

RUTAS DEL SUPERÓXIDO EN LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tesis de Doctorado

Ciencias Biológicas-PEDECIBA Biología

Sub-Área Bioquímica

Lic. Carolina Prolo

Dirección

Dra. María Noel Álvarez

Co-dirección

Dr. Rafael Radi

Foto: macrófagos infectados con *T. cruzi*, núcleos en azul y Nox2 en verde

A Isabella y Leandro.

"Somewhere, something incredible is waiting to be known".

Carl Sagan

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1-ANTECEDENTES.....	3
Macrófagos en la respuesta inmune: primeros reportes.....	3
Mecanismos citotóxicos dependientes de oxígeno en macrófagos	5
Óxido nítrico sintasa inducible.....	6
NADPH oxidasa.....	10
Nox2.....	11
Nox1.....	14
Modelos para el estudio de la NADPH oxidasa.....	15
Química del radical superóxido, el óxido nítrico y peroxinitrito	17
Radical superóxido.....	17
Peróxido de hidrógeno.....	18
Radical hidroxilo.....	19
Óxido nítrico.....	20
Peroxinitrito y su relevancia como agente citotóxico.....	21
Reactividad.....	22
Formación endógena de peroxinitrito.....	23
Efectos biológicos.....	24
Interacción macrófago-<i>Trypanosoma cruzi</i>.....	26
Enfermedad de Chagas y <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Enfermedad de Chagas.....	26
<i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Reconocimiento y fagocitosis	29
Biología redox en el fagosoma.....	30
Evidencias sobre la relevancia de los oxidantes en el ataque a <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
2- OBJETIVOS.....	34
3-MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Modelos animales	35

Cultivos celulares.....	35
Detección de proteínas.....	38
Detección de especies reactivas del nitrógeno.....	39
Detección de especies reactivas del oxígeno.....	40
Reconstitución del fenotipo salvaje en BMDM gp91 ^{phox} ^{-/-}	43
Silenciamiento de Nox1.....	45
Infección <i>in vivo</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i>	45

4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno en cultivos de macrófagos derivados de médula ósea en ratones gp91^{phox}^{-/-} e iNOS^{-/-}.....	48
Diferenciación de células derivadas de médula ósea.....	48
Producción de [•] NO en BMDM de ratones iNOS ^{-/-} y gp91 ^{phox} ^{-/-}	49
Producción de O ₂ ^{•-} en BMDM de ratones iNOS ^{-/-} y gp91 ^{phox} ^{-/-}	50
Nox1 en macrófagos gp91 ^{phox} ^{-/-}	54
Producción de ONOO ⁻ en BMDM de ratones gp91 ^{phox} ^{-/-}	58
Rol del O₂^{•-} y el [•]NO en la infección de macrófagos por <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	60
Infección de macrófagos iNOS ^{-/-}	61
Infección en macrófagos gp91 ^{phox} ^{-/-}	61
Reconstitución del fenotipo <i>wt</i> en BMDM gp91 ^{phox} ^{-/-} e infección con <i>T. cruzi</i>	63
Liberación de amastigotas en cultivos de macrófagos gp91 ^{phox} ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	67
Inducción de Nox1 durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	68
Rol de la Nox2 <i>in vivo</i>: infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> en el modelo murino.....	71
Sobrevida y parasitemia de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	71

Evaluación de la carga parasitaria en tejidos de ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
Análisis de la infección por bioluminiscencia <i>in vivo</i>	73
5-CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	77
6-PUBLICACIONES.....	79
7-AGRADECIMIENTOS.....	80
8-ABREVIATURAS.....	82
9-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

RESUMEN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozoo flagelado causante de la patología conocida como Enfermedad de Chagas. Este parásito tiene un ciclo de vida complejo, atravesando varios estadios que alternan entre un insecto hematófago que actúa como vector y un hospedero vertebrado, como el humano. En el marco de la respuesta inmune innata, los macrófagos son uno de los principales tipos celulares en actuar para eliminar al parásito, y dentro de los mecanismos citotóxicos de estas células, se destaca la producción de oxidantes como una de las herramientas responsables del control de la infección. La fagocitosis de *T. cruzi* desencadena el ensamblaje y activación de la enzima NADPH oxidasa 2 (Nox2), responsable de la producción de grandes cantidades de radical aniónico superóxido ($O_2^{\bullet-}$) hacia el interior del fagosoma y durante un tiempo limitado. El ambiente pro-inflamatorio que acompaña la infección es responsable, por otro lado, de la producción de óxido nítrico (*NO) debido a la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa 2 (NOS2). La producción simultánea de estas especies lleva a la formación de peroxinitrito así como otras especies derivadas en la vacuola fagocítica. En general son oxidantes fuertes capaces de reaccionar con centros metálicos y generar modificaciones nitro-oxidativas en proteínas y lípidos que pueden afectar su estructura y función, y se vinculan directamente con la toxicidad o muerte celular. En este trabajo, se utilizó como modelo a los ratones gp91^{phox}⁻/⁻, que no expresan la Nox2 de forma de evaluar el rol del $O_2^{\bullet-}$ durante la infección con *T. cruzi*. En la infección de macrófagos aislados a partir de estos animales se evidenció su participación en el control de la infección a nivel celular, resultando en un aumento de hasta 10 veces en el número de parásitos por macrófago infectado. La recomposición del fenotipo salvaje en estas células, tanto desde el punto de vista bioquímico como genético, permitió confirmar la participación de la Nox2 en la respuesta efectora del macrófago. En el modelo *in vivo* de infección, se observó un marcado aumento de la mortalidad de los animales gp91^{phox}⁻/⁻ con respecto a los *wt*, a pesar de no encontrar diferencias en la curva de parasitemia, como ya había sido descrito por otros autores. La detección de ADN de *T. cruzi* en músculo y corazón de animales infectados permitió demostrar que en los ratones gp91^{phox}⁻/⁻ la carga parasitaria y por lo tanto la proliferación de los parásitos en los tejidos es mayor. Esta observación también fue realizada usando técnicas de imagenología *in vivo*, para lo que se infectó con parásitos que expresan la enzima luciferasa y se midió la bioluminiscencia de los animales durante varios días para seguir la evolución de la infección. En suma, los resultados obtenidos con el modelo gp91^{phox}⁻/⁻, demuestran el rol central del $O_2^{\bullet-}$ formado por la Nox2, en el control de la proliferación de *T. cruzi*. La ausencia de la Nox2 permitió por otro lado evidenciar la expresión e inducción en macrófagos de otra isoforma de la NADPH oxidasa, la Nox1, que no

había sido descrito hasta el momento. La actividad de la enzima Nox1 es mucho menor que la de Nox2 pero se sostiene por varias horas. Si bien el producto de la reacción es el mismo, es interesante destacar que en ausencia de Nox2, la inducción de la Nox1 durante la infección resultó en una proliferación aún mayor de los parásitos intracelulares. En la misma línea, experimentos *in vitro* mostraron que la exposición a concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) tiene un efecto pro-proliferativo en *T. cruzi*, como en otros tipos celulares. En este trabajo se logró determinar cuáles son las rutas del $O_2^{\bullet-}$ durante la infección con *T. cruzi*, comprobando el rol central de la Nox2 en el control de la infección y evidenciando la presencia de otra fuente de $O_2^{\bullet-}$, la Nox1, con efecto contrapuesto.

1- ANTECEDENTES

I. Macrófagos en la respuesta: primeros reportes

Hacia fines del siglo XIX un microbiólogo ruso, llamado Elie Metschnikoff, describió por primera vez el proceso de fagocitosis. Mientras estudiaba el proceso digestivo en organismos primitivos y su relación con la evolución, observó que algunas células de organismos superiores (a las que llamaría fagocitos) eran capaces de incorporar partículas y lo vinculó por primera vez con un mecanismo de defensa. Si bien sus ideas fueron polémicas al principio y parecían contraponerse a la teoría de la inmunidad humoral, décadas después recibiría el premio Nobel por sus trabajos en inmunología (1). A partir de esas observaciones, muchos científicos se abocaron al estudio de los mecanismos que subyacen a este proceso y permiten al hospedador defenderse de la invasión de microorganismos. Se describieron los fenómenos de quimiotaxis y opsonización, que permiten a los fagocitos detectar y migrar hacia la partícula extraña y a su vez reconocer “marcas” moleculares derivadas del hospedador que representan una señal de peligro sobre la partícula (2,3). Por otro lado, en 1932, Baldrige y Gerard observaron que los leucocitos expuestos a distintos patógenos aumentaban su tasa de consumo de oxígeno transitoriamente, fenómeno que denominaron como “*extra respiration*” y más tarde sería reconocido como “estallido respiratorio” (4). Algunas décadas después, comenzó a relacionarse dicho consumo de oxígeno aumentado con una actividad oxidasa dependiente de NADPH capaz de formar peróxido de hidrógeno y que serviría de mecanismo de defensa frente a patógenos como *Escherichia coli* (5,6). Gracias a los trabajos de Bernard Babior en los años 70’ se conoció la verdadera naturaleza de la especie formada por la “NADPH oxidasa” de neutrófilos, cuando identificaron que se producían grandes cantidades del anión radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) durante el estallido respiratorio (7,8). Estos descubrimientos cobran gran importancia en el área de la medicina cuando se identifica que la ausencia de estallido respiratorio es la causa de una patología descrita por primera vez en 1957, la Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD) (9). Los pacientes con CGD presentan una gran susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas desde temprana edad, lo cual se debe a la deficiencia congénita en la enzima NADPH oxidasa y a la concomitante respuesta deficitaria de macrófagos y neutrófilos en la respuesta inmune (10).

Otro hito en el conocimiento de la actividad citotóxica de los fagocitos fue el descubrimiento de la formación de óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) por parte de los macrófagos. Este hallazgo ocurrió por la convergencia de dos líneas de investigación hasta el momento independientes. Por un lado, la

observación en 1981 de que ratones libres de gérmenes excretaban más nitrato que el que ingieren, llevó al surgimiento de la idea de que algún tipo celular era capaz de producir óxidos inorgánicos de nitrógeno (11). Luego, Stuehr y Nathan demostraron que los macrófagos expuestos a lipopolisacárido bacteriano (LPS) o activados con citoquinas eran capaces de producir grandes cantidades de nitrito, el cual deriva, como se determinaría más adelante, de la oxidación del grupo guanidinio de la arginina (12,13). En esos trabajos iniciales se vio que el NO producido por los macrófagos es capaz de inhibir la respiración y la proliferación de células tumorales así como de inhibir la multiplicación de una gran cantidad de microorganismos (14,15).

Casi al mismo tiempo, en el campo de la fisiología vascular, se descubre la formación de una entidad con mayor poder oxidante que sus precursores ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO), el peroxinitrito (ONOO^-). Mientras no se conocía la naturaleza química del “factor relajante derivado del endotelio” (EDRF por su sigla en inglés), se observó que la presencia de enzimas superóxido dismutasas (SODs) aumentaban la vida media de este agente y disminuían el daño oxidativo que se observaba en modelos de injuria reperusión. Estas y otras observaciones permitieron determinar que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ es un blanco importante del EDRF y ayudaron a identificar al NO como el agente vasodilatador producido en el endotelio (16,17). En 1990 se propuso que el producto de reacción entre NO y $\text{O}_2^{\bullet-}$, el ONOO^- , se forma en sistemas biológicos y es capaz de generar oxidaciones en distintas biomoléculas (18-20). Dos años más tarde, se describe por primera vez la formación de ONOO^- en macrófagos (21) y a partir de ese momento surge una gran cantidad de evidencias sobre el rol de esta especie en el contexto de la respuesta frente a distintos patógenos y otros procesos inflamatorios (22).

Al día de hoy, más de un siglo después de los hallazgos de Mestchnikoff, se conocen las bases moleculares de la fagocitosis, donde células especializadas son capaces de internalizar patógenos y agentes extraños para su eliminación. Son diversos los mecanismos de destrucción con los que cuentan estas células y cada patógeno induce una respuesta específica sobre el fagocito. Las células dendríticas, los neutrófilos y los macrófagos conforman el grupo de fagocitos profesionales y constituyen la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos. Este trabajo se centra en la respuesta montada por los macrófagos frente a diferentes estímulos, en particular en aquellos mecanismos citotóxicos dependientes de oxidantes.

II- Mecanismos citotóxicos dependientes de oxígeno en macrófagos

Como otros fagocitos profesionales, los macrófagos son capaces de internalizar partículas relativamente grandes ($>5 \mu\text{m}$) permitiendo su destrucción y a su vez de participar de un fenómeno esencial para el desarrollo de la inmunidad adaptativa, la presentación de antígenos. La fagocitosis lleva al encapsulamiento del microorganismo en el fagosoma, una vacuola derivada de la invaginación de la membrana plasmática a partir de su interacción a través de receptores con la partícula u organismo a ingerir. Este compartimiento sufre un proceso de “maduración”, tras la fusión endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente con lisosomas celulares, lo que le confiere algunas de las propiedades citotóxicas (23).

Una de los principales eventos que acompañan la maduración del fagosoma es su acidificación, dependiente del transporte activo de H^+ hacia el lumen de este compartimento por parte de la familia de V-ATPasas. Estas enzimas tienen un dominio V_1 , con sitios de unión a ATP, ADP y Pi y un dominio V_0 transmembrana por donde se translocan los H^+ hacia el interior del fagosoma. Su funcionamiento es similar al descrito para las F-ATPasas que actúan en la fosforilación oxidativa, solo que en el caso de las V-ATPasas, la hidrólisis del ATP impulsa el transporte electrogénico de H^+ , proceso inverso al que ocurre en la síntesis de ATP mitocondrial (24). La acidificación ocurre tempranamente, luego de 30 minutos de la interacción con el agente extraño se alcanzan pHs <6 , como se observa en macrófagos humanos (25), y en el caso del fagosoma de la línea celular J774A.1 de macrófagos murinos conteniendo *T. cruzi*, se ha determinado en nuestro laboratorio que el pH es de $5,3 \pm 0,1$ en el mismo tiempo (26). La acidificación tiene efectos directos sobre el metabolismo de ciertos microorganismos y, a su vez, activa las enzimas hidrolíticas que actúan óptimamente a pHs ácidos. En el caso de *T. cruzi*, el pH ácido favorece la diferenciación de tripomastigota a amastigota y el escape de la vacuola fagocítica hacia el citosol algunas horas después de la infección (27).

Por otro lado, el fagosoma también se enriquece con una batería de proteínas y péptidos antimicrobianos que limitan el crecimiento o bien afectan directamente la viabilidad de los microorganismos. En el primer grupo encontramos por ejemplo a la proteína de macrófagos 1 asociada a la resistencia natural (NRAMP-1 por su sigla en inglés), una proteína transmembrana capaz de remover cationes divalentes (Zn^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+}) del interior del fagosoma y limitar así la biodisponibilidad de nutrientes esenciales para la sobrevivencia de distintos patógenos (23). En el segundo grupo de proteínas con actividad antimicrobiana encontramos las defensinas y

catelicidinas, así como enzimas líticas (lipasas, lisozima, endo- y exopeptidasas entre otras) que actúan permeabilizando las paredes celulares bacterianas y degradando distintos componentes microbianos. Muchos de estos péptidos y proteínas han sido descritos principalmente en neutrófilos, pero también se han encontrado en macrófagos y monocitos humanos, e incluso se propone que existe un intercambio de proteínas defensinas entre neutrófilos y macrófagos (28,29).

El otro grupo importante de mecanismos citotóxicos con los que cuentan los macrófagos comprende a las enzimas formadoras de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, responsables del daño oxidativo asociado al control de la infección. El rol de estas enzimas constituye el centro de este trabajo y se discuten en las secciones a continuación.

a) Óxido nítrico sintasa inducible

La familia de óxido nítrico sintasas (NOS) se compone de 3 isoformas caracterizadas hasta el momento: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Más allá de su nomenclatura, la expresión de estas enzimas se ha descrito en muchos tejidos y cumplen diversos roles. Como su nombre lo indica, son responsables de la síntesis de *NO a expensas de NADPH, O_2 , y arginina. El mecanismo de reacción consiste en dos mono-oxigenaciones secuenciales de la arginina, con la formación de un intermediario N-OH-arginina (**Figura 1-1**). En el proceso participan 4 grupos prostéticos: FAD, FMN, un grupo hemo y tetrahidrobiopterina (BH_4). El NADPH cede electrones al grupo FAD y este al grupo FMN. Estos equivalentes de reducción se transfieren luego al hierro hémico, permitiendo que pueda unir O_2 y formar un intermediario Fe^{2+} -dioxi, cuya naturaleza aún se discute. Luego la BH_4 actúa reduciendo a este compuesto y formando la especie capaz de hidroxilar a la arginina. La formación de citrulina y *NO a partir de N-OH-arginina requiere de un compuesto Fe^{2+} -dioxi diferente, también activado por BH_4 (30).

Todas las NOS dependen de la unión a calmodulina (CaM) para su actividad. Sin embargo, el requerimiento de Ca^{2+} para promover la unión de CaM a la enzima es muchísimo menor en el caso de la iNOS, lo que implica que para concentraciones normales de Ca^{2+} citosólico la enzima está unida a CaM. Es por eso que a veces se refiere a esta enzima como Ca^{2+} -independiente, aunque no es estrictamente correcto, ya que el complejo con CaM se requiere para el correcto plegamiento de la proteína y para el intercambio de electrones desde el NADPH hacia las flavinas (31).

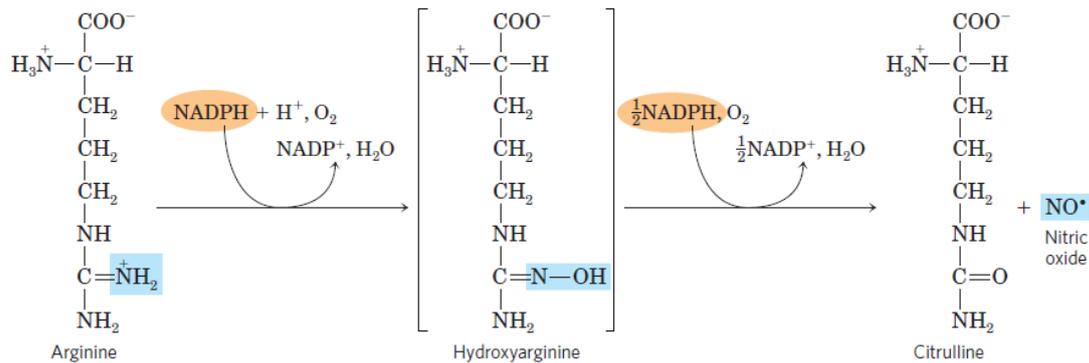


Figura 1-1. Síntesis de NO . En una primera etapa la L-arginina es hidroxilada en una reacción que consume NADPH y O_2 . Luego el intermediario OH-arginina es oxidado a L-citrulina, consumiendo una segunda molécula de O_2 y 0,5 equivalentes de NADPH, al tiempo que se libera NO como producto. *Esquema tomado del libro Principles of Biochemistry, 6^{ta} Ed.*

En particular, los macrófagos expresan la isoforma iNOS o NOS2, capaz de formar grandes cantidades de NO de forma sostenida en el tiempo (32). Desde el punto de vista estructural, es un homodímero, donde cada monómero cuenta con un dominio oxidasa y un dominio reductasa. En este último, ocurre el pasaje de electrones desde el NADPH hacia el FAD y el FMN, y luego son transferidos al grupo hemo del dominio oxidasa del otro monómero. En esta región de la enzima se une la arginina y se da oxidación en 2 pasos de este aminoácido para generar NO . Hasta el momento no se ha podido elucidar la estructura cristalográfica de la holoenzima, si bien existen reportes de estructuras de los dominios separados. Sin embargo, estudios de microscopía electrónica permitieron conocer aspectos de la formación del dímero de la iNOS y la dinámica de la proteína durante la catálisis. En el trabajo de Campbell y col. (33) se determinó que los dominios oxidasa de cada monómero se unen de forma antiparalela y los dominios reductasa se encuentran en los “extremos” del dímero. Para que ocurra la transferencia electrónica del dominio reductasa al dominio oxidasa de otro monómero se da un gran movimiento de la enzima, acercando ambas regiones de la proteína (ver **Figura 1- 2**)(33).

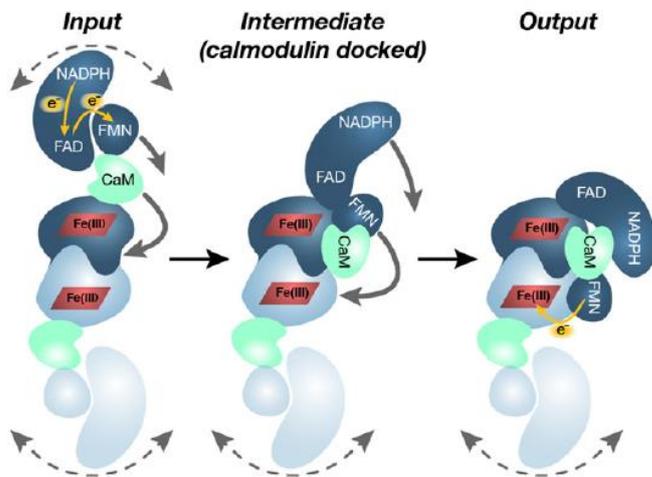


Figura 1-2. Posible estructura y dinámica de la iNOS. Los dominios oxidasa de cada monómero se unen de forma antiparalela, unidos a calmodulina y con los dominios reductasa orientados hacia los extremos. El estado llamado “input” corresponde a la estructura necesaria para la interacción entre los subdominios NADPH/FAD y FMN. Para transferir los electrones al dominio oxidasa, la enzima sufre un gran cambio conformacional que acerca el subdominio FMN hacia el grupo hemo, alcanzando el estado llamado “output”. Tomado de Campbell y col. *PNAS*, 2014.

En cuanto a su regulación, la iNOS se regula a nivel transcripcional y por estabilización del ARNm, a diferencia de las otras isoformas, la endotelial y la neuronal, las cuales son reguladas principalmente por la concentración de Ca^{2+} intracelular. Este fenómeno se ha descrito en detalle en el modelo murino, donde se sabe que tanto citoquinas proinflamatorias ($\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) como motivos moleculares presentes en los patógenos son capaces de activar la transcripción del gen. En particular, el interferón- γ ($\text{IFN-}\gamma$) interacciona con su receptor en la membrana del macrófago, activando la fosforilación y dimerización del factor $\text{STAT1-}\alpha$, el cual activa a nivel nuclear la transcripción del factor de respuesta a interferón 1 (IRF1). Tanto $\text{STAT1}\alpha$ como IRF1 se unen a regiones reguladoras del gen de iNOS promoviendo su transcripción (34). Además, algunos de los llamados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, por su sigla en inglés), como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) o proteínas del parásito *T. cruzi*, activan la vía de $\text{NF-}\kappa\text{-B}$ a través de la interacción con el receptor tipo Toll-4 (TLR4) y actúan sinérgicamente con las citoquinas proinflamatorias en la inducción de la expresión de iNOS (ver **Figura 1-3**) (35-37). Por el contrario, las citoquinas antiinflamatorias, como IL-4 e IL-13 producidas por linfocitos T reguladores, activan al factor de transcripción $\text{STAT6}\alpha$ y bloquean la transcripción del gen (38,39). Otros supresores de su expresión, como el $\text{TGF}\beta\text{-1}$ actúan a través de la desestabilización del ARNm e impiden su traducción a proteína(40).

La inducción *in vitro* de la iNOS en macrófagos por IFN- γ y LPS se ha caracterizado en detalle y son necesarias 4-5 horas de exposición a estos estímulos para evidenciar la producción de NO . Luego de ese período la actividad se sostiene hasta la degradación de la enzima (aproximadamente 16 horas)(32).

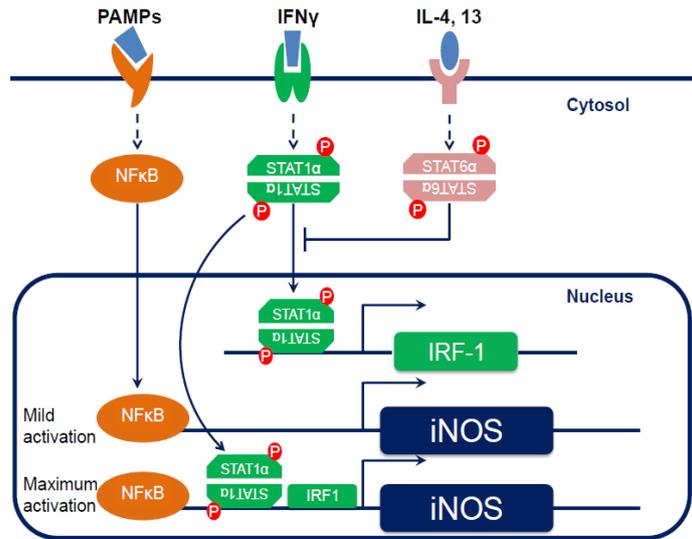


Figura 1-3. Regulación de la expresión de iNOS en macrófagos. El reconocimiento de PAMPs llevan a la migración del factor NF κ -B hacia el núcleo, el cual se une a regiones reguladoras del gen codificante para iNOS y promueve su expresión. A su vez, la señalización por IFN γ activa la vía de JAK/STAT, en particular desencadena la fosforilación del factor STAT1 α , el cual estimula directamente la transcripción de la iNOS y a través del factor IRF-1. Citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 o 13 bloquean la expresión de la iNOS a través del factor STAT6 α . *Extraído de Prolo y col., Biofactors 2014.*

En cuanto a su localización subcelular, se ha descrito que al menos parte de la iNOS se encuentra en vesículas intracelulares de 50-80 nm de diámetro, mientras que el resto

está distribuida en el citosol celular en macrófagos primarios y de línea (41,42). Las vesículas conteniendo la proteína serían reclutadas a las cercanías de los fagosomas recién formados para direccionar la producción de NO o incluso fusionarse con la membrana fagosomal. Este proceso es dependiente del tipo de microorganismo internalizado y algunos como *Mycobacterium tuberculosis* interfieren en el reclutamiento de la iNOS hacia el fagosoma (42,43). De cualquier forma, el NO es un radical pequeño capaz de atravesar membranas y difundir varios diámetros celulares, por lo que puede alcanzar la vacuola fagocítica más allá de la localización subcelular de la enzima que lo produce (44).

El rol de la iNOS en la respuesta inmune innata ha sido ampliamente estudiado en el modelo murino. Se sabe que la deficiencia genética de esta proteína en los ratones iNOS $^{-/-}$, así como su inhibición farmacológica, conllevan una mayor susceptibilidad a infecciones por distintos patógenos (bacterias, hongos, parásitos y virus) (31). En humanos también se conoce su relevancia en distintos procesos inflamatorios o infecciosos, ya que se detecta una mayor expresión de iNOS en macrófagos obtenidos de pacientes con tuberculosis, placas de ateroma, entre otros y a su vez el uso de inhibidores específicos disminuye la capacidad microbicida en estas células (31,45,46). Si bien es posible inducir la enzima en condiciones experimentales en células epiteliales humanas y hepatocitos (entre otros) expuestos a citoquinas proinflamatorias

(47,48), hasta el momento no se ha logrado estimular su expresión en macrófagos humanos *in vitro*. Esta dificultad metodológica probablemente se explique por condiciones o mecanismos de señalización que operan *in vivo* pero están ausentes en cultivos celulares o aún no han sido identificados (49). Existe un único caso reportado hasta el momento de una deficiencia hereditaria en el gen *iNOS*^{-/-}, la cual se cree que provocó la muerte de un paciente por infección con citomegalovirus. Se trata de una variante muy poco frecuente con herencia autosómica recesiva y origina una proteína truncada no funcional. Este reporte es muy importante porque se trata de la primera asociación de una deficiencia natural completa en esta proteína y una respuesta inmune deficiente (47).

La producción de *NO dependiente de *iNOS* en macrófagos también juega un papel importante en la respuesta frente a amenazas extracelulares, como son las células tumorales. Ya en los primeros estudios sobre la activación de macrófagos con IFN- γ y LPS se observó la potencia tumoricida que posee el *NO (50). Este fenómeno ha sido estudiado en diversos tipos de tumores, y en muchos de ellos se evidencia que los inhibidores específicos de *iNOS* promueven el crecimiento de células cancerígenas. Sin embargo, en otros modelos, dependiendo de la cantidad de *NO formado y el tipo de tumor, se le ha adjudicado un rol pro-tumorigénico a la inducción de la *iNOS* (51,52).

b) NADPH Oxidasa

La familia de las NADPH oxidasas (Nox) comprende un grupo de enzimas con dominios transmembrana capaces de formar especies parcialmente reducidas del O₂ a expensas de NADPH. La primera de ellas fue caracterizada en células fagocíticas como se mencionó anteriormente y se conoce como Nox2. Luego se describieron otras isoformas en otros tipos celulares y que cumplen funciones importantes de señalización. La mayoría de estas enzimas cuenta con varias subunidades reguladoras que forman un complejo a nivel de las membranas biológicas y pueden variar entre las distintas isoformas, siendo el componente transmembrana el más conservado desde el punto de vista estructural (**Figura 1-4**). Los miembros de esta familia más recientemente caracterizados son las Duox 1 y 2 (del inglés, *dual oxidase*) que contienen un dominio peroxidasa. Se cree que estas enzimas son capaces de oxidar sustratos a partir del H₂O₂ formado en la misma proteína (53,54).

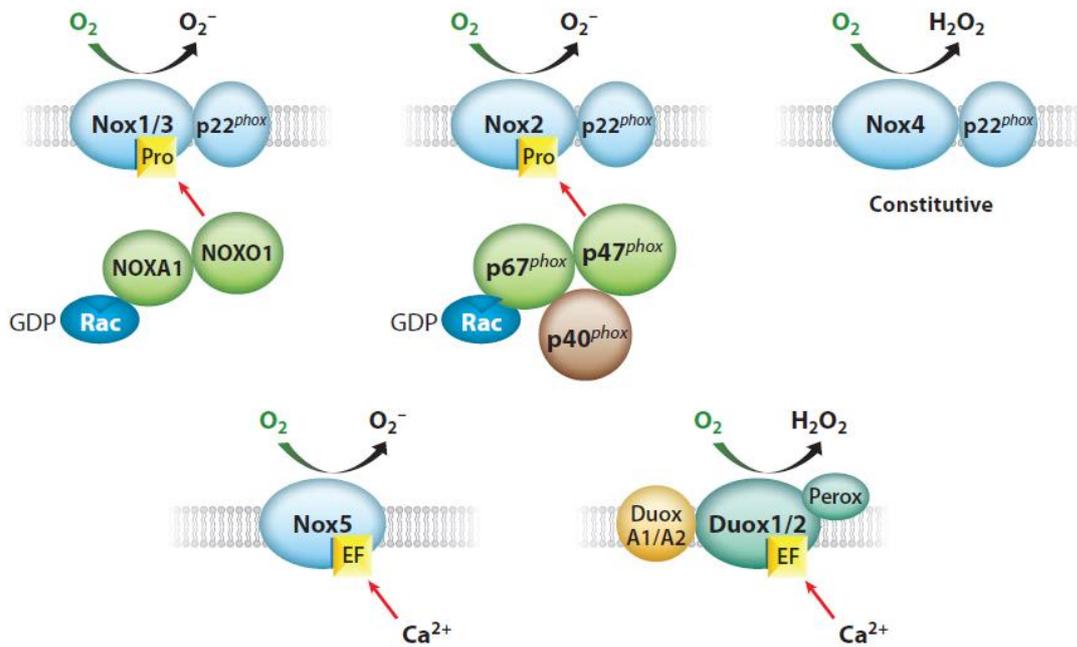


Figura 1-4. Isoformas de la NADPH oxidasa. La familia de las NADPH oxidasas comprende un grupo de enzimas de membrana capaces de generar O₂⁻ o H₂O₂. Cada miembro de esta familia se compone de distintas subunidades y cofactores. La Nox4 tiene actividad constitutiva, mientras que las isoformas 1-3 requieren de la activación por parte de subunidades reguladoras y las restantes son dependientes de Ca²⁺. Las isoformas 1,2,3 y 5 generan O₂⁻, mientras que la Nox4 y las Duox generarían H₂O₂. En particular este último tipo de enzima presenta un dominio tipo peroxidasa que sería capaz de modificar distintos blancos proteicos a partir del H₂O₂ formado en la enzima. *Extraído de Lambeth y Neish, Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.2014.*

Nox2

Los macrófagos cuentan con la isoforma más estudiada de la familia de las NADPH oxidasas. Se trata de la Nox2, típica de fagocitos profesionales. Esta enzima fue descrita en la segunda mitad del siglo XX, como la responsable del llamado estallido respiratorio, el cual consiste en un gran consumo de O₂ y formación de O₂⁻ por parte de macrófagos y neutrófilos tras la fagocitosis de agentes extraños (53).

La Nox2 es un complejo multienzimático formado por 2 subunidades ubicadas en la membrana plasmática y 3 subunidades que permanecen en el citosol cuando la célula está en reposo. Las proteínas de membrana gp91^{phox} y p22^{phox} forman un heterodímero conocido como flavocitocromo b₅₅₈, donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima. En particular, la subunidad gp91^{phox} tiene todos los cofactores necesarios para la síntesis de O₂⁻. El extremo N-terminal se compone de 6 hélices transmembrana, mientras que el extremo C-terminal se orienta hacia el citosol y contiene sitios de unión para FAD y NADPH, además de 2 grupos hemo idénticos unidos no covalentemente. La proteína p22^{phox} presenta 3 hélices transmembrana y

en su dominio citosólico contiene un motivo de tipo PRR (región rica en prolina), clave para la interacción con los componentes solubles de la NADPH oxidasa (55). Las restantes subunidades $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ y $p47^{phox}$, tienen un rol regulatorio y en condiciones basales se encuentran formando complejos con estequiometría 1:1:1 en el citosol (56).

Frente a un estímulo fagocítico o en presencia de agonistas solubles pro-inflamatorios se desencadenan 3 mecanismos que llevan al ensamblaje del complejo a nivel de la membrana plasmática: fosforilación de subunidades citosólicas, activación del metabolismo lipídico e intercambio GDP por GTP en la pequeña GTPasa Rac1/2 (**Figura 1-5**)(54).

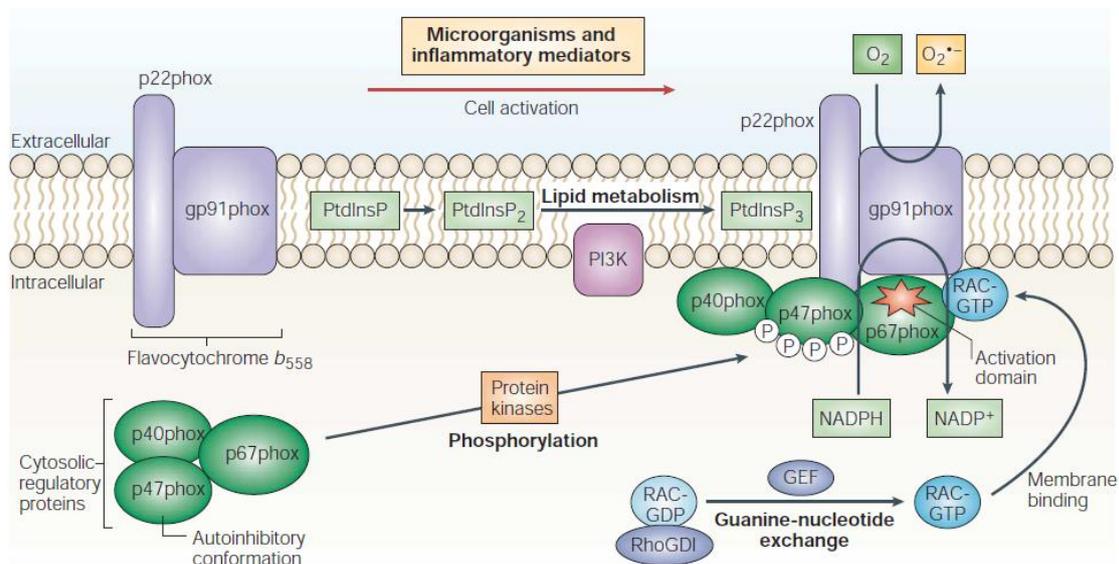


Figura 1-5. Activación y ensamblaje del complejo NADPH oxidasa 2. En una célula en reposo, las subunidades de membrana $gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$ permanecen separadas de las subunidades citosólicas $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ y $p47^{phox}$. Tras estímulos fagocíticos o activación por distintos agonistas ocurre la fosforilación de las proteínas citosólicas hacia la membrana formando el complejo completamente activo. La estabilización del complejo depende de interacciones entre $p47^{phox}$ y $p22^{phox}$ y de $p40^{phox}/p47^{phox}$ con fosfatidilinosítoles de la bicapa lipídica. En paralelo, se requiere de la activación y migración de Rac-GTP para que se dé la activación completa del complejo. *Extraído de Lambeth, y col., Nat Rev Immunol 2004.*

Por un lado, el reconocimiento de patógenos lleva a la activación de la fosfolipasa $C\beta$ y la concomitante hidrólisis del inositol bifosfato (PIP_2). Los productos de esta reacción, inositol 3 fosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) promueven la activación de la protein quinasa C (PKC). La acción de esta y otras quinasas celulares, como Akt, llevan a la fosforilación de las subunidades citosólicas. En particular, la fosforilación de $p47^{phox}$ lleva a la liberación de 2 dominios de homología SHC 3 (SH3) de su unión a una región auto inhibitoria (AIR) dentro de la proteína (57). Una vez expuestos, los dominios SH3 son capaces de interactuar con la región PRR de $p22^{phox}$ (55). La migración hacia la membrana estaría relacionada con la interacción de un dominio PX

("phox homology") presente tanto en p47^{phox} como en p40^{phox} y una proteína del citoesqueleto, la moesina (58). A su vez, el mismo dominio participa del anclaje de dichas subunidades a fosfatidilinositoles fosforilados de la bicapa lipídica (59). También las subunidades p40^{phox} y p67^{phox} son blanco de fosforilación en distintos residuos, aunque el rol de esta modificación no está tan claro. La activación de p47^{phox} es un requisito necesario para la migración de las otras subunidades citosólicas (55).

En paralelo, otro complejo formado por la pequeña GTPasa Rac (1 o 2) y el inhibidor de la disociación de GDP para Rho (RhoGDI) migra hacia la membrana plasmática y contribuye a la activación de la NADPH oxidasa (**Figura 1-5**). Cuando Rac intercambia GDP por GTP es capaz de unirse e inducir un cambio conformacional en p67^{phox}. Esta modificación sería una condición necesaria para iniciar el flujo de electrones a través del flavocitocromo b₅₅₈ (60).

Por último, la activación de la NADPH oxidasa no es un proceso binario de "encendido" o "apagado", sino que ciertos estímulos como el factor de necrosis tumoral (TNFα) o el LPS pueden aumentar la respuesta del complejo enzimático, un proceso conocido como "priming". En particular se ha visto que este tipo de agonistas pueden promover la fosforilación de algunas subunidades, preparando a la oxidasa para una mayor activación frente a un estímulo fagocítico (61).

La reacción catalizada por la Nox2 consiste en la reducción del O₂ a expensas de electrones provenientes del NADPH:



La transferencia electrónica ocurre desde el NADPH hacia el grupo FAD, y luego a través de un grupo hemo hacia el O₂. La orientación de la enzima determina que el producto de la reacción se forme hacia el exterior de la membrana plasmática, o tras la invaginación de la misma para formar el fagosoma, hacia el interior de esta vacuola (62,63).

En cuanto a la cantidad de O₂^{•-} formado por la Nox2, existen una serie de reportes obtenidos con distintas técnicas en macrófagos y neutrófilos y en general se obtienen flujos en el orden de pmoles/min/10⁶ células para los primeros y de nmoles/min/10⁶ células para los últimos. En cuanto a los valores precisos de flujos de formación de O₂^{•-} se observa cierta variabilidad, lo cual podría explicarse por la distinta sensibilidad de las técnicas de detección utilizadas.

Nox1

La isoforma Nox1 fue identificada por primera vez en 1999 en células no fagocíticas, principalmente en células de músculo liso vascular (VSMC) y colonocitos (64). Desde su descubrimiento se ha estudiado fuertemente su rol en la proliferación celular y en el crecimiento tumoral (65). Los animales deficientes en esta enzima son viables y no muestran ningún fenotipo espontáneo, aunque presentan ciertas alteraciones en la regulación de la presión sanguínea (66).

De forma similar a la Nox2, la isoforma 1 requiere de la GTPasa Rac y de subunidades citosólicas análogas para su actividad. NOXO1 es conocida como la subunidad “organizadora” del complejo y comparte gran homología con p47^{phox}, aunque carece de la región AIR. NOXA1 cumple una función análoga a p67^{phox}, activando el flujo de electrones a través de Nox1, mientras que estructuralmente difieren en que presenta un solo dominio SH3 (67).

En cuanto a su regulación, existe un control transcripcional de la cantidad de enzima además de la regulación de su actividad, mientras que la isoforma fagocítica se expresa constitutivamente. Además, los niveles de formación de O₂^{•-} por Nox1 son mucho menores a los que se forman en el estallido respiratorio, lo cual sugiere un rol señalizador, más que citotóxico para esta actividad (65). Se ha visto que existe un aumento de la expresión de Nox1 en tumores de pacientes con cáncer de colon asociado a mutaciones en el oncogén Ras (68), y se cree que el O₂^{•-} generado por la enzima media la oxidación (*via* H₂O₂) de proteínas clave de control del ciclo celular (65). Más recientemente se ha descrito la expresión de Nox1 en macrófagos, la cual aumenta por exposición a LPS bacteriano. Esta regulación depende de factores *downstream* del receptor TLR-4 como IRAK-1 (*interleukin-1 receptor associated kinase-1*), que media tanto la inducción del gen de Nox1, como la activación de la enzima a través de la pequeña GTPasa Rac1 (69-71). Incluso se ha demostrado que existe una inducción de la enzima en macrófagos aislados de ratones tratados con LPS en modelos de artritis y endotoxemia (72,73). Si bien se ha estudiado la participación de la Nox1 en la diferenciación, necrosis, respuesta aterogénica de macrófagos (74-76), entre otros, el rol que cumple enzima durante la activación por PAMPs como el LPS aún no se conoce. En cuanto a su localización, algunos reportes apuntan a que se encuentra en vesículas intracelulares, otros la detectan en la membrana plasmática asociada a las caveolas, pero su ubicación específica no se encuentra totalmente definida aún (77-79).

A pesar de que no constituye un mecanismo citotóxico establecido, la Nox1 se incluyó en esta sección dado que, en el marco de este trabajo, se identificó una asociación entre la activación

de los macrófagos por la infección con *T. cruzi* y la expresión de esta enzima, aunque la función de esta actividad como parte de la respuesta citotóxica aún requiere más investigación.

Modelos para el estudio de la actividad NADPH oxidasa

Como se discutió en la sección anterior, la isoforma típica fagocítica, Nox2, ha sido la más estudiada y sobre la que se conocen más detalles de su regulación y activación. Al tratarse de un complejo multienzimático y cuyo *core* catalítico está en una proteína integral de membrana, no es posible purificarla a partir de los tradicionales sistemas de expresión procariotas o eucariotas. Muchos de los detalles sobre su actividad, provienen de aproximaciones donde se busca recomponer el complejo enzimático en solución, a partir de fragmentos de membranas de células conteniendo la glicoproteína de membrana y las proteínas organizadoras y reguladoras solubles (80).

A la hora de explorar aspectos específicos de alguna de las isoformas en el contexto celular, la información más valiosa proviene de modelos modificados genéticamente, donde se suprime la expresión de una de las variantes en particular. Esto se debe a que la mayoría de los inhibidores disponibles actúan de forma no selectiva, inhibiendo todas las NADPH oxidasas, e incluso otras enzimas con mecanismos de acción similares. Además, algunos de los inhibidores disponibles presentan cierta reactividad con especies derivadas del oxígeno, dificultando la interpretación de los resultados.

Probablemente el difeniliodonio (DPI, por su nombre en inglés) es el inhibidor más ampliamente utilizado para inhibir la actividad NADPH oxidasa. Sin embargo, se trata de una molécula orgánica capaz de reaccionar y formar aductos covalentes con las flavinas de varias enzimas. Dependiendo de la concentración utilizada, el DPI puede inhibir otras enzimas además de la Nox, como el citocromo-P450, la enzima xantina oxidasa, iNOS, succinato deshidrogenasa, entre otras (81-83). Otros inhibidores disponibles presentan problemas de especificidad entre las distintas isoformas de NADPH oxidasa (Ver **Tabla 1-1**). Más recientemente se han desarrollado péptidos con analogía de secuencia con el objetivo de aumentar la selectividad de la inhibición con resultados prometedores. Se unen a regiones específicas de la enzima y funcionan como inhibidores competitivos en el ensamblaje del complejo activo (84).

Tabla 1-1. Inhibidores de NADPH oxidasa más utilizados. Tomado de Gonzalez-Perilli, L, Prolo C, Álvarez MN; *Bioactive lipids in health and disease, Cap. 6.*

Inhibitor	Description	Mechanism	IC ₅₀ , Ki cell free assay	IC ₅₀ intact cells	Comments
Diphenylene-iodonium (DPI)	Iodonium compound	Generate phenyl radical that reacts with flavins	5.6 μM ^a	0.9 μM ^b	Non-specific. Inhibits mitochondrial complex I, xanthine oxidase, NOS and others.
Nox2 ds-tat	Peptide containing a fragment analogue to B-loop of Nox2	Blocks the interaction between p47 ^{phox} and Nox2	0.74 μM ^c	ND	No inhibition of Nox1 and Nox4
Nitro-arachidonic acid	Nitrated form of arachidonic acid	Blocks NADPH oxidase assembly	ND	4.1 μM ^d	Reacts with nucleophiles
VAS2870	Triazolo-pyrimidine	NK	10.6 μM ^e	0.08 μM ^f	Also inhibits Nox1 and Nox4 and exerts off-target thiol alkylation
ML171	2-acetyl-phenothiazine	NK	5 μM ^g	>10 μM ^h	Potent inhibitor of Nox1
GKT137831	Pyrazolo-pyrimidine	NK	1.7 μM ⁱ	ND	Inhibits other Nox isoforms (1 and 4)

En muchos casos, el uso de ratones *knock out* (KO) para una enzima permite inferir (en complemento con otras estrategias) su rol en determinado proceso. La supresión de la expresión de alguna de las isoformas de Nox conlleva un fenotipo observable, mientras que en otros casos no existe una afectación obvia, ver **Tabla 1-2** (85). En el caso de los animales gp91^{phox}^{-/-}, que no expresan Nox2, se observa una mayor susceptibilidad a la infección por distintos patógenos y de hecho la ausencia natural de esta actividad en humanos da origen a la enfermedad granulomatosa crónica (CGD) como ya se mencionó (10). Este modelo está disponible en nuestro

Tabla 1-2. Fenotipo de ratones KO para cada isoforma de Nox

Isoforma	Principal tejido donde se expresa	Fenotipo del ratón KO
Nox1	Cólon y células de músculo liso vascular	Ninguno
Nox2	Principalmente en fagocitos	CGD
Nox3	Oído interno	Defectos en el balance
Nox4	Células epiteliales	Ninguno
Nox5	Bazo y testículos	No existe modelo murino
Duox1	Tiroides	Ninguno
Duox2	Tiroides	Hipotiroidismo

laboratorio y es central en el desarrollo de trabajo como estrategia para esclarecer el papel de la formación de $O_2^{\bullet-}$ derivado de Nox2 durante la infección por *T. cruzi*.

III- Química del radical superóxido, el óxido nítrico y peroxinitrito

a) Radical superóxido

El radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) se forma por la reducción univalente (**Figura 1-6**) del oxígeno molecular (O_2). Su carácter de radical libre, implica que posee un electrón desapareado y que tiene existencia independiente. En sistemas biológicos se forma como producto secundario de algunos procesos (por ejemplo, la cadena respiratoria), pero también existen enzimas especializadas para su producción (NADPH oxidasas) (86).

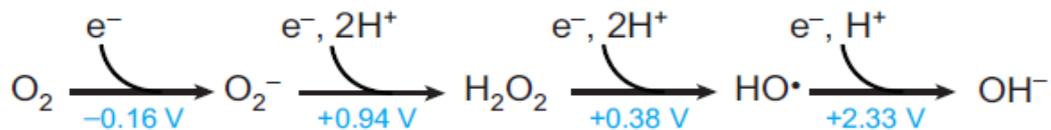


Figura 1-6. Estados de oxidación del O_2 y sus potenciales de reducción estándar (E°). $O_2^{\bullet-}$, radical superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; HO^{\bullet} , radical hidroxilo; OH^- , anión hidroxilo. *Extraído de Imlay, J. Annu. Rev. Biochem. 2008.*

El superóxido puede existir en la forma aniónica ($O_2^{\bullet-}$) o la forma protonada: el radical perhidroxilo (HO_2^{\bullet} , $pK_a = 4,8$). Desde el punto de vista del potencial redox, el $O_2^{\bullet-}$ puede actuar tanto como agente oxidante (y formar H_2O_2) o como reductor (dando O_2) (87). El HO_2^{\bullet} es un oxidante más fuerte que el $O_2^{\bullet-}$ y puede ser relevante en ambientes con pHs ácidos como el fagosoma (26). Sin embargo, su importancia en la mayoría de los fluidos biológicos es relativamente menor, ya que constituye el 1% de la especie a pH neutro (87).

A pesar de su alto potencial de reducción ($O_2^{\bullet-}, 2H^+/H_2O_2 = +0.94V$), el $O_2^{\bullet-}$ es capaz de oxidar un número reducido de biomoléculas ya que la carga negativa impide su reactividad con centros nucleofílicos. Sin embargo, productos derivados del $O_2^{\bullet-}$ pueden tener un impacto importante sobre diferentes biomoléculas. También por causa de la carga negativa, presenta una permeabilidad reducida en membranas biológicas, determinando que sus efectos sean más importantes en el sitio donde se genera (87).

Uno de los principales efectos directos de la acción del $O_2^{\bullet-}$ es la inactivación de proteínas con centros ferro-sulfurados, como el caso de la enzima aconitasa (88,89). También es capaz de reaccionar con centros metálicos, como los grupos hemo (90) o con otros radicales libres, como el $\bullet NO$, reacción que se discutirá más adelante en este trabajo.

La reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ da lugar a la formación de una especie no radical: el H_2O_2 . Se trata de un proceso espontáneo que ocurre rápidamente a $pH=4,8$ y se enlentece en medios más alcalinos ya que involucra la reacción de un $O_2^{\bullet-}$ y un HO_2^{\bullet} (91,92):



Sin embargo, en sistemas biológicos la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ ocurre fundamentalmente a través de la acción de las enzimas SODs (93), que catalizan esta reacción con constantes de velocidad mucho mayores (10^5 para la reacción espontánea vs $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la reacción catalizada a $pH=7,4$) (92,94):



La acción de las distintas SODs y la reacción con radicales libres explican en gran parte la corta vida media del radical $O_2^{\bullet-}$ en un contexto biológico ($t_{1/2} < 1 \text{ ms}$).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 es otro de los productos de reducción parcial del oxígeno (**Figura 1-6**), pero en este caso se trata de una especie neutra, no radical y relativamente estable (95). La producción de H_2O_2 se da por la dismutación descrita previamente o por diferentes oxidasas, muchas de las cuales actúan en tipos celulares y en compartimentos subcelulares específicos, como la xantina oxidasa (XO), monoamina oxidasa (MAO), o D-aminoácido oxidasa (DAO), entre otras (96).

A diferencia de las otras especies reactivas derivadas del O_2 , presenta una permeabilidad a través de membranas relativamente similar a la del agua (H_2O) y una mayor vida media en la célula, lo cual permite su difusión a través de diferentes compartimentos alejados del sitio de producción (97).

Desde el punto de vista de su reactividad, se trata de un oxidante moderado, capaz de participar en oxidaciones por dos electrones de diferentes moléculas. Los principales blancos intracelulares del H_2O_2 son los tioles (-SH) altamente reactivos de las enzimas peroxirredoxinas, responsables de su detoxificación y de la transmisión de señales oxidativas en la célula (98).

Otro blanco relevante del H₂O₂ es la reacción con centros metálicos, conocida como reacción de Fenton (99):



De la reacción del H₂O₂ con el metal surge un oxidante fuerte como lo es el radical hidroxilo ([•]OH), aunque en ciertos casos el oxidante que se forma consiste en una forma activada del centro metálico. Estrictamente, la reacción de Fenton involucra un átomo de Fe²⁺, pero existe una química similar para la reacción con Cu²⁺ (95).

Radical hidroxilo ([•]OH)

La formación biológica del [•]OH depende principalmente de la química de Fenton mencionada anteriormente. Otra fuente alternativa puede ser la descomposición del peroxinitrito, un proceso que se describe en la sección c).

El [•]OH es un oxidante muy fuerte (**Figura 1-6**) (100), capaz de reaccionar con diversas biomoléculas a velocidades controladas por difusión ($k > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Cuenta con una vida media extremadamente corta (10⁻⁹ s) y, por ende, su capacidad de difusión en la célula es muy limitada. A pesar de su gran reactividad, el [•]OH presenta una toxicidad relativa. Esto se explica porque al reaccionar de forma inespecífica con un gran número de blancos moleculares, es poco probable que provoque la oxidación de residuos críticos en las enzimas, por ejemplo.

Un caso donde existe cierta especificidad en el daño es la reacción del H₂O₂ con Cu⁺ complejoado al ADN en una reacción análoga a la de Fenton. En este caso la generación sitio-específica de [•]OH posibilita la oxidación del ADN formando 8-oxoguanina, cual puede resultar en mutaciones en el ADN y/o muerte celular. El radical [•]OH también es capaz de iniciar reacciones en cadena de peroxidación lipídica. La acumulación de hidroperóxidos lipídicos daña la membrana alterando su función, y además éstas especies generan aldehídos derivados altamente citotóxicos (101).

Como se ha descrito en esta sección, las especies reactivas del oxígeno se forman en condiciones fisiológicas en las diferentes células. La presencia ubicua de enzimas capaces de detoxificar O₂^{•-} y H₂O₂ muestra que es necesario prevenir el desbalance en la producción de oxidantes que llevaría a la modificación de componentes celulares. Esto quedó demostrado tempranamente, cuando se generaron bacterias de *Escherichia coli* deficientes en actividad SOD o catalasa/peroxidasa sufrían defectos de crecimiento (102).

b) Óxido nítrico

El $\cdot\text{NO}$ es un radical libre sintetizado enzimáticamente como se describió en la sección 1.II-a. Se conocen numerosas funciones asociadas a esta especie: regulación del tono vascular, agregación plaquetaria, proliferación celular, neuromodulación, entre otras (103-105). En este trabajo, se hará foco en la función citotóxica que presenta el $\cdot\text{NO}$, fundamentalmente en el contexto de la activación de los macrófagos por exposición a patógenos.

En cuanto a sus propiedades, el coeficiente de difusión ($D = 350 \mu^2\text{s}^{-1}$) (106) y la alta solubilidad en membranas (coeficiente de permeabilidad, $P_m = 93 \text{ cm}^{-1}$) (44) del $\cdot\text{NO}$, determinan que la bicapa lipídica no sea una barrera efectiva para este pequeño radical. Por otro lado, reacciona lentamente con la mayoría de las biomoléculas y es capaz de difundir varios diámetros celulares ejerciendo efectos parácrinos (107).

El grupo hemo de la hemoglobina constituye un blanco muy importante para el $\cdot\text{NO}$, con el cual reacciona rápidamente ($k = 8.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), dando nitrato y metahemoglobina. En la vasculatura, la $t_{1/2}$ del $\cdot\text{NO}$ se ve fuertemente disminuida por la alta concentración de oxihemoglobina (20 mM) dentro de los glóbulos rojos (107,108). La reactividad con centros de Fe^{2+} también media la activación de la enzima guanilato ciclasa por parte del $\cdot\text{NO}$ y su efecto vasodilatador, uno de los principales roles conocidos de este radical (109,110). El $\cdot\text{NO}$ es capaz de reaccionar también con tioles proteicos, formando S-nitrosocisteínas, un tipo de modificación reversible involucrada en los mecanismos de regulación enzimática (111).

Por otro lado, el $\cdot\text{NO}$ es capaz de reaccionar con O_2 ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) generando varias especies intermedias (Ec.1-5 a 9), algunas de ellas con relevancia en la nitración y oxidación de biomoléculas. Entre las especies intermedias reactivas que se forman, está el radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), el óxido de nitrógeno (III) (N_2O_3) y el óxido de nitrógeno (IV) (N_2O_4), llegando a productos finales más estables como el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-) (112). Este proceso, conocido como autooxidación, cobra mayor importancia en membranas debido a la mayor concentración de las especies involucradas (113).



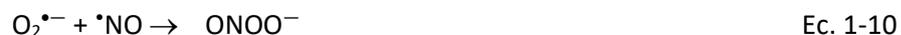


Los efectos deletéreos del $\cdot\text{NO}$ se deben principalmente a la formación de especies derivadas, como ser el $\cdot\text{NO}_2$ (mencionado previamente) o el ONOO^- , formado por la reacción de $\cdot\text{NO}$ con $\text{O}_2^{\cdot-}$. El $\cdot\text{NO}_2$ es un radical con poder oxidante moderado ($\cdot\text{NO}_2/\text{NO}_2^- = 0.9 \text{ V}$) y participa en reacciones de recombinación con otros radicales ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), adición a dobles enlaces, transferencia de electrones y de abstracción de átomos de hidrógeno en enlaces carbono-hidrógeno por ejemplo en compuestos fenólicos (114). Entre las reacciones de recombinación se encuentran las reacciones con radicales lipídicos y proteicos que llevan a la formación de compuestos nitrados, cuya detección es quizás la forma más utilizada para evidenciar daño nitro-oxidativo en muestras biológicas (115-117).

Por su parte, el ONOO^- es altamente oxidante y la reactividad de esta especie con distintas biomoléculas se abarca en la siguiente sección.

c) Peroxinitrito y su relevancia como agente citotóxico

Como se mencionó previamente, el peroxinitrito (ONOO^-) se forma por la reacción entre los radicales $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ a velocidades controladas por difusión (Ec. 1-10, $k \sim 10^9\text{-}10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (118).



La forma aniónica (ONOO^-) está en equilibrio con su ácido conjugado, el ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pKa} = 6.8$ (119)), Ec. 1-11. A pH fisiológico predomina la forma aniónica (80%), sobre la forma ácida (20%) y para simplificar, se utiliza el término peroxinitrito para hacer referencia a ambas especies, ONOO^- y ONOOH .



El ONOOH puede difundir libremente a través de las membranas biológicas ($P_m \sim 1 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$), mientras que el anión ONOO^- , requiere de canales aniónicos para atravesar la bicapa lipídica (120).

Desde el punto de vista de su reactividad, el ONOO^- es un potente oxidante y un nucleófilo fuerte, que puede generar oxidaciones en distintas biomoléculas por uno o dos e^- , con potenciales de reducción de $E^{\circ'}_{\text{ONOO}^-/\bullet\text{NO}_2} = 1.6 \text{ V}$ y $E^{\circ'}_{\text{ONOO}^-/\text{NO}_2^-} = 1.3 \text{ V}$, respectivamente (121,122). El gran número de blancos disponibles limita drásticamente la $t_{1/2}$ del peroxinitrito en medios biológicos ($\sim 10\text{-}20 \text{ ms}$), fenómeno que históricamente ha dificultado el estudio de los efectos de esta especie en distintos procesos (123). Sin embargo, el desarrollo tecnológico ha permitido mejorar los métodos de detección de peroxinitrito en sistemas biológicos, a pesar su naturaleza efímera, y conocer así con detalle el rol de esta especie en procesos fisiológicos y patológicos (124).

Reactividad

La química del peroxinitrito es compleja, presenta dependencia con el pH y puede involucrar reacciones directas o radicalares. En el primer caso, el ONOO^- puede actuar como nucleófilo fuerte o participar en oxidaciones por un e^- con metales de transición; y por su parte el ONOOH puede oxidar diferentes sustratos por dos e^- , ver reacciones I y II de la **Figura 1-7** (125). Por otro lado, el ONOOH puede sufrir homólisis, generando los radicales $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{NO}_2$. La velocidad de descomposición del ONOOH depende del pH con una k de 0.9 s^{-1} a pH 7.4 y 37°C (125). Sin embargo, otras reacciones directas del peroxinitrito hacen que la homólisis en las células sea poco relevante. De hecho, el principal blanco del peroxinitrito en sistemas biológicos es el CO_2 , que también originará una ruta radicalar, ver reacción III de la **Figura 1-7**. De la reacción del peroxinitrito y el dióxido de carbono (CO_2 , $k = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37°C) surge un intermediario inestable, el nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO_2), que decae a dos radicales libres: radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) y $\bullet\text{NO}_2$ con un rendimiento de 35% (126). Ambos intermediarios son responsables de gran parte de los efectos biológicos del peroxinitrito.

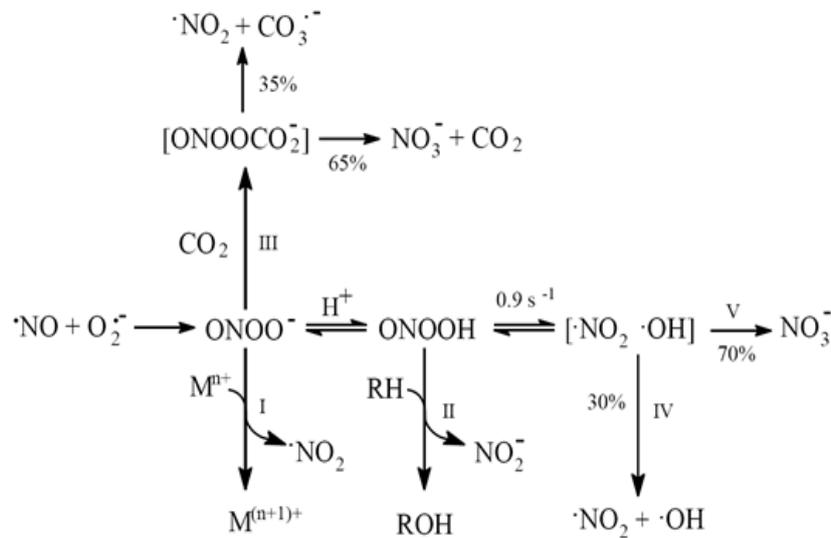


Figura 1-7. Reactividad del peroxinitrito. (I) reacción directa con metales de transición; (II) reacción de oxidación de sustratos por dos electrones; (III) formación de nitrosoperoxocarboxilato y su descomposición; (IV) homólisis del ácido peroxinitroso y (V) rearreglo a nitrato. Tomado de Radi, y col., *FRBM* 2001.

Formación endógena de peroxinitrito

Los precursores para la formación de peroxinitrito son radicales libres de corta vida media en un contexto biológico y cuentan con blancos importantes que los mantienen en un bajo estado

estacionario (127). En condiciones fisiológicas la abundancia de enzimas superóxido dismutasas (~10-20 μM) tanto a nivel citosólico (CuZnSOD), mitocondrial (MnSOD) como extracelular (EC-SOD), lleva a la rápida dismutación ($k \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) del $\text{O}_2^{\cdot-}$ para dar H_2O_2 (128). El $\cdot\text{NO}$ es la única especie capaz de competir con esta reacción

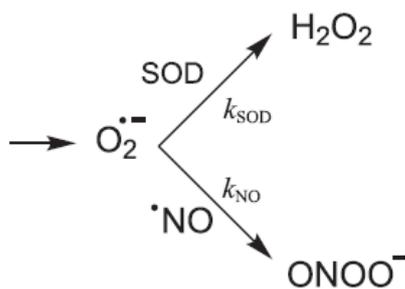


Figura 1-8 Competencia entre la SOD y el $\cdot\text{NO}$ por la reacción con $\text{O}_2^{\cdot-}$. Tomado de Radi R, *PNAS* 2018.

(Figura 1-8). Sin embargo, el $\cdot\text{NO}$ puede difundir varios diámetros celulares y al alcanzar un vaso

sanguíneo es consumido rápidamente por la reacción con oxihemoglobina (107,108). Para que la reacción entre ambos tenga lugar, es necesario que se coincidan temporal- y espacialmente y a su vez que exista un aumento en la concentración de $\cdot\text{NO}$ para competir a la reacción de dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ (129). Dada la carga negativa del $\text{O}_2^{\cdot-}$ y su limitada difusión, es de esperar

que el peroxinitrito se forme principalmente en el sitio de producción de $O_2^{\bullet-}$ (por ejemplo: en fagosomas de macrófagos, matriz mitocondrial y citosol).

Desde la publicación de los primeros trabajos que señalaban la formación de peroxinitrito en sistemas biológicos (18), se ha demostrado su papel en escenarios fisiológicos y patológicos, como inflamación, envejecimiento, hipertensión, neurodegeneración, entre otros (129). A su vez, el uso de sondas reporteras, cada vez más selectivas, ha permitido cuantificar la producción de peroxinitrito en distintos modelos biológicos a pesar de su naturaleza elusiva (**Ver tabla 1-3**)(124,130).

Tabla 1-3. Flujos de formación de peroxinitrito determinado en distintos modelos. Tomado de Ríos, N y col., Nitric Oxide 2016.

Cell type/line	Stimulus	Peroxynitrite production	Peroxynitrite flux ^a	Detection method
Primary rat alveolar macrophages[34]	PMA	Extracellular	0.11 nmol 10^6 cell min^{-1}	HPA-nitration
J774.2 macrophages[37]	LPS	Extracellular	~0.0045 nmol 10^6 cell min^{-1}	DHR
J774A.1 macrophages [60]	IFN γ -LPS, PMA	Extracellular	0.13 nmol 10^6 cell min^{-1} ^b	DCFH ₂
J774A.1 Macrophages [147]	IFN γ -LPS, PMA	Extracellular	0.06-0.12 nmol 10^6 cell min^{-1}	CBA
BAECs [130]	Basal	Intracellular	0.6 μ M. min^{-1}	FL-B
BAECs [17]	Basal	Mitochondria	180 μ M. min^{-1}	Theoretical ^c
J774A.1 macrophages [130]	IFN γ -LPS, <i>T. cruzi</i>	Phagosome	12 μ M. min^{-1}	FL-B

Efectos biológicos

El peroxinitrito es capaz de oxidar tioles críticos en proteínas, llevando a la inactivación o modificación de la actividad de enzimas como se ha demostrado para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y creatina quinasa, entre otras (19,131,132). Sin embargo, los tioles

más reactivos son los presentes en las enzimas peroxirredoxinas que reaccionan a velocidades muy altas ($k \sim 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), en comparación con otros grupos tioles más abundantes como el del GSH (133,134). Estas enzimas protegen del posible daño oxidativo por peroxinitrito y constituyen factores de virulencia en organismos patógenos como *T. cruzi* que deben enfrentarse al ataque oxidativo en la infección a mamíferos (135,136). Sin embargo, se postula que a su vez la oxidación de tioles en las peroxirredoxinas se relaciona con eventos de señalización dependientes de peróxidos (129). Por otro lado, el peroxinitrito reacciona con centros metálicos en las proteínas y se conocen ejemplos de enzimas inactivadas de esta forma (por ejemplo, citocromo *c* y aconitasa) (134).

Otros efectos biológicos del peroxinitrito son dependientes de los radicales $\text{CO}_3^{\bullet-}$ y $\text{}^{\bullet}\text{NO}_2$ que se forman a partir de la reacción con CO_2 . La modificación más estudiada es la nitración de tirosinas proteicas, donde un oxidante fuerte abstrae un e^- generando un radical tirosilo, que luego se combina con $\text{}^{\bullet}\text{NO}_2$ para formar 3-nitrotirosina (3- NO_2 -Tyr). Además de las consecuencias biológicas de esta modificación (pérdida o ganancia de función enzimática), la detección de residuos nitrados de tirosina ha servido tradicionalmente como huella de la formación de peroxinitrito (134). Las proteínas no son las únicas susceptibles al daño por peroxinitrito, sino que éste es capaz de generar oxidación y nitración en bases nitrogenadas del ADN, así como cadenas de lipoperoxidación y nitración de lípidos de membrana (137-140).

Las modificaciones mencionadas anteriormente, explican la gran toxicidad del peroxinitrito hacia distintos organismos patógenos. Esto puede evidenciarse por la exposición *in vitro* de distintos organismos a adiciones únicas o de forma continua, pero también a partir de modelos de generación biológica de peroxinitrito. Prototípicamente, los macrófagos son un modelo ideal de formación de este oxidante, mediante la activación de la producción simultánea de $\text{}^{\bullet}\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$. La modulación farmacológica y/o manipulación genética de la formación de radicales precursores en células y animales ha permitido demostrar la relevancia de la formación de peroxinitrito en distintos modelos de infección por organismo patógenos. Como parte de este trabajo se realizó un relevamiento de la evidencia disponible en la literatura que relaciona la formación de peroxinitrito con la eliminación de distintos tipos de patógenos, datos que fueron analizados en una revisión (22). Más adelante se discutirá el rol del peroxinitrito específicamente en el contexto de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

IV- Interacción macrófago-*Trypanosoma cruzi*

a) Enfermedad de Chagas y *Trypanosoma cruzi*

Enfermedad de Chagas

El “mal” o enfermedad de Chagas (también conocida como tripanosomiasis americana) es una patología infecciosa endémica en América Latina principalmente, aunque en expansión a otras áreas del planeta (**Figura 1-9**). Se estima que al menos 7 millones de personas se encuentran infectadas con este parásito y que otros 28 millones de personas se encuentran en riesgo de infección (141,142). Los países con mayor prevalencia de infectados son Bolivia, Argentina, Paraguay y Ecuador. El agente etiológico de esta enfermedad es el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La forma principal de transmisión es el contacto entre los humanos y las heces u orina de los insectos triatomíneos, su principal vector. Otras vías de contagio son: vertical, por transfusiones, trasplantes de órganos y por consumo de alimentos contaminados con heces de triatomíneos infectados. Por las características de la transmisión, la patología se presenta principalmente en regiones rurales y con condiciones de vivienda precarias. Sin embargo, en las últimas décadas se ha evidenciado que la mayoría de los diagnósticos se han dado en regiones

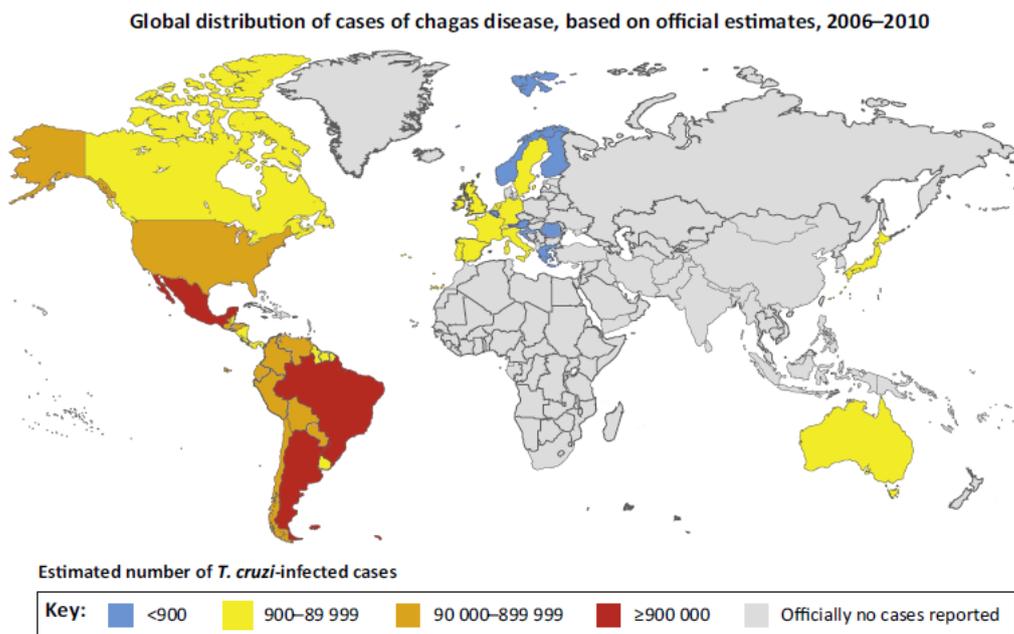


Figura 1-9. Distribución geográfica de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Extraído de Pérez, C y col., *Trends in Parasitology*, 2015.

urbanas, y se atribuye este fenómeno a la migración y gran movilidad propia de estos tiempos, tomando importancia las rutas de transmisión no vectoriales (143).

La infección con *T. cruzi* se caracteriza por una fase aguda, que comienza poco tiempo después de la infección, con presencia de parásitos circulantes en sangre. Esta etapa puede ser asintomática o presentar síntomas leves: reacción local en el sitio de infección (chagoma), signo de Romaña (conjuntivitis e inflamación periorbital por contacto de la mucosa ocular con el parásito), fiebre, hepatomegalia y esplenomegalia. Luego se establece una respuesta inmune capaz de disminuir la parasitemia, aunque *T. cruzi* permanece alojado “silenciosamente” en algunos tejidos, y los pacientes ingresan en lo que se conoce como fase crónica. El 70 % de los pacientes infectados permanecen asintomáticos en una forma “indeterminada” de la enfermedad, mientras que el 30% restante desarrollarán patologías cardíacas o digestivas después de 10 a 30 años de la infección. Los trastornos más comunes son la cardiopatía dilatada y megaformaciones como megacolon y megaesófago principalmente. Se desconocen hasta el momento cuáles son los factores particulares, propios del parásito o del hospedero, que determinan el destino hacia la fase crónica sintomática (144). En general, se acepta que el balance entre la resistencia del parásito y la respuesta inmune del hospedero es crucial para el desarrollo de la patología. Las evidencias muestran que la inflamación asociada a la infección juega un rol fundamental en el progreso de la enfermedad, ya que en los pacientes con cardiopatía chagásica predomina el perfil pro-inflamatorio de citoquinas y otros marcadores, mientras que en pacientes asintomáticos se observa una respuesta inmune de tipo reguladora (143).

Los tratamientos disponibles hasta el momento son etiológicos y son más efectivos durante la fase aguda de la infección. Se trata de las drogas nifurtimox y el benznidazol, cuyo mecanismo de acción no se conoce en detalle a pesar de décadas de investigación (145). Ambos muestran ser eficaces para eliminar el parásito en esta etapa inicial de la enfermedad y en pacientes menores de 14 años, pero presentan importantes efectos secundarios. El benznidazol generalmente es mejor tolerado, más eficaz y tiene mayor penetración en los tejidos que el nifurtimox, pero aun así, el tratamiento debe ser discontinuado en un 9- 29% de los casos debido a sus efectos secundarios (143).

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado perteneciente a la familia de tripanosomatídeos en el cual también se clasifican otros protozoarios como *Leishmania spp* y otros *Trypanosoma spp*.

El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Figura 1-10) requiere de un insecto vector y un hospedero mamífero. El llamado ciclo selvático comprende la transmisión desde insectos hematófagos triatomíneos a pequeños vertebrados salvajes. La transmisión al ser humano es altamente dependiente de las condiciones de vida que permitan la convivencia del vector con el hombre, que dan lugar al llamado ciclo doméstico (146). En particular en América del Sur, *Triatoma infestans* (“vinchuca”) ha sido la principal especie de insecto

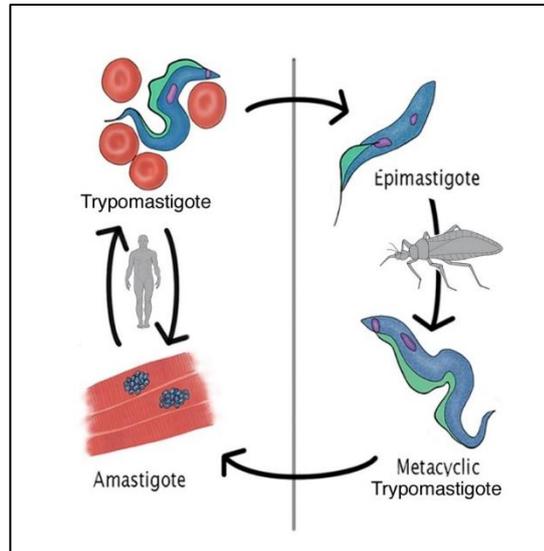


Figura 1-10. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de chagasfound.org.

involucrada en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* (147). El parásito es capaz de replicarse por fisión binaria en el tracto digestivo de la vinchuca en la forma epimastigota, para luego diferenciarse a la forma infectiva, tripomastigota, en un proceso llamado metaciclogénesis. Cuando el insecto pica a un humano, también deposita sus heces conteniendo parásitos en la zona cercana a la herida. El contacto de las heces con la herida o alguna mucosa del organismo permite la entrada de *T. cruzi* a su hospedero mamífero. Los tripomastigotas son capaces de invadir diferentes células y se transforman en amastigotas intracelulares replicativos. Luego sufren la transformación a tripomastigotas y producen la lisis de la célula hospedera, liberando formas infectivas que diseminarán la infección por el organismo. El ciclo se completa cuando un triatomíneo pica a un paciente infectado (146).

La especie *T. cruzi* en realidad comprende un grupo muy heterogéneo de cepas, con evolución clonal e hibridaciones, y esto ha complejizado la nomenclatura y clasificación en la literatura. Actualmente se acepta que existen 6 grupos filogenéticos principales denominados DTUs (*Discrete typing units*), donde se agrupan cepas que se relacionan más entre sí que con todas las otras existentes, siendo identificables por distintos marcadores (genéticos, moleculares, inmunológicos, geográficos) (148). Las cepas circulantes más prevalentes pertenecen a los DTU

I y II, que equivalen a los grupos Tc.I y Tc.II de la clasificación anterior: Tc. I, con ciclos selváticos y domésticos y que comprende cepas como Dm28c, Sylvio X10, G, Tulahuen, entre otras y T.c II, que tiene origen doméstico e incluye a las cepas Esmeraldo, Y, etc. La excepción más importante la constituye la cepa CL-Brener de circulación doméstica, que antes pertenecía al grupo II y ahora se clasifica en el DTU VI. De hecho, se determinó que CL-Brener es una cepa híbrida, proveniente de los DTUs Tc.II y III (149,150).

b) Reconocimiento y fagocitosis

La interacción patógeno-hospedero que tiene lugar en la infección de macrófagos por *T. cruzi* implica una importante respuesta citotóxica dependiente de oxidantes y como contraparte, un sofisticado sistema antioxidante en el parásito. En esta sección se discutirán los aspectos específicos que se conocen sobre esta interacción.

Se han descrito una gran cantidad de moléculas presentes en la superficie de los tripomastigotas de *T. cruzi* que participan de la interacción con la célula hospedera. Las más abundantes son las glicoproteínas de tipo mucina (representan el 1% del genoma) y las transialidasas, responsables de transferir residuos de ácido siálico desde la superficie de la célula a glicoconjugados del parásito (como las mucinas). A nivel de la célula hospedera también se han descrito varios receptores que participan del reconocimiento como el receptor de manosa, receptor de Fc, TLRs, receptor *scavenger* entre otros)(151).

La interacción con el parásito lleva a la fosforilación de tirosinas clave, mediada principalmente por la quinasa del 3-fosfatidilinositol (PI 3-K) y PKC desencadenando la internalización del parásito por fagocitosis, movilización de lisosomas para su fusión con el fagosoma y la activación de la Nox2 (151-154). Durante la fagocitosis, la célula emite pseudópodos a partir de la membrana plasmática, englobando completamente al patógeno, un proceso que requiere de activación de la polimerización de la actina y remodelación del citoesqueleto. Luego de sellada la membrana que envuelve al patógeno se forma la vacuola parasitófora y ocurre el proceso de maduración de la misma, por fusión con endosomas y lisosomas hasta formar el fagolisosoma (151).

Por otro lado, en macrófagos infectados con *T. cruzi* se da la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α), mediada principalmente por mucinas del parásito a través de la activación de las vías de NF- κ B y MAPK (155). La iniciación de estas cascadas de señalización

depende de la activación a través de los receptores TLR2 y TLR4 (36,156). En particular, el aumento del IFN- γ ha sido descrito en numerosos trabajos y se ha vinculado con el control de la infección por *T. cruzi* (157). Este contexto inflamatorio dependiente de IFN- γ lleva, entre otras cosas, a la inducción de la iNOS por vías de señalización discutidas anteriormente.

c) Biología redox en el fagosoma

El $O_2^{\bullet-}$ derivado de Nox2 se forma hacia el interior del fagosoma y el $^{\bullet}NO$ difunde desde el citosol, dando lugar a la formación de $ONOO^-$ dentro de la vacuola (Ver **Figura 1-11**). El escaso espacio entre la membrana del fagosoma y el parásito (<20 nm), lleva a que se formen altas concentraciones de peroxinitrito en esta zona (rango milimolar), capaces de promover oxidaciones en la superficie del parásito de forma directa o dependientes de radicales derivados (158). La presencia de CO_2 no evita que el peroxinitrito sea capaz, incluso, de difundir y oxidar blancos intracelulares de *T. cruzi* (158,159). A su vez, se ha determinado que aún en presencia de $^{\bullet}NO$, parte del $O_2^{\bullet-}$ intrafagosomal es capaz de difundir hacia el interior de *T. cruzi* y reaccionar con el $^{\bullet}NO$ que alcanza el citosol del parásito. Esto implica que se forma $ONOO^-$ tanto en el lumen del fagosoma como en el interior del patógeno (26).

Por otro lado, el pH ácido del fagosoma de *T. cruzi* (pH = 5,3) determina que cerca de un 30 % del $O_2^{\bullet-}$ se encuentre como HO_2^{\bullet} , especie con mayor capacidad de difundir y oxidar blancos intracelulares en el parásito (26). También, por efecto de la captación de SOD extracelular en el fagosoma o de la propia Fe-SOD de *T. cruzi* (160,161), el $O_2^{\bullet-}$ puede dismutar en el lumen de la vacuola formando H_2O_2 , el cual también tiene efectos citotóxicos.

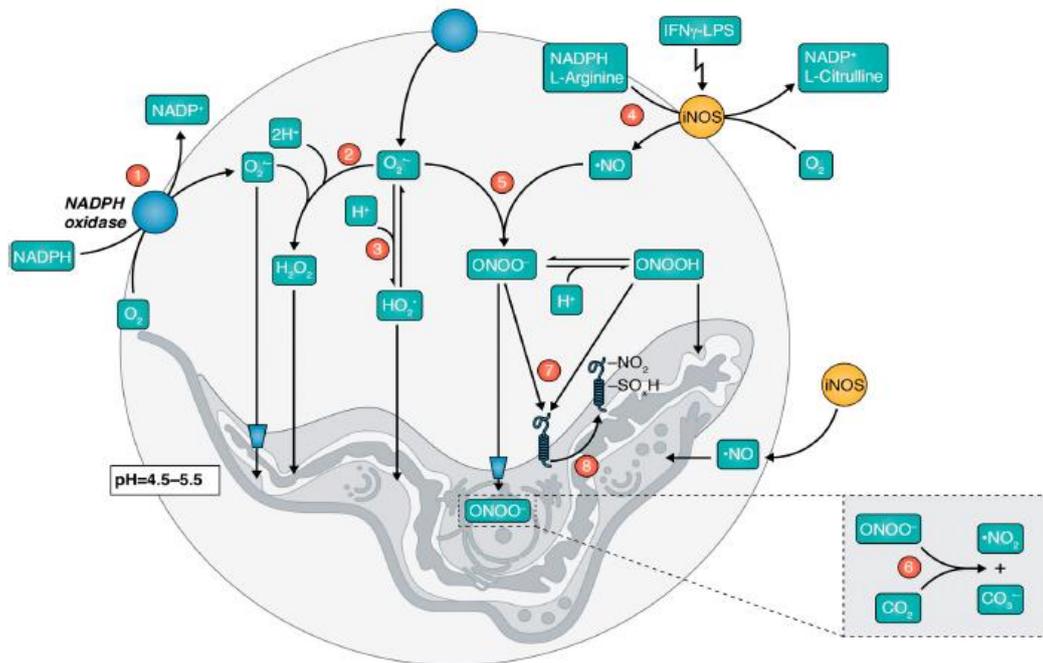


Figura 1-11. Reacciones en el fagosoma de *T. cruzi*. La Nox2 se ensambla en la membrana del fagosoma y dirige la producción de O₂^{•-} hacia el interior de la vacuola. Éste puede dismutar a H₂O₂ por acción de la SOD, y generar así daño oxidativo en el parásito. Tanto el radical aniónico O₂^{•-} como la forma protonada HO₂[•] se difunden a través de la membrana de *T. cruzi*. A su vez, el •NO es capaz de difundir desde el citosol y reaccionar rápidamente con el O₂^{•-} para formar ONOO⁻ en el lumen del fagosoma o en el citosol del parásito. El ONOO⁻ es capaz de oxidar directamente blancos moleculares o a través de los radicales derivados de la reacción con CO₂. El •NO por su parte también tiene efectos citotóxicos sobre *T. cruzi*. Tomado de Piacenza, L y col. *JEM*, 2019.

d) Evidencias sobre la relevancia de los oxidantes en el ataque a *Trypanosoma cruzi*

Tanto la inducción de la expresión de la iNOS como la activación de la Nox2 están fuertemente relacionadas con la eliminación del parásito en macrófagos. Está demostrado que ratones deficientes en IFN-γ (IFN-γ^{-/-}) son incapaces de controlar la infección, debido a que presentan una respuesta inflamatoria deficiente y no pueden inducir la producción de •NO por la iNOS (162). A su vez, la inhibición farmacológica o la ablación genética de la iNOS lleva a que los ratones no controlen la proliferación del parásito, evidencias que, en conjunto con la toxicidad del •NO observada *in vitro*, resaltan la importancia de esta enzima en el contexto de la infección (163,164).

En la infección de macrófagos se ha demostrado que la activación de la Nox2 en simultáneo con la producción de NO en los primeros 30-90 minutos de la fagocitosis resulta en un mayor control de la infección que si se estudia su toxicidad individual, subrayando que la formación de ONOO^- es importante en la eliminación de *T. cruzi* (158).

Por otro lado, la manipulación de los componentes del sistema antioxidante de *T. cruzi* ha contribuido a determinar la relevancia de la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO y sus derivados (H_2O_2 y ONOO^-). Por ejemplo, la infección de macrófagos con una cepa de *T. cruzi* sobreexpresante de Fe-SODB (isoforma de SOD predominante en el citosol), muestra que la mayor detoxificación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ lleva a una proliferación descontrolada del parásito (26). De la misma manera, la sobreexpresión de las peroxiredoxinas de *T. cruzi*, capaces de detoxificar tanto H_2O_2 como ONOO^- , aumenta la virulencia de los parásitos tanto *in vitro* como *in vivo* (158,165).

Sin embargo, la evidencia acerca del papel de la Nox2 en el contexto de la infección por *T. cruzi* se ha visto cuestionada en los últimos tiempos. En los primeros estudios de infección a macrófagos, se observó que clones de células incapaces de formar $\text{O}_2^{\bullet-}$ tras la fagocitosis de *T. cruzi* no lograban controlar la infección, y este resultado se revertía al agregar una fuente exógena de H_2O_2 (glucosa oxidasa)(166,167). De esta forma se demostraba que, al igual que en otros modelos de infección por patógenos, la actividad Nox2 se relaciona con el control de la proliferación y/o sobrevida. Estudios más recientes realizados con el modelo de ratones $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ que no expresan la Nox2, muestran resultados que se contraponen a la hipótesis de que esta enzima contribuye en la respuesta contra *T. cruzi*. Si bien los animales KO mueren de forma prematura por la infección, se observan parasitemias (cantidad de parásitos en sangre) similares a las que se encuentran en los ratones *wt* (168-170). Incluso en un trabajo se reportan menores parasitemias en los animales $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ y se le atribuye un rol contraproducente a la formación de oxidantes en el contexto de la infección por *T. cruzi* (171). También se ha estudiado la invasión en los tejidos de ratones *wt* y $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ y no se han observado diferencias significativas (170). En cuanto a la infección *in vitro*, se reporta que macrófagos peritoneales y de médula ósea $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ con parásitos de las cepas Y y CL-Brener se infectan en menor proporción que los *wt* (170,171), en contraste con lo esperado según los antecedentes acerca del rol de la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y derivados como agentes citotóxicos.

Este tipo de resultados, ha llevado a plantear el concepto de que el $\text{O}_2^{\bullet-}$ no es importante en la inhibición de la proliferación o destrucción del parásito en la fase aguda de la infección. Sin embargo, esta visión deja abierta la pregunta de por qué los ratones $\text{gp91}^{\text{phox-/-}}$ son más susceptibles a la infección por *T. cruzi* y mueren de forma prematura. Algunos plantean que la

ausencia de $O_2^{\bullet-}$, elimina uno de los blancos importantes del $\bullet NO$, aumentando los niveles de estado estacionario de este último y generando una vasodilatación exacerbada. Sin embargo, este factor no explica la mayor mortalidad, dado que el restablecimiento de la presión arterial no previene del colapso del animal (170). Además se ha reportado que el exceso de $\bullet NO$ en ratones $gp91^{phox-/-}$ puede promover un fenotipo pro-arritmogénico en cardiomiocitos y contribuir a la patología cardíaca (169). En otro modelo de animales deficientes en Nox2 ($p47^{phox-/-}$) se observa mayor colonización de los tejidos por parte de *T. cruzi* y menor supervivencia del ratón. Los autores describen que existe una respuesta de linfocitos TCD8⁺ deficiente, con un perfil de citoquinas alterado, dando cuenta de la mayor mortalidad de los animales infectados (172).

Si bien es posible que todos los mecanismos contribuyan a la susceptibilidad aumentada en animales deficientes en Nox2, la bibliografía disponible es contradictoria con respecto al rol que tienen los oxidantes en el ataque a *T. cruzi*. La hipótesis que guió este trabajo es que la formación de $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$ es muy relevante en el control de la infección por *T. cruzi*, dadas las evidencias obtenidas tanto *in vitro* como *in vivo* mediante el uso de cepas sobreexpresantes de SOD o peroxirredoxinas, y que la ausencia de estas actividades lleva a una peor evolución del hospedero por la proliferación descontrolada del parásito.

2- OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir a determinar el rol del superóxido en el control de la infección de macrófagos por *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos

- 1- Caracterizar la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en cultivos de macrófagos derivados de médula ósea de ratones iNOS^{-/-} y gp91^{phox}^{-/-}.
- 2-Determinar la relevancia de las enzimas iNOS y gp91^{phox} en la respuesta citotóxica de macrófagos infectados con *Trypanosoma cruzi*
- 3-Evaluar los mecanismos superóxido-dependientes que operan *in vivo* para controlar la infección por *Trypanosoma cruzi* en ratones *wt* y gp91^{phox}^{-/-}.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos animales

Se adquirieron cepas de animales modificados genéticamente en *The Jackson Lab* que presentan una deficiencia de la enzima Nox2 o iNOS: C57BL/6.129S6.Cybb, llamados gp91^{phox}^{-/-} y CByJ.129P2(B6)-*Nos2*, llamados iNOS ^{-/-}. Estas colonias fueron mantenidas en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación (UATE) del Instituto Pasteur de Montevideo en condiciones SPF ("*specific pathogen free*") y luego trasladados a la Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación de la Facultad de Medicina (URBE) para realizar los experimentos.

Cultivos celulares

Cultivos de macrófagos de línea celular J774A1.1. Las células se obtuvieron en la empresa ATCC y se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% suero bovino fetal inactivado (SBF) por calor y los antibióticos estreptomina y penicilina (100mg/L). Habitualmente se realizaron 2 pasajes semanales y para los experimentos se utilizaron cultivos 80 % confluentes crecidos en placas de múltiples pocillos.

Obtención de cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM). Los macrófagos se obtuvieron a partir de la diferenciación de células precursoras de médula ósea de los ratones de cepa salvaje o KO. El procedimiento de purificación de médula ósea consiste en sacrificar a los ratones por dislocación cervical e inmediatamente disecar las tibias y fémures en condiciones de esterilidad, abriendo a nivel de las epífisis y perfundiéndolos con medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Luego se centrifuga el contenido y las células obtenidas se plaquean en un medio condicionado (30% v/v) que contiene el factor estimulante de colonias macrofágicas (M-CSF) que favorece la diferenciación de los macrófagos. Este medio se obtiene del sobrenadante de un cultivo de células de la línea de fibroblastos L929. Luego de 7 días de cultivo se descartan las células no adherentes y las no viables, obteniéndose una población pura y homogénea de macrófagos(173).

Caracterización fenotípica del cultivo de macrófagos derivados de médula ósea. Luego de siete días de la extracción de médula ósea se recuperaron las células adherentes y se resuspendieron en PBS frío (4°C) en una densidad de 5x10⁵ células/ml. Se procedió de la misma manera con las células no adherentes y estas servirán como control negativo. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo anti-F4/80 conjugado con Alexa 488 (Rat-anti-mouse Alexa 488, Invitrogen) en una

dilución 1/400 durante 30 minutos en oscuridad. Se lavaron las células con PBS y luego se analizaron por citometría de flujo. Los macrófagos son positivos para F4/80 (173,174).

Obtención de cultivos primarios de macrófagos peritoneales. Los ratones *wt* y *gp91^{phox}-/-* fueron sacrificados y se removió la piel abdominal para exponer el peritoneo. Luego se inyectaron 5 mL de PBS frío en la cavidad peritoneal y se masajó suavemente para despegar las células adheridas. Se extrajo la suspensión celular mediante el uso de una jeringa y se realizaron 2 lavados con PBS. Luego se resuspendieron las células en medio RPMI y se plaquearon en portaobjetos con 8 divisiones (2×10^5 células por pocillo). Los experimentos se realizaron inmediatamente luego de que las células se adhirieron al portaobjetos.

Inducción de la iNOS. La inducción de la expresión de la iNOS se llevó a cabo según protocolos definidos en trabajos previos de nuestro grupo de investigación para cultivos de macrófagos de línea (32). El procedimiento consiste en la exposición de las células a 400U/ml de IFN- γ y 8 μ g/ml de LPS durante 4-5hs. Como inhibidores de la producción de *NO se utilizaron: N-monometilarginina (N-MMA), y la aminometilpiridina (AMPyr), conocidos inhibidores de la isoforma inducible de la NOS.

Activación del estallido respiratorio. El estallido respiratorio en los macrófagos puede desencadenarse por estímulos fagocíticos y por activadores de la Nox2 que no dependen de la fagocitosis. En este trabajo se utilizó el desafío con tripomastigotas metacíclicos (la forma infectiva de *T. cruzi*) como estímulo fagocítico y el éster de forbol PMA (4 μ g/mL), que al ser análogo del diacilglicerol activa directamente a PKC provocando la fosforilación y ensamblaje de la NADPH oxidasa (175).

Inducción de Nox1. Para promover el aumento de la expresión de Nox1 se utilizó LPS como inductor, tratando a los macrófagos durante 24 horas con una dosis de 4 μ g/mL, una concentración menor que la utilizada para inducir la iNOS.

Cultivo de epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos y tripomastigotas de Trypanosoma cruzi. Los epimastigotas de las cepas CL-Brener, Dm28c, CL- Luc:mNeon (176) (cedidos por el Dr. Martin Taylor, London School of Hygiene and Tropical Disease), y CL-Brener sobreexpresantes de las peroxirredoxinas citosólica y mitocondrial (CPX y MPX, conteniendo los vectores pTEXTcCPX-9E10 y pTEX-TcMPX-9E10, cedidos por el Dr. Shane Wilkinson de Queen Mary University of Londres, Reino Unido) fueron mantenidos en un medio BHI (infusión de cerebro-corazón 33g/l, hemina 0.02 g/l, KCl 0.4 g/l y Na₂HPO₄ 4 g/l), suplementado con SBF inactivado

por calor (10%), glucosa (0.3 g/l), estreptomycin (0.2 g/l) y penicilina (200,000 U/l). En el cultivo de los epimastigotas CL-Luc:Neon se adicionó el antibiótico de selección higromicina (Sigma, 150 µg/ml). Los epimastigotas CPX y MPX fueron mantenidos por adición del antibiótico geneticina (G418) al medio de cultivo (250 µg/ml). Para inducir la metacicloogénesis química los epimastigotas de cultivo fueron centrifugados y resuspendidos en una densidad de $3-5 \times 10^8$ cél/ml en un medio denominado orina de triatomíneo artificial (TAU) compuesto por NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM en buffer fosfato 8 mM, con 0.035 % de NaHCO₃, pH 6.0. Se incubaron 2 horas en estufa a 28 °C en medio TAU y luego se resuspendieron en TAU3AAG (TAU adicionado con prolina 10 mM, L-glutamato 50 mM, L-aspartato 2 mM y glucosa 10 mM) en una densidad de $3-5 \times 10^6$ cél/ml, y se incubaron durante 72-96 horas a 28° C. Durante la transformación, parte de los parásitos mueren (aproximadamente 30-40%) y los que se transforman se colectan del sobrenadante del cultivo (177). Los tripomastigotas de *T. cruzi* se obtuvieron infectando células no fagocíticas. Para eso usamos las células Vero, una línea celular epitelial derivada de riñón de mono, adquirida en ATCC (*American type culture collection*). La monocapa de células Vero son expuestas a los tripomastigotas metacíclicos (relación 20:1) durante 12 horas. Luego se lava el cultivo y se mantiene hasta la aparición de los nidos de amastigotas (4-5 días). El medio (DMEM suplementado con SBF 1%) se cambia diariamente hasta observar la salida de los tripomastigotas cuando se lisan las células Vero. Los parásitos recuperados del sobrenadante del cultivo fueron usados para nuevas infecciones de células Vero con el objetivo de mantener la forma infectiva y para experimentos de infección en macrófagos.

Infección en macrófagos por Trypanosoma cruzi. Macrófagos plaqueados en porta-objetos, sin activar o activados con IFN-γ y LPS (inductores de la iNOS), se incubaron con tripomastigotas de *T. cruzi* (en relaciones parásito/macrófago 5:1) durante 2 horas. Luego de lavados los cultivos se fijaron en este punto para evaluar la capacidad invasiva en las distintas cepas de macrófagos, o bien se incubaron durante 24hs en DMEM suplementado con 10% SBF de complementado, a 37°C, 5% CO₂ para evaluar el control de la infección. Finalizada la incubación, los cultivos se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 10 min y se permeabilizaron con tritón al 0.1%. Para teñir los núcleos de los macrófagos y de los parásitos internalizados se incubó a los preparados con una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 10 µM, Invitrogen) en PBS. Luego se evaluó por microscopía de epifluorescencia el porcentaje de macrófagos infectados (con al menos un parásito) y la relación del número de núcleos de parásitos con respecto a los núcleos de macrófagos como índice de infección (N° de núcleos de parásitos/ N° de núcleos de macrófagos*100). En otra serie de experimentos, en vez de fijar el cultivo, se contabilizó la cantidad de parásitos extracelulares en el sobrenadante del cultivo 6 días después de infectado

con CL-Brener. Para ello se recuperó el medio de cultivo, se centrifugó para concentrar la suspensión y se realizó el conteo de parásitos en cámara de Neubauer.

Curvas de crecimiento de epimastigotas. Epimastigotas de distintas cepas, en una densidad de 3×10^8 /ml, fueron tratados durante 1 hora con distintas concentraciones de H_2O_2 (0, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M) en buffer PBS modificado de Dulbecco's (dPBS: NaCl, 137 mM; KCl, 2.7 mM; Na_2HPO_4 , 8 mM; KH_2PO_4 , 1.45 mM; $CaCl_2$, 0.9 mM; $MgCl_2$, 0.5 mM; glucosa, 5.5 mM; L-arginina, 1 mM), luego se lavaron por centrifugación y fueron cultivados en una densidad inicial de 1×10^6 /ml en medio BHI. El crecimiento de cultivo se analizó por espectrofotometría, midiendo turbidez a 600 nm diariamente.

DetECCIÓN DE PROTEÍNAS

Inmunocitoquímica. Macrófagos de médula ósea de ratones *wt* se cultivaron en portaobjetos de 8 divisiones y fueron tratados con LPS (4 μ g/ml) durante 24 horas. Luego se fijaron las células con formaldehído al 3,6 % v/v durante 10 min y se permeabilizaron las células con tritón 0.1% por otros 15 minutos. Se agregó solución de bloqueo conteniendo 0.1% BSA y 0.01 % Tween durante 1 hora. Luego se realizó el marcaje con un anticuerpo primario anti-Nox1 (1:500, *overnight*), DAPI (10 μ M, 15 min) y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa-488 (2 horas), intercalando lavados con Tween 0.1% entre el anticuerpo 1° y 2°. Se montó el preparado utilizando gel de montaje (Gel Mounting, Sigma) y las imágenes se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal.

Western blot. Para evaluar la expresión de distintas enzimas presentes en los macrófagos BMDM y J774A-1 se utilizó la técnica de *western blot*. Para ello se prepararon muestras a partir 1×10^6 células (como mínimo) incubadas con buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, tritón 0.1%, inhibidor de proteasas). Luego se sonicaron las muestras y finalmente se calentó a 90°C durante 5 minutos. Se agregó buffer de la muestra y se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, sembrando aproximadamente 100 μ g de proteína total. Se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa en la modalidad "húmeda" *overnight*. Se bloqueó la membrana con leche al 3% en PBS durante 30 min y luego se incubó los anticuerpos primarios (anticuerpo policlonal anti-iNOS de Alexis; anticuerpo policlonal anti-Nox1 de Sigma-Aldrich; anti Nox2 de Abcam, anti-GAPDH, todos ellos en una dilución 1:1000 en

PBS-Tween 0,1%) desde 2 hasta 16 horas dependiendo el caso. Se lavó el exceso de anticuerpo con PBS-Tween 0.5%. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante una hora en presencia de Tween 0.5%. Para el revelado se utilizaron dos sistemas diferentes: anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano y anticuerpos secundarios con fluoróforos que emiten en el infrarrojo cercano. En el primer caso se reveló con el sustrato SuperSignal West Femto (Thermo) en placa fotográfica y en el otro mediante un detector de fluorescencia NIR ("near infra red"), marca LI-COR, modelo ODYSSEY.

Detección de especies reactivas del nitrógeno

Para los ensayos de formación de oxidantes (con excepción de la técnica de Griess), el medio de cultivo se sustituyó por dPBS, que contiene sustratos necesarios para mantener viables las células y para las actividades enzimáticas fundamentales en este trabajo, al tiempo que se evita la interferencia del rojo fenol o el buffer bicarbonato en las medidas.

Técnica de Griess. La producción de $\cdot\text{NO}$ se evaluó por la técnica colorimétrica de Griess, que mide la acumulación de NO_2^- , producto estable de la oxidación del $\cdot\text{NO}$ (178). El sobrenadante de cultivos de macrófagos activados con IFN- γ y LPS u otros tratamientos se incubó con el reactivo de Griess, el cual se prepara mezclando volúmenes iguales de agua, una solución 0.1% (m/v) de N-naftiletildiamina en 60 %v/v de ácido acético glacial y una solución de 1% de sulfanilamida en 30% v/v de ácido acético glacial. La base de la técnica es la reacción del trióxido de dinitrógeno (N_2O_3 , generado a partir de la autooxidación del $\cdot\text{NO}$ o de la acidificación del nitrito) con la sulfanilamida, produciendo un derivado diazonio que reacciona con N-naftietildiamina para dar el diazo producto coloreado que absorbe a 540 nm. Se incubó una mezcla con proporciones de 1/3 de muestra y 2/3 de reactivo durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm. Como referencia se realizó una curva de calibración con NaNO_2 (0-50 μM).

Detección de ONOO^- . Para la detección de peroxinitrito se utilizó el ácido cumarín-7-borónico (CBA), el cual reacciona con la forma aniónica del peroxinitrito (ONOO^-) con una constante de velocidad lo suficientemente alta como para competir con otros blancos intracelulares ($1,1 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), generando un producto fluorescente (**Figura 3-1**)(179). El CBA se incubó con los macrófagos en una concentración final de 100 μM en dPBS y el producto de la oxidación de la

sonda se detectó en un fluorímetro de placas ($\lambda_{exc}=330$, $\lambda_{em}=450$) en forma continua o se determinó la concentración alcanzada al final de la incubación.

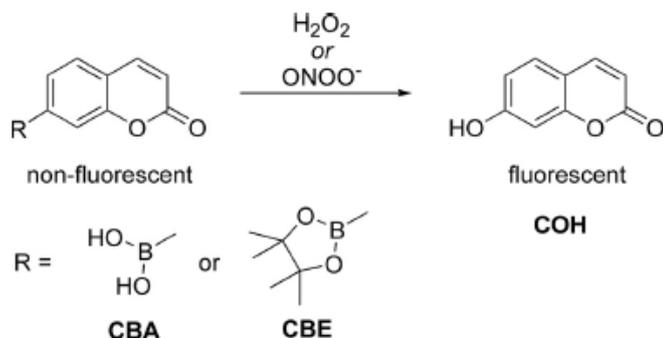
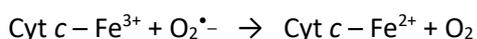


Figura 3-1. Oxidación de CBA. El ácido (CBA) o el éster (CBE) borónico derivados de la cumarina reaccionan con H_2O_2 o con $ONOO^-$ para dar hidroxycumarina (COH) fluorescente como producto. La reacción con $ONOO^-$ tiene una constante de velocidad 1 millón de veces mayor que la de la reacción con H_2O_2 . Tomado de Zielonka, J, y col. JBC, 2010.

Detección de especies reactivas del oxígeno

Reducción de citocromo c^{3+} . El $O_2^{\cdot-}$ es capaz de reducir al citocromo c^{3+} (Ec. 3-1) originando un cambio espectral que se traduce en un aumento de la absorbancia a 550 nm ($\epsilon_{550nm}=21 \text{ mM cm}^{-1}$)(93).



Ec. 3-1

Para medir el estallido respiratorio se determinó la concentración de citocromo c reducido luego de dos horas de incubación de una monocapa de $2,5 \times 10^6$ macrófagos con citocromo c^{3+} ($20 \mu\text{M}$) a 37°C . Como control, se incluyó una condición con el agregado de SOD. La fracción de citocromo reducido que no se forma en presencia de SOD se atribuye a la reacción con $O_2^{\cdot-}$.

Oxidación de Amplex Red. Para medir la formación de $O_2^{\cdot-}$ se utilizó también una técnica indirecta basada en la detección de su producto de dismutación, el H_2O_2 . El método consiste en el uso de una sonda fluorogénica, el Amplex Red, que en presencia de la peroxidasa de rábano (HRP) y H_2O_2 genera un producto fluorescente (**Figura 3-2**), la resurfina ($\lambda_{exc}=530 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=590\text{nm}$)(180).

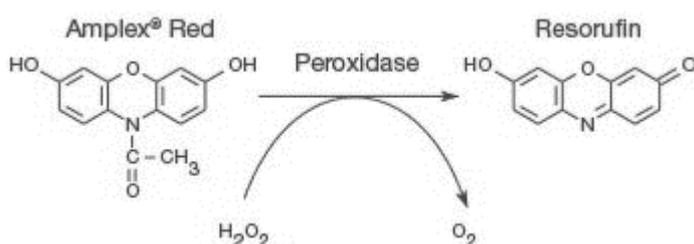
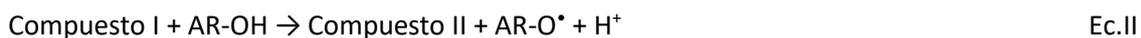


Figura 3-2. Oxidación de la sonda Amplex Red. La reacción del H_2O_2 con la peroxidasa es capaz de generar un radical en la enzima (compuesto I) y este luego oxida al Amplex Red, generando un producto fluorescente, la resurfina.

El mecanismo de reacción implica la formación de un radical en la peroxidasa (compuesto I) por la reacción con H_2O_2 . Luego, el compuesto I es capaz de formar un radical fenólico intermedio en la sonda, que finalmente re-arregla dando el producto fluorescente, resurfina. En las ecuaciones I-III se describe el mecanismo propuesto para las sondas fenólicas (ROH) como el Amplex Red (181).



Para medir el estallido respiratorio en macrófagos se incubó a las células con Amplex Red (50 μM) en dPBS (Dulbecco's PBS) en presencia de HRP (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora y se siguió la oxidación de la sonda en un fluorímetro de placas con monocromador (Varioskan).

Reducción de NBT. El azul de nitro-tetrazolio (NBT) es reducido por el $\text{O}_2^{\bullet-}$ a formazán, que precipita y tiene un color azul oscuro (86), lo que permite identificar fácilmente el sitio de formación del radical por microscopía. Los macrófagos plaqueados en portaobjetos fueron expuestos a los tripomastigotas (con una relación de 10 parásitos por macrófago) en una solución de NBT (5 mg/ml) en dPBS. Luego de 15 minutos se lavaron los cultivos con PBS para retirar el NBT y los parásitos no fagocitados, se fijaron incubando en 4% de formaldehído en PBS durante 10 minutos. La presencia de fagosomas con precipitados de formazán fue analizada por microscopía de contraste de fases (Nikon Eclipse TE200).

Oxidación de Dihidroetidio. El Dihidroetidio (DHE) es la sonda más utilizada para la detección de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en sistemas biológicos, con aplicación desde cultivos celulares hasta su uso en animales. En presencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$, DHE se oxida a 2-hidroxi-etidio (2-OH-E⁺), un producto característico de la reacción con este radical (**Figura 3-3**). Dado que la reacción con otras especies reactivas del oxígeno puede generar otros productos fluorescentes (como el etidio, E⁺), es necesario realizar una separación de los productos por HPLC (104,182,183).

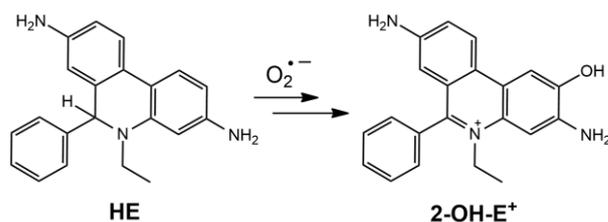


Figura 3-3. Oxidación de DHE (o HE) por $\text{O}_2^{\bullet-}$. La reacción genera un producto específico, 2-OH-E⁺.

Macrófagos de médula ósea *wt* y *gp91^{phox}-/-* cultivados en frascos de 25 cm² se trataron con LPS (4 µg/mL) por 24h. Posteriormente se incubaron con DHE (50 µM) durante 40 minutos a 37°C. Luego se lavó 3 veces con PBS para retirar el excedente de sonda no incorporado y se agregó PMA (4 µg/ml) durante 2 horas adicionales. Finalizada esa incubación, se colectaron las células y resuspendieron en tritón 0.1%. Se realizaron 50 pasajes por jeringa (27Gx1/2" 0.4 × 13 mm) para la disrupción mecánica de las células. Luego se llevó a cabo la precipitación proteica y extracción de los productos de oxidación del DHE con acetonitrilo (100 µL) durante 2 h a 4°C. Se centrifugaron las muestras a 13.000 g durante 5 min y se recuperó la fase orgánica, la cual se secó en evaporador de vacío (Rapid vap, LABCONCO) a 40°C, 100 mbar, 40 rpm durante 24 horas. Finalmente, se resuspendieron las muestras en 100 µL de buffer de muestra (90% agua, 10% acetonitrilo y 0.1% ácido trifluoroacético). Para la detección de los productos de oxidación de la sonda se utilizó un equipo HPLC (Agilent) equipado con detectores en el espectro UV-visible. La columna empleada para separar el Et⁺, 2-OH-E⁺ y el DHE es una C-18 de fase reversa (250 x 4.6 mm, 2.7 µm) equilibrada con 10% Acetonitrilo/0.1% ácido trifluoroacético (TFA). La separación se llevó a cabo incrementando la concentración de ACN desde 10 a 65 % (0.5 mL/min). La elución de los componentes de la mezcla se siguió mediante la detección de fluorescencia ($\lambda_{exc}=510$ nm; $\lambda_{em}=595$ nm)(184). Se realizó una curva de calibración con estándar de 2-OH-Et⁺ (0-2µM) para cuantificar la concentración de este producto en las muestras ($y= 14.62\mu\text{M} \times -0.879$, $R=0.9965$).

Oxidación di-hidro-diclorofluoresceína La sonda *di-hidro-diclorofluoresceína* (DCFH₂) no reacciona con una única especie oxidante. El mecanismo de reacción general es una abstracción por oxidantes fuertes de un electrón (*NO₂, CO₃^{•-}, *OH), produciendo un intermedio radicalar aniónico (DCF^{•-}), que luego se oxida para dar estructuras resonantes responsables del aumento de la emisión de fluorescencia (DCF)(185). El H₂O₂ que se genera a partir de O₂^{•-}, en presencia de hierro, hemo o radicales derivados del ONOO⁻ puede oxidarla y generar señal (186), **Figura 3-4**.

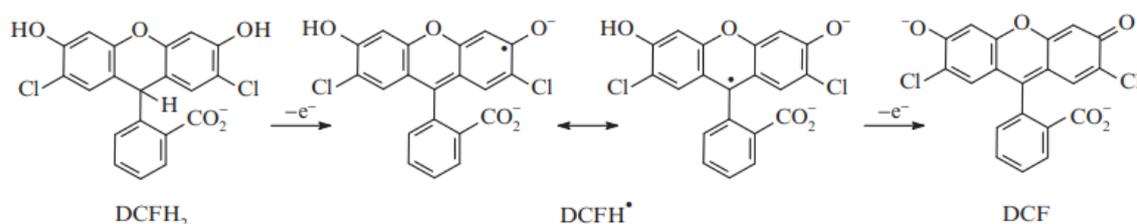


Figura 3-4. Oxidación de DCFH₂. El mecanismo implica dos pasos, primero se genera un intermediario radical (DCF^{•-}) y luego la especie con mayor fluorescencia (DCF). Tomado de Wardman, P y col, *Methods in Enzimology*,

Macrófagos de médula ósea $gp91^{phox-/-}$ fueron cultivados en placas de 24 pocillos y se pre-trataron con LPS (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o infectaron con tripomastigotas de *T. cruzi* durante 24 horas previas al ensayo. Luego se cambió el medio de cultivo por dPBS con DCFH_2 50 μM , en algunos casos se agregó PMA (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como activador y se midió la oxidación de la sonda en un fluorímetro de placas durante 1,5 horas a 37 °C, ($\lambda_{\text{exc}}=480 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$).

Reconstitución del fenotipo salvaje en BMDM $gp91^{phox-/-}$.

Generación de vectores lentivirales conteniendo la secuencia de $gp91^{phox}$. En el laboratorio contamos con los plásmidos necesarios para generar lentivirus de 3ª generación (cedidos por la Dra. Celia Quijano) donde el genoma viral se encuentra dividido para aumentar la seguridad en el trabajo con estos vectores (pCMV-dR8 y pCMV-VSV-G). También adquirimos los plásmidos conteniendo los genes $gp91^{phox}$, $gp91^{phox} + \text{GFP}$ y el plásmido control pLV (Addgene, #30480, #30476 y #12262)(187). Los mismos fueron obtenidos a partir de un cultivo de 250 ml de bacterias *E. Coli* cultivadas en medio LB en presencia de ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37 °C. Se purificaron los plásmidos mediante un kit comercial de midi-prep (Invitrogen). Para generar las partículas lentivirales se siguieron los protocolos generales del *Broad Institute RNAi Consortium* (104). Brevemente, se cultivaron células 293T a un 50 % de confluencia en placas de 10 cm y se incubaron con todos los plásmidos (pCMV-dR8, 3 μg ; pCMV-VSV-G 0.375 μg ; pLV, pLV. $gp91^{phox}$, y pLV. $gp91^{phox}.\text{GFP}$ 3 μg) en presencia de DMEM y Turbofect (18 μl). Se cambió el medio a las 24 horas y se colectaron los sobrenadantes con partículas lentivirales a las 48 y 72 horas. Se removieron células muertas por centrifugación (2000 rpm) y luego se filtró la suspensión con filtro estéril de 0.45 μm . Finalmente, se concentraron las partículas por centrifugación en tubos con filtro (punto de corte 30.000 KDa, Amicon) a 1600 g a 4°C durante 30 min (a partir de 30 mL de sobrenadante cultivo provenientes de 3 placas de 10 cm se obtiene 1 mL de una suspensión concentrada). Se estimó el número de partículas virales infectando células 293T con distintas diluciones de la suspensión obtenida y contando la proporción de células que expresan el gen reportero, obteniéndose un título promedio de 1×10^7 unidades transformantes/mL.

Transfección del gen de $gp91^{phox}$ en BMDM. Se ensayaron distintos momentos para la transfección con lentivirus en los macrófagos de médula ósea (2, 6 y 7 días post extracción), determinando que la condición que mejor funcionó fue 48 h post extracción, es decir durante el proceso de diferenciación y sin agentes para la transfección como el Polybrene (188). Para ello, se incubaron las células con la suspensión concentrada de lentivirus (50-500 μL dependiendo de

la cantidad de macrófagos, relación partículas lentivirales:macrófagos de 2:1) hasta el final del período de diferenciación (7° día post extracción). Luego se evaluó la expresión de gp91^{phox} por PCR tradicional y PCR en tiempo real. También se utilizó PMA como activador clásico del estallido respiratorio para hacer medidas de H₂O₂ por Amplex Red.

Detección de ARNm de Nox1 y 2 por RT-PCR. A partir de 2 x 10⁶ macrófagos por condición se realizó la disrupción mecánica de las células con jeringa en presencia de buffer de lisis. Luego se extrajo el ARN total por medio de un kit comercial (Invitrogen). Para generar el ADN copia se utilizó el kit comercial “Superscript III first strand synthesis system for RT-PCR” (Invitrogen). Brevemente, se preparó una mezcla con 10 µL del ARN extraído, 0.5 mM de dNTPs y 50 ng de hexámeros aleatorios. Se incubó durante 5 min a 65°C y luego 1 min en hielo. Luego se realizó una mastermix acorde a las instrucciones del kit (buffer de reacción, DTT 10 mM, RNAsa OUT 40U/µL, retrotranscriptasa (200 U). Se transfirieron 10 µL de la mezcla a la solución de ARN y se incubó primero 10 min a 25°C y luego 50 min a 50°C. Se termina la reacción a 85°C durante 5 minutos. Finalmente se agrega RNAsa H para degradar el ARN y se incuba 20 minutos a 37°C. Para la PCR se utilizaron 5 µg de ADNc (cuantificado en un equipo NanoDrop) y se realizó una mezcla en el tubo de reacción conteniendo: la polimerasa Taq Platinum (Invitrogen), buffer 10X, dNTPs, MgCl₂, F-primer y R-primer. Para Nox 2 se utilizó el siguiente programa: 94°C 1min, 40 ciclos de 94°C 30s, 61°C 30s, 72°C 1 min, y 10 min 72°C. Para la amplificación de Nox1 se utilizó un ciclado de: 94°C 1min, ciclos de 94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 1 min, y 10 min 72°C).

Infección de macrófagos con Trypanosoma cruzi en presencia de xantina oxidasa. Se realizaron infecciones en macrófagos gp91^{phox}^{-/-} en presencia de una fuente exógena de O₂^{•-}, la enzima xantina oxidasa (XO). De forma de limitar la producción de esta especie en el interior del fagosoma, se procuró que la proteína fuera fagocitada junto con los parásitos. Para ello, 1,8 x 10⁷ tripomastigotas Dm28c fueron incubados con la enzima XO (150 mU/ml) durante 20 min y luego se realizó un lavado con PBS. Se reservaron alícuotas de la suspensión para medir el flujo de O₂^{•-} dependiente de XO antes y después de la incubación con los parásitos mediante reducción de citocromo c³⁺. Finalmente, se realizó la infección en los BMDM durante dos horas. Tras retirar los parásitos no internalizados se agregó medio de cultivo conteniendo xantina (150 µM) y se evaluó el resultado de la infección a las 24 horas contando núcleos de macrófagos y parásitos teñidos con DAPI.

Infección de macrófagos con Trypanosoma cruzi en presencia de glucosa oxidasa. Macrófagos de médula ósea gp91^{phox}^{-/-} (2x10⁵) fueron infectados con tripomastigotas Dm28 (5:1) en presencia de distintas concentraciones de glucosa oxidasa para generar flujos de H₂O₂ entre 0 y

50 nM/min. Luego de 2 horas de incubación se lavó el exceso de parásitos y enzima. A las 24 horas se evaluó el índice de infección, fijando el cultivo y tiñendo los núcleos con DAPI.

Silenciamiento de Nox1

siRNA. Se adquirieron 2 tipos de siRNA comerciales diseñados para silenciar la Nox1 murina. Se trata del *Silencer Selected siRNA* y una serie de 3 siRNA del sistema *Stealth*, ambos producidos por la empresa Invitrogen. También se adquirió un control negativo conjugado a fluoróforo como control de transfección (*Silencer™ Cy™3-labeled Negative Control siRNA*).

Transfección por lipofección. Se preparó una suspensión de Lipofectamine conteniendo 500 μ L de Optimem y 1-5 μ L del reactivo. Luego se agregaron los siRNA (5-200 nM) y se incubaron 20 min para permitir que se formen los complejos Lipofectamine-ARN. Luego se transfirió esta mezcla a macrófagos cultivados en placas de 6 pocillos (2×10^6 células por condición) que fueron lavados previamente con medio sin antibióticos. Luego de 18 horas se retiró la mezcla y se agregó medio DMEM 10% SBF. Se trató con LPS (4 μ g/ml) y tras 24 horas de incubación se evaluó el silenciamiento por *western blot* o RT-PCR. En algunos experimentos, se realizó la inducción con LPS previo a la transfección con los siRNA.

Transfección por electroporación. Una de las estrategias utilizadas para la incorporación del siRNA en los macrófagos fue la electroporación. Para ello se colocaron 2×10^6 macrófagos (j774A-1 y BMDM inmediatamente luego de la extracción o al final de la diferenciación) suspendidos en 50 μ L de medio Optimem por condición, en celdas de 2 mm, y luego se agregaron 50 μ L de Optimem conteniendo el siRNA (1-3 μ M). Se ensayaron distintas condiciones de electroporación (200-400 V, 100-200 Ω , 25-50 F)(188). Después del pulso se diluyeron las células en 1 ml de medio DMEM 10% SBF. Luego de 24 horas se cambió el medio y se trató las células con LPS (4mg/ml) para inducir Nox1. Tras 24 horas adicionales se evaluó el silenciamiento por *western blot* o RT-PCR.

Infeción *in vivo* con *Trypanosoma cruzi*

Inoculación de Trypanosoma cruzi en ratones. El protocolo de infección fue avalado por la CEUA, con N° de expediente: 070153-000119-15. Se utilizaron 2 grupos (uno por cada cepa) con 5

ratones cada uno. El día "0" del experimento se inocularon 1×10^7 tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* de cepas Dm28c o CL-Luc:Neon (obtenidos de cultivos de células VERO como se describe anteriormente) suspendidos en 300 μ L de DMEM + 10% SBF de forma intraperitoneal. Los experimentos de infección con CL-Luc:Neon fueron realizados en su totalidad en la Unidad de animales transgénicos y de experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo (UATE).

Parasitemias. Se realizaron parasitemias diarias de los ratones infectados entre los días 3 y 8 post-infección. Para ello se tomaron muestras de sangre por punción en la punta de la cola de los ratones (1 gota). Luego se contabilizaron en cámara de Neubauer los tripomastigotas presentes por mL de sangre.

Evaluación de carga parasitaria por PCR en tiempo real. Para evaluar el grado de invasión de parásitos a nivel tisular en los ratones luego de 10 días de infección se aisló tejido muscular cardíaco y esquelético (100 mg). Se utilizó un homogeneizador de vidrio y el reactivo para aislamiento genómico DNAzol (Life Technologies). A partir de 100 ng de ADN total se realizó una PCR en tiempo real, utilizando el kit SYBRgreen (Applied Biosystems) y primers específicos para una región de ADN satelital de *T. cruzi* AATTATGAATGGCGGGAGTCA (forward), CCAGTGTGTGAACACGCAAAC (reverse) que amplifican una región de 195 pb (189). Para la cuantificación relativa se utilizó como referencia el gen de GAPDH murino (5'-CTGAGAACGGGAAGCTTGTC-3' (forward) and 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3' (reverse). Cada reacción (20 μ L) de PCR contenía: SYBR Green SuperMix 2X (10 μ L), 0.5 μ M de cada primer, y ADN (100 ng). El programa utilizado fue: 50 °C (10 min); 94 °C (3 min); 40 ciclos de 94 °C (45 s), 68 °C (1 min), y 72 °C (1 min); y un último paso de 72 °C (10 min). La curva de "melting" se analizó midiendo la fluorescencia entre 95 y 55 °C. El cambio relativo se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde ΔCt es la diferencia entre Ct de *T. cruzi* y GAPDH; y $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre los ΔCt de muestras gp91^{phox}-/- y wt.

Visualización de bioluminiscencia in vivo y ex vivo. Se realizaron infecciones con la cepa CL-Luc:Neon, en grupos de 5 ratones (un grupo con ratones C57BL/6 y otro con ratones gp91^{phox}-/-). Se inocularon 1×10^7 tripomastigotas por animal de forma intraperitoneal. Para la visualización de los animales se utilizó un equipo multi-modal de imagenología *in vivo* (In Vivo Xtreme, Bruker) disponible en la UATE del Instituto Pasteur y con la colaboración de los doctores Marcelo Comini y Diego Benitez. Se registró la bioluminiscencia cada 2 o 3 días dependiendo de la fase de la infección. Para ello se inyectó una solución de D-luciferina (150 mg/Kg) vía intraperitoneal, se anestesió a los animales con isoflurano 2.5% v/v en oxígeno e

inmediatamente se analizaron en el detector de bioluminiscencia, acumulando la señal durante 5 minutos. También se adquirieron radiografías de rayos X cada vez. Luego de la adquisición de las imágenes los animales fueron recuperados y devueltos a sus cajas. Para los estudios *ex vivo* se inyectó a los ratones con D-luciferina (150 mg/Kg) y luego de 7 minutos se los sacrificó por sangrado bajo anestesia terminal (pentobarbital 100mg/kg). Luego los animales fueron perfundidos a través del corazón con D-luciferina (0.3mg/ml). Finalmente se disecaron los tejidos y órganos y se colocaron en placa de Petri embebidos con D-luciferina (0.3mg/mL) en PBS-glucosa 1% a 37°C para el registro de luminiscencia en el equipo de imagenología. Se analizaron las imágenes en el programa Fiji de Image J. Para determinar la intensidad total de señal en cada ratón se utilizó el parámetro “*integrated density*”, considerando un área de 95*270 píxeles y se corrigió sustrayendo el *background*, obtenido en un área oscura de igual tamaño dentro de la imagen. El cambio relativo en la intensidad de la señal se calculó tomando como referencia la imagen obtenida el día 3 para cada animal.

Parasitismo en bazo. Se cuantificó la invasión por *T. cruzi* en los bazos de ratones infectados a los 10 días luego de la inoculación con parásitos CL-Luc:Neon. Para ello se aisló el tejido, se disgregó mecánicamente mediante el uso de una malla metálica hasta obtener una suspensión homogénea de células. Luego se midió la fluorescencia de los parásitos (que expresan la proteína mNeonGreen) en un fluorímetro de placas ($\lambda_{em} = 480$, $\lambda_{ex} = 520$) y se normalizó en base a la cantidad de proteínas totales.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm SEM. Se utilizó el test estadístico test t de Student para comparar dos grupos y ANOVA para más de dos grupos. Un valor $p \leq 0.05$ se consideró significativo. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces y por duplicado o triplicado en cada oportunidad.

4- RESULTADOS y DISCUSIÓN

I. Caracterización de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en cultivos de macrófagos derivados de médula ósea de ratones iNOS^{-/-} y gp91^{phox}^{-/-}.

a) Diferenciación de células de médula ósea

Las células obtenidas a partir de la médula ósea de los ratones se diferencian en macrófagos luego de la exposición al factor M-CSF (del inglés *macrophage colony-stimulating factor*) (173). La identificación de la población de células adherentes obtenidas a lo largo del tratamiento se realizó analizando por citometría la expresión del marcador de membrana característico de macrófagos murinos, F4/80, con un anticuerpo específico conjugado a FIT-C (**Figura 4-1**). Se observó que a los 5 días existen dos poblaciones con diferente expresión, mientras que luego de 7 días todo el cultivo expresa el marcador F4/80. Estos resultados están en línea con los protocolos de obtención de BMDM (del inglés, *bone marrow derived macrophages*) disponibles en la literatura (173). A partir del día 7 post-extracción de las células, el cultivo primario de macrófagos ofrece un plazo de entre 2 y 3 días para realizar experimentos, luego de ese tiempo se observa una disminución importante en el número de células adheridas. Los macrófagos utilizados en este trabajo fueron obtenidos a partir de la diferenciación de células precursoras de la médula ósea de ratones de cepa salvaje (C57BL/6 y Balb/c) y de las cepas modificadas genéticamente: iNOS^{-/-} y gp91^{phox}^{-/-}. Los animales iNOS^{-/-}, son KO para la enzima iNOS (CByJ.129P2(B6)-*Nos2*), por lo que no expresan la enzima en respuesta a un contexto pro-inflamatorio y, por lo tanto, no producen *NO, siendo más susceptibles frente a diferentes agentes infecciosos (31). Los ratones gp91^{phox}^{-/-} (C57BL/6.129S6.Cybb) presentan una mutación en el locus *Cybb*, que origina la deficiencia completa de actividad Nox2 y son incapaces de montar un estallido respiratorio a nivel de fagocitos profesionales. Estos animales constituyen un modelo de la forma más común de la CGD (ligada al cromosoma X), la cual se caracteriza por mayor susceptibilidad a distintas infecciones. Salvo los aspectos relacionados al sistema inmune, la apariencia, histología o desarrollo de los ratones iNOS^{-/-} y gp91^{phox}^{-/-} son similares a los de la cepa salvaje (190,191).

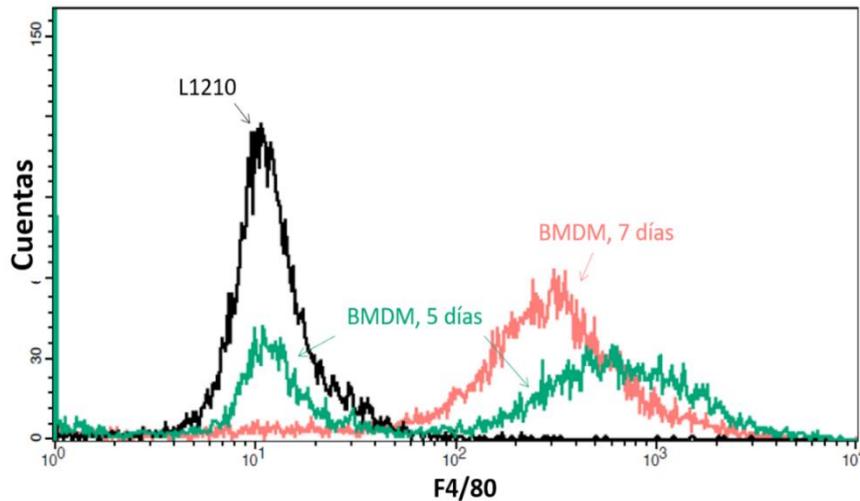


Figura 4-1. Caracterización fenotípica de macrófagos obtenidos de médula ósea. Macrófagos diferenciados a partir de médula ósea de un ratón C57BL-6 fueron incubados con el anticuerpo conjugado a FIT-C anti-F4-80 y analizados por citometría luego de 5 y 7 días de incubación con el medio de diferenciación. Como control negativo se utilizaron células L1210 (línea celular de leucemia linfóide de ratón) y como control positivo se usaron macrófagos de línea J774A-1 (no mostrado).

b) Producción de NO en BMDM de ratones $i\text{NOS}^{-/-}$ y $gp91^{\text{phox}^{-/-}}$

Una vez establecida la técnica de extracción y diferenciación de BMDMs estudiamos la expresión de la iNOS en estas células, así como la producción de NO y de $\text{O}_2^{\bullet-}$. La expresión de iNOS se analizó tanto en células wt , $gp91^{\text{phox}^{-/-}}$ e $i\text{NOS}^{-/-}$ tras la incubación clásica de 5 horas con IFN- γ y LPS (31,32). La expresión de la iNOS luego de la inducción con citoquinas es similar en macrófagos wt y $gp91^{\text{phox}^{-/-}}$, mientras que no se evidencia presencia de la proteína en las células obtenidas a partir de ratones $i\text{NOS}^{-/-}$ (Figura 4-2).

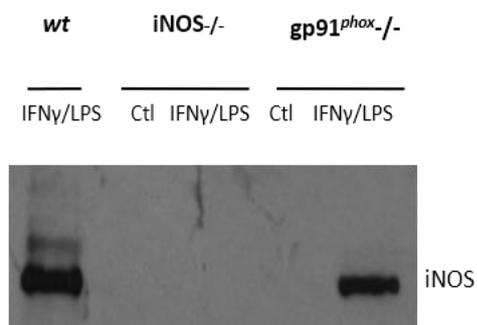
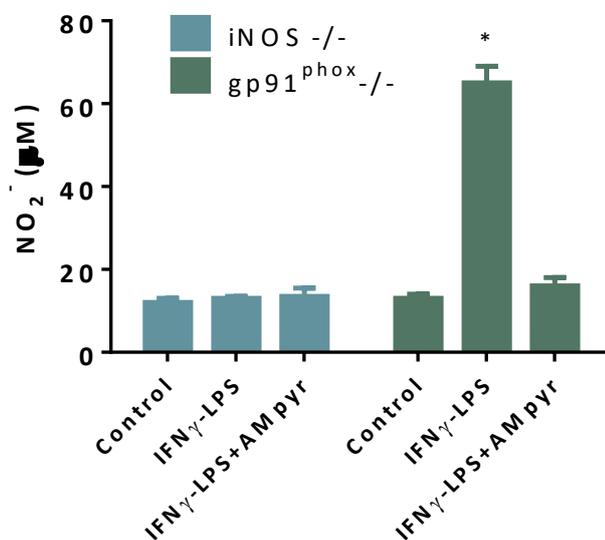


Figura 4-2. Expresión de iNOS. Western blot realizado con lisados de macrófagos de médula ósea de ratones C57BL-6 (wt); $i\text{NOS}^{-/-}$ y $gp91^{\text{phox}^{-/-}}$ y revelado con un anticuerpo anti-iNOS. Se analizó la expresión de la proteína en condición control (sin tratamiento) y en presencia de inductores de la iNOS (IFN- γ /LPS).

Se determinó la formación de $\cdot\text{NO}$ por macrófagos derivados de las cepas $i\text{NOS}^{-/-}$ y $gp91^{phox^{-/-}}$ midiendo NO_2^- , producto estable de la oxidación del $\cdot\text{NO}$ (178). La producción de $\cdot\text{NO}$ en los macrófagos $gp91^{phox^{-/-}}$ fue suprimida casi completamente por un inhibidor de la $i\text{NOS}$, la aminometilpiridina (AMPyr), mientras que no se detectó NO_2^- en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos derivados de ratones $i\text{NOS}^{-/-}$. Cabe destacar que la producción de $\cdot\text{NO}$ en las células $gp91^{phox^{-/-}}$ es similar a la determinada en los macrófagos salvajes, no existiendo aparentemente una respuesta modulada por la ausencia de la enzima responsable del estallido respiratorio (**Figura 4.3**).

Figura 4-3. Producción de $\cdot\text{NO}$ por macrófagos $i\text{NOS}^{-/-}$ y $gp91^{phox^{-/-}}$. Macrófagos derivados de médula ósea fueron cultivados en placas de 24 pocillos y tratados con $\text{IFN-}\gamma/\text{LPS}$ durante 24 horas. Además, se agregó el inhibidor AMPyr (100 μM) en algunas condiciones. Luego se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de NO_2^- (derivado del $\cdot\text{NO}$) por la técnica de Griess. “*” indica $p < 0.05$



c) Producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en BMDM de ratones $i\text{NOS}^{-/-}$ y $gp91^{phox^{-/-}}$

La producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en los BMDMs se estudió por medio de diferentes técnicas que se basan en fundamentos distintos o presentan diferencias en la sensibilidad. Entre ellas se incluyen: la reducción de citocromo c^{3+} (cit c^{3+}), de NBT o de DHE por reacción directa con el $\text{O}_2^{\cdot-}$, y la oxidación de sondas fluorescentes por el H_2O_2 u otras especies derivadas del $\text{O}_2^{\cdot-}$ como la DCFH₂ o Amplex red. Los resultados obtenidos confirmaron la ausencia de actividad del tipo “estallido respiratorio” en células $gp91^{phox^{-/-}}$ y una actividad comparable a la de los wt en los macrófagos $i\text{NOS}^{-/-}$ tras la activación clásica con PMA (**Figura 4-4**).

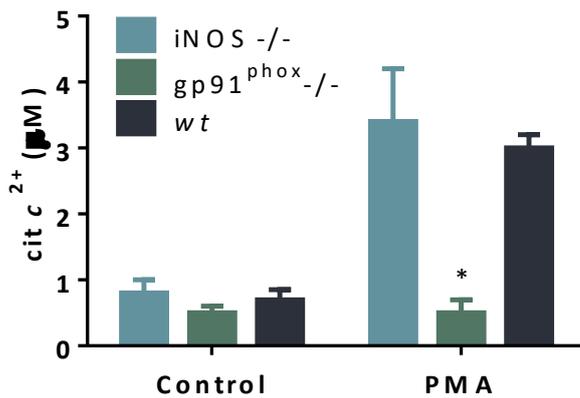


Figura 4-4. Producción de $O_2^{\bullet-}$ por macrófagos iNOS^{-/-}, gp91^{phox-/-} y wt. Macrófagos derivados de médula ósea (2.5×10^6 por pocillo) se incubaron con una solución de cit c^{3+} oxidado $20 \mu M$ en dPBS durante 2 horas. Luego se colectó el sobrenadante y midió la concentración de citocromo c registrando la absorbancia a 550 nm ($\epsilon=21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). “*” indica $p<0.05$.

De la misma manera, la detección por microscopia de cristales de formazán, productos de la reducción de azul de nitro-tetrazolio por $O_2^{\bullet-}$, mostró que no existe actividad Nox2 promovida por estímulos clásicos, como PMA o la exposición a *T. cruzi*, en macrófagos gp91^{phox-/-} (Figura 4-5).

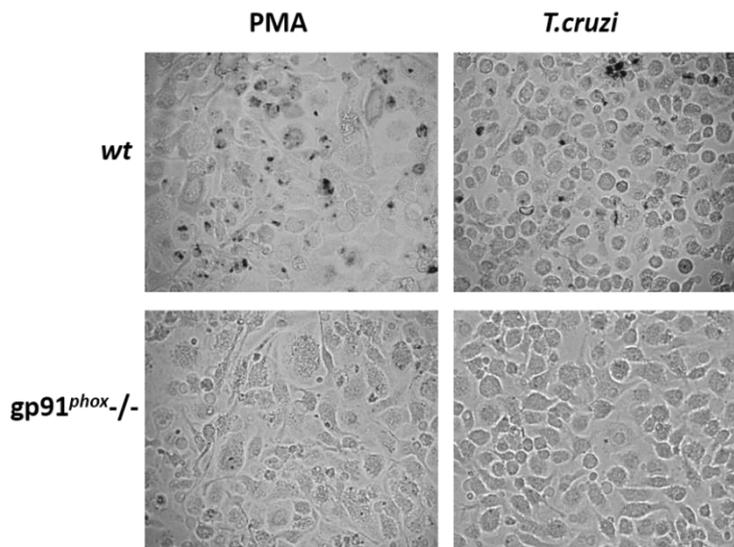


Figura 4-5. Reducción de NBT por macrófagos derivados de médula ósea de ratones wt y gp91^{phox-/-}. Los macrófagos de médula ósea se incubaron con PMA o parásitos de *Trypanosoma cruzi* en presencia de NBT (5 mg/ml) durante 30 min. Posteriormente se fijaron los cultivos con formaldehído y se visualizó al microscopio de campo claro la presencia de depósitos de color oscuro, correspondientes a la formación de cristales de formazán en el sitio de producción de $O_2^{\bullet-}$.

Se contempló la posibilidad de que exista una fuente alternativa de $O_2^{\bullet-}$ que juegue un rol durante la infección en los macrófagos (y ratones) KO con *T. cruzi*, a modo de compensación por la ausencia de Nox2. Existen algunos reportes de la expresión de otra isoforma de la NADPH oxidasa en macrófagos además de la típica isoforma fagocítica, Nox2 (69-71). Se trata de la Nox1, muy estudiada a nivel de VSMC y que, si bien comparte algunas subunidades con la isoforma 2,

el *core* catalítico se encuentra en una proteína diferente a gp91^{phox}, denominada Nox1 (64). La regulación o activación de Nox1 en macrófagos ha sido escasamente explorada hasta el momento. Los reportes existentes muestran que existe una inducción de la expresión de la Nox1 por exposición a LPS y una activación directa dependiente de la pequeña GTPasa Rac1 (69,70).

Para evaluar la presencia de esta isoforma y un posible rol de compensación en la producción de O₂^{•-} en ausencia de la Nox2, se evaluó la producción de O₂^{•-} y H₂O₂ bajo incubaciones prolongadas con LPS en BMDM gp91^{phox}^{-/-}. Como se mencionó previamente no es posible detectar producción de O₂^{•-} en macrófagos BMDM gp91^{phox}^{-/-} con estímulos clásicos, como el tratamiento con PMA o infección con *T. cruzi*. Tampoco el tratamiento con LPS durante 24 horas lleva a una actividad detectable por la técnica de reducción de NBT en estas células. Sin embargo, la combinación de un tratamiento con LPS durante 24 h y luego la infección con *T. cruzi*, o el estímulo con PMA (**Figura 4-6**) llevan a la aparición de cristales de formazán, producto de la reacción del O₂^{•-} con NBT.

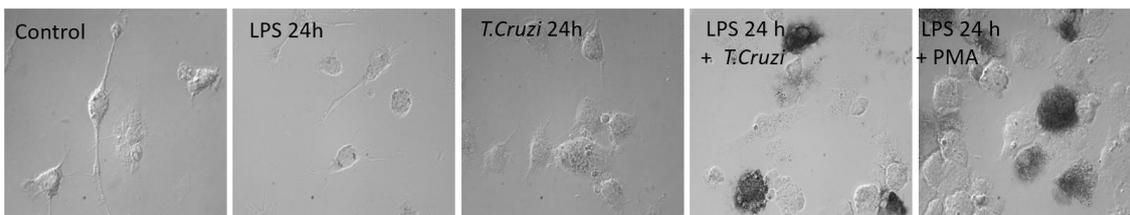


Figura 4-6. Producción de O₂^{•-} en macrófagos gp91^{phox}^{-/-}. Macrófagos derivados de médula ósea fueron cultivados en portaobjetos de 8 divisiones y tratados con LPS (4 µg/ml) o tripomastigotas de *T. cruzi* (5:1) durante 24 horas. En algunos casos luego de 24 horas de exposición a LPS se agregaron tripomastigotas o PMA (4 µg/ml) en presencia de NBT en el medio (2mg/ml). Tras 20 minutos se lavó el cultivo y se visualizó en un microscopio óptico la formación de depósitos de formazán de color oscuro.

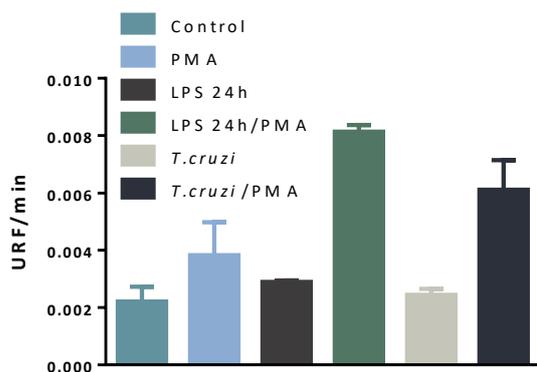


Figura 4-7. Producción de oxidantes por macrófagos gp91^{phox}^{-/-}. Macrófagos de médula ósea (5x10⁵ por pocillo) fueron tratados con LPS (4 µg/ml) o infectados con *T. cruzi* (5:1) durante 24 horas. Luego se midió la oxidación de la sonda DCFH₂ (50 µM) por parte de estos macrófagos en un fluorímetro de placas (Varioskan Flash, λ_{exc}=480 nm; λ_{em}=520 nm) en ausencia o presencia de PMA (4 µg/ml) durante 1,5 h.

También se estudió la producción de oxidantes en estas condiciones en macrófagos gp91^{phox}^{-/-} por una técnica menos específica pero más sensible, como es la oxidación de la DCFH₂. Esta sonda reacciona con distintos radicales dando DCF como producto. Si bien la DCFH₂ no reacciona con O₂^{•-} en forma directa, el H₂O₂ (producto de su dismutación) en presencia de hierro, o bien el ONOO⁻ generan radicales capaces de oxidarla (186). Esta técnica

permitió evidenciar que los BMDM que no expresan Nox2 conservan cierta capacidad de producir oxidantes por la activación con PMA si previamente se expuso a esas células a LPS o parásitos de *T. cruzi* durante las 24 horas (**Figura 4-7**).

La oxidación de DHE a 2-hidroetidio (2-OH-Et⁺) corresponde exclusivamente a la reacción de la sonda con O₂^{•-} y permite detectar este radical de forma inequívoca en un análisis por HPLC (184). Por medio de esta técnica, se determinó que en los cultivos de macrófagos gp91^{phox}^{-/-} tratados con LPS durante 24 h y luego activados con PMA, existe formación de O₂^{•-}, pero que despreciable con respecto a los niveles que se alcanzan en el “estallido respiratorio” de los macrófagos wt, (0,1 vs 2,8 pmol/min/10⁶ células, **Figura 4-8**).

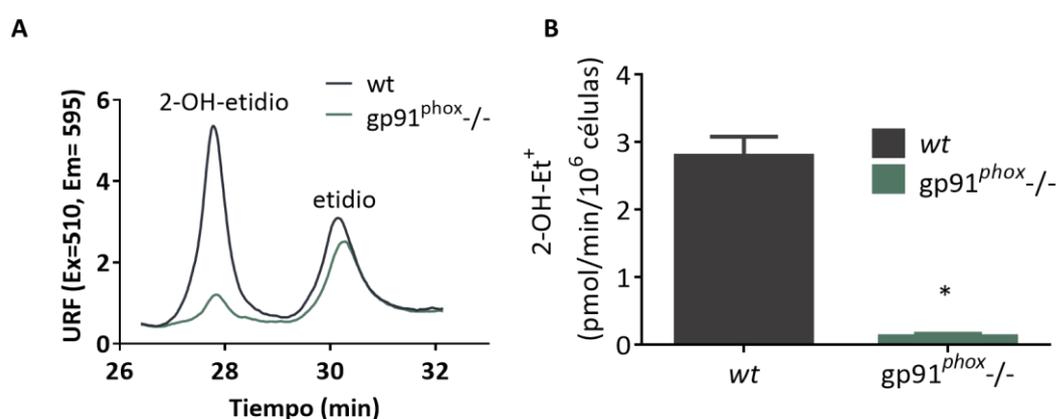


Figura 4-8. Producción de O₂^{•-} en BMDM wt y gp91^{phox}^{-/-}. Macrófagos de médula ósea (5 x 10⁶) fueron tratados con LPS (4 µg/ml) durante 24 h. Luego fueron incubados con la sonda DHE (50 µM) durante 40 min y se lavó el excedente. Se activó a las células con PMA (4 µg/ml) y después de 2 horas se procedió a lisar las células para realizar la extracción orgánica y analizar por HPLC los productos fluorescentes obtenidos (λ_{exc}=510 nm; λ_{em}=595 nm). **A**) En el gráfico se muestran cromatogramas representativos con los picos correspondientes al 2-OH-Et⁺ (específico de la reacción con O₂^{•-}) y el Et⁺. **B**) Se obtuvo el área bajo la curva del pico correspondiente a 2-OH-Et⁺ en macrófagos activados y se corrigió sustrayendo la señal en macrófagos control. Luego se calculó la concentración de este compuesto con una curva de calibración realizada con un estándar (0.-2µM). “*” = p<0.02

La cuantificación de la producción de O₂^{•-} por Nox2 y Nox1 permite analizar el posible rol de ambas enzimas durante la activación macrofágica. Las técnicas usadas presentan distintas limitaciones, pero pueden ser usadas en forma combinada para analizar cada tipo celular y condición de activación. La velocidad de formación de O₂^{•-} determinada por la formación de 2-OH-Et⁺ puede representar una subestimación del valor real, debido a la competencia entre la sonda y otros blancos del O₂^{•-}, así como a la pérdida de producto durante la extracción. En cambio, la técnica de reducción de cit C³, implica la medida directa del producto de oxidación en el sobrenadante del cultivo sin procedimientos adicionales. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, así como datos relevados de la literatura fueron sistematizados en la **Tabla 4-1**, de forma de poder comparar las diferentes condiciones.

Tabla 4-1. Flujos de $O_2^{\bullet-}$ reportados en macrófagos y neutrófilos. * RAW 264.7 y J774A son líneas celulares de macrófagos; **En algunos casos se convirtió el dato original asumiendo 1 mg de proteína $\sim 2 \times 10^6$ células.

Tipo celular*	Estímulo	Técnica	pmol/min/ 10^6 células**	Ref.
RAW 264.7	PMA	DHE	5	(192)
BMDM	PMA	DHE	2,8	Este trabajo
BMDM gp91 ^{phox} ^{-/-}	PMA	DHE	0,1	Este trabajo
BMDM	PMA	Reducción de cit c ³⁺	12	Este trabajo
J774A.1	PMA	Reducción de cit c ³⁺	150	(32)
J774A.1	PMA	Amplex Red	60	Este trabajo
J774A.16	PMA	NBT	200	(167)
J774A.16	<i>T. cruzi</i>	NBT	60	(167)
Macrófagos peritoneales	PMA	Scopoletina	4000	(193)
Neutrófilos	PMA	Reducción de cit c ³⁺	15×10^3	(63)

Existe una gran variabilidad en los valores de velocidad de formación de $O_2^{\bullet-}$ reportados en macrófagos. Esto puede explicarse por las diferencias en las técnicas y en los tipos de macrófagos utilizados. Por ejemplo, se observa que en los macrófagos de línea celular (J774A-1) se determinaron flujos mayores de $O_2^{\bullet-}$ por exposición a PMA que en los cultivos primarios obtenidos a partir de médula ósea.

d) Nox1 en macrófagos gp91^{phox}^{-/-}

Dado que se evidenció formación de $O_2^{\bullet-}$ en macrófagos gp91^{phox}^{-/-} con estímulos similares a los reportados para inducir la expresión de Nox1, se estudiaron los cambios en la cantidad de esta proteína en macrófagos de médula ósea. Al analizar su expresión por *western blot* en lisados de BMDMs, se ve que el tratamiento con LPS lleva a un aumento de la cantidad de Nox1 (**Figura 4-9**). El curso temporal de la expresión de la proteína muestra que el incremento de la proteína comienza a ser detectable por esta técnica luego de 6 horas de exposición a LPS. Se obtienen resultados similares con macrófagos J774A-1.

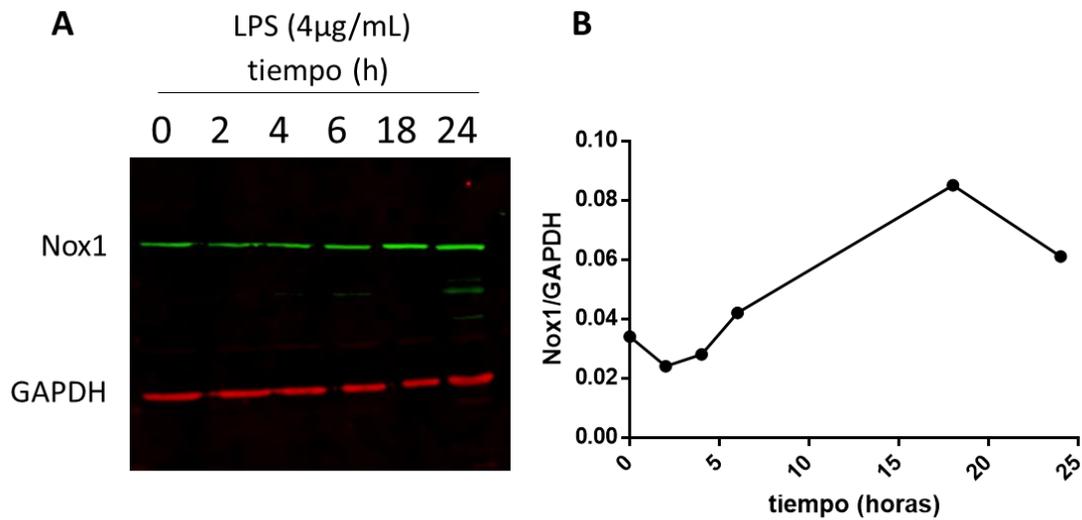


Figura 4-9. Curso temporal de la expresión de Nox1 en BMDM tratados con LPS. Macrófagos de médula ósea cultivados en placas de 6 pocillos fueron tratados con LPS (4 µg/ml) durante 2, 4, 6, 18 y 24 horas y luego lisados con buffer de lisis celular. Se realizó una electroforesis desnaturalizante y después se transfirieron las proteínas a una membrana para *western blot*. Se utilizaron anticuerpos comerciales anti-Nox1 y anti-GAPDH murinas. Para el revelado se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos que emiten en el infrarrojo y la fluorescencia se analizó en el *Odyssey Infrared Imaging* (Licor).

Si bien el estímulo con LPS no es suficiente para activar la producción de $O_2^{\bullet-}$ como se describió en la sección anterior, es posible que un efecto de “priming” sobre la enzima, aumentando su expresión y luego un segundo estímulo lleve a la activación de la misma.

Por otro lado, algunos autores detectan especies reactivas del oxígeno en macrófagos *wt* tratados con LPS durante tiempos muy cortos (15 a 120 min), atribuyéndolas a la actividad Nox1 (70,71). En concreto, proponen que existe una interacción entre IRAK-1 y Rac1 tras la estimulación con LPS, llevando a la activación de ésta última y, por consiguiente, de la enzima Nox1 (70). Sin embargo, en dichos artículos los autores no discriminan entre otras posibles fuentes de oxidantes como la propia Nox2 o la mitocondria. En el presente trabajo, no fue posible detectar $O_2^{\bullet-}$ producido por macrófagos tratados sólo con LPS por ninguna de las técnicas utilizadas, sino que se requiere un segundo estímulo.

Además de los efectos sobre la expresión y actividad, la estimulación con LPS parece influir en la localización de la enzima. En la inmunocitoquímica realizada con macrófagos BMDM *wt* se observa, además de un aumento, una redistribución de la señal, pasando de ser difusa a acumularse en algunas zonas discretas (**Figura 4-10**). La localización subcelular de esta enzima aún no se encuentra claramente establecida y debe seguir investigándose. En el marco de este trabajo se utilizaron marcadores de membrana plasmática, lisosomas y mitocondrias y no se

obtuvo co-localización con la señal correspondiente al marcaje con anticuerpo específico para Nox1.

Como se mencionó anteriormente, la inducción de la expresión de Nox1 por LPS fue descrita en macrófagos previamente y se propone que la señal transcurre a través de la vía TLR-4 > IRAK-1 > NfκB. En este sentido, evaluamos la expresión de Nox1 en BMDM infectados con *T. cruzi*, dado que es sabido que estos parásitos presentan agonistas de los receptores TLR4 (194).

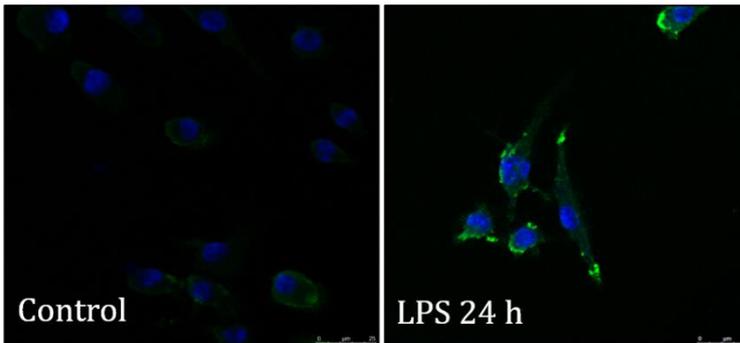


Figura 4-10. Expresión de Nox1 en macrófagos BMDM. Macrófagos de médula ósea fueron tratados con LPS (4 µg/mL) durante 24 horas. Luego se fijaron las células y se realizó una inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-Nox1 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa-488. Las imágenes se analizaron por microscopía de fluorescencia confocal. Verde: *nox1*; Azul: DAPI.

Como se observa en la **Figura 4-11**, la infección con tripomastigotas de *T. cruzi* provoca también un incremento en la expresión de la enzima Nox1, algo que no se había descrito hasta el momento.

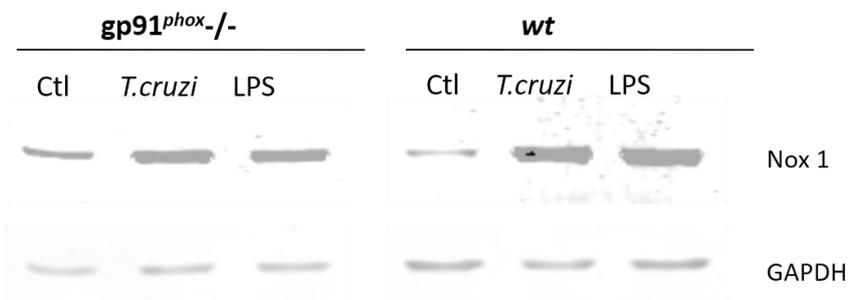


Figura 4-11. Expresión de Nox1. Se infectaron macrófagos de médula ósea *wt* y *gp91^{phox}-/-* con tripomastigotas de *T. cruzi* Dm28c (5:1) durante 24 horas y se trataron otros cultivos con LPS (4µg/ml) por el mismo tiempo. Luego se realizó una electroforesis desnaturizante con lisados preparados a partir de esos cultivos, se transfirieron las proteínas a una membrana para *western blot*. Se marcaron las proteínas Nox1 y GAPDH con anticuerpos comerciales y se reveló la membrana con anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos de emisión en el infrarrojo. Se detectó la señal fluorescente en el equipo Odyssey Infrared Imaging (Licor).

La detección del ARNm de Nox1 en BMDM *wt* también muestra que el tratamiento con LPS o *T. cruzi* durante 24 horas llevan a un aumento en la cantidad del mensajero, **Figura 4-12**, lo cual es consistente con la regulación transcripcional de la enzima descrita en otros trabajos. Cabe

mencionar que el producto de PCR obtenido fue secuenciado en la UBM del Instituto Pasteur, confirmando la identidad del fragmento de Nox1.

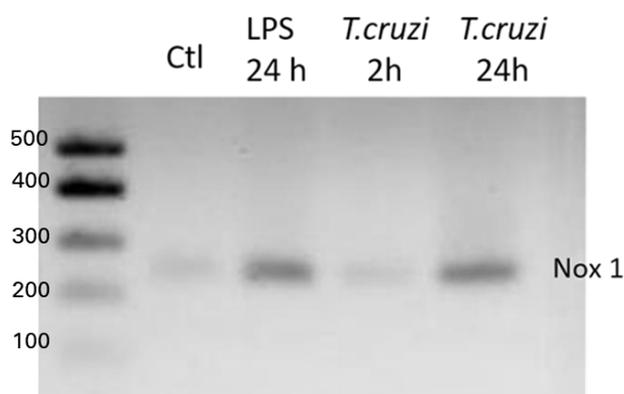


Figura 4-12. Expresión de ARNm de Nox1. Se realizó la extracción de ARN total a través de un kit comercial (Invitrogen) a partir de lisados de macrófagos incubados con LPS (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o *T. cruzi* (5:1) por 24 horas. Luego se generó el ADN copia por retro-transcripción *in vitro* y finalmente se amplificó un fragmento de la secuencia codificante de Nox1 por PCR tradicional. Tamaño esperado del fragmento: 237pb

Como estrategia para evaluar el rol que tiene la inducción de la Nox1 durante la infección con *T. cruzi* se buscó silenciar la expresión de la proteína por la técnica de pequeños ARNs de interferencia (siRNA). La metodología se basa en el sistema de interferencia propio de las células, donde un ARN doble hebra es procesado en fragmentos pequeños por la proteína Dicer. Luego dichos fragmentos son reconocidos por el complejo RISC que remueve una de las hebras. Finalmente, es la cadena anti-sentido la que se une al ARNm blanco y guía su degradación por el complejo RISC (195). En particular, se trabajó con dos tipos de siRNA comerciales (*Stealth* siRNA y *Silencer Selected* siRNA de Invitrogen) y dos estrategias para la incorporación del ácido nucleico en el citoplasma de las células (lipofección y electroporación). Sin embargo, no fue posible disminuir la expresión de la enzima significativamente tanto en macrófagos de médula ósea como en J774A-1 (datos representativos en **Figura 4-13**). Los niveles de Nox1 se estudiaron a nivel de la proteína y del ARNm. Como control de la transfección se utilizó un siRNA no codificante conjugado a un fluoróforo (*Silencer™ Cy™3-labeled Negative Control siRNA*) que permite seguir la incorporación en las células mediante microscopía de fluorescencia. Si bien se observa que la mayoría de las células contienen el ácido nucleico marcado, esto no se vio reflejado en la eficiencia del silenciamiento de la proteína de interés. A su vez, se varió la concentración de silenciador utilizado, la concentración de agente de lipofección, las condiciones de electroporación, pero sin obtener mayor éxito. Incluso se varió el momento de la transfección de los BMDM, realizándose inmediatamente después de la extracción de las

células o luego de su diferenciación a macrófagos y también antes o después de la inducción con LPS.

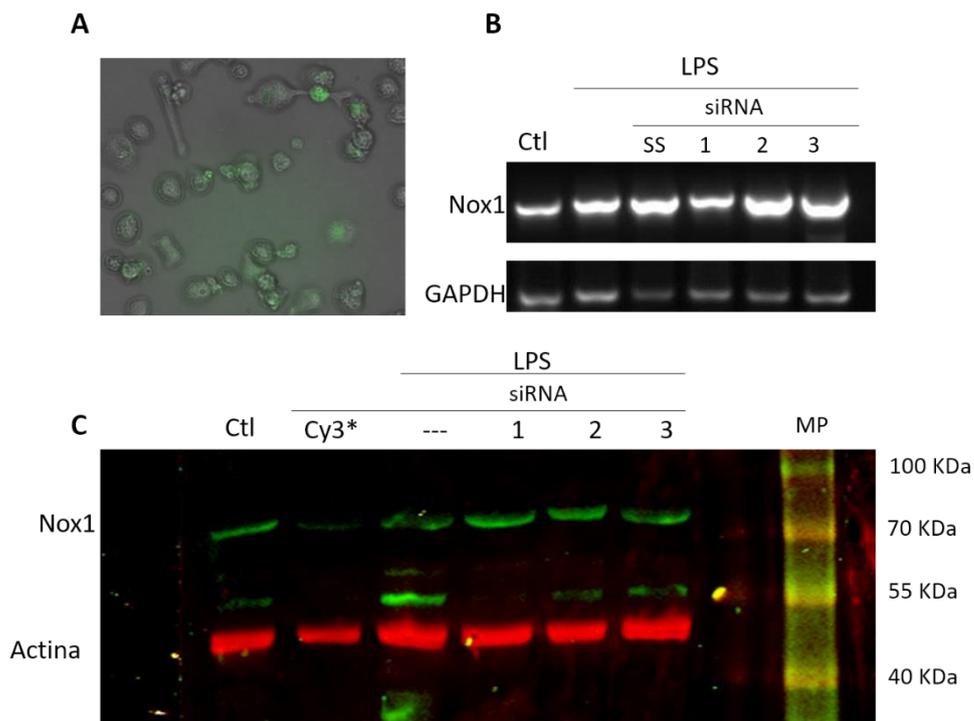


Figura 4-13. Silenciamiento de Nox1 en macrófagos BMDM. Macrófagos de médula ósea (2.5×10^6) luego de 7 días de diferenciación fueron re-suspendidos en medio Optimem y electroporados (125 V, 200 Ω , 50 μ F) con 50 pmoles totales de 3 siRNA diferentes del sistema *Stealthy* (siRNA 1, 2 y 3) y un siRNA control negativo fluorescente (Cy3*). Luego las células se cultivaron en placas de 6 pocillos y tras 24 horas se cambió el medio y se observó la fluorescencia del cultivo (panel A). En ese momento se agregó LPS (4 μ g/ml) y a las 48 horas desde la transfección se evaluó la expresión de Nox1 por *western blot* (panel C). En otro experimento similar, pero utilizando además otro siRNA del sistema *Silencer Selected* (SS), se evaluó el silenciamiento por RT-PCR (panel B).

e) Producción de ONOO⁻ en BMDMs derivados de ratones *gp91^{phox}-/-*

La producción de ONOO⁻ en macrófagos capaces de generar O₂^{•-} y [•]NO en forma simultánea ha sido extensamente estudiada en nuestro laboratorio. La deficiencia en una de las enzimas responsables de estas especies induce a pensar que no se formará ONOO⁻ en estas células.

La detección de ONOO⁻ en sistemas biológicos ha sido siempre un desafío desde que se evidenció su relevancia *in vivo*, ya que su medida directa en ese tipo de entornos no es posible. Por otro lado, la gran reactividad del ONOO⁻ con distintos blancos presentes normalmente en cualquier célula o fluido biológico hacen que su cuantificación sea dificultosa. Tradicionalmente, se han desarrollado sondas fluorescentes (o luminiscentes) que al reaccionar con ONOO⁻ forman una especie estable y detectable por fluorimetría. La mayoría de estas estrategias se basan en la reacción entre los radicales derivados del ONOO⁻ ([•]OH, CO₃^{•-} y [•]NO₂) con sondas fluorogénicas, como es el caso de la dihidrorodamina (DHR) y DCFH₂ entre otras, ampliamente usadas en el

campo del estudio de los oxidantes (185). La gran desventaja que presentan estos métodos es que otros radicales que se forman normalmente en procesos biológicos pueden llevar a cabo las mismas oxidaciones e interferir con la detección (124). Sin embargo, en la última década han surgido nuevas moléculas capaces de reaccionar directa- y selectivamente con ONOO^- , como son los derivados boronados. Los ésteres o ácidos borónicos son grupos electrofílicos que presentan una gran reactividad hacia nucleófilos como los peróxidos HOO^- , ClO^- y sobre todo ONOO^- (192,196,197). Un tercer grupo de sondas desarrollados más recientemente son los ácidos borónicos, que han demostrado reaccionar rápidamente con H_2O_2 y son compuestos prometedores para su uso en la detección de ONOO^- (198).

En particular en este trabajo se realizaron ensayos con el boronato de cumarina (CBA), sonda que reacciona rápidamente con ONOO^- ($1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) y lo detecta en forma selectiva (179), permitiendo evidenciar formación de ONOO^- en macrófagos $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$. Cuando estas células son activadas luego de una incubación prolongada con LPS se evidencia oxidación de la sonda (Figura 4-14.A). Esta señal se inhibe completamente en presencia de un inhibidor de la formación de $\text{}^*\text{NO}$, lo cual demuestra que la oxidación de la sonda es dependiente de ONOO^- . Indirectamente estos resultados confirman la presencia de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en macrófagos sin Nox2, ya que este es un precursor necesario para la oxidación de las sondas derivadas de boronato. Cabe destacar que la velocidad de formación de ONOO^- es un orden de magnitud menor en los macrófagos $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$ con respecto a los *wt* (Figura 4-14.B), lo que coincide con las diferencias determinadas en la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ con el DHE en la sección anterior.

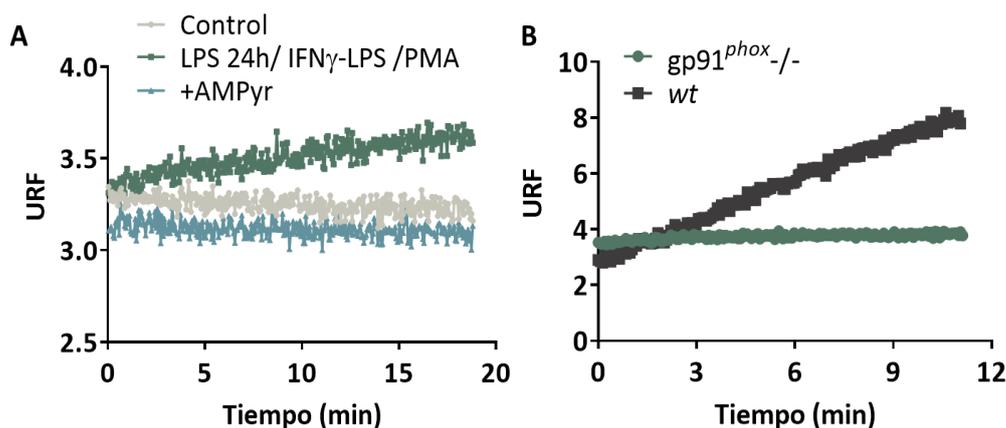


Figura 4-14. Formación de peroxinitrito en macrófagos $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$. **A)** Macrófagos $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$ fueron tratados con LPS (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas. Luego se agregaron inductores de la iNOS (IFN γ 400U/mL, LPS 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 horas. Finalmente se activó con PMA en presencia de CBA (100 μM) y se siguió la fluorescencia en el fluorímetro de placas ($\lambda_{\text{exc}}=330 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=450 \text{ nm}$) En una de las condiciones se agregó el inhibidor amino-metil-piridina (100 μM). **B)** Macrófagos *wt* y $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$ fueron tratados igual que en A) y se evaluó la oxidación de CBA de la misma forma.

*En definitiva, los macrófagos obtenidos de ratones deficientes de la subunidad catalítica de Nox2 y de la iNOS son buenos modelos para estudiar la relevancia de la formación de cada uno de los oxidantes en la respuesta típica del macrófago durante su activación farmacológica o la infección con *T. cruzi*, ya que la deficiencia en una de estas especies no afecta la producción de la otra. Por otro lado, se evidenció que los macrófagos *gp91^{phox}*^{-/-} conservan una mínima capacidad de formar $O_2^{\bullet-}$ (y $ONOO^-$), dependiente de otra isoforma de Nox que se induce frente a estímulos prolongados con agonistas de TLR-4, pero que no alcanza los niveles alcanzados por la Nox2 en macrófagos wt.*

II. Rol del $O_2^{\bullet-}$ y el $\bullet NO$ en la infección de macrófagos por *T. cruzi*

En la infección de macrófagos por *T. cruzi*, la formación de $ONOO^-$ dependiente de la producción de $O_2^{\bullet-}$ por parte de la Nox2 y de $\bullet NO$ por la iNOS, es responsable de disminuir en un 60% el número de amastigotas que se encuentran 24 horas después de realizada la infección. La modulación farmacológica de las enzimas confirma que la condición de mayor toxicidad sobre el parásito implica la producción de ambas especies en forma simultánea. Asimismo, el control de la infección varía con la cepa de parásitos ya que el contenido de enzimas antioxidantes es variable. En la infección con parásitos sobreexpresantes de la peroxirredoxina citosólica (Cpx), enzima capaz de detoxificar el $ONOO^-$, la activación de los macrófagos no lleva a una disminución de la infección, en acuerdo con que la toxicidad depende de la formación de $ONOO^-$ (158).

En este trabajo se utilizaron principalmente dos cepas de *T. cruzi*, originalmente aisladas y descritas a partir de fuentes diferentes. Se trata de la cepa Dm28c, perteneciente al DTU I de *T. cruzi*, aislada en primer lugar en zarigüeyas en Venezuela; y por otro lado la cepa híbrida CL-Brener, de origen brasileño, perteneciente al grupo (DTU) VI con transmisión mayormente doméstica y aislada de vinchucas (149).

a) Infección de macrófagos *iNOS*^{-/-}

La inducción de la *iNOS* provoca un aumento de la producción de *NO y como consecuencia un mayor control de la infección por *T. cruzi*, lo cual se relaciona directamente con la formación de peroxinitrito en este contexto (158).

La infección con *T. cruzi* en macrófagos *iNOS*^{-/-} muestra que existe un aumento de casi 4 veces en la proliferación de parásitos con respecto a lo que se observa en los *wt* (**Figura 4-15.A**). A su vez, la reconstitución del fenotipo salvaje por adición de una fuente externa de *NO , genera una reducción en el número de parásitos dentro de las células (**Figura 4-15.B**). Esto confirma los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo con otras estrategias y recapitula lo reportado en la literatura para la infección *in vitro* e *in vivo* (158,163,171,199), que muestran que el *NO tiene un rol citotóxico muy importante en la respuesta a *T. cruzi*, ya sea actuando directamente o a través de la formación de especies derivadas (como el peroxinitrito).

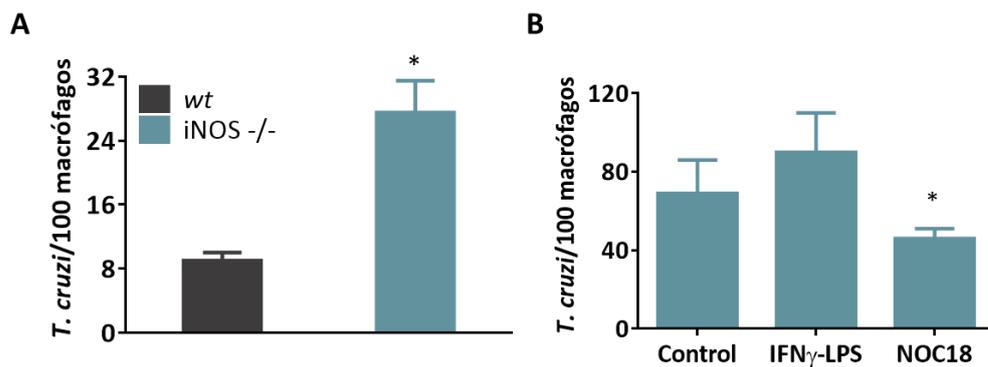


Figura 4-15. Infección de macrófagos *iNOS*^{-/-} con *Trypanosoma cruzi*. A) Macrófagos de médula ósea de ratones *wt* e *iNOS*^{-/-} plaqueados en portaobjetos fueron tratados con IFN- γ (400 u/mL) y LPS (8 μ g/mL) por 5 horas y luego se incubaron con tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener en relación 5:1 (parásitos:macrófagos) durante 2 horas. Se lavó para retirar los parásitos no internalizados. Luego de 24 h se fijó el cultivo con formaldehído y se tiñeron los núcleos con DAPI para determinar el índice de infección por microscopía de epifluorescencia. B) Macrófagos de médula ósea *iNOS*^{-/-} sin tratar o estimulados con IFN- γ y LPS fueron infectados como en A). En una de las condiciones se agregó el dador de *NO NOC18 (10 μ M). Los resultados se expresan en términos de parásitos intracelulares cada 100 macrófagos. * = $p < 0.05$

b) Infección de macrófagos *gp91*^{phox}^{-/-}

Como se muestra en la **Figura 4-16**, la deficiencia de la enzima Nox2 también provoca una falla en el control de la infección por *T. cruzi* *in vitro* tanto con la cepa CL-Brener como Dm28c. Se

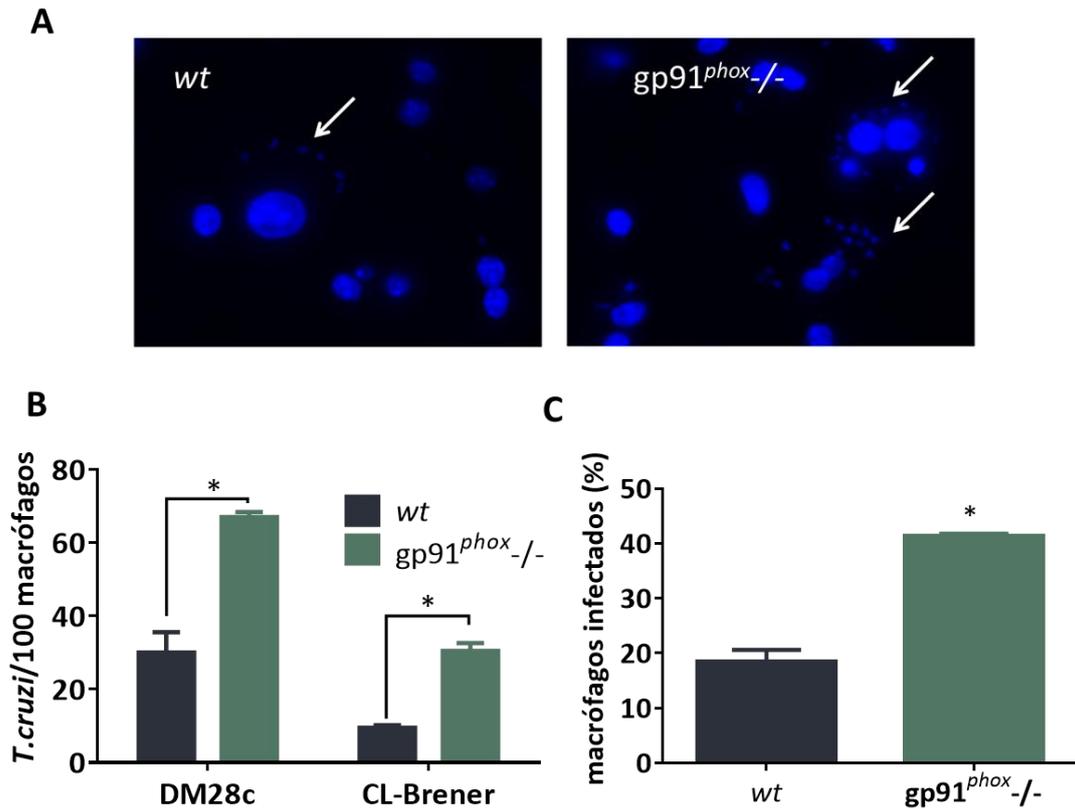


Figura 4-16. Infección de BMDM con *Trypanosoma cruzi*. Macrófagos de médula ósea de ratones de cepa salvaje y gp91^{phox}^{-/-} plaqueados en portaobjetos se incubaron con tripomastigotas de *T. cruzi* CL-Brener o Dm28c en relación 5:1 (parásitos:macrófagos) durante 2 horas. Luego se lavó para retirar los parásitos no internalizados y se mantuvo el cultivo en estufa por 24 horas adicionales. Finalmente se fijó el cultivo con formaldehído y se tiñeron los núcleos con DAPI para determinar el índice de infección por microscopía de epifluorescencia. A) Imagen representativa de la infección donde se ven los núcleos de macrófagos y parásitos en azul. Las flechas indican algunos de los parásitos intracelulares. B) Resultados expresados como cantidad de amastigotas cada 100 macrófagos. C) Resultados en términos de proporción de macrófagos que contenían al menos un parásito. * = p<0.05.

observa un aumento en el número de macrófagos infectados, y en el número de parásitos totales en relación al de macrófagos, que es entre 2 y 3 veces mayor en macrófagos gp91^{phox}^{-/-} con respecto a los wt. Estos datos evidencian la importancia de la enzima Nox2 en la respuesta citotóxica del macrófago. Cabe destacar que los efectos observados luego de 24 horas de infección, no se deben a cambios en el proceso de invasión, porque luego de 2 horas de incubación con los

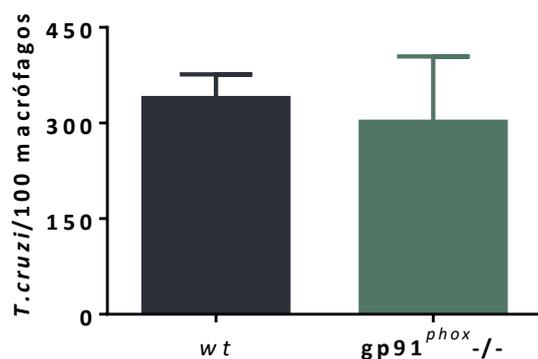


Figura 4-17. Invasión de *T. cruzi* en BMDM wt y gp91^{phox}^{-/-}. Macrófagos de médula ósea de ratones wt y gp91^{phox}^{-/-} plaqueados en portaobjetos se incubaron con tripomastigotas de *T. cruzi* Dm28c relación 5:1 (parásitos:macrófagos) durante 2 horas. Luego se lavó para retirar los parásitos no internalizados y se fijó el cultivo con formaldehído y se tiñeron los núcleos con DAPI para determinar el índice de infección por microscopía de epifluorescencia.

tripomastigotas no se observan diferencias significativas en el número de parásitos intracelulares (**Figura 4-17**). El aumento en el número de amastigotas en el cultivo de macrófagos gp91^{phox}^{-/-} después de 24 horas se asocia, por lo tanto, a una mayor sobrevivencia del parásito dentro de la célula. El mismo patrón se obtuvo cuando se infectaron macrófagos peritoneales de ratones deficientes en Nox2, con un aumento aún mayor del número de parásitos por célula (**Tabla 4.2**), lo cual constituye un control importante, dadas las diferencias que pueden existir entre los macrófagos de distintos tejidos.

	<i>T. cruzi</i> /100 macrófagos
wt	12,5 ± 2
gp91^{phox}^{-/-}	97 ± 3

Tabla 4.2. Infección de macrófagos peritoneales con *Trypanosoma cruzi*. Se obtuvieron macrófagos de lavado peritoneal de ratones de cepa salvaje y gp91^{phox}^{-/-} y se incubaron con tripomastigotas de *T. cruzi* Dm28c en relación 5:1 (parásitos:macrófagos) durante 2 horas. Luego se lavó para retirar los parásitos no internalizados y se fijó el cultivo 24 horas después. Se tiñeron los núcleos con DAPI y se contabilizó el n° de amastigotas cada 100 macrófagos por microscopía de epifluorescencia.

La susceptibilidad aumentada que se observa en macrófagos gp91^{phox}^{-/-} es consistente con lo que ocurre con otros modelos de infección por patógenos. Sin embargo, los resultados se contraponen a algunos trabajos publicados en los últimos años como se discutió en la sección “Antecedentes”.

Dado que los resultados obtenidos con los macrófagos iNOS^{-/-} son congruentes con los reportes disponibles en la literatura, se decidió profundizar en la infección en la cepa gp91^{phox}^{-/-}, con el objetivo de aportar datos sobre el rol del estallido respiratorio en la infección aguda por *T. cruzi* en el contexto de una aparente controversia en este aspecto.

c) Reconstitución del fenotipo wt en BMDM gp91^{phox}^{-/-} e infección con *T. cruzi*

En el modelo celular de infección de macrófagos con *T. cruzi*, se determinó que la ausencia de la subunidad catalítica de Nox2 resulta en un control deficiente de la infección. Para descartar la posibilidad de que la modificación genética en los macrófagos gp91^{phox}^{-/-} tenga otro efecto adicional a la pérdida de la capacidad de formar O₂^{•-} intrafagosomal, se procuró recomponer el

fenotipo salvaje en los BMDM $gp91^{phox-/-}$ mediante el agregado de una fuente exógena de $O_2^{\bullet-}$ dentro del fagosoma durante la infección por *T. cruzi* y evaluar el efecto sobre la infección.

Para la reconstitución se desarrollaron dos estrategias experimentales. En la primera se utilizó a la enzima xantina oxidasa (XO), la cual cataliza la oxidación de xantina a ácido úrico, generando H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$. Para lograr localizar la producción de $O_2^{\bullet-}$ en el interior del fagosoma, de forma de simular lo que ocurre durante la activación de Nox2, los tripomastigotas fueron incubados con la enzima procurando que la proteína se adhiera a la superficie del parásito. Finalizada la incubación, los parásitos fueron lavados para retirar el exceso y fueron usados para la infección de macrófagos. Para determinar la producción de $O_2^{\bullet-}$ se midió la actividad enzimática en la suspensión de XO antes y después de incubar con los tripomastigotas. Esta medida determinó que la suspensión de parásitos preserva aproximadamente el 50% de la actividad original de la suspensión (5×10^{-11} mol de $O_2^{\bullet-}$ /min). Considerando el número de tripomastigotas y asumiendo una distribución homogénea de la enzima, se puede estimar una actividad de formación de $O_2^{\bullet-}$ de 2.6×10^{-18} moles/min por tripomastigota. Este flujo de $O_2^{\bullet-}$ está en el orden de lo que puede formar un macrófago *wt* por fagosoma si tomamos en cuenta la velocidad determinada por oxidación de DHE (**Tabla 4-1**) y asumimos un promedio de 3 fagosomas por célula ($\sim 1 \times 10^{-18}$ moles de $O_2^{\bullet-}$ /fagosoma). Finalmente, se realizó la infección con estos tripomastigotas en los BMDM por dos horas y luego de cambiar el medio se agregó el sustrato de la enzima (xantina). La presencia de XO disminuyó el índice de infección (evaluado a las 24 horas) en los BMDM $gp91^{phox-/-}$, recuperándose parcialmente el control de la infección que presentan los BMDM *wt* ($\sim 60\%$, **Figura 4-18**). De esta manera, se reafirma la importancia de la formación de $O_2^{\bullet-}$ en la respuesta a la infección por *T. cruzi*.

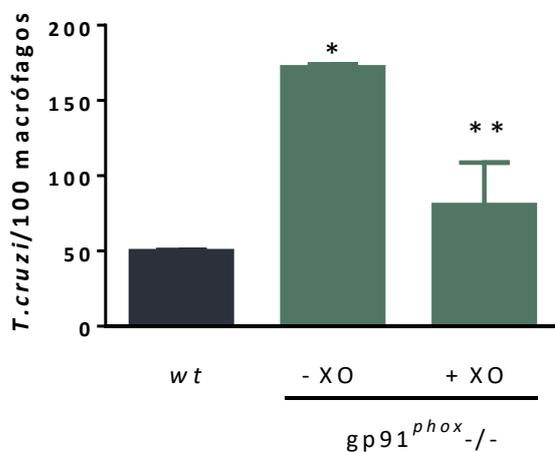


Figura 4-18. Reconstitución del $O_2^{\bullet-}$ intrafagosomal durante la infección por *T. cruzi* en BMDM $gp91^{phox-/-}$. A una suspensión de $1,8 \times 10^7$ tripomastigotas/mL se le agregó la enzima XO (150 mU/ml) y se incubó durante 20 min. Se lavó el exceso con PBS y luego se realizó la infección en los BMDM durante dos horas. Tras retirar los parásitos no internalizados se agregó medio de cultivo conteniendo xantina (150 μ M). Se evaluó el resultado de la infección a las 24 horas contando núcleos de macrófagos y parásitos teñidos con DAPI. "***" indica diferencia significativa con respecto a "*" con $p < 0.05$.

La segunda estrategia usada en el presente trabajo como prueba de concepto, fue la de recomponer el fenotipo salvaje de los macrófagos introduciendo el gen de gp91^{phox} a través de vectores lentivirales. Antecedentes del grupo de Didier Trono, quienes desarrollaron un método para restituir la actividad NADPH oxidasa en fagocitos de ratones con la mutación X-CGD. En esos trabajos, los autores transfectan células pluripotenciales de médula ósea con vectores lentivirales conteniendo la proteína gp91^{phox} y/o GFP como gen reportero y luego realizan un trasplante de médula ósea a ratones X-CGD, logrando un nivel considerable (40-50%) de recuperación de actividad NADPH oxidasa en granulocitos y macrófagos circulantes (187). En vista de esos resultados, se adaptó la estrategia al modelo de BMDMs, determinando que la transfección es más eficiente si se realiza durante el período de diferenciación de las células de médula ósea a macrófagos y con una suspensión de partículas lentivirales concentradas por ultra-filtración. Esto se determinó utilizando lentivirus que además de la proteína gp91, codifican para GFP y de esta manera, puede seguirse la incorporación del material genético por medio de la fluorescencia (**Figura 4.19**). En las condiciones mencionadas, aproximadamente un 60 % de los BMDM gp91^{phox}^{-/-} presentan señal fluorescente, indicando que la mayoría expresan la proteína reportera codificada en el vector.

A su vez, es posible detectar la expresión del ARNm de Nox2 (**Figura 4-20.A**) en macrófagos transfectados con el vector lentiviral pLV.gp91^{phox} (187). Se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar de forma relativa la expresión gp91^{phox}, pero por este método no se

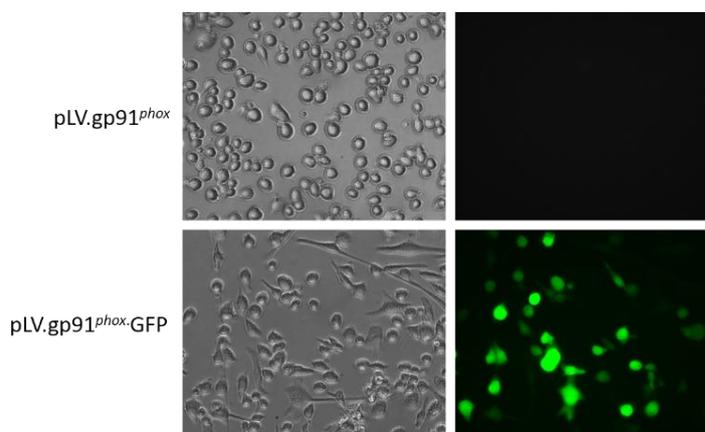


Figura 4-19. Transfección de partículas lentivirales en BMDM. Macrófagos de médula ósea (2×10^5 células) fueron incubados con 100 μ L de partículas lentivirales concentradas pLV.gp91^{phox}^{-/-} o pLV.gp91^{phox}^{-/-}.GFP desde el día 2 post extracción hasta el final del período de diferenciación (7 días). Luego se analizó la fluorescencia de GFP en un microscopio de epifluorescencia.

encontraron diferencias significativas en la expresión del mensajero en los macrófagos tratados o no con el vector lentiviral, si bien se observa un pequeño aumento (**Figura 4-20.B**). No ha sido posible evaluar hasta el momento la expresión y localización de gp91 por no disponer de buenos anticuerpos comerciales para la detección de la proteína por *western blot* o inmunocitoquímica.

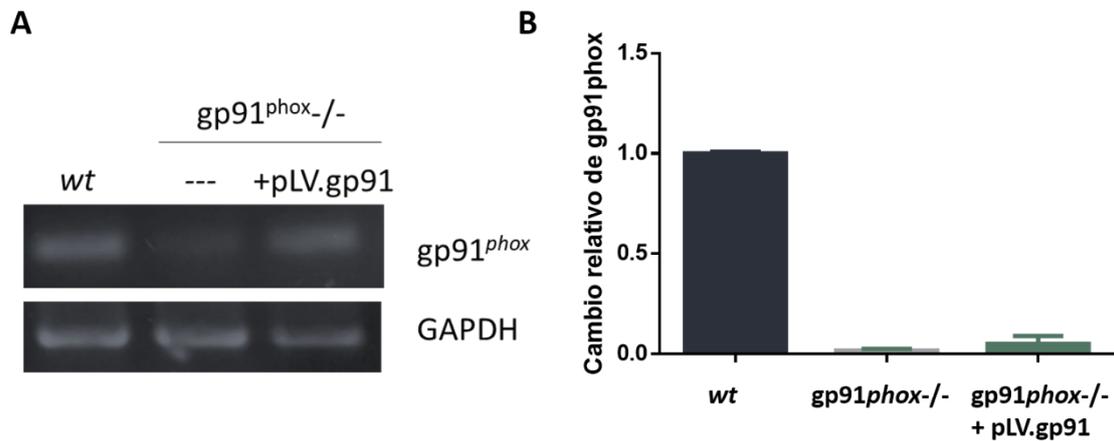


Figura 4-20. Expresión del ARNm de gp91^{phox}. Macrófagos de médula ósea (2×10^7) en proceso de diferenciación (2 días post extracción) fueron incubados con 200 μ L de una suspensión de vectores lentivirales conteniendo el gen gp91^{phox}. Luego 5 días (día 7 post extracción) se evaluó la expresión del ARNm por PCR convencional (A) utilizando primers específicos para gp91^{phox} y por PCR en tiempo real (B).

Por otro lado, se evaluó la actividad NADPH oxidasa indirectamente mediante la oxidación de Amplex Red y se vio que estas células recuperan parcialmente la capacidad de formar $O_2^{\bullet-}$ tras la activación con PMA, aunque en niveles mucho menores que los macrófagos wt (~35 veces menos, **Figura 4-21. A y B**). Consistentemente con los niveles bajos de actividad Nox2 obtenidos, existe una leve recuperación de la capacidad de controlar la infección por *T. cruzi* (**Figura 4-21.C**) y una vez más, permite relacionar la formación de $O_2^{\bullet-}$ intrafagosomal con la citotoxicidad sobre el parásito. Luego de probar diferentes condiciones para optimizar la expresión del gen gp91^{phox} a través de los vectores lentivirales no fue posible aumentar la actividad Nox2 en los BMDM. En el trabajo de Barde *et al*, donde se desarrollan y describen los vectores lentivirales con gp91^{phox} también hay una discordancia entre el número de células (granulocitos y macrófagos) GFP-positivas y las que son capaces de producir especies reactivas (medido como oxidación de DHR). Es decir que la expresión y/o la funcionalidad de la proteína gp91 probablemente sea menor que la del gen reportero. Esto podría explicarse por plegamiento y/o localización incorrectos de la subunidad catalítica de Nox2 o bien alteraciones de fenómenos de señalización en las células KO que impidan la activación del complejo. Cabe destacar que la relación partículas lentivirales:macrófagos utilizada en este trabajo se ajusta a lo recomendado para este tipo celular(188).

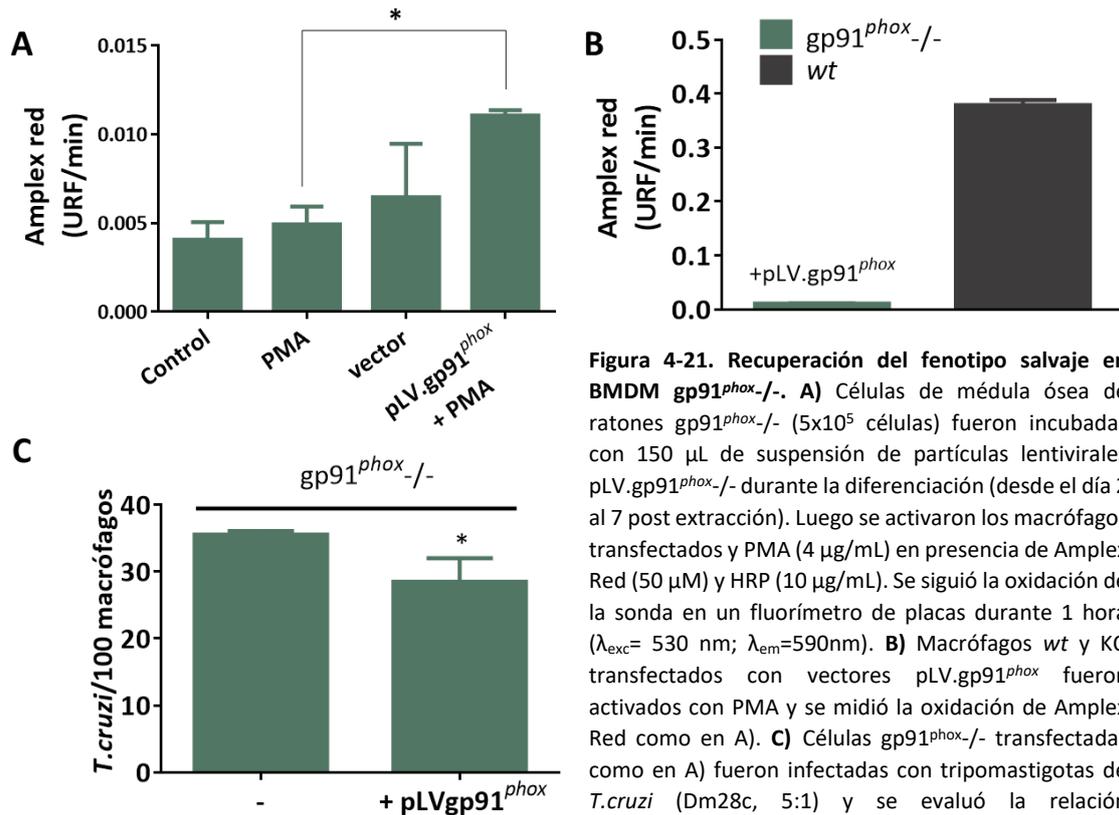


Figura 4-21. Recuperación del fenotipo salvaje en BMDM gp91^{phox}^{-/-}. **A)** Células de médula ósea de ratones gp91^{phox}^{-/-} (5x10⁵ células) fueron incubadas con 150 μ L de suspensión de partículas lentivirales pLV.gp91^{phox}^{-/-} durante la diferenciación (desde el día 2 al 7 post extracción). Luego se activaron los macrófagos transfectados y PMA (4 μ g/mL) en presencia de Amplex Red (50 μ M) y HRP (10 μ g/mL). Se siguió la oxidación de la sonda en un fluorímetro de placas durante 1 hora (λ_{exc} = 530 nm; λ_{em} =590nm). **B)** Macrófagos wt y KO transfectados con vectores pLV.gp91^{phox} fueron activados con PMA y se midió la oxidación de Amplex Red como en A). **C)** Células gp91^{phox}^{-/-} transfectadas como en A) fueron infectadas con tripomastigotas de *T. cruzi* (Dm28c, 5:1) y se evaluó la relación parásito/macrófagos luego de 24 horas, mediante el conteo de núcleos teñidos con DAPI.

d) Liberación de amastigotas en cultivos de macrófagos gp91^{phox}^{-/-} infectados con *T. cruzi*.

La infección de *T. cruzi* a nivel celular involucra las siguientes fases: 1) infección por tripomastigotas, 2) escape de la vacuola parasitófora, 3) diferenciación en amastigota 4) multiplicación de la forma amastigota, 5) diferenciación a tripomastigotas, 6) lisis de la célula y liberación al medio extracelular donde podrán infectar nuevas células. En las infecciones *in vitro*, puede observarse la aparición de tripomastigotas en el sobrenadante de cultivo debido a la lisis celular luego de 4-10 días (dependiendo del tipo celular, el inóculo, etc.). En experimentos de infección a macrófagos de médula ósea gp91^{phox}^{-/-} observamos que luego de 6 días de la infección se observan mayoritariamente formas amastigotas extracelulares, mientras que en el sobrenadante del cultivo de macrófagos wt son tripomastigotas (**Figura 4-22**). Esta observación podría explicarse por al menos 2 factores: que la ausencia de O₂^{•-} lleve a un defecto en la diferenciación a tripomastigotas y por eso no se complete el proceso o bien que la proliferación masiva de los parásitos intracelulares lleve a una lisis celular prematura, antes de que la

diferenciación se haya producido. También se sabe los amastigotas son capaces de infectar células localmente y perpetuar así la infección en los tejidos (200,201). Esta característica puede tener implicancias en la diseminación de la infección en los tejidos *in vivo*.

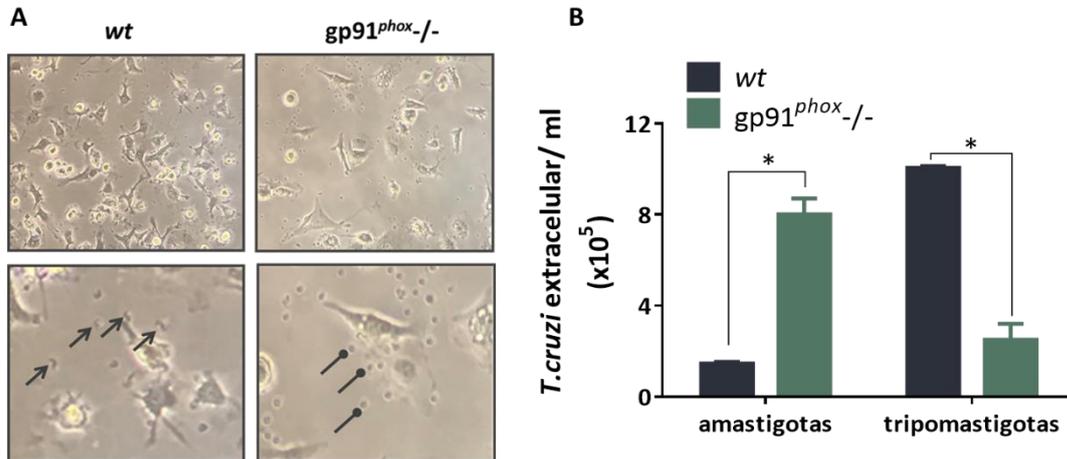


Figura 4-22. Liberación de amastigotas en macrófagos gp91^{phox}^{-/-} infectados con *Trypanosoma cruzi*. Macrófagos de médula ósea wt y gp91^{phox}^{-/-} fueron incubados con parásitos de la cepa CL-Brener durante 2 horas en relación 5:1 y luego se lavó para retirar los parásitos no internalizados. Luego de 6 días de cultivo se colectó el sobrenadante y se contabilizaron los parásitos extracelulares en el microscopio invertido con un aumento de 400X. A) Imagen representativa de los cultivos de macrófagos luego de 6 días de infección (flechas normales indican tripomastigotas, flechas redondas indican amastigotas). B) Cuantificación de los parásitos extracelulares en cámara de Neubauer. * y ** = p<0.05.

e) Inducción de Nox1 durante la infección por *Trypanosoma cruzi*

Para evaluar la participación de la Nox1 en el control de la infección se indujo su expresión previo a la infección. Para ello, se trató a los macrófagos con LPS 24 horas antes de infectar con los tripomastigotas. Sorprendentemente, la inducción previa de Nox1 en lugar de resultar en una disminución del número de parásitos, genera un aumento. Este fenómeno se observa tanto en macrófagos wt como gp91^{phox}^{-/-} como se puede apreciar en la **Figura 4-23**. Incluso en condiciones donde se activó también la iNOS (datos no mostrados), el tratamiento con LPS 24 horas previas a la infección provocó un aumento marcado en el número de parásitos por macrófago cuantificado luego de 24 horas de infección. Es decir, que el aumento de actividad de la Nox1 en lugar de colaborar en la eliminación del parásito, estaría actuando favoreciendo la multiplicación de *T.cruzi*.

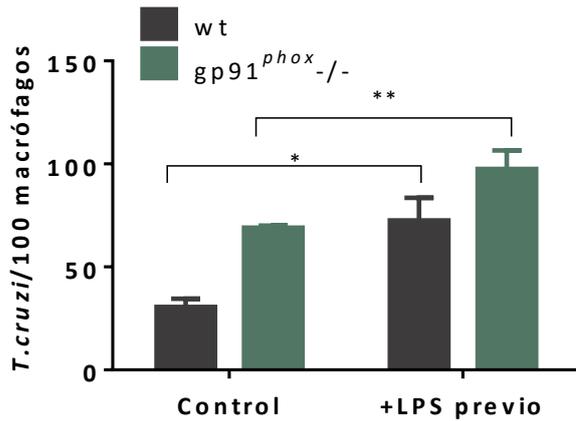


Figura 4-23. Infección en macrófagos wt y gp91^{phox-/-} induciendo previamente la Nox1. Macrófagos de médula ósea fueron incubados durante 24 h con LPS (4µg/mL) y luego infectados con *T. cruzi* (Dm28c) en una relación 5:1. Se evaluó el resultado de la infección luego de 24 h contando el número de núcleos de parásitos y de macrófagos teñidos con DAPI. * y **= p<0.05

Si bien la exposición a LPS puede tener otros efectos sobre los macrófagos, nuestra hipótesis para explicar estos resultados es que la producción de dosis sub-letales de O₂^{•-} por Nox1 y su consecuente dismutación a H₂O₂, podría tener un efecto pro-proliferativo en *T. cruzi*. Esta propiedad pro-proliferativa de pequeñas concentraciones de H₂O₂ se ha observado en un gran número de tipos celulares incluidos los tripanosomas (202,203).

En este sentido, estudiamos el efecto del H₂O₂ en la forma replicativa de *T. cruzi*, los epimastigotas. Para ello, se expuso a la forma replicativa de *T. cruzi*, los epimastigotas, a dosis entre 0 y 100 µM de H₂O₂ durante una hora y luego se evaluó su proliferación por varios días. Para este estudio se utilizaron distintas cepas con diferentes niveles de infectividad y de contenido de enzimas antioxidantes (CL-Brener, Dm28, CPX, MPX).

Las dosis entre 5-30 µM resultaron pro-proliferativas para los epimastigotas de todas las cepas, mientras que dosis mayores a esos valores fueron tóxicas para estos parásitos (**Figura 4-24**).

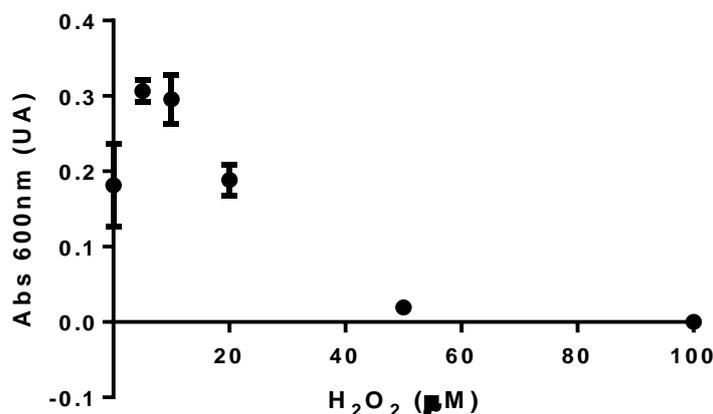


Figura 4-24. -Exposición de epimastigotas de CL-Brener a H₂O₂. Epimastigotas en una densidad de 3x10⁸/ml fueron tratados con distintas concentraciones de H₂O₂ (0, 5, 10, 20, 50 y 100 µM), luego se lavaron y fueron cultivados en una densidad inicial de 1x10⁶/ml. El crecimiento de cultivo se analizó por espectrofotometría, midiendo turbidez a 600 nm. En el gráfico se muestra la turbidez alcanzada en cada cultivo al día 6.

El flujo de H_2O_2 “umbral” (a partir del cual se observó toxicidad) fue diferente para cada cepa de parásito, lo cual probablemente esté relacionado con el contenido de enzimas antioxidantes de cada uno. Frente a una mayor capacidad para detoxificar H_2O_2 , se requiere mayor concentración para observar daño (**Tabla 4-3**). Para evaluar si la presencia de bajas concentraciones de H_2O_2 favorece la proliferación de los amastigotas intracelulares, se realizaron infecciones en macrófagos $gp91^{phox-/-}$ en presencia de flujos exógenos de esta especie. Se utilizó la enzima glucosa oxidasa como fuente química de H_2O_2 variando la concentración de proteína para regular el flujo. En la **figura 4-25**

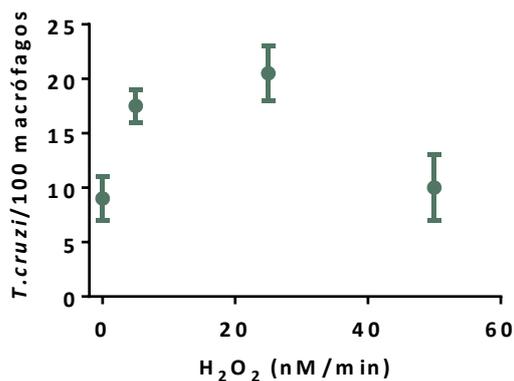


Figura 4.25. Infección de macrófagos $gp91^{phox-/-}$ con *T. cruzi* en presencia de un sistema dador de H_2O_2 . Macrófagos de médula ósea (2×10^5) fueron infectados con tripomastigotas Dm28 en presencia de distintas concentraciones de glucosa oxidasa para generar flujos de H_2O_2 entre 0 y 50 nM/min. Luego de 2 horas de incubación se lavó el exceso de parásitos y enzima. A las 24 horas se evaluó el índice de infección tificando los núcleos con DAPI.

*La infección de macrófagos deficientes en las enzimas iNOS y Nox2 permitieron demostrar la importancia de estas enzimas en el control de proliferación de *T. cruzi*. Es importante destacar que el papel del $O_2^{\bullet-}$ derivado de Nox2 ha sido cuestionado en la literatura, por lo que las evidencias presentadas suman argumentos en favor del rol de esta especie en el contexto de la infección de macrófagos por *T. cruzi*. La reconstitución genética y bioquímica de la actividad Nox2 en macrófagos $gp91^{phox-/-}$ resultó en una recuperación de la citotoxicidad acorde al nivel de restauración del fenotipo. A su vez, se evidenció un vínculo entre la infección por *T. cruzi* y el*

Tabla 4-3. Dosis máxima de H_2O_2 que tiene efecto pro-proliferativo para distintas cepas de *T. cruzi*.

Cepa	H_2O_2
CL-Brener	10 μ M
Dm28c	20 μ M
CPx	30 μ M
MPx	20 μ M

lleva a un aumento del número de amastigotas detectados 24 horas después. En cambio, que un flujo de 50 nM/min no tiene ese efecto pro-proliferativo sobre el parásito.

En definitiva, es posible que la formación de $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 en bajas concentraciones por la Nox1 en forma sostenida, luego de transcurrido el estallido respiratorio, pueda contribuir a la proliferación de los parásitos que sobreviven al ataque oxidativo del fagosoma en estas células.

aumento de la expresión de la Nox1. Esta isoforma produce $O_2^{\bullet-}$ en niveles mucho menores que la Nox2 y esta actividad favorece la proliferación los parásitos intracelulares, aumentando la infección.

III. Rol de la Nox2 *in vivo*: infección con *T. cruzi* en el modelo murino

a) Sobrevida y parasitemia

Para estudiar la relevancia de la formación de $O_2^{\bullet-}$ por la Nox2 a nivel sistémico en la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, realizamos infecciones en ratones de cepa salvaje y $gp91^{phox-/-}$. La infección fue realizada de forma intraperitoneal, 1×10^7 tripomastigotas de la cepa Dm28c. El número de parásitos utilizado es alto debido a que las cepas se encuentran en cultivo hace varios años lo que determina que su virulencia esté atenuada (204).

Las infecciones fueron realizadas en paralelo en las dos cepas de ratón con una duración máxima de 12 días debido a que los animales $gp91^{phox-/-}$ mueren de forma prematura por la infección (Figura 4-26.A). Esto ya había sido reportado por otros autores (170,171) y resulta esperable por la deficiencia de una enzima clave en la respuesta inmune innata frente a muchos patógenos (205,206). Sin embargo, en la determinación de parásitos en sangre, método clásico para el seguimiento y evaluación de la infección con *T. cruzi* en el modelo murino, no se encontraron diferencias significativas (Figura 4.26.B).

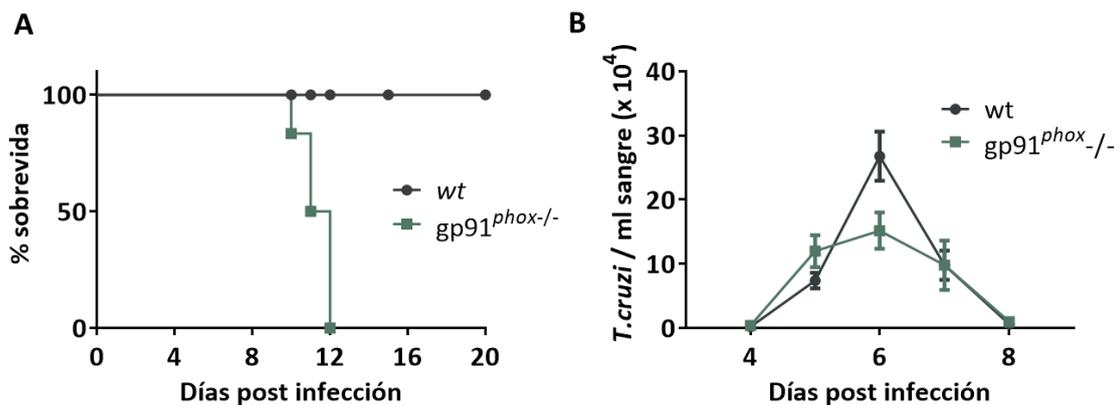


Figura 4.26. Infección de ratones *wt* y $gp91^{phox-/-}$ con *Trypanosoma cruzi*. Animales de 6-8 semanas de edad de las cepas C57Bl-6J y $gp91^{phox-/-}$ fueron inoculados con 1×10^7 tripomastigotas de la cepa Dm28c por vía intraperitoneal. A) Curva de sobrevida representativa. B) Parasitemia. A partir del día 4 se realizó la extracción de sangre y conteo de parásitos en cámara de Neubauer.

b) Evaluación de la carga parasitaria

Para evaluar de otra forma el control de la infección por parte de los ratones, determinamos la carga parasitaria en tejidos de animales infectados mediante la detección de ADN de *T. cruzi*. Para ello, comparamos 3 juegos de *primers* específicos reportados en la literatura. Seleccionamos los que presentaron mayor sensibilidad y especificidad en la PCR de tiempo real, que amplifican una región de ADN satélite del parásito y son ampliamente utilizados con estos fines (189).

Como se observa en la **Figura 4.27**, hay un claro incremento de la carga parasitaria en el tejido cardíaco y músculo esquelético de ratones $gp91^{phox-/-}$ con respecto a los *wt*. Estos resultados van en línea con la hipótesis de que la falta de la actividad Nox2 favorece la sobrevida y multiplicación de *T. cruzi* dentro del hospedero, como se observa en otros modelos de deficiencia de esta enzima ($p47^{phox-/-}$, tratamiento con apocinina) (172,207). Lo anterior permite inferir que la formación de $O_2^{\bullet-}$ es importante en el curso de la respuesta inmune desencadenada frente a la infección por el parásito.

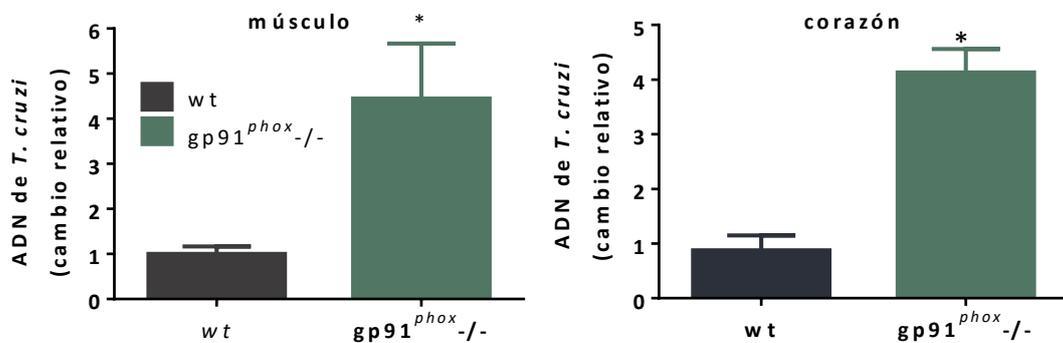


Figura 4.27. Carga parasitaria en tejido de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. Animales de 8 semanas de edad de las cepas C57BL/6 y $gp91^{phox-/-}$ fueron inoculados con 1×10^7 tripomastigotas de la cepa Dm28c por vía intraperitoneal. Luego de 11 días se sacrificaron los animales y se aisló tejido muscular esquelético (cuádriceps) y muscular cardíaco. Se realizó la extracción de ADN con el reactivo DNAzol (Life technologies) y luego se cuantificó la cantidad de ADN parasitario por PCR en tiempo real utilizando primers específicos de una región de ADN satelital de *Trypanosoma cruzi* en un equipo Illumina. *= $p < 0.05$.

c) Análisis de la infección por bioluminiscencia *in vivo*

Otra estrategia utilizada para evaluar el efecto de la deficiencia de Nox2 en la infección por *T. cruzi* fue visualización *in vivo* de la invasión de los parásitos en los ratones, lo cual permite obtener una perspectiva global del animal. Para ello utilizamos una cepa de *T. cruzi* modificada genéticamente que expresa una variante de la proteína fluorescente amarilla (mNeonGreen) y la enzima luciferasa con emisión desplazada hacia el rojo (CL-Luc:Neon), la cual permite detectar los principales focos de infección en el animal ya sea por fluorescencia o mediante la inyección de luciferina y posterior detección de bioluminiscencia. Esta cepa fue desarrollada y cedida gentilmente por el Dr. Martin Taylor (176).

La infección con estos parásitos se realizó en la Unidad de animales transgénicos y de experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo en colaboración con el Dr. Marcelo Comini y el Dr. Diego Benitez del Laboratorio de Biología Redox de Trypanosomas. Se trabajó con grupos de 5 ratones y se inocularon 1×10^7 tripomastigotas de CL-Brener LucNeon a cada ratón, de forma intraperitoneal. A partir de las 24 horas post infección y durante 10 días (a intervalos de 48 o 72 h) se realizó el análisis de la bioluminiscencia *in vivo* en un equipo que permite la adquisición de datos de luminiscencia, radiografía de rayos X y reflectancia de hasta 5 ratones a la vez (Bruker, In vivo Xtreme). En la **Figura 4-28.A**, se muestran las imágenes de luminiscencia superpuestas con las radiografías de rayos X de los ratones *wt* y *gp91^{phox}-/-* en los días 3, 5, 7 y 10 post- infección y en la **Figura 4-28.B** la cuantificación de la señal de cada ratón. Los animales presentan una localización principalmente abdominal de la infección, aunque en algunos individuos se ve una invasión generalizada. Puede observarse que la intensidad de la señal aumenta en el grupo *wt* hasta el día 5 (coincidente con el pico de parasitemia, **Figura 4-26**) y luego empieza a disminuir notoriamente, mientras que en los *gp91^{phox}-/-* permanece elevada. Esto indica un control deficiente de la infección por parte de los animales KO, lo que está en línea con la muerte de los animales a partir del día 10 post infección (al día 11 post infección habían muerto 3 animales y los otros dos fueron sacrificados por su grave estado), al tiempo que los *wt* sobrevivieron a todo el experimento. El día 11 post infección se realizó la visualización de la luminiscencia de los órganos *ex vivo* en un animal de cada grupo. En este análisis (**Figura 4-29**) puede verse que en los *gp91^{phox}-/-* se distingue señal bioluminiscente en todos los tejidos extraídos, pero principalmente en bazo, tejido adiposo y tubo digestivo. A su vez puede verse claramente la diferencia de intensidad de la señal entre las cepas, lo cual se relaciona con la mayor invasión de parásitos en los ratones KO, en línea con los resultados obtenidos por PCR en tiempo real.

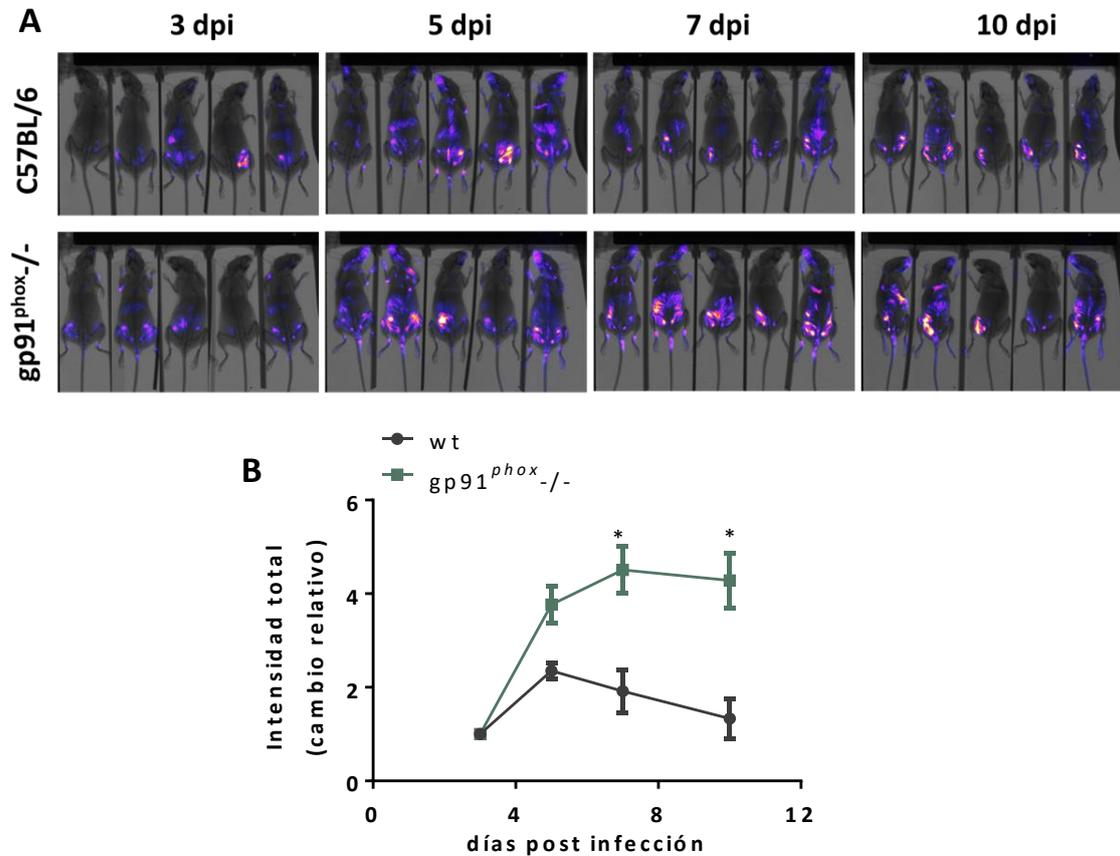


Figura 4-28. Análisis de bioluminiscencia *in vivo* en ratones infectados con *T. cruzi* CL- Luc:Neon. Los ratones *wt* y *gp91^{phox}^{-/-}* (5 animales por grupo) fueron inoculados con 1×10^7 tripomastigotas de cultivo *via* intraperitoneal. A partir del día 3 se registró la bioluminiscencia *in vivo* en un equipo *In vivo Xtreme Bruker* tras la inyección de luciferina (150mg/Kg) intraperitoneal bajo anestesia. **A)** Imágenes adquiridas acumulando 5 minutos de exposición. **B)** Aumento relativo de la intensidad total de luminiscencia de cada ratón con respecto al día 3. *= $p < 0.05$.

Como se ve en las imágenes de bioluminiscencia de los animales de cepa salvaje, luego del pico de parasitemia, los animales comienzan a controlar la infección y la señal disminuye. Mientras que en los animales *gp91^{phox}^{-/-}* aún en el día 10 se observa una señal bastante generalizada. Por otra parte, llama la atención la gran colonización hallada en el bazo en los animales KO, siendo el principal sitio de infección al día 11. Gracias a la expresión del reportero mNeonGreen, fue posible determinar la fluorescencia proveniente de *T. cruzi* en el lisado total del bazo, constatándose la diferencia de señal en este órgano entre las dos cepas de ratones, con un valor casi 10 veces mayor en la cepa KO. (**Figura 4-30**). Esto es interesante, ya que algunos autores proponen que el colapso del bazo es la causa de la muerte en animales infectados con cepas

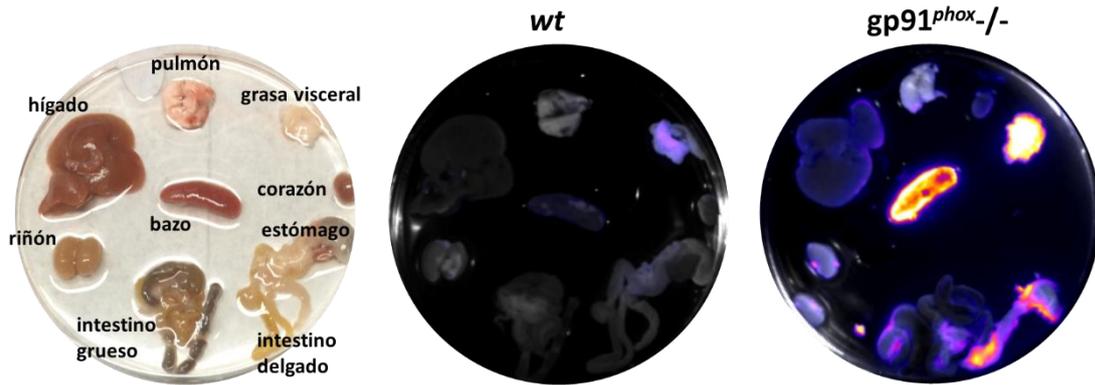


Figura 4-29. Bioluminiscencia *ex vivo* en tejidos de ratones *wt* y *gp91^{phox}-/-* infectados con *T.cruzi* CL-Brener. Luego de 11 días post infección, se seleccionó un ratón de cada grupo para la visualización *ex vivo* (tercer ratón en las imágenes de cada grupo, día 10, figura 4-28). Se inyectó luciferina vía IP 150 mg/Kg y luego de 7 min se sacrificó al animal por desangrado a través del corazón bajo anestesia en dosis letal. Finalmente, se disecaron los órganos y fueron dispuestos en una placa de Petri sumergidos en luciferina 0.3 mg/Kg para su visualización en el equipo Bruker, In vivo Extreme II.

virulentas. Se propone que ocurre una destrucción masiva de macrófagos infectados en el bazo y la liberación de factores inflamatorios asociados llevaría al colapso del animal (208).

Es llamativo que a pesar de la mayor carga parasitaria detectada en los tejidos de ratones

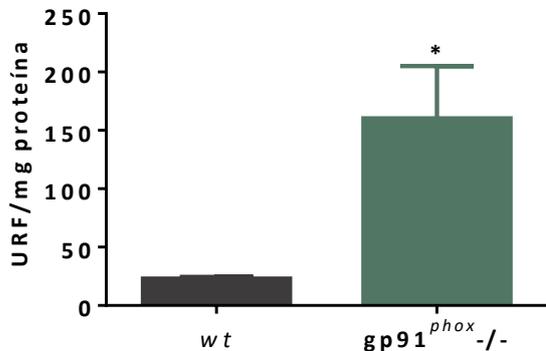


Figura 4-30. Parasitismo en bazos de ratones *wt* y *gp91^{phox}-/-* . 10 días post infección, se aisló el bazo de ratones infectados con la cepa CL-Luc:Neon. Tras la disrupción mecánica del tejido se obtuvo una suspensión con la totalidad de las células del tejido. Se cuantificó la fluorescencia ($\lambda_{exc}=485$ nm; $\lambda_{em}=520$ nm) en un lector de placas y se normalizó por la cantidad de proteínas determinada por el método ácido bicinónico.

gp91^{phox}-/- infectados, la parasitemia sea similar a la de los animales *wt*. Si bien este indicador se usa generalmente para evaluar el curso de la infección, la parasitemia no reflejó el grado de invasión a nivel tisular en este caso. Los resultados que se muestran en la **Figura 4-22** podrían explicar por qué no hay mayor cantidad de tripomastigotas circulantes en los animales KO, ya que se observa que existe liberación de amastigotas a partir de macrófagos *gp91^{phox}-/-*, capaces de infectar localmente las células vecinas. La ocurrencia de este fenómeno *in vivo* podría determinar una gran invasión de los tejidos, sin que exista un importante aumento de tripomastigotas en sangre en animales *gp91^{phox}-/-*.

Los resultados obtenidos en la infección *in vivo* de ratones *gp91^{phox}-/-* demuestran el rol citotóxico del $O_2^{\bullet-}$ en el marco de la respuesta inmune. Como se discutió previamente en la

sección 4.II-e, flujos menores de oxidantes como el H_2O_2 tienen efectos pro-proliferativos sobre *T.cruzi* (202,203,209), e incluso son capaces de promover un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes (210), confiriéndoles una ventaja durante la infección. Sin embargo, los flujos de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , y ONOO^- que forman los macrófagos en una respuesta inflamatoria son elevados y resultan en concentraciones muy altas, en particular cuando se calcula el valor alcanzado en un espacio de volumen reducido como lo es el fagosoma (26,196,211).

Las observaciones obtenidas en el marco de este trabajo coinciden con antecedentes de modelos *in vivo* que reportan la susceptibilidad que confiere a los ratones la deficiencia en la enzima Nox2 frente a la infección por *T. cruzi*. También se reafirma que no existen diferencias significativas en las parasitemias durante la fase aguda de la infección con respecto a los ratones *wt*. Lo novedoso es que se pudo evidenciar un importante aumento en la invasión de los tejidos en los animales KO con respecto a los de cepa salvaje, lo cual va en línea con la hipótesis de que los macrófagos $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$ son menos eficientes en su respuesta oxidativa y citotóxica.

*Por medio de infecciones in vivo en ratones $\text{gp91}^{\text{phox}}/-$, se pudo evidenciar la marcada susceptibilidad debido a la ausencia de Nox2 frente a la infección por *T. cruzi*, reflejada en la mayor mortalidad de este grupo. Por medio de técnicas de biología molecular e imagenología in vivo fue posible determinar la gran colonización de tejidos en animales KO. Estos resultados reafirman la importancia de la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en los fagocitos profesionales para controlar la proliferación del parásito.*

5- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se caracterizó la formación de oxidantes en macrófagos de médula ósea de ratones deficientes en las enzimas iNOS y Nox2 y se vio que frente a estímulos clásicos son incapaces de formar $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ respectivamente, al tiempo que la deficiencia de una de las enzimas no impacta en la actividad de la otra. La ausencia de producción tanto de $\cdot\text{NO}$ como de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en el contexto de la infección por *T. cruzi* aumenta considerablemente la susceptibilidad de los macrófagos, un fenómeno que se revierte parcialmente cuando se restaura la formación de oxidantes por fuentes exógenas. De esta forma, demostramos que la respuesta oxidativa de los macrófagos es muy importante para el control de la infección por *T. cruzi*.

Por otro lado, los macrófagos deficientes de Nox2 conservan una mínima capacidad de producir $\text{O}_2^{\cdot-}$ cuando se realizan combinaciones de estímulos como el LPS y el PMA. Esta actividad se observa concomitantemente con un aumento de la expresión de la isoforma Nox1 de la NADPH oxidasa, reportada anteriormente en macrófagos. Por primera vez se estudió la relación entre esta enzima y la interacción con *T. cruzi*, observándose una inducción de la proteína tras la infección. Sin embargo, aún resta conocer el rol de esta proteína en la respuesta del macrófago, ya que se evidenció que la expresión de la proteína correlaciona negativamente con el control de la infección. Sería importante profundizar en el estudio del rol de Nox1 durante la infección y determinar si esta enzima favorece la proliferación de *T. cruzi in vivo*, ya que es un aspecto no explorado de la interacción con el hospedero vertebrado. Las posibles estrategias para abordar este aspecto son la evaluación de la expresión de la proteína en lavado peritoneal y bazo y eventualmente realizar infecciones en ratones Nox1^{-/-}.

En el modelo *in vivo* se pudo demostrar que la Nox2 es un factor clave en el control de la proliferación de *T. cruzi* en ratones infectados, ya que su ausencia conlleva a una mayor colonización de tejidos y a la muerte prematura de los animales. Estos resultados están en acuerdo con lo observado en el modelo *in vitro* de infección por *T. cruzi* y también en otros modelos de infección por patógenos. Sin embargo, hay aspectos que aún requieren mayor investigación, como por ejemplo qué factores determinan que las parasitemias de ratones gp91^{phox}^{-/-} infectados no sean mayores que las de los animales *wt*. Algunos indicios obtenidos en este trabajo, conducen a pensar que podría existir una diseminación diferente en los ratones gp91^{phox}^{-/-}, dependiente de amastigotas que se liberan e infectan localmente sin afectar la cantidad de tripomastigotas circulantes. En este sentido, es importante estudiar el curso

temporal de la diferenciación y liberación de los parásitos en macrófagos $gp91^{phox-/-}$. Por otro lado, sería interesante investigar si existe una mayor retención de parásitos a nivel del bazo de animales $gp91^{phox-/-}$, que permita explicar la gran colonización de este tejido observada en animales infectados con *T. cruzi*.

Por otro lado, es importante comprender qué es en definitiva lo que lleva a la muerte del animal, un punto aún en discusión en la literatura. Se plantea evaluar si la proliferación descontrolada del *T. cruzi* determina que existan diferencias en la respuesta inflamatoria (producción de citoquinas, infiltrado inflamatorio, etc.) o si es directamente la invasión de los tejidos por parte del parásito la que causa el colapso del animal.

6- PUBLICACIONES

Artículos originales asociados al desarrollo de esta tesis:

1- Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxynitrite formation by macrophages. Carolina Prolo, María Noel Álvarez, Natalia Ríos, Gonzalo Peluffo, Rafael Radi y Natalia Romero. *Free Radical Biology and Medicine*. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.027.

2- NOX2-derived superoxide radical is crucial to control acute *Trypanosoma cruzi* infection. Carolina Prolo, Damián Estrada, Lucía Piacenza, Diego Benitez, Marcelo Comini, Rafael Radi y María Noel Álvarez. *Redox Biology*, 2021. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102085

Artículos de revisión y capítulos de libro publicados vinculados al tema de la Tesis:

1- Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxynitrite detection. Carolina Prolo-Natalia Ríos, Lucía Piacenza, María Noel Álvarez y Rafael Radi. *Free Radical Biology & Medicine*, 2018. (Revisión). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.02.017

2- Peroxynitrite Formation and Detection in Living Cells. Natalia Ríos-Carolina Prolo, María Noel Álvarez, Lucía Piacenza y Rafael Radi. *Nitric Oxide 3rd Edition*, Editado por Louis J. Ignarro Elsevier 2017. (Capítulo de Libro). DOI: 10.1016/B978-0-12-804273-1.00021-1

3- Arachidonic acid and nitroarachidonic: effects on NADPH oxidase activity. Lucía Gonzalez-Perilli, Carolina Prolo y María Noel Álvarez. *Bioactive lipids in Health and Disease*, Editado por Andres Trostchansky y Homero Rubbo, Springer Nature 2019. (Capítulo de libro). DOI: 10.1007/978-3-030-11488-6_6.

Participación en otros artículos relacionados

1- Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. Natalia Rios, Lucía Piacenza, Madia Trujillo, Alejandra Martínez, Verónica Demicheli, Carolina Prolo, María Noel Álvarez, Gloria V. López y Rafael Radi. *Free Radical Biology and Medicine* 2016 . DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.033

2- Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. Alejandra Martínez, Carolina Prolo, Damián Estrada, Natalia Rios, María Noel Álvarez, María Dolores Piñeyro, Carlos Robello, Rafael Radi, Lucía Piacenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 2019. DOI: 10.1073/pnas.1821487116.

7- AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a las personas vinculadas directamente con esta tesis:

A Noel, por ser mi guía en este trabajo y en la vida, por siempre estimularme a pensar, por mostrarme lo que realmente es importante y lo que no, y, sobre todo, por su protección, dedicación y amistad.

A Rafael, por la oportunidad de ser parte de este grupo, por el apoyo y la confianza, por plantearme nuevos desafíos siempre y por contagiar el entusiasmo por la ciencia

A Lucía (P), porque es parte de cada resultado de esta tesis, porque es mi referente y amiga.

A Nati (Romero) y Gonza, con quienes trabajé al principio de esta tesis, me enseñaron mucho y me divertí aún más.

A Damián, Ale y Gaby, compañeros incondicionales de los tripos y el bioterio, siempre presentes para discutir un resultado, contar una infección o tomar un mate.

A Pao, por su ayuda cuando le tenía miedo a los ratones, por los medios a último momento y por su compañía siempre.

A Mariela, Marcelo y Martín de URBE, por su ayuda constante con los ratones.

A Nati Rios, por cederme sus sondas maravillosas para detectar peroxinitrito.

A Marcelo Comini y Diego Benitez, con quienes realicé los experimentos de bioluminiscencia.

A Natalia Lagos, que me ayudó con procedimientos con los ratones en la UATE.

A Celia Quijano, quien amablemente me cedió los plásmidos para los lentivirus y me enseñó a trabajar con ellos.

A los miembros de la CAS, Leonor Thomson, Marcelo Comini y Patricia Cassina por el seguimiento durante el desarrollo del trabajo y al tribunal: Leonor Thomson, Adriana Parodi y María Laura Chiribao por aceptar corregir esta tesis.

En segundo lugar, quiero agradecer a personas que indirectamente hicieron posible el desarrollo de este trabajo:

A Clarita, por aguantarme mientras escribo esta tesis.

A mis amigos con “muchos problemas”, que son mi sostén y diversión día a día y me rescatan siempre.

A todos mis compañeros y amigos del CEINBIO, que hacen de este lugar, el mejor para trabajar.

A mi madre, luchadora incansable, que me dio todo para que estudie y crezca con todas las posibilidades. A mi padre, que me motivó siempre a buscar la excelencia y me hubiese encantado que viera esta defensa. A Marce, mi hermano, científico de alma, siempre desafiándome con preguntas y al que nunca convengo fácilmente, y a Marcos, mi otro hermano, culpable de que haya conocido la bioquímica.

A Nacho, Isabella y Leandro, mi equipo, mis amores, que padecieron esta tesis y me ayudaron infinitamente.

Y para finalizar agradezco a las instituciones que de una u otra forma hicieron posible este doctorado:

A la Facultad de Medicina, que se convirtió en mi segunda casa.

A las agencias financiadoras: la Comisión Académica de Posgrado, CAP, que me otorgó becas de maestría, doctorado y finalización de doctorado; a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, ANII, y Comisión sectorial de investigación científica, CSIC, que financiaron proyectos de investigación y desarrollo a María Noel Álvarez; al Sistema Nacional de Investigadores, SNI, al cual pertenezco hace varios años ; al Programa de desarrollo de las ciencias básicas, PEDECIBA, por las alícuotas de estudiante; y Espacio interdisciplinario, EI, por su apoyo al CEINBIO.

8- ABREVIATURAS

A

AMPyr: Amino-metil-piridina

B

BHI: medio Brain heart infusion

BMDM: Bone marrow derived macrophage

C

cit c³⁺: citocromo c ³⁺

CaM: calmodulina

CPX: peroxirredoxina citosólica de *T. cruzi*

D

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCFH₂: dihidro-dicloro-fluoresceína

DHE: Di-hidroetidio

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

dPBS: *Dulbecco's phosphate-buffered solution*

DPI: Difenileniodonio

Duox: *Dual oxidase*

DTU: *Discrete typing unit*

E

Et⁺: Etidio

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial

F

FAD: Dinucleótido de flavina y adenina

FIT-C: fluorescein isothiocyanate

FMN: mononucleótido de flavina

G

GFP: green fluorescein protein

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

H

HRP: peroxidasa de rábano

I

IFN γ : Interferón-gamma

IL: Interleuquina

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IP3: Inositol 3-fosfato

IRF-1: *interferon response factor 1*

K

KO: knock out

L

LPS: lipopolisacárido

M

MPX: peroxirredoxina mitocondrial de *T. cruzi*

MCS-F: *macrophage colony-stimulating factor*

N

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NBT: *Nitroblue-tetrazolium*

NF κ -B: *Nuclear factor κ -B*

nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal

NOS2: Óxido nítrico sintasa 2 (inducible)

Nox1: NADPH oxidasa 1

Nox2: NADPH oxidasa 2

O

2-OH-Et⁺: 2-hidrohetidio

P

PAMP: *Pathogen associated motif pattern*

PBS: phosphate buffered-saline

PKC: protein quinasa C

PMA: phorbol myristate acetate

PRR: proline-rich region

R

RPMI: medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

S

SBF: Suero bovino fetal

SH3: *Src homology 3*

siRNA: *short interference ribonucleic acid*

SOD: Superóxido dismutase

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

T

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral β

TLR: *Toll-like receptor*

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

W

wt: wild type

X

XO: Xantina oxidasa

9- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gordon, S. (2008) Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European journal of immunology* **38**, 3257-3264
2. Keller, H. U., Hess, M. W., and Cottier, H. (1975) Physiology of chemotaxis and random motility. *Seminars in hematology* **12**, 47-57
3. Stossel, T. P. (1975) Phagocytosis: recognition and ingestion. *Seminars in hematology* **12**, 83-116
4. Baldrige, C. W. G., R. W. (1932) "The extra respiration of phagocytosis". *American Journal of Physiology-Legacy Content* **103(1)**, 235-236
5. Rossi, F., and Zatti, M. (1964) Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia* **20**, 21-23
6. Iyer, G. Y., and Questel, J. H. (1963) NADPH and NADH oxidation by guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **41**, 427-434
7. Babior, B. M., Curnutte, J. T., and McMurrich, B. J. (1976) The particulate superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest* **58**, 989-996
8. Babior, B. M., Kipnes, R. S., and Curnutte, J. T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* **52**, 741-744
9. Berendes, H., Bridges, R. A., and Good, R. A. (1957) A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minnesota medicine* **40**, 309-312
10. Arnold, D. E., and Heimall, J. R. (2017) A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Advances in therapy* **34**, 2543-2557
11. Green, L. C., Tannenbaum, S. R., and Goldman, P. (1981) Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* **212**, 56-58
12. Stuehr, D. J., and Marletta, M. A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7738-7742
13. Iyengar, R., Stuehr, D. J., and Marletta, M. A. (1987) Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6369-6373
14. Stuehr, D. J., and Nathan, C. F. (1989) Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* **169**, 1543-1555
15. Nathan, C. F., and Hibbs, J. B., Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**, 65-70
16. Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1988) The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* **12**, 365-372
17. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Byrns, R. E., Wood, K. S., and Chaudhuri, G. (1988) Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **246**, 218-226
18. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1620-1624

19. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* **266**, 4244-4250
20. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **288**, 481-487
21. Ischiropoulos, H., Zhu, L., and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* **298**, 446-451
22. Prolo, C., Alvarez, M. N., and Radi, R. (2014) Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors* **40**, 215-225
23. Flannagan, R. S., Cosio, G., and Grinstein, S. (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* **7**, 355-366
24. Beyenbach, K. W., and Wieczorek, H. (2006) The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of experimental biology* **209**, 577-589
25. Mantegazza, A. R., Savina, A., Vermeulen, M., Perez, L., Geffner, J., Hermine, O., Rosenzweig, S. D., Faure, F., and Amigorena, S. (2008) NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells. *Blood* **112**, 4712-4722
26. Martinez, A., Prolo, C., Estrada, D., Rios, N., Alvarez, M. N., Pineyro, M. D., Robello, C., Radi, R., and Piacenza, L. (2019) Cytosolic Fe-superoxide dismutase safeguards *Trypanosoma cruzi* from macrophage-derived superoxide radical. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 8879-8888
27. Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., and Andrews, N. W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med* **171**, 401-413
28. Gutschmann, T. (2016) Interaction between antimicrobial peptides and mycobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1858**, 1034-1043
29. Arnett, E., Lehrer, R. I., Pratikhya, P., Lu, W., and Seveau, S. (2011) Defensins enable macrophages to inhibit the intracellular proliferation of *Listeria monocytogenes*. *Cellular microbiology* **13**, 635-651
30. Stuehr, D. J., and Haque, M. M. (2019) Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *British journal of pharmacology* **176**, 177-188
31. MacMicking, J., Xie, Q. W., and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**, 323-350
32. Alvarez, M. N., Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol* **359**, 353-366
33. Campbell, M. G., Smith, B. C., Potter, C. S., Carragher, B., and Marletta, M. A. (2014) Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E3614-3623
34. Kleinert, H., Schwarz, P. M., and Forstermann, U. (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* **384**, 1343-1364
35. Rottenberg, M. E., Castanos-Velez, E., de Mesquita, R., Laguardia, O. G., Biberfeld, P., and Orn, A. (1996) Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. *European journal of immunology* **26**, 3203-3213
36. Oliveira, A. C., de Alencar, B. C., Tzelepis, F., Klezewsky, W., da Silva, R. N., Neves, F. S., Cavalcanti, G. S., Boscardin, S., Nunes, M. P., Santiago, M. F., Nobrega, A., Rodrigues, M. M., and Bellio, M. (2010) Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8⁺ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS pathogens* **6**, e1000870

37. Xie, Q. W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **269**, 4705-4708
38. Coccia, E. M., Stellacci, E., Marziali, G., Weiss, G., and Battistini, A. (2000) IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. *International immunology* **12**, 977-985
39. Bogdan, C., Thuring, H., Dlaska, M., Rollinghoff, M., and Weiss, G. (1997) Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by IL-13: influence of the macrophage population. *J Immunol* **159**, 4506-4513
40. Vodovotz, Y., and Bogdan, C. (1994) Control of nitric oxide synthase expression by transforming growth factor-beta: implications for homeostasis. *Progress in growth factor research* **5**, 341-351
41. Vodovotz, Y., Russell, D., Xie, Q. W., Bogdan, C., and Nathan, C. (1995) Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J Immunol* **154**, 2914-2925
42. Miller, B. H., Fratti, R. A., Poschet, J. F., Timmins, G. S., Master, S. S., Burgos, M., Marletta, M. A., and Deretic, V. (2004) Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infect Immun* **72**, 2872-2878
43. Webb, J. L., Harvey, M. W., Holden, D. W., and Evans, T. J. (2001) Macrophage nitric oxide synthase associates with cortical actin but is not recruited to phagosomes. *Infect Immun* **69**, 6391-6400
44. Moller, M., Botti, H., Batthyany, C., Rubbo, H., Radi, R., and Denicola, A. (2005) Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem* **280**, 8850-8854
45. Nicholson, S., Bonecini-Almeida Mda, G., Lapa e Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N., Linhares, C., Rom, W., and Ho, J. L. (1996) Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* **183**, 2293-2302
46. Depre, C., Havaux, X., Renkin, J., Vanoverschelde, J. L., and Wijns, W. (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res* **41**, 465-472
47. Drutman, S. B., Mansouri, D., Mahdaviani, S. A., Neehus, A. L., Hum, D., Bryk, R., Hernandez, N., Belkaya, S., Rapaport, F., Bigio, B., Fisch, R., Rahman, M., Khan, T., Al Ali, F., Marjani, M., Mansouri, N., Lorenzo-Diaz, L., Emile, J. F., Marr, N., Jouanguy, E., Bustamante, J., Abel, L., Boisson-Dupuis, S., Beziat, V., Nathan, C., and Casanova, J. L. (2020) Fatal Cytomegalovirus Infection in an Adult with Inherited NOS2 Deficiency. *The New England journal of medicine* **382**, 437-445
48. Taylor, B. S., and Geller, D. A. (2000) Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* **13**, 413-424
49. Nathan, C. (2006) Role of iNOS in human host defense. *Science* **312**, 1874-1875; author reply 1874-1875
50. Hibbs, J. B., Jr., Vavrin, Z., and Taintor, R. R. (1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* **138**, 550-565
51. Nath, N., and Kashfi, K. (2020) Tumor associated macrophages and 'NO'. *Biochemical pharmacology* **176**, 113899
52. Bogdan, C. (2015) Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends in immunology* **36**, 161-178
53. Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D., and Batra, S. (2015) NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & molecular immunology* **12**, 5-23
54. Lambeth, J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology* **4**, 181-189

55. Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005) Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J* **386**, 401-416
56. Ziegler, C. S., Bouchab, L., Tramier, M., Durand, D., Fieschi, F., Dupre-Crochet, S., Merola, F., Nusse, O., and Erard, M. (2019) Quantitative live-cell imaging and 3D modeling reveal critical functional features in the cytosolic complex of phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* **294**, 3824-3836
57. Yuzawa, S., Suzuki, N. N., Fujioka, Y., Ogura, K., Sumimoto, H., and Inagaki, F. (2004) A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **9**, 443-456
58. Wientjes, F. B., Reeves, E. P., Soskic, V., Furthmayr, H., and Segal, A. W. (2001) The NADPH oxidase components p47(phox) and p40(phox) bind to moesin through their PX domain. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 382-388
59. Kanai, F., Liu, H., Field, S. J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G. E., Cantley, L. C., and Yaffe, M. B. (2001) The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nature cell biology* **3**, 675-678
60. Pick, E. (2014) Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases* **5**, e27952
61. El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidallo, M. A., and Dang, P. M. (2016) Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological reviews* **273**, 180-193
62. Babior, B. M., and Kipnes, R. S. (1977) Superoxide-forming enzyme from human neutrophils: evidence for a flavin requirement. *Blood* **50**, 517-524
63. Nauseef, W. M. (2019) The phagocyte NOX2 NADPH oxidase in microbial killing and cell signaling. *Curr Opin Immunol* **60**, 130-140
64. Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A. B., Griendling, K. K., and Lambeth, J. D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401**, 79-82
65. Lambeth, J. D., and Neish, A. S. (2014) Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. *Annu Rev Pathol* **9**, 119-145
66. Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., and Krause, K. H. (2006) Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett* **580**, 497-504
67. Banfi, B., Clark, R. A., Steger, K., and Krause, K. H. (2003) Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* **278**, 3510-3513
68. Laurent, E., McCoy, J. W., 3rd, Macina, R. A., Liu, W., Cheng, G., Robine, S., Papkoff, J., and Lambeth, J. D. (2008) Nox1 is over-expressed in human colon cancers and correlates with activating mutations in K-Ras. *International journal of cancer* **123**, 100-107
69. Yokota, H., Tsuzuki, A., Shimada, Y., Imai, A., Utsumi, D., Tsukahara, T., Matsumoto, M., Amagase, K., Iwata, K., Nakamura, A., Yabe-Nishimura, C., and Kato, S. (2017) NOX1/NADPH Oxidase Expressed in Colonic Macrophages Contributes to the Pathogenesis of Colonic Inflammation in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Murine Colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **360**, 192-200
70. Maitra, U., Singh, N., Gan, L., Ringwood, L., and Li, L. (2009) IRAK-1 contributes to lipopolysaccharide-induced reactive oxygen species generation in macrophages by inducing NOX-1 transcription and Rac1 activation and suppressing the expression of antioxidative enzymes. *J Biol Chem* **284**, 35403-35411
71. Kim, J. S., Yeo, S., Shin, D. G., Bae, Y. S., Lee, J. J., Chin, B. R., Lee, C. H., and Baek, S. H. (2010) Glycogen synthase kinase 3beta and beta-catenin pathway is involved in toll-like receptor 4-mediated NADPH oxidase 1 expression in macrophages. *FEBS J* **277**, 2830-2837

72. Matsumoto, M., Liu, J., Iwata, K., Ibi, M., Asaoka, N., Zhang, X., Katsuyama, M., Matsuda, M., Nabe, T., Schroder, K., and Yabe-Nishimura, C. (2021) NOX1/NADPH oxidase is involved in the LPS-induced exacerbation of collagen-induced arthritis. *Journal of pharmacological sciences* **146**, 88-97
73. Liu, J., Iwata, K., Zhu, K., Matsumoto, M., Matsumoto, K., Asaoka, N., Zhang, X., Ibi, M., Katsuyama, M., Tsutsui, M., Kato, S., and Yabe-Nishimura, C. (2020) NOX1/NADPH oxidase in bone marrow-derived cells modulates intestinal barrier function. *Free Radic Biol Med* **147**, 90-101
74. Vanden Berghe, T., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2007) NADPH oxidases: new players in TNF-induced necrotic cell death. *Molecular cell* **26**, 769-771
75. Xu, Q., Choksi, S., Qu, J., Jang, J., Choe, M., Banfi, B., Engelhardt, J. F., and Liu, Z. G. (2016) NADPH Oxidases Are Essential for Macrophage Differentiation. *J Biol Chem* **291**, 20030-20041
76. Lee, S. H., Park, D. W., Park, S. C., Park, Y. K., Hong, S. Y., Kim, J. R., Lee, C. H., and Baek, S. H. (2009) Calcium-independent phospholipase A2beta-Akt signaling is involved in lipopolysaccharide-induced NADPH oxidase 1 expression and foam cell formation. *J Immunol* **183**, 7497-7504
77. Cheret, C., Gervais, A., Lelli, A., Colin, C., Amar, L., Ravassard, P., Mallet, J., Cumano, A., Krause, K. H., and Mallat, M. (2008) Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase. *J Neurosci* **28**, 12039-12051
78. Helmcke, I., Heumuller, S., Tikkanen, R., Schroder, K., and Brandes, R. P. (2009) Identification of structural elements in Nox1 and Nox4 controlling localization and activity. *Antioxid Redox Signal* **11**, 1279-1287
79. Daneva, Z., Marziano, C., Ottolini, M., Chen, Y. L., Baker, T. M., Kuppusamy, M., Zhang, A., Ta, H. Q., Reagan, C. E., Mihalek, A. D., Kasetti, R. B., Shen, Y., Isakson, B. E., Minshall, R. D., Zode, G. S., Goncharova, E. A., Laubach, V. E., and Sonkusare, S. K. (2021) Caveolar peroxynitrite formation impairs endothelial TRPV4 channels and elevates pulmonary arterial pressure in pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
80. Pick, E. (2020) Cell-Free NADPH Oxidase Activation Assays: A Triumph of Reductionism. *Methods in molecular biology* **2087**, 325-411
81. Paddenberg, R., Ishaq, B., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Rose, F., Weissmann, N., Braun-Dullaeus, R. C., and Kummer, W. (2003) Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **284**, L710-719
82. Reis, J., Massari, M., Marchese, S., Cecon, M., Aalbers, F. S., Corana, F., Valente, S., Mai, A., Magnani, F., and Mattevi, A. (2020) A closer look into NADPH oxidase inhibitors: Validation and insight into their mechanism of action. *Redox Biol* **32**, 101466
83. O'Donnell, B. V., Tew, D. G., Jones, O. T., and England, P. J. (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* **290 (Pt 1)**, 41-49
84. Csanyi, G., Cifuentes-Pagano, E., Al Ghoul, I., Ranayhossaini, D. J., Egana, L., Lopes, L. R., Jackson, H. M., Kelley, E. E., and Pagano, P. J. (2011) Nox2 B-loop peptide, Nox2ds, specifically inhibits the NADPH oxidase Nox2. *Free Radic Biol Med* **51**, 1116-1125
85. Sirokmany, G., Donko, A., and Geiszt, M. (2016) Nox/Duox Family of NADPH Oxidases: Lessons from Knockout Mouse Models. *Trends in pharmacological sciences* **37**, 318-327
86. Hayyan, M., Hashim, M. A., and AlNashef, I. M. (2016) Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical reviews* **116**, 3029-3085
87. Winterbourn, C. C. (2020) Biological chemistry of superoxide radicals. *ChemTexts* **6**, 7
88. Hausladen, A., and Fridovich, I. (1994) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* **269**, 29405-29408

89. Castro, L., Rodriguez, M., and Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxyxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* **269**, 29409-29415
90. Butler, J., Jayson, G. G., and Swallow, A. J. (1975) The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* **408**, 215-222
91. Bielski, B. H. J., and Allen, A. O. (1977) Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals. *The Journal of Physical Chemistry* **81**, 1048-1050
92. Behar, D., Czapski, G., Rabani, J., Dorfman, L. M., and Schwarz, H. A. (1970) Acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *The Journal of Physical Chemistry* **74**, 3209-3213
93. McCord, J. M., and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte cupreins (hemocupreins). *J Biol Chem* **244**, 6049-6055
94. Klug, D., Rabani, J., and Fridovich, I. (1972) A Direct Demonstration of the Catalytic Action of Superoxide Dismutase through the Use of Pulse Radiolysis. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 4839-4842
95. Winterbourn, C. C. (2013) The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol* **528**, 3-25
96. Sies, H. (2014) Role of metabolic H₂O₂ generation Redox signaling and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 8735-8741
97. Moller, M. N., and Denicola, A. (2018) Diffusion of nitric oxide and oxygen in lipoproteins and membranes studied by pyrene fluorescence quenching. *Free Radic Biol Med* **128**, 137-143
98. Antunes, F., and Brito, P. M. (2017) Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. *Redox Biol* **13**, 1-7
99. Yamazaki, I., and Piette, L. H. (1990) ESR spin-trapping studies on the reaction of Fe²⁺ ions with H₂O₂-reactive species in oxygen toxicity in biology. *J Biol Chem* **265**, 13589-13594
100. Koppenol, W. H., Stanbury, D. M., and Bounds, P. L. (2010) Electrode potentials of partially reduced oxygen species, from dioxygen to water. *Free Radical Biology and Medicine* **49**, 317-322
101. Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine* **91**, S14-S22
102. Imlay, J. A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem* **77**, 755-776
103. Bredt, D. S., and Snyder, S. H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**, 175-195
104. Ignarro, L. J. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annual review of pharmacology and toxicology* **30**, 535-560
105. Hill, B. G., Dranka, B. P., Bailey, S. M., Lancaster, J. R., Jr., and Darley-Usmar, V. M. (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem* **285**, 19699-19704
106. Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M., and Tomboulian, P. (1993) Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 1076-1082
107. Prolo, C., Alvarez, M. N., Rios, N., Peluffo, G., Radi, R., and Romero, N. (2015) Nitric oxide diffusion to red blood cells limits extracellular, but not intraphagosomal, peroxyxynitrite formation by macrophages. *Free Radic Biol Med* **87**, 346-355
108. Herold, S. (1998) Kinetic and spectroscopic characterization of an intermediate peroxyxynitrite complex in the nitrogen monoxide induced oxidation of oxyhemoglobin. *FEBS Lett* **439**, 85-88
109. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 9265-9269

110. Palmer, R. M., Ferrige, A., and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526
111. Gould, N., Doulias, P. T., Tenopoulou, M., Raju, K., and Ischiropoulos, H. (2013) Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *J Biol Chem* **288**, 26473-26479
112. Möller, M. N., Rios, N., Trujillo, M., Radi, R., Denicola, A., and Alvarez, B. (2019) Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 14776-14802
113. Möller, M. N., Li, Q., Lancaster Jr, J. R., and Denicola, A. (2007) Acceleration of nitric oxide autoxidation and nitrosation by membranes. *IUBMB life* **59**, 243-248
114. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and De Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* **32**, 841-859
115. Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4003-4008
116. O'Donnell, V. B., and Freeman, B. A. (2001) Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circulation research* **88**, 12-21
117. Beckmann, J. S., Ye, Y. Z., Anderson, P. G., Chen, J., Accavitti, M. A., Tarpey, M. M., and White, C. R. (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* **375**, 81-88
118. Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G., and Koppenol, W. H. (1997) Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical research in toxicology* **10**, 1285-1292
119. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxyxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 4244-4250
120. Marla, S. S., Lee, J., and Groves, J. T. (1997) Peroxyxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 14243-14248
121. Koppenol, W. H., and Kissner, R. (1998) Can O NOOH Undergo Homolysis? *Chemical research in toxicology* **11**, 87-90
122. Koppenol, W. H. (1998) Peroxyxynitrite uncloaked? *Chemical research in toxicology* **11**, 716
123. Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxyxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* **4**, 161-177
124. Prolo, C., Rios, N., Piacenza, L., Alvarez, M. N., and Radi, R. (2018) Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxyxynitrite detection. *Free Radic Biol Med* **128**, 59-68
125. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. a. N., Naviliat, M., and Cayota, A. (2001) Unraveling peroxyxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 463-488
126. Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxyxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* **333**, 49-58
127. Quijano, C., Romero, N., and Radi, R. (2005) Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radic Biol Med* **39**, 728-741
128. Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64**, 97-112
129. Radi, R. (2018) Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxyxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 5839-5848

130. Rios, N. P., C. Alvarez, MN. Piacenza, L. Radi; R. (2016) Peroxynitrite formation and detection in living cells. in *Nitric Oxide* (Ignarro, L. ed.), 3rd Ed., Elsevier. pp
131. Souza, J. M., and Radi, R. (1998) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* **360**, 187-194
132. Konorev, E. A., Hogg, N., and Kalyanaraman, B. (1998) Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett* **427**, 171-174
133. Trujillo, M., Budde, H., Pineyro, M. D., Stehr, M., Robello, C., Flohe, L., and Radi, R. (2004) Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem* **279**, 34175-34182
134. Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., and Radi, R. (2018) Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chemical reviews* **118**, 1338-1408
135. Piacenza, L., Zago, M. P., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Basombrio, M. A., and Radi, R. (2009) Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of Trypanosoma cruzi virulence. *Int J Parasitol* **39**, 1455-1464
136. Piacenza, L., Trujillo, M., and Radi, R. (2019) Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *J Exp Med* **216**, 501-516
137. Yermilov, V., Rubio, J., and Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS letters* **376**, 207-210
138. Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. A. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 26066-26075
139. Trostchansky, A., and Rubbo, H. (2008) Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1887-1896
140. Darley-Usmar, V. M., Hogg, N., O'Leary, V. J., Wilson, M. T., and Moncada, S. (1992) The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun* **17**, 9-20
141. WHO. Chagas Disease. Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypansomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypansomiasis)). Accessed on 1st January 2021.
142. CDC. (2021) Parasites- American Trypanosomiasis (also known as Chagas disease).
143. Pérez-Molina, J. A., and Molina, I. (2018) Chagas disease. *The Lancet* **391**, 82-94
144. Moncayo, A., and Ortiz Yanine, M. I. (2006) An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of tropical medicine and parasitology* **100**, 663-677
145. Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., and Cheeseman, I. (2008) A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5022-5027
146. Andrade, L. O., and Andrews, N. W. (2005) The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol* **3**, 819-823
147. Guhl, F. (2017) 5 - Geographical distribution of Chagas disease. in *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)* (Telleria, J., and Tibayrenc, M. eds.), Elsevier, London. pp 89-112
148. Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M. A., Romanha, A. J., Sturm, N. R., Tibayrenc, M., Schijman, A. G., and Second Satellite, M. (2009) A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, 1051-1054

149. Sturm, N. R., Vargas, N. S., Westenberger, S. J., Zingales, B., and Campbell, D. A. (2003) Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* **33**, 269-279
150. Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., and Sturm, N. R. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12**, 240-253
151. Barrias, E. S., de Carvalho, T. M., and De Souza, W. (2013) *Trypanosoma cruzi*: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation. *Frontiers in immunology* **4**, 186
152. Todorov, A. G., Einicker-Lamas, M., de Castro, S. L., Oliveira, M. M., and Guilherme, A. (2000) Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem* **275**, 32182-32186
153. Woolsey, A. M., and Burleigh, B. A. (2004) Host cell actin polymerization is required for cellular retention of *Trypanosoma cruzi* and early association with endosomal/lysosomal compartments. *Cellular microbiology* **6**, 829-838
154. Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (1999) Signaling pathways in phagocytosis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **21**, 422-431
155. Camargo, M. M., Andrade, A. C., Almeida, I. C., Travassos, L. R., and Gazzinelli, R. T. (1997) Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol* **159**, 6131-6139
156. Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., and Gazzinelli, R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* **167**, 416-423
157. Torrico, F., Heremans, H., Rivera, M. T., Van Marck, E., Billiau, A., and Carlier, Y. (1991) Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* **146**, 3626-3632
158. Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L., and Radi, R. (2011) 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* **286**, 6627-6640
159. Alvarez, M. N., Piacenza, L., Irigoien, F., Peluffo, G., and Radi, R. (2004) Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* **432**, 222-232
160. Manni, M. L., Tomai, L. P., Norris, C. A., Thomas, L. M., Kelley, E. E., Salter, R. D., Crapo, J. D., Chang, L. Y., Watkins, S. C., Piganelli, J. D., and Oury, T. D. (2011) Extracellular superoxide dismutase in macrophages augments bacterial killing by promoting phagocytosis. *The American journal of pathology* **178**, 2752-2759
161. Hu, L., Zachariae, E. D., Larsen, U. G., Vilhardt, F., and Petersen, S. V. (2019) The dynamic uptake and release of SOD3 from intracellular stores in macrophages modulates the inflammatory response. *Redox Biol* **26**, 101268
162. Martins, G. A., Vieira, L. Q., Cunha, F. Q., and Silva, J. S. (1999) Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infect Immun* **67**, 3864-3871
163. Holscher, C., Kohler, G., Muller, U., Mossmann, H., Schaub, G. A., and Brombacher, F. (1998) 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* **66**, 1208-1215

164. Vespa, G. N., Cunha, F. Q., and Silva, J. S. (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* **62**, 5177-5182
165. Pineyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., and Robello, C. (2008) Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* **408**, 45-50
166. Tanaka, Y., Kiyotaki, C., Tanowitz, H., and Bloom, B. R. (1982) Reconstitution of a variant macrophage cell line defective in oxygen metabolism with a H₂O₂-generating system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2584-2588
167. Tanaka, Y., Tanowitz, H., and Bloom, B. R. (1983) Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infect Immun* **41**, 1322-1331
168. Goes, G. R., Rocha, P. S., Diniz, A. R., Aguiar, P. H., Machado, C. R., and Vieira, L. Q. (2016) *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004555
169. Santos-Miranda, A., Joviano-Santos, J. V., Ribeiro, G. A., Botelho, A. F. M., Rocha, P., Vieira, L. Q., Cruz, J. S., and Roman-Campos, D. (2020) Reactive oxygen species and nitric oxide imbalances lead to in vivo and in vitro arrhythmogenic phenotype in acute phase of experimental Chagas disease. *PLoS pathogens* **16**, e1008379
170. Santiago, H. C., Gonzalez Lombana, C. Z., Macedo, J. P., Utsch, L., Tafuri, W. L., Campagnole-Santos, M. J., Alves, R. O., Alves-Filho, J. C., Romanha, A. J., Cunha, F. Q., Teixeira, M. M., Radi, R., and Vieira, L. Q. (2012) NADPH phagocyte oxidase knockout mice control *Trypanosoma cruzi* proliferation, but develop circulatory collapse and succumb to infection. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1492
171. Paiva, C. N., Feijo, 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., Fantappie, M. R., Lannes-Vieira, J., and Bozza, M. T. (2012) Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest* **122**, 2531-2542
172. Dhiman, M., and Garg, N. J. (2014) P47phox^{-/-} mice are compromised in expansion and activation of CD8⁺ T cells and susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS pathogens* **10**, e1004516
173. Weischenfeldt, J., and Porse, B. (2008) Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc* **2008**, pdb prot5080
174. Crocker, P. R., and Gordon, S. (1985) Isolation and characterization of resident stromal macrophages and hematopoietic cell clusters from mouse bone marrow. *J Exp Med* **162**, 993-1014
175. Baxter, M. A., Leslie, R. G., and Reeves, W. G. (1983) The stimulation of superoxide anion production in guinea-pig peritoneal macrophages and neutrophils by phorbol myristate acetate, opsonized zymosan and IgG2-containing soluble immune complexes. *Immunology* **48**, 657-665
176. Costa, F. C., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Calderano, S. G., Lewis, M. D., Olmo, F., Beneke, T., Gluenz, E., Sunter, J., Dean, S., Kelly, J. M., and Taylor, M. C. (2018) Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, e0006388
177. Bonaldo, M. C., Souto-Padron, T., de Souza, W., and Goldenberg, S. (1988) Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol* **106**, 1349-1358
178. Granger, D. L., Taintor, R. R., Boockvar, K. S., and Hibbs, J. B., Jr. (1996) Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* **268**, 142-151

179. Zielonka, J., Sikora, A., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2010) Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J Biol Chem* **285**, 14210-14216
180. Debski, D., Smulik, R., Zielonka, J., Michalowski, B., Jakubowska, M., Debowska, K., Adamus, J., Marcinek, A., Kalyanaraman, B., and Sikora, A. (2016) Mechanism of oxidative conversion of Amplex(R) Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies. *Free Radic Biol Med* **95**, 323-332
181. Kettle, A. J., Carr, A. C., and Winterbourn, C. C. (1994) Assays using horseradish peroxidase and phenolic substrates require superoxide dismutase for accurate determination of hydrogen peroxide production by neutrophils. *Free Radic Biol Med* **17**, 161-164
182. Zielonka, J., Vasquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2008) Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: A unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nature Protocols* **3**, 8-21
183. Kalyanaraman, B., Dranka, B. P., Hardy, M., Michalski, R., and Zielonka, J. (2014) HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes--the ultimate approach for intra- and extracellular superoxide detection. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* **1840**, 739-744
184. Zhao, H., Joseph, J., Fales, H. M., Sokoloski, E. A., Levine, R. L., Vasquez-Vivar, J., and Kalyanaraman, B. (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5727-5732
185. Wardman, P. (2008) Methods to measure the reactivity of peroxynitrite-derived oxidants toward reduced fluoresceins and rhodamines. *Methods Enzymol* **441**, 261-282
186. Kalyanaraman, B., Hardy, M., Podsiadly, R., Cheng, G., and Zielonka, J. (2017) Recent developments in detection of superoxide radical anion and hydrogen peroxide: Opportunities, challenges, and implications in redox signaling. *Arch Biochem Biophys* **617**, 38-47
187. Barde, I., Laurenti, E., Verp, S., Wiznerowicz, M., Offner, S., Viorner, A., Galy, A., Trumpp, A., and Trono, D. (2011) Lineage- and stage-restricted lentiviral vectors for the gene therapy of chronic granulomatous disease. *Gene therapy* **18**, 1087-1097
188. Zhang, X., Edwards, J. P., and Mosser, D. M. (2009) The expression of exogenous genes in macrophages: obstacles and opportunities. *Methods in molecular biology* **531**, 123-143
189. Khare, S., Nagle, A. S., Biggart, A., Lai, Y. H., Liang, F., Davis, L. C., Barnes, S. W., Mathison, C. J., Myburgh, E., Gao, M. Y., Gillespie, J. R., Liu, X., Tan, J. L., Stinson, M., Rivera, I. C., Ballard, J., Yeh, V., Groessl, T., Federe, G., Koh, H. X., Venable, J. D., Bursulaya, B., Shapiro, M., Mishra, P. K., Spraggon, G., Brock, A., Mottram, J. C., Buckner, F. S., Rao, S. P., Wen, B. G., Walker, J. R., Tuntland, T., Molteni, V., Glynn, R. J., and Supek, F. (2016) Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature* **537**, 229-233
190. Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O., and Sherman, P. A. (1995) Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10688-10692
191. Pollock, J. D., Williams, D. A., Gifford, M. A., Li, L. L., Du, X., Fisherman, J., Orkin, S. H., Doerschuk, C. M., and Dinarello, M. C. (1995) Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nature genetics* **9**, 202-209
192. Zielonka, J., Zielonka, M., Sikora, A., Adamus, J., Joseph, J., Hardy, M., Ouari, O., Dranka, B. P., and Kalyanaraman, B. (2012) Global profiling of reactive oxygen and

- nitrogen species in biological systems: high-throughput real-time analyses. *J Biol Chem* **287**, 2984-2995
193. Nathan, C., Nogueira, N., Juangbhanich, C., Ellis, J., and Cohn, Z. (1979) Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* **149**, 1056-1068
194. Rodrigues, M. M., Oliveira, A. C., and Bellio, M. (2012) The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *Journal of parasitology research* **2012**, 507874
195. EP, O. K. (2016) siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing. *Materials and Methods* **3**
196. Rios, N., Piacenza, L., Trujillo, M., Martinez, A., Demicheli, V., Prolo, C., Alvarez, M. N., Lopez, G. V., and Radi, R. (2016) Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *Free Radic Biol Med*
197. Sikora, A., Zielonka, J., Lopez, M., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. (2009) Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* **47**, 1401-1407
198. Gatin-Fraudet, B., Ottenwelter, R., Le Saux, T., Norsikian, S., Pucher, M., Lombes, T., Baron, A., Durand, P., Doisneau, G., Bourdreux, Y., Iorga, B. I., Erard, M., Jullien, L., Guianvarc'h, D., Urban, D., and Vauzeilles, B. (2021) Evaluation of borinic acids as new, fast hydrogen peroxide-responsive triggers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**
199. Saeftef, M., Fleischer, B., and Hoerauf, A. (2001) Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* **69**, 2252-2259
200. Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S., and Nussenzweig, V. (1988) Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med* **168**, 649-659
201. Ferreira, E. R., Bonfim-Melo, A., Mortara, R. A., and Bahia, D. (2012) *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes and host cell signaling: more pieces to the puzzle. *Frontiers in immunology* **3**, 363
202. Finzi, J. K., Chiavegatto, C. W., Corat, K. F., Lopez, J. A., Cabrera, O. G., Mielniczki-Pereira, A. A., Colli, W., Alves, M. J., and Gadelha, F. R. (2004) *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol* **133**, 37-43
203. Nogueira, N. P., Saraiva, F. M., Sultano, P. E., Cunha, P. R., Laranja, G. A., Justo, G. A., Sabino, K. C., Coelho, M. G., Rossini, A., Atella, G. C., and Paes, M. C. (2015) Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS One* **10**, e0116712
204. Contreras, V. T., De Lima, A. R., and Zorrilla, G. (1998) *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **93**, 753-760
205. Carneiro, M. B. H., Roma, E. H., Ranson, A. J., Doria, N. A., Debrabant, A., Sacks, D. L., Vieira, L. Q., and Peters, N. C. (2018) NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. *J Immunol* **200**, 196-208
206. Shiloh, M. U., MacMicking, J. D., Nicholson, S., Brause, J. E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., and Nathan, C. (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* **10**, 29-38
207. Dhiman, M., and Garg, N. J. (2011) NADPH oxidase inhibition ameliorates *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis during Chagas disease. *The Journal of pathology* **225**, 583-596

208. Zulmira M.S. Cordeiro, A. C. G. D. a. Z. A. A. (1997) KINETICS OF TRYPANOSOMA CRUZI DESTRUCTION IN THE MOUSE SPLEEN. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **30**
209. Paula, J. I. O., Pinto, J. D. S., Rossini, A., Nogueira, N. P., and Paes, M. C. (2020) New perspectives for hydrogen peroxide in the amastigogenesis of Trypanosoma cruzi in vitro. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* **1866**, 165951
210. Gadelha, F. R., Goncalves, C. C., Mattos, E. C., Alves, M. J., Pineyro, M. D., Robello, C., and Peloso, E. F. (2013) Release of the cytosolic trypanothione peroxidase into the incubation medium and a different profile of cytosolic and mitochondrial peroxiredoxin expression in H₂O₂-treated Trypanosoma cruzi tissue culture-derived trypomastigotes. *Experimental parasitology* **133**, 287-293
211. Winterbourn, C. C., and Kettle, A. J. (2013) Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal* **18**, 642-660