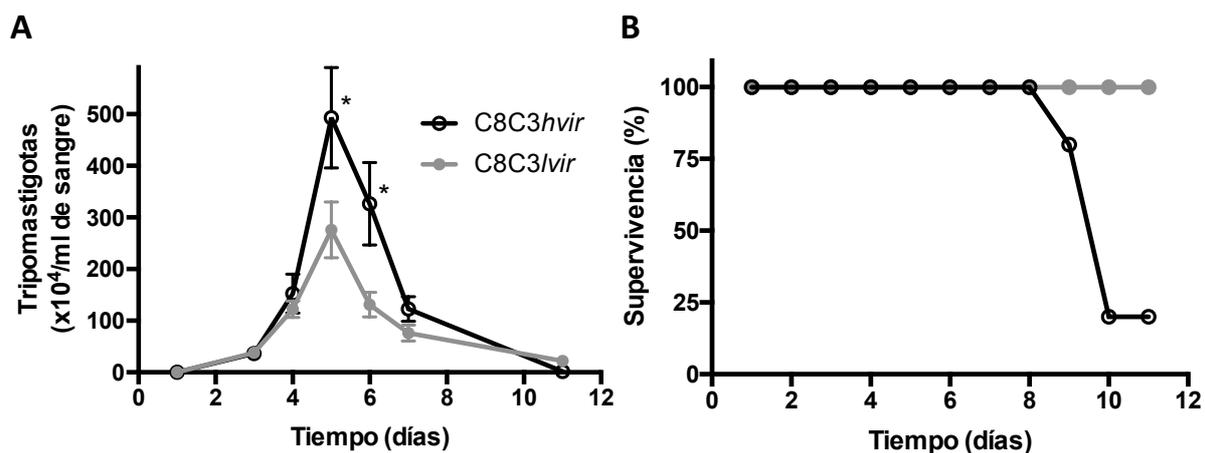


Figura 43. Virulencia de los clones de *T. cruzi* C8C3hvir vs C8C3/vir en infecciones del modelo murino. Grupos independientes de 5 ratones machos BALB/c (6-8 semanas) se infectaron de manera intraperitoneal con 2×10^7 tripomastigotas de la cepa C8C3hvir vs C8C3/vir. **(A)** La parasitemia se evaluó diariamente por el conteo de tripomastigotas presentes en sangre (obtenida de la vena caudal de la cola) mediante microscopía de campo claro. Los resultados representan la media de cinco ratones por grupos independientes. **(B)** Curva de supervivencia para los ratones infectados como se describió previamente. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$.

Niveles de enzimas antioxidantes en los clones de alta y baja virulencia de la cepa C8C3

Se cuantificaron los niveles de enzimas antioxidantes: Fe-superóxido dismutasas mitocondrial (Fe-SODA) y citosólica (Fe-SODB), peroxirredoxinas mitocondrial (MPx) y citosólica (CPx), tripanotona reductasa (TR) y Ascorbato-citocromo c peroxidasa (APxCcP); en extractos parasitarios procedentes de los diferentes estadios de *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas y amastigotas) para los clones de alta y baja virulencia de la cepa C8C3 mediante técnicas de western blot utilizando anticuerpos específicos para cada una de las diferentes enzimas disponibles en el laboratorio. Posteriormente, se revelaron por técnicas infrarrojas utilizando anticuerpos secundarios conjugados a IRE800-IRE600 (Odyssey) (Figura 44A). Se observó un aumento en los niveles de enzimas antioxidantes en los estadios infectivos del clon C8C3hvir con respecto al C8C3/vir. En particular, se observó un aumento en las peroxirredoxinas CPx y MPx (Tabla 1).

Resultados capítulo 2: Restablecimiento del fenotipo virulento en modelos de infección celular y animal por la sobreexpresión de CPx en *T. cruzi*

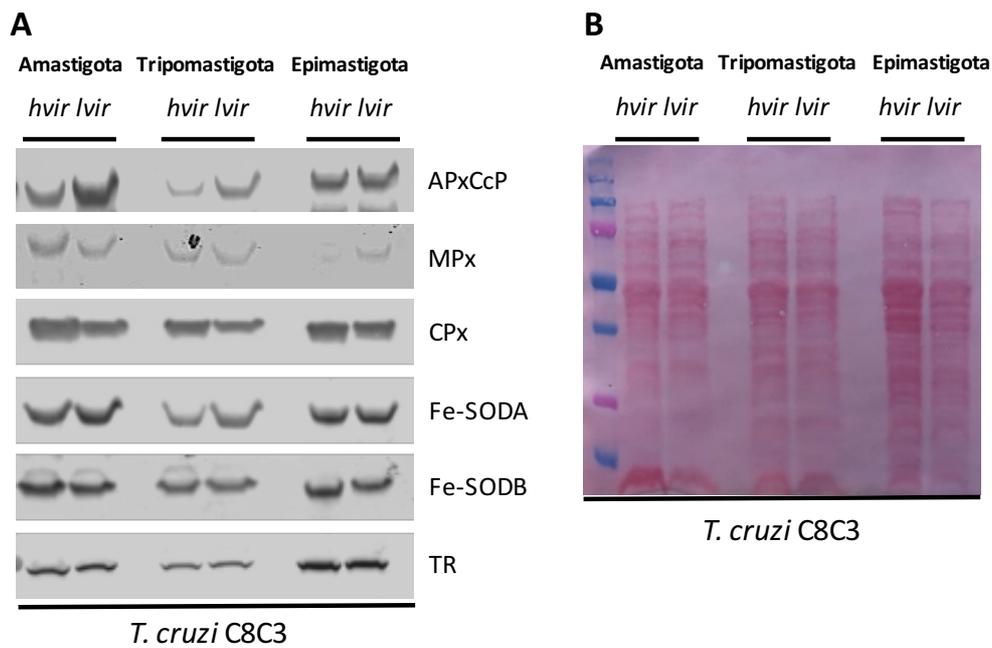


Figura 44. Enzimas antioxidantes en los clones C8C3*hvir* y C8C3*lvir*. (A) Western Blot de las enzimas antioxidantes en los diferentes estadios parasitarios (epimastigota, tripomastigota y amastigota) para los clones C8C3*hvir* y C8C3*lvir*. (B) Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceau. APxCcP: Ascorbato-citocromo c peroxidasa; MPx: peroxirredoxina mitocondrial; CPx: peroxirredoxina citosólica; Fe-SODA: Fe-superóxido dismutasa mitocondrial; Fe-SODB: Fe-superóxido dismutasa citosólica; TR: tripanotona reductasa.

	Ratio de enzimas antioxidantes (<i>hvir</i> / <i>lvir</i>)					
Estadio	APxCcP	CPx	MPx	Fe-SODA	Fe-SODB	TR
Amastigota	0,6	1,7	1,9	0,6	1,1	1,0
Tripomastigota	0,5	1,4	1,2	0,3	1,1	0,9
Epimastigota	1,3	1,3	0,3	0,9	1,3	1,2

Tabla 1. Niveles de expresión de enzimas antioxidantes en los diferentes estadios para los clones C8C3*hvir* y C8C3*lvir*. Análisis del armamento de enzimas antioxidante en *T. cruzi* C8C3*hvir* y C8C3*lvir* por western blot y detección infrarroja. La carga de proteína se normalizó por tinción de Ponceau. Los niveles de expresión se expresan relativos al clone C8C3*lvir*. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

Recuperación del fenotipo virulento en el clon C8C3/*vir* por la sobreexpresión de CPx.

Generación de parásitos C8C3/*vir* sobreexpresantes de CPx

Considerando los resultados descritos previamente, se realizó la transfección por electroporación de la cepa C8C3/*vir* con el plásmido pTREX conteniendo la secuencia codificante de CPx fusionada al epítipo 9E10 de c-Myc. Los epimastigotas sobreexpresantes de CPx se seleccionaron por la presencia en el medio de cultivo (BHI) del antibiótico geneticina (G418, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como marcador de selección. Luego, se caracterizó la sobreexpresión de CPx en epimastigotas transfectados mediante western blot utilizando anticuerpos anti-CPx disponibles en el laboratorio y se reveló por técnicas infrarrojas utilizando anticuerpos secundarios conjugados a IRE800-IRE600 (Odyssey). Se observó un aumento de $\approx 2,2$ veces en la expresión de CPx por epimastigotas transfectados y se confirmó que la expresión de otras enzimas antioxidantes no se afectó (Figura 45).

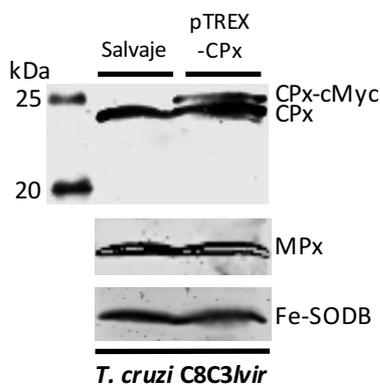


Figura 45. Generación de epimastigotas C8C3/*vir* sobreexpresantes de CPx. Western blot para las enzimas antioxidantes (CPx, MPx y Fe-SODB) en epimastigotas C8C3/*vir* y transfectados con el plásmido pTREX-CPx-9E10(cMyc) seleccionados por la presencia de G418 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en el medio de cultivo (BHI).

Incremento en la proliferación de parásitos CPx sobreexpresantes en modelos celulares.

Nos propusimos evaluar el rol de la sobreexpresión de CPx en la recuperación del fenotipo virulento en la cepa de *T. cruzi* C8C3*lvir* en infecciones a macrófagos. Para ello, se infectó la línea celular de macrófagos J774A.1 (relación parásito: célula, 5:1) estimulados o no con LPS/IFN- γ para la inducción de la expresión de la iNOS y se evaluó la proliferación por conteo de amastigotas intracelulares (DAPI). La sobreexpresión de CPx determinó un aumento en la proliferación de amastigotas intracelulares tanto en cultivos estimulados como no estimulados (Figura 46A). El control parasitario, previo a la evasión del fagosoma y establecimiento del parásito en el citosol celular, depende en gran medida de la producción de ONOOH. De esta manera, los niveles de CPx al momento de la invasión resultan determinantes para la evasión del fagosoma y establecimiento en el citosol celular, como fue descrito previamente ⁵⁵.

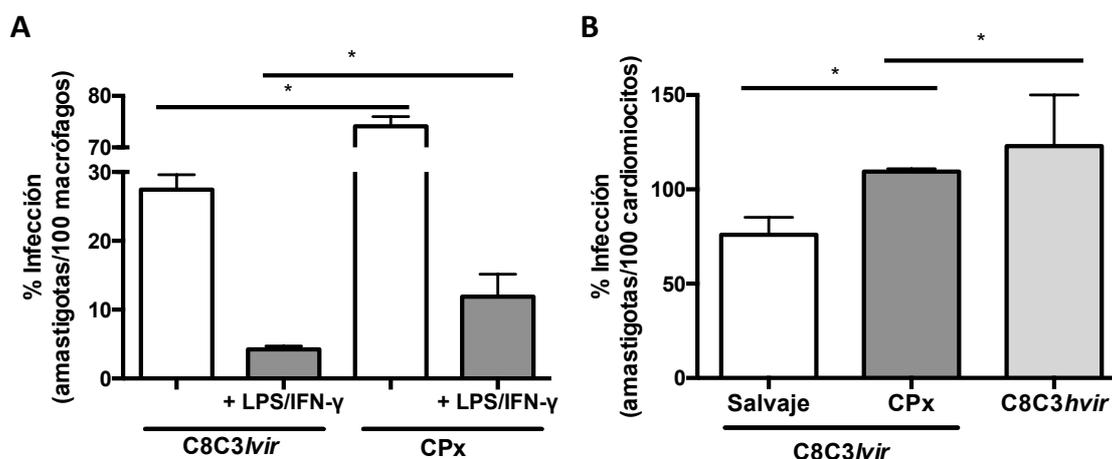


Figura 46. Proliferación de amastigotas intracelulares en infecciones *in vitro* a macrófagos y cardiomiocitos. (A) Macrófagos de la línea celular J774A.1 (2 x 10⁵ células) se infectaron (relación parásito:célula; 5:1) con tripomastigotas de *T. cruzi* C8C3*lvir* o sobreexpresantes CPX. (B) Cardiomiocitos H9c2 (1 x 10⁵ células) se infectaron con tripomastigotas de *T. cruzi* C8C3*lvir*, C8C3*lvir* o sobreexpresantes CPX como se describió en (A). El número de amastigotas intracelulares se determinó mediante tinción con DAPI. Los resultados se expresan como el número de amastigotas cada 100 células. *, denota diferencia estadística con p < 0,05.

Luego, realizamos infecciones en cultivos de cardiomiocitos de la línea celular H9c2 utilizando tripomastigotas de cultivo de los diferentes clones y se evaluó la capacidad infectiva (24 h post-infección) mediante conteo de amastigotas intracelulares para parásitos salvajes (C8C3*lvir* y C8C3*lvir*) y sobreexpresantes CPX. Se observó que la sobreexpresión de CPx en parásitos C8C3*lvir* recupera el fenotipo virulento alcanzando niveles de proliferación similares a los observados por el clon de alta virulencia (C8C3*lvir*) (Figura 46B).

CPx factor de virulencia en infecciones al modelo murino.

Finalmente, nos propusimos investigar el rol de la enzima antioxidante CPx como factor de virulencia capaz de rescatar el fenotipo virulento en la cepa mantenida mediante pasajes en medio de cultivo axénico (*C8C3/vir*). Se evaluó en la fase aguda de la enfermedad mediante la infección intraperitoneal de ratones C57BL/6 (grupos independientes de 5) con tripomastigotas de cultivo (2×10^7) de la cepa salvaje (*C8C3/vir*) y sobreexpresantes CPx. Se observó un mayor conteo de tripomastigotas sanguíneos en el pico de parasitemia para los parásitos sobreexpresante CPx con respecto a la cepa salvaje (Figura 47).

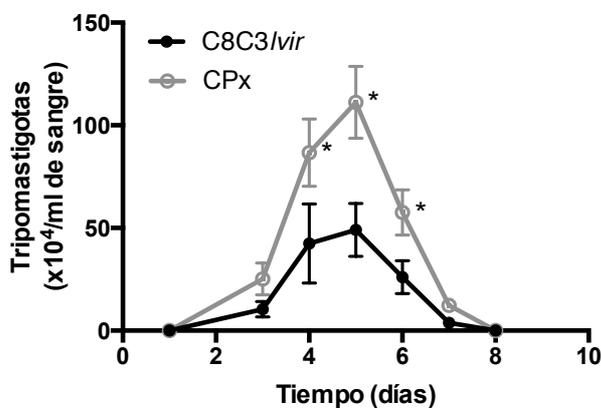


Figura 47. Virulencia de *T. cruzi* C8C3/vir salvaje y sobreexpresantes CPx en infecciones a ratón.

Grupos independientes de 5 ratones machos C57BL/6 (6-8 semanas) se infectaron de manera intraperitoneal con tripomastigotas (2×10^7) de la cepa salvaje (*C8C3/vir*) y sobreexpresantes CPx. La parasitemia se evaluó diariamente por el conteo de tripomastigotas presentes en sangre (obtenida de la vena caudal de la cola) mediante microscopía de campo claro. Los resultados representan la media de cinco ratones por grupos independientes. * denota diferencia estadística con $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En *T. cruzi* se han descrito diversos factores de virulencia que participan a diferentes niveles en la interacción huésped—patógeno favoreciendo el éxito de la infección y la persistencia parasitaria en los tejidos durante años. Estos factores de virulencia pueden estar directamente asociados a: Adhesión e invasión celular, escape del fagolisosoma, resistencia y evasión de la respuesta inmune, detoxificación de especies oxidantes, reparación de macromoléculas oxidadas, diferenciación celular y proliferación^{56,209–214}. Las diferencias observadas para los clones C8C3 mantenidos mediante pasajes por ratón (C8C3*hvir*) y por medio de cultivo axénico (C8C3*lvir*) muestran la gran plasticidad que presenta *T. cruzi*. La pérdida del fenotipo virulento observada por el clon C8C3*lvir* en el modelo murino durante la fase aguda con respecto al clon C8C3*hvir* (Figura 43) se ha adjudicado a una disminución en los niveles de expresión de cruzipaina (Czp), proteína reguladora del complemento (CRP) y transialidasa²⁷⁸. Estas proteínas participan en los procesos de adhesión e invasión celular (Czp y transialidasa), escape del fagolisosoma (transialidasa) y resistencia y evasión del sistema inmune (CRP) determinando un fenotipo más virulento²¹⁴. Además de estos factores, la capacidad antioxidante parasitaria es fundamental para poder sobrevivir y escapar del fagosoma. Se cuantificaron los niveles de enzimas antioxidantes en ambos clones para los tres estadios parasitarios (Figura 44). El clon C8C3*hvir* presenta niveles de expresión mayores para las enzimas CPx y MPx con respecto a C8C3*lvir* (Tabla 1). En estudios previos se observó que tripomastigotas metacíclicos de cepas salvajes de alta virulencia presentan mayores niveles de peroxirredoxinas con respecto al mismo estadio de cepas salvajes atenuadas⁵⁹. Por consiguiente, nos planteamos validar la expresión de CPx en el clon C8C3*lvir* como factores de virulencia capaz de recuperar el fenotipo virulento observado para el clon C8C3*hvir*. Inicialmente, se generaron parásitos C8C3*lvir* sobreexpresantes de CPx (Figura 45). La sobreexpresión de CPx en el clon C8C3*lvir* determinó un aumento en la proliferación de amastigotas intracelulares tanto en infecciones a cultivos de cardiomiocitos como de macrófagos estimulados o no estimulados (Figura 46). La sobreexpresión de CPx aumenta la virulencia parasitaria debido a la neutralización de los efectos citotóxicos del peroxinitrito, favoreciendo la supervivencia de *T. cruzi* dentro del fagosoma de macrófagos estimulados⁵⁵.

Discusión capítulo 2: Restablecimiento del fenotipo virulento en modelos de infección celular y animal por la sobreexpresión de CPx en T. cruzi

Finalmente, en infecciones al modelo murino de la enfermedad se observó que la sobreexpresión de CPx genera un aumento en la parasitemia durante la fase aguda de la enfermedad con respecto a la cepa sin transfectar C8C3/*vir* (Figura 47). Estos resultados se encuentran de acuerdo con los descritos previamente en donde se describió una correlación directa entre los niveles de peroxirredoxinas en cepas salvajes más virulentas con la parasitemia, daño a tejidos y cardiomiopatía sintomática ^{59,239}. Por lo tanto nuestros resultados confirman a la CPx como factor de virulencia en *T. cruzi*, capaz de reestablecer el fenotipo virulento en el clon de baja virulencia C8C3/*vir*, tanto en infecciones a modelos celulares como al modelo animal. La recuperación del fenotipo virulento, mediada por la sobreexpresión de CPx, puede deberse a un aumento en la capacidad de detoxificación de peroxinitrito, H₂O₂ y otros hidroperóxidos orgánicos de cadena corta ^{181,228,238} y/o a la actividad holdasa (chaperona) reportada previamente para la CPx de *T. cruzi* ²⁷⁹ así como para la peroxirredoxina de *Leishmania*, perteneciente a la misma familia ²⁸⁰.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, identificamos a dos mediadores derivados del hospedero (H_2O_2 y $\cdot NO$) como responsables del control de la proliferación intracelular de amastigotas intracelulares. Dicho control se da, en parte, por la inducción del programa de muerte parasitario, y en este contexto, parásitos con un mayor contenido de Fe-SODA y/o MPX resultaron ser resistentes generando infecciones más severas. Por otra parte, comenzamos los estudios de la relevancia que presenta el mimetismo apoptótico con la exposición de FS para el proceso de infección. Se observó una menor presencia de exposición de FS en tripomastigotas Fe-SODA lo que se podría relacionar con la menor parasitemia observada en la fase aguda de la enfermedad. Este mecanismo, sería dependiente de la modulación del fenotipo de fagocitos profesionales en el sitio de invasión. En este sentido, la menor exposición de FS haría que los fagocitos adopten un fenotipo proinflamatorio controlando la proliferación parasitaria. Esta hipótesis también se corroboró con la cepa salvaje en donde se eliminaron los parásitos que exponían FS, resultando también en una menor parasitemia.

Nos planteamos como perspectiva determinar el rol de la exposición de FS a nivel parasitario (parásitos apoptóticos o con mimetismo apoptótico) en el establecimiento de la infección dependiente de la evasión de la respuesta mediada por macrófagos reclutados en el sitio de infección a nivel peritoneal. Asimismo, pretendemos definir si cambios en el número de parásitos con FS externalizada en su membrana plasmática en el inóculo infectivo llevan a una modulación de la respuesta fagocítica desde una activación clásica citotóxica a una activación alterna favorable para la proliferación parasitaria en las etapas iniciales de la infección. En estas etapas iniciales, la modulación de la respuesta del macrófago sería crucial para que *T. cruzi* pueda evadir la respuesta inmune del huésped y así poder diseminarse y establecer la infección.

Por otra parte, logramos restablecer de forma parcial la virulencia de la cepa de *T. cruzi* C8C3 atenuada mediante la expresión de la peroxirredoxina citosólica CPx tanto en infecciones celulares (cardiomiocitos y macrófagos) como en el modelo murino de la enfermedad. Estos resultados, en conjunto con una menor expresión de ambas peroxirredoxinas en la cepa

Conclusiones y perspectivas

atenuada, confirmar en rol de estas como factores de virulencia como se había descrito previamente.

Nos planteamos como perspectiva transfectar el clon C8C3/*vir* con el plásmido pTREX conteniendo la secuencia que codifica para la MPx para posteriormente evaluar dicha enzima como factor de virulencia capaz de reestablecer el fenotipo observado por el clon C8C3/*hvir*.

En suma, el control de la proliferación de *T. cruzi* es dependiente de mecanismos redox que determinan la proliferación o MCP a través de la producción de mediadores derivados de la célula huésped (H_2O_2 , *NO y especies relacionadas), capaces de difundir y alcanzar blancos parasitarios. El destino parasitario (proliferación vs muerte) se encuentra estrechamente relacionado con los niveles de enzimas antioxidantes presentes en *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Medios de Cultivo

BHI (*Brain Heart Infusion*) y Leibovitz (L-15) se adquirieron de Sigma. DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) se adquirió de Gibco.

Antibióticos

Penicilina, estreptomina y gentamicina (G418) se adquirieron de sigma.

Citoquinas

TNF- α (factor de necrosis tumoral α), IL-1 β (interleuquina 1 β) e IFN- γ (interferón γ) se adquirieron de Sigma.

Sondas

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), JC-1, Amplex[®]-Red, MitoSOX, kits APOBrdU-TUNEL y Click-iT[®]TUNELAlexaFluor[®]488, anexina-V (AV) conjugada con Alexa Fluor[®] 488, yoduro de propidio (IP) y DHE (dihidroetidio) se adquirieron de Invitrogen.

Enzimas

Tripsina-EDTA (solución 10 X), colagenasa II y peroxidasa de rábano picante (HRP) se adquirieron de sigma.

Oxidantes

H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) se adquirió de Mallindckrodt. El dador de ^{*}NO, NOC-18 [2,2'-(hidroxinitrosohidrazino) bis-etanamina] se adquirió de sigma.

Anticuerpos primarios

Anticuerpos monoclonales de ratón anti-FoxO-3A y anti-Prx3 se adquirieron de Abcam. Anticuerpo monoclonal de ratón anti-MnSOD se adquirió se Santa Cruz. Anticuerpo policlonal de conejo anti- β -actina se adquirió de Sigma. Los anticuerpos anti-Fe-SODA, anti-CPx y anti-MPx se produjeron en ratón y conejo en colaboración con el bioterio de la Facultad de Medicina.

Anticuerpos secundarios

IgG anti-ratón (conjugado a IR Dye-680 o -800) y IgG anti-conejo (conjugado a IR Dye-680 o -800) se adquirieron de LI-COR Biosciences. Anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Fluor 488 se adquirió en Invitrogen.

Otros reactivos

Inhibidores de proteasas, fibronectina, Optiprep, lipopolisacárido (LPS), oligomicina (oligo), carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), antimicina A (AA) y rotenona (ROT) se adquirieron de sigma. Suero fetal bovino (SFB) se adquirió de Gibco. Apoptotic cell isolation kit se adquirió de Bio Vision.

Cultivo de parásitos y diferenciación en el estadio infectivo

Cultivo de parásitos

Loa epimastigotas de *T. cruzi* se cultivaron a 28 °C en medio de infusión de cerebro-corazón (BHI: Infusión de cerebro y corazón 33 g/L, triptosa 3 g/L, KCl 0.4 g/L, Na₂HPO₄ 4 g/L, hemina 0,02 g/L, 10 % de suero fetal bovino (SFB), glucosa 0,3 g/L, estreptomycin 0,2 g/L y penicilina 200.000 U), como se describió anteriormente ²⁸¹. El Dr. Shane Wilkinson (Queen Mary University of Londres, Reino Unido) proporcionó amablemente los parásitos CL-Brener salvajes y modificados genéticamente para la sobreexpresión de la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de hierro (Fe-SODA) o la peroxirredoxina mitocondrial (MPx) ^{238,282}. El Dr. Jorge González (Universidad de Antofagasta, Chile) cedió amablemente las variantes de alta (*hvir*) y baja (*lvir*) virulencia de la cepa C8C3 ²⁷⁸. La variante C8C3/*lvir* se transfectó por con un plásmido pTREX conteniendo la secuencia codificante de la peroxirredoxina citosólica (CPx) para la sobreexpresión de la misma. Epimastigotas C8C3/*lvir* en fase exponencial de crecimiento (5 x 10⁷ parásitos/mL) se lavaron y resuspendieron en HBS (Hepes 21 mM; NaCl, 137 mM; KCl, 5 mM; glucosa, 6 mM, pH 7,4). El plásmido pTREX-CPx (100 µg) se agregó a 400 µL de dicha suspensión en una cubeta de electroporación y se transfectaron los epimastigotas mediante dos pulsos de 450 V, 50 µF y 25 Ω utilizando el electroporador ECM 630 Electro Cell Manipulator (BTX) System. Las células transfectadas se resuspendieron en 10 mL de BHI y 24 h después se adicionó geneticina (G418) al medio de cultivo (250 µg/mL). Los parásitos transfectados (Fe-SODA, MPx y CPx) se seleccionaron mediante la presencia de G418 (250 µg/ml) en el medio de cultivo. Luego de la selección, se caracterizó la sobreexpresión en los parásitos por técnicas de western blot utilizando anticuerpos específicos y se mantuvieron en medio axénico en presencia de G418. Las secuencias codificantes de Fe-SODA, CPx y MPx poseen una etiqueta en el C-terminal del epítipo 9E10 derivado de la proteína c-Myc.

Diferenciación en tripomastigotas metacíclicos

Epimastigotas de 5 días de cultivo (fase exponencial) de las cepas salvajes (CL-Brener, C8C3*hvir* y C8C3*vir*) y los correspondientes sobreexpresantes de enzimas antioxidantes (Fe-SODA, MPx o CPx) se colectaron por centrifugación a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, los epimastigotas se utilizaron para la obtención de tripomastigotas metacíclicos infectivos, mediante transformación química en medio artificial de orina de triatomineo (TAUP-3AAG, 96 horas a 28 °C) como se describió previamente^{55,59,283}. Los tripomastigotas metacíclicos resultantes se utilizaron para infectar células VERO confluentes a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂ y posterior obtención de tripomastigotas de cultivo en el sobrenadante de infección.

Western blot de enzimas antioxidantes

Los extractos de parásitos de *T. cruzi* se obtuvieron a partir de 6×10^8 parásitos/mL utilizando el buffer de lisis [Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM y Triton X-100 0,5 %(v/v); pH 8,0] conteniendo inhibidores de proteasa (sigma) durante 15 min en hielo. Se sonicaron los extractos y se centrifugaron a 13.000 g durante 30 min a 4 °C. Se suplementó el sobrenadante con buffer de carga [Tris-HCl 30 mM, SDS 1 %(m/v) y glicerol 5 %(v/v); pH 6,6]. Los extractos resultantes (~50 µg) se mantuvieron a -80 °C hasta su utilización. Las muestras proteicas obtenidos de los 4 estadios parasitarios se separaron mediante SDS-PAGE (15 %) y se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa. A continuación, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con rojo Ponceau (Applichem) como control de carga y se bloquearon con leche en polvo sin grasa [3 %(m/v) en PBS pH 7,4] durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos para las diferentes enzimas antioxidantes disponibles en el laboratorio, en una dilución 1:2.000 en Tween-20 [0,1 %(v/v) en PBS pH 7,4] y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Luego, las membranas se lavaron con Tween-20 [0,1 %(v/v) en PBS] y se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios conjugados a IRDye 800 o 680 (LI-COR Biosciences) diluido 1:15000. Después del lavado de las membranas, las proteínas inmunoreactivas se visualizaron con un sistema de detección de fluorescencia infrarroja (Odyssey, LI-COR Biosciences)¹⁸⁴.

Cultivo de cardiomiocitos e infección por *T. cruzi*

Purificación y cultivo de cardiomiocitos

Cardiomiocitos derivados de rata (H9c2, ATCC®) se cultivaron en DMEM suplementado con penicilina, estreptomina (100 U/ml y 100 µg/ml respectivamente), NaHCO₃ (1,8 g/L) y 10 % SFB a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂, hasta alcanzar 80 % de confluencia.

Los cardiomiocitos primarios se obtuvieron a partir de 15 neonatos de ratón BALB/c (1–3 días). Dichos neonatos se sacrificaron por decapitación, los corazones se extrajeron de forma aséptica y se mantuvieron en solución salina equilibrada de Hanks (*Hanks' balanced salt solution*; HBSS: NaCl 8 g/l, KCl 0,4 g/l, KH₂PO₄ 0,06 g/l, K₂HPO₄ 0,048 g/l, glucose 1 g/l, MgSO₄ 0,098 g/l, CaCl₂ 0,14 g/l and NaHCO₃ 0,35 g/l; pH 7,4) en hielo. Se lavaron 6 veces con HBSS frío, se aislaron los ventrículos y se cortaron en pequeños fragmentos. A continuación, se disoció el tejido cardíaco durante la noche a 4 °C (con agitación longitudinal) en 7 ml de 0,5%(m/v) tripsina–EDTA 0,2%(m/v) (sigma), diluido en HBSS. Seguidamente, el tejido parcialmente disgregado se sometió a una segunda etapa de disociación en una solución de 5 ml de colagenasa-II (1 mg/ml), disuelta en medio Leibovitz (L-15), a 37 °C durante 40 minutos con agitación longitudinal. Las células en suspensión se filtraron (70 µm) y centrifugaron a 300 g durante 5 min a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en DMEM suplementado y las células se pre-plaquearon durante 2 horas a 37 °C con 5 % de CO₂ para eliminar fibroblastos y otras células no musculares. Posteriormente, se colectó el sobrenadante enriquecido en cardiomiocitos y se sembró 1–5 × 10⁵ células/pocillo, en pocillos pre-recubiertos con 0,05%(v/v) fibronectina–gelatina 0,02%(m/v), en portaobjetos con cámaras (Lab-Tek) o en placas de 24 pocillos (Nunc). Los cardiomiocitos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5 % CO₂ durante 72 h para permitir la adhesión celular antes de los procedimientos experimentales ²⁸⁴.

Infección a cardiomiocitos por *T. cruzi*

Tripomastigotas derivados del sobrenadante de células VERO salvajes (CL-Brener, C8C3*hvir* C8C3*vir*) y sobreexpresantes (Fe-SODA, MPx y CPx) se utilizaron para infectar cultivos de cardiomiocitos primarios y/o de la línea celular (H9c2) nativos o estimulados con citoquinas proinflamatorias (TNF- α , 25 ng/ml; IL-1 β , 25 ng/ml) plaqueados en portaobjetos con cámaras (Lab-Tek, relación parásito:célula de 5:1 o 10:1). Después de 2 h, los parásitos no internalizados se eliminaron por lavando con PBS (dos veces) y las células se incubaron en DMEM suplementado durante 24–48 h a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5 % CO₂. Las células se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) fresca [4 %(v/v) en PBS] durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS que contenía glicina (100 mM) y se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton X-100 [0,1 %(v/v) en PBS]. El número de parásitos por cardiomiocitos se determinó mediante tinción con DAPI (5 μ g/ml). Los preparados se analizaron utilizando un microscopio (Nikon Eclipse TE-200) a un aumento de 1.000X y se registraron fotografías digitales de las células infectadas. Se contaron al menos 1.000 células de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como el número de amastigotas por 100 células y representan la media de tres experimentos independientes.

Potencial de membrana mitocondrial en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mm}$) se determinó utilizando el catión lipofílico JC-1. Consiguientemente, cardiomiocitos primarios se cultivaron en placas de 24 pocillos (fondo de vidrio) y se infectaron o no (control) con tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener salvajes durante 24 horas. Se añadió JC-1 (0,5 μ M) y DAPI (5 μ g/ml) en cada pocillo, se incubaron las células a 37 °C en atmósfera con 5 % CO₂ durante 1 h y se lavaron con buffer de Krebs—Henseleit (NaHCO₃ 15 mM, KCl 5 mM, NaCl 120 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM y NaH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,3). Las células se visualizaron mediante microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE 200), equipado con una cámara digital, a un tiempo de exposición fijo. La fluorescencia de los agregados de JC-1 se observó utilizando un cubo de filtro con un filtro de excitación (longitud de onda/paso de banda) de 540/25 nm, un filtro de emisión de 605/55 nm y un divisor de haz

a 565 nm. Simultáneamente, el monómero se observó usando un cubo de filtro con un filtro de excitación de 480/30 nm, un filtro de emisión de 535/40 nm y un divisor de haz a 505 nm.

Consumo de oxígeno en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*

El consumo de oxígeno mitocondrial de cardiomiocitos se evaluó utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse XF²⁴ (Agilent technology) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la siguientes modificaciones. Los cardiomiocitos primarios se sembraron (5 x 10⁴ células/pocillo) en placas de cultivo de células XF²⁴ (Seahorse Bioscience) recubiertas con 0,05 % (v/v) fibronectina–gelatina 0,02 % (m/v) y se mantuvieron en DMEM complementado a 37 °C en atmosfera de 5 % CO₂ durante 72 h, como se detallo previamente. Posteriormente, las células se infectaron o no con tripomastigotes de *T. cruzi* CL-Brener o sobreexpresantes Fe-SODA o MPx (relación parásito:célula 5:1). Después de 24 h de infección, el medio de cultivo se descartó y reemplazó por medio DMEM modificado (NaCl 1,85 g/l, rojo fenol 15 mg/l, piruvato de sodio 1 mM, glucosa 10 mM y L-glutamina 2 mM). Cada ciclo de medición consiste en un tiempo de mezcla de 3 min y un período de adquisición de datos de 3 min. La velocidad de consumo de O₂ (QO₂) se midió y registró antes y después de la adición de los siguientes compuestos: oligomicina (oligo, 5 μM), carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 5 μM) y antimicina A (AA, 5 μM) más rotenona (ROT, 1 μM). Después de restar la respiración no mitocondrial (consumo de oxígeno en presencia de AA-ROT) a cada set de datos, los QO₂ se reportaron como pmolO₂/min/5x10⁴ células. Se realizaron al menos tres experimentos independientes con cinco réplicas biológicas. El RCR (índice de control respiratorio) se calculó como el consumo de O₂ después de la adición de FCCP dividido el consumo de O₂ después de oligomicina (QO_{2(FCCP)} / QO_{2(Oligomicina)}). El RCM (máxima capacidad respiratoria se calculó como el consumo de O₂ después del agregado de FCCP (QO_{2(FCCP)}). La capacidad respiratoria de reserva se calculo como el consumo de O₂ después del agregado de FCCP menos el el consumo de O₂ basal (QO_{2(FCCP)} – QO_{2(basal)})²⁴⁵.

Producción de H₂O₂ por cardiomiocitos infectados con *T. cruzi*

Cardiomiocitos primarios se infectaron o no con tripomastigotas CL-Brener salvajes (relación parásito:célula 5:1), se colectaron los sobrenadantes de cultivo a diferentes tiempos post-infección (0–4 días) y se almacenaron a – 80 °C hasta su utilización. La concentración de H₂O₂ en sobrenadantes de cultivos se determinó utilizando el reactivo Amplex[®] Red (50 μM, Invitrogen) y la peroxidasa de rábano picante (HRP, 0,1 U/ml) en buffer de Krebs-Ringer (NaCl 145 mM, Na₃PO₄ 5,7 mM, KCl 4,86 mM, CaCl₂ 0,54 mM, MgSO₄ 1,22 mM, glucosa 5,5 mM; pH 7,35). El producto fluorescente rojo, resorufina, se midió en un lector de placa de fluorescencia a 37 °C (Varioskan Flash, Thermo Scientific) a las longitudes de onda de λ_{ex} = 568 nm y λ_{em} = 581 nm. Los valores de fluorescencia obtenidos se compararon contra una curva de calibración de H₂O₂ (0–250 μM) en las mismas condiciones experimentales y los resultados se expresaron como nmol H₂O₂/10⁵ cardiomiocitos.

Respuesta antioxidante en cardiomiocitos infectados por *T. cruzi*.

Activación del factor de transcripción FOXO

La activación por estrés oxidativo del factor de transcripción FOXO-3A se evaluó por microscopía de fluorescencia. Cardiomiocitos primarios se sembraron en portaobjetos con cámaras (Nunc[®] Lab-Tek[®]) y se infectaron o no con tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener salvajes en presencia y ausencia de citoquinas proinflamatorias como se describió anteriormente durante 12 h. Posteriormente, las células se fijaron con PFA fresco [4 %(m/v)] durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS (pH 7,4) y permeabilizaron con Triton X-100 [0,1 %(v/v) en PBS] conteniendo seroalbúmina bovina [1 %(m/v)] durante 1 h. La inmunodetección de la activación y translocación nuclear de FOXO-3A se realizó utilizando un anticuerpo de ratón anti-FOXO-3A (1:50) (Abcam) en Tween-20 [0,1 %(v/v) en PBS] durante la noche a 4 °C. Después de repetidos lavados, los portaobjetos se incubaron durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con Alexa-Fluor-488 (Invitrogen) diluido 1:100 en Tween-20 [0,1 %(v/v) en PBS]. El ADN se visualizó con DAPI (5 μg/ml). Las células se

analizaron utilizando el microscopio de fluorescencia descrito previamente. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa ImageJ 1.36B (Wayne Rasband, Institutos Nacionales de la Salud, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Expresión de los genes diana de FOXO

Los niveles de expresión de proteína de MnSOD y Prx-3 mitocondriales (ambos diana de FOXO-3) se evaluaron mediante western blot. En resumen, los cardiomiocitos se infectaron como se describió anteriormente y se lisaron en buffer Tris-HCl [50 mM, pH 7,4; conteniendo NaCl 150 mM, nonidet P-40 1 %(v/v), desoxicolato de sodio 0,25 %(m/v) y EDTA 1 mM]. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE (15 %), se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y se bloquearon con leche en polvo sin grasa [3 %(m/v) en PBS pH 7,4] durante 1 h. Las membranas se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-Prx3 (Abcam) o anticuerpo monoclonal anti-MnSOD (Santa Cruz) junto con un anticuerpo policlonal de conejo anti- β -actina (Sigma). Los anticuerpos primarios se utilizaron en una dilución 1:2.000 en Tween-20 [0,1 %(v/v) en PBS pH 7,4] y se incubaron durante la noche a 4 °C en agitación. Luego, las membranas se lavaron con Tween-20 [0,1 %(v/v) en PBS] y se incubaron con IgG anti-ratón (conjugado a IR Dye-800) y IgG anti-conejo (conjugado a IR Dye-680) (LI-COR Biosciences) diluido 1:15.000 durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Después del lavado de las membranas, las proteínas inmunoreactivas se visualizaron con un sistema de detección de fluorescencia infrarroja (Odyssey, LI-COR Biosciences).

Muerte celular programada en *T. cruzi*

Purificación de amastigotas intra-cardiomiocitos

Cardiomiocitos H9c2 se utilizaron para la purificación de amastigotas intracelulares debido a una mayor eficiencia en el número de amastigotas obtenidos, necesarios en los experimento realizados posteriormente. Brevemente, los cardiomiocitos se infectaron con tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener o sobreexpresantes Fe-SODA o MPx (relación parásito:célula, 5:1)

durante 48–72 h en presencia o ausencia de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β , 25 ng/ml cada una) y/o del dador de $\cdot\text{NO}$ (NOC-18; 0,5 mM). Los amastigotas se purificaron utilizando un gradiente de densidad con Optiprep (Sigma). Brevemente, los cultivos celulares se lavaron dos veces en PBS frío (pH 7,4) y se levantaron mecánicamente con *scraper* en PBS frío conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasa (Sigma). La suspensión celular se centrifugó a 300 g durante 5 min a temperatura ambiente, y cada pellet se resuspendió en PBS frío conteniendo inhibidores de proteasa. Luego, las células se rompieron mediante pasajes por jeringa (27Gx1/2" 0.4x13 mm) y la suspensión resultante enriquecida en amastigotas se vertió lentamente sobre 1 volumen de Optiprep [16 %(v/v) en PBS] y se centrifugaron a 800 g durante 15 min. Finalmente, los amastigotas purificados (presentes en el pellet) se evaluaron mediante microscopía de campo claro y se utilizaron para las diferentes condiciones experimentales.

Fragmentación del ADN y producción de radical superóxido en amastigotas intra-cardiomiocitos

Se evaluó la fragmentación del ADN en amastigotas purificados mediante tinción de TUNEL utilizando el kit APO-BrdU TUNEL (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los parásitos con tinción de TUNEL se analizaron mediante citometría de flujo (Beckton Dickson) y los resultados se expresaron como el aumento en la población M1 en comparación con amastigotas purificados de cardiomiocitos no tratados. Simultáneamente, se evaluó la producción mitocondrial de radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ usando MitoSOX (Invitrogen). Para ello, amastigotas purificados se cargaron con MitoSOX (5 μM) durante 30 min, se lavaron tres veces en PBS y se incubaron a 37 °C en presencia o ausencia de NOC-18 (0,5 mM) durante 3 h. La oxidación de MitoSOX intraparasitaria se evaluó mediante citometría de flujo como se describió anteriormente ²⁹.

Además, se determinó la presencia de amastigotas intra-cardiomiocitos apoptóticos y la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ mediante microscopía de fluorescencia utilizando Click-iT[®] TUNEL Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen) y MitoSOX respectivamente, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se analizaron utilizando el microscopio de fluorescencia descrito previamente. El procesamiento de imágenes se realizó con el programa ImageJ 1.36B (Wayne Rasband, Institutos Nacionales de la Salud, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Inducción de la MCP en epimastigotas de *T. cruzi* tratados con H_2O_2

Epimastigotas (3×10^8 células) en la fase exponencial de crecimiento (5 días) de las cepas de *T. cruzi* CL-Brener y sobreexpresantes Fe-SODA y MPx se incubaron en PBS estéril (pH 7,4) y se expusieron a H_2O_2 (300 μ M) durante 10 min a 28 °C o suero humano fresco (SHF) ^{243,246}. Después de la incubación, los parásitos se centrifugaron a 800 g durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en PBS y/o BHI a una densidad celular de 1×10^7 células/ml. Luego se analizaron diferentes marcadores característicos de la MCP que se detallan a continuación.

Exposición de fosfatidil-serina e integridad de la membrana plasmática

Se evaluó la exposición de fosfatidil-serina (FS) y la integridad de la membrana plasmática después de 3 a 24 horas de tratamiento con H_2O_2 o SHF. Para ello, epimastigotas (1×10^6 células) se incubaron con anexina-V (AV) conjugada con Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante en presencia de yoduro de propidio (IP, 1 μ g/ml). Posteriormente, se analizaron las células mediante citometría de flujo (FACS-Calibur, Becton Dickinson).

Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN en epimastigotas se evaluó después de 24 h de exposición a H_2O_2 o SHF mediante tinción con TUNEL utilizando el kit APO-BrdU TUNEL (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se analizaron las células mediante citometría de flujo (FACS-Calibur, Becton Dickinson).

Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mm}$) se evaluó después de 3 h de tratamiento con H_2O_2 o SHF utilizando la sonda JC-1 (Invitrogen). Epimastigotas (1×10^7 células) se incubaron con JC-1 (5 μ M) durante 30 min a 28 °C y se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4). La fluorescencia verde y roja de JC-1 se evaluó mediante citometría de flujo.

Consumo de oxígeno en epimastigotas de *T. cruzi* tratados con H₂O₂

El consumo de oxígeno a nivel mitocondrial se evaluó utilizando el analizador Seahorse XF²⁴ (Agilent Technology) a 4 h post-tratamiento con H₂O₂. Las microplacas XF²⁴ se recubrieron con gelatina [2 % (m/v) en PBS] y se incubaron durante 1 h a 28 °C en una incubadora sin CO₂. Los parásitos tratados o no con H₂O₂ se resuspendieron a una densidad celular de 5 x 10⁷ epimastigotas/ml en medio DMEM modificado. Se sembraron a una densidad celular de 5 x 10⁶ epimastigotas/pocillo (100 µl) en microplacas XF²⁴ precubiertas con gelatina, se centrifugaron a 800 g durante 5 min y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. La homogeneidad de la monocapa de parásitos se comprobó mediante microscopía óptica. Cada ciclo de medición consistió en un tiempo de mezcla de 30 s con un período de adquisición de datos de 2 min. La velocidad de consumo de O₂ (QO₂) se midió antes y después de la adición de oligomicina (5 µM), FCCP (1 µM) y AA más ROT (1 µM cada una), y los diferentes parámetros se calcularon como se describió anteriormente.

Producción de radical superóxido en epimastigotes tratados con H₂O₂

Detección de 2-OH-etidio por HPLC

La producción de O₂^{•-} mitocondrial después del tratamiento con H₂O₂ se evaluó en parásitos CL-Brener y sobreexpresantes Fe-SODA a través de la detección por HPLC del producto específico 2-OH-E⁺ ²⁴⁸. Brevemente, epimastigotas (3 x 10⁸ células) se precargaron con DHE (50 µM, Invitrogen) durante 30 minutos a 28 °C y se lavaron tres veces con PBS para eliminar la sonda no incorporada. Luego se incubaron los parásitos con H₂O₂ como se describió anteriormente y, después de 3 h, las células se lisaron en Triton X-100 [0,1 % (v/v) en PBS pH 7,4] mediante pasaje por jeringa (27Gx1/2" 0,4 x 13 mm) de 100 veces. Luego, los lisados se mezclaron con 1 volumen de acetonitrilo (ACN) utilizando vórtex, y las proteínas se precipitaron durante 2 h a 4 °C. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 1 h a 4 °C, y la fase orgánica se removió y secó con un rota-evaporador (Rapid Vap, LABCONCO). Una vez secas las muestras, se resuspendieron en 20 µl de una mezcla de fase móvil [H₂O/ACN/ácido trifluoroacético (TFA); 89,9/10/0,1 %], y se analizaron 2 µl por HPLC utilizando una columna de fenil-hexilo Supelco Ascentis Express (5cm x 4,6mm; 2,7 µm; Sigma). Las muestras se

eluyeron isocráticamente con una fase móvil que contenía H₂O/ACN/TFA (64,9/35/0,1 %). Se generó el estándar 2-OH-E⁺ incubando DHE (50 μM) en buffer fosfato (50 mM, pH 7,4) durante 1 h con xantina (200 mM), xantina oxidasa (50 mU/ml) y catalasa (0,2 mg/ml) a temperatura ambiente, y la concentración se calculó utilizando el coeficiente de extinción a 470 nm ($1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como se reportó previamente^{285,286}. La concentración 2-OH-E⁺ en las diferentes condiciones experimentales se calculó utilizando una curva estándar para 2-OH-E⁺ (0–2 μM). Los productos se analizaron por HPLC con detección fluorimétrica como se describió previamente²⁴⁸.

Actividad aconitasa

Epimastigotas se trataron o no con H₂O₂ durante 10 minutos como se describió previamente. Se lavaron tres veces y se resuspendieron en PBS a la misma concentración. Después de 3 h, se obtuvo el extracto total de parásitos mediante tres ciclos de congelación y descongelación (1 min a 100 °C y 1 min en nitrógeno líquido) en 0,5 ml de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7,5; conteniendo MnCl₂ 0,6 mM y fluorocitrato 2 μM). Después de la lisis celular, las fracciones insolubles se eliminaron mediante centrifugación a 13.000 g durante 30 minutos a 4 °C. Se midió la actividad aconitasa en los sobrenadantes siguiendo la absorbancia a 240 nm en presencia de cis-aconitato (0,5 mM). La actividad se expresa como el porcentaje relativo a la condición de control (sin tratamiento con H₂O₂).

Cultivo de macrófagos e infección por *T. cruzi*

Cultivo de macrófagos

Macrófagos murinos (J774A.1, ATCC®) se cultivaron en medio DMEM suplementado con penicilina, estreptomina (100 U/ml y 100 μg/ml respectivamente), NaHCO₃ (1,8 g/L) y 10 % SFB a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO₂. Los macrófagos J774A.1 se estimularon con IFN-γ (800 U/mL, Sigma) y LPS (16 μg/mL, Sigma) durante 5 h para la inducción de la iNOS⁵⁷. La activación de la NOX2 asociada a membrana, el reclutamiento de las subunidades citosólicas y ensamblaje del complejo se induce durante el proceso de reconocimiento e internalización

de *T. cruzi* por macrófagos⁵⁵. En algunas condiciones, previo a la infección, se adicionó N^ω-Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 10 mM, Sigma) al medio de cultivo para inhibir la iNOS.

Infección a macrófagos por *T. cruzi*

Macrófagos J774A.1 (2×10^5 células) plaqueados en portaobjetos con cámaras (Lab-Tek) inmunoestimulados (IFN- γ /LPS) o no para la inducción de la iNOS se infectaron (relación parásito:célula de 2:1 o 5:1) con tripomastigotas de las cepas de *T. cruzi* salvajes (CL-Brener, C8C3*hvir*, C8C3*vir*) o los correspondientes sobreexpresantes (Fe-SODA y CPx), como se describió previamente en la sección “infección a cardiomiocitos por *T. cruzi*”. Después de 2 h, los parásitos no internalizados se eliminaron por lavado con PBS (dos veces) y las células se incubaron en DMEM suplementado durante 24–48 h a 37 °C. Las células se fijaron en una solución de PFA fresca [4 %(v/v) en PBS] durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron con PBS que contenía glicina (100 mM) y se permeabilizaron durante 5 minutos con Triton X-100 [0,1 %(v/v) en PBS]. El número de parásitos por macrófagos se determinó mediante tinción con DAPI (5 μ g/ml). Los preparados se analizaron utilizando un microscopio (Nikon Eclipse TE-200) a un aumento de 1000X, y se registraron fotografías digitales de las células infectadas. Se contaron al menos 1000 células de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como el número de amastigotas por 100 células y representan la media de tres experimentos independientes.

Infección experimental a ratones

Ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 machos de 8–12 semanas se utilizaron como modelo agudo de la enfermedad de Chagas^{234,287}. Los ratones (grupos independientes de 5) se infectaron de forma intra-peritoneal con $1-2 \times 10^7$ tripomastigotas de cultivo de las diferentes cepas salvajes de *T. cruzi* (CL-Brener, C8C3*vir* y C8C3*hvir*) y los correspondientes sobreexpresante (Fe-SODA y CPx). Las infecciones se evaluaron mediante conteo de parasitemia en sangre. Se extrajo sangre periférica (3 μ L de la vena caudal de la cola) cada día durante 7–15 días (hasta finalización del pico de parasitemia, fase aguda) y se contaron los tripomastigotas sanguíneos en cámara de Neubauer a un aumento de 400x.

Ética en el uso de animales en el laboratorio

Los ratones neonatos se proporcionaron por el bioterio DI.LA.VE—MGAP y se retiraron en el bioterio de Facultad de Medicina. Los ratones adultos se proporcionaron y se mantuvieron en el bioterio de Facultad de Medicina. Los experimentos con animales se realizaron según lo dictado por la ley uruguaya (Nº 18.611) y los protocolos para el uso de animales en el laboratorio se aprobaron por el comité de ética de la Facultad de Medicina (Exp. Nº 070153-000119-15, Exp. Nº 070153-000179-13). La manipulación de los animales se realizó por investigadores avalados de categorías A o B según la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

Análisis de los datos

Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces en días independientes. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM). El test t-Student se realizó para la comparación entre dos grupos y el ANOVA se utilizó para la comparación entre más de dos grupos. Para el análisis post hoc, se realizó el método de diferencia menos significativa. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Pato y Alfon por la paciencia, apoyo diario y principalmente por alegrar mis días. Además, a Patricia por ser una excelente compañera de vida y madre.

A mis padres, Carlos y Martha, y hermanos, Leti y Juanchi, por estar siempre presentes apoyándome en todo.

A Lu Piacenza por ser una excelente tutora y amiga, por la paciencia y dedicación a lo largo de todos estos años en los que he aprendido muchísimo y espero seguir aprendiendo durante muchos años más. Por la constante discusión de resultado y el intercambio durante la planificación de experimentos, que me han permitido ser objetivo y práctico al momento de planificar las condiciones experimentales así como a ser crítico con los resultados obtenidos.

A Rafael por la discusión de resultados y sugerencia de experimentos, los cuales han contribuido a la presentación de resultados en congresos, publicación de un artículo científico y tesis.

A Leonor Thompson, Ana Denicola y Karen Ovsejevi por aceptar participar como tribunal de la defensa de tesis de doctorado.

A Ale, Caro, Gabi y Vera, compañeras y amigas, que me han ayudado y participado en los experimentos realizados.

A Noelita por considerarme para participar en proyectos de investigación y educación bajo su dirección.

A Pao por toda la ayuda, medios, buffers, geles, etc.

A mis grandes amigos con “muchos problemas”, Adrián, Aníbal, Caro, Ale, Pao, Luli, Nati, Vale, Bea y Ceci.

A los compañeros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y CEINBIO, por las discusiones de resultados en las reuniones de grupo a partir de las cuales se han diseñado diversos experimentos.

Agradecimientos

A Mariela Santos y Martín Breijo del bioterio de la Facultad de Medicina (URBE), por la colaboración con los experimentos realizados en ratón.

A Luciana del bioterio DILAVE, por proporcionarnos los neonatos de ratón.

A Patricia Pereira, Barbara Hissa y Luciana O. Andrade de la Universidad Federal de Minas Gerais (Brasil) por la pasantía y entrenamiento en la obtención de cultivos primarios de cardiomiocitos.

A Jorge González de la Universidad de Antofagasta Chile, por habernos cedido amablemente los clones virulentos y avirulentos de la cepa C8C3.

A las agencias Financiadoras, PEDECIBA, ANII y CSIC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Chagas, C.; Chagas, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1909**, *1* (2), 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.
- (2) Antinori, S.; Galimberti, L.; Bianco, R.; Grande, R.; Galli, M.; Corbellino, M. Chagas Disease in Europe: A Review for the Internist in the Globalized World. *Eur. J. Intern. Med.* **2017**, *43*, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>.
- (3) Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M. J.; Montgomery, S. P. Trypanosoma Cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24* (4), 655–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>.
- (4) Gascon, J.; Bern, C.; Pinazo, M.-J. Chagas Disease in Spain, the United States and Other Non-Endemic Countries. *Acta Trop.* **2010**, *115* (1–2), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>.
- (5) Hernandez, S.; Flores, C. A.; Viana, G. M.; Sanchez, D. R.; Traina, M. I.; Meymandi, S. K. Autochthonous Transmission of Trypanosoma Cruzi in Southern California. *Open Forum Infect. Dis.* **2016**, *3* (4), ofw227. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw227>.
- (6) Hotez, P. J. The Rise of Neglected Tropical Diseases in the “New Texas.” *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12* (1), e0005581. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005581>.
- (7) Lidani, K. C. F.; Andrade, F. A.; Bavia, L.; Damasceno, F. S.; Beltrame, M. H.; Messias-Reason, I. J.; Sandri, T. L. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* **2019**, *7*, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.
- (8) Navarro, M.; Navaza, B.; Guionnet, A.; López-Vélez, R. Chagas Disease in Spain: Need for Further Public Health Measures. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (12), e1962. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001962>.
- (9) Organización Mundial de la Salud, O. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-tripanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-tripanosomiasis)) (accessed 2020 -11 -19).
- (10) Angheben, A.; Boix, L.; Buonfrate, D.; Gobbi, F.; Bisoffi, Z.; Pupella, S.; Gandini, G.;

Referencias Bibliográficas

- Aprili, G. Chagas Disease and Transfusion Medicine: A Perspective from Non-Endemic Countries. *Blood Transfus. Trasfus. Sangue* **2015**, *13* (4), 540–550. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>.
- (11) Buekens, P.; Cafferata, M. L.; Alger, J.; Althabe, F.; Belizán, J. M.; Bustamante, N.; Carlier, Y.; Ciganda, A.; Del Cid, J. H.; Dumonteil, E.; Gamboa-León, R.; García, J. A.; Gibbons, L.; Graiff, O.; Maldonado, J. G.; Herrera, C.; Howard, E.; Lara, L. S.; López, B.; Matute, M. L.; Ramírez-Sierra, M. J.; Robles, M. C.; Sosa-Estani, S.; Truyens, C.; Valladares, C.; Wesson, D. M.; Zúniga, C.; For The Congenital Chagas Working Group, null. Congenital Transmission of *Trypanosoma Cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An Observational Prospective Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98* (2), 478–485. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0516>.
- (12) Latzke, A. B.; Fernández, P.; Chiurchiu, C.; De la Fuente, J. L.; Caliva, S.; Bonisconti, F.; Caeiro, J. P. *Trypanosoma Cruzi*, Organ Transplant Related. *IDCases* **2017**, *10*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2017.09.001>.
- (13) Sánchez, L. V.; Ramírez, J. D. Congenital and Oral Transmission of American Trypanosomiasis: An Overview of Physiopathogenic Aspects. *Parasitology* **2013**, *140* (2), 147–159. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001394>.
- (14) Arrúa, E. C.; Seremeta, K. P.; Bedogni, G. R.; Okulik, N. B.; Salomon, C. J. Nanocarriers for Effective Delivery of Benznidazole and Nifurtimox in the Treatment of Chagas Disease: A Review. *Acta Trop.* **2019**, *198*, 105080. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105080>.
- (15) Sales Junior, P. A.; Molina, I.; Fonseca Murta, S. M.; Sánchez-Montalvá, A.; Salvador, F.; Corrêa-Oliveira, R.; Carneiro, C. M. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97* (5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>.
- (16) Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet Lond. Engl.* **2010**, *375* (9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- (17) Roscoe, A.; Tomey, M. I.; Torregrossa, G.; Galhardo, C.; Parhar, K.; Zochios, V. Chagas Cardiomyopathy: A Comprehensive Perioperative Review. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **2018**, *32* (6), 2780–2788. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2018.04.046>.
- (18) Gironès, N.; Fresno, M. Etiology of Chagas Disease Myocarditis: Autoimmunity, Parasite Persistence, or Both? *Trends Parasitol.* **2003**, *19* (1), 19–22.

[https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)00006-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)00006-5).

- (19) De Bona, E.; Lidani, K. C. F.; Bavia, L.; Omidian, Z.; Gremski, L. H.; Sandri, T. L.; de Messias Reason, I. J. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1842. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842>.
- (20) Hidron, A.; Vogenthaler, N.; Santos-Preciado, J. I.; Rodriguez-Morales, A. J.; Franco-Paredes, C.; Rassi, A. Cardiac Involvement with Parasitic Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (2), 324–349. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-09>.
- (21) Matsuda, N. M.; Miller, S. M.; Evora, P. R. B. The Chronic Gastrointestinal Manifestations of Chagas Disease. *Clin. Sao Paulo Braz.* **2009**, *64* (12), 1219–1224. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009001200013>.
- (22) da Silveira, A. B. M.; Lemos, E. M.; Adad, S. J.; Correa-Oliveira, R.; Furness, J. B.; D'Avila Reis, D. Megacolon in Chagas Disease: A Study of Inflammatory Cells, Enteric Nerves, and Glial Cells. *Hum. Pathol.* **2007**, *38* (8), 1256–1264. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.01.020>.
- (23) Ricci, M. F.; Béla, S. R.; Moraes, M. M.; Bahia, M. T.; Mazzeti, A. L.; Oliveira, A. C. S.; Andrade, L. O.; Radí, R.; Piacenza, L.; Arantes, R. M. E. Neuronal Parasitism, Early Myenteric Neurons Depopulation and Continuous Axonal Networking Damage as Underlying Mechanisms of the Experimental Intestinal Chagas' Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 583899. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.583899>.
- (24) Andrade, L. O.; Andrews, N. W. The Trypanosoma Cruzi-Host-Cell Interplay: Location, Invasion, Retention. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (10), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>.
- (25) Gazzinelli, R. T.; Oswald, I. P.; Hieny, S.; James, S. L.; Sher, A. The Microbicidal Activity of Interferon-Gamma-Treated Macrophages against Trypanosoma Cruzi Involves an L-Arginine-Dependent, Nitrogen Oxide-Mediated Mechanism Inhibitable by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-Beta. *Eur. J. Immunol.* **1992**, *22* (10), 2501–2506. <https://doi.org/10.1002/eji.1830221006>.
- (26) Nauseef, W. M. Myeloperoxidase in Human Neutrophil Host Defence. *Cell. Microbiol.* **2014**, *16* (8), 1146–1155. <https://doi.org/10.1111/cmi.12312>.
- (27) de Carvalho, T. M.; de Souza, W. Early Events Related with the Behaviour of

Referencias Bibliográficas

Trypanosoma Cruzi within an Endocytic Vacuole in Mouse Peritoneal Macrophages. *Cell Struct. Funct.* **1989**, *14* (4), 383–392. <https://doi.org/10.1247/csf.14.383>.

(28) de Souza, W.; de Carvalho, T. M. U.; Barrias, E. S. Review on Trypanosoma Cruzi: Host Cell Interaction. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, *2010*. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>.

(29) Piacenza, L.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Radi, R. Fighting the Oxidative Assault: The Trypanosoma Cruzi Journey to Infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12* (4), 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.06.011>.

(30) Barrias, E. S.; de Carvalho, T. M. U.; De Souza, W. Trypanosoma Cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 186. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00186>.

(31) Batista, M. F.; Nájera, C. A.; Meneghelli, I.; Bahia, D. The Parasitic Intracellular Lifestyle of Trypanosomatids: Parasitophorous Vacuole Development and Survival. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00396>.

(32) Nogueira, N.; Cohn, Z. Trypanosoma Cruzi: Mechanism of Entry and Intracellular Fate in Mammalian Cells. *J. Exp. Med.* **1976**, *143* (6), 1402–1420. <https://doi.org/10.1084/jem.143.6.1402>.

(33) Hall, B. F.; Webster, P.; Ma, A. K.; Joiner, K. A.; Andrews, N. W. Desialylation of Lysosomal Membrane Glycoproteins by Trypanosoma Cruzi: A Role for the Surface Neuraminidase in Facilitating Parasite Entry into the Host Cell Cytoplasm. *J. Exp. Med.* **1992**, *176* (2), 313–325. <https://doi.org/10.1084/jem.176.2.313>.

(34) Andrews, N. W.; Abrams, C. K.; Slatin, S. L.; Griffiths, G. A T. Cruzi-Secreted Protein Immunologically Related to the Complement Component C9: Evidence for Membrane Pore-Forming Activity at Low PH. *Cell* **1990**, *61* (7), 1277–1287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90692-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90692-8).

(35) Andrews, N. W.; Whitlow, M. B. Secretion by Trypanosoma Cruzi of a Hemolysin Active at Low PH. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *33* (3), 249–256. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90086-8).

(36) Ley, V.; Robbins, E. S.; Nussenzweig, V.; Andrews, N. W. The Exit of Trypanosoma Cruzi from the Phagosome Is Inhibited by Raising the PH of Acidic Compartments. *J. Exp. Med.* **1990**, *171* (2), 401–413. <https://doi.org/10.1084/jem.171.2.401>.

(37) Andrews, N. W.; Katzin, A. M.; Colli, W. Mapping of Surface Glycoproteins of

Trypanosoma Cruzi by Two-Dimensional Electrophoresis. A Correlation with the Cell Invasion Capacity. *Eur. J. Biochem.* **1984**, *140* (3), 599–604. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08144.x>.

(38) Andrade, L. O. Plasma Membrane Repair Involvement in Parasitic and Other Pathogen Infections. *Curr. Top. Membr.* **2019**, *84*, 217–238. <https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.08.002>.

(39) Andrews, N. W. Solving the Secretory Acid Sphingomyelinase Puzzle: Insights from Lysosome-Mediated Parasite Invasion and Plasma Membrane Repair. *Cell. Microbiol.* **2019**, *21* (11), e13065. <https://doi.org/10.1111/cmi.13065>.

(40) Denicola, A.; Rubbo, H.; Rodríguez, D.; Radi, R. Peroxynitrite-Mediated Cytotoxicity to Trypanosoma Cruzi. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *304* (1), 279–286. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1350>.

(41) Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18* (6), 642–660. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4827>.

(42) Alvarez, M. N.; Piacenza, L.; Irigoín, F.; Peluffo, G.; Radi, R. Macrophage-Derived Peroxynitrite Diffusion and Toxicity to Trypanosoma Cruzi. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *432* (2), 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.015>.

(43) Babior, B. M.; Kipnes, R. S.; Curnutte, J. T. Biological Defense Mechanisms. The Production by Leukocytes of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent. *J. Clin. Invest.* **1973**, *52* (3), 741–744. <https://doi.org/10.1172/JCI107236>.

(44) Dahlgren, C.; Karlsson, A. Respiratory Burst in Human Neutrophils. *J. Immunol. Methods* **1999**, *232* (1), 3–14. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00146-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00146-5).

(45) de Carvalho, T. U.; de Souza, W. Cytochemical Localization of NADH and NADPH Oxidases during Interaction of Trypanosoma Cruzi with Activated Macrophages. *Parasitol. Res.* **1987**, *73* (3), 213–217. <https://doi.org/10.1007/BF00578506>.

(46) Lowenstein, C. J.; Glatt, C. S.; Bredt, D. S.; Snyder, S. H. Cloned and Expressed Macrophage Nitric Oxide Synthase Contrasts with the Brain Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (15), 6711–6715.

(47) Lyons, C. R.; Orloff, G. J.; Cunningham, J. M. Molecular Cloning and Functional Expression of an Inducible Nitric Oxide Synthase from a Murine Macrophage Cell Line. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (9), 6370–6374.

Referencias Bibliográficas

- (48) Marletta, M. A.; Yoon, P. S.; Iyengar, R.; Leaf, C. D.; Wishnok, J. S. Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitrite and Nitrate: Nitric Oxide Is an Intermediate. *Biochemistry* **1988**, *27* (24), 8706–8711. <https://doi.org/10.1021/bi00424a003>.
- (49) Nathan, C. Nitric Oxide as a Secretory Product of Mammalian Cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1992**, *6* (12), 3051–3064.
- (50) Xie, Q. W.; Cho, H. J.; Calaycay, J.; Mumford, R. A.; Swiderek, K. M.; Lee, T. D.; Ding, A.; Trosco, T.; Nathan, C. Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science* **1992**, *256* (5054), 225–228. <https://doi.org/10.1126/science.1373522>.
- (51) Fridovich, I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>.
- (52) Sheng, Y.; Abreu, I. A.; Cabelli, D. E.; Maroney, M. J.; Miller, A.-F.; Teixeira, M.; Valentine, J. S. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (7), 3854–3918. <https://doi.org/10.1021/cr4005296>.
- (53) Bielski, B. H. J. Reevaluation of the Spectral and Kinetic Properties of HO₂ and O₂-Free Radicals. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28* (4–5), 645–649. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1978.tb06986.x>.
- (54) Martínez, A.; Prolo, C.; Estrada, D.; Rios, N.; Alvarez, M. N.; Piñeyro, M. D.; Robello, C.; Radi, R.; Piacenza, L. Cytosolic Fe-Superoxide Dismutase Safeguards Trypanosoma Cruzi from Macrophage-Derived Superoxide Radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116* (18), 8879–8888. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821487116>.
- (55) Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Piacenza, L.; Radi, R. Intraphagosomal Peroxynitrite as a Macrophage-Derived Cytotoxin against Internalized Trypanosoma Cruzi: Consequences for Oxidative Killing and Role of Microbial Peroxiredoxins in Infectivity. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (8), 6627–6640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167247>.
- (56) Piacenza, L.; Trujillo, M.; Radi, R. Reactive Species and Pathogen Antioxidant Networks during Phagocytosis. *J. Exp. Med.* **2019**, *216* (3), 501–516. <https://doi.org/10.1084/jem.20181886>.
- (57) Alvarez, M. N.; Trujillo, M.; Radi, R. Peroxynitrite Formation from Biochemical and Cellular Fluxes of Nitric Oxide and Superoxide. *Methods Enzymol.* **2002**, *359*, 353–366. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)59198-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)59198-9).

- (58) Hölscher, C.; Köhler, G.; Müller, U.; Mossmann, H.; Schaub, G. A.; Brombacher, F. Defective Nitric Oxide Effector Functions Lead to Extreme Susceptibility of Trypanosoma Cruzi-Infected Mice Deficient in Gamma Interferon Receptor or Inducible Nitric Oxide Synthase. *Infect. Immun.* **1998**, *66* (3), 1208–1215. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.3.1208-1215.1998>.
- (59) Piacenza, L.; Zago, M. P.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Basombrio, M. A.; Radi, R. Enzymes of the Antioxidant Network as Novel Determiners of Trypanosoma Cruzi Virulence. *Int. J. Parasitol.* **2009**, *39* (13), 1455–1464. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.010>.
- (60) Prolo, C.; Alvarez, M. N.; Radi, R. Peroxynitrite, a Potent Macrophage-Derived Oxidizing Cytotoxin to Combat Invading Pathogens. *BioFactors Oxf. Engl.* **2014**, *40* (2), 215–225. <https://doi.org/10.1002/biof.1150>.
- (61) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press.
- (62) Winterbourn, C. C. Reconciling the Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (5), 278–286. <https://doi.org/10.1038/nchembio.85>.
- (63) Winterbourn, C. C. Biological Chemistry of Superoxide Radicals. *ChemTexts* **2020**, *6* (1), 7. <https://doi.org/10.1007/s40828-019-0101-8>.
- (64) Fang, F. C. Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts and Controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2* (10), 820–832. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>.
- (65) Imlay, J. A. The Molecular Mechanisms and Physiological Consequences of Oxidative Stress: Lessons from a Model Bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11* (7), 443–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>.
- (66) Imlay, J. A. Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **2003**, *57*, 395–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>.
- (67) Behar, D.; Czapski, G.; Rabani, J.; Dorfman, L. M.; Schwarz, H. A. Acid Dissociation Constant and Decay Kinetics of the Perhydroxyl Radical. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74* (17), 3209–3213. <https://doi.org/10.1021/j100711a009>.
- (68) De Grey, A. D. N. J. HO₂*: The Forgotten Radical. *DNA Cell Biol.* **2002**, *21* (4), 251–257. <https://doi.org/10.1089/104454902753759672>.

Referencias Bibliográficas

- (69) Jankowski, A.; Scott, C. C.; Grinstein, S. Determinants of the Phagosomal PH in Neutrophils. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (8), 6059–6066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110059200>.
- (70) Segal, A. W.; Geisow, M.; Garcia, R.; Harper, A.; Miller, R. The Respiratory Burst of Phagocytic Cells Is Associated with a Rise in Vacuolar PH. *Nature* **1981**, *290* (5805), 406–409. <https://doi.org/10.1038/290406a0>.
- (71) Bedard, K.; Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2007**, *87* (1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.
- (72) Brand, M. D. Riding the Tiger – Physiological and Pathological Effects of Superoxide and Hydrogen Peroxide Generated in the Mitochondrial Matrix. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2020**, *55* (6), 592–661. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1828258>.
- (73) Fridovich, I. Quantitative Aspects of the Production of Superoxide Anion Radical by Milk Xanthine Oxidase. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245* (16), 4053–4057.
- (74) McCord, J. M.; Fridovich, I. The Biology and Pathology of Oxygen Radicals. *Ann. Intern. Med.* **1978**, *89* (1), 122–127. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-89-1-122>.
- (75) Murphy, M. P. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochem. J.* **2009**, *417* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- (76) Goncalves, R. L. S.; Quinlan, C. L.; Perevoshchikova, I. V.; Hey-Mogensen, M.; Brand, M. D. Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production by Muscle Mitochondria Assessed Ex Vivo under Conditions Mimicking Rest and Exercise. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (1), 209–227. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619072>.
- (77) Tahara, E. B.; Navarete, F. D. T.; Kowaltowski, A. J. Tissue-, Substrate-, and Site-Specific Characteristics of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46* (9), 1283–1297. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.008>.
- (78) Lenaz, G. The Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species: Mechanisms and Implications in Human Pathology. *IUBMB Life* **2001**, *52* (3–5), 159–164. <https://doi.org/10.1080/15216540152845957>.
- (79) Brand, M. D. The Sites and Topology of Mitochondrial Superoxide Production. *Exp. Gerontol.* **2010**, *45* (7), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>.

- (80) Robb, E. L.; Hall, A. R.; Prime, T. A.; Eaton, S.; Szibor, M.; Viscomi, C.; James, A. M.; Murphy, M. P. Control of Mitochondrial Superoxide Production by Reverse Electron Transport at Complex I. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (25), 9869–9879. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003647>.
- (81) Lambeth, J. D. NOX Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4* (3), 181–189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>.
- (82) Donkó, A.; Péterfi, Z.; Sum, A.; Leto, T.; Geiszt, M. Dual Oxidases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2005**, *360* (1464), 2301–2308. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1767>.
- (83) Nauseef, W. M. Biological Roles for the NOX Family NADPH Oxidases. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (25), 16961–16965. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700045200>.
- (84) Nauseef, W. M. Detection of Superoxide Anion and Hydrogen Peroxide Production by Cellular NADPH Oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (2), 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.040>.
- (85) Leto, T. L.; Morand, S.; Hurt, D.; Ueyama, T. Targeting and Regulation of Reactive Oxygen Species Generation by Nox Family NADPH Oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11* (10), 2607–2619. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2637>.
- (86) Sies, H.; Jones, D. P. Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21* (7), 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
- (87) Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. L.; Ross, A. B. Reactivity of HO₂/O₂ Radicals in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1985**, *14* (4), 1041–1100. <https://doi.org/10.1063/1.555739>.
- (88) Imlay, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 755–776. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055>.
- (89) Miller, A.-F. Superoxide Dismutases: Ancient Enzymes and New Insights. *FEBS Lett.* **2012**, *586* (5), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>.
- (90) Beltran-Hortelano, I.; Perez-Silanes, S.; Galiano, S. Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for Trypanosoma Cruzi: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease. *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24* (11), 1066–1138. <https://doi.org/10.2174/092986732323666161227094049>.

Referencias Bibliográficas

- (91) Olmo, F.; Urbanová, K.; Rosales, M. J.; Martín-Escolano, R.; Sánchez-Moreno, M.; Marín, C. An in Vitro Iron Superoxide Dismutase Inhibitor Decreases the Parasitemia Levels of *Trypanosoma Cruzi* in BALB/c Mouse Model during Acute Phase. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2015**, *5* (3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.05.002>.
- (92) Lah, M. S.; Dixon, M. M.; Pattridge, K. A.; Stallings, W. C.; Fee, J. A.; Ludwig, M. L. Structure-Function in *Escherichia Coli* Iron Superoxide Dismutase: Comparisons with the Manganese Enzyme from *Thermus Thermophilus*. *Biochemistry* **1995**, *34* (5), 1646–1660. <https://doi.org/10.1021/bi00005a021>.
- (93) Cabelli, D. E.; Bielski, B. H. J. Kinetics and Mechanism for the Oxidation of Ascorbic Acid/Ascorbate by HO₂/O₂- (Hydroperoxyl/Superoxide) Radicals. A Pulse Radiolysis and Stopped-Flow Photolysis Study. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87* (10), 1809–1812. <https://doi.org/10.1021/j100233a031>.
- (94) Winterbourn, C. C.; Metodiewa, D. The Reaction of Superoxide with Reduced Glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *314* (2), 284–290. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1444>.
- (95) Gardner, P. R.; Fridovich, I. Superoxide Sensitivity of the *Escherichia Coli* Aconitase. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (29), 19328–19333.
- (96) Liochev, S. I.; Fridovich, I. Fumarase C, the Stable Fumarase of *Escherichia Coli*, Is Controlled by the SoxRS Regulon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (13), 5892–5896. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.5892>.
- (97) Flint, D. H.; Tuminello, J. F.; Emptage, M. H. The Inactivation of Fe-S Cluster Containing Hydro-Lyases by Superoxide. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (30), 22369–22376.
- (98) Srinivasan, C.; Liba, A.; Imlay, J. A.; Valentine, J. S.; Gralla, E. B. Yeast Lacking Superoxide Dismutase(s) Show Elevated Levels of “Free Iron” as Measured by Whole Cell Electron Paramagnetic Resonance. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (38), 29187–29192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004239200>.
- (99) Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. Radical-Radical Reactions of Superoxide: A Potential Route to Toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305* (3), 729–736. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00810-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00810-6).
- (100) Butler, J.; Jayson, G. G.; Swallow, A. J. The Reaction between the Superoxide Anion Radical and Cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *408* (3), 215–222.

[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(75)90124-3).

- (101) Koppenol, W. H.; van Buuren, K. J.; Butler, J.; Braams, R. The Kinetics of the Reduction of Cytochrome c by the Superoxide Anion Radical. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *449* (2), 157–168. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90130-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90130-4).
- (102) Gu, M.; Imlay, J. A. Superoxide Poisons Mononuclear Iron Enzymes by Causing Mismetallation. *Mol. Microbiol.* **2013**, *89* (1), 123–134. <https://doi.org/10.1111/mmi.12263>.
- (103) Faulkner, K.; Fridovich, I. Luminol and Lucigenin as Detectors for O₂^{s-}. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15* (4), 447–451. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90044-U](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90044-U).
- (104) Zhao, H.; Joseph, J.; Fales, H. M.; Sokoloski, E. A.; Levine, R. L.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B. Detection and Characterization of the Product of Hydroethidine and Intracellular Superoxide by HPLC and Limitations of Fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102* (16), 5727–5732. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501719102>.
- (105) Benov, L.; Szejnberg, L.; Fridovich, I. Critical Evaluation of the Use of Hydroethidine as a Measure of Superoxide Anion Radical. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25* (7), 826–831. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00163-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00163-4).
- (106) Liochev, S. I.; Fridovich, I. Lucigenin (Bis-N-Methylacridinium) as a Mediator of Superoxide Anion Production. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337* (1), 115–120. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.9766>.
- (107) Zielonka, J.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B. Detection of 2-Hydroxyethidium in Cellular Systems: A Unique Marker Product of Superoxide and Hydroethidine. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (1), 8–21. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.473>.
- (108) Hardy, M.; Zielonka, J.; Karoui, H.; Sikora, A.; Michalski, R.; Podsiadły, R.; Lopez, M.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaraman, B.; Ouari, O. Detection and Characterization of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Biological Systems by Monitoring Species-Specific Products. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *28* (15), 1416–1432. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7398>.
- (109) Michalski, R.; Michalowski, B.; Sikora, A.; Zielonka, J.; Kalyanaraman, B. On the Use of Fluorescence Lifetime Imaging and Dihydroethidium to Detect Superoxide in Intact Animals and Ex Vivo Tissues: A Reassessment. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *67*, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.816>.
- (110) Winterbourn, C. C. Hydrogen Peroxide Reactivity and Specificity in Thiol-Based Cell Signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **2020**, *48* (3), 745–754.

<https://doi.org/10.1042/BST20190049>.

(111) Parascandolo, A.; Laukkanen, M. O. Carcinogenesis and Reactive Oxygen Species Signaling: Interaction of the NADPH Oxidase NOX1-5 and Superoxide Dismutase 1-3 Signal Transduction Pathways. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *30* (3), 443–486. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7268>.

(112) Sies, H. *Oxidative Stress: Eustress and Distress*; Academic Press, 2019.

(113) Brigelius-Flohé, R.; Flohé, L. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxid. Redox Signal.* **2019**, *33* (7), 498–516. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7905>.

(114) Rhee, S. G.; Kil, I. S. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 749–775. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014431>.

(115) Zeida, A.; Trujillo, M.; Ferrer-Sueta, G.; Denicola, A.; Estrin, D. A.; Radi, R. Catalysis of Peroxide Reduction by Fast Reacting Protein Thiols. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (19), 10829–10855. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00371>.

(116) Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartesaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (3), 1338–1408. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00568>.

(117) Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol. Rev.* **1979**, *59* (3), 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>.

(118) Winterbourn, C. C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. *Methods Enzymol.* **2013**, *528*, 3–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>.

(119) Bakhmutova-Albert, E. V.; Yao, H.; Denevan, D. E.; Richardson, D. E. Kinetics and Mechanism of Peroxymonocarbonate Formation. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (24), 11287–11296. <https://doi.org/10.1021/ic1007389>.

(120) Richardson, D. E.; Regino, C. A. S.; Yao, H.; Johnson, J. V. Methionine Oxidation by Peroxymonocarbonate, a Reactive Oxygen Species Formed from CO₂/Bicarbonate and Hydrogen Peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2003**, *35* (12), 1538–1550. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.08.019>.

(121) Trindade, D. F.; Cerchiaro, G.; Augusto, O. A Role for Peroxymonocarbonate in the

Stimulation of Biothiol Peroxidation by the Bicarbonate/Carbon Dioxide Pair. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19* (11), 1475–1482. <https://doi.org/10.1021/tx060146x>.

(122) Dagnell, M.; Cheng, Q.; Rizvi, S. H. M.; Pace, P. E.; Boivin, B.; Winterbourn, C. C.; Arnér, E. S. J. Bicarbonate Is Essential for Protein-Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Oxidation and Cellular Signaling through EGF-Triggered Phosphorylation Cascades. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (33), 12330–12338. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009001>.

(123) Davies, M. J.; Hawkins, C. L.; Pattison, D. I.; Rees, M. D. Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10* (7), 1199–1234. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1927>.

(124) Thomas, E. L.; Grisham, M. B.; Jefferson, M. M. Cytotoxicity of Chloramines. *Methods Enzymol.* **1986**, *132*, 585–593. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(86\)32043-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(86)32043-3).

(125) Ginsburg, I.; Kohen, R. Cell Damage in Inflammatory and Infectious Sites Might Involve a Coordinated “Cross-Talk” among Oxidants, Microbial Haemolysins and Amphiphiles, Cationic Proteins, Phospholipases, Fatty Acids, Proteinases and Cytokines (an Overview). *Free Radic. Res.* **1995**, *22* (6), 489–517. <https://doi.org/10.3109/10715769509150323>.

(126) Hurst, J. K. What Really Happens in the Neutrophil Phagosome? *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53* (3), 508–520. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.008>.

(127) von Köckritz-Blickwede, M.; Nizet, V. Innate Immunity Turned Inside-out: Antimicrobial Defense by Phagocyte Extracellular Traps. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **2009**, *87* (8), 775–783. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0481-0>.

(128) Brand, M. D. Mitochondrial Generation of Superoxide and Hydrogen Peroxide as the Source of Mitochondrial Redox Signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *100*, 14–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>.

(129) Janssen-Heininger, Y. M. W.; Mossman, B. T.; Heintz, N. H.; Forman, H. J.; Kalyanaraman, B.; Finkel, T.; Stamler, J. S.; Rhee, S. G.; van der Vliet, A. Redox-Based Regulation of Signal Transduction: Principles, Pitfalls, and Promises. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011>.

(130) Rhee, S. G.; Kang, S. W.; Jeong, W.; Chang, T.-S.; Yang, K.-S.; Woo, H. A. Intracellular Messenger Function of Hydrogen Peroxide and Its Regulation by Peroxiredoxins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17* (2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.02.004>.

(131) Sies, H.; Berndt, C.; Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 715–

748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.

(132) Zhang, L.; Wang, X.; Cueto, R.; Effi, C.; Zhang, Y.; Tan, H.; Qin, X.; Ji, Y.; Yang, X.; Wang, H. Biochemical Basis and Metabolic Interplay of Redox Regulation. *Redox Biol.* **2019**, *26*, 101284. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101284>.

(133) Buettner, G. R. Superoxide Dismutase in Redox Biology: The Roles of Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11* (4), 341–346. <https://doi.org/10.2174/187152011795677544>.

(134) Fukai, T.; Ushio-Fukai, M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *15* (6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>.

(135) Bienert, G. P.; Chaumont, F. Aquaporin-Facilitated Transmembrane Diffusion of Hydrogen Peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (5), 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>.

(136) Bertolotti, M.; Farinelli, G.; Galli, M.; Aiuti, A.; Sitia, R. AQP8 Transports NOX2-Generated H₂O₂ across the Plasma Membrane to Promote Signaling in B Cells. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *100* (5), 1071–1079. <https://doi.org/10.1189/jlb.2AB0116-045R>.

(137) Hara-Chikuma, M.; Watanabe, S.; Satooka, H. Involvement of Aquaporin-3 in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling via Hydrogen Peroxide Transport in Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *471* (4), 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.010>.

(138) Forman, H. J.; Maiorino, M.; Ursini, F. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry* **2010**, *49* (5), 835–842. <https://doi.org/10.1021/bi9020378>.

(139) Murphy, M. P.; Holmgren, A.; Larsson, N.-G.; Halliwell, B.; Chang, C. J.; Kalyanaraman, B.; Rhee, S. G.; Thornalley, P. J.; Partridge, L.; Gems, D.; Nyström, T.; Belousov, V.; Schumacker, P. T.; Winterbourn, C. C. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metab.* **2011**, *13* (4), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.010>.

(140) Sies, H. Role of Metabolic H₂O₂ Generation: Redox Signaling and Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (13), 8735–8741. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.544635>.

(141) Winterbourn, C. C. Biological Production, Detection, and Fate of Hydrogen Peroxide. *Antioxid. Redox Signal.* **2018**, *29* (6), 541–551. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7425>.

Referencias Bibliográficas

- (142) Barata, A. G.; Dick, T. P. A Role for Peroxiredoxins in H₂O₂- and MEKK-Dependent Activation of the P38 Signaling Pathway. *Redox Biol.* **2020**, *28*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101340>.
- (143) Bl, H.; M, N.; Jj, S.; T, B.; A, P.; Pm, S.; K, L.; A, S.; B, P.; B, Y.; D, D.; O, B.; K, N.; S, O.; D, Y.; M, G. R.; R, K.-F.; Ca, N. A Peroxidase Peroxiredoxin 1-Specific Redox Regulation of the Novel FOXO3 microRNA Target let-7 <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28398822/> (accessed 2021 -01 -30). <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6871>.
- (144) Sobotta, M. C.; Liou, W.; Stöcker, S.; Talwar, D.; Oehler, M.; Ruppert, T.; Scharf, A. N. D.; Dick, T. P. Peroxiredoxin-2 and STAT3 Form a Redox Relay for H₂O₂ Signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (1), 64–70. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1695>.
- (145) Brigelius-Flohé, R.; Flohé, L. Selenium and Redox Signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *617*, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.08.003>.
- (146) Kaya, A.; Lee, B. C.; Gladyshev, V. N. Regulation of Protein Function by Reversible Methionine Oxidation and the Role of Selenoprotein MsrB1. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *23* (10), 814–822. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6385>.
- (147) Poli, G.; Leonarduzzi, G.; Biasi, F.; Chiarpotto, E. Oxidative Stress and Cell Signalling. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11* (9), 1163–1182. <https://doi.org/10.2174/0929867043365323>.
- (148) Santos, C. X. C.; Hafstad, A. D.; Beretta, M.; Zhang, M.; Molenaar, C.; Kopec, J.; Fotinou, D.; Murray, T. V.; Cobb, A. M.; Martin, D.; Zeh Silva, M.; Anilkumar, N.; Schröder, K.; Shanahan, C. M.; Brewer, A. C.; Brandes, R. P.; Blanc, E.; Parsons, M.; Belousov, V.; Cammack, R.; Hider, R. C.; Steiner, R. A.; Shah, A. M. Targeted Redox Inhibition of Protein Phosphatase 1 by Nox4 Regulates EIF2 α -Mediated Stress Signaling. *EMBO J.* **2016**, *35* (3), 319–334. <https://doi.org/10.15252/embj.201592394>.
- (149) Bartberger, M. D.; Liu, W.; Ford, E.; Miranda, K. M.; Switzer, C.; Fukuto, J. M.; Farmer, P. J.; Wink, D. A.; Houk, K. N. The Reduction Potential of Nitric Oxide (NO) and Its Importance to NO Biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (17), 10958–10963. <https://doi.org/10.1073/pnas.162095599>.
- (150) Radi, R. Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (23), 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>.

Referencias Bibliográficas

- (151) Bredt, D. S.; Snyder, S. H. Isolation of Nitric Oxide Synthetase, a Calmodulin-Requiring Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (2), 682–685. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.2.682>.
- (152) Lamas, S.; Marsden, P. A.; Li, G. K.; Tempst, P.; Michel, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase: Molecular Cloning and Characterization of a Distinct Constitutive Enzyme Isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (14), 6348–6352.
- (153) Knowles, R. G.; Moncada, S. Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J.* **1994**, *298* (Pt 2), 249–258. <https://doi.org/10.1042/bj2980249>.
- (154) Campbell, M. G.; Smith, B. C.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Marletta, M. A. Molecular Architecture of Mammalian Nitric Oxide Synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (35), E3614–E3623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413763111>.
- (155) Lee, M.; Rey, K.; Besler, K.; Wang, C.; Choy, J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results Probl. Cell Differ.* **2017**, *62*, 181–207. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_8.
- (156) PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87* (1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>.
- (157) Brookes, P. S.; Bolaños, J. P.; Heales, S. J. The Assumption That Nitric Oxide Inhibits Mitochondrial ATP Synthesis Is Correct. *FEBS Lett.* **1999**, *446* (2–3), 261–263. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00217-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00217-3).
- (158) Cleeter, M. W.; Cooper, J. M.; Darley-Usmar, V. M.; Moncada, S.; Schapira, A. H. Reversible Inhibition of Cytochrome c Oxidase, the Terminal Enzyme of the Mitochondrial Respiratory Chain, by Nitric Oxide. Implications for Neurodegenerative Diseases. *FEBS Lett.* **1994**, *345* (1), 50–54. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00424-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00424-2).
- (159) Shiva, S.; Brookes, P. S.; Patel, R. P.; Anderson, P. G.; Darley-Usmar, V. M. Nitric Oxide Partitioning into Mitochondrial Membranes and the Control of Respiration at Cytochrome c Oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (13), 7212–7217. <https://doi.org/10.1073/pnas.131128898>.
- (160) Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-Dependent Lipid Peroxidation. Formation of Novel Nitrogen-Containing Oxidized Lipid Derivatives. *J. Biol.*

Chem. **1994**, *269* (42), 26066–26075.

(161) Padmaja, S.; Huie, R. E. The Reaction of Nitric Oxide with Organic Peroxyl Radicals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195* (2), 539–544. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2079>.

(162) Eiserich, J. P.; Butler, J.; van der Vliet, A.; Cross, C. E.; Halliwell, B. Nitric Oxide Rapidly Scavenges Tyrosine and Tryptophan Radicals. *Biochem. J.* **1995**, *310* (Pt 3), 745–749. <https://doi.org/10.1042/bj3100745>.

(163) Kissner, R.; Nauser, T.; Bugnon, P.; Lye, P. G.; Koppenol, W. H. Formation and Properties of Peroxynitrite as Studied by Laser Flash Photolysis, High-Pressure Stopped-Flow Technique, and Pulse Radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10* (11), 1285–1292. <https://doi.org/10.1021/tx970160x>.

(164) Madej, E.; Folkes, L. K.; Wardman, P.; Czapski, G.; Goldstein, S. Thiyl Radicals React with Nitric Oxide to Form S-Nitrosothiols with Rate Constants near the Diffusion-Controlled Limit. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44* (12), 2013–2018. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.02.015>.

(165) Botti, H.; Möller, M. N.; Steinmann, D.; Nauser, T.; Koppenol, W. H.; Denicola, A.; Radi, R. Distance-Dependent Diffusion-Controlled Reaction of •NO and O₂•- at Chemical Equilibrium with ONOO-. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (49), 16584–16593. <https://doi.org/10.1021/jp105606b>.

(166) Goldstein, S.; Czapski, G. The Reaction of NO. with O₂.- and HO₂.: A Pulse Radiolysis Study. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *19* (4), 505–510. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)00034-u](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)00034-u).

(167) Huie, R. E.; Padmaja, S. The Reaction of No With Superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **1993**, *18* (4), 195–199. <https://doi.org/10.3109/10715769309145868>.

(168) Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (4), 1620–1624. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.4.1620>.

(169) Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4* (3), 161–177. <https://doi.org/10.1021/cb800279q>.

(170) Radi, R.; Beckman, J. S.; Bush, K. M.; Freeman, B. A. Peroxynitrite Oxidation of

Sulfhydryls. The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (7), 4244–4250.

(171) Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R. Peroxynitrite: Biochemistry, Pathophysiology and Development of Therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (8), 662–680. <https://doi.org/10.1038/nrd2222>.

(172) van der Loo, B.; Labugger, R.; Skepper, J. N.; Bachschmid, M.; Kilo, J.; Powell, J. M.; Palacios-Callender, M.; Erusalimsky, J. D.; Quaschnig, T.; Malinski, T.; Gygi, D.; Ullrich, V.; Lüscher, T. F. Enhanced Peroxynitrite Formation Is Associated with Vascular Aging. *J. Exp. Med.* **2000**, *192* (12), 1731–1744. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>.

(173) Viner, R. I.; Ferrington, D. A.; Williams, T. D.; Bigelow, D. J.; Schöneich, C. Protein Modification during Biological Aging: Selective Tyrosine Nitration of the SERCA2a Isoform of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Skeletal Muscle. *Biochem. J.* **1999**, *340* (Pt 3), 657–669.

(174) Brown, G. C. Regulation of Mitochondrial Respiration by Nitric Oxide Inhibition of Cytochrome c Oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1504* (1), 46–57. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(00\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(00)00238-3).

(175) Radi, R.; Rodriguez, M.; Castro, L.; Telleri, R. Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *308* (1), 89–95. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1013>.

(176) Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Martínez, A.; Radi, R. Trypanosoma Cruzi Antioxidant Enzymes as Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19* (7), 723–734. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4618>.

(177) Bartesaghi, S.; Herrera, D.; Martinez, D. M.; Petruk, A.; Demicheli, V.; Trujillo, M.; Martí, M. A.; Estrín, D. A.; Radi, R. Tyrosine Oxidation and Nitration in Transmembrane Peptides Is Connected to Lipid Peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *622*, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.04.006>.

(178) Augusto, O.; Goldstein, S.; Hurst, J. K.; Lind, J.; Lyman, S. V.; Merenyi, G.; Radi, R. Carbon Dioxide-Catalyzed Peroxynitrite Reactivity - The Resilience of the Radical Mechanism after Two Decades of Research. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *135*, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.026>.

(179) Schöpfer, F.; Riobó, N.; Carreras, M. C.; Alvarez, B.; Radi, R.; Boveris, A.; Cadenas,

E.; Poderoso, J. J. Oxidation of Ubiquinol by Peroxynitrite: Implications for Protection of Mitochondria against Nitrosative Damage. *Biochem. J.* **2000**, *349* (Pt 1), 35–42. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3490035>.

(180) Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Folkes, L.; Wardman, P.; Radi, R. Reaction of the Carbonate Radical with the Spin-Trap 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline-N-Oxide in Chemical and Cellular Systems: Pulse Radiolysis, Electron Paramagnetic Resonance, and Kinetic-Competition Studies. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43* (11), 1523–1533. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.08.002>.

(181) Trujillo, M.; Budde, H.; Piñeyro, M. D.; Stehr, M.; Robello, C.; Flohé, L.; Radi, R. Trypanosoma Brucei and Trypanosoma Cruzi Tryparedoxin Peroxidases Catalytically Detoxify Peroxynitrite via Oxidation of Fast Reacting Thiols. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (33), 34175–34182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404317200>.

(182) Alegria, T. G. P.; Meireles, D. A.; Cussioli, J. R. R.; Hugo, M.; Trujillo, M.; de Oliveira, M. A.; Miyamoto, S.; Queiroz, R. F.; Valadares, N. F.; Garratt, R. C.; Radi, R.; Di Mascio, P.; Augusto, O.; Netto, L. E. S. Ohr Plays a Central Role in Bacterial Responses against Fatty Acid Hydroperoxides and Peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (2), E132–E141. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619659114>.

(183) Demicheli, V.; Quijano, C.; Alvarez, B.; Radi, R. Inactivation and Nitration of Human Superoxide Dismutase (SOD) by Fluxes of Nitric Oxide and Superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42* (9), 1359–1368. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.034>.

(184) Martinez, A.; Peluffo, G.; Petruk, A. A.; Hugo, M.; Piñeyro, D.; Demicheli, V.; Moreno, D. M.; Lima, A.; Batthyány, C.; Durán, R.; Robello, C.; Martí, M. A.; Larrioux, N.; Buschiazio, A.; Trujillo, M.; Radi, R.; Piacenza, L. Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-Mediated Nitration and Inactivation of Trypanosoma Cruzi Iron-Superoxide Dismutases (Fe-SODs) A and B: Disparate Susceptibilities Due to the Repair of Tyr35 Radical by Cys83 in Fe-SODB through Intramolecular Electron Transfer. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (18), 12760–12778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545590>.

(185) Quijano, C.; Hernandez-Saavedra, D.; Castro, L.; McCord, J. M.; Freeman, B. A.; Radi, R. Reaction of Peroxynitrite with Mn-Superoxide Dismutase. Role of the Metal Center in Decomposition Kinetics and Nitration. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (15), 11631–11638. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009429200>.

(186) Cm, C.; Tg, M.; Lr, G.; Fo, O.; Dt, N.; M, N. S. L.; L, M.; Mc, P. Current understanding

Referencias Bibliográficas

of the Trypanosoma cruzi-cardiomyocyte interaction
<http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23115558/> (accessed 2020-12-08).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00327>.

(187) Cruz, J. S.; Machado, F. S.; Ropert, C.; Roman-Campos, D. Molecular Mechanisms of Cardiac Electromechanical Remodeling during Chagas Disease: Role of TNF and TGF- β . *Trends Cardiovasc. Med.* **2017**, *27* (2), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.08.003>.

(188) Roman-Campos, D.; Sales-Junior, P.; Duarte, H. L.; Gomes, E. R.; Lara, A.; Campos, P.; Rocha, N. N.; Resende, R. R.; Ferreira, A.; Guatimosim, S.; Gazzinelli, R. T.; Ropert, C.; Cruz, J. S. Novel Insights into the Development of Chagasic Cardiomyopathy: Role of PI3Kinase/NO Axis. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *167* (6), 3011–3020. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.09.020>.

(189) Wen, J. J.; Porter, C.; Garg, N. J. Inhibition of NFE2L2-Antioxidant Response Element Pathway by Mitochondrial Reactive Oxygen Species Contributes to Development of Cardiomyopathy and Left Ventricular Dysfunction in Chagas Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2017**, *27* (9), 550–566. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6831>.

(190) Ba, X.; Gupta, S.; Davidson, M.; Garg, N. J. Trypanosoma Cruzi Induces the Reactive Oxygen Species-PARP-1-RelA Pathway for up-Regulation of Cytokine Expression in Cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (15), 11596–11606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.076984>.

(191) Chandrasekar, B.; Melby, P. C.; Troyer, D. A.; Colston, J. T.; Freeman, G. L. Temporal Expression of Pro-Inflammatory Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase in Experimental Acute Chagasic Cardiomyopathy. *Am. J. Pathol.* **1998**, *152* (4), 925–934.

(192) Machado, F. S.; Souto, J. T.; Rossi, M. A.; Esper, L.; Tanowitz, H. B.; Aliberti, J.; Silva, J. S. Nitric Oxide Synthase-2 Modulates Chemokine Production by Trypanosoma Cruzi-Infected Cardiac Myocytes. *Microbes Infect.* **2008**, *10* (14–15), 1558–1566. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.09.009>.

(193) Machado Fabiana S.; Martins Gislaine A.; Aliberti Júlio C. S.; Mestriner Fabiola L. A. C.; Cunha Fernando Q.; Silva João S. Trypanosoma Cruzi-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity. *Circulation* **2000**, *102* (24), 3003–3008. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3003>.

(194) Durand, J. L.; Mukherjee, S.; Commodari, F.; De Souza, A. P.; Zhao, D.; Machado, F. S.; Tanowitz, H. B.; Jelicks, L. A. Role of NO Synthase in the Development of Trypanosoma

Cruzi-Induced Cardiomyopathy in Mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *80* (5), 782–787.

(195) Michailowsky, V.; Silva, N. M.; Rocha, C. D.; Vieira, L. Q.; Lannes-Vieira, J.; Gazzinelli, R. T. Pivotal Role of Interleukin-12 and Interferon-Gamma Axis in Controlling Tissue Parasitism and Inflammation in the Heart and Central Nervous System during *Trypanosoma Cruzi* Infection. *Am. J. Pathol.* **2001**, *159* (5), 1723–1733. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63019-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63019-2).

(196) Radi, R.; Cassina, A.; Hodara, R. Nitric Oxide and Peroxynitrite Interactions with Mitochondria. *Biol. Chem.* **2002**, *383* (3–4), 401–409. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.044>.

(197) Dhiman, M.; Nakayasu, E. S.; Madaiah, Y. H.; Reynolds, B. K.; Wen, J.-J.; Almeida, I. C.; Garg, N. J. Enhanced Nitrosative Stress during *Trypanosoma Cruzi* Infection Causes Nitrotyrosine Modification of Host Proteins: Implications in Chagas' Disease. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173* (3), 728–740. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080047>.

(198) Dhiman, M.; Zago, M. P.; Nunez, S.; Amoroso, A.; Rementería, H.; Dousset, P.; Nunez Burgos, F.; Garg, N. J. Cardiac-Oxidized Antigens Are Targets of Immune Recognition by Antibodies and Potential Molecular Determinants in Chagas Disease Pathogenesis. *PLoS One* **2012**, *7* (1), e28449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028449>.

(199) Naviliat, M.; Gualco, G.; Cayota, A.; Radi, R. Protein 3-Nitrotyrosine Formation during *Trypanosoma Cruzi* Infection in Mice. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **2005**, *38* (12), 1825–1834. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005001200011>.

(200) Dhiman, M.; Estrada-Franco, J. G.; Pando, J. M.; Ramirez-Aguilar, F. J.; Spratt, H.; Vazquez-Corzo, S.; Perez-Molina, G.; Gallegos-Sandoval, R.; Moreno, R.; Garg, N. J. Increased Myeloperoxidase Activity and Protein Nitration Are Indicators of Inflammation in Patients with Chagas' Disease. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **2009**, *16* (5), 660–666. <https://doi.org/10.1128/CVI.00019-09>.

(201) Gupta, S.; Bhatia, V.; Wen, J.; Wu, Y.; Huang, M.-H.; Garg, N. J. *Trypanosoma Cruzi* Infection Disturbs Mitochondrial Membrane Potential and ROS Production Rate in Cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47* (10), 1414–1421. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.008>.

(202) Wen, J. J.; Garg, N. J. Manganese Superoxide Dismutase Deficiency Exacerbates the Mitochondrial ROS Production and Oxidative Damage in Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12* (7), e0006687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006687>.

Referencias Bibliográficas

- (203) Wen, J. J.; Yin, Y. W.; Garg, N. J. PARP1 Depletion Improves Mitochondrial and Heart Function in Chagas Disease: Effects on POLG Dependent MtDNA Maintenance. *PLoS Pathog.* **2018**, *14* (5), e1007065. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007065>.
- (204) Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. The Multifaceted Roles of PARP1 in DNA Repair and Chromatin Remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (10), 610–621. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53>.
- (205) Libisch, M. G.; Faral-Tello, P.; Garg, N. J.; Radi, R.; Piacenza, L.; Robello, C. Early Trypanosoma Cruzi Infection Triggers MTORC1-Mediated Respiration Increase and Mitochondrial Biogenesis in Human Primary Cardiomyocytes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01889>.
- (206) Brown, S. P.; Cornforth, D. M.; Mideo, N. Evolution of Virulence in Opportunistic Pathogens: Generalism, Plasticity, and Control. *Trends Microbiol.* **2012**, *20* (7), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>.
- (207) Casadevall, A.; Pirofski, L. Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184* (3), 337–344. <https://doi.org/10.1086/322044>.
- (208) Coelho, C.; Bocca, A. L.; Casadevall, A. The Tools for Virulence of Cryptococcus Neoformans. *Adv. Appl. Microbiol.* **2014**, *87*, 1–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800261-2.00001-3>.
- (209) Arias, D. G.; Cabeza, M. S.; Erben, E. D.; Carranza, P. G.; Lujan, H. D.; Téllez Iñón, M. T.; Iglesias, A. A.; Guerrero, S. A. Functional Characterization of Methionine Sulfoxide Reductase A from Trypanosoma Spp. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50* (1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.695>.
- (210) Vieira, G. A. L.; Silva, M. T. A. da; Regasini, L. O.; Cotinguiba, F.; Laure, H. J.; Rosa, J. C.; Furlan, M.; Cicarelli, R. M. B. Trypanosoma Cruzi: Analysis of Two Different Strains after Piplartine Treatment. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* **2018**, *22* (3), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.009>.
- (211) Passos-Silva, D. G.; Rajão, M. A.; Nascimento de Aguiar, P. H.; Vieira-da-Rocha, J. P.; Machado, C. R.; Furtado, C. Overview of DNA Repair in Trypanosoma cruzi, Trypanosoma brucei, and Leishmania major <https://www.hindawi.com/journals/jna/2010/840768/> (accessed 2020 -11 -25). <https://doi.org/10.4061/2010/840768>.
- (212) Rajão, M. A.; Furtado, C.; Alves, C. L.; Passos-Silva, D. G.; Moura, M. B. de;

[https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00285-7](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00285-7).

(218) Maya, J. D.; Repetto, Y.; Agosín, M.; Ojeda, J. M.; Tellez, R.; Gaule, C.; Morello, A. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon Glutathione and Trypanothione Content in Epimastigote, Trypomastigote and Amastigote Forms of *Trypanosoma Cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1997**, *86* (1), 101–106.

(219) Flohé, L. The Trypanothione System and Its Implications in the Therapy of Trypanosomatid Diseases. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **2012**, *302* (4–5), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.008>.

(220) Irigoín, F.; Cibils, L.; Comini, M.; Wilkinson, S.; Flohé, L.; Radi, R. Insights into the Redox Biology of *Trypanosoma Cruzi*: Trypanothione Metabolism and Oxidant Detoxification. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *45* (6), 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.028>.

(221) Fairlamb, A. H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T.; Cerami, A. Trypanothione: A Novel Bis(Glutathionyl)Spermidine Cofactor for Glutathione Reductase in Trypanosomatids. *Science* **1985**, *227* (4693), 1485–1487. <https://doi.org/10.1126/science.3883489>.

(222) Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S.; Fairlamb, A. H. A Single Enzyme Catalyses Formation of Trypanothione from Glutathione and Spermidine in *Trypanosoma Cruzi*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (39), 35853–35861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204403200>.

(223) El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Blandin, G.; Berriman, M.; Crabtree, J.; Aggarwal, G.; Caler, E.; Renauld, H.; Worthey, E. A.; Hertz-Fowler, C.; Ghedin, E.; Peacock, C.; Bartholomeu, D. C.; Haas, B. J.; Tran, A.-N.; Wortman, J. R.; Alsmark, U. C. M.; Angiuoli, S.; Anupama, A.; Badger, J.; Bringaud, F.; Cadag, E.; Carlton, J. M.; Cerqueira, G. C.; Creasy, T.; Delcher, A. L.; Djikeng, A.; Embley, T. M.; Hauser, C.; Ivens, A. C.; Kummerfeld, S. K.; Pereira-Leal, J. B.; Nilsson, D.; Peterson, J.; Salzberg, S. L.; Shallom, J.; Silva, J. C.; Sundaram, J.; Westenberger, S.; White, O.; Melville, S. E.; Donelson, J. E.; Andersson, B.; Stuart, K. D.; Hall, N. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* **2005**, *309* (5733), 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.1112181>.

(224) Moutiez, M.; Meziane-Cherif, D.; Aumercier, M.; Sergheraert, C.; Tartar, A. Compared Reactivities of Trypanothione and Glutathione in Conjugation Reactions. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1994**, *42* (12), 2641–2644. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.2641>.

(225) Hugo, M.; Trujillo, M.; Piacenza, L.; Radi, R. Trypanothione Functions in

Kinetoplastida. In *Glutathione*; CRC Press, 2018.

(226) Manta, B.; Comini, M.; Medeiros, A.; Hugo, M.; Trujillo, M.; Radi, R. Trypanothione: A Unique Bis-Glutathionyl Derivative in Trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2013**, *1830* (5), 3199–3216. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.013>.

(227) Atwood, J. A.; Weatherly, D. B.; Minning, T. A.; Bundy, B.; Cavola, C.; Opperdoes, F. R.; Orlando, R.; Tarleton, R. L. The Trypanosoma Cruzi Proteome. *Science* **2005**, *309* (5733), 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1110289>.

(228) Piacenza, L.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Kelly, J. M.; Wilkinson, S. R.; Radi, R. Peroxiredoxins Play a Major Role in Protecting Trypanosoma Cruzi against Macrophage- and Endogenously-Derived Peroxynitrite. *Biochem. J.* **2008**, *410* (2), 359–368. <https://doi.org/10.1042/BJ20071138>.

(229) Arias, D. G.; Piñeyro, M. D.; Iglesias, A. A.; Guerrero, S. A.; Robello, C. Molecular Characterization and Interactome Analysis of Trypanosoma Cruzi Tryparedoxin II. *J. Proteomics* **2015**, *120*, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.001>.

(230) Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Kelly, J. M. Biochemical Characterization of a Trypanosome Enzyme with Glutathione-Dependent Peroxidase Activity. *Biochem. J.* **2000**, *352* (Pt 3), 755–761.

(231) Wilkinson, S. R.; Kelly, J. M. The Role of Glutathione Peroxidases in Trypanosomatids. *Biol. Chem.* **2003**, *384* (4), 517–525. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.060>.

(232) Wilkinson, S. R.; Meyer, D. J.; Taylor, M. C.; Bromley, E. V.; Miles, M. A.; Kelly, J. M. The Trypanosoma Cruzi Enzyme TcGPXI Is a Glycosomal Peroxidase and Can Be Linked to Trypanothione Reduction by Glutathione or Tryparedoxin. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (19), 17062–17071. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111126200>.

(233) Wilkinson, S. R.; Taylor, M. C.; Touitha, S.; Mauricio, I. L.; Meyer, D. J.; Kelly, J. M. TcGPXII, a Glutathione-Dependent Trypanosoma Cruzi Peroxidase with Substrate Specificity Restricted to Fatty Acid and Phospholipid Hydroperoxides, Is Localized to the Endoplasmic Reticulum. *Biochem. J.* **2002**, *364* (Pt 3), 787–794. <https://doi.org/10.1042/BJ20020038>.

(234) Hugo, M.; Martínez, A.; Trujillo, M.; Estrada, D.; Mastrogiovanni, M.; Linares, E.; Augusto, O.; Issoglio, F.; Zeida, A.; Estrín, D. A.; Heijnen, H. F. G.; Piacenza, L.; Radi, R. Kinetics, Subcellular Localization, and Contribution to Parasite Virulence of a Trypanosoma Cruzi Hybrid Type A Heme Peroxidase (TcAPx-CcP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*

Referencias Bibliográficas

- (8), E1326–E1335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618611114>.
- (235) Wilkinson, S. R.; Obado, S. O.; Mauricio, I. L.; Kelly, J. M. Trypanosoma Cruzi Expresses a Plant-like Ascorbate-Dependent Hemoperoxidase Localized to the Endoplasmic Reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (21), 13453–13458. <https://doi.org/10.1073/pnas.202422899>.
- (236) Taylor, M. C.; Lewis, M. D.; Fortes Francisco, A.; Wilkinson, S. R.; Kelly, J. M. The Trypanosoma Cruzi Vitamin C Dependent Peroxidase Confers Protection against Oxidative Stress but Is Not a Determinant of Virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9* (4), e0003707. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003707>.
- (237) Piñeyro, M. D.; Arcari, T.; Robello, C.; Radi, R.; Trujillo, M. Tryparedoxin Peroxidases from Trypanosoma Cruzi: High Efficiency in the Catalytic Elimination of Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507* (2), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.014>.
- (238) Wilkinson, S. R.; Temperton, N. J.; Mondragon, A.; Kelly, J. M. Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-Dependent Peroxide Metabolism in Trypanosoma Cruzi. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (11), 8220–8225. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8220>.
- (239) Zago, M. P.; Hosakote, Y. M.; Koo, S.-J.; Dhiman, M.; Piñeyro, M. D.; Parodi-Talice, A.; Basombrio, M. A.; Robello, C.; Garg, N. J. TcI Isolates of Trypanosoma Cruzi Exploit the Antioxidant Network for Enhanced Intracellular Survival in Macrophages and Virulence in Mice. *Infect. Immun.* **2016**, *84* (6), 1842–1856. <https://doi.org/10.1128/IAI.00193-16>.
- (240) Piñeyro, M. D.; Parodi-Talice, A.; Arcari, T.; Robello, C. Peroxiredoxins from Trypanosoma Cruzi: Virulence Factors and Drug Targets for Treatment of Chagas Disease? *Gene* **2008**, *408* (1–2), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.014>.
- (241) Mateo, H.; Sánchez-Moreno, M.; Marín, C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Purified Trypanosoma Cruzi Excreted Superoxide Dismutase. *Clin. Biochem.* **2010**, *43* (15), 1257–1264. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.015>.
- (242) Estrada, D.; Specker, G.; Martínez, A.; Dias, P. P.; Hissa, B.; Andrade, L. O.; Radi, R.; Piacenza, L. Cardiomyocyte Diffusible Redox Mediators Control Trypanosoma Cruzi Infection: Role of Parasite Mitochondrial Iron Superoxide Dismutase. *Biochem. J.* **2018**, *475* (7), 1235–1251. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170698>.

Referencias Bibliográficas

- (243) Piacenza, L.; Irigoín, F.; Alvarez, M. N.; Peluffo, G.; Taylor, M. C.; Kelly, J. M.; Wilkinson, S. R.; Radi, R. Mitochondrial Superoxide Radicals Mediate Programmed Cell Death in *Trypanosoma Cruzi*: Cytoprotective Action of Mitochondrial Iron Superoxide Dismutase Overexpression. *Biochem. J.* **2007**, *403* (Pt 2), 323–334. <https://doi.org/10.1042/BJ20061281>.
- (244) Irigoín, F.; Inada, N. M.; Fernandes, M. P.; Piacenza, L.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E.; Radi, R. Mitochondrial Calcium Overload Triggers Complement-Dependent Superoxide-Mediated Programmed Cell Death in *Trypanosoma Cruzi*. *Biochem. J.* **2009**, *418* (3), 595–604. <https://doi.org/10.1042/BJ20081981>.
- (245) Brand, M. D.; Nicholls, D. G. Assessing Mitochondrial Dysfunction in Cells. *Biochem. J.* **2011**, *435* (2), 297–312. <https://doi.org/10.1042/BJ20110162>.
- (246) Vilchez Larrea, S. C.; Alonso, G. D.; Schlesinger, M.; Torres, H. N.; Flawiá, M. M.; Fernández Villamil, S. H. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Plays a Differential Role in DNA Damage-Response and Cell Death Pathways in *Trypanosoma Cruzi*. *Int. J. Parasitol.* **2011**, *41* (3–4), 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.11.008>.
- (247) Shah-Simpson, S.; Pereira, C. F. A.; Dumoulin, P. C.; Caradonna, K. L.; Burleigh, B. A. Bioenergetic Profiling of *Trypanosoma Cruzi* Life Stages Using Seahorse Extracellular Flux Technology. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2016**, *208* (2), 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.07.001>.
- (248) Zielonka, J.; Zielonka, M.; VerPlank, L.; Cheng, G.; Hardy, M.; Ouari, O.; Ayhan, M. M.; Podsiadły, R.; Sikora, A.; Lambeth, J. D.; Kalyanaraman, B. Mitigation of NADPH Oxidase 2 Activity as a Strategy to Inhibit Peroxynitrite Formation. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (13), 7029–7044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702787>.
- (249) Balouz, V.; Bracco, L.; Ricci, A. D.; Romer, G.; Agüero, F.; Buscaglia, C. A. Serological Approaches for *Trypanosoma Cruzi* Strain Typing. *Trends Parasitol.* **2021**, *37* (3), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.12.002>.
- (250) Lima, L.; Espinosa-Álvarez, O.; Ortiz, P. A.; Trejo-Varón, J. A.; Carranza, J. C.; Pinto, C. M.; Serrano, M. G.; Buck, G. A.; Camargo, E. P.; Teixeira, M. M. G. Genetic Diversity of *Trypanosoma Cruzi* in Bats, and Multilocus Phylogenetic and Phylogeographical Analyses Supporting Tcbat as an Independent DTU (Discrete Typing Unit). *Acta Trop.* **2015**, *151*, 166–177. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>.
- (251) Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.;

Referencias Bibliográficas

- Sturm, N. R. The Revised *Trypanosoma Cruzi* Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological Relevance and Research Applications. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2012**, *12* (2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.
- (252) de Souza, E. M.; Araújo-Jorge, T. C.; Bailly, C.; Lansiaux, A.; Batista, M. M.; Oliveira, G. M.; Soeiro, M. N. C. Host and Parasite Apoptosis Following *Trypanosoma Cruzi* Infection in in Vitro and in Vivo Models. *Cell Tissue Res.* **2003**, *314* (2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0782-5>.
- (253) Kierszenbaum, F.; Knecht, E.; Budzko, D. B.; Pizzimenti, M. C. Phagocytosis: A Defense Mechanism against Infection with *Trypanosoma Cruzi*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1974**, *112* (5), 1839–1844.
- (254) Wanderley, J. L. M.; DaMatta, R. A.; Barcinski, M. A. Apoptotic Mimicry as a Strategy for the Establishment of Parasitic Infections: Parasite- and Host-Derived Phosphatidylserine as Key Molecule. *Cell Commun. Signal. CCS* **2020**, *18* (1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0482-8>.
- (255) de Freitas Balanco, J. M.; Moreira, M. E.; Bonomo, A.; Bozza, P. T.; Amarante-Mendes, G.; Pirmez, C.; Barcinski, M. A. Apoptotic Mimicry by an Obligate Intracellular Parasite Downregulates Macrophage Microbicidal Activity. *Curr. Biol. CB* **2001**, *11* (23), 1870–1873. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00563-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00563-2).
- (256) Zhang, X.; Goncalves, R.; Mosser, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* **2008**, *Chapter 14*, Unit 14.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>.
- (257) Manque, P. A.; Probst, C.; Pereira, M. C. S.; Rampazzo, R. C. P.; Ozaki, L. S.; Pavoni, D. P.; Neto, D. T. S.; Carvalho, M. R.; Xu, P.; Serrano, M. G.; Alves, J. M. P.; Meirelles, M. de N. S. L.; Goldenberg, S.; Krieger, M. A.; Buck, G. A. *Trypanosoma Cruzi* Infection Induces a Global Host Cell Response in Cardiomyocytes. *Infect. Immun.* **2011**, *79* (5), 1855–1862. <https://doi.org/10.1128/IAI.00643-10>.
- (258) Kuroda, J.; Ago, T.; Matsushima, S.; Zhai, P.; Schneider, M. D.; Sadoshima, J. NADPH Oxidase 4 (Nox4) Is a Major Source of Oxidative Stress in the Failing Heart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (35), 15565–15570. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002178107>.
- (259) Moe, K. T.; Khairunnisa, K.; Yin, N. O.; Chin-Dusting, J.; Wong, P.; Wong, M. C. Tumor Necrosis Factor- α -Induced Nuclear Factor-KappaB Activation in Human Cardiomyocytes Is Mediated by NADPH Oxidase. *J. Physiol. Biochem.* **2014**, *70* (3), 769–779.

<https://doi.org/10.1007/s13105-014-0345-0>.

(260) Maejima, Y.; Kuroda, J.; Matsushima, S.; Ago, T.; Sadoshima, J. Regulation of Myocardial Growth and Death by NADPH Oxidase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *50* (3), 408–416. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.12.018>.

(261) Eijkelenboom, A.; Burgering, B. M. T. FOXOs: Signalling Integrators for Homeostasis Maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14* (2), 83–97. <https://doi.org/10.1038/nrm3507>.

(262) Sengupta, A.; Molkenin, J. D.; Paik, J.-H.; DePinho, R. A.; Yutzey, K. E. FoxO Transcription Factors Promote Cardiomyocyte Survival upon Induction of Oxidative Stress *. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (9), 7468–7478. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.179242>.

(263) Dias, P. P.; Capila, R. F.; do Couto, N. F.; Estrada, D.; Gadelha, F. R.; Radi, R.; Piacenza, L.; Andrade, L. O. Cardiomyocyte Oxidants Production May Signal to T. Cruzi Intracellular Development. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005852>.

(264) Murray, H. W.; Spitalny, G. L.; Nathan, C. F. Activation of Mouse Peritoneal Macrophages in Vitro and in Vivo by Interferon-Gamma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **1985**, *134* (3), 1619–1622.

(265) Paiva, C. N.; Feijó, D. F.; Dutra, F. F.; Carneiro, V. C.; Freitas, G. B.; Alves, L. S.; Mesquita, J.; Fortes, G. B.; Figueiredo, R. T.; Souza, H. S. P.; Fantappiè, M. R.; Lannes-Vieira, J.; Bozza, M. T. Oxidative Stress Fuels Trypanosoma Cruzi Infection in Mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (7), 2531–2542. <https://doi.org/10.1172/JCI58525>.

(266) Song, W.; Lu, X.; Feng, Q. Tumor Necrosis Factor-Alpha Induces Apoptosis via Inducible Nitric Oxide Synthase in Neonatal Mouse Cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45* (3), 595–602. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00395-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00395-8).

(267) De Souza, E. M.; Nefertiti, A. S. G.; Bailly, C.; Lansiaux, A.; Soeiro, M. N. C. Differential Apoptosis-like Cell Death in Amastigote and Trypomastigote Forms from Trypanosoma Cruzi-Infected Heart Cells in Vitro. *Cell Tissue Res.* **2010**, *341* (1), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0985-5>.

(268) DosReis, G. A.; Lopes, M. F. The Importance of Apoptosis for Immune Regulation in Chagas Disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104 Suppl 1*, 259–262. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900033>.

(269) Gardner, P. R. Aconitase: Sensitive Target and Measure of Superoxide. *Methods*

Enzymol. **2002**, *349*, 9–23. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)49317-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)49317-2).

(270) Park, H.-J.; Song, B.-S.; Kim, J.-W.; Yang, S.-G.; Kim, S.-U.; Koo, D.-B. Exposure of Triclosan in Porcine Oocyte Leads to Superoxide Production and Mitochondrial-Mediated Apoptosis During In Vitro Maturation. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093050>.

(271) Shen, H. M.; Yang, C. F.; Ding, W. X.; Liu, J.; Ong, C. N. Superoxide Radical-Initiated Apoptotic Signalling Pathway in Selenite-Treated HepG(2) Cells: Mitochondria Serve as the Main Target. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30* (1), 9–21. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00421-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00421-4).

(272) Shi, L.; Wu, Y.; Lv, D. L.; Feng, L. Scutellarein Selectively Targets Multiple Myeloma Cells by Increasing Mitochondrial Superoxide Production and Activating Intrinsic Apoptosis Pathway. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **2019**, *109*, 2109–2118. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.024>.

(273) Liochev, S. I.; Fridovich, I. The Role of O₂·⁻ in the Production of HO·: In Vitro and in Vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16* (1), 29–33. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90239-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90239-9).

(274) Birge, R. B.; Boeltz, S.; Kumar, S.; Carlson, J.; Wanderley, J.; Calianese, D.; Barcinski, M.; Brekken, R. A.; Huang, X.; Hutchins, J. T.; Freimark, B.; Empig, C.; Mercer, J.; Schroit, A. J.; Schett, G.; Herrmann, M. Phosphatidylserine Is a Global Immunosuppressive Signal in Efferocytosis, Infectious Disease, and Cancer. *Cell Death Differ.* **2016**, *23* (6), 962–978. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.11>.

(275) Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells in Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF-β, PGE₂, and PAF. *J. Clin. Invest.* **1998**, *101* (4), 890–898. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>.

(276) Fadok, V. A.; McDonald, P. P.; Bratton, D. L.; Henson, P. M. Regulation of Macrophage Cytokine Production by Phagocytosis of Apoptotic and Post-Apoptotic Cells. *Biochem. Soc. Trans.* **1998**, *26* (4), 653–656. <https://doi.org/10.1042/bst0260653>.

(277) Pan, S. C. Establishment of Clones of Trypanosoma Cruzi and Their Characterization in Vitro and in Vivo. *Bull. World Health Organ.* **1982**, *60* (1), 101–107.

(278) San Francisco, J.; Barría, I.; Gutiérrez, B.; Neira, I.; Muñoz, C.; Sagua, H.; Araya, J. E.;

Andrade, J. C.; Zailberger, A.; Catalán, A.; Remonsellez, F.; Vega, J. L.; González, J. Decreased Cruzipain and Gp85/Trans-Sialidase Family Protein Expression Contributes to Loss of Trypanosoma Cruzi Trypomastigote Virulence. *Microbes Infect.* **2017**, *19* (1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>.

(279) Piñeyro, M. D.; Arias, D.; Ricciardi, A.; Robello, C.; Parodi-Talice, A. Oligomerization Dynamics and Functionality of Trypanosoma Cruzi Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase as Peroxidase and Molecular Chaperone. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2019**, *1863* (10), 1583–1594. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.013>.

(280) Castro, H.; Teixeira, F.; Romao, S.; Santos, M.; Cruz, T.; Flórido, M.; Appelberg, R.; Oliveira, P.; Ferreira-da-Silva, F.; Tomás, A. M. Leishmania Mitochondrial Peroxiredoxin Plays a Crucial Peroxidase-Unrelated Role during Infection: Insight into Its Novel Chaperone Activity. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (10), e1002325. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002325>.

(281) Piacenza, L.; Peluffo, G.; Radi, R. L-Arginine-Dependent Suppression of Apoptosis in Trypanosoma Cruzi: Contribution of the Nitric Oxide and Polyamine Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98* (13), 7301–7306. <https://doi.org/10.1073/pnas.121520398>.

(282) Temperton, N. J.; Wilkinson, S. R.; Kelly, J. M. Cloning of an Fe-Superoxide Dismutase Gene Homologue from Trypanosoma Cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *76* (1–2), 339–343. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)02553-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)02553-7).

(283) Bonaldo, M. C.; Souto-Padron, T.; de Souza, W.; Goldenberg, S. Cell-Substrate Adhesion during Trypanosoma Cruzi Differentiation. *J. Cell Biol.* **1988**, *106* (4), 1349–1358. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.4.1349>.

(284) Hissa, B.; Duarte, J. G.; Kelles, L. F.; Santos, F. P.; del Puerto, H. L.; Gazzinelli-Guimarães, P. H.; de Paula, A. M.; Agero, U.; Mesquita, O. N.; Guatimosim, C.; Chiari, E.; Andrade, L. O. Membrane Cholesterol Regulates Lysosome-Plasma Membrane Fusion Events and Modulates Trypanosoma Cruzi Invasion of Host Cells. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (3), e1583. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001583>.

(285) Zielonka, J.; Zhao, H.; Xu, Y.; Kalyanaram, B. Mechanistic Similarities between Oxidation of Hydroethidine by Fremy's Salt and Superoxide: Stopped-Flow Optical and EPR Studies. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *39* (7), 853–863. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.001>.

(286) Zielonka, J.; Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaram, B. The Confounding Effects of Light, Sonication, and Mn(III)TBAP on Quantitation of Superoxide Using Hydroethidine. *Free Radic.*

Referencias Bibliográficas

Biol. Med. **2006**, *41* (7), 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.017>.

(287) Doença de Chagas: manual de experimentação animal <https://portal.fiocruz.br/livro/doenca-de-chagas-manual-de-experimentacao-animal> (accessed 2021 -03 -18).