

TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

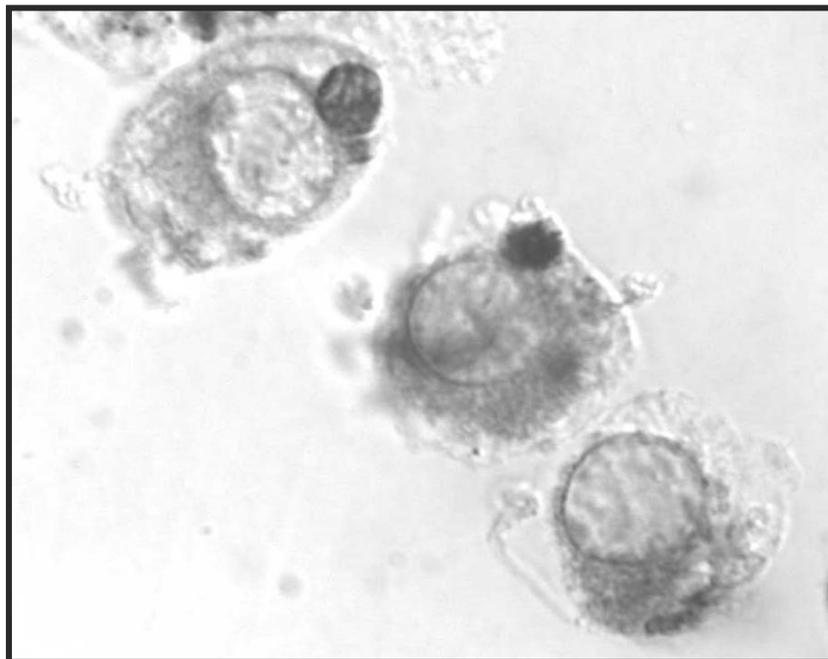
SUB AREA BIOQUÍMICA

PEDECIBA

**Difusión y Toxicidad de Oxidantes
Derivados de Macrófagos:**

Aspectos bioquímicos y aplicación al estudio
de daño oxidativo a *Trypanosoma cruzi*

MARÍA NOEL ALVAREZ CAL



Orientador: Prof. Dr. Rafael Radi

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad de la República

MONTEVIDEO
URUGUAY
2007

A Alvaro, por la mitad de mi vida
A Luli, Marti y Ceci porque nada importa más

Foto de carátula: Macrófagos infectados con tripomastigotas de *T. cruzi* en presencia de NBT. Se observan en la imagen los depósitos de formazán localizados en la vesícula fagocítica, producto de la formación de superóxido por la NADPH oxidasa durante la internalización del parásito.

INDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Especies derivadas del oxígeno y del nitrógeno generados por macrófagos	8
1.1.1 Generación del radical superóxido: NADPH oxidasa	9
1.1.2 Generación de óxido nítrico: óxido nítrico sintasa	11
1.1.3 Propiedades físico-químicas de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno	14
1.1.3.1 Especies reactivas derivadas del oxígeno	15
1.1.3.2 Especies reactivas derivadas del nitrógeno	17
1.1.3.3 Métodos de detección de especies reactivas en sistemas biológicos.....	21
1.2 Rol citotóxico de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	22
1.2.1 Toxicidad mediada por las especies reactivas derivadas del oxígeno	22
1.2.2 Toxicidad mediada por las especies reactivas derivadas del nitrógeno	22
1.2.3 Sistemas de defensas contra especies reactivas presentes en microorganismos.....	25
1.3 Interacción macrófago- <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.3.1 Invasión del macrófago por <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.3.2 Producción de superóxido durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.3.3 Producción de óxido nítrico durante la infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos generales	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIALES Y METODOS	33
4. RESULTADOS	42
4.1 Detección de radical carbonato formado en sistemas biológicos... ..	43
4.1.1 Reacción del radical carbonato con DMPO	44
4.1.2 Detección del radical carbonato con DMPO	45
4.1.2.1 Reacción de Fenton en presencia de bicarbonato	45
4.1.2.1 Sistema CuZnSOD/H ₂ O ₂ en presencia de bicarbonato	49
4.1.2.3 Hidroxilación de DMPO por ONOO ⁻ /CO ₂	51
4.1.2.4 Detección de CO ₃ ^{•-} en un sistema celular	52
4.2 Modulación de la activación macrofágica por <i>Trypanosoma cruzi</i>	53

4.2.1	Activación de la NADPH oxidasa en la interacción de macrófagos con <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
4.2.1.1	Interacción macrófagos – epimastigotas	53
4.2.1.2	Interacción macrófagos – tripomastigotas metacíclicos	58
4.2.2	Inducción de la Óxido nítrico sintasa y producción de óxido nítrico en la interacción del macrófago con <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
4.2.2.1	Producción de óxido nítrico en presencia de <i>T. cruzi</i>	63
4.2.2.2	Expresión de la iNOS en presencia de <i>T. cruzi</i>	65
4.2.2.3	Expresión del mRNA de la iNOS en presencia de <i>T. cruzi</i>	66
4.3	Toxicidad de peroxinitrito producido por macrófagos sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	68
4.3.1	Difusión y toxicidad del peroxinitrito sobre epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	68
4.3.1.1	Estudio <i>in vitro</i> de la toxicidad del peroxinitrito	68
4.3.1.2	Difusión y toxicidad del peroxinitrito derivado de macrófagos	71
4.3.2	Difusión y toxicidad del peroxinitrito sobre tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	75
4.3.2.1	Internalización de tripomastigotas	75
4.3.2.2	Difusión y toxicidad del peroxinitrito en el fagosoma	77
4.3.3	Rol de las peroxirredoxinas en la protección del <i>T. cruzi</i>	81
4.3.3.1	Protección en epimastigotas que sobreexpresan peroxirredoxinas.....	82
4.3.3.2	Protección en tripomastigotas que sobreexpresan peroxirredoxinas.....	84
5.	CONCLUSIONES	87
5.1	Detección de radical carbonato en sistemas biológicos.....	88
5.2	Modulación de la respuesta macrofágica en la interacción con <i>T. cruzi</i>	88
5.3	Toxicidad de peroxinitrito derivado de macrófagos sobre <i>T. cruzi</i>	90
5.4	Publicaciones.....	93
6.	REFERENCIAS	95

R E S U M E N

Los macrófagos, junto a neutrófilos y otras células fagocíticas son componentes claves en las respuestas microbicidas y tumoricidas, debido fundamentalmente a su capacidad para producir especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno. La activación de la NADPH oxidasa, produce el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y la inducción de la óxido nítrico sintasa, es responsable de la formación de óxido nítrico ($\cdot NO$). El $\cdot NO$ y el $O_2^{\cdot-}$ reaccionan a velocidad controlada por difusión para dar un oxidante potente, el peroxinitrito ($ONOO^-$). El peroxinitrito en presencia de CO_2 forma un aducto que decae rápidamente ($< 1\mu s$) a los radicales carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot NO_2$). Durante el desarrollo de este trabajo utilizamos técnicas diversas para poder establecer la formación de los oxidantes. En particular profundizamos en la formación y detección del radical carbonato en sistemas bioquímicos y biológicos, y en su reacción con el atrapador de spin 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), determinando que la constante de la reacción es de $2.4 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, siendo una reacción de velocidad moderada, tanto para el $CO_3^{\cdot-}$ como para el DMPO. La importancia de esta reacción en la detección de oxidantes en sistemas biológicos radica en la posibilidad de alcanzar altas concentraciones de DMPO en sistemas celulares y animales como atrapador de oxidantes. Para el estudio de difusión y toxicidad intercelular del peroxinitrito generado por macrófagos, el modelo utilizado en nuestro trabajo fue la del cocultivo con *Trypanosoma cruzi*, parásito unicelular causante de la enfermedad de Chagas. Los efectos generados sobre la forma epimastigota que no invade al macrófago, fueron la oxidación de una sonda intracelular que indica la llegada del oxidante al interior del parásito y una disminución de la viabilidad, efectos que dependen de la formación simultánea del radical superóxido y el óxido nítrico. La presencia de bicarbonato en el medio atenúa los efectos observados, en acuerdo con el consumo extracelular del peroxinitrito por la rápida reacción con el CO_2 . Sin embargo estudios realizados a distintas densidades celulares (correspondientes a distintas distancias promedio de difusión del peroxinitrito antes de alcanzar un blanco), indican que para distancias menores a $5 \mu m$, la mayor parte del peroxinitrito alcanza la célula blanco en ausencia y en presencia de CO_2 . Esa distancia es mayor que la que debe difundir el peroxinitrito dentro de la vacuola fagocítica. Evaluamos la toxicidad del peroxinitrito sobre tripomastigotas fagocitados, observando un 50% de inhibición en la infección en los macrófagos activados. Estos resultados fueron confirmados con el uso de las cepas de *Trypanosoma cruzi* sobreexpresantes de peroxirredoxinas, enzimas que catalizan la descomposición del peroxinitrito. Estas cepas presentan una mayor viabilidad e infectividad que la cepa salvaje cuando son expuestas a macrófagos activados.

1. INTRODUCCION

1.1 Especies derivadas del oxígeno y del nitrógeno generadas por macrófagos

El objetivo principal del sistema inmune es la defensa del organismo contra agentes infecciosos o contra el crecimiento descontrolado de células propias. Los macrófagos, junto a los neutrófilos y otras células fagocíticas son componentes claves en las respuestas microbicidas y tumorocidas, debido fundamentalmente a su capacidad para producir especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno (11). Las primeras evidencias se obtuvieron en neutrófilos, células en las que se describió la existencia del estallido respiratorio, denominado así por el aumento del consumo de oxígeno, no dependiente de la cadena respiratoria, que se observaba durante la fagocitosis (14,15). La enzima responsable del consumo de O_2 es la NADPH oxidasa, y en 1973 Babior *et al* reportaron por primera vez que el producto de su actividad es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (16). Esta actividad tomó mayor importancia unos años más tarde cuando se identificó que los fagocitos obtenidos a partir de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica (enfermedad caracterizada por un aumento de las infecciones) no mostraban ese aumento en el consumo de O_2 y no poseían capacidad citotóxica *in vitro* (17,18).

La producción de óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) por macrófagos fue descrita (19,20) recién 30 años después, lo que determinó que el rol de la formación de oxidantes en la inmunidad se haya centrado durante muchos años en los neutrófilos (considerando además que la formación de $O_2^{\cdot-}$ por estas células es aproximadamente tres veces mayor que en macrófagos), y en los daños vinculados a las especies reactivas derivadas del oxígeno.

Los macrófagos poseen ciertas características que lo transforman en un buen modelo para el estudio de la toxicidad mediada por la formación de oxidantes. Estas células poseen las enzimas, NADPH oxidasa (*phox*) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), responsables de la producción de $O_2^{\cdot-}$ y $^{\cdot}NO$ respectivamente. En neutrófilos el 95 % de la NADPH oxidasa se encuentra en gránulos que son liberados al medio extracelular durante la activación, y parte a la vesícula fagocítica; en macrófagos la mayor parte de la enzima se encuentra en la membrana y forma parte de la membrana del fagosoma cuando este es generado, lo que implica una formación de $O_2^{\cdot-}$ y de sus derivados localizada y concentrada en un pequeño volumen, el volumen intrafagosomal. Si bien la formación de $O_2^{\cdot-}$ durante el estallido respiratorio es moderado en relación a los niveles alcanzados por neutrófilos, la formación de $^{\cdot}NO$ es mayor que en estos últimos, y lo que resulta más interesante es que en los macrófagos se pueden formar $O_2^{\cdot-}$ y $^{\cdot}NO$ simultáneamente con flujos similares (21), con la formación de nuevas especies con mayor poder oxidante, como el peroxinitrito.

Los oxidantes producidos por macrófagos derivan de estos dos radicales, el $^{\cdot}NO$ y el $O_2^{\cdot-}$. Esas especies se clasifican en dos grupos, las especies reactivas derivadas del oxígeno, formado por el $O_2^{\cdot-}$, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($^{\cdot}OH$), el hipoclorito ($HOCl$) y el radical carbonato ($CO_3^{\cdot-}$); las especies reactivas derivadas del nitrógeno comprenden al $^{\cdot}NO$, el anión nitroxilo (NO^-), el peroxinitrito ($ONOO^-$), el nitrosoperoxocarboxilato ($ONOOCO_2^-$) y el dióxido de nitrógeno ($^{\cdot}NO_2$). En la Figura 1.1 se representan las especies que derivan de $O_2^{\cdot-}$ y $^{\cdot}NO$ y que tienen mayor relevancia en el modelo de toxicidad mediada por macrófagos.

Estas especies presentan características físico- químicas distintivas, que describiremos más adelante, ya que esas propiedades determinan sus diferentes roles en los procesos fisiopatológicos. Analizaremos inicialmente la formación de $O_2^{\cdot-}$ y de $^{\cdot}NO$ durante la activación macrofágica.

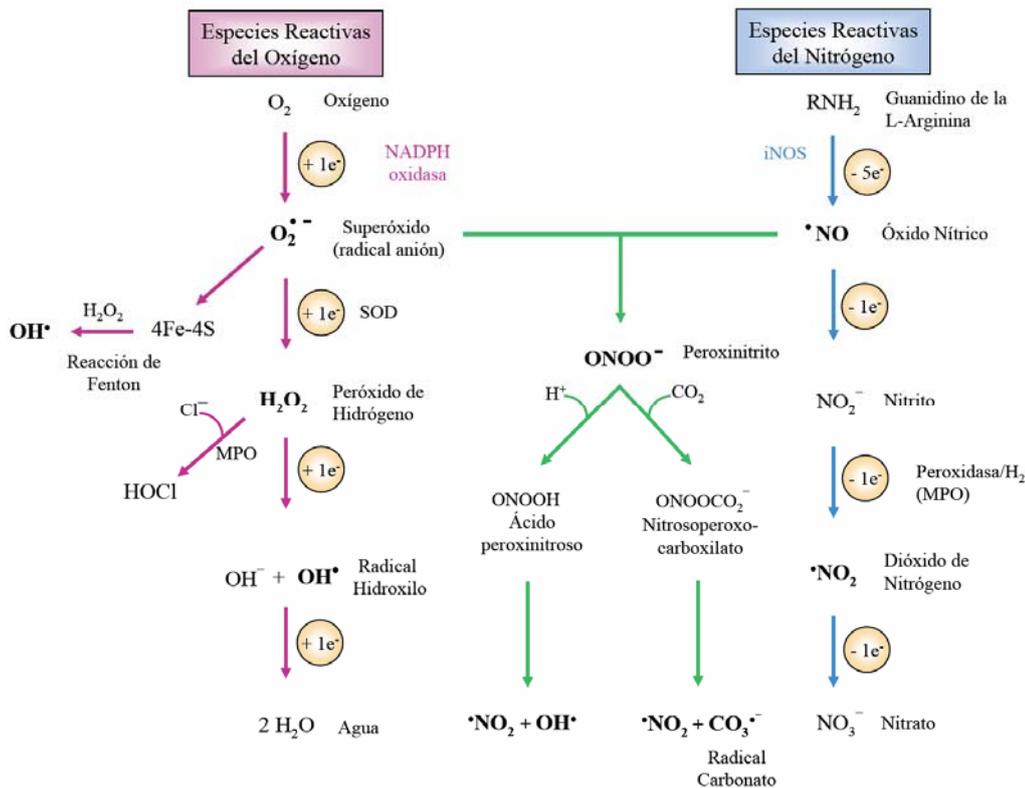


Fig. 1.1 Producción de especies reactivas por células fagocíticas.

Durante la activación macrofágica la producción de $O_2^{\bullet-}$ y $\cdot NO$ deriva en la formación de especies con propiedades físico-químicas características que definirán el rol que cada una juega durante la interacción con los patógenos.

Adaptado de Fang, F. Nat Rev Microbiol(2);2004(7)

1.1.1 Generación de radical superóxido: NADPH oxidasa.

La NADPH oxidasa es una enzima de membrana plasmática que cataliza la producción de $O_2^{\bullet-}$ por la reducción univalente del O_2 usando el NADPH como dador de electrones (ecuación [1]):



La NADPH oxidasa de células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) se encuentra quiescente en la célula en estado basal; en respuesta a estímulos quimiotácticos y partículas fagocitables se produce su activación (22) que depende de la migración de proteínas citosólicas reguladoras que se ensamblan con la subunidad de membrana. La proteína de membrana (gp91^{PHOX} o Nox2) forma parte de una familia de enzimas homólogas denominadas Nox (NAD(P)H oxidasas) integrada en mamíferos por 7 miembros, que incluyen de Nox1 a Nox 5 y las Duox1 y 2 (3) y que se expresan en la mayoría de los tipos celulares, siendo actualmente reconocidas como una de las fuentes de $O_2^{\bullet-}$, implicadas en procesos fisiológicos como la señalización celular (23) y en situaciones patológicas como la disfunción vascular (24).

NADPH oxidasa de macrófagos.

La activación de la enzima (representada en la Figura 1.2) ocurre a través de una serie compleja de interacciones proteína-proteína (25). La enzima activa está formada por: dos proteínas de membrana (p22^{PHOX} y gp91^{PHOX}), que se encuentran también en las membranas de vesículas de secreción y gránulos específicos en neutrófilos, y juntas forman una flavohemoproteína heterodimérica conocida como citocromo b₅₅₈, y, tres proteínas citosólicas (p47^{PHOX}, p67^{PHOX} y p40^{PHOX}) que se encuentran formando un complejo en el citosol de la célula en estado basal y migran hacia la membrana plasmática durante la activación (26-29). Otro componente esencial para la actividad de la enzima, con un rol regulador es la proteína Rac. Rac es una GTPasa de bajo peso molecular perteneciente a la familia Rho, que se transloca a la membrana durante la activación, y que aparentemente participa también de la desactivación del complejo, a través de sus propios

mecanismos reguladores, es decir de su activación por GEFs (factores intercambiadores de nucleótidos de guanina) y su inactivación por GAPs (6) (Figura 1.2).

La separación de estos componentes en compartimentos diferentes asegura que la enzima se encuentre inactiva mientras la célula esté en estado basal. La exposición de la célula al estímulo fagocítico lleva a una importante fosforilación de residuos de serinas (por lo menos 11 residuos) particularmente de la subunidad p47^{PHOX}, mediada por la proteína quinasa C o por Akt, que le permite su interacción con p67^{PHOX} y su migración hasta la membrana plasmática, para formar la oxidasa activa junto al citocromo b₅₅₈ (30). La catálisis ocurre completamente en la subunidad de membrana (citocromo b₅₅₈), que solo se vuelve activa por un cambio de conformación inducido por la interacción con p67^{PHOX} (29).

La enzima ensamblada es capaz entonces de transferir electrones desde su sustrato, el NADPH, hasta el O₂ a través de sus grupos prostéticos transportadores de electrones, la flavina y el o los grupos hemo (la subunidad citocromo b₅₅₈ posee dos grupos hemo, pero no está determinado si ambos participan en la transferencia de electrones).

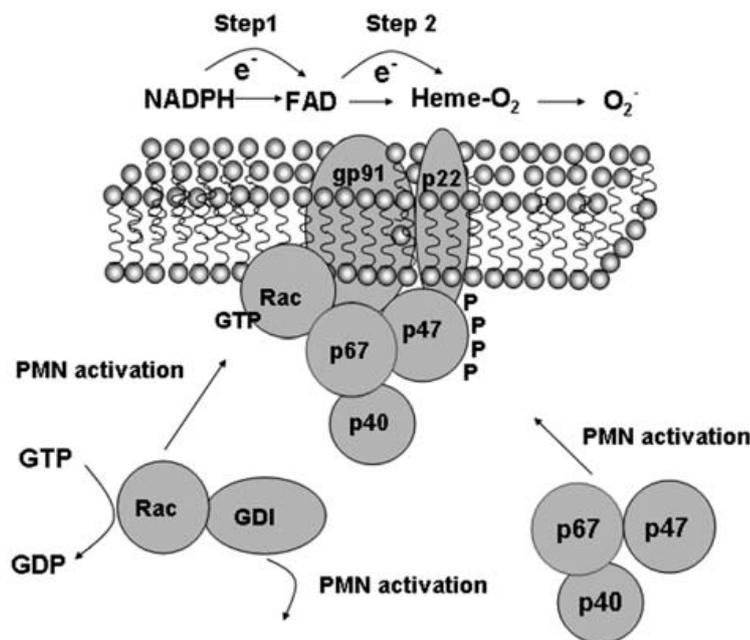


Fig. 1.2 NADPH oxidasa de células fagocíticas.

En la figura se observan los componentes y su ensamblaje, además de la reacción catalizada por la enzima. La transferencia de electrones ocurre en dos pasos, como muestra la figura. Paso 1: desde el NADPH al FAD unido al citocromo b₅₅₈ y el paso 2 desde el FAD al hemo y luego al O₂.

Extraído de: Bokoch and Zhao, 2006 (6)

No existen datos cristalográficos de la proteína, y la estructura propuesta en la Figura 1.3, con los sitios de unión de los sustratos, está basada en estudios moleculares y bioquímicos (3). Durante el proceso fagocítico, la enzima es internalizada en la vacuola fagocítica de cara al interior de la misma, es decir que el O₂⁻ se forma en el interior de la vacuola. La activación de la NADPH oxidasa sin fagocitosis genera una producción de O₂⁻ hacia el medio extracelular.

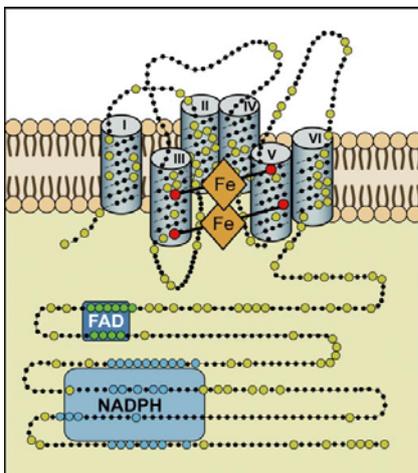


Fig.1.3 Estructura propuesta para la gp91^{PHOX}.

La proteína posee seis dominios transmembrana altamente conservados en la familia de las Nox.

En los dominios III y V se encuentran los residuos de histidina que coordinan con los grupos hemo. En el sector COOH terminal (cara citosólica de la membrana plasmática) contiene los dominios de unión al FAD y NADPH.

La transferencia de electrones ocurre desde el NADPH al FAD, luego los hemo y finalmente al O₂ (cara externa de la membrana).

Extraído de: Bedard y Krause, 2007(3).

La producción de superóxido como mecanismo efector de la respuesta inmune no se debe a una acción directa de este radical sino a la formación de las especies derivadas (31); el H₂O₂ formado por dismutación espontánea o catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), que puede actuar directamente o como sustrato de la mieloperoxidasa (MPO) en neutrófilos o de la eosinófilo peroxidasa (EPO) en eosinófilos (32), para formar otros oxidantes como HOCl y hipobromito (HOBr). La producción de HOCl alcanza concentraciones dentro del fagosoma de un neutrófilo suficientes para matar una bacteria (33), sin embargo los individuos que presentan una deficiencia en mieloperoxidasa son menos susceptibles a infecciones que los deficientes en NADPH oxidasa (34). El O₂^{•-} reacciona a velocidad controlada por difusión con el [•]NO formado por la óxido nítrico sintasa generando ONOO⁻ dentro del fagosoma.

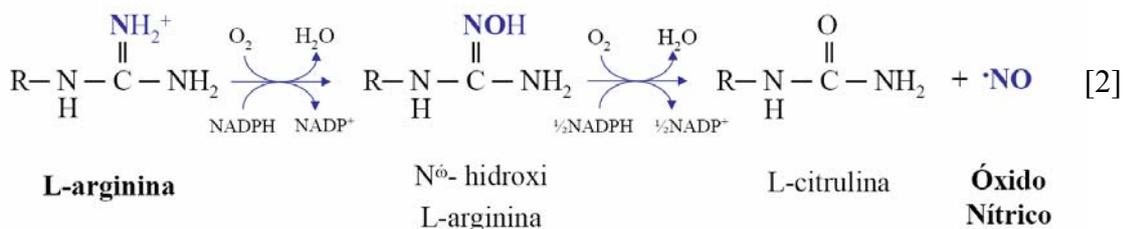
Además de la formación de especies reactivas se ha propuesto una vía alternativa de mecanismo de daño a partir de la actividad de esta enzima en neutrófilos, que implica la generación de un incremento en la concentración del K⁺ fagosomal para compensar la transferencia de electrones que ocurre en la membrana por la actividad de la NADPH oxidasa y evitar de ese modo la depolarización de la membrana. Como el K⁺ es el catión de mayor concentración en citosol, ingresa a la vacuola y actúa activando proteasas, como la elastasa del neutrófilo y catepsina G (35).

La importancia fisiopatológica de la NADPH oxidasa de células fagocíticas es evidente ya que se han identificado mutaciones en los genes que codifican las subunidades gp91^{PHOX}, p47^{PHOX}, p22^{PHOX} o p67^{PHOX} como causas de la Enfermedad granulomatosa crónica (EGC) (36). La EGC es una inmunodeficiencia primaria en la que los individuos afectados sufren infecciones crónicas y granulomas inflamatorios causados por microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Klebsiela sp*, *Aerobacter sp*, *Serratia sp* y microorganismos oportunistas. La forma más frecuente de esta enfermedad es la causada por mutaciones en el gen de la gp91phox (X-EGC) (37), la cual tiene un patrón hereditario ligado al cromosoma X. Las demás formas de EGC son de tipo autosómicas recesivas debido a mutaciones en los genes de p22phox, p47phox y p67phox (38). Mutaciones en Rac 2 han sido asociadas con defectos en el estallido respiratorio de las células fagocíticas e infecciones recurrentes (39). Al ser la EGC una inmunodeficiencia primaria poco frecuente, es difícil el estudio de su patogénesis y sus características moleculares. Teniendo en cuenta esto, resulta de gran utilidad los modelos experimentales *in vivo*, que además de responder a esta necesidad, permiten comprender los procesos bioquímicos y moleculares asociados con el sistema NADPH oxidasa. Para tales propósitos se han generado ratones knock-out para gp91phox p47phox y Rac 2 (40-42).

1.1.2 Generación de óxido nítrico: Óxido nítrico sintasa inducible

La identificación del [•]NO como mecanismo efector del sistema inmune se inicia con la caracterización de la arginina como un sustrato necesario para la actividad tumoricida de los macrófagos (13), identificando luego al [•]NO como la molécula responsable de esos efectos (19).

Las enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico a partir de L-arginina son conocidas como óxido nítrico sintasas (NOS; EC 1.14.13.39). La familia consiste en tres isoformas, la constitutiva neuronal (nNOS, 150-160 kDa), la constitutiva endotelial (eNOS, 135 kDa) y la forma inducible (iNOS, 130kDa). La reacción que catalizan es la de oxidación del grupo guanidinio de la L-arginina, generando óxido nítrico y L- citrulina como productos. (Ec. [2])



Las tres formas revelan un mismo mecanismo de catálisis, aunque difieren en sus estructuras primarias, sus regulaciones y su localización cromosómica. Las dos formas constitutivas son estrictamente dependientes del aumento del Ca^{2+} citosólico, mientras que para la iNOS, los niveles de Ca^{2+} basales son suficientes para que se encuentre completamente activa (43).

La iNOS (también llamada NOS2, por ser la segunda de las isoenzimas en ser purificada y clonada), se encuentra en las células fagocíticas (donde fue inicialmente descrita) y en otros tipos celulares como fibroblastos, miocitos y células endoteliales (44,45). Lo que caracteriza a esta isoforma, es que en todas estas células aumenta su expresión luego de la inducción por estímulos inmunológicos ($\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) y el aumento de la producción de NO cumple un rol de inhibidor del crecimiento microbiano en cualquier tipo celular infectado (46-48).

Características estructurales de la iNOS.

Es una proteína homodimérica que sintetiza NO catalizando la oxidación de 5 electrones de uno de los átomos de nitrógeno del grupo guanidinio de la L-arginina. Esta oxidación se produce a través de dos sucesivas reacciones de monooxigenación, generando $\text{N}^{\text{O}}\text{-OH-L-arginina}$ como intermediario (ec [2] y Figura 1.4). La proteína presenta un dominio oxidasa amino terminal, que posee el grupo hemo y los sitios de unión para la L-arginina y la tetrahidrobiopterina (BH_4), unido a través de un sitio de unión a calmodulina (CaM) con el dominio carboxi-terminal, que es un dominio reductasa con los sitios de unión para NADPH, FAD y FMN (Figura 1.4). La transferencia de electrones ocurre desde el NADPH al FAD y luego al FMN, pasando finalmente al hierro hémico de la subunidad adyacente (43).

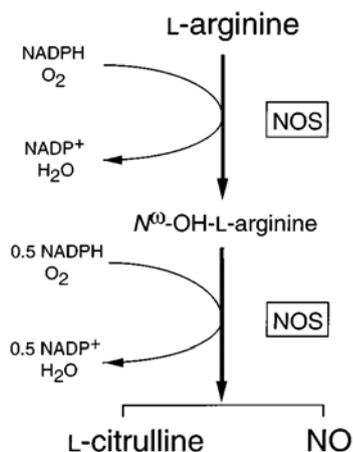
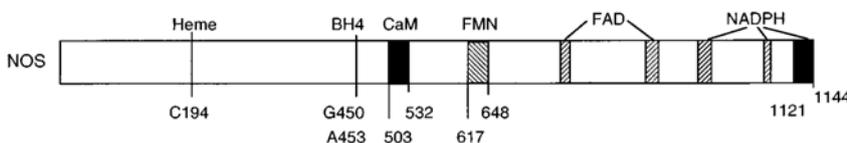


Fig. 1.4 Síntesis de óxido nítrico en macrófagos.

La óxido nítrico sintasa cataliza la reacción en dos pasos, con la formación de la $\text{N}^{\text{O}}\text{-OH-L-arginina}$ como intermediario y de L-citrulina y NO como productos finales. En el esquema inferior se representa la localización de los sitios de unión de los cofactores de la enzima en el dominio oxidasa (hemo, BH_4), el dominio reductasa (FAD; FMN y NADPH), y el dominio con el sitio de unión a la CaM como nexo.

Extraído de MacMicking et al, 1997 (8)



La iNOS se encuentra distribuida en el citosol del macrófago; aproximadamente la mitad del total de la enzima se localiza en vesículas de 50-80 nm que son transportadas hasta el fagosoma, durante la activación macrofágica, lo que determina que exista un aumento local de la concentración de óxido nítrico (49).

Regulación de la iNOS.

La iNOS sintetiza mayores cantidades de NO que las isoformas constitutivas, aumentando las concentraciones de estado estacionario de esta molécula cerca de 1000 veces (de nM a μM); no depende para su actividad de un aumento de Ca^{2+} , y una vez presente la enzima, la producción es

continúa durante muchas horas (>20 hs), hasta que la misma es degradada (8). Estas características explican la importancia de los mecanismos de regulación de esta enzima.

Existen numerosos trabajos que describen la regulación de la actividad de la iNOS por mecanismos diversos, como la disponibilidad de sustratos y cofactores (BH₄) (50). En particular la disminución de la producción de *NO por depleción de arginina, debido a la competencia de otras enzimas como la arginasa (51) y a la baja velocidad de ingreso de arginina a la célula a través de el transportador de aminoácidos catiónicos (52). A pesar de la existencia de estos mecanismos, existe consenso en que la modulación de la expresión de la proteína es el componente fundamental en la regulación de la producción de *NO (53,54).

La producción de citoquinas activadoras (ej. IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6) o inhibitorias (ej. IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β) (8) por distintas poblaciones de linfocitos T, controla la transcripción de la enzima. Las citoquinas que promueven la inducción de la enzima son producidas por linfocitos Th1 y las inhibitorias por Th2, lo que implica que existan dos tipos de activaciones del macrófago, la activación clásica o pro-inflamatoria (mediada por Th1) y una activación alterna o anti-inflamatoria (mediada por Th2) (55,56).

Otro grupo de reguladores de la iNOS lo conforman productos de virus, bacterias, protozoarios y hongos. El LPS, el ejemplo más estudiado, independiente de otros activadores estimula una inducción moderada, pero sinergiza la respuesta al IFN- γ , obteniéndose una respuesta máxima cuando el macrófago está expuesto a un estímulo liberado por el sistema inmune y un estímulo dependiente del microorganismo invasor. Esto ocurre porque las vías de señalización usadas por los distintos compuestos son diferentes (57). Las vías que están involucradas en la señalización para la inducción son, el factor nuclear- κ B (NF- κ B), que media la inducción por LPS, IL-1 β y TNF- α (58), el factor regulador del interferón tipo 1 (IRF-1)(59) y el transductor de señales y activador de la transcripción -1 α (STAT-1 α), que también responde al IFN- γ , ya que el receptor del IFN- γ activa las quinasas janus (JAKs) y estas a los factores de transcripción STAT (60). Nombramos solo estas tres vías como ejemplo, pero existen otras vías involucradas en la inducción de la iNOS, que varían entre los distintos organismos y tipos celulares, con activaciones PPAR y HIF-1 dependientes (61,62).

La expresión de la proteína es regulada también a otros niveles, afectando la estabilidad del mRNA, la traducción del mRNA o la estabilidad de la proteína, como se observa en macrófagos activados con IFN- γ expuestos a TGF- β 1 (63).

Algunos patógenos inhiben la expresión de la iNOS en macrófagos (ej. *Leishmania* spp y *Candida albicans*) (64,65), lo que facilita su supervivencia. Los mecanismos por los cuales estos patógenos modulan la formación de *NO no están completamente identificados. En *Leishmania major* la supresión que se observa en modelos animales está mediada aparentemente por glicoinositolfosfolípidos del parásito que llevan a una estimulación de los linfocitos Th2 con la consiguiente producción de citoquinas inhibitorias (66), mientras que en *Leishmania donovani* estaría mediada por la activación de fosfotirosina fosfatasa que desactivan las cascadas de señales que conducen a la inducción en el macrófago (64). En *Trypanosoma cruzi* han sido reportados tanto efectos inhibitorios como activadores de la inducción de la iNOS de macrófagos en trabajos donde se usan los distintos estadios del parásito que analizaremos más adelante.

*Producción de *NO por macrófagos humanos.*

Un punto de discrepancia entre los investigadores ha sido la existencia de la iNOS en humanos. Existen actualmente muchos reportes en que se detectan el mRNA y la actividad de la enzima en macrófagos y neutrófilos humanos, además del aumento de derivados de *NO en la circulación en el curso de un proceso inflamatorio (67,68), que aportan suficientes evidencias de que producen *NO en respuesta a estímulos inflamatorios como lo son las infecciones (69). Los macrófagos obtenidos a partir de pacientes con infecciones u otras condiciones inflamatorias expresan invariablemente la iNOS, y lo que ha confundido es que la estimulación de monocitos diferenciados *in vitro* no era eficiente (70-72). Hay que remarcar que los promotores de los genes

que codifican la iNOS humana son diferentes de los de ratones, y variables entre los distintos tejidos, que hacen difícil la comprensión con la información existente hasta el momento (54).

1.1.3 Propiedades fisicoquímicas de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno.

La producción de $O_2^{\bullet-}$ y $\cdot NO$ por estas enzimas deriva en la generación de otras especies que como vimos se agrupan bajo la denominación de “especies reactivas” pese a que cada una de ellas posee propiedades fisico-químicas, químicas y biológicas distintivas. En particular, es importante remarcar las diferencias que presentan en cuanto a sus reactividades con biomoléculas, y también sus propiedades difusionales en sistemas compartimentalizados, siendo ambas características fundamentales a tener en cuenta para sus destinos y acciones en sistemas biológicos. Ambos conceptos están además relacionados, ya que la distancia de difusión dependerá en parte de la reactividad de la molécula. Así, los posibles efectos biológicos de las distintas especies oxidantes estarán influidos por una combinación de la reactividad y la capacidad de difundir en particular a través de membranas biológicas.

Estos aspectos son particularmente relevantes cuando se atribuyen acciones citotóxicas y microbicidas a las especies reactivas producidas por células del sistema inmune ya que estas pueden formar especies oxidantes tanto hacia el medio extracelular como hacia el intrafagosomal con el cometido de generar daño oxidativo a una célula blanco. El nivel de oxidantes formados en compartimentos específicos y las distancias de difusión que deben recorrer para ejercer acciones citotóxicas, van a ser determinantes críticas para definir la importancia de cada una de las especies reactivas como moléculas efectoras de la inmunidad celular.

1.1.3.1 Especies reactivas derivadas de oxígeno

Radical Superóxido: El $O_2^{\bullet-}$ es un radical libre que puede actuar tanto como reductor o como oxidante ($E^{\circ}_{O_2/O_2^{\bullet-}} = -0.33 \text{ V}$ y $E^{\circ}_{O_2^{\bullet-}/H_2O_2} = 0.94 \text{ V}$), presentando en sistemas biológicos una vida media corta ($< 1 \text{ ms}$) debido fundamentalmente a la reacción de dismutación catalizada por las distintas isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (ec. [3]) (73) y por la reacción con el $\cdot NO$ ($k \sim 1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (74).



La difusión del $O_2^{\bullet-}$ a través de membranas biológicas se limita a su pasaje a través de canales aniónicos ya que su pKa es de 4.8, y a pH fisiológico la mayor parte de las moléculas están en la forma aniónica, lo que impide la difusión a través de la membrana.

La formación de $O_2^{\bullet-}$ conduce entonces, más que a efectos directos de esta especie, a la generación local de nuevas especies con mayor capacidad oxidante como el H_2O_2 y el $ONOO^-$.

Peróxido de hidrógeno: El H_2O_2 ($E^{\circ}_{H_2O_2/OH} = 0.38 \text{ V}$) tiene características que lo diferencian de las otras especies derivadas del oxígeno, es una molécula sin carga, no es un radical libre y es relativamente estable en condiciones fisiológicas. Es capaz de oxidar por dos electrones directamente varias biomoléculas, como por ejemplo, sulfhidrilos y hemoproteínas y ha sido identificada su participación en vías de señalización celular.

Su vida media depende principalmente de la actividad de enzimas detoxificantes como la catalasa que cataliza la conversión del H_2O_2 en H_2O y O_2 , la glutatión peroxidasa que lo reduce a H_2O a expensas de la oxidación de glutatión, y otras peroxidases que varían según el tipo celular.

Los tripanosomatídeos no poseen catalasa pero en *T. cruzi* han sido identificados varios sistemas de peroxidases localizados en los distintos compartimentos intracelulares

El H_2O_2 es una molécula polar, similar al H_2O , y su difusión a través de las membranas biológicas presenta características similares a las del agua, sin embargo estudios recientes han demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* adquiere resistencia al H_2O_2 (75) con una disminución en un factor de 2 de la permeabilidad de su membrana a este oxidante, logrado por cambios en la

composición de la membrana. Esto junto a la rápida remoción del H₂O₂ por los sistemas antioxidantes intracelulares, generan un importante gradiente en las concentraciones entre el medio extracelular y el intracelular (76).

Radical Hidroxilo: La producción biológica de [•]OH a partir de especies reactivas del oxígeno requiere la participación de metales de transición (Fe, Cu) que intervienen en la reacción de Fenton [Ec.2] o en el ciclo de Haber-Weiss [Ec. 2 y 3].



La formación de esta especie *in vivo* requiere por tanto la reacción del O₂^{•-} con el metal, para las que debe competir con las otras reacciones del propio superóxido y la reacción del H₂O₂ con el Fe^{II}, reacción lenta, cuya constante para la reacción con el Fe^{II} libre es de 2.0 x 10⁴ M⁻¹s⁻¹ (77). En condiciones fisiológicas los niveles de Fe libre o activo desde el punto de vista redox son extremadamente bajos, sin embargo un aumento en los niveles de O₂^{•-} y de H₂O₂ pueden promover la movilización de metales unidos a proteínas por mecanismos que incluyen la oxidación mediada por O₂^{•-} de centros ferrosulfurados (como en aconitasa (78)), de proteínas de reserva o transporte de Fe (como ferritina y transferrina) o degradando grupos hemos proteicos. Los metales liberados en estas condiciones son atrapados por moléculas de bajo peso molecular, como ADP, citrato, o piruvato que funcionan como quelantes, estando disponible el metal para la reacción de Fenton (77).

El [•]OH es la molécula de mayor poder oxidante formada en sistemas biológicos (E^o_{OH/H₂O} = 2.33 V), reaccionando con la mayoría de las biomoléculas en reacciones de adición u oxidación por un electrón a velocidades controladas por difusión (k > 10⁹ M⁻¹s⁻¹). Debido a esta alta reactividad su vida media es extremadamente corta (~ 10⁻⁹ s) y pese a la visión comúnmente aceptada acerca de su alto potencial citotóxico, éste es relativo, ya que una importante proporción de lo que se genera puede reaccionar, por ejemplo, con residuos proteicos no críticos y no tener efecto sobre las funciones celulares. El [•]OH sólo difunde 3-4 diámetros moleculares de su sitio de formación.

En la reacción de Fenton existen dos vías alternativas a la formación de [•]OH, una conduce a la formación de especies no oxidantes y la otra es la formación de especies oxo-ferrilo (X-Fe^{IV}=O) (77). Los complejos oxo-hierro tienen una mayor vida media que el [•]OH, siendo más selectivos en su reactividad (E^o_{Fe^{III}/Fe^{II}} ~ 1.6 V). Una reacción posible de estos complejos es con el nitrito, al que oxida para dar [•]NO₂, como ocurre con el compuesto II de la mieloperoxidasa (MPO- Fe^{IV}) (79,80).

Acido hipocloroso: El H₂O₂ puede, en lugar de ser sustrato de las enzimas detoxificantes dar origen a la formación de otro oxidante potente: el ácido hipocloroso (HOCl) por acción de la mieloperoxidasa (MPO).

La MPO cataliza la formación de HOCl a partir de H₂O₂ e ión Cl⁻ (ecs.[6] y [7]). Los productos de oxidación de haluros (como el HOCl) son moléculas citotóxicas que actúan por dos mecanismos principales: la halogenación y la oxidación (E^o_{HOCl/Cl⁻} = 0.17 V y E^o_{HOCl/Cl⁻} = 1.08 V).



Los principales productos en el caso de la cloración son las monocloraminas y dicloraminas que involucran principalmente el grupo amino N-terminal de péptidos y proteínas, así como nucleótidos de piridina y adenina. Es probable que la toxicidad dependa fundamentalmente de las reacciones de oxidación (81), ya que el HOCl es un potente oxidante cuyos blancos principales son grupos sulfhidrilos, centros ferrosulfurados (82) y grupos hemos de distintas hemoproteínas (83). Las cloraminas conservan un fuerte poder oxidante y son responsables muchas veces de la toxicidad de este producto debido a su mayor estabilidad (84).

Esta enzima es capaz además de convertir el nitrito (NO₂⁻) en dióxido de nitrógeno ([•]NO₂), responsable de la nitración de aminoácidos en particular de tirosinas (85,86,87). Este es un destino probable del H₂O₂ en neutrófilos que poseen grandes cantidades de esta enzima en los gránulos

azurófilos, que es liberada al medio extracelular durante la activación y degranulación celular. Sin embargo es un tema controversial la presencia de esta enzima en macrófagos. La enzima está escasamente representada en los monocitos circulantes, no se expresa en macrófagos diferenciados *in vitro*, aunque existe algún reporte de su presencia en macrófagos diferenciados *in vivo* (88)¹.

Radical Carbonato: El radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) se forma en sistemas biológicos a partir de reacciones en que participan el anión bicarbonato (HCO_3^-) y el dióxido de carbono (CO_2). Los mecanismos descritos originalmente fueron la reacción del $\cdot\text{OH}$ con HCO_3^- y con el anión carbonato (CO_3^{2-}) (ecs. [8] y [9]).



A pH fisiológico la reacción posible es la del $\cdot\text{OH}$ con HCO_3^- ($\text{pK}_a = 10.25$) (ec.[8]), que posee una constante de velocidad mucho menor que la del $\cdot\text{OH}$ con la mayor parte de las biomoléculas ($\sim 10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), y a pesar de que la concentración del HCO_3^- en medios biológicos es de 25 mM, no parece ser un mecanismo probable de generación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en esos sistemas. Esto hizo que esta especie no fuera tenida en cuenta por los biólogos como posible oxidante hasta el reconocimiento de la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a partir de la reacción del ONOO^- con CO_2 (89-92).

La siguiente vía fue la identificación del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ como la especie oxidante, difusible, generada durante la actividad peroxidásica de la CuZnSOD en presencia de HCO_3^- (9,93) o CO_2 (94).

Por último, otra fuente posible de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ es la enzima xantino oxidasa en actividad en presencia de HCO_3^- (95).

El $\text{CO}_3^{\cdot-}$ es un radical libre con alto poder oxidante siendo el potencial de reducción determinado para el par $\text{CO}_3^{\cdot-}/\text{HCO}_3^-$ de 1.78 V a pH 7.0 (96) y el pK_a de esta especie menor a 0 (97), con lo que se puede asegurar que en condiciones fisiológicas se encuentra en la forma aniónica, dificultando su pasaje entre distintos compartimentos. La mayoría de las reacciones de este radical son oxidaciones en medio acuoso por transferencia de electrones y abstracción de hidrógeno, pero prácticamente no existen reacciones de adición. En sistemas biológicos las reacciones más importantes son con algunos residuos aminoacídicos, en particular, triptofano ($k = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), cisteína ($k = 1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tirosina ($k = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), metionina ($k = 3.6 \times 10^7$) e histidina ($k = 5.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (98,99). El resto de los aminoácidos, así como el esqueleto carbonado de las proteínas pueden ser oxidados, pero las constantes de esas reacciones son $< 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, significativamente menores que las de los aminoácidos más reactivos, lo que hace poco probable que ocurran. Recientemente han sido reportadas reacciones con centros metálicos proteicos, con constantes de reacción altas, como es el caso de la reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con el Fe^{II} del citocromo c ($k = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (100)) y de la aconitasa ($k = 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (101)). Otra reacción posible es con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, particularmente con la guanina, con la que se ha determinado una constante de $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (102).

El $\text{CO}_3^{\cdot-}$ es un radical más estable que el $\cdot\text{OH}$, lo que hace más efectivas sus reacciones; el amplio rango que presenta en sus constantes de reacción lo transforma en un oxidante muy selectivo, que cuando es generado dentro de la célula seguramente su blanco preferencial sean los residuos de tirosina expuestos al medio acuoso en las proteínas. Si bien la constante de reacción con el triptofano es mayor, este aminoácido se encuentra en un número menor y generalmente se localiza en entornos hidrofóbicos, a los que el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ no accede fácilmente. La reacción con la tirosina genera radical tirosilo, que puede recombinar con $\cdot\text{NO}_2$ produciendo la nitración del residuo (103).

La difusión del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a otros compartimentos celulares está limitada por su condición de molécula cargada al igual que lo que ocurre con el anión superóxido. Su reactividad va a estar limitada por lo tanto al compartimento en que es generado (98).

¹ En la línea de macrófagos que usamos en nuestro trabajo exploramos su presencia, pero no pudimos evidenciar ninguna actividad ni en condiciones basales ni en las condiciones de activación que usamos para la producción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$.

1.1.3.2 Especies reactivas derivadas de nitrógeno

Oxido Nítrico: El $\cdot\text{NO}$ es un radical libre bastante estable ($E^{\circ}_{\cdot\text{NO}/\text{NO}} = 1.21 \text{ V}$ y $E^{\circ}_{\cdot\text{NO}/\text{NO}_2} = 0.4 \text{ V}$), con poca capacidad redox y por ello no reacciona en forma rápida con la mayoría de las biomoléculas. A pesar de esto la vida media del $\cdot\text{NO}$ *in vivo* es relativamente corta ($<10 \text{ s}$) (104), siendo las reacciones directas más rápidas con metales de transición (como grupos hemo de la guanilato ciclasa, citocromo oxidasa, y de la hemoglobina) o con otras especies radicalares como el $\text{O}_2^{\cdot-}$ (105), radical tiilo (RS^{\cdot}), radicales proteicos y radicales lipídicos, mediando a veces reacciones de terminación de propagaciones radicalares (106). La mayor parte de sus efectos patogénicos dependen de la formación de sus derivados, como ONOO^- , formado por la reacción del $\cdot\text{NO}$ con el radical superóxido, y $\cdot\text{NO}_2$, por la reacción con el oxígeno.

La hidrofobicidad del $\cdot\text{NO}$ permite su difusión a través de las membranas lipídicas (con un valor reportado de $0.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para la membrana de eritrocitos (107) y un coeficiente de partición en liposomas de 4.4 (108)) Sus propiedades fisico-químicas hacen que el $\cdot\text{NO}$ sea una molécula capaz de transmitir información y generar efectos en compartimentos diferentes al que fue producido sin necesidad de mecanismos específicos de transporte. Esta difusibilidad implica que puede salir del compartimento celular en el que es producido y distribuirse en todas las direcciones, ya sea en otros compartimentos de la misma célula o hacia células vecinas (109). Las diferencias en los efectos del $\cdot\text{NO}$ en los distintos sistemas van a depender del tipo celular (con diferentes moléculas blanco), fuentes de $\text{O}_2^{\cdot-}$ locales y tensión de oxígeno. Las altas concentraciones de $\cdot\text{NO}$ sintetizadas por la iNOS, generan un aumento importante en el estado estacionario de $\cdot\text{NO}$ en el citosol celular y en las membranas, donde puede reaccionar con el O_2 (que también se concentra en ambientes hidrófobos), produciendo intermediarios reactivos como $\cdot\text{NO}_2$, N_2O_3 , N_2O_4 y cuyos productos finales son el nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) (ecs. [10] a [14]) (110).



La difusión del $\cdot\text{NO}$ hacia el espacio extracelular durante la activación macrofágica va a estar acelerada por la presencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$, favoreciendo la formación de ONOO^- en los lugares en que se encuentra activa la NADPH oxidasa.

Anión nitroxilo: El $\cdot\text{NO}$ puede ser reducido por un electrón para dar el anion nitroxilo (NO^-) con un potencial de reducción de 0.39 V. El NO^- se convierte rápidamente en N_2O bajo condiciones fisiológicas a través de la protonación, dimerización y deshidratación (111). Reacciona con tioles, lo que resulta en la formación de hidroxilaminas o S-nitrosotioles y con O_2 para dar ONOO^- .

Dióxido de nitrógeno: El $\cdot\text{NO}_2$ es un radical libre cuya formación biológica depende principalmente, de la descomposición del ONOO^- y del ONOOCO_2^- , de la oxidación del NO_2^- catalizada por hemoperoxidasas (mieloperoxidasa y eosinófilo peroxidasa) y de la oxidación por O_2 del $\cdot\text{NO}$ (Ec.[10]), reacción favorecida en ambientes hidrofóbicos donde ambas especies se concentran, en particular cuando se incrementa la formación de $\cdot\text{NO}$, ya que la velocidad de la reacción es de segundo orden en la concentración de $\cdot\text{NO}$.

Es un oxidante moderadamente fuerte ($E^{\circ}_{\cdot\text{NO}_2/\text{NO}_2^-} = 0.9 \text{ V}$) y participa en reacciones de recombinación con otros radicales ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), de adición a dobles enlaces, de transferencia de electrones y de abstracción de átomos de hidrógenos en enlaces carbono-hidrógeno por ejemplo en compuestos fenólicos (98). Entre las reacciones de recombinación se encuentran las reacciones con radicales lipídicos y proteicos que llevan a la formación de compuestos nitrados. El interés de este proceso es que se trata de una modificación de las moléculas que nos permite demostrar la presencia de esta especie *in vivo* (103,112,113).

Un destino del $\cdot\text{NO}_2$ de gran importancia en los sistemas biológicos es la reacción con tioles (ej. el glutatión (GSH), $k = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ a pH 7.4 (114)), debido a la alta concentración intracelular de estos.

En sistemas biológicos las concentraciones que se alcanzan de esta especie son bajas ($<1\mu\text{M}$) por lo que la reacción de dimerización para dar N_2O_4 (ec.[11]) es poco probable (98).

Peroxinitrito: La formación simultánea de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ lleva a la producción de una especie no radicalar pero con alto poder oxidante. Las propiedades fisico-químicas de sus precursores indican que el $\cdot\text{NO}$ debe difundir hasta el sitio de producción del $\text{O}_2^{\cdot-}$. En nuestro modelo, el peroxinitrito se genera hacia el medio extracelular en ausencia de fagosoma o cuando hay fagocitosis, dentro de la propia vesícula.



En condiciones fisiológicas la presencia de superóxido dismutasa tanto a nivel citosólico (CuZnSOD), mitocondrial (MnSOD) como extracelular (EC-SOD), lleva a la rápida dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ formado para dar H_2O_2 . Sin embargo, la sobreproducción de $\cdot\text{NO}$ en condiciones patológicas puede competir con esa reacción y así conducir a la formación de ONOO^- . La forma aniónica del ONOO^- se encuentra en rápido equilibrio con la forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH , $\text{pK}_a = 6.8$ (115)), especies con reactividades diferentes.

Las reactividad del peroxinitrito/peroxinitroso se dividen en reactividades directas y las indirectas o mediadas por los radicales ($\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{NO}_2$) productos de la homólisis de la forma protonada, por lo cual, la velocidad de descomposición, y por lo tanto las reacciones, dependen del pH, con una constante de velocidad de decaimiento de 0.9 s^{-1} a pH 7.4 a 37°C , que aumenta con la disminución del pH (116).

Las reacciones directas del ONOO^- incluyen la reacción con sulfhidrilos (115), metaloproteínas (centros ferrosulfurados (117) y metalo-porfirínicos (118)) y con dióxido de carbono (CO_2), todas reacciones de velocidades moderadas, con un rango de constantes entre 10^3 a $10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

En medios biológicos la concentración de CO_2 es del orden de 1-2 mM (10^4 veces mayor que la concentración de H^+ a pH 7.4, y 10^2 veces cuando el pH es < 6 , como en el fagosoma), lo que hace de esta reacción una de sus principales rutas *in vivo*. La reacción con CO_2 ($k = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ a 37°C (90)) genera un aducto denominado nitrosoperoxocarboxilato (ONOOCO_2^-) que tiene una vida media estimada en menos de $1 \mu\text{s}$ y homoliza generando en este caso, un 35% de los radicales $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$, mientras el resto reaarregla a NO_3^- y CO_2 (Figura 1.5).

La vida media del ONOO^- en sistemas biológicos se estima en el rango de los 10 ms, tiempo suficiente para permitir su difusión entre distintos compartimentos y difundir entre 1 y 2 diámetros celulares ($\sim 10 \mu\text{m}$). El ONOO^- puede atravesar las membranas celulares vía canales aniónicos, mientras que el ONOOH lo hace por difusión pasiva. Es probable que en biología ambos mecanismos coexistan, dependiendo la importancia relativa de ambas vías de diversos factores, entre los que se incluyen por ejemplo una combinación del pH local y de la presencia y el número de canales aniónicos (118). Esto implica que el ONOO^- puede actuar en un compartimento distinto al que fue generado. Sin embargo, en el caso del aducto que se forma en su reacción con el CO_2 , el ONOOCO_2^- , su corta vida media ($< 1 \mu\text{s}$ (119)) implica que decaiga en el mismo compartimento en que es generado, por lo que sus efectos dependerán principalmente de reacciones de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$ generados (120).

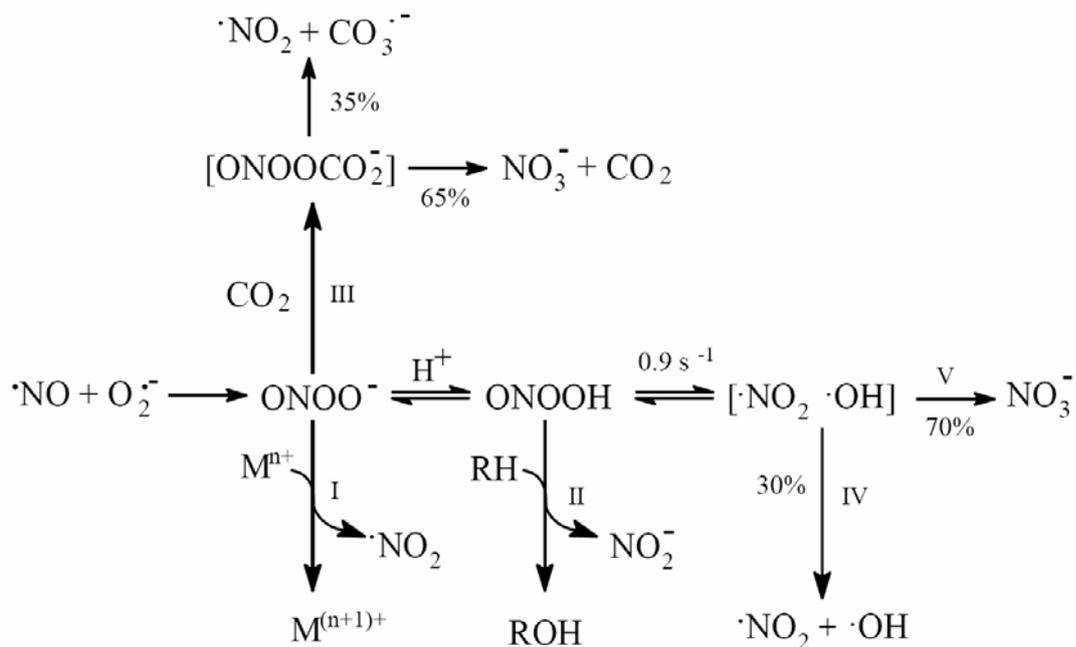


Figura 1.5 Rutas del peroxinitrito. (I) reacción directa con metales de transición; (II) es la reacción de oxidación por dos electrones; (III) formación de nitrosoperoxocarboxilato y su descomposición; (IV) homólisis del ácido peroxinitroso y (V) rearreglo a nitrato.
 Extraído de Radi et al, *Free Radic.Biol.Med.* (30) 2001

El rol de cada una de estas especies en el daño oxidativo, depende de su capacidad de difundir suficiente distancia en medios biológicos para alcanzar blancos críticos y de su poder oxidante. Esto involucra características como el potencial re-dox, la vida media y su capacidad de atravesar membranas biológicas. En la Tabla 1.1 mostramos esos datos para las especies involucradas en el proceso fagocítico (Tabla 1.1)

Tabla 1.1. Propiedades físico-químicas de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno producidas por macrófagos activados.

Fórmula	Nombre recomendado por IUPAC ¹	Nombre común	$t_{1/2}$ (s)	E° (V)	Propiedades fisicoquímicas
$O_2^{\cdot-}$	Dióxido(\bullet 1-)	Anión superóxido	10^{-3}	+0.94	Difusión limitada a pasaje por canales aniónicos
$^{(2)}H_2O_2$	Dihidrodioxido	Peróxido de hidrógeno	--	+0.38	Difunde membranas, la permeabilidad al H_2O_2 depende de la composición
$\cdot OH$	hidridooxígeno(\bullet)	Radical hidroxilo	10^{-9}	+2.3	Difusión limitada debido a su alta reactividad
$CO_3^{\cdot-}$	trióxidocarbonato(\bullet 1-)	Radical carbonato	10^{-3}	+1.6	Difusión limitada a pasaje por canales aniónicos
$\cdot NO$	oxidonitrógeno(\bullet) monóxido de nitrógeno	Óxido nítrico	1-10	+0.39	Difunde fácilmente y alcanza otros compartimentos
$\cdot NO_2$	dióxidonitrógeno(\bullet) dióxido de nitrógeno	dióxido de nitrógeno	10^{-2}	+0.99	Difunde fácilmente, se acumula en membranas
$ONOO^-$	Oxoperoxonitrato(1-)	Peroxinitrito ³	10^{-1}	+1.4	Difunde a través de canales aniónicos.
$ONOOH$	hidrógeno oxoperoxonitrato(1-)	Ácido peroxinitroso			Difunde membranas
$ONOOCO_2^-$	1-carboxilato-2-nitrosodioano	Nitrosoperoxo-carboxilato	$< 10^{-6}$	--	Difusión limitada debido a su corta vida media

¹ IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

² El H_2O_2 es una especie muy estable, pero la presencia de catalasa y distintas peroxidasas en células disminuye su vida media, y el valor depende la capacidad de detoxificación de cada tipo celular.

³ El término peroxinitrito se usa generalmente para referirse a la suma de $ONOO^-$ y $ONOOH$. A pH 7.4 existe un 80% de la forma $ONOO^-$. La vida media reportada corresponde a la de la mezcla de ambas especies, a pH 7.4, 37°C.

1.1.3.3 Métodos de detección de especies reactivas en sistemas biológicos

Las cortas vidas medias de las especies oxidantes dificultan su detección, en particular cuando se generan en sistemas biológicos, en donde la detección debe competir con los sistemas antioxidantes y con las elevadas concentraciones de biomoléculas que pueden reaccionar con ellas. Se necesitan sondas que reaccionen o atrapen estas especies sufriendo alguna modificación característica, estable y que no sean tóxicas. En el curso de esta tesis hemos utilizado técnicas que ya han sido caracterizadas en forma apropiada por distintos autores. Las sondas comúnmente usadas poseen propiedades espectrofotométricas, fluorescentes (dihidrorodamina (121,122), diclorofluoresceína (123-125), hidroetidio (126-128), diaminofluoresceínas (129,130)), luminiscentes (luminol (89,131,132), lucigenina (133,134), coelenterazina (135)) o paramagnéticas (sondas atrapadoras de spin).

La mayoría de estas técnicas no son específicas para una especie, sino que muchas veces los mismos productos se generan por la reacción de varias de ellos.

La detección del radical carbonato ha sido menos estudiada que la de las otras especies, ya que como vimos anteriormente, la caracterización de su formación en sistemas biológicos es reciente (90). Este radical generalmente no se adiciona, lo que dificulta su detección específica. Sin embargo puede ser detectada en forma directa por dos técnicas, la quimioluminiscencia, dependiente según plantearon Hodgson y Fridovich (136), de la reacción de dismutación del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (90,95) y la resonancia paramagnética electrónica (92), con la limitación en ambos casos de que se necesitan concentraciones relativamente elevadas para ser detectadas. La detección indirecta se realiza por evaluación de los productos de oxidación, como la formación de 3-3'ditirosina (137,138), oxidación de sondas fluorescentes (dihidrorodamina y diclorofluoresceína) (124) y de la formación del aducto hidroxilado del atrapador de spin 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO) (9,139) (Fig. 1.6).

La detección de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ por la reacción con el DMPO resulta interesante ya que esta molécula difunde fácilmente a través de las membranas y puede ser usada en altas concentraciones (~100 mM) en células, tejidos o animales, ya que no presenta toxicidad en esas concentraciones. Al tratarse de una detección indirecta se pierde especificidad, ya que el DMPO hidroxilado (DMPO-OH) es el producto también de la adición $\cdot\text{OH}$ y del decaimiento de la forma DMPO-OOH generada por la reacción del DMPO con el $\text{O}_2^{\cdot-}$, pero puede ser una técnica importante para la detección de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en sistemas biológicos.

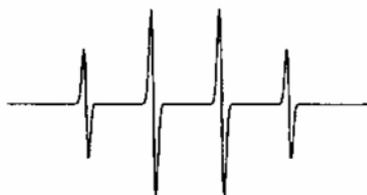
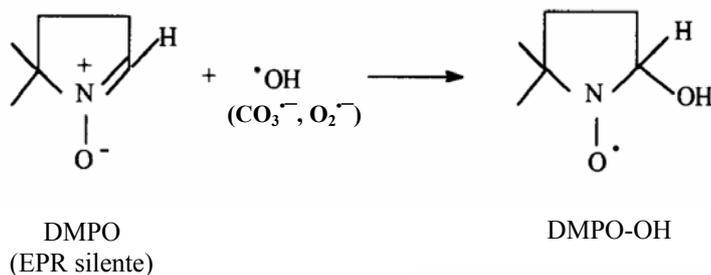


Fig.1.6 Estructuras del DMPO y el DMPO-OH

A través de mecanismos diferentes el $\cdot\text{OH}$, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ forman el producto hidroxilado del DMPO, el DMPO-OH que presenta una señal de EPR característica.

1.2 Rol citotóxico de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

La actividad microbicida de estas especies ha sido convincentemente demostrada desde experimentos *in vitro* de exposición a oxidantes, cocultivos con células productoras de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$, con la respectiva modulación farmacológica de esas producciones, hasta la generación de los modelos de animales knock-out para una o más de las enzimas vinculadas a la generación de oxidantes.

Como vimos, a partir de los productos de las enzimas que se activan durante una infección, el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el $\cdot\text{NO}$, se generan, en forma espontánea o catalizadas, otras especies, tales como el H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$, ONOO^- , ONOOCO_2^- y $\text{CO}_3^{\cdot-}$, lo que hace muchas veces difícil la asignación de acciones microbicidas específicas a cada una de ellas.

Los blancos que existen en los patógenos son diversos, incluyendo tioles, centros metálicos, tirosinas proteicas, bases de los nucleótidos y lípidos.

1.2.1 Toxicidad mediada por las especies reactivas derivadas del oxígeno

Estudios de exposición de *Escherichia coli* a bajas concentraciones de H_2O_2 , mostraron que el mecanismo principal de toxicidad en ese sistema dependía del daño sobre el DNA de la célula, mientras que exposiciones a altas concentraciones resultaban en daño sobre diversos blancos celulares. El daño sobre el DNA es dependiente de la presencia de hierro, lo que implica al radical hidroxilo o el ferrilo como especies tóxicas producidas por reacción de Fenton con modificaciones de las bases y de los azúcares que derivan en roturas de la cadena (140). El daño sobre las proteínas provoca una serie de modificaciones sobre algunos aminoácidos, entre los que se destacan: la cisteína, metionina, tirosina, fenilalanina y triptofano, y también se ha descrito en estudios de exposición a H_2O_2 , la generación de carbonilos proteicos, formados por la oxidación de arginina, prolina, o lisina (141).

1.2.2 Toxicidad mediada por las especies reactivas derivadas del nitrógeno

El $\cdot\text{NO}$ y los nitrosotioles pueden inhibir parcialmente la respiración bacteriana (142) e incluso promover la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a ese nivel con la subsiguiente formación de ONOO^- en la mitocondria del patógeno (143). Se ha mostrado también la inhibición reversible de la replicación del DNA bacteriano por un mecanismo de movilización del Zn de metaloproteínas (144), y la inhibición de la síntesis de ribonucleótidos por la reacción del $\cdot\text{NO}$ con el radical tirosilo generado durante el ciclo catalítico de la ribonucleótido reductasa, lo que limita la disponibilidad de precursores para la síntesis y reparación del DNA (145).

En algunos casos ya ha sido demostrado que la molécula efectora es el ONOO^- , en particular esto ocurre durante la interacción con los macrófagos, ya que estos producen superóxido y óxido nítrico en cantidades equimolares durante por lo menos 60-90 minutos (21,146,147).

Los blancos del ONOO^- / ONOOH y ONOOCO_2^- son:

1. *Reacción directa con centros metálicos*: como los grupos hemos de las hemoproteínas (ej. citocromos (148)), o centros Fe-S (ej. aconitasa(117)).
2. *Oxidación de sulfhidrilos*, (115) como en cisteínas proteicas (generando la inactivación enzimática en el caso de cisteínas críticas (149) o la depleción de tioles que participan en mecanismos antioxidantes como el glutatión o la tripanotona (150).
3. *Nitración de tirosinas*, la nitración de tirosina es un proceso altamente selectivo limitado a determinadas tirosinas de las proteínas, que depende de la formación de los radicales derivados del ONOO^- y se asocia en muchos casos con pérdida de función de la proteína modificada. Actualmente se han identificado varias proteínas nitradas vinculadas a diversos procesos patológicos. Entre ellas destacamos a la MnSOD que fue la primer proteína nitrada encontrada *in vivo*, y que la nitración de la Tyr-34 conduce a la inactivación total de la enzima. (151,152). Las proteínas afectadas por este mecanismo están asociadas a distintas funciones celulares, son proteínas del citoesqueleto (como la nitración de actina (153)) proteínas que integran vías de señalización con modulación de las rutas dependientes de quinasas de tirosinas, con activación de

quinasas (ejemplo, ERK (154)) y proteínas vinculadas al metabolismo energético celular (proteínas de la glucólisis (155) y de la cadena respiratoria (156-158)).

4. *Oxidación de lípidos.* El ONOO⁻ es capaz de desencadenar peroxidación lipídica (159,160) en membranas afectando la permeabilidad y la fluidez de la membrana (161,162).

5. *Oxidación de ácidos nucleicos.* Produce modificaciones oxidativas tanto a nivel de las bases nitrogenadas (en particular sobre la guanina, con la 8-oxo-guanina como producto mayoritario y 8-nitroguanina (163)), como del esqueleto de azúcar-fosfato en ácidos nucleicos, que conducen a la rotura de la cadena, con activación de la poli (ADP) ribosa polimerasa (PARP) (164).

La toxicidad del ONOO⁻ puede derivar en los dos procesos de muerte celular conocidos, apoptosis (165,166) y necrosis (164,167) (Figura 1.7), recientemente revisado por Szabó, Ischiropoulos y Radi (2).

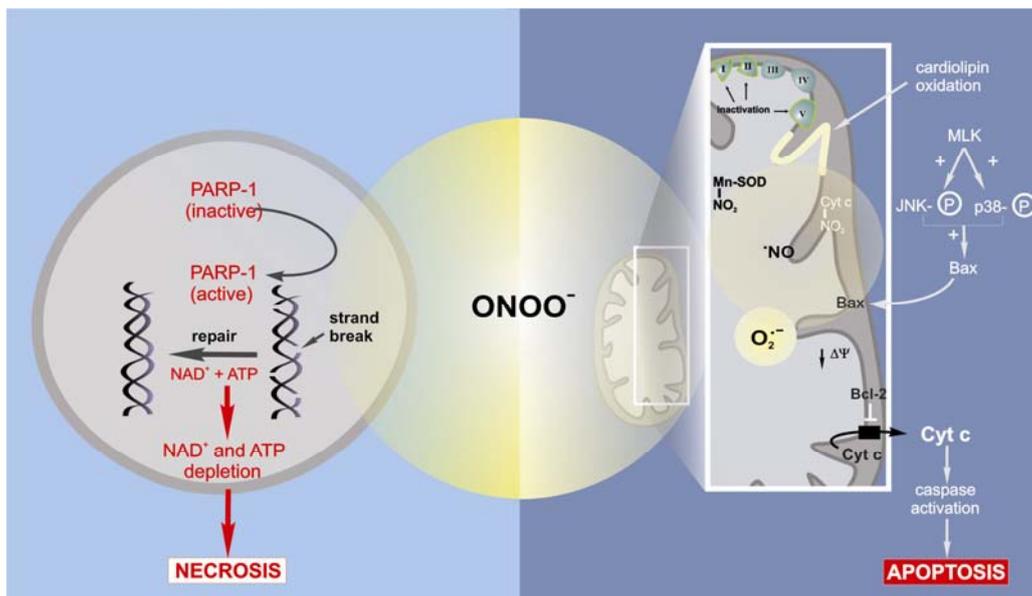


Fig. 1.7 Muerte celular mediada por peroxinitrito

En la mitocondria el ONOO⁻ afecta la formación de ATP e induce pérdida del potencial de membrana con la liberación de citocromo c y activación de apoptosis.

A nivel nuclear el ONOO⁻ genera daño sobre el ADN, con la fragmentación de ADN y la activación de la PARP y la depleción de ADP y ATP provocando la necrosis celular.

Extraído de Szabó, Ischiropoulos y Radi. (2007) (2)

Para ejemplificar los efectos microbicidas del ONOO⁻ mostramos en la Tabla 1.2 algunos datos que existen en la literatura y las estrategias experimentales que se han utilizado para intentar definir la especie responsable del daño. Los daños oxidativos identificados en células expuestas a ONOO⁻ *in vitro*, sirven como base para analizar qué procesos ocurren *in vivo*. Aunque inicialmente se creía que la nitración proteica era una huella exclusiva del ONOO⁻, actualmente se sabe que aunque es una de las posibles fuentes de [•]NO₂ también existen otros mecanismos como la nitración mediada por peroxidasas. Como se observa en la Tabla 1.2 las aproximaciones experimentales con los distintos patógenos son similares, identificando a la iNOS y la NADPH oxidasa como mecanismos efectores necesarios para el control de la infección.

Tabla 1.2 Evidencias del rol citotóxico del peroxinitrito durante la infección.

Patógeno	Estrategia Experimental y Observaciones	Referencia
Bacterias		
<i>Escherichia coli</i> (bacilo gram (-))	Exposición <i>in vitro</i> a NO y ONOO^- . Mayor toxicidad del ONOO^- .	(168) (169)
<i>Salmonella thiphimurium</i> (bacilo gram (-))	La cepa de Salmonella deficiente de Cu,Zn-SOD tiene una menor sobrevivencia en macrófagos y es menos virulenta en ratones. Recupera su virulencia cuando se enfrenta a macrófagos incapaces de generar $\text{O}_2^{\bullet-}$ o NO .	(170)
<i>Brucella abortus</i> (gram (-), intracelular)	(1) Infección en macrófagos. Uso de inhibidores. (2) Infección en ratones deficientes en iNOS y gp91phox.	(171) (172)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (gram (+))	Exposición a oxidantes <i>in vitro</i> Infección en macrófagos. Uso de inhibidores. Infección en ratones deficientes en iNOS	(173)
<i>Rhodococcus equi</i> (gram (+), intracelular)	Exposición <i>in vitro</i> a oxidantes. Control de la infección en ratones es IFN- γ dependiente. Ratones deficientes en iNOS o NADPH oxidasa no controlan infección	(174)
Parásitos		
<i>Cryptosporidium parvum</i> (protozoario)	La infección en animales es mayor con inhibidores de la iNOS y FeTMPyP. Colocalización de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ con iNOS.	(175)
<i>Leishmania amazoniensis</i> (protozoario)	Infección en ratones. Detección de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ en proteínas de la vacuola fagocítica del macrófago y del parásito	(176)
<i>Leishmania major</i> (protozoario)	Cocultivos con macrófagos activados. Los autores asocian la toxicidad con el NO pero no tienen en cuenta la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante la interacción macrófago- <i>Leishmania</i>	(177)
<i>Leishmania donovani</i> (protozoario)	Infecciones en ratones iNOS(-/-) y NADPH oxid. (-/-)	(178)
Virus		
<i>Coxsackievirus</i> (virus)	Exposición <i>in vitro</i> a ONOO^- inhibe la replicación viral. Detección de $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ asociada a proteínas virales e inhibición de la infección en ratones mediada por inhibidores de la NOS y atrapadores de ONOO^- .	(179)
Hongos		
<i>Candida albicans</i> (fungus)	Exposición <i>in vitro</i> a oxidantes. Infección en macrófagos que aumentan con inhibidores de la iNOS y atrapadores de $\text{O}_2^{\bullet-}$	(180)

Estudios con animales deficientes de NADPH oxidasa e iNOS.

Como se puede observar en la Tabla 1.2, una de las estrategias más usadas actualmente es el uso de los animales modificados genéticamente, que sean incapaces de producir $O_2^{\cdot-}$, $\cdot NO$ o ambas. Si bien experimentalmente es más simple el uso de inhibidores de las enzimas para analizar su participación como mecanismos efectores, esto ha planteado ciertas dificultades en modelos animales. Por un lado debido a que no se dispone aún de inhibidores efectivos, específicos e inocuos para el huésped, de la NADPH oxidasa (3). En cuanto a la iNOS, aunque existen diversos inhibidores, se presentan día a día nuevas moléculas, intentando inhibir específicamente a la isoforma inducible, para evitar los efectos sobre la producción fisiológica de $\cdot NO$.

La generación de ratones deficientes en NADPH oxidasa (para alguna de las subunidades, en la mayoría de los casos, son ratones gp91^{PHOX} -/- o p47^{PHOX} -/-) mostró que son susceptibles a una serie de infecciones, como *S. typhimurium* (181), *A. fumigatus* (182) y *S. aureus*. Los ratones deficientes de iNOS, mostraron su esencialidad en infecciones con *Mycobacterium tuberculosis* (183), *Leishmania major* (184), *Leishmania donovani* (178). Con respecto a estas especies es interesante remarcar que por otros mecanismos algunos de estos patógenos modulan el estallido respiratorio del huésped.

Se han desarrollado también ratones deficientes más complejos, tratando de estudiar las interacciones de las diferentes vías que participan en la inmunidad. El ejemplo más dramático de estas combinaciones fue el modelo desarrollado por Shiloh y col. (181) de un ratón doblemente deficiente para gp91^{PHOX} y NOS2. Aún en condición libre de microorganismos externos estos ratones morían por infecciones generadas a partir de los microorganismos presentes en la flora normal (181).

La estrategia de modificación genética también presenta problemas, ya que puede perder de vista otras funciones de las mismas moléculas. En el caso del $\cdot NO$ y del $O_2^{\cdot-}$ se les reconocen funciones de regulación de la respuesta inmune fundamentales para el correcto desarrollo del proceso, como la inhibición de la proliferación de los linfocitos (46), la producción de una larga lista de citoquinas (185) y la activación de vías de señalización (186,187)

Los mecanismos antimicrobianos que se ponen en juego en cada infección pueden ser diferentes. En el sistema inmune existe redundancia que permite asegurar el éxito y también existe sinergia entre mecanismos aparentemente independientes, estos dos elementos, esenciales, hacen que sea difícil la interpretación cabal de los resultados que se obtienen con los modelos knock-out.

1.2.3 Sistemas defensivos contra especies reactivas presentes en microorganismos.

Los microorganismos patógenos son aquellos que resisten o burlan los mecanismos efectores de las células fagocíticas, logrando esto por medio de varias estrategias que incluyen, la evasión, la supresión, la inactivación enzimática, atrapamiento de especies, secuestro de hierro y mecanismos de reparación.

Los mecanismos involucrados comprenden la disrupción algunas veces de las vías de señalización que activan al macrófago, como son las vías implicadas en la activación de la NADPH oxidasa y de la iNOS (188,189).

La detoxificación de estas especies por enzimas como las catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas ha sido estudiada en la mayoría de los patógenos, siendo en muchos casos enzimas necesarias para la virulencia del organismo (190). Más recientemente se han detectado nuevas actividades de detoxificación de las especies reactivas del nitrógeno, como las actividades dioxigenasa y reductasa de $\cdot NO$ que han sido identificadas en *Escherichia coli* y en *Mycobacterium tuberculosis* (191-193) o la actividad peroxinitrito reductasa atribuida a las peroxirredoxinas, familia de enzimas ampliamente distribuidas tanto por los tipos celulares en los que se han identificado (levadura, protozoarios, eubacterias, plantas y animales) como por su localización subcelular (en citosol, mitocondria, cloroplastos, peroxisomas y asociadas a membranas) (194-196). La resistencia que se observa en numerosas bacterias se vincula a la expresión de enzimas

antioxidantes. En *Salmonella typhimurium*, la CuZn-SOD periplásmica es fundamental para la sobrevivencia de la bacteria en el fagosoma, evitando la formación de ONOO⁻ durante el proceso (170).

Además de las actividades enzimáticas, existen moléculas que pueden funcionar como atrapadores intracelulares de los oxidantes, como son los tioles de bajo peso molecular, como el glutatión (GSH) presente en gran parte de los microorganismos y en el caso de los tripanosomatídeos, la dihidrotriptanotona, un ditiol que es el centro de las rutas de detoxificación de oxidantes en estos protozoarios (150).

Es interesante marcar que la exposición a los distintos oxidantes, como O₂⁻, H₂O₂, [•]NO y S-nitrosotioles activan en muchos patógenos los mismos genes, codificando para aumentar las defensas antioxidantes, como el regulón SoxRS de *E.coli* que contiene el gen de la SOD, endonucleasa IV y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y el activador OxyR que controla la expresión de catalasa, glutatión reductasa y la subunidad C de la alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) (identificada como integrante de la familia de peroxirredoxinas, con actividad peroxinitrito reductasa) en *E.coli* y en *S. typhimurium* (197,198).

Sistemas detoxificadores en *Trypanosoma cruzi*

La detoxificación de oxidantes en tripanosomatídeos está a cargo de 5 peroxididasas, que obtienen los equivalentes de reducción a partir de la forma reducida de la tripanotona (dihidrotriptanotona, T(SH)₂), principal tiol de bajo peso molecular en estos parásitos (Fig. 1.8), vía la triparredoxina (TPN, proteína con homología a la tioredoxina de mamíferos).

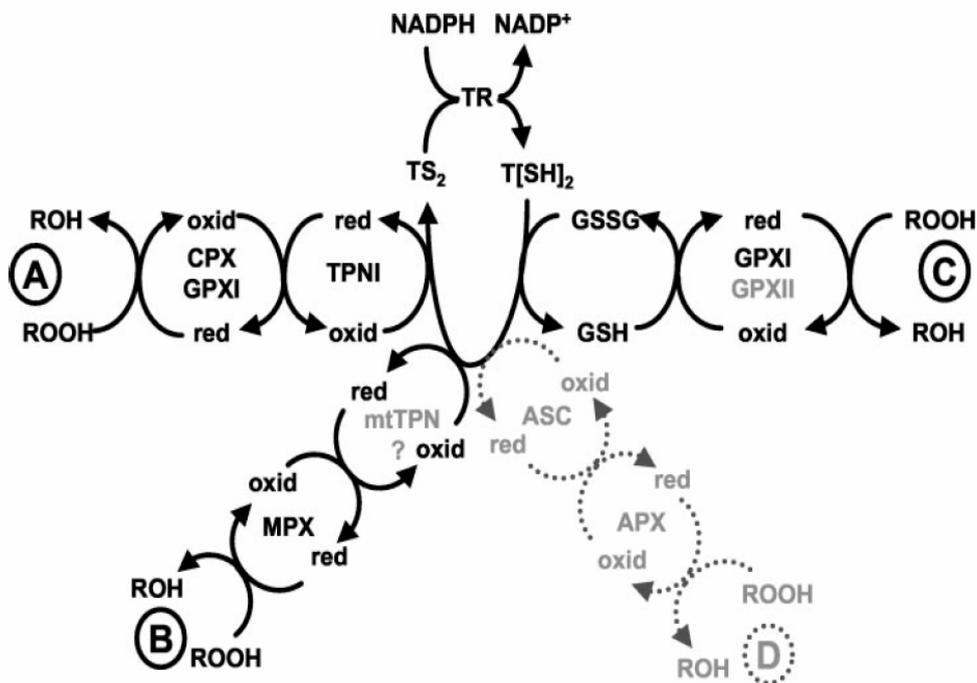


Fig. 1.8 Metabolismo de peróxidos en *T. cruzi*. La tripanotona disulfuro (TS₂) es reducida a T(SH)₂ por la tripanotona reductasa (TR) a expensas del NAD(P)H. La T(SH)₂ puede ceder los equivalentes de reducción a diferentes sistemas enzimáticos dependientes de triparredoxina (TPN) o de glutatión (GSH). CPX (A) y MPX (B) utilizan el poder reductor de la TPN para la reducción de diferentes peróxidos (ROOH) a sus respectivos alcoholes (ROH). En los sistemas que utilizan las GPXI (A y C) (citosol y glicosoma) y GPXII (C) (retículo endoplásmico) el glutatión oxidado (GSSG) es reducido de manera no-enzimática por la T(SH)₂ siendo el GSH y/o la TPN los que ceden los equivalentes de reducción. Para la ascorbato peroxidasa (APX) (D) el ascorbato es reducido de forma no enzimática por la T(SH)₂.

Extraído de Wilkinson et al, 2003.

Estos sistemas (representados en la Figura 1.8) son las triparredoxina peroxididasas mitocondrial (MPX) y citosólica (CPX) (199); la ascorbato peroxidasa del retículo endoplásmico (APX) (200) y las glutatión peroxididasas (GPXI y II) presentes en el glicosoma, citosol y retículo, que a diferencia

de las de mamíferos, carecen de selenio en su sitio activo (201). La forma oxidada de la T(SH)₂, la tripanotiona disulfuro (TS₂) es reducida por la flavoenzima tripanotiona reductasa (TR) a expensas del poder reductor del NADPH.

Recientemente se han realizado estudios de la expresión proteica diferencial entre los distintos estadios del parásito. Se ha identificado así, que en el pasaje a la forma infectiva tripomastigota (metacicloogénesis) aumenta la expresión de enzimas y sustratos antioxidantes, entre los que se encuentran la ascorbato peroxidasa (APX), las peroxirredoxinas citosólica y mitocondrial (MPX), la Fe-superóxido dismutasa mitocondrial (TcSODA), además de triparredoxina (TPN) y dihidrotripanotiona T(SH)₂ (12). El aumento en los componentes antioxidantes del parásito le sirve probablemente para enfrentar en el nuevo estadio la exposición a oxidantes, como ocurre durante la interacción con las células del sistema inmune del huésped.

De todas las peroxidases de *T. cruzi*, la única que se ha demostrado que tiene actividad catalítica para la descomposición del peroxinitrito *in vitro* es la CPX, con una constante determinada para esa reacción de $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (196).

1.3 Interacción macrófago-*Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario flagelado causante de la enfermedad de Chagas que sufre numerosos cambios morfológicos y metabólicos durante su ciclo de vida. La forma no infectiva (epimastigota) prolifera en el intestino del insecto vector (*Triatoma infectans*) y se diferencia a la forma tripomastigota metacíclico en el sector terminal del intestino. El tripomastigota metacíclico, forma infectiva para el huésped vertebrado, invade las células del huésped, principalmente macrófagos, donde se diferencia a la forma replicativa intracelular, el amastigota. Luego de varios ciclos replicativos, se generan acúmulos de amastigotas dentro de la célula, comienza la transformación a la forma tripomastigota circulante y cuando se produce la muerte de la célula huésped, los tripomastigotas salen al medio extracelular, infectando células adyacentes o accediendo a través de la circulación sistémica a otros tejidos (en particular, corazón, tracto digestivo y sistema nervioso) (Figura 1.9) (202,203).

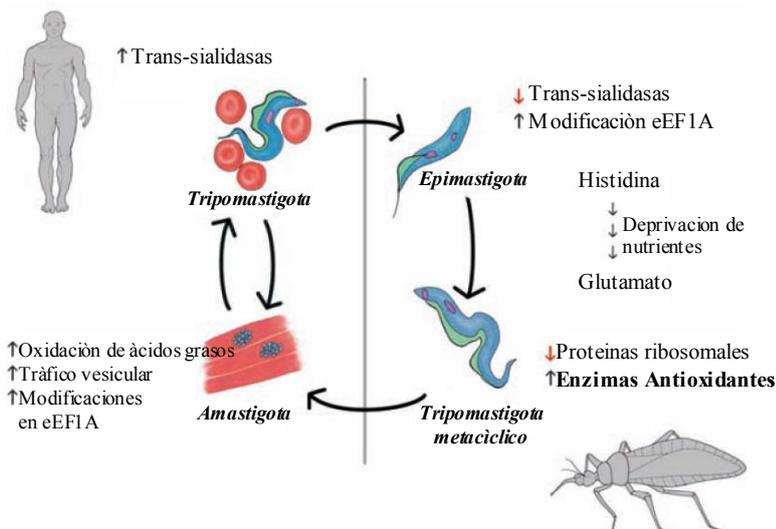


Fig. 1.9 Ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*
 El epimastigota se replica en el intestino del insecto y se diferencia a la forma infectiva, tripomastigota metacíclico. En el huésped vertebrado el tripomastigota metacíclico infecta células (en particular macrófagos), se transforma a la forma amastigota (intracelular) y a la forma tripomastigota circulante, que puede ser ingerida por el insecto completando el ciclo. Se representa la expresión diferencial de vías metabólicas en cada estadio del parásito. Adaptado de Atwood et al., 2005(12,13)

Una característica de la infección por *Trypanosoma cruzi* es la destrucción de las células del huésped, con daño en los tejidos vitales dependiente del reclutamiento de células inflamatorias, que contribuyen con la defensa eliminando parásitos, con el costo de dañar los tejidos del propio huésped (204,205); esto se ha evidenciado en el tejido cardíaco donde se encuentran, en fase crónica, zonas de necrosis y fibrosis, rasgos característicos de procesos inflamatorios crónicos. En

esas lesiones crónicas, se ha detectado la presencia de parásitos (206,207) indicando que eso es lo que determina el mantenimiento del proceso (208).

En el foco inflamatorio los linfocitos T activados producen citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- γ y TNF- α que conducen a la activación de las otras células del sistema inmune presentes en el lugar, en particular neutrófilos y macrófagos.

Existen numerosos trabajos que estudian la interacción de los diferentes estadios del *Trypanosoma cruzi* con las células del huésped mamífero y presentan evidencias de la participación en el proceso de componentes de ambos tipos celulares, con el desencadenamiento de cascadas de señalización complejas tanto en el parásito como en la célula huésped (209-211). Existen diferencias en los mecanismos usados para la invasión por las formas tripomastigotas metacíclico y circulante (212), de los usados por la forma amastigota (213,214). Los tripomastigotas infectan en un proceso en el que se pueden identificar dos pasos; el primer paso es la adhesión del parásito a la membrana de la célula huésped, mediado por los motivos glicosídicos expuestos en las superficies de ambas células (215,216). En la segunda etapa el parásito es internalizado y los mecanismos involucradas en esta etapa son diferentes entre las células no fagocíticas y las fagocíticas. En definitiva, las formas infectivas del parásito presentan distinta interacción con cada una de las células del huésped. Existe mucha información respecto a la invasión de células no fagocíticas en la literatura, pero nos centraremos en lo que ocurre en la interacción del *T.cruzi* con el macrófago.

1.3.1 Invasión del macrófago por *T.cruzi*

Generalmente se acepta que el sistema inmune juega un rol importante en el control de las enfermedades parasitarias, y en el caso de la enfermedad de Chagas, existen evidencias basadas en que deficiencias en la respuesta celular o humoral contribuyen con el progreso de la enfermedad.

Los macrófagos se encuentran entre las primeras células en ser infectadas por *T.cruzi*, lo que implica la importancia de analizar la capacidad de estos de controlar ese primer paso de la infección (4,217).

La etapa de internalización del *T.cruzi* ocurre con la formación de una vacuola fagocítica que contiene al parásito, en un proceso dependiente de la polimerización de actina localizada en los sitios de formación del fagosoma (218). La infección es inhibida por citocalasina D, droga que promueve la depolarización de la actina (219).

Los primeros eventos que ocurren en la célula infectada luego de la internalización comprenden la fosforilación de tirosinas mediada por quinasas de tirosinas proteicas (PTKs)(220) y la quinasa del 3-fosfatidilinositol (PI 3-K)(221,222), que son reclutadas en el sitio de ingreso del parásito y colocalizan con los filamentos de actina (223). La PI 3-K está involucrada en muchos de los procesos que se desencadenan en la fagocitosis, como la activación de GTPasas pequeñas que regulan la dinámica de la actina F (224), la movilización de lisosomas y su fusión con el fagosoma generado (225) y la activación de la NADPH oxidasa, siendo la principal responsable de la fosforilación de las tirosinas de la subunidad citosólica p47^{PHOX}, que genera su migración a la membrana para formar la oxidasa activa (226).

En macrófagos infectados con *T.cruzi* existe inicialmente inducción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12 y TNF- α), mediado por glicoproteínas tipo mucinas del parásito (227) a través de la activación de las vías de NF- κ B y MAPK (228). La iniciación de estas cascadas de señalización depende de la activación a través del receptor TLR2 de la familia de receptores tipo Toll (TLRs) (53). En la activación del TLR2 por LPS se ha descrito que luego de la modulación pro-inflamatoria inicial, se induce un estado de tolerancia en el macrófago, reprogramando sus funciones con una inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, IL-12 y TNF- α (229).

En células no fagocíticas ha sido descrita una tercera etapa en la infección, que se conoce como la evasión del parásito. Si bien esto no ha sido estudiado rigurosamente en células fagocíticas es probable que el parásito que sobrevive a los mecanismos efectores iniciales, pueda también en

estas células escapar del fagosoma. La evasión en células no fagocíticas consiste en una degradación de la membrana de la vacuola, proceso que es dependiente de la acidificación del contenido de la vacuola (230). El parásito secreta una proteína que está inmunológicamente relacionada con el componente C9 de la cascada del complemento y que posee la capacidad (a pH bajos) de constituirse como un poro en la membrana de la vacuola, provocando su disrupción (231).

1.3.2 Producción de superóxido durante la infección con *Trypanosoma cruzi*

Las cascadas de señalización que se activan durante la interacción del macrófago con *T.cruzi* (como la activación de PKC), son las que están involucradas en la activación de la NADPH oxidasa. Se han realizado pocos estudios en cuanto a la formación de superóxido durante la fagocitosis de estos parásitos y esos trabajos se realizaron en condiciones diferentes, con resultados contrapuestos.

Docampo y col. estudiaron la interacción de *T.cruzi* con neutrófilos expuestos a epimastigotas y tripomastigotas opsonizados, evaluando la producción de superóxido por el aumento del consumo de oxígeno, la liberación de H₂O₂ y la formación de DMPO-OH. Los autores concluyeron que la interacción con el parásito desencadenaba estallido respiratorio y que la producción de O₂^{•-} era mayor en la interacción con la forma epimastigota que con la tripomastigota (232). La interacción con macrófagos fue evaluada en dos trabajos en que los resultados fueron contrapuestos; con células obtenidas a partir de bazo de ratón (mayoritariamente macrófagos), se determinó la producción de O₂^{•-} por quimioluminiscencia del luminol, obteniendo respuestas similares con epimastigotas y tripomastigotas opsonizados (233). Sin embargo, unos años antes, Mc Cabe y col planteaban la incapacidad de los macrófagos de generar oxidantes durante la interacción con los parásitos, medidos como producción de H₂O₂ (234).

La formación de ONOO⁻ durante la fagocitosis depende de que la NADPH oxidasa se active y de la cantidad de O₂^{•-} generado por esta activación. Por lo tanto es importante definir en particular la capacidad de la forma tripomastigota de inducir respuesta en la célula huésped.

1.3.3 Producción de óxido nítrico durante la infección con *Trypanosoma cruzi*

El control de la replicación de *T.cruzi* intracelular y de la carga parasitaria en ratones infectados vinculado a un aumento del IFN- γ ha sido descrito en numerosos trabajos (235-237). Uno de los efectos generados por el aumento del IFN- γ es la inducción de la iNOS en células fagocíticas, y el rol del [•]NO producido por células expuestas a citoquinas en el control de la infección fue evidenciado también en modelos celulares y animales. Las aproximaciones metodológicas fueron diversas, con el uso de análogos de arginina como inhibidores de la iNOS, que bloqueaban la actividad tripanocida de los macrófagos (238) o exacerbaban la infección en ratones (239,240). También se realizaron estudios en ratones deficientes en el receptor para IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}) o en la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS^{-/-}), siendo ambas cepas altamente susceptibles a la infección con *T.cruzi* evidenciado por las elevadas parasitemias y los daños observados en los tejidos (241). La presencia de la iNOS (242) y de nitrotirosina (243) en cultivos o tejidos infectados ha sido demostrada y la colocalización de estos con los parásitos indica que no habría un efecto sistémico ni local durante la infección que implique una regulación negativa de la actividad de la enzima *in vivo*.

Sin embargo, con la forma no infectiva (epimastigota) se ha observado la inhibición de la inducción de la iNOS con parásitos enteros y también con la cruzipaína (cisteína proteasa lisosomal presente en los epimastigotas a una concentración apreciablemente mayor que en los otros estadios del parásito (244)) purificada a partir de estos, por lo cual se plantea que sea esta proteína la responsable de la inhibición (245,246). Con la forma tripomastigota se observa en cambio que la producción de [•]NO no se afecta durante la infección, observándose la inducción de la proteína y niveles de [•]NO elevados tanto en cultivos celulares como en ratones infectados (247-249). En macrófagos de cultivo, la infección con *T.cruzi* potencia el efecto del IFN- γ , a través de la

activación de las vías NF- κ B y STAT1 α , además de vías involucradas en aumentar la estabilidad del mRNA (como ERK1/ERK2) (249).

Toxicidad mediada por \cdot NO y $O_2^{\cdot-}$

La producción de \cdot NO se correlaciona con la resistencia de las distintas cepas de ratones a la infección, y el uso de inhibidores de la iNOS lleva a un dramático aumento de la parasitemia y la mortalidad. Existen numerosos reportes que muestran que los ratones deficientes en iNOS son muy susceptibles a la infección (241,250); por otro lado Cummings y col. reportaron parasitemias similares en ratones deficientes en iNOS y la cepa salvaje, adjudicándole el rol de control de la infección a las citoquinas proinflamatorias a través de mecanismos independientes de \cdot NO (251).

Las especies reactivas del O_2 han sido implicadas en el control de la infección desde hace muchos años en que Bloom y col. desarrollaron una clona deficiente en NADPH oxidasa a partir de la línea de macrófagos J774, observando una infección mayor en esas células que en la línea parental (252,253).

Por último, existen evidencias de la formación de nitrotirosina durante la infección con *T. cruzi*; se detectó un aumento de la nitrotirosina en proteínas plasmáticas y también un aumento de la nitrotirosina en miocardio de los ratones infectados, tejido preferencial para el mantenimiento de la infección en la etapa crónica (243,254). Si bien la nitración no es una huella específica de la presencia de ONOO $^-$, si lo es para el \cdot NO y el $O_2^{\cdot-}$, ya que la nitración en sistemas biológicos depende de un aumento de ambas especies y puede ser debido a la formación de ONOO $^-$, o a la actividad de una peroxidasa en presencia de NO $_2^-$ y H $_2$ O $_2$. Las fuentes de \cdot NO pueden ser además de las células inflamatorias, la iNOS de los propios miocitos con la inducción dependiente de estímulos Th1; una fuente posible de $O_2^{\cdot-}$, alternativa a la NADPH oxidasa que como vimos produce grandes cantidades durante un tiempo limitado, pueden ser las mitocondrias de las células del huésped y también la del parásito, ya que el aumento de \cdot NO puede inhibir la cadena respiratoria con un aumento local del $O_2^{\cdot-}$, y por lo tanto del ONOO $^-$ (248,255).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

Estudiar la difusión y toxicidad de los oxidantes derivados de macrófagos activados

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Estudiar la reacción del radical carbonato con el 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO)
 - 2.2.1.1 Determinar la constante de velocidad de la reacción del radical carbonato con DMPO
 - 2.2.1.2 Evaluar el uso del DMPO como técnica de detección de radical carbonato en sistemas biológicos
- 2.2.2 Estudiar la modulación de la activación macrofágica en la interacción con *Trypanosoma cruzi*
 - 2.2.2.1 Evaluar la activación de la NADPH oxidasa en la interacción con epimastigotas y tripomastigotas
 - 2.2.2.2 Evaluar la inducción de la óxido nítrico sintasa en la interacción con epimastigotas y tripomastigotas
- 2.2.3 Estudiar la difusión y la toxicidad del peroxinitrito derivado de macrófagos sobre *Trypanosoma cruzi*
 - 2.2.3.1 Evaluar el efecto del CO₂ en la toxicidad del peroxinitrito sobre *Trypanosoma cruzi*
 - 2.2.3.2 Evaluar la toxicidad del peroxinitrito derivado de macrófagos sobre *Trypanosoma cruzi*
 - 2.2.3.3 Evaluar el rol de las triparredoxina peroxidases de *T.cruzi* en la protección al daño oxidativo generado por macrófagos activados

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Generación química de oxidantes

3.1.1 Síntesis y cuantificación de ONOO⁻

El ONOO⁻ es sintetizado en nuestro laboratorio en un reactor de flujo detenido a partir de peróxido de hidrógeno y de nitrito de sodio en medio ácido según ya ha sido descrito en trabajos anteriores del equipo (90,115). La solución es conservada a -80°C. La concentración de ONOO⁻ es determinada espectrofotométricamente, midiendo su absorbancia a 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). (115); el exceso de peróxido de hidrógeno se elimina con el agregado de dióxido de manganeso.

3.1.2 Producción de [•]OH

La generación de [•]OH se realizó por medio de la reacción de Fenton con hierro ferroso (Fe^{II}) quelado con DTPA (Fe^{II}-DTPA), con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (77). Las soluciones de Fe^{II} (10 mM) fueron preparadas en el día, disolviendo sulfato de hierro (II) de amonio en 2.5 mM de ácido sulfúrico. La concentración de H₂O₂ fue determinada espectrofotométricamente usando el coeficiente de extinción de 43.6 M⁻¹.cm⁻¹ a 240 nm. La reacción fue iniciada con el agregado de Fe^{II} bajo agitación sobre la mezcla de H₂O₂ y DTPA preparada en buffer fosfato 50 mM.

3.1.3 Actividad peroxidásica de la CuZn-SOD

La reacción se inicia con el agregado de H₂O₂ al preparado de CuZn-SOD (60 μM), en presencia de DMPO, o de tirosina según el ensayo. Incubaciones de 20 minutos se realizaron en buffer fosfato 50 mM, pH 7.4, en presencia de distintas concentraciones de HCO₃⁻ para detectar los productos (DMPO-OH, ditirosina) derivados de la formación de CO₃^{-•} por este sistema (9).

3.1.4 Dadores de óxido nítrico

Los dadores de [•]NO utilizados son los complejos [•]NO-aminas estabilizados por pH (NOC de Dojindo Molecular Technologies), que se descomponen liberando [•]NO por protonación. Existen compuestos con distintas vidas medias a 37°C y pH 7.4, como el NOC7 (5 min.) y NOC18 (21 horas), que fueron preparados como soluciones 10- 100 mM en NaOH 1 mM. La liberación de [•]NO por estas sustancias es determinada espectrofotométricamente por la técnica de oxidación de hemoglobina a dos longitudes de onda: 577 nm (desaparición de la oxihemoglobina) y 630 nm (aumento de la metahemoglobina).

3.1.5 Producción de O₂^{-•} y H₂O₂

Utilizamos como sistema generador de O₂^{-•} la enzima xantino oxidasa (XO) que cataliza la oxidación de hipoxantina (HX) y xantina en presencia de O₂ a ácido úrico. El O₂ funciona como aceptor de 1 o 2 electrones siendo reducido a O₂^{-•} y H₂O₂ respectivamente. La actividad de la enzima fue monitoreada espectrofotométricamente midiendo la producción de ácido úrico a 292 nm ($\epsilon = 11 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y la determinación de la producción de O₂^{-•} se realizó por el ensayo de reducción de citocromo c³⁺ ($\epsilon_{550} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.2 Técnicas de detección.

3.2.1 Síntesis y detección de 3,3'-ditirosina. Para generar la ditirosina usamos la peroxidasa de rábano (0.2 mg/ml de HRP), en una mezcla que contiene L-tirosina (0.5 mM), y H₂O₂ 500 μM en buffer fosfato (50 mM) pH 7.4 incubándolos 20 min a 25° C. La muestra obtenida luego de la incubación fue centrifugada usando tubos Centricon (con un corte de peso molecular de 5000 Da) para separar la enzima de los productos (256). La concentración de ditirosina obtenida por acción de la HRP o en los experimentos con el sistema CuZnSOD/H₂O₂/HCO₃⁻, fue determinada espectrofotométricamente a 315 nm usando coeficientes de extinción reportados en la literatura: 5700 M⁻¹.cm⁻¹ a pH 7.4 y 8380 M⁻¹.cm⁻¹ a pH 9.9. (257).

3.2.2 Estudios de HPLC

La formación de dímeros (3,3'-ditirosina) y de hidroxiaromáticos (3,4-dihidroxifenilalanina) a partir de la oxidación de tirosina por [•]OH o por CO₃^{-•} fueron determinados por HPLC de fase reversa utilizando como fase móvil un gradiente de fosfato de potasio 40 mM pH 3 y metanol y como fase estacionaria una columna C18. La detección de tirosina, 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y 3,3'-

ditirosina fue realizada por absorbancia a 280 nm y por fluorescencia ($\lambda_{exc} = 280$ nm y $\lambda_{em} = 410$ nm) con la utilización de compuestos estándares como referencia.

3.2.3 Estudios de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica

La resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una técnica que permite la detección directa de las moléculas que poseen un momento neto de espín electrónico. Los radicales libres cumplen esta condición, por lo que es la única técnica que permite su detección directa. El EPR indirecto, usando moléculas atraparoras de spin (spin traps), es un herramienta que permite estudiar la formación de radicales libres, en particular de los radicales centrados en el oxígeno, que no son detectables por EPR directo debido a sus cortas vidas media. En nuestro trabajo usamos como atrapador de spin al 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), una nitrona capaz de atrapar radicales derivados del O_2 , como $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ y $CO_3^{\cdot -}$, generando por distintos mecanismos el producto hidroxilado del DMPO, el DMPO-OH, que posee una señal característica ($\alpha_N = \alpha_H = 14.9$ G).

Los valores de concentración de DMPO-OH fueron obtenidos fueron determinados a partir de la doble integral del espectro, usando como calibración cada día espectros de concentraciones conocidas un nitróxido estable, el 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil (TEMPOL) determinadas por espectrofotometría ($\epsilon_{240nm} = 1440$ M⁻¹.cm⁻¹) en las mismas condiciones instrumentales.

Los experimentos de EPR fueron realizados en un espectrómetro Bruker EMX. Luego de realizada la mezcla correspondiente la muestras fueron transferidas a una celda plana de 200 μ l adquiriendo inmediatamente el espectro. Las condiciones instrumentales se indican para cada experimento en la sección resultados. Todos los experimentos fueron realizados a 21°C. λ

Detección de DMPO-OH generados por células: Los experimentos fueron realizados con monocapas de macrófagos previamente sembrados en placas de 6 pocillos. La inducción de la iNOS fue realizada 5 horas antes de las medidas con IFN- γ y LPS (como se indica en la sección correspondiente) en DMEM. Luego de las 5 horas se lavaron los cultivos y se cambió el medio de cultivo por dPBS adicionado con glucosa (1g/l), L-arginina (1 mM) y DMPO (100 mM). La activación de la NADPH oxidasa (con PMA (2 μ g/ml) o con *T.cruzi*) se realizó en cada condición 15 minutos antes de levantar el sobrenadante para transferirlo a la celda del EPR.

3.2.4 Estudios de radiólisis de pulso

La determinación de las constantes de velocidad de reacción del radical $CO_3^{\cdot -}$ presentados en esta tesis fue realizada por la técnica de radiólisis de pulso gracias a la colaboración con Lisa Folkes y Peter Wardman del Gray Cancer Institute, Mount Vernon Hospital en Northwood, Middlesex, UK. Utilizaron un acelerador lineal de 6 MeV, generando pulsos de 3.3 Gy. Los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. El $CO_3^{\cdot -}$ fue generado por radiólisis de soluciones conteniendo 90 mM Na_2CO_3 , 10 mM $NaHCO_3$ a pH 10.7 previamente saturadas con N_2O . Las constantes de velocidad de las reacciones del $CO_3^{\cdot -}$ con DMPO y con DTPA-Fe^{II} se obtuvieron observando a 600 nm el decaimiento del $CO_3^{\cdot -}$ en presencia de concentraciones crecientes de la molécula en estudio.

3.3 Cultivos celulares.

3.3.1 Cultivo y activación de macrófagos

La línea celular J774A.1 se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC). Es derivada de un reticulosarcoma murino de la cepa BALB/c, inducida bajo forma de ascitis por Ralph y col en 1975, comparte con los macrófagos primarios gran parte de sus características, tal como la fagocitosis, síntesis y secreción de lisozima y proteasas neutras y expresión de receptores Fc y C3.

El cultivo de esta línea se realizó en 90% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 1.0 g/l de glucosa, 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomycin y 10 % suero bovino fetal inactivado por calor. Se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C, 5% CO_2 , en frascos de cultivo de 25cm².

Los experimentos se realizaron en Dulbecco's PBS (dPBS: 0.9 mM $CaCl_2$, 0.5 mM $MgCl$, 2.7 mM KCl , 1.45 mM H_2PO_4 , 137 mM $NaCl$, 8.1 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) suplementado con 5.5 mM glucosa y 1 mM L-arginina o en el medio de cultivo DMEM según se indica en cada caso en la sección de resultados.

Activación de la NADPH oxidasa. Para activar la NADPH-oxidasa existen dos posibles mecanismos, uno mediado por receptores (estímulo fagocítico) y uno independiente de receptores. En nuestro trabajo fueron testeados los dos tipos de mecanismos, para el independiente de receptores se utilizó PMA preparado en DMSO (1mg/ml) y conservado a -20° C. La concentración utilizada en los experimentos fue de 2 μ g/ml. Controles con la misma cantidad de DMSO fueron realizados y no afectaban las determinaciones realizadas. Para la activación mediada por receptores se usó zimósán opsonizado con suero humano fresco (258).

Inducción de la iNOS e inhibidores. Los macrófagos fueron plaqueados para los experimentos en placas de cultivo o en portas. Cuando la monocapa estaba cercana a la confluencia, se exponían a los inductores de la iNOS, IFN- γ (300-500 U/ml) y LPS (3 μ g/ml) durante 5 horas (21).

Como inhibidores de la producción de NO se usaron : N-monometilarginina (N-MMA), la aminoguanidina (AG) y el N-(3-aminometil) benzil)acetamidina (1400 W).

3.3.2 Cultivo de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Los epimastigotas de las cepas Tulahuen-2 y CL-Brener 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 suero bovino fetal inactivado por calor (10%), glucosa (0.3 g/l), estreptomycin (0.2 g/l) y penicilina (200,000 U/l). Para los experimentos de exposición a oxidantes y a macrófagos los parásitos fueron cosechados por centrifugación (800xg) en la fase exponencial del crecimiento (5 días), lavados tres veces en dPBS y resuspendidos en la densidad celular necesaria. El número de parásitos se determinó por conteo en la cámara de Neubauer.

*Opsonización de *T.cruzi*.* Para el estudio de la activación de NADPH oxidasa con la forma epimastigota se opsonizaron incubando durante 15 minutos a 30° C a los parásitos con 10% de suero obtenido de ratón inmunizado con epimastigotas viables de *T.cruzi* (232).

Cultivo de las cepas de epimastigotas sobreexpresantes de Cpx, Mpx y Apx.

Las cepas sobreexpresantes de las triparredoxina peroxidasa citosólica (Cpx) y mitocondrial (Mpx) y de la ascorbato peroxidasa de retículo endoplásmico (Apx) fueron desarrolladas por el laboratorio del Dr. Shane Wilkinson de la London School of Hygiene and Tropical Medicine (Reino Unido) (199). Son cepas que fueron transfectadas con el vector pTEX-9E10 que contiene en el extremo 3' de cada gen insertado el epitope 9E10 de la proteína humana c-myc, lo que permite identificarlas y confirmar la sobreexpresión por Western-blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-cmyc 9E10. La sobreexpresión de las enzimas se obtiene por agregado al medio de cultivo de geneticina (G418, 200 μ g/ml).

3.3.3 Cultivo de células epiteliales: mantenimiento de tripomastigotas de *T.cruzi*

La forma infectiva de *T.cruzi* se mantuvo infectando células no fagocíticas. Para eso usamos las células Vero, una línea celular de estirpe epitelial derivada de riñón de mono, obtenida de ATCC.

La monocapa de células Vero son expuestas a los tripomastigotas (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 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.

3.3.4 Metaciclologénesis de *Trypanosoma cruzi* inducida químicamente

La transformación de las formas epimastigotas a la forma tripomastigota metacíclico se logra por incubación en medios definidos. Esta técnica permite obtener la forma infectiva en menos tiempo y en número generalmente mayores que a través de la infección de células Vero. Los epimastigotas del 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. En TAU se incubaron 2 horas en estufa a 28° C y luego transfirieron a frascos de cultivo y resuspendidos en TAU3AAG en una densidad de $3-5 \times 10^6$ cél/ml, medio en el que se incubaron durante 72-96 horas

a 28° C. El medio TAU3AAG consiste en el TAU adicionado con prolina (10 mM), L-glutamato (50 mM), L-aspartato (2 mM) y glucosa (10 mM). Durante la transformación parte de los parásitos mueren (aproximadamente 30-40%) y los que se transforman se adhieren a la superficie del frasco de cultivo (259).

Realizamos transformaciones químicas de las distintas cepas de epimastigotas con las que trabajamos, Tulahuén-2, CL-Brener y CL-Brener que sobreexpresan las peroxididasas (CPX, MPX y APX).

Los tripomastigotas metacíclicos obtenidos por esta técnica fueron usados en la infección de células Vero, confirmando su transformación a forma infectiva (Fig.3.1) y para los experimentos de infección en macrófagos y la exposición a oxidantes *in vitro*.

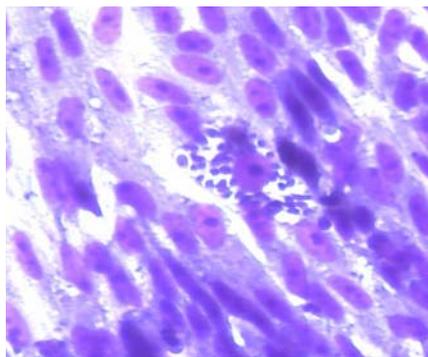


Fig 3.1. Evidencia de la transformación química de epimastigotas en tripomastigotas metacíclicos: infección en células Vero.

Los epimastigotas de *T. cruzi* (Tul-2) se diferenciaron al estadio *tripomastigota metacíclico* en medio químico definido. Infección realizada sobre células Vero (20 parásitos/cél). Luego de 4 días se tiñeron con Giemsa para la visualización de los núcleos. Foto obtenida a un aumento de 60X.

3.4 Estudios de toxicidad inducido por oxidantes en *Trypanosoma cruzi*

3.4.1 Exposición a oxidantes

Las formas epimastigotas y tripomastigotas de *T.cruzi* fueron expuestas a oxidantes para evaluar la toxicidad de las distintas especies. Los oxidantes utilizados fueron: $O_2^{\cdot-}$ (XO/ HX), $\cdot NO$ (NOC 18) y $ONOO^-$, en ausencia y en presencia de HCO_3^- en el medio para evaluar los efectos del $ONOOCO_2^-$ y por lo tanto del $CO_3^{\cdot-}$. Las exposiciones fueron realizadas en suspensiones con una densidad de 3×10^8 céls/ml (salvo en los experimentos donde se indica otra cosa) en dPBS con 1g/l de glucosa, pH 7.4. En el caso de la exposición a $ONOO^-$, se realizó adicionando bolos de concentración conocida a las suspensiones bajo agitación.

3.4.2 Incorporación de [3H] Timidina

La incorporación de timidina marcada se usa para determinar los efectos sobre la velocidad de proliferación del cultivo. Una alícuota de los epimastigotas (5×10^6 células) previamente expuestos a las diferentes condiciones experimentales (oxidantes o macrófagos activados) se incubaron en 200 μ l de BHI con 1 μ Ci de [3H] Timidina durante 18 horas a 28°C (260). Las células luego fueron cosechadas sobre filtros de fibra de vidrio. La radiactividad en los filtros corresponde a la que habían incorporado las células en cada condición, y se midió en un contador de centelleo Trilux 1450 Microbeta, de Wallac. Para cada muestra se realizaron tres determinaciones independientes.

3.4.3 Oxidación de Dihidrorodamina intracelular

La dihidrorodamina (DHR) es una sonda no fluorescente que difunde libremente atravesando la membrana celular y es oxidada a la forma fluorescente rodamina 123 (RH). La RH 123 (λ_{exc} = 500 nm y λ_{em} = 529 nm) es una molécula con carga positiva lo que mantiene al fluoróforo localizado en el interior de la célula (261).

Los epimastigotas y tripomastigotas fueron incubados 30 minutos en una solución de DHR 50 μ M en dPBS, y lavados luego dos veces en dPBS. La oxidación del fluoróforo intracelular fue medida en continuo o como punto final según el experimento, en el lector de fluorescencia en placas con los filtros λ_{exc} = 485 nm y λ_{em} = 520 nm (Fluostar, BMG Labtechnologies).

3.4.4 Liberación de Uridina

Los tripomastigotas de *T. cruzi* (2×10^8 céls/ml) obtenidos por transformación química fueron incubados con $10 \mu\text{Ci/ml}$ de $[5,6-^3\text{H}]$ uridina en TAU3AAG durante 24 horas a 28°C .

Liberación de $[^3\text{H}]$ uridina durante la infección a macrófagos. Los macrófagos fueron infectados con los tripomastigotas precargados con $[^3\text{H}]$ uridina, en una relación de 10 parásitos/macrófago. Inmediatamente de agregados se sincronizó la infección por centrifugación de las placas (5 min., $800 \times g$). A los 30 minutos se lavó el cultivo conservando el sobrenadante de infección (S1) para el cálculo de radiactividad total de cada condición. Se realizaron tres lavados con PBS de los pocillos para descartar parásitos no internalizados y se incubaron nuevamente en DMEM. Luego de las dos horas de infección se tomó el sobrenadante de los pocillos (S2), y se despegaron las células usando un buffer de lisis (céls), determinando la radiactividad en ambas fracciones.

Cada sobrenadante (S1 y S2) y las células en buffer de lisis (céls) (0.5 ml) se mezclaron con 3 ml de líquido de centelleo en viales de 5 ml y se midieron en un contador de centelleo Trilux 1450 Microbeta, de Wallac.

La estimación de la lisis durante la infección en macrófagos se calculó viendo el porcentaje de la radiactividad total representado en la fracción S2.

Liberación de $[^3\text{H}]$ uridina por tripomastigotas expuestos a oxidantes. Los parásitos precargados con $[^3\text{H}]$ uridina fueron expuestos a flujos de $\cdot\text{NO}$ y de $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante 1 hora o a bolos de ONOO^- . Luego de la exposición se centrifugaron las células y se determinó la radiactividad del precipitado y del sobrenadante para cada condición, estimando la lisis con el cálculo del porcentaje representado por el sobrenadante en el total (obtenido de la suma del sobrenadante y el precipitado celular).

3.5 Detección de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ derivados de macrófagos.

3.5.1 Detección de $\cdot\text{NO}$.

Técnica de Griess. La producción de $\cdot\text{NO}$ se determinó usando la técnica colorimétrica de Griess, que detecta el nitrito (NO_2^-), producto estable de oxidación del $\cdot\text{NO}$, que se acumula en los sobrenadantes del cultivo (262).

El reactivo de Griess se preparó mezclando en el momento volúmenes iguales de una solución 0.1 % (p/v) de N-naphthylethylenediamina en 60 % v/v de ácido acético glacial en agua desionizada y una solución 1.0 % de sulfanilamida en 30 % v/v de ácido acético glacial en agua desionizada.

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-naphthylethylenediamina para dar el diazo producto coloreado que absorbe a 540 nm.

La mezcla que utilizamos es de 1/3 de muestra y 2/3 de reactivo, se incubaron 10 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm, usando para determinar la concentración de NO_2^- una curva de calibración entre 0 y $100 \mu\text{M}$.

Oxidación de 4,5-diaminofluorescein diacetato (DAF-2DA). Para poder evidenciar la generación de $\cdot\text{NO}$ en las primeras horas después de la inducción usamos una sonda fluorescente, el 4,5-diaminofluorescein diacetato (DAF-2DA) (Invitrogen), debido a que presenta una mayor sensibilidad y que nos permite la detección en continuo en el fluorímetro de placas. Luego de 5 horas de incubación con los inductores, el medio fue cambiado por una solución de DAF-2DA $10 \mu\text{M}$ en d-PBS. La detección fue realizada a 37°C en el lector de fluorescencia en placas con los filtros 485/520 (Fluostar, BMG Labtechnologies).

3.5.2 Detección de $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado por macrófagos.

Quimioluminiscencia del luminol: Los macrófagos en placas de 24 pocillos fueron incubados en dPBS con $200 \mu\text{M}$ luminol e inmediatamente de agregado el activador (PMA, zimósán, epimastigotas y tripomastigotas de *T. cruzi*) la luminiscencia fue registrada en continuo durante 90 minutos en un lector de luminiscencia en placas a 37°C . (Lumistar, BMG Labtechnologies).

Resonancia paramagnética electrónica (EPR). La formación de DMPO-OH durante la activación de la NADPH oxidasa fue descrita anteriormente en la sección de EPR.

Detección de formación de $O_2^{\cdot-}$ intrafagosomal: Reducción de NBT. Durante la fagocitosis la producción de $O_2^{\cdot-}$ por la NADPH oxidasa se realiza hacia el interior de la vacuola fagocítica (263). El azul de nitro-tetrazolio (NBT) es reducido por el $O_2^{\cdot-}$ a formazán, que precipita en el sitio de formación y tiene un color azul oscuro, lo que permite identificar fácilmente el sitio de activación de la enzima, por microscopía. Los macrófagos plaqueados en portas fueron expuestos a los tripomastigotas metacíclicos (con una relación de 20 parásitos por macrófago) en una solución de NBT (1 mg/ml) en dPBS. Luego de 15 minutos se lavaron los portas con PBS para sacar el NBT y los parásitos no fagocitados, se fijaron incubando en 4% de formaldehído en PBS durante 20 minutos y se tiñeron los núcleos con DAPI (10 μ M) durante 10 minutos. La presencia de fagosomas con precipitados de formazán fue analizada por microscopía de contraste de interferencia diferencial (Nomarski-DIC) y la colocalización de estos precipitados con núcleos de tripomastigotas fue evidenciada observando en el mismo campo la fluorescencia del DAPI ($\lambda_{exc} = 368$ nm y $\lambda_{em} = 461$ nm). El ensayo fue realizado también en macrófagos expuestos previamente al inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (50 μ M).

Reducción de Dihidroetidio durante la infección. El ensayo fue realizado en macrófagos plaqueados en placas de 24 pocillos en dPBS con 100 μ M DHE expuestos a los activadores de NADPH oxidasa (PMA, zimosán opsonizado y tripomastigotas) en ausencia y en presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (50 μ M). Luego de una hora de incubación se lavaron los pocillos y se incubó una hora más en dPBS a 37° C. La fluorescencia fue medida en el lector de fluorescencia en placas con el par de filtros: $\lambda_{exc} = 485$ nm / $\lambda_{em} = 555$ nm (Fluostar, BMG Labtechnologies).

3.5.3 Purificación de ARN, síntesis de ADN copia (ADNc) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Cultivos de macrófagos en confluencia fueron utilizados para la determinación de los niveles de ARNm de la iNOS luego de diferentes tratamientos. Se utilizaron epimastigotas y tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* en una relación 10:1 parásito/macrófago. Luego de 2-3 hrs de producida la inducción, se purificó el ARN total de macrófagos utilizando el kit de extracción y purificación PureLink™ Micro-to-Midi total ARN purification system (Invitrogen). El ARN obtenido se utilizó para la síntesis de ADN copia (ADNc) utilizando SuperScript™III First-Strand System for RT-PCR (Invitrogen). El ADNc obtenido fue usado para la determinación de los niveles de expresión de la iNOS por PCR utilizando los primers:

5'-CTAAGAGTCACCAAATGGCTCCC-3' y 5'-ACCAGAGGCAGCACATCAAAGC-3' que producen la amplificación de una región de aproximadamente 875 pares de bases de la iNOS murina. La PCR se realizó utilizando 5 μ g de ADNc a una temperatura de 58°C. Se utilizaron primers estándares para la enzima constitutiva gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) como control positivo de la técnica:

5'-CTGAGAACGGGAAGCTTGTC-3' y 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3', que amplifica una región de aproximadamente 600 pb. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 1 h a 80 V y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Los geles se registraron y se realizó la densitometría de las bandas mediante la utilización del programa Image J™. Los resultados se expresan como porcentaje de inducción respecto a la condición control.

3.6. Interacción Macrófagos- *Trypanosoma cruzi*.

3.6.1 Cocultivos macrófagos- epimastigotas.

Se realizaron dos tipos de cocultivos con la forma epimastigotas, uno en contacto directo en que los parásitos se colocan sobre la monocapa de macrófagos y el otro es un sistema de distancia fija entre los macrófagos y los epis y separados por una membrana semipermeable con un poro de 0.4 μ m (Falcon). Este sistema se trata de unos insertos que se colocan dentro de los pocillos de las placas de

cultivo. El fondo del inserto es la membrana en que se depositan los parásitos y que está a 0.8-0.9 mm del fondo del pocillo, es decir de la monocapa de macrófagos.

3.6.2 Infecciones de macrófagos con tripomastigotas.

3.6.2.1. Determinación de la infección en macrófagos por Trypanosoma cruzi.

Macrófagos plaqueados en portas, sin activar o activados con IFN- γ y LPS, fueron expuestos a tripomastigotas de las cepas CL-Brener y CPX durante 1 hora. Luego de lavados los cultivos incubaron durante 24 y 72 horas en DMEM suplementado con 10% SBF de complementado, a 37°C, 5% CO₂.

Finalizada la incubación los portas fueron fijados y permeabilizados, y se incubaron 10 min con una solución de 10 μ M DAPI (Invitrogen) en PBS, para teñir los núcleos de los macrófagos y de los parásitos internalizados.

Los preparados fueron observados por microscopía de fluorescencia (filtro UV-2A) con un aumento de 100X que permite la clara visualización de los núcleos de *T.cruzi*. Se tomaron en promedio 30 fotos de cada condición. En cada imagen se contaron el número de macrófagos y el número de parásitos. Los resultados se expresan como número de *T.cruzi*/ macrófago y son un promedio de un mínimo de 3 experimentos.

3.6.2.1. Detección de formación del fagolisosoma en macrófagos infectados con T.cruzi

Los tripomastigotas (3×10^8 céls/ml) fueron incubados 30 minutos con la sonda fluorescente 5-(6)-carboxifluoresceína diacetato (que presenta mayor número de cargas negativas que la fluoresceína, por lo que se retiene mejor dentro de la célula luego de ser desesterificada por las esterasas intracelulares). Luego de la incubación las células fueron lavadas en PBS para descartar el fluoróforo no internalizado.

Los macrófagos fueron infectados con tripomastigotas precargados con carboxifluoresceína, en presencia de 100 nM del marcador lisosomal fluorescente LysoTracker (Invitrogen). LysoTracker es una base débil que se encuentra parcialmente protonada a pH 7.0, ligada a una sonda fluorescente que se acumula en organelos ácidos probablemente debido a su protonación.

Los preparados fueron lavados luego de 1 hora de incubación. Luego de que las células fueron fijadas y permeabilizadas, se analizaron por microscopía de fluorescencia con los filtros G-2A y B-2A correspondientes a la fluorescencia de la carboxifluoresceína ($\lambda_{exc} = 492$ nm, $\lambda_{em} = 518$ nm) y del marcador lisosomal ($\lambda_{exc} = 577$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm) respectivamente.

3.6.3 Inmunocitoquímica.

Macrófagos plaqueados en portas y previamente expuestos a las distintas condiciones fueron lavados, fijados con la solución de formaldehído (3.7 % en PBS) y permeabilizados con Tritón X100 (0.1 % en PBS). Las células fueron incubadas luego en la solución de bloqueo (3% BSA en PBS) previo a la exposición a los anticuerpos primarios.

Expresión de la iNOS en macrófagos. (anti iNOS). Las células fueron incubadas durante 1 hora con una dilución 1/100 del anticuerpo anti-uNOS (Sigma). Los lavados luego de la incubación se realizaron con PBS- Tritón X100 (0.01%). Los preparados se incubaron 1 hora con anticuerpo anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 594 (Invitrogen) con $\lambda_{exc} = 590$ nm y $\lambda_{em} = 617$ nm.

Detección de la formación de polímeros de actina. Los macrófagos fueron incubados con las formas infectivas de *T.cruzi* durante 15 minutos. Luego de la fijación y la permeabilización de las células se expusieron a una solución de faloidina marcada con rodamina (faloidina-RH de SIGMA) 1/100 en PBS, durante 20 minutos. Luego de 3 lavados con PBS, los portas fueron montados con un gel de montaje para preparados fluorescentes (Crystal mount, de Fisher Scientific).

Localización de sobreexpresantes fagocitados. En la infección con tripomastigotas sobreexpresantes de las peroxirredoxinas evaluamos la presencia de la enzima sobreexpresada con el anticuerpo monoclonal anti c-myc (Santa Cruz Biotechnology). Incubamos los preparados durante 1 hora con una dilución del anticuerpo 1/100 en solución de bloqueo. Como anticuerpo

secundario usamos el anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) con $\lambda_{exc} = 495$ nm y $\lambda_{em} = 519$ nm.

Detección de 3'-nitrotirosina. Las células fueron incubadas durante 1 hora con una dilución 1/100 del anticuerpo anti-NO₂Tyr en la solución de bloqueo. Los lavados luego de la incubación se realizaron con PBS- Tritón X100 (0.01%). Los preparados se incubaron 1 hora con anticuerpo anti-conejo conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) con $\lambda_{exc} = 495$ nm y $\lambda_{em} = 519$ nm. El anticuerpo policlonal antinitrotirosina fue generado en nuestro laboratorio a partir de la inmunización de conejos con hemocianina nitrada por peroxinitrito (264).

En todos los experimentos se utilizó el fluoróforo DAPI (Invitrogen) para la tinción de núcleos, con $\lambda_{exc} = 368$ nm y $\lambda_{em} = 461$ nm. El DAPI (10 μ M) fue incubado 10 minutos como último paso antes del montaje de los preparados.

3.7 Estudios de Microscopía.

El análisis de los experimentos de inmunocitoquímica con los anticuerpos anti-iNOS, anti c-myc y anti NO₂-tirosina, la visualización de la oxidación de la DHR intracelular y los estudios de infección de macrófagos y células Vero, para determinar el número de parásitos internalizados, fueron realizados en un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000 (Nikon) equipado para estudios de fluorescencia con los filtros UV-2A ($\lambda_{exc} = 330$ -380 nm y $\lambda_{em} > 420$ nm), B-2A ($\lambda_{exc} = 450$ -480 nm y $\lambda_{em} > 520$ nm) y G-2A ($\lambda_{exc} = 510$ -560 nm y $\lambda_{em} > 590$ nm) y óptica Nomarski u Óptica de Contraste Diferencial (DIC). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital (SPOT RT de Diagnostic Instrument Inc.) y analizadas con el programa de procesamiento de imágenes digitales Image J (software de libre acceso de NIH).

3.8 Análisis y procesamiento de datos.

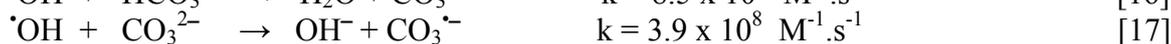
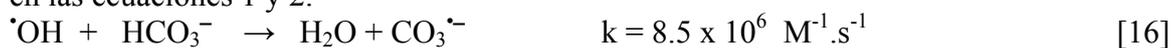
Todos los experimentos realizados fueron repetidos un mínimo de tres veces. Los resultados mostrados son media \pm SD de 3 experimentos, o en algunos casos registros representativos, como se indica en cada figura o tabla de la sección resultados.

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 Detección de radical carbonato formado en sistemas biológicos

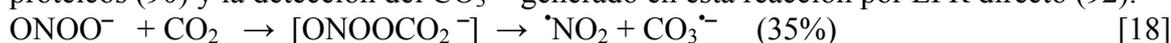
En los últimos años el radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) ha comenzado a ser tomado en cuenta como una de las especies reactivas generadas en sistemas biológicos. Las altas concentraciones de bicarbonato (≥ 24 mM) y de CO_2 (1.2 mM) presentes en el medio extracelular indican la importancia que tiene el estudio de la formación de este radical durante una situación de estrés oxidativo.

El radical carbonato se puede producir a partir de la oxidación por un electrón de los aniones carbonato (CO_3^{2-}) y bicarbonato (HCO_3^-), por ejemplo por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) según se plantea en las ecuaciones 1 y 2.



Las constantes de velocidad de estas reacciones son menores a las de la mayoría de las biomoléculas con $\cdot\text{OH}$ (la mayor parte de ellas poseen constantes de velocidad $> 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), lo que contribuyó a que se relativizara la posible formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en sistemas complejos.

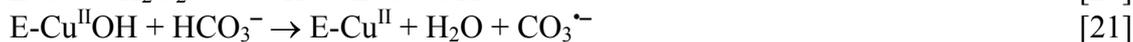
Sin embargo, en la última década se han planteado reacciones que generan $\text{CO}_3^{\cdot-}$, con mayor relevancia en sistemas biológicos; el primer mecanismo propuesto fue la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ como producto de la homólisis del aducto ONOOCO_2^- , producido en la reacción entre el ONOO^- y el CO_2 ($2.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7.4 y 37°C), con un rendimiento de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ del 35 % (ec 3). Las evidencias de la formación de esta especie derivan de que la presencia de CO_2 modifica la reactividad del ONOO^- , aumentando la nitración de aromáticos e inhibiendo las reacciones directas con tioles y hemos proteicos (90) y la detección del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generado en esta reacción por EPR directo (92).



En sistemas biológicos la concentración de CO_2 (1-2 mM) transforma a esta reacción en la principal vía de descomposición del ONOO^- .

Se han identificado otros sistemas generadores de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ que presentan relevancia fisiopatológica, como es el caso del aumento de la actividad peroxidásica de la CuZnSOD que se observa en algunos casos de mutaciones puntuales de la proteína asociadas al desarrollo de Esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (265). La CuZnSOD posee una modesta actividad peroxidasa que fue evidenciada usando distintos sustratos oxidables y observando además la protección que ejercían ciertas moléculas (azida o formiato) sobre la inactivación de la enzima por el H_2O_2 . La actividad peroxidasa aumentaba cuando los ensayos se realizaban en un medio con HCO_3^- (266,267). En el año 1999, Kalyanaraman y col. propusieron que ese aumento era debido a la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ *in situ*, radical que podía salir del sitio activo de la enzima y oxidar diferentes blancos localizados fuera del mismo (93). Las evidencias que apoyaron la formación del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ fueron que la reactividad del oxidante que se generaba en el proceso coincidía con la reactividad del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y no con la reactividad del $\cdot\text{OH}$ y que la formación el grupo "OH" del DMPO-OH producido por el sistema CuZnSOD / H_2O_2 / HCO_3^- , no proviene del H_2O_2 sino del H_2O (9).

El mecanismo planteado para la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en este sistema es el siguiente (ec. 3-5):



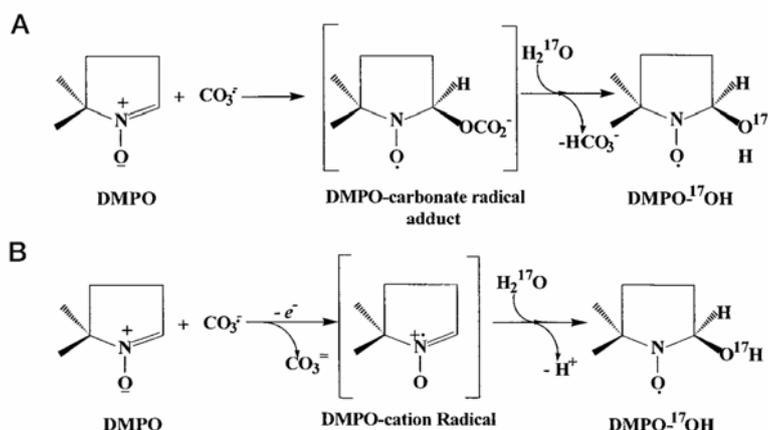
El oxidante unido a la enzima, representado aquí como $\text{E-Cu}^{\text{II}}\text{OH}$ puede oxidar residuos aminoacídicos adyacentes o al HCO_3^- , y en ese caso el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ formado puede abandonar el sitio activo de la enzima y ser responsable de oxidaciones a moléculas que no pueden ingresar al sitio activo para ser oxidadas. Una alternativa a este mecanismo fue planteada por Liochev y Fridovich (94), que mostraron que a pH 7.4 la actividad peroxidásica de la SOD depende del CO_2 más que del HCO_3^- , pero finalmente la especie generada es el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Ec. 7 - 9).



Por último, se detectó la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a partir de la xantina oxidasa, enzima clave en el metabolismo de las purinas, vinculada a diversas condiciones patológicas por la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 durante su actividad y recientemente por la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$. El mecanismo planteado para esta enzima es que se forma peroximonocarbonato (HCO_4^-) como intermediario que es reducido por los propios centros redox de la enzima (95).

Estos ejemplos muestran como ha tomado trascendencia la detección de $\text{CO}_3^{\cdot-}$, que es difícil debido a la falta de efectos específicos, ya que, a diferencia de otros radicales como el $\cdot\text{OH}$ o el $\cdot\text{NO}_2$, el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ no forma aductos estables por adición, lo que dificulta obtener pruebas de su formación.

El primer reporte de la reacción de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con el DMPO fue en el sistema CuZnSOD/ H_2O_2 / HCO_3^- , en el que se detectaba la formación de DMPO-OH y aunque inicialmente se atribuyó esto a la posible formación de $\cdot\text{OH}$, finalmente usando (^{17}O) H_2O se evidenció que el $\cdot\text{OH}$ que se adicionaba al DMPO derivaba del H_2O (9). Los autores del trabajo plantearon dos posibles mecanismos para la generación de DMPO-OH por la reacción de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con DMPO; uno en que se formaría como intermediario el DMPO cation radical ($\text{DMPO}^{\cdot+}$) y en el otro el intermediario sería un aducto DMPO-carbonato inestable, en ambos casos finalmente se genera el DMPO-OH adicionando OH^- del H_2O (Esquema 4.1).



Esquema 4.1 Mecanismo planteado para la generación de DMPO-OH por reacción del DMPO con $\text{CO}_3^{\cdot-}$

Los autores plantean dos posibles mecanismos, en (A) la formación de un intermediario DMPO-radical carbonato y en (B) la formación del DMPO cation radical como intermediario

Extraído de Zhang y col., 2000 (9).

En un trabajo reciente, Villamena y col. analizaron en forma teórica y experimental los posibles mecanismos por los cuales la reacción del radical carbonato con DMPO genera DMPO-OH. Estos estudios teóricos mostraron que el mecanismo preferencial para la adición del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ al DMPO es la formación de un aducto radical inestable, el DMPO- OCO_2 (mecanismo A en el Esquema 4.1) y la segunda etapa correspondiente a la formación de DMPO-OH resulta de la sustitución nucleofílica del grupo carbonato por OH^- del H_2O , aunque según estos autores esa segunda etapa ocurre para una fracción del aducto (268).

Frente a la posibilidad de que el DMPO pudiera ser usado como detector de la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ determinamos la constante de la reacción en colaboración con el laboratorio del Dr Peter Wardman del Gray Cancer Institute, Mount Vernon Hospital en Northwood, Middlesex, UK, por radiólisis de pulso. En nuestro laboratorio estudiamos los distintos sistemas en los que se genera $\text{CO}_3^{\cdot-}$, analizando la competencia con moléculas que reaccionan con $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con constantes de reacción conocidas, evaluando la formación de DMPO-OH por EPR y los productos de oxidación de la tirosina como molécula que compite por el $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Por último usamos el DMPO para evidenciar la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en un sistema celular.

4.1.1 Reacción del radical carbonato con DMPO.

La velocidad de la reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con el DMPO fue medida a pH 10.65 observando directamente el decaimiento del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a 600 nm ($\epsilon_{600 \text{ nm}} = 1850 \pm 50 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (269). En presencia de DMPO se observó un aumento de la velocidad de decaimiento dependiente de la

concentración de DMPO (Fig. 4.1). A partir de esos registros se calculó una constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y DMPO de $(2.47 \pm 0.14) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (fig. 4.1, inserto).

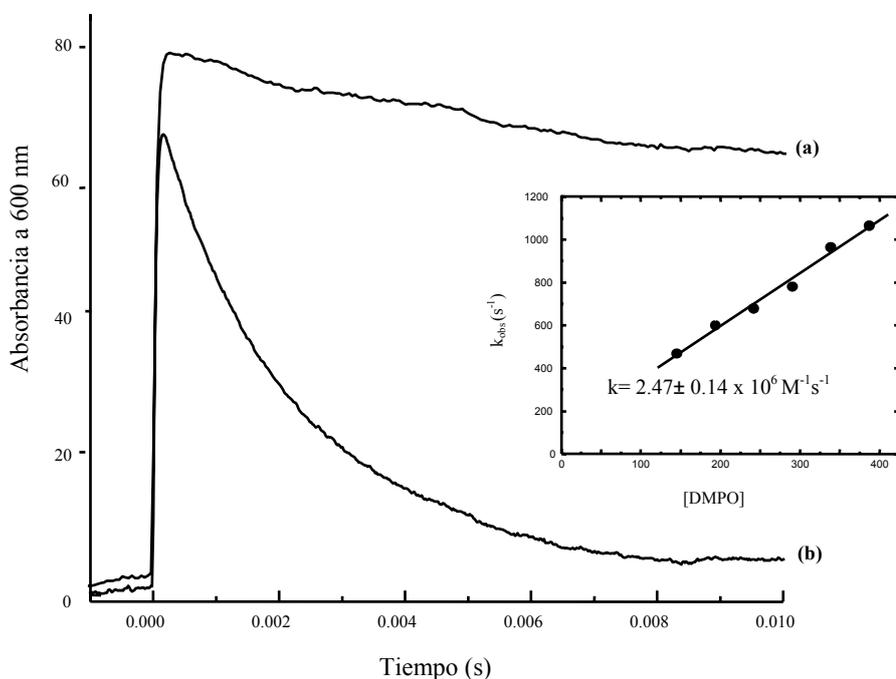


Fig 4.1 Determinación de la constante de velocidad de reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con DMPO.

Los decaimientos del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ generado por radiólisis de pulso siguieron un comportamiento exponencial de primer orden. Registros obtenidos (a) sin adición de DMPO y (b) con 145 μM de DMPO.

En el inserto: constante observada (k_{obs}) de el decaimiento del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en función de la concentración de DMPO.

Se trata por lo tanto de una reacción con una velocidad moderada que se encuentra en el medio, tanto para las reacciones del DMPO como para las del $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Las reacciones de otros radicales con DMPO presentan un rango valores de k muy amplio que va desde reacciones controladas por difusión, como es el caso del $\cdot\text{OH}$ ($k_{\text{OH}} = 4.3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) hasta reacciones muy lentas como la del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($k_{\text{O}_2^{\cdot-}} = 16 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). En el medio de esos valores se encuentran las reacciones con radicales de tioles, por ejemplo el radical del glutatión y de la cisteína, así como con los radicales centrados en carbono, en que las k están en el orden de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

En cuanto a las reacciones del radical carbonato, la reacción con el DMPO se ubica en una posición media, ya que si analizamos las reacciones con distintos aminoácidos vemos que con tirosina, cisteína, metionina y triptofano es de uno a dos órdenes más rápida y con otros como fenilalanina o arginina dos órdenes más lentas.

Este valor y su relación con las otras reacciones que pueden competir en los distintos sistemas en que se genere $\text{CO}_3^{\cdot-}$ nos permite prever que con altas concentraciones de DMPO (del orden de 100 mM) se podría detectar el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ incluso en sistemas celulares.

4.1.2 Detección del radical carbonato con DMPO

4.1.2.1 Reacción de Fenton en presencia de HCO_3^- .

El primer sistema que estudiamos fue la reacción de Fenton como generadora de radical hidroxilo en presencia de bicarbonato.



En la reacción de Fenton el mecanismo de reacción y el rendimiento de radical hidroxilo de la misma varía con el quelante de Fe^{II} utilizado (77). En nuestro trabajo usamos el complejo $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-DTPA}$, ya que este ha sido caracterizado como un muy eficiente generador de $\cdot\text{OH}$, con

rendimientos que varían entre el 50 y el 100 %, dependiendo de las relaciones de concentraciones de los reactivos.

Formación de DMPO-OH por el sistema de Fenton en presencia de HCO₃⁻

Estudiamos en estas condiciones el efecto de diferentes concentraciones de HCO₃⁻ y observamos una inhibición dosis dependiente en la formación de DMPO-OH (Fig. 4.2A).

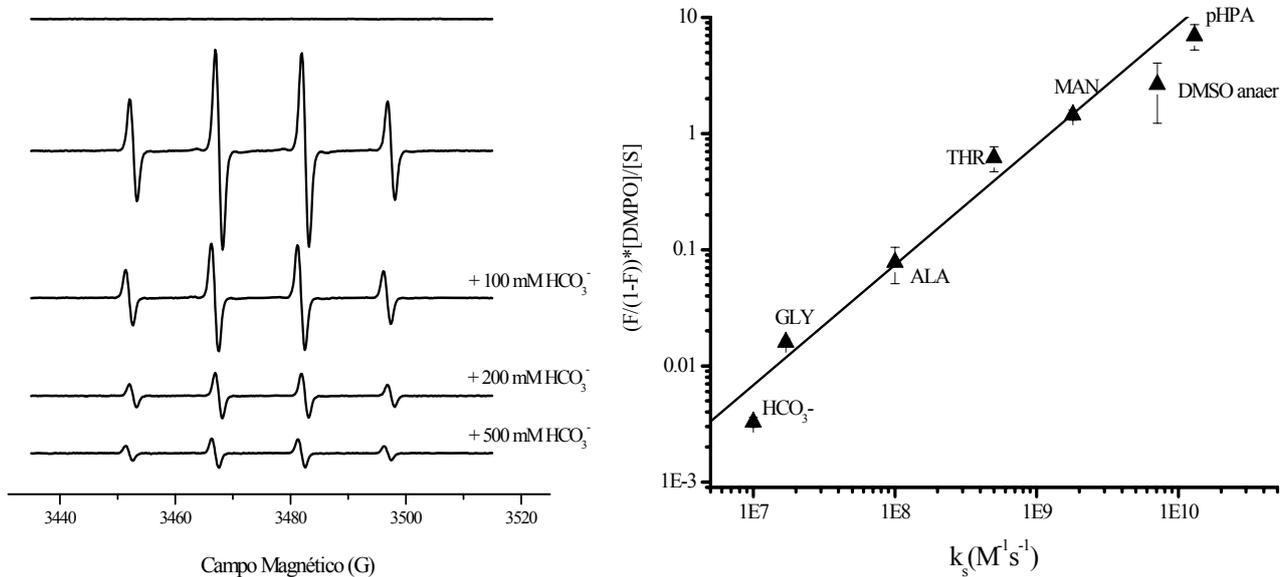


Fig 4.2 Formación de DMPO-OH por la reacción de Fenton: inhibición por HCO₃⁻ y otros atrapadores de [•]OH.

(A) Incubaciones de DMPO (0.5 mM), H₂O₂ (100 μM) y Fe^{II}-DTPA (100 μM) en buffer fosfato 20 mM, pH 7.4 con concentraciones crecientes de HCO₃⁻. Los espectros son registrados inmediatamente después de la adición de Fe^{II}. (B) La inhibición por los distintos atrapadores de [•]OH se representa como $(F/(1-F)) \cdot [DMPO]/[S]$ vs k_s , donde la pendiente de la recta es $1/k_{DMPO}$, (F) es la fracción de inhibición de la formación de DMPO-OH en presencia del atrapador o “scavenger” (S) y k_s la constante de reacción de cada atrapador con el [•]OH (117,270). Cada punto fue obtenido usando un amplio rango de concentración para cada atrapador : glicina (25-50-100 y 500 mM; $k_s = 1.7 \times 10^7 M^{-1} \cdot s^{-1}$), alanina (5-10-20-30-40-50 y 100 mM; $k_s = 1 \times 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$), treonina (0.5-1-2-3-4-5 y 25 mM; $k_s = 5 \times 10^8 M^{-1} \cdot s^{-1}$), manitol (0.1-0.25-0.5-1-2-2.5-5 y 10mM; $k_s = 1.8 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$), DMSO (0.1-0.25-0.35 y 0.5 mM; $k_s = 7.1 \times 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$), ácido 4-hidroxi-fenilacético (pHPA) (0.1-0.2-0.3-0.4 y 0.5 mM; $k_s = 1.3 \times 10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$). Las competencias con DMSO se realizaron en buffer saturado en argón y se observó una inhibición dosis dependiente y el aumento concomitante de la señal de DMPO-radical metilo ([•]CH₃) impidiendo, por la falta de O₂, la formación del radical metoxilo ([•]OCH₃) para simplificar el análisis de los espectros y de la cuantificación de DMPO-OH.

Condiciones instrumentales: potencia de microonda, 20 mW; amplitud de modulación, 1 G; constante de tiempo, 164 ms; velocidad de barrido de campo, 0.7 G/s; ganancia, 5×10^4 .

Cuando analizamos el efecto de varios atrapadores de [•]OH con constantes de reacción que van desde 10^7 a 10^{10} , vemos que la inhibición observada en la formación de DMPO-OH es la esperada según las constantes de reacción de cada atrapador. Esa inhibición también se cumple con bicarbonato, considerando la reacción del HCO₃⁻ con [•]OH ($k = 8.5 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$) (271) (Fig. 4.2B).

Considerando que en esa reacción se forma CO₃^{•-} y que este reacciona con DMPO rindiendo DMPO-OH, no esperábamos obtener inhibición, salvo que exista en el sistema una reacción que consuma el CO₃^{•-} compitiendo con la reacción con DMPO o que el rendimiento de formación de DMPO-OH por este mecanismo fuera extremadamente bajo.

Realizamos simulaciones asistidas por computadora para intentar entender lo que ocurría en este sistema. En la tabla 4.1 planteamos las reacciones involucradas, con las constantes reportadas que usamos en las simulaciones para tratar de explicar la inhibición obtenida. No encontramos en la literatura ningún reporte de la reacción del CO₃^{•-} con el complejo Fe^{II}-DTPA, por lo que obtuvimos la constante con la colaboración del laboratorio del Dr. Peter Wardman por la técnica de radiólisis

de pulso. La constante de segundo orden obtenida fue de $6.1 \pm 0.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, es decir una reacción rápida considerando las reacciones conocidas del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Fig. 4.3).

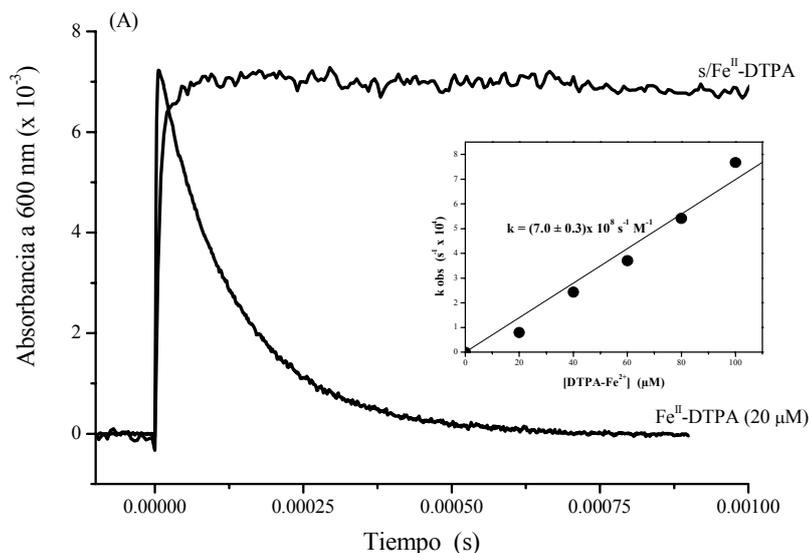


Fig 4.3 Determinación de la constante de reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con Fe^{II} -DTPA.

Radiólisis de pulso en una solución de Na_2CO_3 (90 mM), NaHCO_3 (10 mM), pH 10.7, saturada en N_2O en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de Fe^{II} -DTPA (10-100 μM). Observación directa de la desaparición de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a 600nm. La constante de la reacción se obtiene del gráfico de las constantes observadas de velocidad de decaimiento exponencial en función de la concentración de Fe^{II} -DTPA (inserto).

Tabla 4.1: Reacciones involucradas en la producción de DMPO-OH por reacción de Fenton en presencia de HCO_3^- .

Reacción	k ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Referencia
1) $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-DTPA} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{\text{III}}\text{-DTPA}$	410	(77)
2) $\cdot\text{OH} + \text{DMPO} \rightarrow \text{DMPO-OH}$	4.3×10^9	(272)
3) $\cdot\text{OH} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_3^{\cdot-}$	8.5×10^6	(272)
4) $\cdot\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}$	2.7×10^7	(272)
5) $\cdot\text{OH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	5.0×10^9	(273)
6) $\cdot\text{OH} + \text{Fe}^{\text{II}}\text{-DTPA} \rightarrow \text{OH}^- + \text{Fe}^{\text{III}}\text{-DTPA}$	2.0×10^9	(77)
7) $\text{CO}_3^{\cdot-} + \text{CO}_3^{\cdot-} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CO}_4^{2-}$	1.5×10^7	(274)
8) $\text{CO}_3^{\cdot-} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{P}$	3.0×10^9	(275)
9) $\text{CO}_3^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{HO}_2^{\cdot}$	8.0×10^5	(269)
10) $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-DTPA} + \text{DMPO-OH} \rightarrow \text{productos}$	1×10^3	(77)
11) $\text{CO}_3^{\cdot-} + \text{DMPO} \rightarrow \text{CO}_3 + \text{DMPO-OH}$	2.47×10^6	(esta tesis)
12) $\text{CO}_3^{\cdot-} + \text{Fe}^{\text{II}}\text{-DTPA} \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{Fe}^{\text{III}}\text{-DTPA}$	6.1×10^8	(esta tesis)

Las reacciones fueron realizadas en buffer fosfato 50 mM. La reacción del $\cdot\text{OH}$ con los componentes del buffer fueron consideradas en las simulaciones, pero no influyen en los resultados

En los resultados de las simulaciones cinéticas vimos que cuando no considerábamos la reacción con el Fe^{II} -DTPA, no observábamos inhibición en la formación de DMPO-OH. En la condición de 500 mM HCO_3^- los datos experimentales mostraban una inhibición de la señal $\sim 80\%$ mientras que en la simulación realizada con las ecuaciones 1 a 11 de la Tabla 4.1 la inhibición era menor al 5%. Cuando consideramos la reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con Fe^{II} -DTPA (ec 12 de la Tabla 4.1), hay una inhibición que se aproxima a los valores obtenidos experimentalmente (Fig. 4.4).

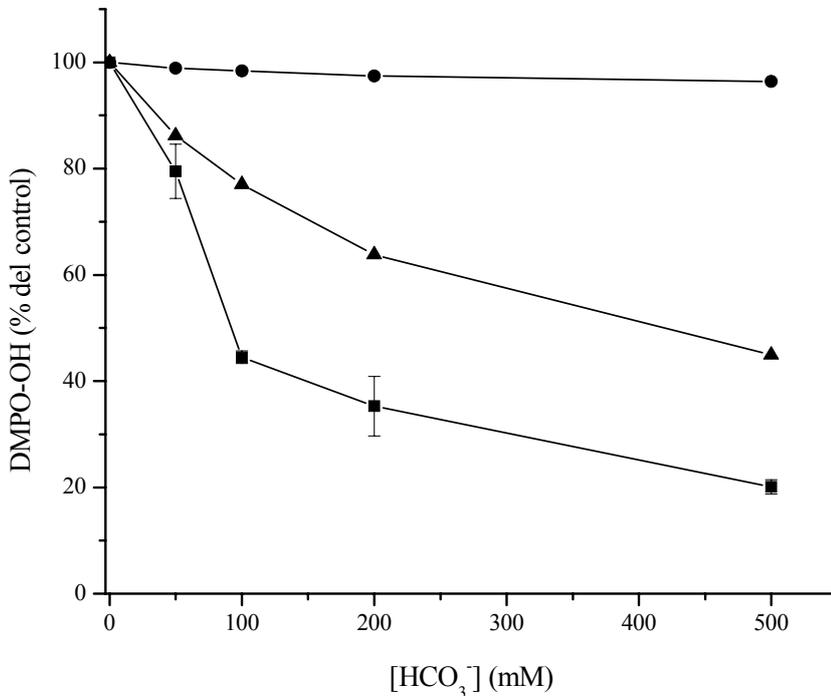


Fig.4.4 Relevancia de la reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con Fe^{II} -DTPA los rendimientos de formación de DMPO-OH por el sistema de Fenton en presencia de HCO_3^- . Los datos experimentales (■) son el promedio de 5 experimentos similares al representado en la fig2. Las simulaciones asistidas por computadores fueron realizadas con las ecuaciones 1- 11 de la Tabla I (●) e incorporando la reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con Fe^{II} -DTPA (ec. 12 de la Tabla 4.1) (▲).

La inhibición de la hidroxilación del DMPO se explica parcialmente (2/3 de la inhibición observada experimentalmente) por la competencia que existe entre el DMPO y el Fe^{II} -DTPA por el $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Un factor adicional que explique el bajo rendimiento en la formación de DMPO-OH puede ser la descomposición del aducto intermediario DMPO-OCO₂ por otras rutas (268).

Detección de productos de oxidación de tirosina por sistema de Fenton

Recurrimos a otro modelo experimental para evidenciar la formación del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y su reacción con DMPO, que es la formación de productos de oxidación de la tirosina. El radical hidroxilo predominantemente se adiciona al anillo de la tirosina ($k = 1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7) para dar el radical tirosina-OH que luego evoluciona mayoritariamente al producto hidroxilado, la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (137,276). El radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ por su parte cuando reacciona con la tirosina ($k = 4.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a pH 7, (274)) promueve la abstracción de un electrón del anillo favoreciendo la formación del radical tirosilo, y por lo tanto el aumento de la 3,3'-ditirosina como producto final. En la figura 4.5 (panel A) mostramos los perfiles de HPLC obtenidos luego de la incubación de tirosina (0.5 mM) con H_2O_2 y Fe^{II} -DTPA (100 μM) en ausencia y en presencia de 0.5 M HCO_3^- .

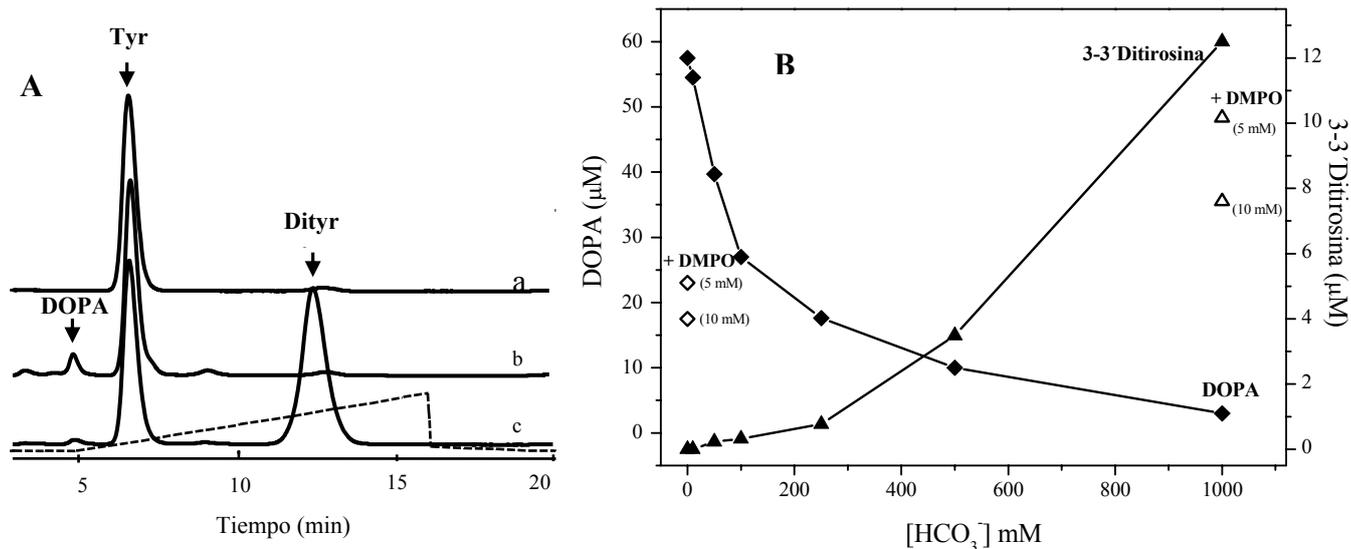


Fig. 4.5 Hidroxilación y dimerización de la tirosina por reacción de Fenton. (A) Registro representativo de HPLC para la tirosina (0.5 mM) no tratada (a) o expuesta a la reacción de Fenton (H_2O_2/Fe^{II} -DTPA (0.1 mM)) en ausencia (b) y en presencia de HCO_3^- 500 mM (c). (B) Efecto del aumento de la concentración de HCO_3^- en la formación de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (◆) y 3,3'-ditirosina (▲). Inhibición de DOPA (◇) y 3,3'-ditirosina (△) obtenida con 5 y 10 mM DMPO.

Los productos fueron identificados y cuantificados comparando los tiempos de retención y las áreas de los picos con los de los estándares correspondientes (tirosina, DOPA y ditirosina).

En ausencia de HCO_3^- se detecta 3,4-dihidroxifenilalanina, pero no observamos formación de ditirosina, mientras que en presencia de HCO_3^- se observa una desaparición del producto hidroxilado y la aparición concomitante de la ditirosina. Este cambio en la reactividad concuerda con la formación de radical carbonato. En el panel B de la Figura 4.5 se puede observar como ocurre la desaparición de la DOPA y la aparición de la 3,3'-ditirosina a medida que aumenta la concentración de HCO_3^- en el sistema.

Cuando agregamos DMPO (5 mM) podemos observar que en ausencia de HCO_3^- la formación de 3,4-dihidroxifenilalanina se inhibe un 60 % e inhibe solamente el 20% de la formación de ditirosina en el sistema con 0.5 M HCO_3^- . Esta diferencia en el efecto del DMPO en ausencia y en presencia de HCO_3^- se explica por la diferencia de la relación de las constantes de reacción involucradas en cada sistema. El DMPO reacciona con $\cdot OH$ con una $k = 4.3 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ (272) es decir 3 veces más lento que con la tirosina, y con $CO_3^{\cdot -}$ ($k = 2.46 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$), 20 veces más lento que con la tirosina. Es de notar que en este sistema debemos utilizar concentraciones muy altas de HCO_3^- y bajas de DMPO para asegurar que el $\cdot OH$ genere $CO_3^{\cdot -}$.

4.1.2.2 Sistema CuZn-SOD/ H_2O_2 en presencia de HCO_3^-

El aumento de la intensidad en la señal de DMPO-OH cuando se incubaba la CuZn-SOD con HCO_3^- ha sido reportado en diversos trabajos (277,278) y fue en el trabajo publicado por Goss y col. en 1999 (93) en que se propuso la formación de radical carbonato en este sistema. Como en los trabajos publicados por el laboratorio del Dr. Kalyanaraman desde ese momento (9,139,265,279-282) se ha demostrado por distintas técnicas la formación del $CO_3^{\cdot -}$ y su reacción con DMPO, nos limitaremos a mostrar algunos resultados de los obtenidos en este sistema, que nos permiten reafirmar cinéticamente la constante determinada por radiólisis de pulso.

Evaluamos por un lado el efecto del agregado de distintas concentraciones de tirosina y triptofano sobre la formación de DMPO-OH por CuZnSOD/ H_2O_2 / HCO_3^- . La inhibición es mas profunda con triptofano, consistente con que este reacciona más rápido con el $CO_3^{\cdot -}$ ($k = 7 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$, pH 7 (274)) (Fig 4.6).

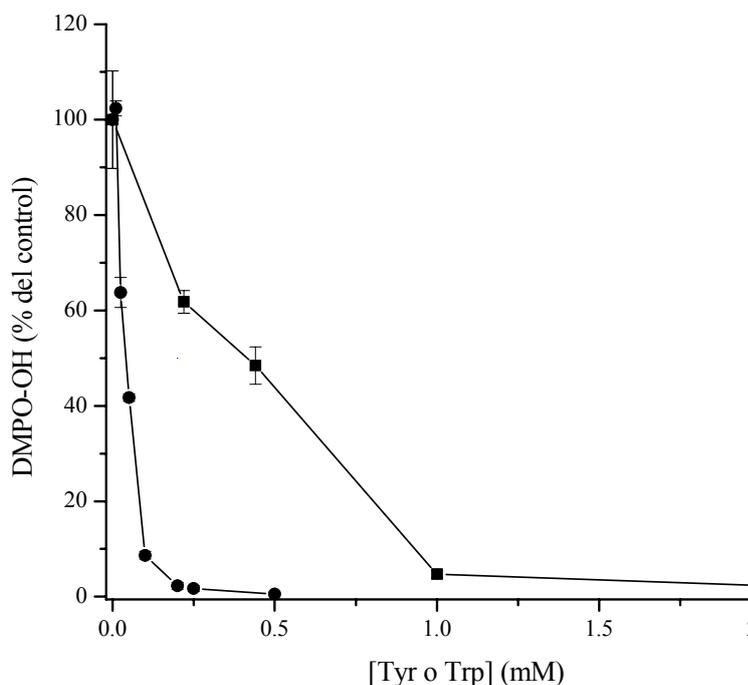


Fig. 4.6 Inhibición de la formación de DMPO-OH por CuZnSOD/H₂O₂/HCO₃⁻

El 100 % corresponde a la formación de DMPO-OH por el sistema CuZnSOD (1 mg/ml), H₂O₂ (1mM) y 50 mM DMPO en un buffer fosfato 50 mM, pH 7.4, con 50 mM HCO₃⁻ incubados

Incubaciones en presencia de triptofano (0-0.5 mM) (●) y tirosina (0-2 mM) (■). Condiciones instrumentales: potencia de microonda, 20 mW; amplitud de modulación, 1 G; constante de tiempo, 164 ms; velocidad de barrido de campo, 0.7 G/s; ganancia, 5 x 10³.

La competencia entre el DMPO y la tirosina fue analizada también evaluando el efecto del DMPO en la formación de ditirosina por el sistema CuZnSOD/H₂O₂/HCO₃⁻. En la figura 4.7 mostramos los cursos temporales de la formación de ditirosina en incubaciones de CuZnSOD, tirosina y H₂O₂, en ausencia y en presencia de 50 mM HCO₃⁻. La formación de ditirosina es despreciable en ausencia de HCO₃⁻ y aumenta a medida que se incrementa la concentración de HCO₃⁻. En la Figura 4.7 se observa la condición de mayor concentración de HCO₃⁻ (50 mM) y el efecto de distintas concentraciones de DMPO (1, 5 y 10 mM). La inhibición obtenida es compatible con lo esperado por la relación de constantes de reacción de la tirosina y el DMPO con el CO₃⁻.

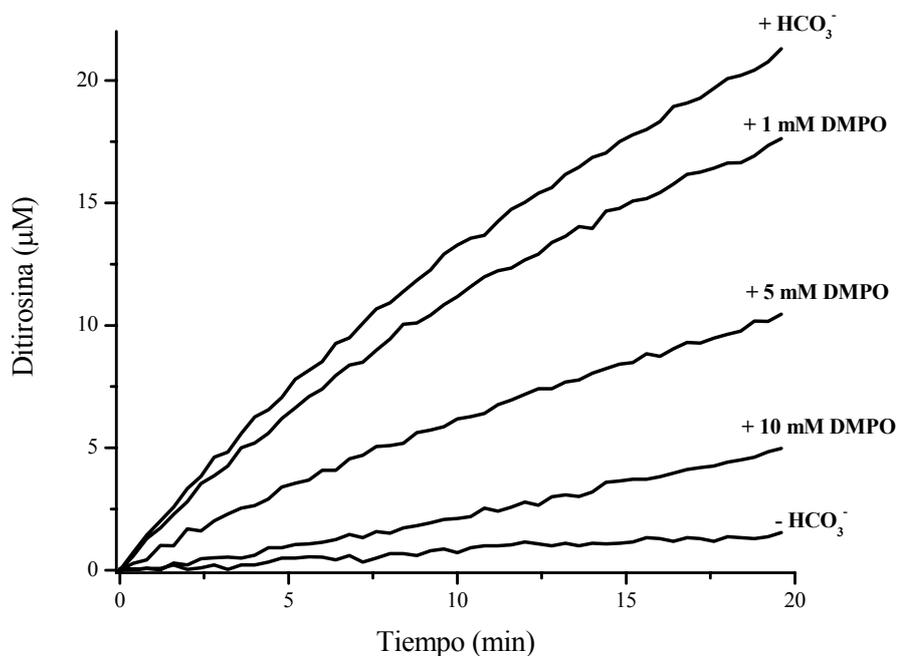


Fig 4.7. Dimerización de tirosina por CuZn-SOD /H₂O₂ / HCO₃⁻: inhibición por DMPO

Cursos temporales de la formación de 3,3'-ditirosina en sistemas conteniendo L-tirosina (0.5 mM), CuZn-SOD (1mg/ml) y H₂O₂ (1mM) en ausencia (-HCO₃⁻) y en presencia de 50 mM HCO₃⁻ (+ HCO₃⁻), en buffer fosfato 50 mM, pH 7.4. En presencia de HCO₃⁻ 50 mM se registró la formación de ditirosina en presencia de 1, 5 y 10 mM DMPO.

La formación de 3,3'-ditirosina fue monitorizada a 315 nm.

4.1.2.3 Hidroxilación de DMPO por el sistema peroxinitrito/dióxido de carbono.

La formación de DMPO-OH durante la homólisis catalizada por protón del peroxinitrito fue reportada previamente en un trabajo en colaboración de nuestro laboratorio con el laboratorio de la Dra Augusto de la Universidad de San Pablo (283,284). En esos trabajos mostraron que es posible la detección del aducto con el agregado de bajas concentraciones de glutatión, debido a que el aducto es destruido por la reacción con el $\cdot\text{NO}_2$ también producido durante la homólisis. Esto fue confirmado por la observación de que el agregado de ONOO^- destruía el DMPO-OH preformado por sonólisis (284). El glutatión reacciona con el $\cdot\text{NO}_2$ ($k = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (114)) evitando que destruya la señal generada por la reacción del ONOO^- con el $\cdot\text{OH}$ (Fig. 4.8).

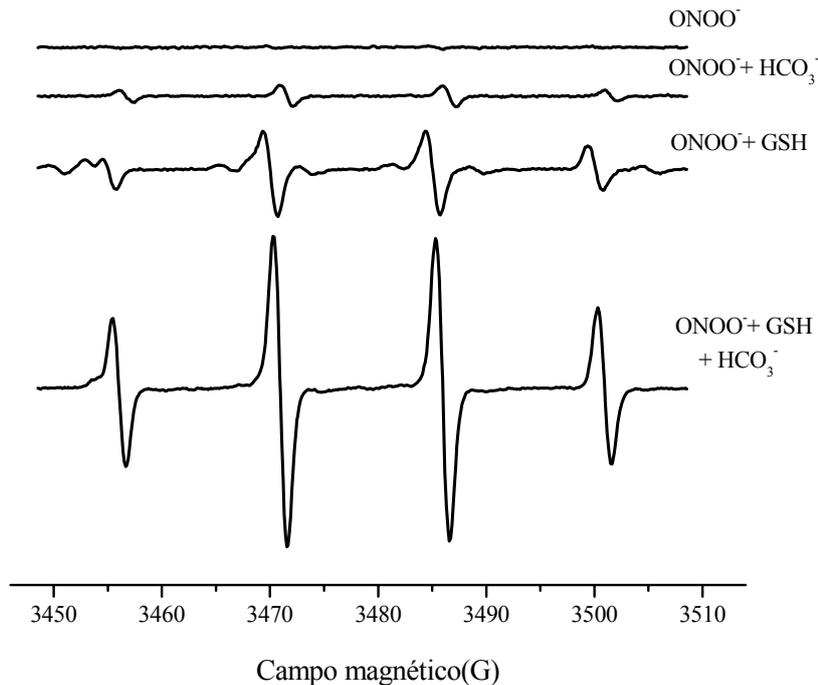


Fig. 4.8. Formación de DMPO-OH por peroxinitrito/ dióxido de carbono. Espectros de EPR del DMPO-OH ($\alpha_N = \alpha_H = 14.9 \text{ G}$) obtenidos con: 5 mM DMPO con 50 μM peroxinitrito en 20 mM buffer fosfato, pH 7.4 (ONOO^-), en presencia de HCO_3^- 25 mM ($\text{ONOO}^- + \text{HCO}_3^-$). Las mismas condiciones adicionando 15 μM de GSH al sistema, sin bicarbonato ($\text{ONOO}^- + \text{GSH}$) y con 25 mM HCO_3^- ($\text{ONOO}^- + \text{GSH} + \text{HCO}_3^-$)
Condiciones instrumentales: potencia de microonda, 20 mW; amplitud de modulación, 1 G; constante de tiempo, 164 ms; velocidad de barrido de campo, 0.7 G/s; ganancia, 5×10^4 .

En nuestros ensayos usamos las mismas condiciones reportadas previamente (283) (DMPO 80 mM, ONOO^- 50 μM y GSH 15 μM , a pH 7.4), condiciones en las que GSH reacciona directamente con menos de un 5% del ONOO^- ($k = 490 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (115)). La adición de HCO_3^- genera un aumento de la señal tanto en ausencia como en presencia de GSH (Figura 4.8). En nuestras condiciones experimentales (1.3 mM en equilibrio con 25 mM HCO_3^- a pH 7.4) y teniendo en cuenta que el ONOO^- reacciona rápidamente ($k = 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 24 °C) con el dióxido de carbono para dar $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$, podemos asegurar que todo el ONOO^- reacciona con el CO_2 , por lo que la formación de DMPO-OH depende de la reacción del DMPO con el $\text{CO}_3^{\cdot-}$. La mayor eficiencia observada en la generación de DMPO-OH cuando se genera $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en lugar de $\cdot\text{OH}$ no tiene una explicación evidente. Por un lado el rendimiento de radicales en la homólisis del ONOOCO_2^- es mayor que en la homólisis catalizada por protón (se genera un 35% de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y un 30% de $\cdot\text{OH}$). Esa diferencia no explica totalmente el aumento de la señal observado en presencia de HCO_3^- , así que es posible

que existan otras reacciones que consuman el $\cdot\text{OH}$ y eso explique la mayor eficiencia del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ para producir DMPO-OH.

Cuando evaluamos el efecto del agregado de tirosina y triptofano observamos lo mismo que en los otros sistemas generadores de $\text{CO}_3^{\cdot-}$, una inhibición mayor con triptofano que con tirosina, acorde con la diferencia de reacción de estos aminoácidos con el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y que no ocurre cuando el oxidante es el $\cdot\text{OH}$.

4.1.2.4 Detección de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en un sistema celular

La formación de DMPO-OH y su detección por EPR se usa como método para evaluar el estallido respiratorio tanto de neutrófilos como de macrófagos. El $\text{O}_2^{\cdot-}$ generado forma un aducto inestable con el DMPO, el DMPO-OOH que decae rápidamente a la formación de DMPO-OH. Durante nuestro trabajo evidenciamos que esa señal se inhibía cuando los macrófagos se encontraban estimulados para la producción de $\cdot\text{NO}$, en acuerdo con la formación de ONOO^- y el aumento de $\cdot\text{NO}_2$ en el sistema (Fig. 4.9, condición PMA vs. condición PMA + iNOS).

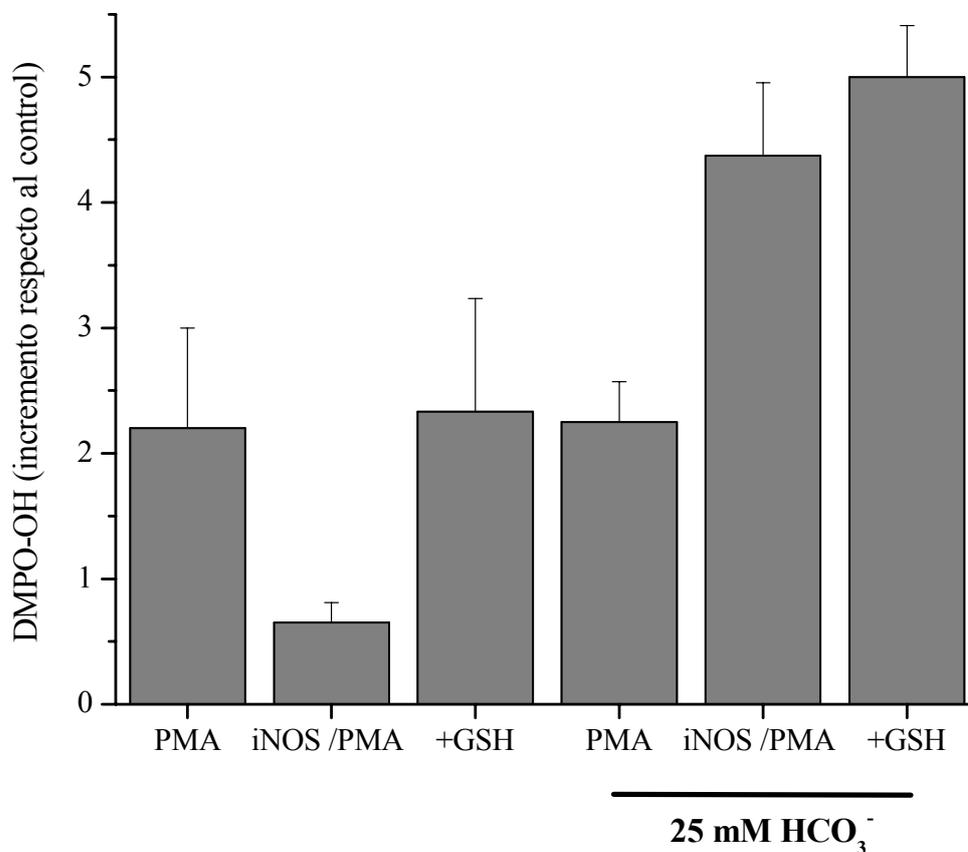


Fig. 4.9 Formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ por macrófagos activados.

Los macrófagos fueron activados para la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (PMA), o la producción simultánea de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ (iNOS/PMA). En la condición iNOS/PMA se agregó al medio extracelular $15 \mu\text{M}$ de GSH (+GSH).

Las mismas condiciones fueron ensayadas con 25 mM HCO_3^- en el medio.

La concentración relativa de DMPO-OH fue obtenida de la doble integración de los registros.

Los espectros fueron registrados 15 minutos después de la activación con PMA en cada condición, acumulando tres barridos sucesivos.

Condiciones instrumentales: potencia de microonda, 20 mW; amplitud de modulación, 1 G; constante de tiempo, 164 ms; velocidad de barrido de campo, 0.8 G/s; ganancia, 5×10^5 .

Cuando agregamos GSH en el medio extracelular recuperamos la señal abolida por la presencia del $\cdot\text{NO}$ debido a la reacción del $\cdot\text{NO}_2$ con el GSH que evita la descomposición del aducto (Fig. 4.9). El efecto del agregado de GSH en el medio extracelular es una evidencia indirecta de que la formación de los oxidantes ocurre en este caso en ese compartimento. La formación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ en estos experimentos fue activada por PMA, molécula que conduce al ensamblaje de la enzima en la membrana del macrófago, produciendo el $\text{O}_2^{\cdot-}$ en la cara externa de la membrana. El $\cdot\text{NO}$ formado en el citosol del macrófago difunde a través de la membrana, y la formación de ONOO^- ocurre en el sitio donde se produce el $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Cuando agregamos al medio de cultivo 25 mM bicarbonato, vimos que el HCO_3^- no afecta la formación ni la detección del $\text{O}_2^{\cdot-}$, pero la señal aumenta en la condición en que se estaban generando en forma simultánea $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ (Fig. 4.9), al igual que en los ensayos realizados con ONOO^- sintetizado en el laboratorio, compatible con la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y la generación de DMPO-OH a partir de su reacción con DMPO.

4.2 Modulación de la activación macrofágica por *Trypanosoma cruzi*

4.2.1 Activación de la NADPH oxidasa en la interacción de macrófagos con *Trypanosoma cruzi*.

El ensamblaje y activación del complejo de la NADPH oxidasa durante la interacción de los macrófagos con los distintos estadios del parásito ha sido un punto de controversia en la literatura. (232-234,285).

En nuestro trabajo usamos diferentes ensayos para detectar la formación de superóxido en células, que nos permitieron evaluar si hay activación de la NADPH oxidasa durante la interacción de los macrófagos con *T.cruzi*. Las técnicas utilizadas son: quimioluminiscencia (oxidación del luminol), resonancia paramagnética electrónica (formación de DMPO-OH), la reducción de una sal de tetrazolio (azul de nitrotetrazolio, NBT) y la oxidación del hidroetidio (HE). Los ensayos para determinar la formación de superóxido se realizaron con las formas epimastigota y tripomastigota de *T.cruzi*.

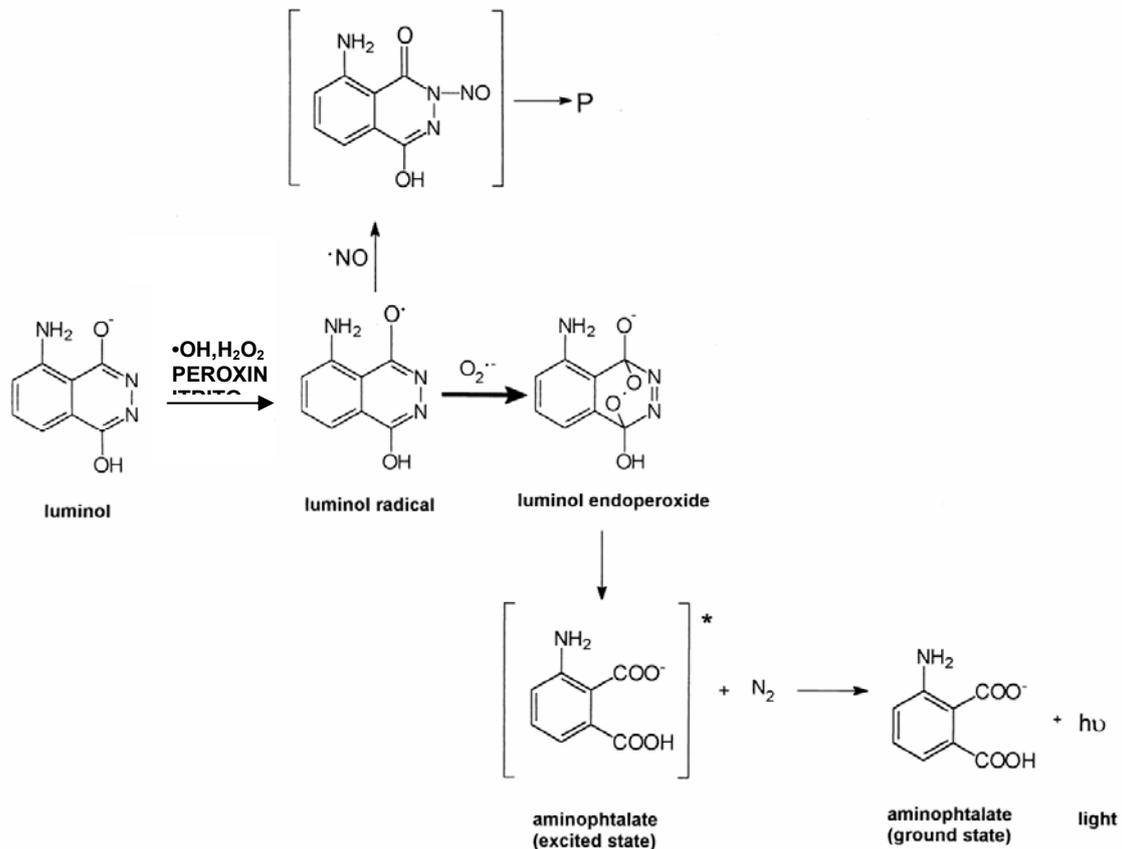
4.2.1.1 Interacción macrófagos - epimastigotas

Quimioluminiscencia del Luminol en macrófagos expuestos a epimastigotas.

La quimioluminiscencia del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) ha sido históricamente una de las técnicas más utilizadas para la detección de especies reactivas del oxígeno en sistemas biológicos, desde enzimas aisladas, cultivos celulares hasta tejidos u órganos (134).

Aunque altamente sensible, no es un método para la determinación directa de la formación de un determinado intermediario, ya que varias especies incluyendo el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el $\cdot\text{OH}$, el H_2O_2 , el ácido hipocloroso (HOCl) y el ONOO^- conducen a la formación de especies luminiscentes por mecanismos de reacción distintos. La emisión de fotones por este sistema se debe a una secuencia de reacciones que se inician por una oxidación por uno o dos electrones del luminol, que lleva a la formación de un radical del luminol o diazoquinona respectivamente, que pueden reaccionar con $\text{O}_2^{\cdot-}$ o H_2O_2 para dar un endoperóxido inestable. Este endoperóxido se descompone a un estado excitado, el aminofalato que decae al estado basal emitiendo un fotón ($h\nu$) (Esquema 4.2).

La formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ durante el estallido respiratorio y su consiguiente dismutación a H_2O_2 , permiten la oxidación del luminol, como puede observarse en el esquema 4.2.



Esquema 4.2 Oxidación del Luminol durante la formación simultánea de $\bullet\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Mecanismo de reacción del luminol propuesto para sistemas que producen $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}$.

La emisión depende de la relación en las concentraciones de cada una de las especies. Cuando la concentración de $\bullet\text{NO}$ es mayor predomina la formación de productos no rutas no luminiscentes.

Adaptado de Radi et al. (2001). (10)

La presencia simultánea de $\bullet\text{NO}$ en niveles similares a los del $\text{O}_2^{\bullet-}$ que se está formando lleva a la formación de ONOO^- , especie también capaz de oxidar al luminol (89). El $\bullet\text{NO}$ y sus derivados ($\bullet\text{NO}_2$) no inducen la quimioluminiscencia del luminol. El proceso planteado de oxidación del luminol en estos casos es más complejo (Esquema 4.2), debido a que el $\bullet\text{NO}$ en exceso lleva a una inhibición de la emisión de la luz probablemente por atrapamiento de intermediarios radicalares que se generan durante el proceso de oxidación del luminol (132).

Cuando los macrófagos forman $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\bullet\text{NO}$, el ONOO^- generado puede dar cuenta del primer paso de oxidación por dos electrones o también podría hacerlo el $\bullet\text{OH}$ derivado de su homólisis. Esto permite que todo el $\text{O}_2^{\bullet-}$ generado lleve a la oxidación del luminol, a través de la formación del ONOO^- obteniéndose valores de luminiscencia mayores que los que se obtienen con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ ya que el ONOO^- tiene mayor rendimiento en la emisión de luz (132).

Cuando los macrófagos son co-incubados con epimastigotas no se produce fagocitosis, con lo cual es difícil establecer *a priori* la existencia o no del estallido respiratorio. La interacción de estos parásitos con la membrana del macrófago puede de todas formas generar una activación local de NADPH oxidasa, generándose $\text{O}_2^{\bullet-}$ hacia el espacio extracelular.

Para evaluar esto trabajamos con epimastigotas sin opsonizar y opsonizados con un suero de ratón inmunizado con *T. cruzi*. La incubación de los epimastigotas con el suero del ratón expuesto previamente a los parásitos lleva a la opsonización de los mismos, a través de la adhesión de los componentes opsonizadores del complemento (C5b y C3b) y por la unión de inmunoglobulinas presentes en el suero. En el caso de los macrófagos en estado basal, con los parásitos sin opsonizar observamos una pequeña inducción de luminiscencia que aumentaba en el caso de los parásitos opsonizados (Figura 4.10). Estos resultados son consistentes con datos previos de la literatura y con

la capacidad de microorganismos opsonizados de desencadenar el estallido respiratorio en células fagocíticas, por la interacción con los receptores específicos de la membrana del macrófagos para la porción Fc de las IgG o por los componentes C3b y C5b del complemento. La luminiscencia obtenida es del mismo orden que la que se observa cuando se usa como activador un estímulo fagocítico como el zimosán opsonizado, pero mucho menor que la obtenida con los ésteres de forbol como el PMA, que produce la activación generalizada de las NADPH oxidasas en membrana, mediada por la activación directa de PKC (Figura 4.10).

Utilizamos distintos inhibidores para poder demostrar que la especie responsable de la luz es el radical superóxido (inhibición por SOD) y que es formado por la NADPH oxidasa (inhibición con el difeniliodonio y la apocinina).

La activación en presencia de CuZnSOD (600 U/ml) observamos una disminución parcial de la luz inducida por epimastigotas opsonizados (Figura 4.10). Para discriminar si eso ocurría debido a que otra especie estaba involucrada en el mecanismo de oxidación del luminol o si era un problema de acceso de la CuZnSOD al sitio donde se generaba el $O_2^{\cdot-}$, utilizamos una SOD modificada (Hb-SOD) que posee un dominio de unión a heparina, cedida gentilmente a nuestro laboratorio por el Dr. Bruce A. Freeman (286). En este caso observamos una inhibición total de la emisión (Figura 4.10). La modificación de esta enzima permite que esta se asocie a la cara externa de la membrana plasmática del macrófago o también de los parásitos, haciendo que se encuentre en el sitio de formación de superóxido durante la activación y sea más efectiva que la CuZn SOD no modificada.

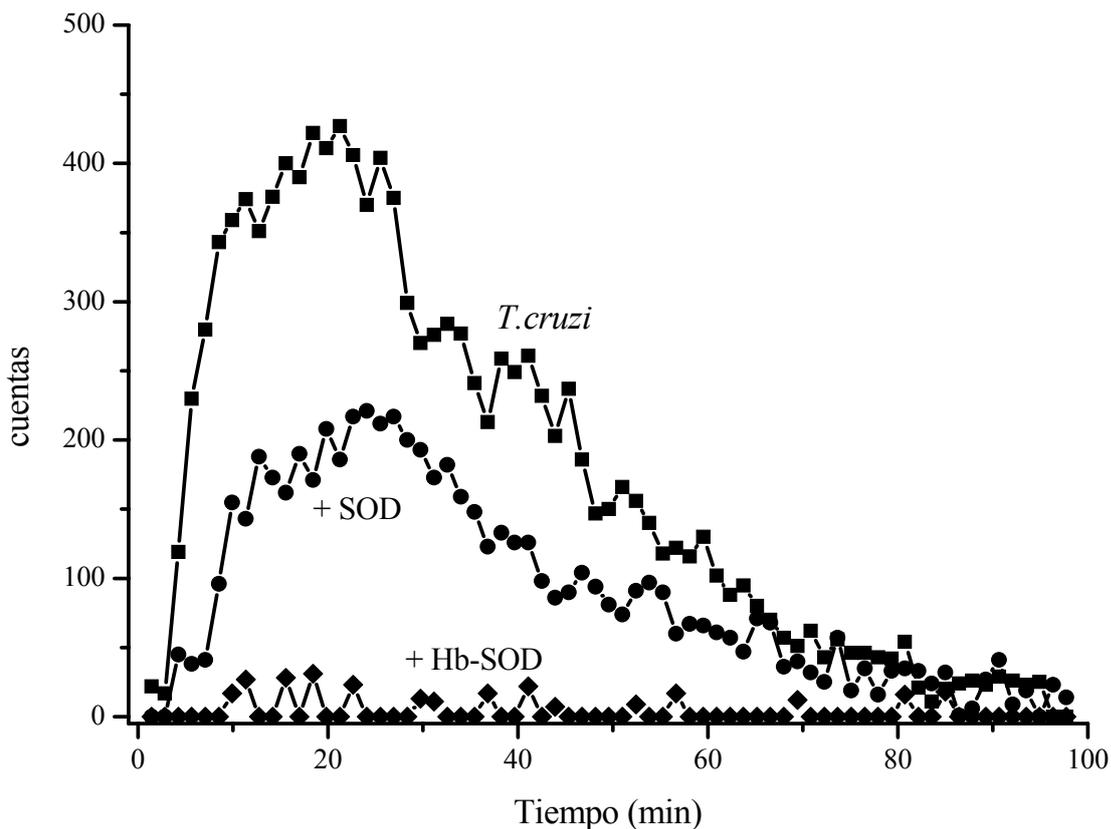


Fig.4.10 Quimioluminiscencia del luminol derivada de macrófagos expuestos a epimastigotas de *T. cruzi*.

Macrófagos (1×10^6) expuestos a epimastigotes (1×10^7) en dPBS con 200 μ M luminol a 37° C. Registros característicos obtenidos en un luminómetro de placas (Lumistar-BMG) en ausencia (*T. cruzi*) o en presencia de 600 U/ml de CuZnSOD (SOD) o de la enzima con un dominio de unión a heparina (Hb-SOD).

El difeniliodonio (DPI) es un inhibidor de flavo-enzimas (287), que inhibe totalmente la luminiscencia del sistema (no mostrado). Sin embargo, sabemos que muchos de los posibles sistemas generadores de especies oxidantes son flavoproteínas, con lo cual utilizamos también otro inhibidor, la apocinina. La apocinina es un compuesto catecol que inhibe la translocación de las subunidades citosólicas de la NADPH oxidasa (p47phox y p67 phox) (288). En este caso también inhibimos completamente la emisión de luz (Figura 4.11).

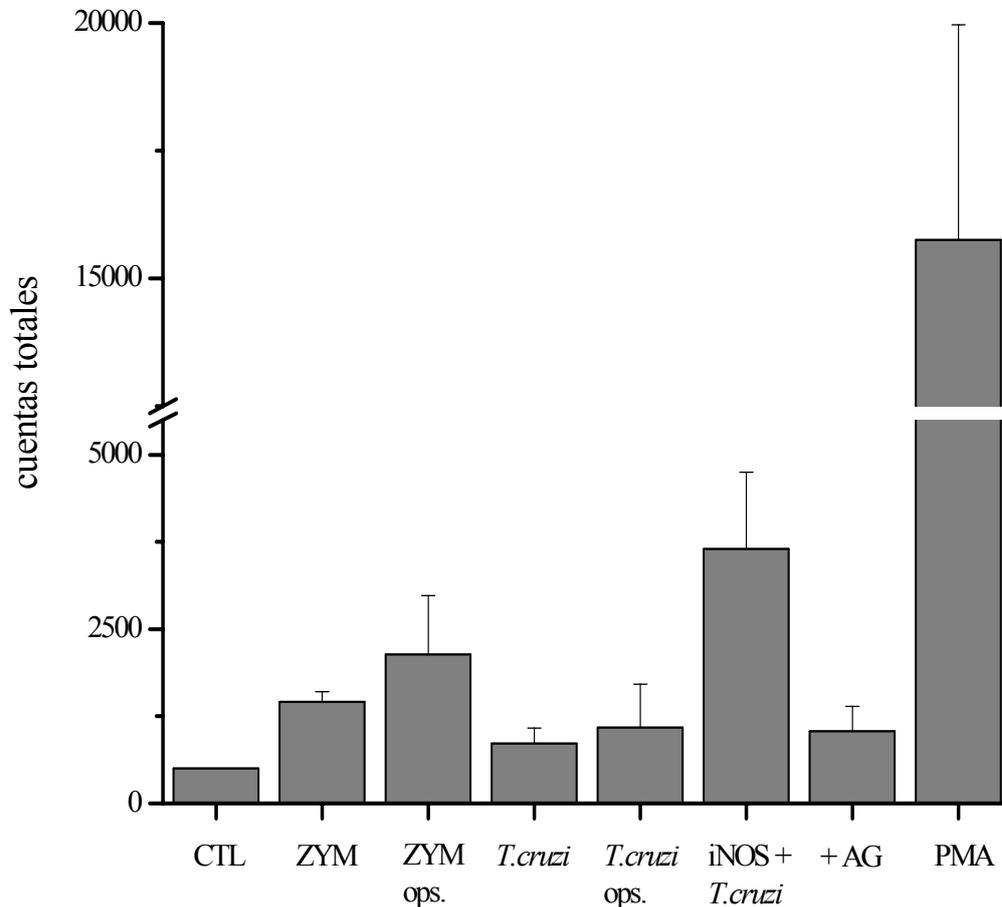


Fig. 4.11 Producción de $O_2^{\bullet-}$ por macrófagos expuestos a epimastigotas de *T.cruzi*.

Macrófagos en dPBS, 200 μ M Luminol, fueron expuestos a activadores de la NADPH oxidasa. Zimosán (ZYM) y zimosán osonizado con suero humano fresco (ZYM ops) (4mg/ml). Los epimastigotas de *T.cruzi* en una relación de 10 parásitos/macrófago. La inducción de la iNOS se realizó 5 horas antes del ensayo (iNOS) y aminoguanidina 1 mM se adicionó para inhibir la producción de $\cdot NO$ (+AG). Cuentas totales generadas en las distintas condiciones durante los 100 minutos siguientes a la activación, registrados en luminómetro de placas (Lumistar-BMG).

Cuando los macrófagos fueron expuestos 5 horas antes a IFN- γ y LPS, se indujo la iNOS y en el momento de la exposición a los epimastigotas se encuentran produciendo $\cdot NO$. La luminiscencia es mayor que en los macrófagos sin inducción de la iNOS (Figura 4.11). Esta mayor eficiencia es consistente con la formación de $ONOO^-$. La exposición a citoquinas de tipo Th1 (como el IFN- γ y el TNF- α , generado durante la activación por el propio macrófago) produce un aumento de la expresión de algunas de las subunidades (gp91^{PHOX}, p47^{PHOX} y p 67^{PHOX}) de la NADPH oxidasa (289,290). Esto puede generar que los macrófagos pre-activados produzcan una mayor cantidad de $O_2^{\bullet-}$ frente al mismo estímulo. Para discriminar entonces si el aumento se debe a una mayor formación de superóxido o a la formación de $ONOO^-$, utilizamos inhibidores de la iNOS como aminoguanidina (AG) o N-monometilarginina (N-MMA), que no afectan la expresión de las enzimas, sino que inhiben la síntesis de $\cdot NO$. En presencia de inhibidores la quimioluminiscencia

es similar a la obtenida con los macrófagos en estado basal. Esto nos indica que en nuestro sistema el aumento de la luz es debido a la formación de ONOO⁻ y su mayor eficiencia para oxidar al luminol en pasos que terminan con la emisión de fotones (Figura 4.11).

Detección de DMPO-OH generado en la interacción macrófago-epimastigota

Para la detección de superóxido se por la técnica de EPR indirecta se utilizan un grupo de atrapadores que son nitronas cíclicas. El superóxido se adiciona en la posición beta de la nitrona, para dar el nitróxido cíclico sustituido detectable por EPR (Esquema 4.3). Uno de los atrapadores mas usados para la detección de este radical en sistemas biológicos es el DMPO. La reacción del DMPO con el radical superóxido genera un aducto intermediario, DMPO-OOH, que presenta un espectro característico. Esta especie tiene una corta vida media ($t_{1/2} = 0.8$ min a pH 7.0) y decae en parte a la forma DMPO-OH (291,292) (Esquema 4.3).

En los últimos años se han desarrollado otras nitronas, como el 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxido (DEPMPO) y 2-ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide (EMPO), cuyos aductos con superóxido tiene una mayor vida media ($t_{1/2} = 14$ y 8 min, respectivamente) (293), lo que permite una mayor especificidad en la detección. Sin embargo, la constante de velocidad para atrapar superóxido es mayor para el DMPO ($k = 16 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), lo que lo hace el atrapador de elección en los sistemas donde se genera superóxido a altas velocidades.

Esquema 4.3. Formación de DMPO-OH en sistemas generadores de O₂⁻.

La reacción del DMPO con O₂⁻ genera DMPO-OOH un intermediario de corta vida media que decae a la forma DMPO-OH (paso2). El DMPO-OH se obtiene también de la reacción directa del DMPO con el [•]OH o de la reacción con CO₃⁻

Extraído de Rosen et al. 2004(1)

DMPO

DMPO-OOH

DMPO-OH

Cuando en el sistema se genera simultáneamente [•]NO y posiblemente ONOO⁻ hay que tener en cuenta que el [•]NO₂ derivado de la oxidación del [•]NO y de la homólisis del ONOO⁻ reacciona con el aducto DMPO-OH, destruyéndolo (283).

Con esta técnica pudimos determinar la formación de O₂⁻ durante la interacción de los epimastigotas con los macrófagos. El ensayo fue realizado en dPBS con 100 mM DMPO. Luego de entre 15 y 30 minutos (tiempos usados en diferentes experimentos) de adicionar los parásitos sobre los macrófagos, el sobrenadante del cultivo fue transferido a la celda del EPR y los registros obtenidos son la acumulación de 3 barridos (Figura 4.12). La señal de DMPO-OH aparece claramente con los epimastigotas, mientras que cuando los macrófagos fueron pre-estimulados para la inducción de la iNOS, la señal desaparece. Esto se debe a lo que planteábamos anteriormente sobre la capacidad del ONOO⁻ (a través de la formación del [•]NO₂) de destruir el aducto DMPO-OH. Para confirmar que la inhibición era dependiente de la formación de [•]NO utilizamos un inhibidor de la iNOS, en este caso el 1400 W, y observamos la recuperación de la señal.

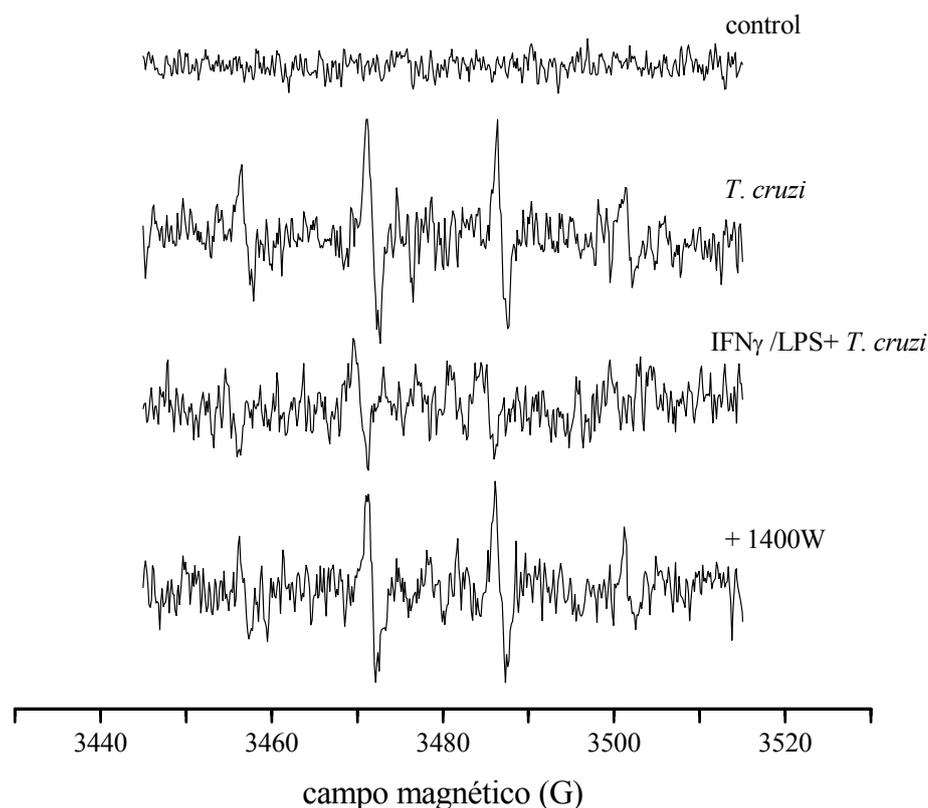


Fig 4.12. Detección de $O_2^{\bullet-}$ durante la interacción de macrófagos con epimastigotas de *T.cruzi*. Los espectros fueron obtenidos luego de incubar 30 minutos a los macrófagos con epimastigotas de *T.cruzi* (2×10^7 céls/ml) a $25^\circ C$ en dPBS con 100 mM DMPO. La inducción de la iNOS fue realizada 5 horas antes del experimento. Cada registro corresponde a la acumulación de 3 barridos consecutivos.

Condiciones instrumentales: potencia de microonda, 20 mW; amplitud de modulación, 1 G; constante de tiempo, 164 ms; velocidad de barrido de campo, 0.8 G/s; ganancia, 5×10^5 .

Estos datos nos permiten confirmar que la interacción de la forma epimastigota con los macrófagos lleva a la activación de la NADPH oxidasa. Si bien en algunos sistemas generadores de $O_2^{\bullet-}$ se puede detectar el aducto intermediario (DMPO-OOH), en nuestro sistema no se observa ya que como vimos presenta una vida media muy corta en medios celulares y además es una señal con más desdoblamientos, lo que genera que la magnitud de los picos sea menor y más difícil de distinguir.

4.2.1.2 Interacción macrófagos- tripomastigotas metacíclicos

La capacidad de las formas infectivas de activar la NADPH oxidasa tiene una mayor relevancia biológica dado que los macrófagos actúan como una primera barrera en la infección por *T.cruzi*, y es importante conocer si estos son capaces de evitar las respuestas citotóxicas durante la infección. Para evaluar en este caso la existencia de estallido respiratorio usamos la quimioluminiscencia del luminol, la reducción del azul de nitrotetrazolio (NBT) y la oxidación del hidroetidio (HE).

Quimioluminiscencia en la infección con tripomastigotas metacíclicos.

En los ensayos para evaluar la activación de la NADPH oxidasa con la forma tripomastigota utilizamos la técnica de luminiscencia derivada del luminol que fue descrita previamente para la interacción con epimastigotas.

En la Figura 4.13 se observa que la exposición de los macrófagos a la forma tripomastigota no opsonizada, la quimioluminiscencia es similar a la obtenida en presencia de zimosán opsonizado.

La inducción previa de la iNOS produce un importante aumento de la luminiscencia, y la incubación con el inhibidor del ensamblaje de la NADPH oxidasa, apocinina (50 μM), inhibe completamente la señal.

En la Figura 4.14 se representan las cuentas totales obtenidas con número creciente de tripomastigotas, con relaciones de 10, 20 y 50 parásitos/macrófago. El aumento de la luz a medida que aumenta el número de parásitos, indica que se producen activaciones locales durante la interacción con la membrana del macrófago y seguramente al aumentar el número de parásitos, aumenta el número de NADPH oxidasas que participan de la producción de $O_2^{\bullet-}$.

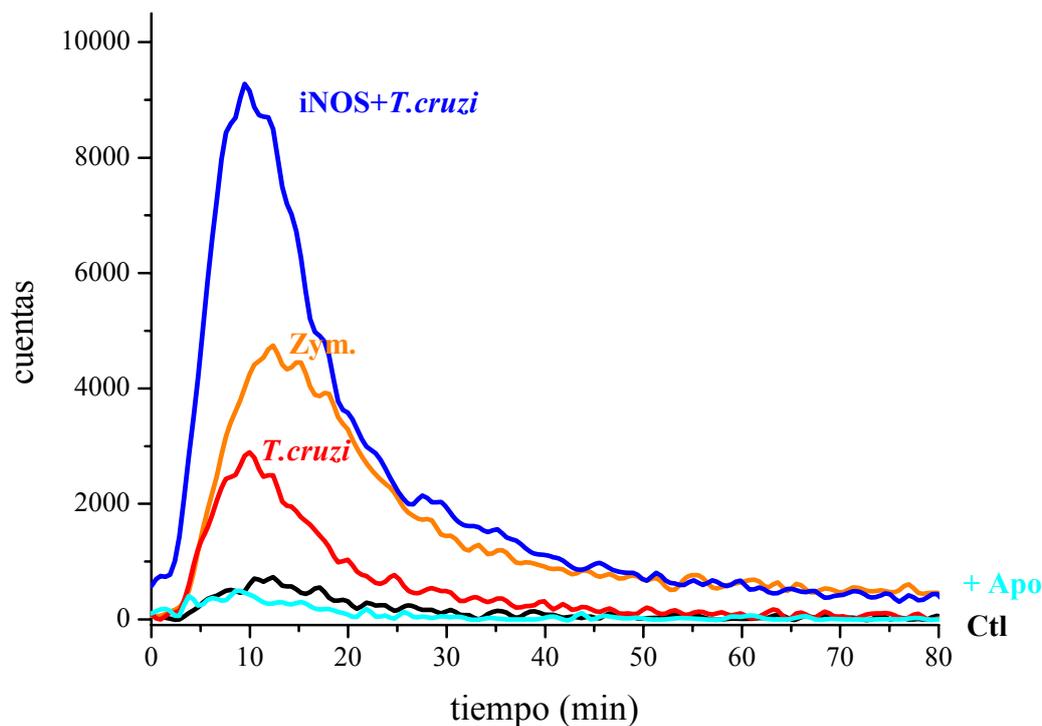


Fig. 4.13 Quimioluminiscencia del luminol derivada de macrófagos expuestos a tripomastigotas. Macrófagos (1×10^6) incubados con 40 mg/ml de zimosán opsonizado (zym), tripomastigotas (1×10^7) en dPBS con 200 μ M luminol a 37° C (*T.cruzi*). Efecto de la producción de NO (iNOS + *T.cruzi*) y de 50 μ M apocinina (+ Apo). Registros obtenidos en luminómetro de placas (Lumistar-BMG).

La pre-incubación de los macrófagos con manosa (5 mM) también resulta en la inhibición de la luminiscencia dependiente de la activación de la NADPH oxidasa durante la fagocitosis de la forma tripomastigota. Si bien en nuestro trabajo no evaluamos el rol de la manosa por otras técnicas, la inhibición de la luminiscencia concuerda con datos de la literatura respecto de las moléculas involucradas en la interacción de *T.cruzi* con macrófagos (214).

El receptor de manosa es una glicoproteína de membrana de elevada expresión en macrófagos. Este receptor une glúcidos tales como L-fucosa, D-manosa, D-N-acetilglucosamina y D-galactosa, moléculas que no se encuentran normalmente en los oligosacáridos de membrana de mamíferos, pero si son frecuentes en las superficies de microorganismos (294,295). El receptor de manosa puede mediar la internalización de microorganismos por fagocitosis, uniendo una gran variedad de patógenos (296), entre los que se ha descrito la interacción con la forma amastigota de *T.cruzi* (214). En los casos de fagocitosis mediada por este receptor se inducen los mecanismos citocidas, con fusión de los lisosomas al fagosoma naciente y activación de la NADPH oxidasa (297), datos que concuerdan con los resultados presentados en esta tesis.

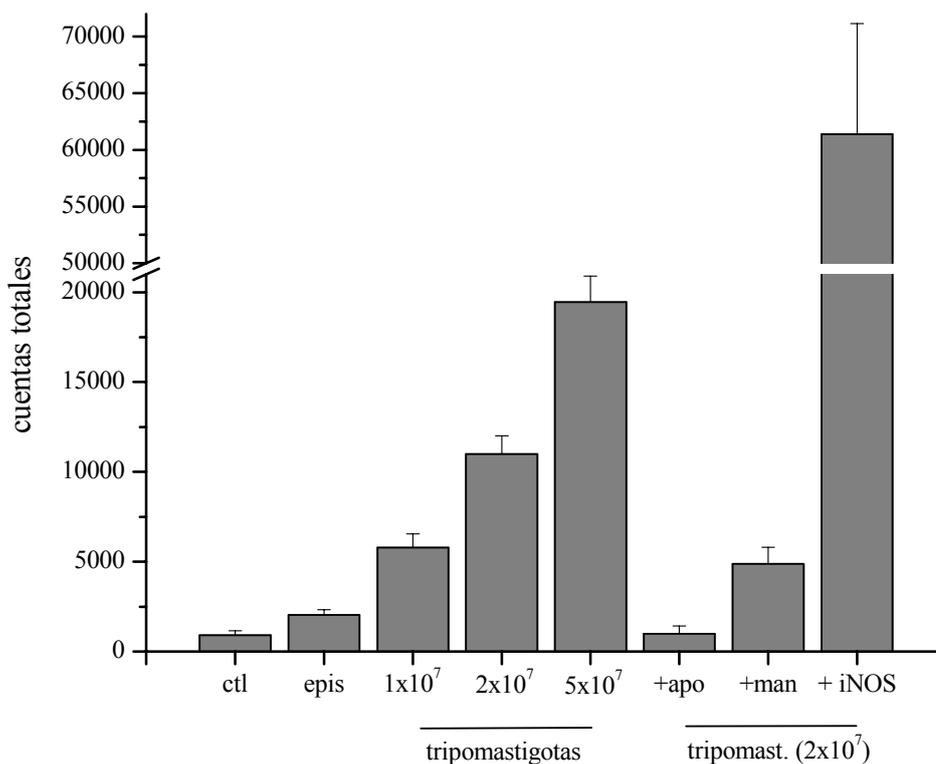


Fig.4.14 Producción de O₂⁻ por macrófagos expuestos a tripomastigotas de *T.cruzi*. Cuentas totales producidas durante los 100 minutos siguientes a la activación. Los macrófagos adheridos en placas de 24 pocillos (1 x 10⁶ /pocillo) fueron desafiados con epimastigotas (2 x 10⁷ /pocillo) y tripomastigotas (1, 2 y 5 x 10⁷ /pocillo). El agregado de apocinina (50 μM) y manosa (5 mM) inhiben la luminiscencia. En la condición iNOS los macrófagos fueron expuestos 5 horas antes del ensayo a IFN-γ y LPS.

Oxidación de Hidroetidio en la exposición a tripomastigotas.

El hidroetidio (HE), forma reducida por dos electrones del etidio (Etd⁺; 3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium), es internalizado rápidamente por las células y dentro de estas es oxidado a la forma Etd⁺ que se intercala en los ácidos nucleicos, aumentando así su fluorescencia (λ_{exc} = 518 nm y λ_{em} = 595 nm) (Esquema 4.4).

Hidroetidio (HE)

etidio (Etd⁺)

Esquema 4.4 Estructuras del Hidroetidio y el Etidio

Esta oxidación se atribuía al metabolismo celular no discriminando las especies oxidantes involucradas. En 1990, Rothe y Valet determinaron que el O₂⁻ así como el H₂O₂ en presencia de peroxidasas eran capaces de producir tal oxidación. El HE también es oxidado intracelularmente por oxidasas y citocromos, lo que determina que como la mayoría de las técnicas, no permita en principio discriminar el efecto del superóxido del de otros oxidantes (298).

Sin embargo en los últimos años se ha identificado que el producto de oxidación del HE por $O_2^{\cdot-}$ es distinto del Etd^+ , ya que se forma un producto hidroxilado (HO-Etd⁺), implicando la formación de un radical intermediario por la oxidación por un electrón del HE y la hidroxilación mediada por superóxido en el segundo paso. El OH-Etd⁺ y el Etd⁺ pueden ser separados por HPLC, permitiendo de esta manera la discriminación de las especies involucradas en el aumento de la fluorescencia. Este producto además presenta un shift en las λ de excitación y de emisión, siendo para el OH-Etd⁺ las longitudes de onda máximas diferentes que para el Etd⁺ (λ_{exc} OH-Etd⁺ = 480 nm y λ_{em} = 567 nm)(126,128).

En nuestro ensayo incubamos los macrófagos plaqueados en placas de 24 pocillos en dPBS con 100 μ M HE. La infección fue realizada con 3×10^7 parásitos por well en ausencia y en presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina. Realizamos también el control con zimosán opsonizado. Luego de una hora de incubación se lavaron los pocillos, se incubó una hora más a 37° C se midió la fluorescencia usando el lector de placas con el par de filtros: $\lambda_{exc} = 485 / \lambda_{em} = 555$. (Figura 4.15)

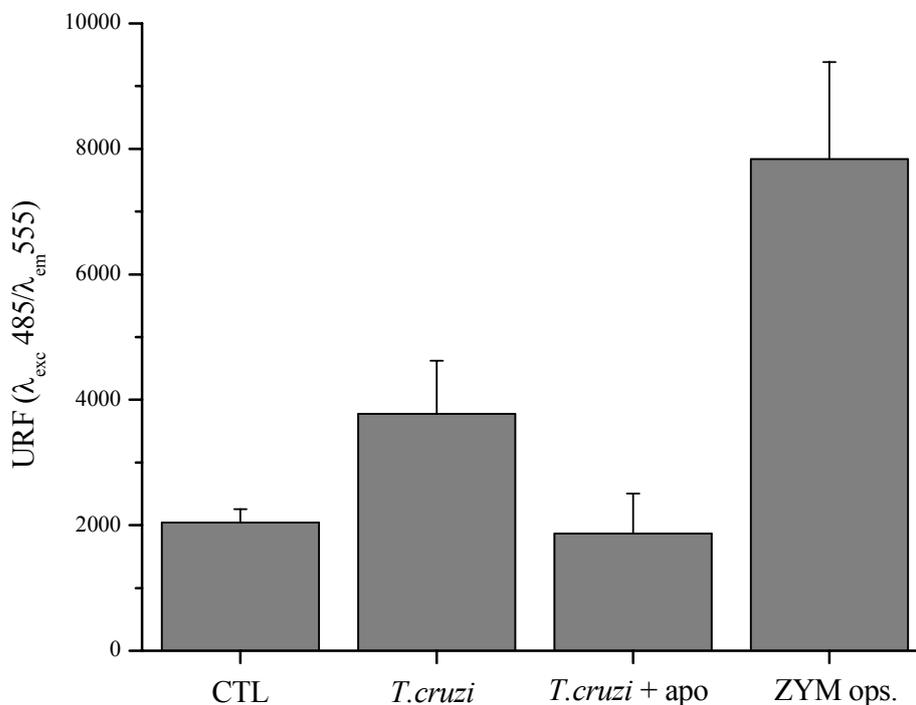


Fig.4.15 Oxidación de hidroetidio durante la infección de macrófagos con tripomastigotas metacíclicos. Los macrófagos adheridos (1×10^6 /pocillo) fueron expuestos a zimosán opsonizado o tripomastigotas (3×10^7 /pocillo) en presencia de 100 μ M de hidroetidio y en ausencia o presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina (50 μ M). La fluorescencia fue medida luego de 2 horas de incubación en un lector de fluorescencia en placas con los filtros λ_{exc} 485/ λ_{em} 555 (Fluostar-BMG)

En la Fig. 4.15 podemos observar se obtuvo una mayor fluorescencia en las células expuestas a los tripomastigotas que en las células control, y que ese aumento fue revertido por el agregado de apocinina. Como control positivo de la técnica usamos el zimosán opsonizado. No separamos los productos por HPLC para asegurarnos que el producto mayoritario fuera la forma hidroxilada (OH-Etd⁺), pero el control con zimosán y la inhibición con apocinina nos indican la participación de la NADPH oxidasa. Es interesante remarcar que no pudimos observar aumentos de la fluorescencia con el PMA, a pesar de que sabemos que genera una activación importante de la enzima, con la formación de mayores cantidades de superóxido que los estímulos fagocíticos. Como la producción de $O_2^{\cdot-}$ en la activación con PMA es hacia el espacio extracelular, los productos de oxidación por

$O_2^{\cdot-}$ del hidroetidio son generados en el medio extracelular. Probablemente en ese caso no alcancen fácilmente los ácidos nucleicos y se pierdan durante los lavados a los que son sometidas las células. La internalización de los tripomastigotas y del zimósán permite retener los productos de oxidación del HE facilitando su interacción con los ácidos nucleicos y el aumento de la fluorescencia.

De alguna manera este diferente comportamiento según la técnica utilizada nos acerca a la compartimentalización de las especies en nuestro modelo. Una observación similar obtuvimos del uso de otra técnica que es la reducción de una sal de tetrazolio, el azul de nitro-tetrazolio (NBT).

Reducción del azul de nitro-tetrazolio en la interacción tripomastigotas-macrófagos.

Dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ llevan a la reducción de la molécula de azul de nitro-tetrazolio (NBT) generando una molécula insoluble en medio acuoso, el formazán. El formazán es de un color azul oscuro que permite la visualización del sitio de formación del $O_2^{\cdot-}$ ya que precipita allí donde se forma (263) Esta técnica nos permite además de evaluar la activación de la NADPH oxidasa, observar la internalización de los parásitos por microscopía de contraste interdiferencial (DIC).

Los macrófagos plaqueados en portas divididos en pocillos fueron expuestos a tripomastigotas (1×10^7) en una solución de NBT (5mg/ml) en dPBS durante 15 y 30 minutos, en ausencia y presencia de apocinina (50 μ M). Luego del tiempo fijado, las células fueron fijadas y permeabilizadas, agregando DAPI para la identificación de los núcleos por microscopía de fluorescencia.

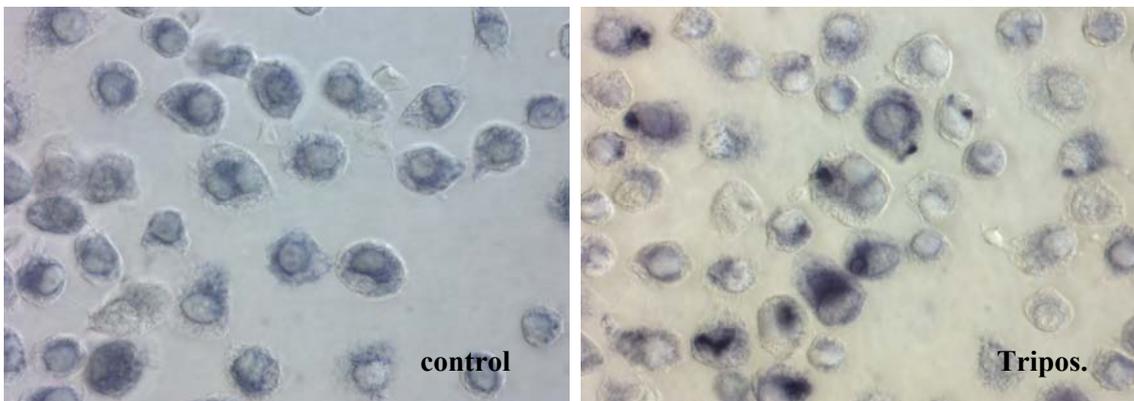


Fig.4.16 Reducción de NBT durante la interacción de macrófagos con tripomastigotas.

Macrófagos sin infectar (control) y expuestos a tripomastigotas metacíclicos (Tripos) durante 15 minutos en presencia de NBT. Se observan depósitos de formazán. (azul intenso) en la incubación con tripomastigotas. Microscopía Nomarski/ DIC. (100X)

En la Figura 4.16 se pueden observar los depósitos oscuros de formazán en los macrófagos incubados con los tripomastigotas. Si bien se observa una reducción homogénea del reactivo que se debe al metabolismo celular, en la condición de infección los depósitos son de color mas intenso y bien localizados, muy sugerentes de que correspondan a vacuolas fagocíticas. Para evidenciar la presencia de parásitos en los sitios de reducción del NBT, teñimos los núcleos con DAPI y utilizando la microscopía de fluorescencia colocalizamos los núcleos de los parásitos con los depósitos de formazán (Figura 4.17). Cuando los macrófagos fueron incubados con apocinina no se observan esos depósitos.

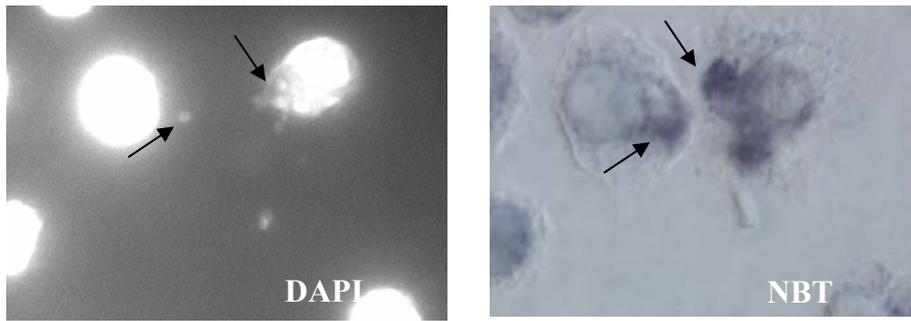


Fig 4.17 Colocalización de núcleos de parásitos internalizados con sitio de formación de superóxido. Imagen obtenida por microscopía de fluorescencia con la tinción de núcleos con DAPI (DAPI-panel izquierdo). Células con depósitos de formazán por microscopía Nomarski/ DIC. (100X) (NBT-panel derecho). Las flechas indican núcleos de parásitos con DAPI y depósitos de formazán en el mismo sitio.

4.2.2 Inducción de la Oxido Nítrico Sintasa y producción de óxido nítrico en la interacción del macrófago con *Trypanosoma cruzi*.

El rol del $\cdot\text{NO}$ en el control de la parasitemia, del crecimiento de los nidos de amastigotas en células no fagocíticas, así como en el éxito en la eliminación del parásito internalizado por macrófagos ha sido reportado desde que se identificó a este radical libre como uno de los mecanismos efectores durante la interacción entre el hospedero y patógenos (48,241,242,248,299,300). Sin embargo, en los últimos años, en algunos trabajos se ha planteado una posible modulación negativa por parte de *T.cruzi* sobre la inducción de la iNOS en la interacción de estos con los macrófagos (245,246), en analogía con lo que ocurre durante la infección de macrófagos con *Leishmania* (301-303). En el caso de *T.cruzi* este efecto de inhibición de la inducción de la iNOS del macrófago fue evaluado con la forma epimastigota y con cruzipaina (cisteinproteasa con propiedades inmunogénicas, de gran expresión en membrana de *T.cruzi* aislada de epimastigotas (245).

Para nuestro trabajo era importante definir que estaba ocurriendo durante la interacción de los macrófagos con las distintas formas de *T.cruzi* con las que trabajamos, ya que la si se inhibe la producción de $\cdot\text{NO}$, no hay formación de ONOO^- .

Para evaluar el efecto de la presencia de *T.cruzi* sobre la inducción de la iNOS y la producción de $\cdot\text{NO}$, estudiamos qué ocurre con la formación del mRNA, la expresión de la proteína y la producción de $\cdot\text{NO}$, cuando los macrófagos son expuestos a la forma epimastigota y tripomastigota de *T.cruzi*.

4.2.2.1 Producción de óxido nítrico en presencia de *T. cruzi*.

Para poder obtener formación simultánea de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ realizamos una pre-exposición de los macrófagos con inductores de la iNOS (IFN- γ y LPS) y 5 horas después (cuando se alcanza una producción constante de $\cdot\text{NO}$) realizamos la exposición al activador de NADPH oxidasa. Esta seguramente no sea la secuencia de eventos que ocurre durante la infección en todos los casos, ya que algunos macrófagos son infectados antes de que ocurra secreción de IFN- γ por las NK y linfocitos T (304), y otros si serán infectados luego de ser estimulados por las citoquinas. Estudiamos el efecto de la exposición a *T.cruzi* sobre la iNOS, cuando se incubaba con los parásitos al mismo tiempo que con los inductores o luego de las 5 horas, cuando la enzima ya está expresada.

La producción de $\cdot\text{NO}$ fue evaluada midiendo la acumulación de sus productos de oxidación, NO_2^- y NO_3^- , en el sobrenadante del cultivo y también viendo la producción en continuo usando el fluoróforo DAF-2DA que debido a la mayor sensibilidad de esta técnica nos permite evidenciar la cinética de la síntesis de $\cdot\text{NO}$.

Efecto de los tripomastigotas sobre la síntesis de óxido nítrico

La incubación de los macrófagos con la forma infectiva, tripomastigotas, incubados durante la inducción o luego de la misma, no genera inhibición en la producción de NO .

En el panel A de la Figura 4.19 se observa que la acumulación de NO_2^- en el sobrenadante del cultivo expuesto a las citoquinas en presencia de los parásitos es similar al de la condición de inducción sin *T.cruzi*. En los registros de oxidación del DAF-2 (panel B) observamos lo que ocurre en las primeras horas de producción de NO , con el mismo resultado, ya que el comportamiento en la condición en presencia de parásitos (trazo azul) es similar a lo que ocurre en ausencia de ellos (trazo rojo).

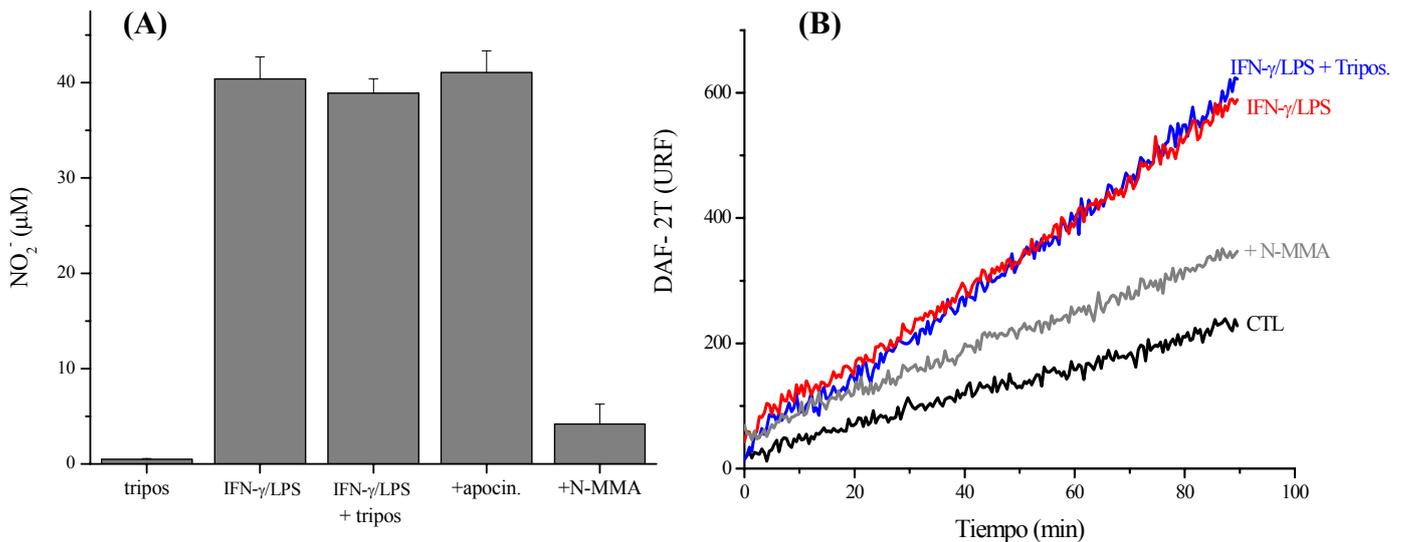


Fig 4.19 Producción de óxido nítrico en presencia de tripomastigotas de *T.cruzi*.

(A) Determinación de la $[\text{NO}_2^-]$ por la técnica de Griess en sobrenadante de macrófagos incubados con IFN- γ y LPS en presencia y en ausencia de tripomastigotas. Inhibición con N-MMA.

(B) Oxidación del DAF-2 por macrófagos expuestos a tripomastigotas (2×10^7) junto con las citoquinas inductoras de la iNOS (trazo azul)

Cuando la incubación se realiza en presencia del inhibidor de la iNOS (N-MMA), se inhibe casi completamente la producción de NO y la incubación con el inhibidor de la NADPH oxidasa (apocinina) no afecta la formación de NO .

La producción de NO es inhibida por lo tanto cuando los epimastigotas son incubados con los macrófagos al tiempo que se induce la iNOS, pero esto no ocurre con la forma infectiva. La inhibición con los epimastigotas no ocurre cuando estos interactúan con macrófagos que ya están produciendo NO , lo que indica que el efecto de estos parásitos es sobre la inducción de la proteína y no sobre su actividad. La inhibición por la forma epimastigota gana relevancia en lo que puede ocurrir en el momento de la infección del huésped vertebrado. Junto con las formas tripomastigotas pueden entrar a la circulación epimastigotas, que en contacto con los componentes del suero del huésped, mueren por apoptosis (305). La interacción de los epimastigotas con los fagocitos, podrían evitar la inducción de la iNOS y por lo tanto favorecer el crecimiento del patógeno (306).

4.2.2.2 Expresión de la iNOS en presencia de *T.cruzi*.

La expresión de la iNOS fue evaluada por inmunocitoquímica usando un anticuerpo anti NOS de ratón revelado con un anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Cy3. Los macrófagos fueron expuestos durante 6 horas a IFN- γ /LPS solos o en presencia de *T.cruzi* (epimastigotas o tripomastigotas) con una relación parásitos/macrófagos de 10:1.

En las fotos obtenidas por microscopía de fluorescencia se observa que en presencia de epimastigotas se inhibe la expresión de la iNOS y los tripomastigotas no afectan la inducción de la enzima (Figura 4.20)

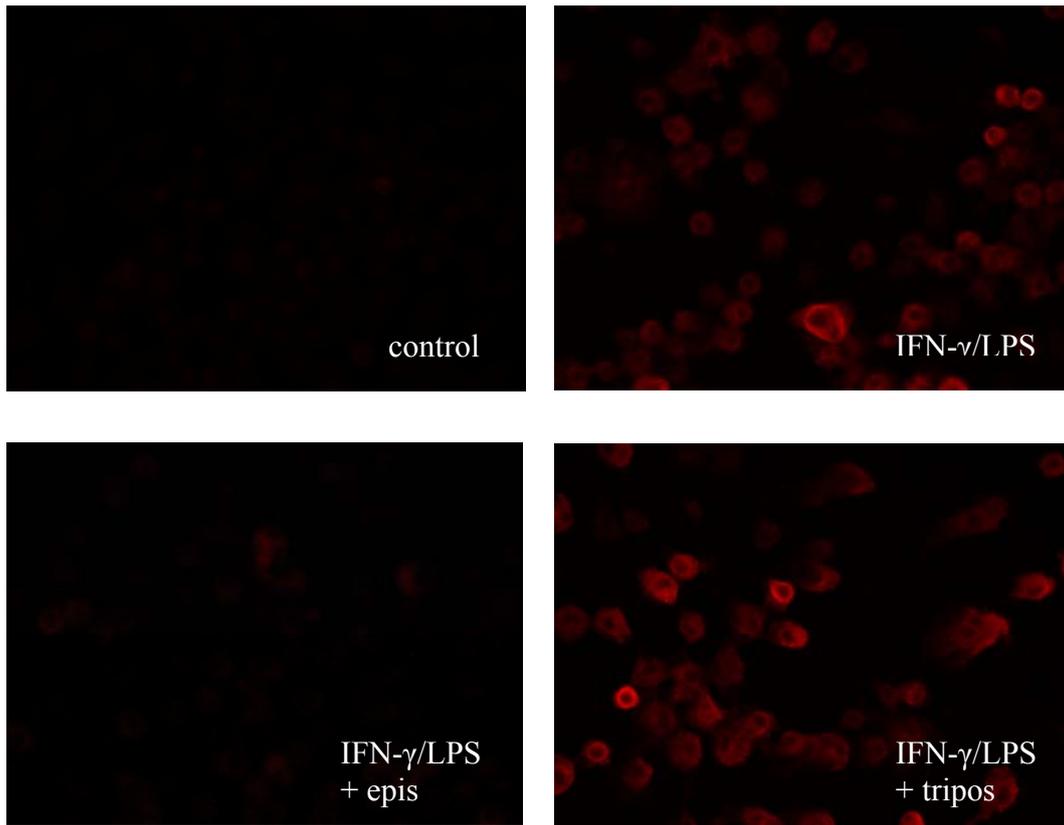


Fig 4.20 Expresión de la iNOS en macrófagos expuestos a *Trypanosoma cruzi*.

Macrófagos sin activar (control) y expuestos a inductores de la iNOS (IFN- γ /LPS), inductores junto a epimastigotas (+ epis) y tripomastigotas metacíclicos (+tripes) en relación 10:1. Luego de 6 horas , las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con el anticuerpo anti-iNOS (SIGMA) (1/100), revelado con un anticuerpo anti-conejo conjugado a Cy-3 (λ_{em} de 555nm) . Microscopía de fluorescencia (40X)

Los resultados en cuanto a la inducción de la enzima concuerdan con los obtenidos en la producción de \cdot NO. La presencia de los epimastigotas impide la inducción de la iNOS, pero cuando la inducción fue completada (luego de 5 horas de exposición a las citoquinas inductoras) no afectan la producción de \cdot NO (Fig. 4.20).

4.2.2.3 Expresión del mRNA de la iNOS en presencia de *T.cruzi*.

La regulación de la expresión de la iNOS puede deberse a la interferencia con las cascadas de activación desencadenadas por el IFN- γ y el LPS. Otros mecanismos reguladores de la expresión de la iNOS son afectar la estabilidad del mRNA, la traducción del mRNA o la estabilidad de la propia proteína, como se observa en macrófagos activados con IFN- γ expuestos a TGF- β 1 (63).

Los macrófagos fueron expuestos a los epimastigotas en relaciones parásitos: macrófago de 5:1 y 10:1 para analizar si la inhibición de la expresión de la enzima se correspondía con disminución en los niveles del mRNA (Fig 4.21).

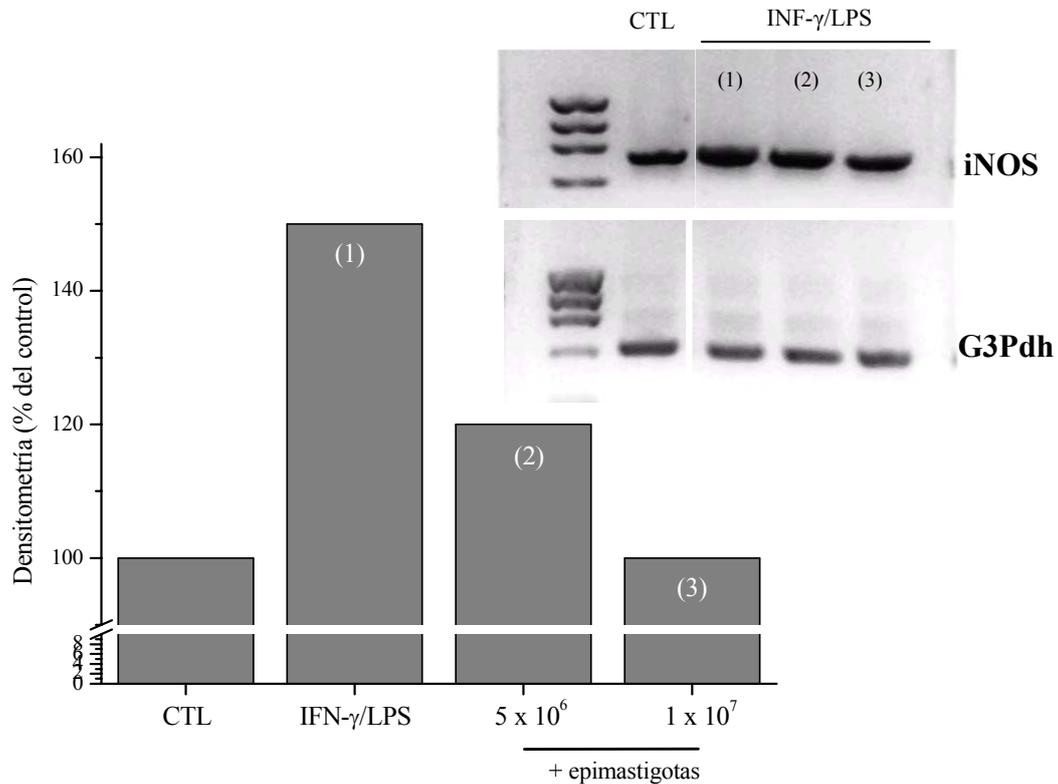


Fig. 4.21 Inhibición de la expresión del mRNA de la iNOS

Macrófagos en confluencia sin inductores de la iNOS (CTL) o expuestos durante 3 horas a IFN- γ y LPS en ausencia (1) o en presencia de 5×10^6 (2) o 1×10^7 (3) epimastigotas de *T.cruzi*. A partir del mRNA total, se obtuvo el cDNA y se usaron primers para la iNOS y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3Pdh) como control de la técnica. Los productos de PCR se separaron por electroforesis y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio (inserto). La densitometría de las bandas fue realizada usando Image JTM. Los resultados se expresan como porcentaje de inducción respecto a la condición control.

En la Figura 4.21 se observa la inhibición de la expresión del mRNA de la iNOS por la presencia de los epimastigotas durante la inducción de la enzima. Esa inhibición depende del número de parásitos, como se observó cuando se determinó la producción de ³NO (Figura 4.18).

Evaluamos también el nivel de expresión del mRNA de la iNOS en los macrófagos expuestos a los tripomastigotas de *T.cruzi* (Figura 4.22).

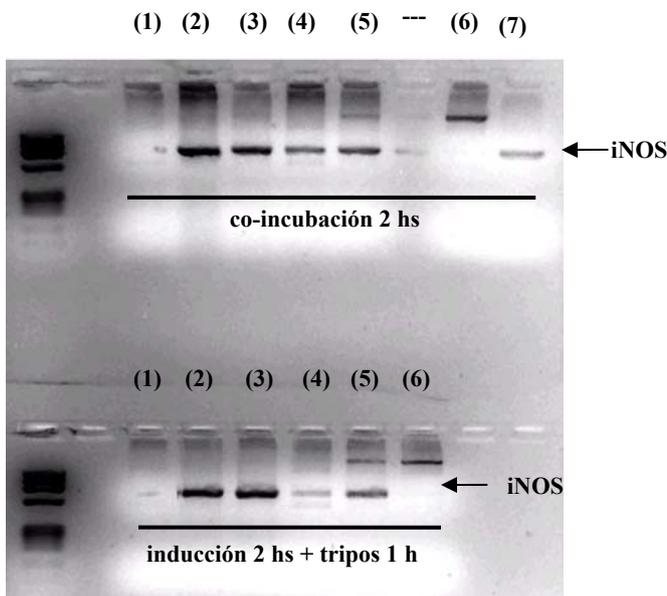


Fig.4.22. Expresión del mRNA de la iNOS en macrófagos activados en presencia de tripomastigotas.

La expresión del mRNA fue evaluada en macrófagos incubados con los inductores (IFN- γ , LPS) en presencia de tripomastigotas (1×10^7) (gel superior).

Macrófagos incubados 2 horas con los inductores de la iNOS y luego 1 hora más en presencia de los tripomastigotas. (gel inferior)

- (1) Control
- (2) IFN- γ /LPS
- (3) IFN- γ /LPS + tripomastigotas
- (4) IFN- γ
- (5) IFN- γ + tripomastigotas
- (6) tripomastigotas
- (7) LPS

La expresión del mRNA de la iNOS no es afectada por la presencia de los tripomastigotas cuando la inducción de la enzima es debida a la incubación con IFN- γ y LPS (carriles 2 y 3). El LPS potencia la activación mediada por IFN- γ activando vías de señalización diferentes (57). La incubación de los macrófagos inducidos por IFN- γ con los tripomastigotas muestra un aumento de la expresión del mRNA respecto a la condición sin parásitos (carriles 4 y 5). *T. cruzi* interacciona con los macrófagos a través del receptor TLR2 (de la familia de receptores tipo Toll) (entre otros) (53) induciendo la activación de las vías de NF- κ B y MAPK (228), al igual que ocurre durante la interacción del LPS con el mismo receptor. Cuando los macrófagos fueron expuestos a IFN- γ y LPS no se detecta un aumento en la expresión del mRNA posiblemente debido a la existencia de redundancia en la activación por parte de los parásitos y el LPS. Un trabajo publicado en el 2006 propone sin embargo, que la interacción con los tripomastigotas genera un aumento en la estabilidad del mRNA y que eso explica la mayor expresión en la condición con IFN- γ y tripomastigotas respecto la de sólo IFN- γ (249).

4.3 Toxicidad de peroxinitrito producido por macrófagos sobre *Trypanosoma cruzi*.

Estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio han mostrado que el peroxinitrito es efectivo en disminuir la viabilidad de los epimastigotas de *T. cruzi* (5), demostrando también que produce alteraciones en el metabolismo energético, afectando la respiración del parásito, disminuye los niveles de antioxidantes a través de una oxidación importante de los tioles de bajo peso molecular (trianotona y glutatión) (150). En nuestro trabajo buscamos establecer si la formación de peroxinitrito por los macrófagos durante la fagocitosis es suficiente para producir efectos citotóxicos sobre el parásito internalizado en la vacuola fagocítica.

4.3.1 Difusión y toxicidad del peroxinitrito sobre epimastigotas de *T. cruzi*

El peroxinitrito decae, por su protonación y homólisis, con una vida media de 2.7 s ($k = 0.26 \text{ s}^{-1}$) a 25 °C, pH 7.4 (105) por lo cual su toxicidad sobre una célula blanco es una función de la distancia que separa el sitio de formación del ONOO⁻ de la célula. Por lo tanto para definir la toxicidad de este oxidante, a diferencia de otros, hay que tener en cuenta la distancia que deberá recorrer antes de alcanzar un blanco, y cuánto es lo que realmente está llegando. Esto implica que en los estudios con parásitos expuestos a peroxinitrito sea importante la densidad de células que se exponen, ya que a mayor densidad, menor distancia debe recorrer y por lo tanto menos peroxinitrito se pierde por homólisis.

Además de la distancia, en un medio mas complejo, como es el medio extracelular, la toxicidad del peroxinitrito va a depender también de la presencia de otros blancos, entre los cuales se destaca el dióxido de carbono (CO₂) con una constante de reacción de $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 37°C, pH 7.4. En presencia de 1.3 mM de CO₂ (en equilibrio con 25 mM bicarbonato), el ONOO⁻ es consumido rápidamente, pudiendo alcanzar solamente blancos que se encuentren a distancias menores de 10-15 μm del sitio de formación.

4.3.1.1 Estudio *in vitro* de la toxicidad del peroxinitrito

Para obtener datos de dosis letal extrapolables a la situación del parásito dentro de la vacuola, se realizó un estudio de toxicidad del ONOO⁻ en función del número de epimastigotas en un medio sin CO₂ y con 1.3 mM CO₂ (25 mM HCO₃⁻), variando las densidades celulares entre 1×10^6 y 3×10^9 células/ml.

La correlación de las densidades celulares con las distancias promedio de difusión del ONOO⁻ está dada por la ecuación [27], propuesta para el cálculo de difusión de ONOO⁻ en suspensiones de glóbulos rojos (120).

$$\Delta x = r \sqrt{\frac{3}{4} \left(\sqrt[3]{\frac{4n\pi}{3}} \right)^2} - 1 \quad [27]$$

Donde: n = relación entre el volumen total y el volumen celular (V_t/V_{cel}), considerando el volumen de un epimastigota de 30 fl (307). Este modelo asume que las células blanco son esferas, lo que sabemos que no se cumple en el caso de los epimastigotas, sin embargo consideramos que este cálculo nos permite tener una idea aproximada de cuanto peroxinitrito efectivamente alcanza los parásitos para cada densidad celular.

Para cada distancia (es decir para cada densidad celular) se puede estimar la proporción de ONOO⁻ que llega ($[ONOO^-]_x/[ONOO^-]_o$) asumiendo el coeficiente de difusión del ONOO⁻ como similar al del nitrato (NO₃⁻), $D=1500 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (118).

Para realizar el cálculo se utilizó la siguiente ecuación, tomada del modelo de difusión en suspensiones de eritrocitos: $\ln \left[\frac{[ONOO^-]_x}{[ONOO^-]_o} \right] = \frac{-\ln 2 \cdot x^2}{2Dt_{1/2}}$, [28]

Considerando la vida media extracelular del ONOO⁻ de 2.7 s en ausencia de CO₂ y de 24 ms en presencia de 1.3 mM CO₂. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Distancia promedio de difusión y peroxinitrito efectivo para las distintas densidades celulares.

Cels/ml	V_{total}/V_{cel}	Δx (μm)	$[ONOO^-]_x/[ONOO^-]_o$ (%)	
			- CO ₂	+ CO ₂
1 x 10 ⁶	3.3 x 10 ⁴	85	53.9	0
5 x 10 ⁶	6.7 x 10 ³	50	80.7	0
1 x 10 ⁷	3.3 x 10 ³	39	87.8	0
5 x 10 ⁷	6.7 x 10 ²	23	95.6	0.6
1 x 10 ⁸	3.3 x 10 ²	18	97.3	4.4
5 x 10 ⁸	6.7 x 10 ¹	11	99.0	31.2
1 x 10 ⁹	3.3 x 10 ¹	8.3	99.4	51.5
3 x 10 ⁹	1.1 x 10 ¹	5.6	99.7	73.9

Los resultados experimentales mostraron que a mayor densidad de células, la dosis letal 50 (DL₅₀) (cantidad de ONOO⁻ que inhibe el 50% la incorporación de [³H]Thy) es mayor, sin embargo ese aumento no es proporcional al número de células. Esto depende de que cuando la distancia que debe recorrer el ONOO⁻ para alcanzar un blanco es menor, la proporción del ONOO⁻ inicial que alcanza los parásitos es mayor. Esto se desprende claramente de la tabla, por ejemplo en la condición sin CO₂ para una densidad celular de 1 x 10⁶ cél/ml, sólo el 50% es efectivo, mientras que a una densidad de 1 x 10⁹ casi el 100 % lo es.

Para poder comparar a distintas densidades celulares la cantidad de ONOO^- necesaria para el mismo efecto, los datos de DL_{50} fueron normalizados por el número de células (nDL_{50}). El análisis de esa nDL_{50} nos mostró que en ausencia de CO_2 para densidades celulares mayores de 5×10^7 ($\Delta x < 23 \mu\text{m}$), los valores tienden a parecerse (Fig.4.23), lo que concuerda con que el ONOO^- que alcanza las células para esas distancias es $> 95 \%$ (Tabla 4.2).

En presencia de CO_2 los valores de nDL_{50} son mucho mayores debido al rápido decaimiento extracelular del ONOO^- , por la reacción con el CO_2 . Para distancias menores de $10 \mu\text{m}$ los valores de nDL_{50} tienden a aproximarse (Fig 4.23, inserto).

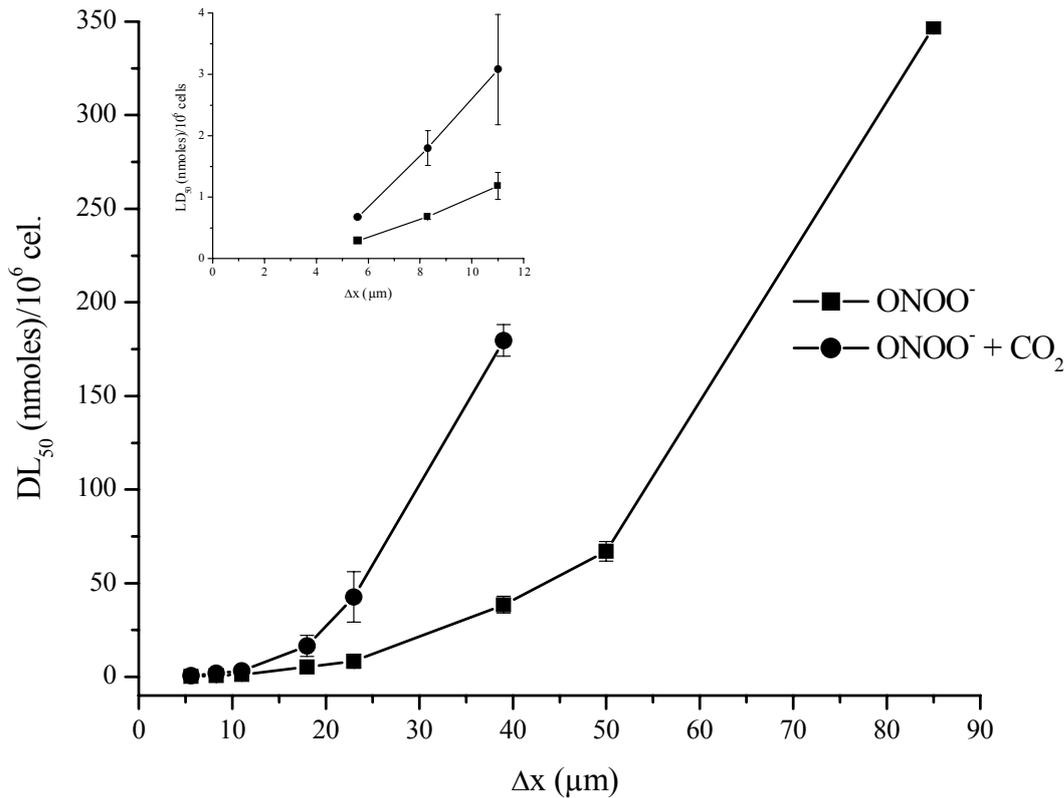


Fig.4.23 Relación entre las distancias de difusión y la toxicidad. Los epimastigotas (densidades entre 1×10^6 y 3×10^9 células/ml) fueron expuestos a distintas concentraciones de ONOO^- en PBS, pH 7.4 a 25°C en ausencia y en presencia de 25 mM HCO_3^- bajo agitación. La viabilidad para cada condición fue evaluada por la incorporación de $[^3\text{H}]$ Thy y el valor de DL_{50} determinado para cada densidad celular con y sin CO_2 . El valor normalizado de dosis letal (nDL_{50}) fue calculado dividiendo la DL_{50} por la densidad celular.

Cuando el *T. cruzi* es fagocitado, el peroxinitrito se genera directamente dentro de la vacuola, por lo tanto la distancia que debe recorrer es menor a $1 \mu\text{m}$. Esa distancia corresponde a densidades celulares mayores a 5×10^9 células/ml, muy difíciles de alcanzar experimentalmente.

A partir de la Figura 4.23 podemos determinar el valor de DL_{50} que corresponde a distancias menores a $5.6 \mu\text{m}$, como la que recorre el ONOO^- en el fagosoma. Ese valor es $< 0.3 \text{ nmol}/10^6$ céls, que corresponde a menos de $0.3 \text{ fmol}/T. cruzi$, valor similar a lo que estimamos se puede producir dentro del fagosoma en los 120 minutos que dura la formación simultánea de NO y O_2^- . En el fagosoma la concentración de CO_2 es similar a la del medio extracelular, pero como se puede observar en el inseto de la Figura 4.23 para distancias menores a $5 \mu\text{m}$, es de esperar que los valores de DL_{50} se vuelvan más similares, es decir que en esas distancias la presencia de CO_2 no afecte la llegada del ONOO^- al parásito.

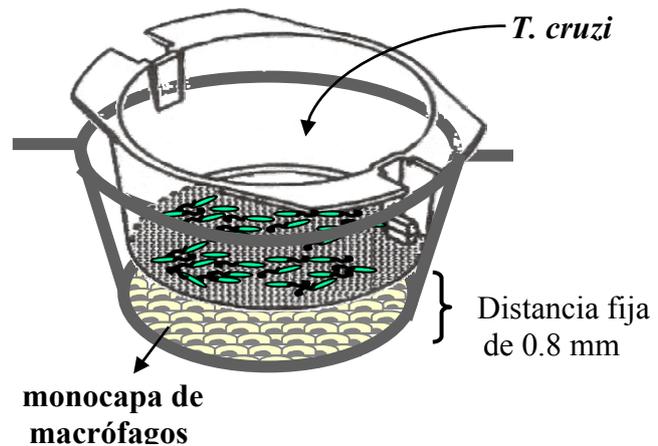
Estos datos nos permiten analizar los resultados obtenidos en la exposición de los parásitos a los macrófagos.

4.3.1.2 Difusión y toxicidad de peroxinitrito derivado de macrófagos

En una primera etapa utilizamos como modelo de célula blanco a la forma epimastigota de *T. cruzi*, haciendo la exposición a los macrófagos activados en dos sistemas diferentes: (1) sistema de insertos, en los cuales los dos tipos celulares están separados por una distancia fija de 0.8 mm (Esquema 4.6) y (2) sistema de co-cultivo, en el que los epimastigotas se encuentran en suspensión sobre la monocapa de macrófagos, con distancias variables y no controlable. En los dos sistemas de cocultivo evaluamos la difusión intercelular de las especies generadas por los macrófagos, evidenciando su llegada al interior del parásito por la oxidación de sondas pre-incorporadas y su toxicidad por inhibición de la replicación celular por incorporación de [³H]Thy.

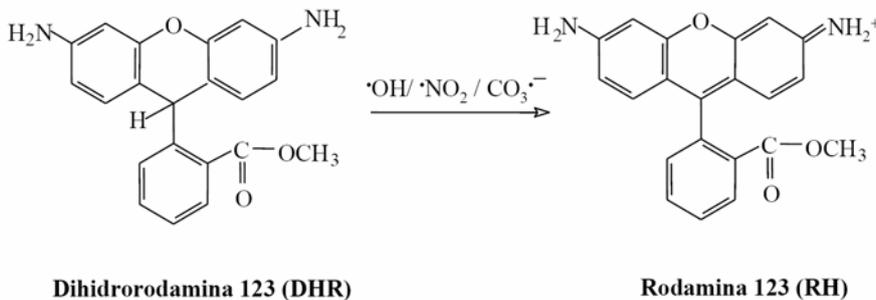
Esquema 4.6. Representación del sistema de insertos usados para la exposición de los epimastigotas de *T. cruzi* a macrófagos activados.

La membrana del fondo del inserto donde se colocan los parásitos es una membrana semipermeable con un poro de 0.4 μm que presenta baja adherencia a proteínas. Estos sistemas son ideales para el estudio de la difusión de las especies generadas por los macrófagos.



Oxidación de DHR intracelular.

La dihidrorodamina es una sonda no fluorescente que atraviesa libremente las membranas celulares y que puede ser oxidada por varios oxidantes que incluyen $\cdot\text{OH}$, sistema H_2O_2 /peroxidasa, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$ (124). El producto de la oxidación es la rodamina 123, molécula catiónica fluorescente que se acumula en las mitocondrias de las células debido a su carga (Esquema 4.7).



Esquema 4.7. Estructura y oxidación de la DHR.

La oxidación de la dihidrorodamina por la reacción con $\cdot\text{OH}$, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}_2$, que derivan de la descomposición del ONOO^- en ausencia o en presencia de CO_2

La oxidación de la DHR incorporada previamente en los parásitos indica la llegada del oxidante al citosol. Las células fueron incubadas durante 30 minutos con la sonda, lavadas y luego rápidamente expuestas a los sistemas generadores de oxidantes. La exposición a sistemas bioquímicos mostró una importante oxidación en los epimastigotas (3×10^8 cel/ml) expuestos a flujos equimolares simultáneos de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ ($0.5 \mu\text{M}/\text{min}$) (Fig 4.24). Cuando se exponen al dador de óxido nítrico, la oxidación de la sonda depende de la formación de $\cdot\text{NO}_2$ por la oxidación del $\cdot\text{NO}$, aunque esta reacción es poco probable considerando la reacción del $\cdot\text{NO}_2$ con los tioles intracelulares.

Cuando los parásitos fueron expuestos al sistema xantina oxidasa-hipoxantina, la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 generado por la enzima pueden oxidar al fluoróforo en presencia de las peroxidadas (125,308,309).

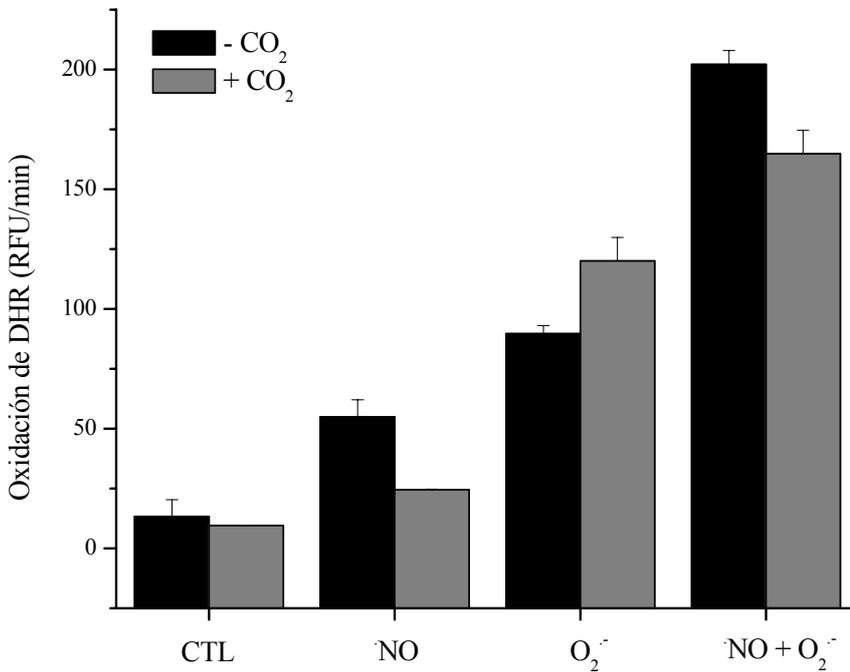


Fig 4.24. Oxidación de DHR en *T. cruzi* expuestos a flujos de $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot NO$.

Epimastigotas pre-cargados con DHR fueron expuestos a flujos de $0.5 \mu M/min$ de $O_2^{\cdot-}$ (formado por xantina oxidasa-hipoxantina), de $\cdot NO$ derivado del NOC12, o ambos en ausencia o presencia de $25 mM HCO_3^-$.

La presencia de CO_2 en el medio inhibió parcialmente la oxidación de DHR en la condición de formación de $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot NO$ (Fig 4.24). En un sistema libre de células no existe diferencias en la oxidación por flujos simultáneos de $O_2^{\cdot-}$ y $\cdot NO$ en ausencia o presencia de CO_2 (310), ya que el $CO_3^{\cdot-}$ generado en lugar del $\cdot OH$ oxida la DHR (124); esto indica que la inhibición observada en nuestro sistema depende de la difusión del $ONOO^-$, que una parte reacciona con el CO_2 fuera de la célula y no alcanza el medio intracelular.

Para evaluar la oxidación de la sonda por los oxidantes generados por los macrófagos utilizamos los dos sistemas de co-incubación de epimastigotas con macrófagos. Los macrófagos fueron estimulados para la producción de $\cdot NO$ y $O_2^{\cdot-}$, en ausencia y en presencia de CO_2 , se agregaron los parásitos precargados con la sonda y el aumento de la fluorescencia por oxidación de la DHR fue medido en el fluorímetro de placas tanto en el sistema de insertos como en el co-cultivo directo (Fig. 4.25).

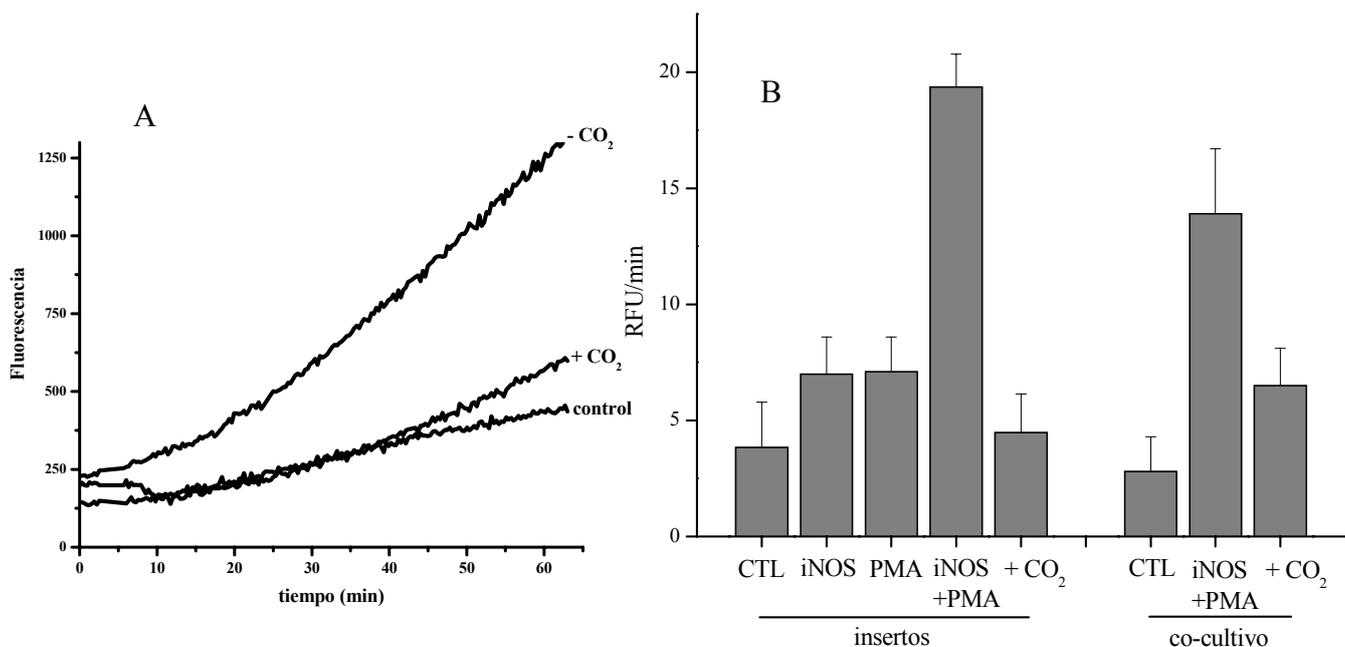


Fig 4.25 Oxidación de DHR intracelular por oxidantes generados por macrófagos. La oxidación de la sonda preincorporada en los epimastigotas fue medida desde el momento de la activación de la NADPH oxidasa con PMA. Los registros representados fueron obtenidos con el sistema de insertos. (- CO₂) es la condición de formación simultánea de *NO y O₂* en dPBS sin HCO₃⁻ y la condición (+ CO₂) es la misma en dPBS con HCO₃⁻ 25 mM (A). Velocidad de oxidación de DHR en el sistema de insertos y en el de co-cultivo para las distintas condiciones de activación de los macrófagos (B).

En los dos sistemas se observa un importante aumento de la fluorescencia en la condición de doble estimulación de los macrófagos que corresponde con la formación de ONOO⁻ (Fig 4.25).

La presencia de CO₂ inhibe la oxidación del fluoróforo cuando la especie involucrada es el ONOO⁻, evitando la llegada de los oxidantes al citosol del parásito. En los insertos la inhibición en presencia de CO₂ es mayor que en el sistema de cocultivo, lo que está de acuerdo con una mayor distancia entre el sitio de formación de los oxidantes y la sonda (Fig. 4.25).

Al finalizar la exposición, los epimastigotas del inserto y las placas con macrófagos y parásitos en contacto, fueron observados por microscopía de fluorescencia, para asegurarnos de la acumulación de rodamina 123 dentro del parásito. En la Figura 4.26 se puede observar a los epimastigotas tomados de los insertos, con mayor fluorescencia cuando los parásitos fueron expuestos a macrófagos activados para la producción de *NO y O₂*. En los preparados en que las células estaban en contacto se observa un aumento de la fluorescencia para la condición de inducción de la iNOS sin usar PMA para activar la NADPH oxidasa. Esto indica que la formación de superóxido en este caso depende de la activación sobre la enzima generada por la interacción con los epimastigotas.

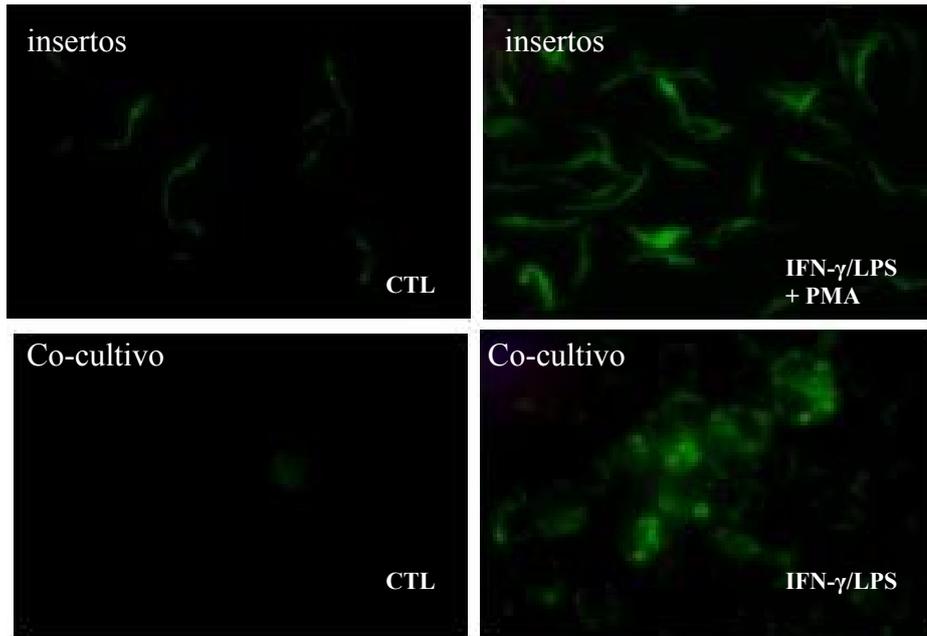


Fig 4.26 Oxidación de la DHR intracelular en *T.cruzi* expuestos a macrófagos activados. Microscopía de fluorescencia de los tripanosomas recuperados de los insertos (insertos) luego de la incubación sobre la monocapa de macrófagos no activados (CTL) y activados para generar $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ (IFN- γ /LPS + PMA). Los macrófagos adheridos en placas incubados con *T.cruzi* precargados con DHR sin activar (CTL) o pre-activados para la formación de $\cdot\text{NO}$ (IFN- γ /LPS) (co-cultivo).

Las imágenes fueron obtenidas en microscopio de fluorescencia con un aumento de 40 X.

Toxicidad del peroxinitrito derivado de macrófagos sobre epimastigotas

La toxicidad del ONOO^- derivado de macrófagos sobre *T.cruzi* fue evaluada por inhibición de la incorporación de timidina marcada con tritio ($[^3\text{H}]$ Thy) en los parásitos expuestos a macrófagos estimulados para la producción de $\cdot\text{NO}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ o de ambos. Los parásitos fueron expuestos a los macrófagos en los dos sistemas de cocultivo durante 2 horas (teniendo en cuenta que es aproximadamente el tiempo que dura la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$) en dPBS con o sin 25 mM HCO_3^- . La incubación de las placas se realizó a 37°C. En las condiciones sin CO_2 se incubaron las células en dPBS en estufa 37° C y en las condiciones con CO_2 se utilizó dPBS con 25 mM HCO_3^- y estufa de cultivo con 5% CO_2 . Finalizadas las dos horas los parásitos de cada condición fueron incubados con $[^3\text{H}]$ Thy durante 18 horas, midiendo la incorporación su incorporación en un contador de centelleo como medida de la proliferación del cultivo (tabla 4.3).

Tabla 4.3. Inhibición de la incorporación de [³H]Thy por *T.cruzi* expuestos a macrófagos activados.

Condición	% de incorporación [³ H]Thy		
	insertos		co-cultivo
	- HCO ₃ ⁻	- HCO ₃ ⁻	+ HCO ₃ ⁻
CTL	100 ± 12 ^a	100 ± 10 ^a	100 ± 9 ^a
iNOS	88 ± 11 ^a	92 ± 16 ^a	87.9 ± 3.6 ^a
PMA	87 ± 9 ^a	95 ± 23 ^a	108.7 ± 22 ^a
Los iNOS+PMA	70 ± 14	56 ± 22	69.2 ± 15

valores son promedios ± S.E. y ^a muestra las condiciones que presentaron una diferencia significativa con la condición (iNOS + PMA) de cada serie con un p<0.05 usando el test de Student-Newman-Keuls.

La incorporación de [³H]Thy mostró la mayor inhibición en la condición de formación de ONOO⁻, en los dos sistemas de cultivo. La inhibición alcanzó casi un 50% en la condición de co-cultivo de las células en contacto (Tabla 4.3). Esa toxicidad disminuyó cuando la incubación se realizó en presencia de CO₂ (~30%). Si bien en este sistema algunos parásitos van a estar en contacto con el macrófago, con lo cual son distancias en que el CO₂ no afecta su llegada, otras se encuentran a distancias mayores.

4.3.2 Difusión y toxicidad del peroxinitrito sobre tripomastigotas de *T.cruzi*

4.3.2.1 Internalización de tripomastigotas

La interacción entre el tripomastigota y el macrófago involucra moléculas de membrana de ambos tipos celulares y lleva a la formación de la vesícula de internalización. En su primera etapa el fagosoma naciente corresponde a extensiones de la membrana plasmática del macrófago, luego sufre un proceso de maduración que implica la fusión con otras estructuras membranosas como son los endosomas y lisosomas. Esas fusiones van generando una vacuola de mayor tamaño, con características particulares. Durante ese proceso de maduración el pH del fagosoma va disminuyendo. Ese descenso se asocia a la fusión con los lisosomas, que contienen en su membrana H⁺-ATPasas (del tipo de ATPasas V), proteínas a las cuales se atribuye la mayor responsabilidad en la acidificación de la vacuola fagocítica.

Es interesante remarcar que existen estrategias de supervivencia de varios microorganismos que implican la inhibición de la maduración del fagosoma.

Internalización de T.cruzi y formación del fagolisosoma

En el caso del *Trypanosoma cruzi*, se describió que la interacción con el macrófago lleva a que los lisosomas se agreguen en el sitio donde se une el parásito, uniéndose al fagosoma naciente en un mecanismo dependiente del aumento de Ca^{2+} intracelular. La aparición de vacuolas con menor pH nos permite evidenciar la fagocitosis de los tripomastigotas. La sonda utilizada para evidenciar la formación del fagolisosoma es el LysoTracker, que consiste en un fluoróforo unido a una base débil que se encuentra parcialmente protonada a pH 7.4. Esta sonda atraviesa libremente la membrana celular y se concentra en las vesículas de menor pH.

En la Figura 4.27 se observa que el patrón de distribución del LysoTracker es claramente distinto en los macrófagos sin infectar (control) que en los macrófagos expuestos a los tripomastigotas (infección). En esta condición se observan puntos donde se acumula mayor concentración del fluoróforo, que corresponden a fagolisosomas.

Para evidenciar la presencia de tripomastigotas en esos fagosomas, cargamos los parásitos con 5-(6)-carboxifluoresceína diacetato para ver si colocalizaban con las vesículas cargadas de lysotracker. En la Figura 4.28 mostramos que donde se observan los parásitos cargados con carboxifluoresceína (verde) coincide con zonas de mayor acumulación del marcador lisosomal (rojo).

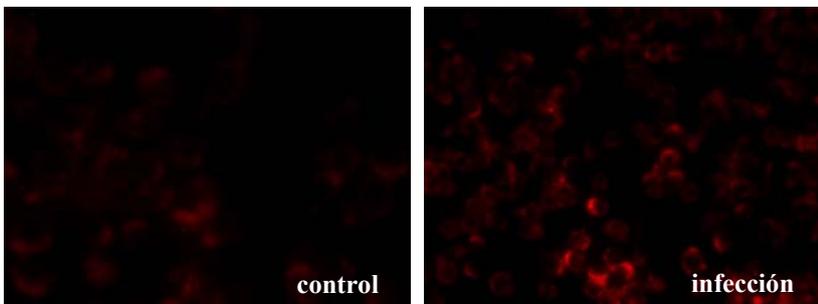


Fig 4.27 Formación de fagosomas en la interacción macrófagos-tripomastigotas.

Los macrófagos fueron infectados con tripomastigotas (infección) en presencia del marcador lisosomal LysoTracker (100 nM). La acumulación de la sonda fluorescente indica la presencia de vesículas de menor pH en el interior de las células. En la condición control (sin infección) no se observa acumulación del fluoróforo.

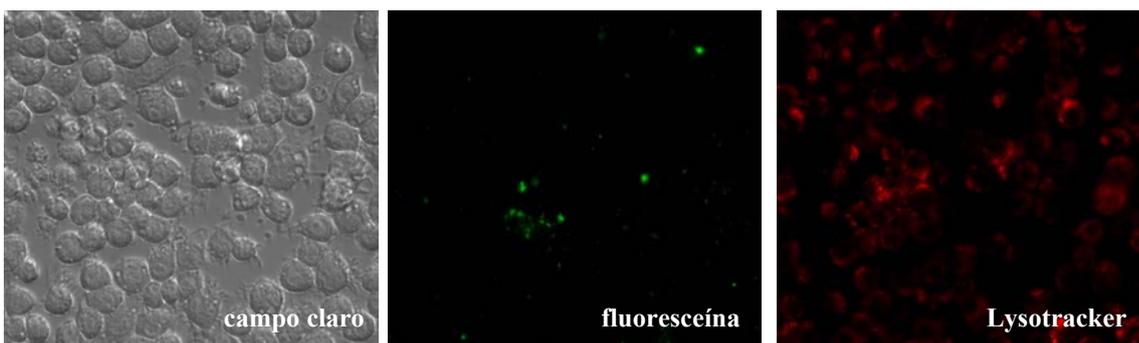


Fig 4.28 Colocalización de tripomastigotas y fagosomas.

Los macrófagos fueron infectados con tripomastigotas precargados con fluoresceína en presencia del marcador lisosomal LysoTracker. Los preparados fueron analizados por microscopía de fluorescencia con los filtros correspondientes a la fluorescencia de la fluoresceína ($\lambda_{\text{exc}}=492$ nm, $\lambda_{\text{em}}=518$ nm) y del marcador lisosomal ($\lambda_{\text{exc}}=577$ nm, $\lambda_{\text{em}}=590$ nm).

Participación de actina durante la fagocitosis.

Las proteínas del citoesqueleto participan en la generación del fagosoma. Debido a la interacción receptor-ligando se dispara en el vértice del fagosoma una polimerización local de actina. Esos

polímeros de actina son transitorios y para visualizarlos usamos a la faloidina marcada con rodamina. La faloidina es una toxina peptídica derivada del hongo *Amanita phalloides*, que se une fuerte y específicamente a la actina polimerizada. La unión estabiliza los filamentos previniendo la disociación de los monómeros en los extremos. Los derivados fluorescentes permiten visualizar la formación de esos polímeros y se usan frecuentemente como forma de identificar y cuantificar el proceso. Los preparados que se observan en la Figura 4.29 fueron fijados a los 20 minutos de hecha la infección. Cuando se incubó con RH-faloidina un cultivo luego de 24 hs de infección no se observan los parches, siendo la distribución del fluoróforo similar a la condición sin infección.

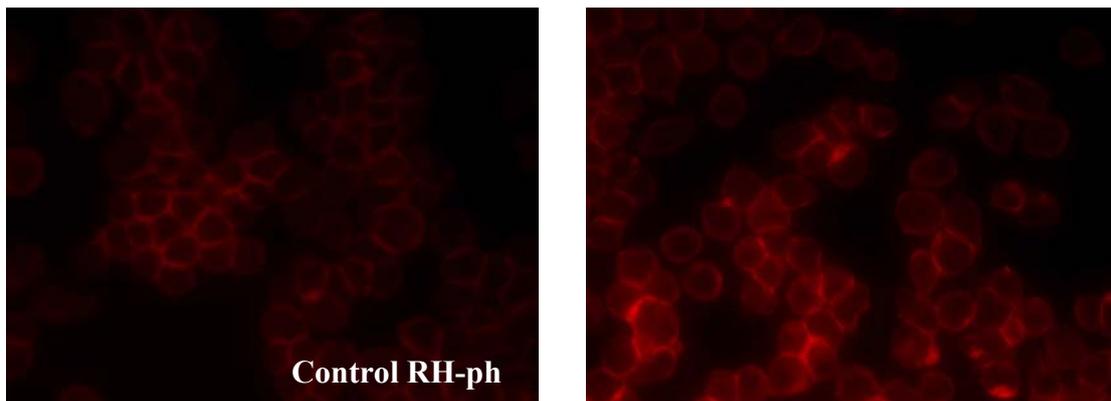


Fig 4.29 Polimerización de actina en macrófagos durante la infección con *T.cruzi*.

Macrófagos expuestos a tripomastigotas fueron incubados con faloidina-RH (1/100) 20 minutos después de la infección. Los preparados fueron analizados por microscopía de fluorescencia con los filtros correspondientes a la fluorescencia de la rodamina.

4.3.2.2 Difusión y toxicidad del peroxinitrito en el fagosoma.

Los macrófagos infectados con los tripomastigotas de *T.cruzi* y preestimulados con citoquinas forman NO en forma similar a los macrófagos sin infectar. Además observamos que se produce estallido respiratorio durante esa interacción. La generación simultánea de estos dos radicales lleva a la producción del ONOO^- , lo que fue evidenciado en forma indirecta en los ensayos de luminiscencia realizados en estos cultivos.

Para evidenciar que el ONOO^- que se está formando en estas condiciones alcanza el parásito fagocitado, decidimos evaluar a través de distintas técnicas la llegada del oxidante, con la oxidación intracelular de la DHR y su toxicidad mediante el estudio de la lisis y conteo de parásitos intracelulares en las diferentes condiciones de infección. Finalmente, realizamos ensayos de inmunocitoquímica para detectar nitrotirosina en macrófagos infectados con tripomastigotas.

Difusión del peroxinitrito en el fagosoma.

Para evaluar la llegada del ONOO^- a los parásitos incluidos en las vesículas fagocíticas, cargamos a los tripomastigotas con DHR antes de la infección, realizamos la incubación en placas de cultivo que centrifugamos para coordinar la infección. Levantamos sobrenadantes luego de 15 minutos y lavamos el cultivo para descartar los parásitos no internalizados. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a 37°C , y luego de lavarlas se determinó la fluorescencia de cada pocillo en el lector de fluorescencia en placas (Fluostar). Como no existe la condición control (sin formación de NO ni $\text{O}_2^{\cdot-}$) ya que la presencia de los tripomastigotas genera la activación de la NADPH oxidasa, para diferenciar la oxidación del fluoróforo dependiente de la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (o H_2O_2) de la oxidación basal que ocurre durante la incubación usamos la apocinina que impide la activación de la NADPH oxidasa (Fig 4.30). Observamos que no existe una oxidación detectable dependiente del estallido respiratorio en nuestro sistema. La mayor fluorescencia se detecta cuando los macrófagos fueron pre-activados para la inducción de la NOS, y ese aumento es inhibido por la apocinina (Fig.

4.30), que impide la activación de la NADPH oxidasa, pero no modifica la formación de $\cdot\text{NO}$ (Fig. 4.19).

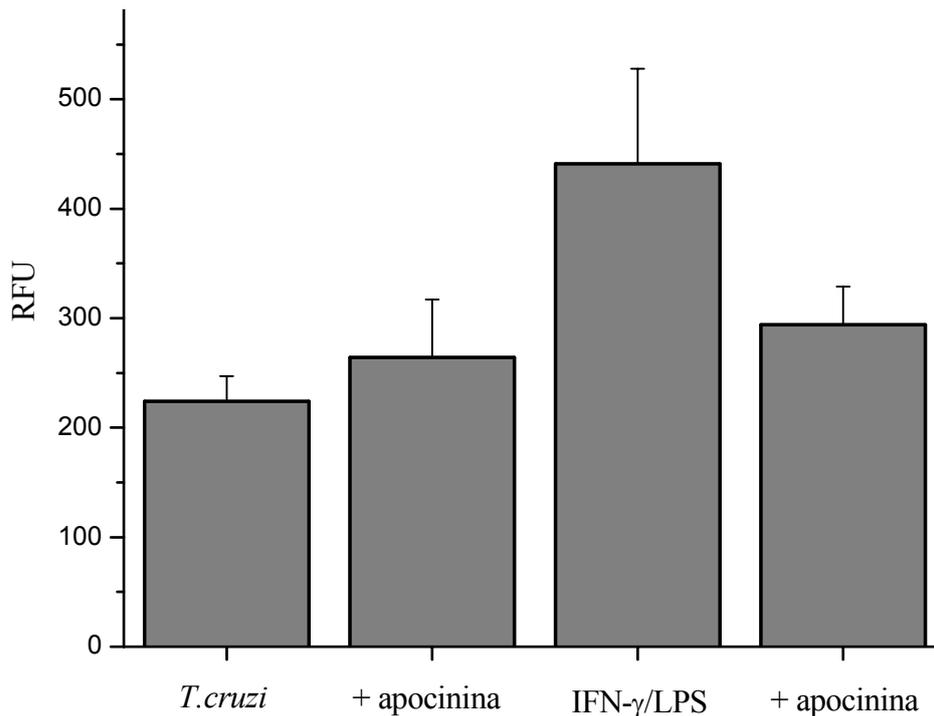


Fig. 4.30 Oxidación de DHR intracelular durante la *T. cruzi* fagocitosis.

Macrófagos infectados con tripomastigotas precargados con DHR. Determinación de la fluorescencia de la RH a las 2 horas de realizada la infección en el fluorímetro de placas, con los filtros con λ_{exc} 485 nm y λ_{em} 520 nm. (Fluostar).

Como habíamos determinado en los cocultivos con la forma epimastigota, el ONOO^- derivado de los macrófagos activados difunde al interior de los parásitos, oxidando la DHR. En este caso el proceso ocurre dentro del fagosoma.

Toxicidad del peroxinitrito en el fagosoma.

Para evaluar los efectos del ONOO^- sobre la viabilidad del parásito utilizamos dos estrategias experimentales: por un lado evaluar la capacidad de infección de estos parásitos en cultivos de macrófagos en las distintas condiciones de activación y por otro la lisis de los tripomastigotas incorporados a través de la liberación de uridina radiactiva.

Infección en macrófagos. Los niveles de infección fueron determinados realizando incubaciones de macrófagos con tripomastigotas en una relación 10 parásitos/macrófago. Los macrófagos fueron infectados en condiciones basales o sin activar (control) y activados para la inducción de la iNOS con IFN- γ y LPS 5 hs antes del agregado de los parásitos. En algunos de los experimentos se evaluó también el efecto de la inhibición de la NADPH oxidasa con apocinina. El cultivo se mantuvo durante 24 o 72 hs y luego de ese tiempo las células fueron fijadas e incubadas con DAPI (sonda fluorescente que se une al ADN) que permite visualizar los núcleos de los macrófagos y de los parásitos internalizados y contarlos. De cada condición y en cada experimento se tomaron ~ 30 fotos de la fluorescencia del preparado con un aumento de 100X (ya que en aumentos menores no se detecta la fluorescencia de los núcleos de los parásitos), promediando para el análisis de cada condición las fotos de por lo menos 3 experimentos. En la Tabla 4.4 se muestran los resultados del conteo de parásitos intracelulares en macrófagos sin activar, activados para la inducción de la iNOS o expuestos a apocinina para inhibir la NADPH oxidasa.

En el caso de los macrófagos control los parásitos estuvieron expuestos a la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por la NADPH oxidasa que se activa localmente por la interacción con el tripomastigota. Para evaluar el efecto del $\text{O}_2^{\cdot-}$ y del H_2O_2 generados en esa situación se infectaron macrófagos preincubados con

apocinina. No vimos diferencia en el número de parásitos/ macrófago entre esas dos condiciones. Cuando los macrófagos infectados tenían la NOS inducida se observó a las 24 horas una disminución de un 60 % en el número de parásitos intracelulares.

Para confirmar que el efecto observado depende de la formación local de ONOO⁻ y no exclusivamente de la formación de [•]NO que posee propiedades citostáticas, incubamos macrófagos con la NOS inducida en presencia de apocinina. En este caso el número de parásitos fue similar al de la condición control (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Toxicidad del peroxinitrito generado por macrófagos sobre *T.cruzi* fagocitados.

condición	24 hs	72 hs
CL-Brener	0.37 ± 0.13	0.26 ± 0.09
CL-Brener + apocin.	0.38 ± 0.12	nd ^a
CL-Brener + iNOS	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.07
CL-Brener + iNOS + apocin.	0.33 ± 0.14	nd ^a

Los valores corresponden al número de parásitos/célula, con un promedio de 500 macrófagos contados por condición en cada experimento. ^a nd.(no determinado).

Liberación de [³H] uridina. Los tripomastigotas fueron incubados en un medio en presencia de [³H] uridina, que se incorpora al pool de nucleótidos y RNA de los parásitos, y se libera al medio extracelular cuando hay pérdida de la integridad de membrana. La toxicidad del ONOO⁻ depende de efectos sobre varios blancos intracelulares, daño sobre proteínas por la reacción con centros metálicos, oxidación de sulfhidrilos o nitración de tirosinas, daño sobre el ADN y en membranas por la oxidación de lípidos. Como no existen datos de la toxicidad de oxidantes sobre la forma tripomastigota *in vitro*, realizamos exposiciones de estos parásitos a ONOO⁻ y flujos de [•]NO y O₂^{•-}. Los tripomastigotas fueron expuestos a ONOO⁻ en bolos y al sistema xantino oxidasa/ hipoxantina (O₂^{•-} y H₂O₂) + NOC 18 ([•]NO). En la Figura 4.31 se observa la liberación de [³H] uridina en cada condición. En la condición de exposición a flujos de [•]NO y O₂^{•-} se observa mayor toxicidad que en la exposición al bolo de ONOO⁻. Esto concuerda con lo que ocurre en la toxicidad sobre epimastigotas determinado por incorporación de timidina, sin embargo en este caso hay que considerar que puede estar afectando también la integridad el H₂O₂ generado por la enzima.

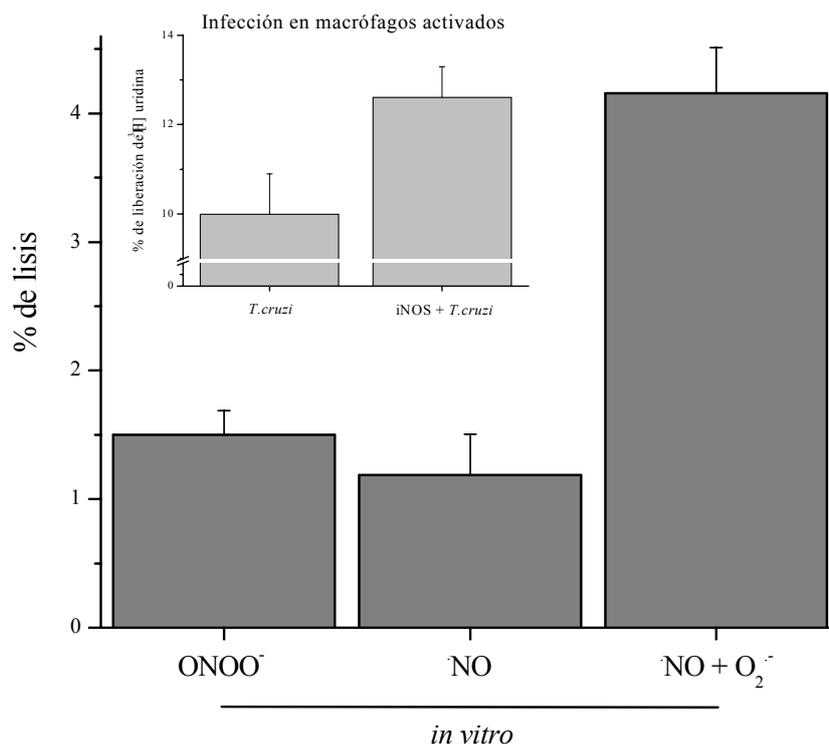


Fig.4.31 Liberación de [³H] Uridina por tripomastigotas expuestos a ONOO⁻.

Exposición de tripomastigotas (5×10^8 céls/ml) a ONOO⁻ (500 μ M), NOC18, (NO) y XO/HX más NOC18 (NO + O₂⁻) con flujos equimolares de 10 μ M/min durante 50 minutos. Inseto: Infección de macrófagos sin activar (*T. cruzi*) y con la iNOS inducida (iNOS + *T. cruzi*) con parásitos precargados con [³H] uridina.

$$\% \text{ de liberación de } [^3\text{H}] \text{ Uridina} = \frac{\text{radiactividad en el sde}}{\text{radiactividad total}} \times 100$$

El % de lisis de los experimentos *in vitro* corresponde a: % de lisis de cada condición - % de lisis espontánea (parásitos sin tratar)

Para evaluar el daño producido durante la fagocitosis realizamos la infección con tripomastigotas precargados de [³H] uridina y se determinó la liberación de la sonda al medio extracelular luego de las dos horas de incubación con macrófagos sin activar y macrófagos pre-activados para la producción de NO (Fig. 4.31, inserto). En la exposición a macrófagos se evidencia que la efectividad de la producción simultánea de NO y O₂⁻ mayor que la de sólo O₂⁻ que se genera cuando no está activada la iNOS.

La toxicidad determinada por esta técnica no es comparable con los datos de epimastigotas medidos como incorporación de [³H] timidina, debido a que con la liberación de uridina se evidencia exclusivamente el daño sobre la integridad de membrana en el tiempo en que se realiza la exposición. En determinaciones que realizamos por la técnica de reducción de MTT (como indicador de poder reductor) observamos en forma preliminar que la sensibilidad de tripomastigotas y epimastigotas al ONOO⁻ es similar.

Detección de nitrotirosina en macrófagos infectados con T. cruzi.

Originalmente, la nitración de residuos de tirosina se atribuyó a los radicales derivados del peroxinitrito ([•]NO₂ y [•]OH) o aquellos provenientes de la reacción del peroxinitrito con el CO₂ ([•]NO₂ y CO₃^{•-}). De hecho el primer reporte de nitración de tirosina en sistemas biológicos, fue realizado con macrófagos activados (146). Rutas alternativas de nitración de tirosina involucran hemoperoxidasas (ej. MPO), H₂O₂ y NO₂⁻. Este mecanismo de nitración es relevante en sistemas donde hay neutrófilos presentes dado que liberan durante la activación y degranulación grandes cantidades de MPO. Si bien existen reportes ambiguos en la literatura sobre la presencia de esta enzima en macrófagos, no hemos detectado actividad MPO en la línea de macrófagos utilizada en este trabajo.

Macrófagos control (CTL) y macrófagos pre-incubados con los inductores de la NOS (IFN- γ /LPS) fueron infectados con tripomastigotas durante 2 horas (Fig 4.32). En esas dos horas es que se forma la mayor parte del ONOO⁻ por parte de los macrófagos, y no hay en ese tiempo acumulación de NO₂⁻ (por la oxidación del *NO) que favorecería la nitración catalizada por peroxidadas.

En estos experimentos observamos en forma consistente que la fluorescencia dependiente de la presencia de nitrotirosina es mayor en la condición de activación de la iNOS. En el panel B de la Fig 4.32, se observa una distribución no homogénea de la tinción, que podría corresponder a la formación localizada de las especies nitrantes.

En el panel C mostramos una foto procesada de modo de poder observar si esos sectores de fluorescencia más intensa coinciden con la localización de los núcleos de los parásitos. Podemos observar que en los sitios de acumulación de NO₂-Tyr generalmente se observan núcleos de parásitos. Para confirmar esto tenemos planificado realizar la inmunodetección de NO₂-Tyr usando la técnica de microscopía electrónica.

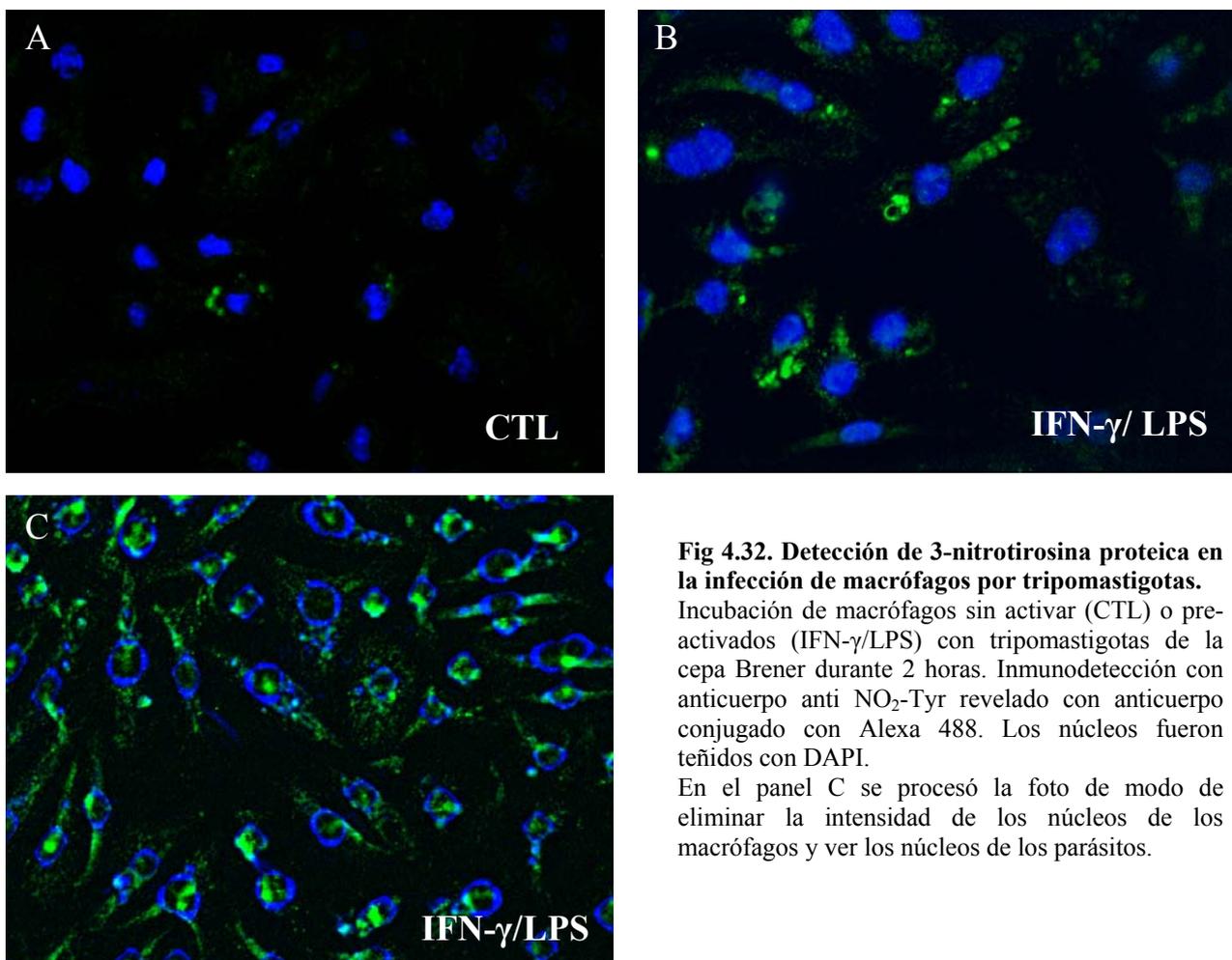


Fig 4.32. Detección de 3-nitrotirosina proteica en la infección de macrófagos por tripomastigotas.

Incubación de macrófagos sin activar (CTL) o pre-activados (IFN- γ /LPS) con tripomastigotas de la cepa Brener durante 2 horas. Inmunodetección con anticuerpo anti NO₂-Tyr revelado con anticuerpo conjugado con Alexa 488. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

En el panel C se procesó la foto de modo de eliminar la intensidad de los núcleos de los macrófagos y ver los núcleos de los parásitos.

4.3.3 Rol de las peroxirredoxinas en la protección del *Trypanosoma cruzi*

Las peroxirredoxinas constituyen una familia de proteínas con actividad peroxidasa, que catalizan la reducción del H₂O₂, peróxidos lipídicos y del ONOO⁻ (194,311,312). Estas enzimas requieren de residuos de cisteína para su función y se reconocen dos grupos según el número de cisteínas que participan de la catálisis, de una cisteína (1-Cys Prx) y de dos cisteínas (2-Cys Prx). La triparredoxina peroxidasa citosólica (CPX) forma parte del grupo de peroxirredoxinas de dos cisteínas, y su mecanismo catalítico consta de un primer paso en que la cisteína peroxidásica

reacciona con el sustrato (H_2O_2 , ONOO^-) siendo oxidado su sulfhidrilo (Cys-SH o Cys-S^-) a la forma sulfénico (Cys-SOH) y un segundo paso de resolución dependiente de la segunda cisteína de la otra subunidad, en que se forma un puente disulfuro intercatenario. Ese disulfuro es reducido luego por la triporredoxina, completando el ciclo catalítico (311).

En el marco de una colaboración con el laboratorio del Dr. Shane Wilkinson (London School of Hygiene and Tropical Medicine de Londres) obtuvimos para evaluar en nuestro modelo cepas de *T. cruzi* que sobreexpresan las peroxirredoxinas citosólica y mitocondrial (CPX y MPX), en las que se describió mayor resistencia con respecto a la cepa salvaje en la exposición a H_2O_2 y a *t*-butilhidroperóxido(199).

Estos sobreexpresantes nos permiten evaluar nuestra hipótesis de la toxicidad mediada por peroxinitrito durante la infección de *T. cruzi* a macrófagos, analizando la protección de esa sobreexpresión sobre los efectos generados durante la interacción con macrófagos activados.

4.3.3.1 Protección en epimastigotas que sobreexpresan peroxirredoxinas.

La exposición de las formas epimastigotas de estas cepas a ONOO^- resultó en una mayor sobrevida para estos sobreexpresantes, además de una menor oxidación de la DHR incorporada en los parásitos. Para evaluar los efectos del ONOO^- derivado de macrófagos usamos el sistema de cultivo y determinamos la viabilidad de las diferentes cepas por incorporación de [^3H] timidina, además de las diferencias en la oxidación de DHR.

Protección de la oxidación de DHR

Los epimastigotas de las distintas cepas fueron incubados con DHR para su incorporación en el citosol y luego expuestos a bolos de ONOO^- a una densidad de 3×10^8 células/ml, densidad a la cual la distancia entre las células es de $12.5 \mu\text{m}$ y como son experimentos en ausencia de CO_2 aproximadamente el 98% del ONOO^- llega a los parásitos.

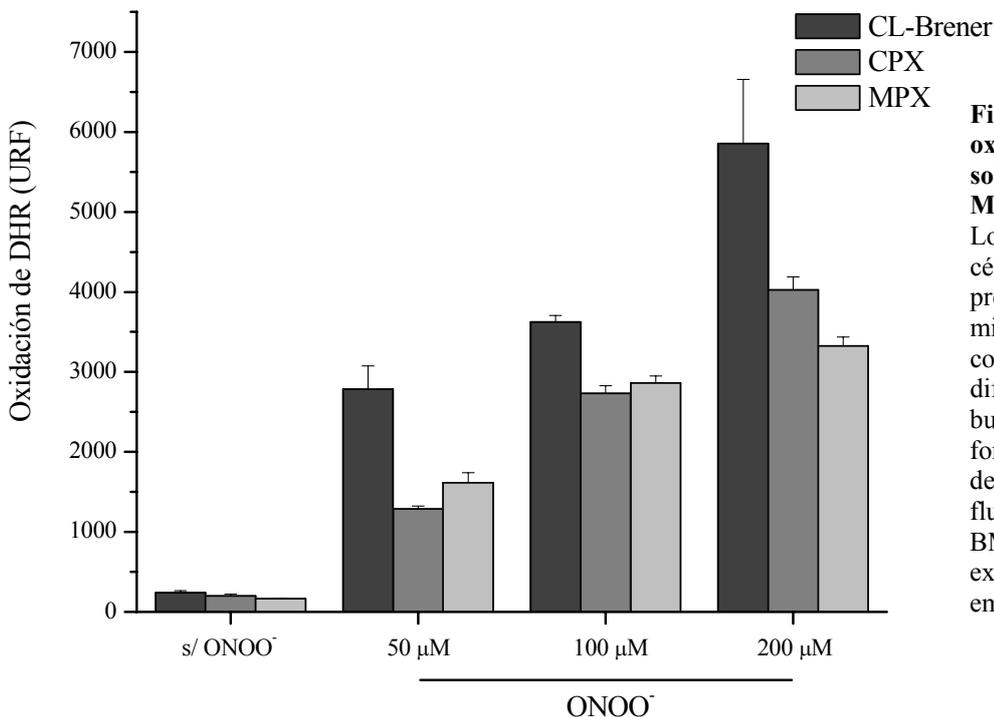


Fig. 4.33 Protección de la oxidación de DHR por la sobre- expresión de CPX y MPX.

Los parásitos (3×10^8 células/ml) se incuban en presencia DHR $50 \mu\text{M}$ por 30 min. Las células pre-cargados con DHR se expusieron a diferentes dosis de ONOO^- en buffer PBS 50 mM pH 7.4. La formación de rodamina fue determinada utilizando un fluorímetro de placas (Fluostar, BMG) con el filtro de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

En la Figura 4.33 se observan las diferencias en la oxidación del flu distintas cepas. Hay una clara inhibición de la oxidación de la DHR en las dos cepas que sobreexpresan las peroxirredoxinas. La oxidación de la DHR depende de la descomposición del ONOO^- y la formación radicales, pero la sobreexpresión de las peroxirredoxinas compite con esa ruta, observándose por lo tanto una menor acumulación de RH en estos parásitos.

Para evaluar la oxidación de la sonda por el ONOO^- generado por los macrófagos utilizamos el sistema de co-cultivo directo de epimastigotas de las tres cepas con macrófagos (Fig 4.34). Los macrófagos fueron estimulados para la producción de $\cdot\text{NO}$ y de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en presencia de los parásitos precargados con la sonda. El aumento de la fluorescencia por oxidación de la DHR fue medido en el fluorímetro de placas.

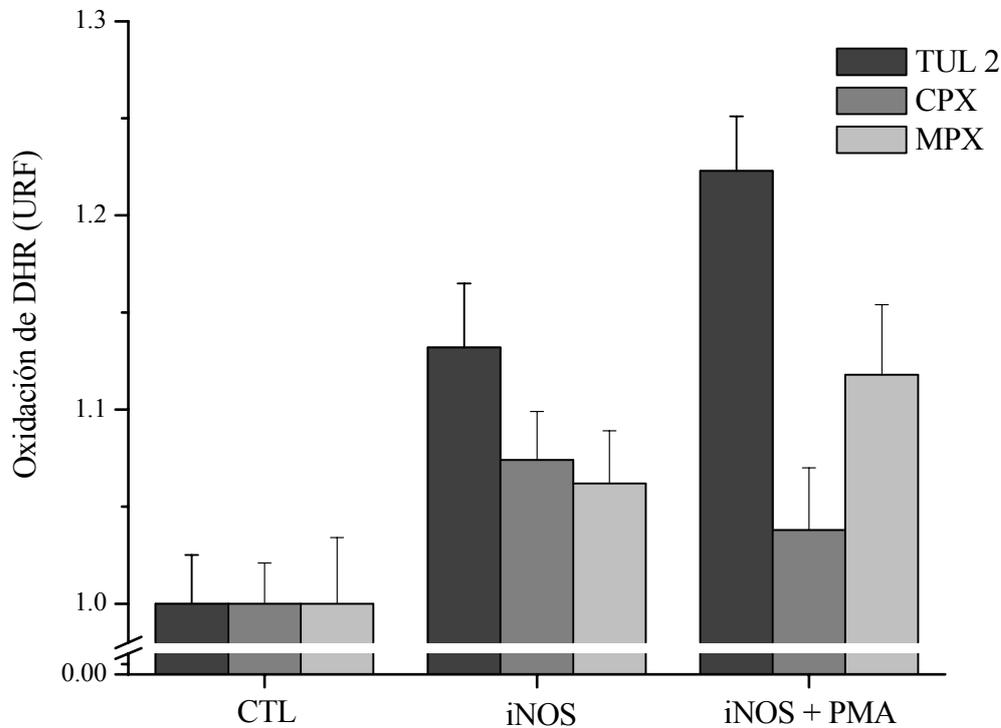


Fig 4.34 Protección de la oxidación de DHR en co-cultivo con macrófagos.

Los parásitos de las cepas salvaje y sobreexpresantes de CPX y MPX (3×10^8 células/ml) precargados con DHR fueron co-incubados con macrófagos formando $\cdot\text{NO}$ (iNOS) o $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$ (iNOS + PMA) en dPBS pH 7.4 durante 120 minutos. La formación de rodamina fue determinada utilizando un fluorímetro de placas (Fluostar- BMG) con el filtro de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

Los resultados se expresan como el aumento de la fluorescencia con respecto al control de cada cepa.

La exposición de los parásitos a macrófagos activados para la formación de ONOO^- mostró también la inhibición de la oxidación de la DHR en las cepas que sobreexpresan las peroxirredoxinas. En la condición que llamamos iNOS, los macrófagos se encuentran pre-inducidos para la producción de $\cdot\text{NO}$ y forman $\text{O}_2^{\cdot-}$ cuando interactúan con los epimastigotas de *T.cruzi*. La inhibición de la oxidación que se observa en las cepas CPX y MPX se debe también a la descomposición del ONOO^- por parte de las peroxirredoxinas.

Protección en la toxicidad del peroxinitrito

Los parásitos de las cepas salvaje y sobreexpresante fueron expuestos a los macrófagos activados para la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ en el sistema de co-cultivo directo. Luego de la incubación, se recuperaron los parásitos de los cultivos y evaluamos la viabilidad usando la técnica de incorporación de [^3H]Thy (Fig. 4.35).

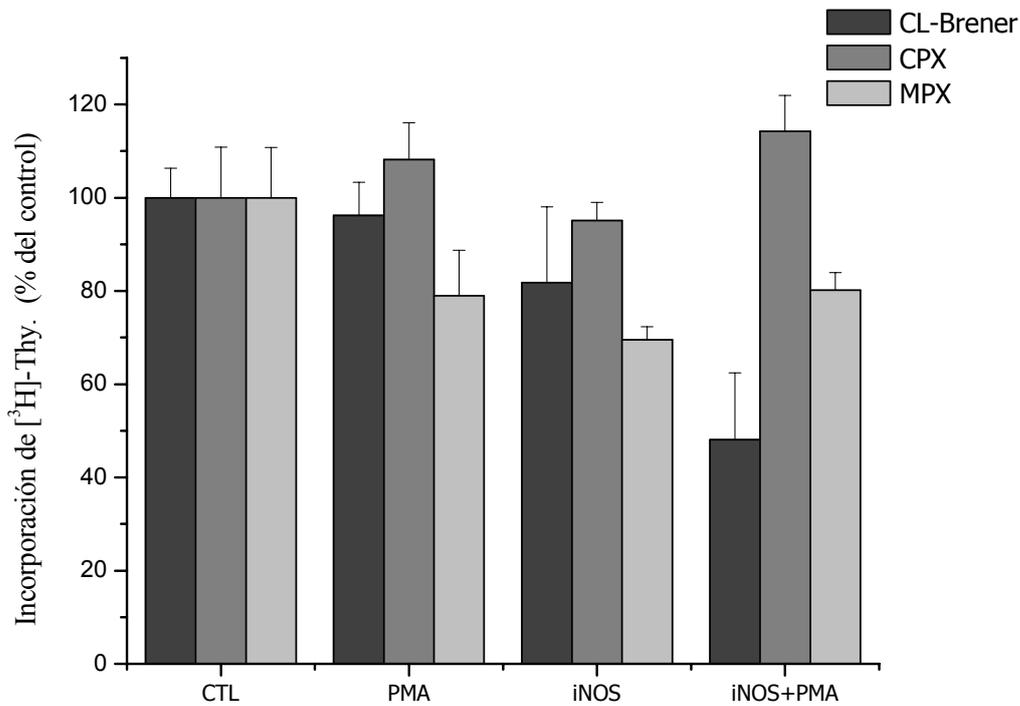


Fig 4.35 Protección de la toxicidad por la sobreexpresión de CPX y MPX.

Se evaluó la resistencia a ONOO^- de los sobreexpresantes (CPX, MPX,) y de la cepa salvaje (CL-Brener) mediante la incubación de los parásitos 2 hs con macrófagos activados para la producción de O_2^- (PMA), NO (iNOS) o ambos (iNOS + PMA). La viabilidad se determina mediante el ensayo de incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina. Los resultados se expresan como % de incorporación de $[^3\text{H}]$ -timidina respecto al control en la condición de no-activación (tomado como 100%).

La formación de ONOO^- por los macrófagos produce una inhibición de aproximadamente el 50% en la replicación de *T. cruzi* expuestos en contacto (Fig. 4.35). En las cepas que sobreexpresan las peroxirredoxinas se observa protección en la toxicidad generada por el ONOO^- , en acuerdo con la inhibición de la oxidación de la DHR y con la función de ONOO^- reductasa propuesta para estas enzimas (194).

4.3.3.2 Protección en tripomastigotas que sobreexpresan peroxirredoxinas

Durante la metacicloogénesis aumenta la expresión de las peroxirredoxinas citosólica y mitocondrial, sin embargo en las cepas salvajes evidenciamos toxicidad dependiente de la activación de los macrófagos.

Realizamos transformación química de las cepas sobreexpresantes para evaluar si una mayor expresión de estas enzimas protege también a estos parásitos durante la fagocitosis.

Sobreexpresión en tripomastigotas metacíclicos

Para evaluar el mantenimiento de la sobreexpresión de la enzima en el estadio metacíclico y durante la infección a macrófagos, utilizamos el anticuerpo anti c-myc, ya que el vector con que fueron transfectadas contiene en el extremo 3' del gen insertado el epítotope 9E10 de la proteína c-myc.

Con la cepa CPX, luego de 24 horas de infección se detectó la presencia de c-myc por inmunocitoquímica, colocalizado con núcleos de los parásitos internalizados (teñidos con DAPI) (Fig 4.36).

No se observa señal con el anticuerpo anti-c-myc en todos los casos donde se ven núcleos de parásitos, debido posiblemente a una menor sensibilidad en la detección con el anticuerpo que la detección de núcleos por DAPI, o que parte de los tripomastigotas pierdan la transformación.

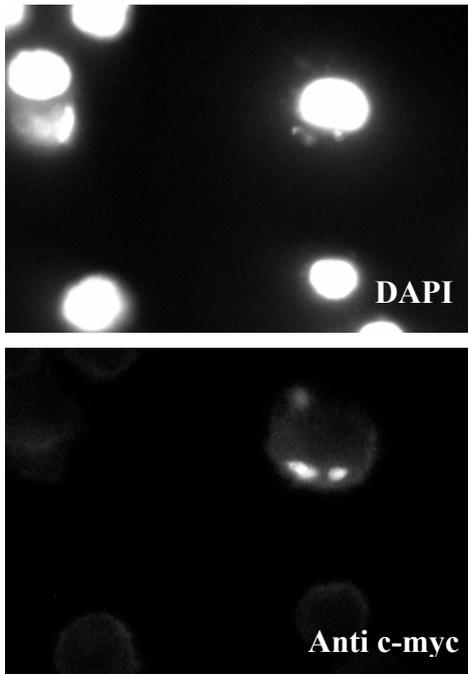


Fig. 4.36 Infección de macrófagos con tripomastigotas CPX.

Macrófagos infectados con tripomastigotas de *T.cruzi* de la cepa CL-Brener que sobreexpresa la peroxirredoxina citosólica (CPX).

Los preparados fueron incubados con el anticuerpo monoclonal anti c-myc y revelados con el anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) con λ_{exc} 495 nm y λ_{em} 519 nm. Los núcleos fueron teñidos con el fluoróforo para tinción de ADN, DAPI.

Las fotos fueron tomadas con los filtros de fluorescencia correspondientes para cada fluoróforo en cada campo, con un aumento de 100X.

Oxidación de DHR y liberación de [³H] uridina en macrófagos infectados con CPX

Evaluamos la difusión y la toxicidad del ONOO⁻ sobre la cepa CPX dentro de la vacuola, utilizando la oxidación de la DHR como indicador de la llegada del oxidante al interior de la célula y la liberación de [³H] uridina como marcador del daño sobre los parásitos internalizados.

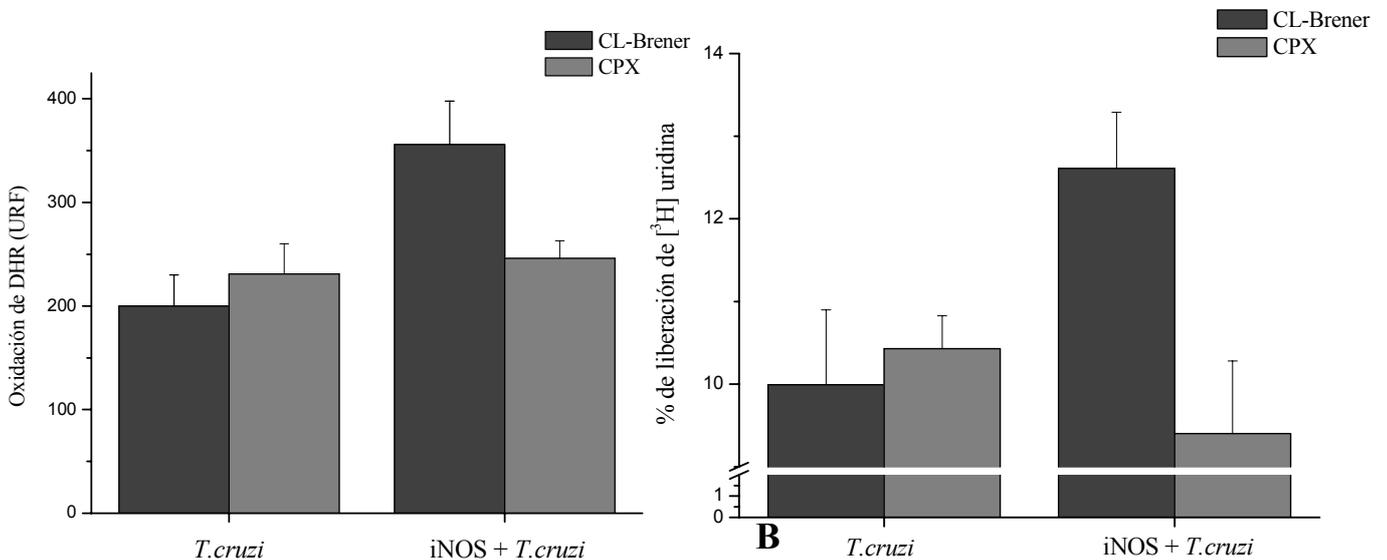


Fig 4.37 Protección de la oxidación de DHR y de la toxicidad por CPX.

Los macrófagos fueron infectados con tripomastigotas precargados con DHR (panel A) o con [³H] uridina (panel B). La oxidación del fluoróforo y la liberación de la uridina marcada fueron determinadas luego de 2 horas de incubación en la cepa salvaje y en la cepa sobreexpresante de CPX.

La sobreexpresión de la CPX inhibe la oxidación de la DHR intracelular (Fig. 4.37, panel A) y la toxicidad mediada por el ONOO⁻ (panel B) generado dentro del fagosoma (Figura 4.37) Esto concuerda con los resultados observados en la forma epimastigota de estos sobreexpresantes y con el mantenimiento de la expresión de la enzima luego de la metaciclogénesis.

Infección de macrófagos por las cepas CL-Brener y CPX

Los resultados de las infecciones realizadas con la cepa de *T.cruzi* CL-Brener indicaron que la formación de NO por parte de los macrófagos y la activación de la NADPH oxidasa son necesarios para el control de la infección. Los datos de la Tabla III mostraban que el número de parásitos/macrófago en estas condiciones disminuía más del 60%.

Realizamos infecciones con tripomastigotas de la cepa CPX y observamos que a las 24 hs de infección, el número de parásitos /macrófago es el mismo para los macrófagos pre-estimulados para la producción de NO que para los macrófagos control (Tabla 4.5)

Tabla 4.5. Infección en macrófagos por *Trypanosoma cruzi* de las cepas CL-Brener y CPX.

condición	24 hs
CL-Brener	0.37 ± 0.13
CL-Brener + iNOS	0.14 ± 0.03
Cpx	0.38 ± 0.19
Cpx + iNOS	0.36 ± 0.09

valores corresponden al número de parásitos/célula, con un número de macrófagos contados entre 200 y 800 por condición en cada experimento.

Estos resultados nos confirman que la toxicidad durante las primeras horas de infección depende de la formación de ONOO^- y de la capacidad de detoxificación de esta especie por los parásitos.

/

5. CONCLUSIONES

5.1 Detección de radical carbonato en sistemas biológicos

La presencia de HCO_3^- y CO_2 en sistemas biológicos es responsable de un cambio en las reactividades de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, a través de la formación de $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Las propiedades fisico-químicas de este radical lo ubican dentro de las especies reactivas más importantes generadas en sistemas biológicos. Es un radical libre con un fuerte poder oxidante ($E^\circ_{\text{CO}_3^{\cdot-}/\text{HCO}_3^-} = 1.78 \text{ V}$ a pH 7.0) y con una mayor selectividad en sus reacciones.

El radical carbonato reacciona con el DMPO con una constante de segundo orden de $2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que es una velocidad moderada tanto para la reactividad del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ como la del DMPO. Esta reacción no forma un aducto estable; Villamena y col han reportado recientemente la detección del intermediario inestable DMPO-OCO₂ y plantean que solo una fracción de este intermediario deriva en la formación de DMPO-OH (268).

El análisis de la formación de DMPO-OH por el sistema de Fenton nos mostró en presencia de HCO_3^- una inhibición de la formación de DMPO-OH mucho mayor que la esperada según los resultados de simulaciones asistidas por computadora (Figs. 4.2 y 4.4). Las razones para obtener una inhibición tan profunda podían ser: un muy bajo rendimiento en la formación de DMPO-OH a partir del DMPO-OCO₂ o que la diferencia de constantes de reacción del DMPO con el $\cdot\text{OH}$ y con el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (10^3 veces más rápida con el $\cdot\text{OH}$) implicara que este atrape eficientemente al $\cdot\text{OH}$ y que otras reacciones del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ le compitieran al DMPO. Dentro de estas reacciones alternativas para el $\text{CO}_3^{\cdot-}$, estudiamos la reacción con el complejo Fe^{II} -DTPA por radiólisis de pulso, determinando una $k = 6.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, reacción que se encuentra entre las más rápidas entre las reacciones del $\text{CO}_3^{\cdot-}$. En las simulaciones, incorporando esta reacción, observamos que esta competencia del DMPO y el Fe^{II} -DTPA por el $\text{CO}_3^{\cdot-}$ explica las dos terceras partes de la inhibición. Destacamos esta reacción en el contexto de que han sido determinadas últimamente, reacciones del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con centros metálicos en proteínas, como es el caso de la aconitasa (101) y del citocromo c (100), siendo ambas constantes similares a la del Fe^{II} -DTPA ($> 3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

La detección del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ en sistemas químicos o celulares puede realizarse por EPR directo (92), con la limitación de que se detectan estados estacionarios del orden μM , lo que es difícil de lograr en sistemas complejos (es de destacar que no se ha podido detectar con esta técnica en el sistema $\text{CuZnSOD}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCO}_3^-$), por quimioluminiscencia (90,95) o por el análisis de los productos de oxidación (ej. 3,3'-ditirosina).

La reacción con el DMPO es una reacción de velocidad moderada para el $\text{CO}_3^{\cdot-}$, pero altas concentraciones ($\sim 100 \text{ mM}$) de este reactivo pueden ser utilizadas en experimentos celulares o incluso en animales sin que genere toxicidad, lo que permite que parte del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ pueda ser atrapado con el DMPO. Del mismo modo la presencia de DMPO puede afectar los rendimientos de oxidación del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (como se observa en las Figs. 4.5 y 4.7), y puede interferir en los experimentos de "inmunospin-trapping", técnica que se basa en el atrapamiento de radicales proteicos por parte del DMPO, y la detección de estos aductos con un anticuerpo específico desarrollado en el laboratorio del Dr. Ronald Mason del Laboratory of Pharmacology and Chemistry, NIH, USA (313). En distintos modelos celulares y animales se ha determinado la protección por la presencia de DMPO en daño oxidativo, disminuyendo la nitración e incluso mejorando la viabilidad (314). En esos casos la reacción del $\text{CO}_3^{\cdot-}$ con el DMPO puede ser responsable en parte de esta protección.

5.2 Modulación de la respuesta macrofágica en la interacción con *Trypanosoma cruzi*

Los resultados expuestos en esta sección sobre la modulación de la respuesta macrofágica por parte de la interacción con los estadios no-infectivo e infectivo de *T. cruzi* nos permiten afirmar que: 1. Las formas epimastigota y tripomastigota de *T. cruzi* desencadenan el ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa.

La respuesta es mayor durante la interacción con el estadio infectivo del parásito y aumenta con el número de tripomastigotas expuestos (Fig. 4.14), lo que nos indica que la activación es local,

abarcando los sectores de membrana involucrados en la interacción con el parásito. La observación por microscopía de la reducción del NBT durante la infección, reafirma esta idea, ya que por esa técnica podemos visualizar claramente la formación de depósitos localizados de formazán y que esos depósitos colocalizan con núcleos de parásitos internalizados (Figs 4.16 y 4.17).

2. La inducción de la iNOS es inhibida por los epimastigotas y potenciada por los tripomastigotas.

La expresión de la iNOS presenta un comportamiento más complejo que la NADPH oxidasa, ya que los dos estadios evaluados generan modulaciones opuestas. En los macrófagos que son expuestos a los epimastigotas durante la inducción se observa una menor producción de $\cdot\text{NO}$, menor expresión de la enzima y del mRNA de la iNOS (Figs. 4.18, 4.20 y 4.21). Esa inhibición es dependiente también del número de parásitos. Si bien en nuestro trabajo no profundizamos en determinar la vía afectada durante la interacción de los epimastigotas con los macrófagos, podemos plantear que probablemente estén interfiriendo con las cascadas de señalización que conducen a la inducción de la enzima, ya que detectamos menores niveles del mRNA de la iNOS. Estos resultados coinciden con los trabajos publicados por Stempin *et al*, en los que plantean que los macrófagos expuestos a la cisteínproteasa cruzipaina purificada a partir de epimastigotas de *T.cruzi*, presentan un patrón de activación tipo activación alterna (similar a la activación generada por citoquinas de tipo Th2), con inhibición de la expresión de la iNOS y aumento de la expresión de la Arginasa (245,246,315).

Sin embargo cuando los macrófagos se exponen a la forma infectiva del parásito no hay inhibición de la expresión de la iNOS inducida por $\text{IFN-}\gamma$ y LPS y además se observa un aumento en los niveles de mRNA obtenidos cuando se induce exclusivamente con $\text{IFN-}\gamma$ (Fig. 4.22). Como planteamos anteriormente, la interacción de los tripomastigotas con los macrófagos ocurre a través glicoproteínas de tipo mucinas (GPI) presentes en la membrana del parásito. Estas glicoproteínas disparan la fosforilación de las MAPK y del inhibidor de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ($\text{i-}\kappa\text{B}$), activando las rutas pro-inflamatorias. Los receptores del macrófago involucrados en el reconocimiento de GPI de *T.cruzi* son TLR2 y CD14, molécula de membrana que participa en el reconocimiento del LPS bacteriano por otro receptor perteneciente a la familia de receptores Toll, el TLR4 (53,316). El aumento del mRNA que observamos cuando los macrófagos se exponen a $\text{IFN-}\gamma$ en presencia de los tripomastigotas puede explicarse por la capacidad de activar cascadas similares a las del LPS bacteriano. La exposición de macrófagos a los parásitos solos no resulta en la inducción de la iNOS, por lo menos en forma detectable con las técnicas y condiciones experimentales usadas en este trabajo (Fig. 4.19 y 4.22).

Durante el proceso de infección los tripomastigotas pueden infectar macrófagos que no hayan sido activados por las citoquinas derivadas de linfocitos T, lo que resulta en la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y las especies derivadas de este, como H_2O_2 y por la reacción de Fenton, formación de $\cdot\text{OH}$ o de especies oxo-ferrilo. Una segunda población de macrófagos son los que estén previamente activados y generando $\cdot\text{NO}$. En este caso el ingreso del parásito, activa el ensamblaje de la NADPH oxidasa, la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que reacciona dentro de la vacuola con el $\cdot\text{NO}$ que difunde desde su sitio de formación en el citosol del macrófago, formando ONOO^- .

Nuestros datos nos permiten afirmar que la producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{NO}$ ocurre en la infección de macrófagos por tripomastigotas de *T.cruzi*, y los resultados obtenidos en luminiscencia (el aumento de la señal dependiente de la presencia de $\cdot\text{NO}$, Fig. 4.13) y en EPR (menor detección de DMPO-OH dependiente de la presencia de $\cdot\text{NO}$, Fig.4.12) son evidencias indirectas de la formación de ONOO^- .

La modulación negativa por parte de la forma epimastigota sobre la inducción de la iNOS puede cumplir un rol anti-inflamatorio cuando se produce el ingreso de los parásitos al huésped vertebrado. Entre las formas tripomastigotas pueden encontrarse epimastigotas que entren en contacto con los macrófagos y si estos no han sido previamente activados, interfieran con la inducción de la iNOS (306).

5.3 Toxicidad de peroxinitrito producido por macrófagos sobre *Trypanosoma cruzi*.

El peroxinitrito se forma en macrófagos previamente activados con citoquinas pro-inflamatorias cuando entran en contacto con *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, la corta vida media de esta especie en sistemas biológicos (~ 10 ms), así como su limitada difusión transmembrana podrían limitar su capacidad para causar daño oxidativo en el parásito. El ONOO⁻ es consumido en reacciones extracelulares, particularmente en su reacción con el CO₂, disminuyendo la toxicidad sobre una célula blanco (5). En nuestro trabajo usamos la forma epimastigota, no infectiva como modelo de toxicidad extracelular, que puede adaptarse a otros microorganismos que se desarrollan extracelularmente como *Trypanosoma brucei*.

Para analizar la competencia entre las reacciones extracelulares del ONOO⁻ con el CO₂ y la difusión/toxicidad sobre la célula blanco utilizamos el modelo desarrollado en nuestro laboratorio que vincula la densidad celular con la distancia promedio de difusión (120). El estudio de la toxicidad del ONOO⁻ en función de la distancia nos permitió determinar un valor para cada densidad celular de dosis necesaria para matar al 50% de la población normalizada a 1 x 10⁶ células (nDL₅₀). En ausencia de CO₂, ese valor aumenta a medida que aumenta la distancia entre las células, en acuerdo con la competencia que existe entre la difusión y la descomposición del ONOO⁻. A distancias menores de 20 µm, los valores de nDL₅₀ se aproximan ya que más del 95 % del ONOO⁻ (Tabla 4.2) alcanza la célula blanco; los valores de dosis letales normalizados para esas distancias son menores a 2-3 nmol/10⁶ céls (Fig. 4.23, inserto).

Sin embargo, en presencia de 1.3 mM CO₂, la estimación teórica de la proporción de ONOO⁻ que alcanza un blanco y los datos experimentales de toxicidad nos muestran que el CO₂ consume parte del ONOO⁻ en todas las distancias evaluadas experimentalmente que son > 5µm. De todos modos, podemos afirmar que a distancias menores aún en presencia de CO₂, la mayor parte del ONOO⁻ (> 75 %) alcanza el blanco, haciéndose comparable ambas situaciones (con y sin CO₂).

Estos resultados realizados con la exposición de los epimastigotas a bolos de ONOO⁻ sintetizado en el laboratorio, nos permitieron analizar los datos obtenidos en cuanto a la difusión y la toxicidad del ONOO⁻ derivado de macrófagos sobre los epimastigotas.

Los resultados obtenidos en la oxidación de la DHR intracelular y en la toxicidad sobre los parásitos muestran que el CO₂ inhibe totalmente esos procesos en el modelo de insertos debido a que a esa distancia entre los macrófagos y los epimastigotas el CO₂ extracelular consume todo el ONOO⁻. Sin embargo en el modelo de co-cultivo, en que parte de las células se encuentran en contacto, el CO₂ genera una inhibición parcial tanto en la oxidación de la sonda como en la toxicidad.

Toxicidad del peroxinitrito sobre T.cruzi dentro de la vacuola fagocítica

Durante la interacción del macrófago con microorganismos, la distancia que debe recorrer el ONOO⁻ determina si puede o no ejercer daño sobre él, en particular considerando que eso ocurre en un medio con 1.3 mM CO₂. La producción del ONOO⁻ ocurre dentro de la vacuola fagocítica y el volumen de la vacuola determina la concentración que se alcanza localmente y la distancia entre la membrana del fagosoma y el microorganismo fagocitado.

En la figura 5.1 (microfotografías de la fagocitosis de *T.cruzi* por macrófagos tomadas a distintos tiempos) se puede observar que en la fagocitosis de los tripomastigotas de *T.cruzi* la membrana del fagosoma rodea el parásito y no existe distancia medible entre las dos membranas. Podemos plantear que esa distancia es menor a 1 µm, a los efectos de analizar cual sería la efectividad del ONOO⁻ generado allí. Como mostramos anteriormente, a esas distancias la presencia de CO₂ no afecta la difusión del ONOO⁻.

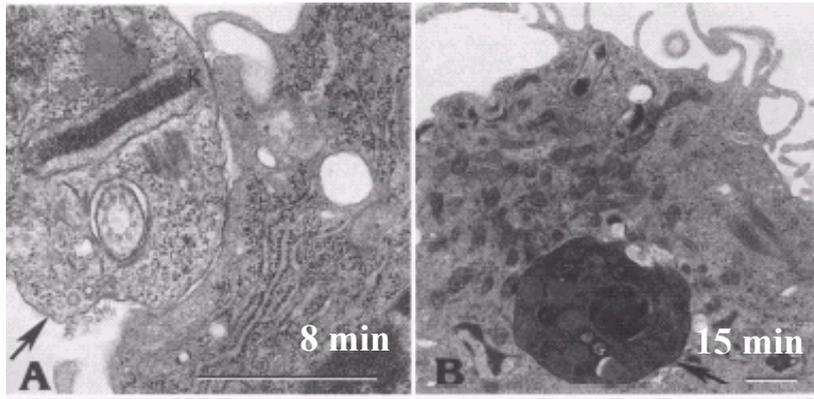


Fig 5.1. Fagocitosis de *T.cruzi* por macrófagos.

Las flechas indican la membrana del parásito mientras es rodeado por la membrana del macrófago (a los 8 min.) y cuando se encuentra completamente internalizado (15 min.)

Barra = 0.5 μm

Extraído de Villalta et al, 1984 (4).

La producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{NO}$ y por lo tanto de ONOO^- dentro del fagosoma son datos difíciles de obtener. A partir de los valores obtenidos en el medio extracelular, usando al PMA como activador de la NADPH oxidasa y asumiendo un volumen del fagosoma similar al volumen del parásito (35 fl), obtenemos un valor de entre 60-80 $\mu\text{M}/\text{min}$ de peroxinitrito durante 100 minutos, tiempo promedio que dura la activación de la NADPH oxidasa. Este valor puede estar sobreestimado, ya que usamos como activador al PMA, que sabemos que genera mayores cantidades de $\text{O}_2^{\cdot-}$ que los activadores fagocíticos, pero puede estar subestimado debido a la dificultad en la cuantificación.

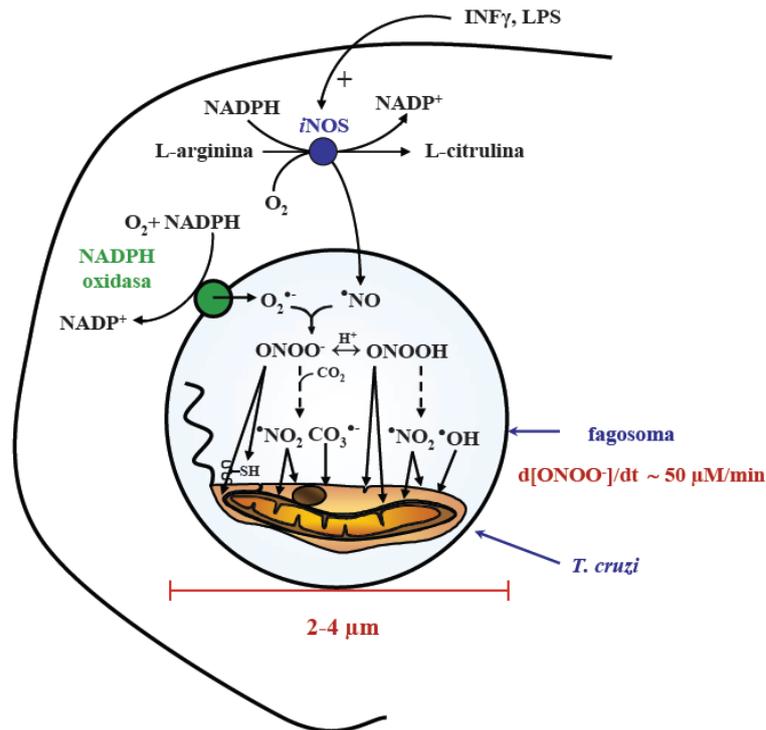
Ese valor corresponde a 0.2-0.3 fmoles, siendo similar al valor de dosis letal obtenido para los epimastigotas. En ese caso, para la menor distancia ensayada sin CO_2 , el nDL_{50} fue de 0.29 nmoles/ 10^6 cels., lo que correspondería a 0.29 fmoles/cél. Con estos datos se podría prever que la formación de ONOO^- intrafagosomal sería suficiente para matar al tripanosoma internalizado.

Los datos utilizados son de dosis letales sobre la forma epimastigota del parásito, ya que no tenemos datos de lo que ocurre con la toxicidad sobre tripomastigotas. Es importante considerar que durante la metacicloogénesis se induce la expresión de enzimas y moléculas involucradas en la detoxificación de oxidantes (la ascorbato peroxidasa, las peroxirredoxinas citosólica y mitocondrial, la Fe-SOD mitocondrial, triparredoxina y dihidrotripanotona $\text{T}(\text{SH})_2$ (12)).

Los resultados de infecciones con tripomastigota en macrófagos nos mostraron que, el ONOO^- formado en el proceso llegaba al interior del parásito, evidenciado por la oxidación de la DHR intracelular y que ejercía daño sobre el parásito, lo que fue determinado por la técnica de liberación de uridina y por el conteo de parásitos intracelulares observados 24 y 72 horas después de comenzada la infección. Observamos un 50% menos de infección en los macrófagos capaces de generar ONOO^- en las primeras etapas de la fagocitosis.

Estos datos fueron reafirmados por los experimentos con la cepa CPX, que sobreexpresa la peroxirredoxina citosólica, enzima capaz de descomponer al ONOO^- (196). En esta cepa evidenciamos una menor oxidación de la DHR, una menor citotoxicidad del ONOO^- *in vitro*, y una mayor infectividad que la cepa salvaje, donde el número de parásitos no se afectaba por la activación del macrófago.

Finalmente, podemos concluir que el modelo de toxicidad del peroxinitrito sobre el *T.cruzi*, planteado por nuestro laboratorio desde 1993 (5) nos sirve para explicar los procesos de toxicidad del ONOO^- generado por macrófagos activados durante la fagocitosis de *Trypanosoma cruzi*.



Esquema 5.1. Toxicidad del ONOO⁻ en la fagocitosis de *T. cruzi*.

Se representan los sitios de formación de O₂⁻ y ^{*}NO por parte de las enzimas del macrófago. La formación de ONOO⁻ dentro de la vacuola fagocítica y el destino del ONOO⁻ que consideramos que parte va a difundir al interior del parásito y parte reaccionar a través de los radicales derivados con la membrana,

Modificado a partir de Denicola et al, 1993. (5)

Estos resultados deben ser complementados por experimentos de infección en macrófagos obtenidos de ratones deficientes en la actividad NADPH oxidasa (gp91^{PHOX}^{-/-}) y de ratones deficientes en iNOS (iNOS^{-/-}), para evaluar si esos macrófagos no logran controlar la infección. Esos experimentos serán realizados en el marco de una colaboración con el laboratorio de la Dra. Leda Q. Vieira del Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia de la Universidad Federal de Minas Gerais. Brasil.

Por otro lado consideramos importante evaluar el desarrollo de las infecciones con las cepas sobreexpresantes (CPX y MPX) en ratones para evaluar si la capacidad de evadir la respuesta del macrófago observada en los experimentos de cultivo celular, implica una mayor capacidad infectiva en el huésped vertebrado. Las infecciones ya se encuentran en curso en nuestro laboratorio y serán analizados los niveles de parasitemia (número de parásitos en sangre) en el curso de la infección y si existe mayor daño sobre los tejidos de los ratones infectados con los sobreexpresantes.

5.4 Publicaciones

Publicaciones vinculadas a la Tesis

1. Peroxynitrite Formation from Biochemical and Cellular Fluxes of Nitric Oxide and Superoxide. María Noel Alvarez, Madia Trujillo and Rafael Radi. *Methods in Enzymology*.359, 353-366. (2002)
2. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. María Noel Alvarez, Lucía Piacenza, Florencia Irigoín, Gonzalo Peluffo and Rafael Radi. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.432 (2004) 222-232.
3. Reaction of the carbonate radical with the spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: *Pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance and kinetic competition studies*. María Noel Alvarez, Gonzalo Peluffo, Lisa Folkes, Peter Wardman y Rafael Radi. Enviado a *Free Radical Biology and Medicine* en abril del 2007

Otras publicaciones

1. L-Arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. Gonzalo Peluffo, Lucía Piacenza, Florencia Irigoín, María Noel Alvarez and Rafael Radi. *Trends Parasitol.* 20:363-369. 2004
2. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. Lucía Piacenza, Florencia Irigoín, María Noel Alvarez, Gonzalo Peluffo, Martin C. Taylor, John M. Kelly, Shane R. Wilkinson y Rafael Radi. *Biochem J.* 403(2):323-34 (2007)

Agradecimientos

a Alvaro

a mis padres, por su eterna ayuda

a Hugo y Haydée, porque siempre están

a Rafael, por el espacio que generó, el grupo que formó, en el que se trabaja con mucha libertad y gran calidad.

a Gonza, Lucía y Nati, mis muy queridos amigos, por eso, y porque me ayudan, me divierten y me pelean. Es un lujo estar con ellos, aprendo mucho y disfruto más.

a Flopi y a Lucía (de nuevo) por su ayuda en los experimentos y lo lindo de trabajar juntas

a Verito, porque se aguantó discusiones insoportables sobre la vida y la muerte del *T. cruzi* y porque la quiero mucho

a Carlos (el Batthy) gran responsable de que yo esté acá, por todo lo que compartimos y por el aguante

a Vale por cuidar a los macrófagos con más cariño que yo

a las chicas, qué grupo!!!! Las más “antiguas” (no se enojen), con las que compartimos tantas cosas y que demostramos que un grupo con muchas mujeres es lo mejor que hay! A Celia, Madia (mi química preferida), Laura, Adriana, Bea y Silvina.

a los chicos malos que eran del piso superior, pero se fueron diluyendo...al Trocha, Botti, Pepe y Homero

a los más nuevos, por animarse, Vero T, Lucia C, Pablo y Lucia B

a Vicky, Patricia e Ivana, indispensables!!!

a Hugo y Alfonso, porque sin ellos no podría haber hecho todo lo que escribí

Y a las Instituciones, que no son otra cosa que la gente que las forma,

empiezo por el departamento de Bioquímica, porque tiene y tuvo gente muy valiosa, que supo darle una personalidad al departamento, que hace que yo sienta mucho orgullo de pertenecer a él.

a la Facultad de Medicina porque puedo hacer docencia y porque es como mi casa.

Al PEDECIBA por el programa que me dio la oportunidad, en una Universidad con poca flexibilidad de cambiar mi rumbo, sin hacer grandes cuestionamientos. Y por la beca que me otorgaron para el desarrollo de mi trabajo.

6. REFERENCIAS

1. Rosen GM, Beselman A, Tsai P, Pou S, Mailer C, al. E: Influence of Conformation on the EPR Spectrum of 5,5-Dimethyl-1-hydroperoxy-1-pyrrolidinyloxyl: A Spin Trapped Adduct of Superoxide. *J. Org. Chem.* . **69**:1321-1330;2004.
2. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R: Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2007 *In Press*
3. Bedard K, Krause KH: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. **87**:245-313;2007.
4. Villalta F, Kierszenbaum F: Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: uptake and mechanism of destruction. *J Immunol*. **133**:3338-3343;1984.
5. Denicola A, Rubbo H, Rodriguez D, Radi R: Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys*. **304**:279-286;1993.
6. Bokoch GM, Zhao T: Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase. *Antioxid Redox Signal*. **8**:1533-1548;2006.
7. Fang FC: Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol*. **2**:820-832;2004.
8. MacMicking J, Xie QW, Nathan C: Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. **15**:323-350;1997.
9. Zhang H, Joseph J, Felix C, Kalyanaraman B: Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical. *J Biol Chem*. **275**:14038-14045;2000.
10. Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A: Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med*. **30**:463-488;2001.
11. Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF: Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med*. **169**:1011-1020;1989.
12. Atwood JA, 3rd, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL: The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*. **309**:473-476;2005.
13. Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z: Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. **235**:473-476;1987.
14. Sbarra AJ, Karnovsky ML: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. **234**:1355-1362;1959.
15. Iyer GYN, Islam MF, Quastel JH: Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature*. **192**:535-541;1961.
16. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. **52**:741-744;1973.
17. Quie PG, White JG, Holmes B, Good RA: In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J Clin Invest*. **46**:668-679;1967.
18. Holmes B, Page AR, Good RA: Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocytic function. *J Clin Invest*. **46**:1422-1432;1967.
19. Stuehr DJ, Nathan CF: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. **169**:1543-1555;1989.
20. Stuehr DJ, Marletta MA: 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;1985.
21. Alvarez MN, Trujillo M, Radi R: Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol*. **359**:353-366;2002.

22. Nakamura M, Baxter CR, Masters BS: Simultaneous demonstration of phagocytosis-connected oxygen consumption and corresponding NAD(P)H oxidase activity: direct evidence for NADPH as the predominant electron donor to oxygen in phagocytizing human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* **98**:743-751;1981.
23. Ehrt S, Schnappinger D, Bekiranov S, Drenkow J, Shi S, Gingeras TR, Gaasterland T, Schoolnik G, Nathan C: Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med.* **194**:1123-1140;2001.
24. Ungvari Z, Csiszar A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A: Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol.* **165**:219-226;2004.
25. Nauseef WM: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochem Cell Biol.* **122**:277-291;2004.
26. Babior BM: The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* **73**:599-601;1984.
27. Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR, Hawkins PT: Neutrophils from p40phox-/- mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med.* **203**:1927-1937;2006.
28. Quinn MT, Gauss KA: Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol.* **76**:760-781;2004.
29. Groemping Y, Rittinger K: Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J.* **386**:401-416;2005.
30. Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klein JB, McLeish KR: Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils. *J Immunol.* **170**:5302-5308;2003.
31. Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* **23**:197-223;2005.
32. Persson T, Andersson P, Bodelsson M, Laurell M, Malm J, Egesten A: Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against Escherichia coli. *Infect Immun.* **69**:3591-3596;2001.
33. Palazzolo AM, Suquet C, Konkel ME, Hurst JK: Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a selective probe for HOCl generation within neutrophils. *Biochemistry.* **44**:6910-6919;2005.
34. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A: Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol.* **104**:10-15;2000.
35. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW: Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature.* **416**:291-297;2002.
36. Segal AW: The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today.* **2**:129-135;1996.
37. Ding C, Kume A, Bjorgvinsdottir H, Hawley RG, Pech N, Dinauer MC: High-level reconstitution of respiratory burst activity in a human X-linked chronic granulomatous disease (X-CGD) cell line and correction of murine X-CGD bone marrow cells by retroviral-mediated gene transfer of human gp91phox. *Blood.* **88**:1834-1840;1996.
38. Curnutte JT: Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodeficiency Rev.* **3**:149-172;1992.
39. Ambruso DR, Knall C, Abell AN, Panepinto J, Kurkchubasche A, Thurman G, Gonzalez-Aller C, Hiester A, deBoer M, Harbeck RJ, Oyer R, Johnson GL, Roos D: Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:4654-4659;2000.

40. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM: The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med.* **182**:751-758;1995.
41. Pollock JD, Williams DA, Gifford MA, Li LL, Du X, Fisherman J, Orkin SH, Doerschuk CM, Dinauer MC: Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat Genet.* **9**:202-209;1995.
42. Yamauchi A, Kim C, Li S, Marchal CC, Towe J, Atkinson SJ, Dinauer MC: Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J Immunol.* **173**:5971-5979;2004.
43. Stuehr DJ: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* **1411**:217-230;1999.
44. Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kaptureczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA, et al.: Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem.* **269**:27580-27588;1994.
45. Hemmrich K, Suschek CV, Lerzynski G, Kolb-Bachofen V: iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protecting against oxidative damage. *J Appl Physiol.* **95**:1937-1946;2003.
46. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A: The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* **173**:17-26;2000.
47. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG: TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity.* **19**:59-70;2003.
48. Fichera LE, Albareda MC, Laucella SA, Postan M: Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun.* **72**:359-363;2004.
49. Vodovotz Y, Russell D, Xie QW, Bogdan C, Nathan C: Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *J Immunol.* **154**:2914-2925;1995.
50. Schoedon G, Schneemann M, Hofer S, Guerrero L, Blau N, Schaffner A: Regulation of the L-arginine-dependent and tetrahydrobiopterin-dependent biosynthesis of nitric oxide in murine macrophages. *Eur J Biochem.* **213**:833-839;1993.
51. Mori M, Gotoh T: Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun.* **275**:715-719;2000.
52. Closs EI, Scheld JS, Sharafi M, Forstermann U: Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol.* **57**:68-74;2000.
53. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT: Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol.* **167**:416-423;2001.
54. Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM: Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* **500**:255-266;2004.
55. Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* **7**:145-173;1989.
56. Pulendran B: Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res.* **29**:187-196;2004.
57. Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U: Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem.* **384**:1343-1364;2003.
58. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C: Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* **269**:4705-4708;1994.

59. Martin E, Nathan C, Xie QW: Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med.* **180**:977-984;1994.
60. Nishiya T, Uehara T, Edamatsu H, Kaziro Y, Itoh H, Nomura Y: Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras. *FEBS Lett.* **408**:33-38;1997.
61. Li M, Pascual G, Glass CK: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol.* **20**:4699-4707;2000.
62. Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA: Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res.* **86**:319-325;2000.
63. Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C: Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med.* **178**:605-613;1993.
64. Nandan D, Lo R, Reiner NE: Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* **67**:4055-4063;1999.
65. Chinen T, Qureshi MH, Koguchi Y, Kawakami K: *Candida albicans* suppresses nitric oxide (NO) production by interferon-gamma (IFN-gamma) and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine peritoneal macrophages. *Clin Exp Immunol.* **115**:491-497;1999.
66. Lohoff M, Gessner A, Bogdan C, Rollinghoff M: Experimental murine leishmaniasis and the Th1/Th2 cell concept. *Tokai J Exp Clin Med.* **23**:347-350;1998.
67. Weinberg JB: Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med.* **4**:557-591;1998.
68. Siedlar M, Mytar B, Krzeszowiak A, Baran J, Hyszko M, Ruggiero I, Wieckiewicz J, Stachura J, Zembala M: Demonstration of iNOS-mRNA and iNOS in human monocytes stimulated with cancer cells in vitro. *J Leukoc Biol.* **65**:597-604;1999.
69. Fang FC, Vazquez-Torres A: Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **282**:L941-943;2002.
70. Pham TN, Rahman P, Tobin YM, Khraishi MM, Hamilton SF, Alderdice C, Richardson VJ: Elevated serum nitric oxide levels in patients with inflammatory arthritis associated with co-expression of inducible nitric oxide synthase and protein kinase C-eta in peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Rheumatol.* **30**:2529-2534;2003.
71. Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL: Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med.* **183**:2293-2302;1996.
72. Tiscornia AC, Cayota A, Landoni AI, Brito C, Oppezco P, Vuillier F, Robello C, Dighiero G, Gabus R, Pritsch O: Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia.* **18**:48-56;2004.
73. McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* **244**:6049-6055;1969.
74. Nauser T, Koppenol W: The rate constant of the reaction of superoxide with nitrogen monoxide: approaching the diffusion limit. *J Phys Chem A* **106**:4084-4086;2002.
75. Branco MR, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F: Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **279**:6501-6506;2004.
76. Antunes F, Cadenas E: Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.* **475**:121-126;2000.

77. Yamazaki I, Piette LH: 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;1990.
78. Liochev SI, Fridovich I: A mechanism for complementation of the sodA sodB defect in Escherichia coli by overproduction of the rbo gene product (desulfoferrodoxin) from Desulfoarculus baarsii. *J Biol Chem.* **272**:25573-25575;1997.
79. Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL: A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* **277**:17415-17427;2002.
80. Bian K, Gao Z, Weisbrodt N, Murad F: The nature of heme/iron-induced protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:5712-5717;2003.
81. Albrich JM, McCarthy CA, Hurst JK: Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**:210-214;1981.
82. Hurst JK, Barrette WC, Jr., Michel BR, Rosen H: Hypochlorous acid and myeloperoxidase-catalyzed oxidation of iron-sulfur clusters in bacterial respiratory dehydrogenases. *Eur J Biochem.* **202**:1275-1282;1991.
83. Winterbourn CC, Kettle AJ: Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* **29**:403-409;2000.
84. Senthilmohan R, Kettle AJ: Bromination and chlorination reactions of myeloperoxidase at physiological concentrations of bromide and chloride. *Arch Biochem Biophys.* **445**:235-244;2006.
85. Burner U, Furtmuller PG, Kettle AJ, Koppenol WH, Obinger C: Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J Biol Chem.* **275**:20597-20601;2000.
86. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A: Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature.* **391**:393-397;1998.
87. Evans TJ, Buttery LD, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J: Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:9553-9558;1996.
88. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW: Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* **94**:437-444;1994.
89. Radi R, Cosgrove TP, Beckman JS, Freeman BA: Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem J.* **290 (Pt 1)**:51-57;1993.
90. Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R: Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys.* **333**:49-58;1996.
91. Lyman SVH, J.K. : Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon-dioxide. Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* **117**:8867-8868;1995.
92. Bonini MG, Radi R, Ferrer-Sueta G, Ferreira AM, Augusto O: Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J Biol Chem.* **274**:10802-10806;1999.
93. Goss SP, Singh RJ, Kalyanaraman B: Bicarbonate enhances the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical. *J Biol Chem.* **274**:28233-28239;1999.
94. Liochev SI, Fridovich I: CO₂, not HCO₃⁻, facilitates oxidations by Cu,Zn superoxide dismutase plus H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:743-744;2004.

95. Bonini MG, Miyamoto S, Di Mascio P, Augusto O: Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. *J Biol Chem.* **279**:51836-51843;2004.
96. Lymar SVS, H.A.; Czapski, G.: Medium effects on reactions of the carbonate radical with thiocyanate, iodide, and ferrocyanide ions. *Radiat. Phys. Chem.* **59**:387-392;2000.
97. Czapski GL, S. V.; Schwarz, H. A. J: Acidity of the carbonate radical. . *J. Phys. Chem.* **103**:3447-3450;1999.
98. Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL: Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med.* **32**:841-859;2002.
99. Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ: Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **291**:R491-511;2006.
100. Domazou AS, Koppenol WH: Oxidation-state-dependent reactions of cytochrome c with the trioxidocarbonate(*1-) radical: a pulse radiolysis study. *J Biol Inorg Chem.* **12**:118-125;2007.
101. Tortora V, Quijano C, Freeman B, Radi R, Castro L: Mitochondrial aconitase reaction with nitric oxide, S-nitrosoglutathione, and peroxyxynitrite: mechanisms and relative contributions to aconitase inactivation. *Free Radic Biol Med.* **42**:1075-1088;2007.
102. Shafirovich V, Dourandin A, Huang W, Geacintov NE: The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides. *J Biol Chem.* **276**:24621-24626;2001.
103. Radi R: Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:4003-4008;2004.
104. Ignarro LJ: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **30**:535-560;1990.
105. Radi R, Denicola A, Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Rubbo H: Biological chemistry of peroxyxynitrite. in Ignarro L (ed): Nitric Oxide, biology and pathobiology. San Diego: Academic Press, 2000, 57-82.
106. Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, Kirk M, Kalyanaraman B, Freeman BA: Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.* **324**:15-25;1995.
107. Denicola A, Souza JM, Radi R, Lissi E: Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Arch Biochem Biophys.* **328**:208-212;1996.
108. Moller M, Botti H, Batthyany C, Rubbo H, Radi R, Denicola A: Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein. *J Biol Chem.* **280**:8850-8854;2005.
109. Quijano C, Romero N, Radi R: 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;2005.
110. Moller MN, Li Q, Vitturi DA, Robinson JM, Lancaster JR, Jr., Denicola A: Membrane "Lens" Effect: Focusing the Formation of Reactive Nitrogen Oxides from the (*)NO/O(2) Reaction. *Chem Res Toxicol.* 2007.
111. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* **258**:1898-1902;1992.
112. Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR: Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **375**:81-88;1994.

113. Xu S, Ying J, Jiang B, Guo W, Adachi T, Sharov V, Lazar H, Menzoian J, Knyushko TV, Bigelow D, Schoneich C, Cohen RA: Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **290**:H2220-2227;2006.
114. Ford E, Hughes MN, Wardman P: Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radic Biol Med.* **32**:1314-1323;2002.
115. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* **266**:4244-4250;1991.
116. Alvarez B, Ferrer-Sueta G, Radi R: Slowing of peroxynitrite decomposition in the presence of mannitol and ethanol. *Free Radic Biol Med.* **24**:1331-1337;1998.
117. Castro L, Rodriguez M, Radi R: Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem.* **269**:29409-29415;1994.
118. Denicola A, Souza JM, Radi R: Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:3566-3571;1998.
119. Merenyi G, Lind J: Thermodynamics of peroxynitrite and its CO₂ adduct. *Chem Res Toxicol.* **10**:1216-1220;1997.
120. Romero N, Denicola A, Souza JM, Radi R: Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. *Arch Biochem Biophys.* **368**:23-30;1999.
121. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS: Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* **16**:149-156;1994.
122. Szabo C, Salzman AL, Ischiropoulos H: Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123 occurs in early stages of endotoxic and hemorrhagic shock and ischemia-reperfusion injury. *FEBS Lett.* **372**:229-232;1995.
123. Glebska J, Koppenol WH: Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. *Free Radic Biol Med.* **35**:676-682;2003.
124. Wrona M, Patel K, Wardman P: Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.* **38**:262-270;2005.
125. Royall JA, Ischiropoulos H: Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* **302**:348-355;1993.
126. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B: Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med.* **34**:1359-1368;2003.
127. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS: Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:15038-15043;2006.
128. Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B: Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:5727-5732;2005.
129. Roychowdhury S, Luthe A, Keilhoff G, Wolf G, Horn TF: Oxidative stress in glial cultures: detection by DAF-2 fluorescence used as a tool to measure peroxynitrite rather than nitric oxide. *Glia.* **38**:103-114;2002.
130. Planchet E, Kaiser WM: Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot.* **57**:3043-3055;2006.

131. Shult PA, Graziano FM, Wallow IH, Busse WW: Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J Lab Clin Med.* **106**:638-645;1985.
132. Castro L, Alvarez MN, Radi R: Modulatory role of nitric oxide on superoxide-dependent luminol chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys.* **333**:179-188;1996.
133. Liochev SI, Fridovich I: Lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a mediator of superoxide anion production. *Arch Biochem Biophys.* **337**:115-120;1997.
134. Tarpey MM, Fridovich I: Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res.* **89**:224-236;2001.
135. Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, Freeman BA: Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res.* **84**:1203-1211;1999.
136. Hodgson EK, Fridovich I: The mechanism of the activity-dependent luminescence of xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys.* **172**:202-205;1976.
137. Santos CX, Bonini MG, Augusto O: Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* **377**:146-152;2000.
138. Andrekopoulos C, Zhang H, Joseph J, Kalivendi S, Kalyanaraman B: Bicarbonate enhances alpha-synuclein oligomerization and nitration: intermediacy of carbonate radical anion and nitrogen dioxide radical. *Biochem J.* **378**:435-447;2004.
139. Zhang H, Joseph J, Gurney M, Becker D, Kalyanaraman B: Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics. *J Biol Chem.* **277**:1013-1020;2002.
140. McCormick ML, Buettner GR, Britigan BE: Endogenous superoxide dismutase levels regulate iron-dependent hydroxyl radical formation in Escherichia coli exposed to hydrogen peroxide. *J Bacteriol.* **180**:622-625;1998.
141. Tamarit J, Cabisco E, Ros J: Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stress. *J Biol Chem.* **273**:3027-3032;1998.
142. Pacelli R, Wink DA, Cook JA, Krishna MC, DeGraff W, Friedman N, Tsokos M, Samuni A, Mitchell JB: Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of Escherichia coli. *J Exp Med.* **182**:1469-1479;1995.
143. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L: Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* **33**:1451-1464;2002.
144. Schapiro JM, Libby SJ, Fang FC: Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**:8496-8501;2003.
145. Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M: Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* **179**:442-448;1991.
146. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS: Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* **298**:446-451;1992.
147. Juliet PA, Hayashi T, Iguchi A, Ignarro LJ: Concomitant production of nitric oxide and superoxide in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* **310**:367-370;2003.
148. Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R: Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys.* **319**:491-497;1995.
149. Souza JM, Radi R: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* **360**:187-194;1998.
150. Thomson L, Denicola A, Radi R: The trypanothione-thiol system in Trypanosoma cruzi as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys.* **412**:55-64;2003.

151. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA: Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**:11853-11858;1996.
152. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA: Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry*. **37**:1613-1622;1998.
153. Neumann P, Gertzberg N, Vaughan E, Weisbrot J, Woodburn R, Lambert W, Johnson A: Peroxynitrite mediates TNF-alpha-induced endothelial barrier dysfunction and nitration of actin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **290**:L674-L684;2006.
154. Zhang P, Wang YZ, Kagan E, Bonner JC: Peroxynitrite targets the epidermal growth factor receptor, Raf-1, and MEK independently to activate MAPK. *J Biol Chem*. **275**:22479-22486;2000.
155. Koeck T, Levison B, Hazen SL, Crabb JW, Stuehr DJ, Aulak KS: Tyrosine nitration impairs mammalian aldolase A activity. *Mol Cell Proteomics*. **3**:548-557;2004.
156. Pearce LL, Kanai AJ, Epperly MW, Peterson J: Nitrosative stress results in irreversible inhibition of purified mitochondrial complexes I and III without modification of cofactors. *Nitric Oxide*. **13**:254-263;2005.
157. Turko IV, Li L, Aulak KS, Stuehr DJ, Chang JY, Murad F: Protein tyrosine nitration in the mitochondria from diabetic mouse heart. Implications to dysfunctional mitochondria in diabetes. *J Biol Chem*. **278**:33972-33977;2003.
158. Yamamoto T, Maruyama W, Kato Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Tanaka M, Sato Y, Naoi M: Selective nitration of mitochondrial complex I by peroxynitrite: involvement in mitochondria dysfunction and cell death of dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm*. **109**:1-13;2002.
159. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. **288**:481-487;1991.
160. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*. **269**:26066-26075;1994.
161. Richter C: Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids*. **44**:175-189;1987.
162. Hall ED, Detloff MR, Johnson K, Kupina NC: Peroxynitrite-mediated protein nitration and lipid peroxidation in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. **21**:9-20;2004.
163. Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide*. **14**:109-121;2006.
164. Szabo C: DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase: a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. **21**:855-869;1996.
165. Estevez AG, Spear N, Manuel SM, Radi R, Henderson CE, Barbeito L, Beckman JS: Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J Neurosci*. **18**:923-931;1998.
166. Ye Y, Quijano C, Robinson KM, Ricart KC, Strayer AL, Sahawneh MA, Shacka JJ, Kirk M, Barnes S, Accavitti-Loper MA, Radi R, Beckman JS, Estevez AG: Prevention of peroxynitrite-induced apoptosis of motor neurons and PC12 cells by tyrosine-containing peptides. *J Biol Chem*. **282**:6324-6337;2007.

167. Szabo C, Saunders C, O'Connor M, Salzman AL: Peroxynitrite causes energy depletion and increases permeability via activation of poly (ADP-ribose) synthetase in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **16**:105-109;1997.
168. Brunelli L, Crow JP, Beckman JS: The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to Escherichia coli. *Arch Biochem Biophys.* **316**:327-334;1995.
169. Zhu L, Gunn C, Beckman JS: Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* **298**:452-457;1992.
170. De Groote MA, Ochsner UA, Shiloh MU, Nathan C, McCord JM, Dinauer MC, Libby SJ, Vazquez-Torres A, Xu Y, Fang FC: Periplasmic superoxide dismutase protects Salmonella from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:13997-14001;1997.
171. Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL: Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol.* **151**:309-319;1993.
172. Ko J, Gendron-Fitzpatrick A, Splitter GA: Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis. *J Immunol.* **168**:2433-2440;2002.
173. Hickman-Davis J, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR, Matalon S: Surfactant protein A mediates mycoplasmaicidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:4953-4958;1999.
174. Darrah PA, Hondalus MK, Chen Q, Ischiropoulos H, Mosser DM: Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of Rhodococcus equi by activated macrophages. *Infect Immun.* **68**:3587-3593;2000.
175. Gookin JL, Allen J, Chiang S, Duckett L, Armstrong MU: Local peroxynitrite formation contributes to early control of Cryptosporidium parvum infection. *Infect Immun.* **73**:3929-3936;2005.
176. Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zuben FJ, Yamada A, Augusto O: In vivo formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect Immun.* **66**:807-814;1998.
177. Assreuy J, Cunha FQ, Epperlein M, Noronha-Dutra A, O'Donnell CA, Liew FY, Moncada S: Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of Leishmania major. *Eur J Immunol.* **24**:672-676;1994.
178. Murray HW, Nathan CF: Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. *J Exp Med.* **189**:741-746;1999.
179. Padalko E, Ohnishi T, Matsushita K, Sun H, Fox-Talbot K, Bao C, Baldwin WM, 3rd, Lowenstein CJ: Peroxynitrite inhibition of Coxsackievirus infection by prevention of viral RNA entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**:11731-11736;2004.
180. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E: Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect Immun.* **64**:3127-3133;1996.
181. Shiloh MU, MacMicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M, Nathan C: Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity.* **10**:29-38;1999.
182. Morgenstern DE, Gifford MA, Li LL, Doerschuk CM, Dinauer MC: Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to Aspergillus fumigatus. *J Exp Med.* **185**:207-218;1997.
183. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF: Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:5243-5248;1997.

184. Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Rollinghoff M, Gresser I, Bogdan C: Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*. **8**:77-87;1998.
185. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, Padron J, Phillips RS: Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol*. **24**:980-984;1994.
186. Lander HM: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J*. **11**:118-124;1997.
187. Li N, Karin M: Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J*. **13**:1137-1143;1999.
188. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC: Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med*. **192**:227-236;2000.
189. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC: Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science*. **287**:1655-1658;2000.
190. Fang FC, DeGroot MA, Foster JW, Baumler AJ, Ochsner U, Testerman T, Bearson S, Giard JC, Xu Y, Campbell G, Laessig T: Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**:7502-7507;1999.
191. Gardner AM, Gardner PR: Flavohemoglobin detoxifies nitric oxide in aerobic, but not anaerobic, Escherichia coli. Evidence for a novel inducible anaerobic nitric oxide-scavenging activity. *J Biol Chem*. **277**:8166-8171;2002.
192. Gardner AM, Helmick RA, Gardner PR: Flavorubredoxin, an inducible catalyst for nitric oxide reduction and detoxification in Escherichia coli. *J Biol Chem*. **277**:8172-8177;2002.
193. Pathania R, Navani NK, Gardner AM, Gardner PR, Dikshit KL: Nitric oxide scavenging and detoxification by the Mycobacterium tuberculosis haemoglobin, HbN in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **45**:1303-1314;2002.
194. Bryk R, Griffin P, Nathan C: Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature*. **407**:211-215;2000.
195. Barr SD, Gedamu L: Role of peroxidoxins in Leishmania chagasi survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem*. **278**:10816-10823;2003.
196. Trujillo M, Budde H, Pineyro MD, Stehr M, Robello C, Flohe L, Radi R: Trypanosoma brucei and trypanosoma cruzi tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem*. 2004.
197. Chen L, Xie QW, Nathan C: Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol Cell*. **1**:795-805;1998.
198. Hausladen A, Privalle CT, Keng T, DeAngelo J, Stamler JS: Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell*. **86**:719-729;1996.
199. Wilkinson SR, Temperton NJ, Mondragon A, Kelly JM: Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in Trypanosoma cruzi. *J Biol Chem*. **275**:8220-8225;2000.
200. Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio IL, Kelly JM: Trypanosoma cruzi expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:13453-13458;2002.
201. Wilkinson SR, Kelly JM: The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem*. **384**:517-525;2003.
202. Brener Z: Biology of Trypanosoma cruzi. *Annu Rev Microbiol*. **27**:347-382;1973.
203. de Souza W: Cell biology of Trypanosoma cruzi. *Int Rev Cytol*. **86**:197-283;1984.

204. Campos MA, Gazzinelli RT: Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm.* **13**:139-143;2004.
205. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS: Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection. *Trends Parasitol.* **18**:262-265;2002.
206. Mortara RA, da Silva S, Patricio FR, Higuchi ML, Lopes ER, Gabbai AA, Carnevale P, Rocha A, Ferreira MS, Souza MM, de Franco MF, Turcato G, Jr., Ferraz Neto BH: Imaging Trypanosoma cruzi within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. *Parasitol Res.* **85**:800-808;1999.
207. Salomone OA, Juri D, Omelianiuk MO, Sembaj A, Aguerri AM, Carriazo C, Barral JM, Madoery R: Prevalence of circulating Trypanosoma cruzi detected by polymerase chain reaction in patients with Chagas' cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* **85**:1274-1276;2000.
208. Kierszenbaum F: Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **37**:1-11;2003.
209. Burleigh BA, Woolsey AM: Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. *Cell Microbiol.* **4**:701-711;2002.
210. Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW: Role in host cell invasion of Trypanosoma cruzi-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med.* **179**:1017-1022;1994.
211. Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW: Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* **71**:1117-1130;1992.
212. Neira I, Ferreira AT, Yoshida N: Activation of distinct signal transduction pathways in Trypanosoma cruzi isolates with differential capacity to invade host cells. *Int J Parasitol.* **32**:405-414;2002.
213. Mortara RA: Trypanosoma cruzi: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp Parasitol.* **73**:1-14;1991.
214. Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M: Trypanosoma cruzi amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med.* **182**:1243-1258;1995.
215. Burleigh BA, Andrews NW: The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol.* **49**:175-200;1995.
216. Araujo-Jorge TC, De Souza W: Interaction of Trypanosoma cruzi with macrophages. Involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galactosamine residues on the recognition process. *Acta Trop.* **45**:127-136;1988.
217. Kierszenbaum F, Knecht E, Budzko DB, Pizzimenti MC: Phagocytosis: a defense mechanism against infection with Trypanosoma cruzi. *J Immunol.* **112**:1839-1844;1974.
218. Rosestolato CT, Dutra Jda M, De Souza W, de Carvalho TM: Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of Trypanosoma cruzi with host cells. *Cell Struct Funct.* **27**:91-98;2002.
219. Caler EV, Morty RE, Burleigh BA, Andrews NW: Dual role of signaling pathways leading to Ca²⁺ and cyclic AMP elevation in host cell invasion by Trypanosoma cruzi. *Infect Immun.* **68**:6602-6610;2000.
220. Vieira MC, de Carvalho TU, de Souza W: Effect of protein kinase inhibitors on the invasion process of macrophages by Trypanosoma cruzi. *Biochem Biophys Res Commun.* **203**:967-971;1994.
221. Todorov AG, Einicker-Lamas M, de Castro SL, Oliveira MM, Guilherme A: Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by Trypanosoma cruzi infection. *J Biol Chem.* **275**:32182-32186;2000.
222. Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* **17**:593-623;1999.

223. Vieira M, Dutra JM, Carvalho TM, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padron T, Souza W: Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol.* **118**:491-500;2002.
224. Kwiatkowska K, Sobota A: Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays.* **21**:422-431;1999.
225. Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA: Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci.* **116**:3611-3622;2003.
226. Vignais PV: The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci.* **59**:1428-1459;2002.
227. Camargo MM, Almeida IC, Pereira ME, Ferguson MA, Travassos LR, Gazzinelli RT: Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol.* **158**:5890-5901;1997.
228. Ropert C, Almeida IC, Closel M, Travassos LR, Ferguson MA, Cohen P, Gazzinelli RT: Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* **166**:3423-3431;2001.
229. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN: Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol.* **164**:5564-5574;2000.
230. Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW: The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med.* **171**:401-413;1990.
231. Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G: A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* **61**:1277-1287;1990.
232. Docampo R, Casellas AM, Madeira ED, Cardoni RL, Moreno SN, Mason RP: Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi*-stimulated human neutrophils. *FEBS Lett.* **155**:25-30;1983.
233. Cardoni RL, Antunez MI, Morales C, Nantes IR: Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* **56**:329-334;1997.
234. McCabe RE, Mullins BT: Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and importance of oxygen-independent killing. *J Immunol.* **144**:2384-2388;1990.
235. Torrico F, Heremans H, Rivera MT, Van Marck E, Billiau A, Carlier Y: Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol.* **146**:3626-3632;1991.
236. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG: Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med.* **175**:169-174;1992.
237. Reed SG: In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol.* **140**:4342-4347;1988.
238. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M: Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett.* **33**:35-40;1992.

239. Petray P, Rottenberg ME, Grinstein S, Orn A: Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **16**:193-199;1994.
240. Saefel M, Fleischer B, Hoerauf A: Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* **69**:2252-2259;2001.
241. Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F: Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.* **66**:1208-1215;1998.
242. Rottenberg ME, Castanos-Velez E, de Mesquita R, Laguardia OG, Biberfeld P, Orn A: Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. *Eur J Immunol.* **26**:3203-3213;1996.
243. Naviliat M, Gualco G, Cayota A, Radi R: Protein 3-nitrotyrosine formation during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Braz J Med Biol Res.* **38**:1825-1834;2005.
244. Parussini F, Duschak VG, Cazzulo JJ: Membrane-bound cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **44**:513-519;1998.
245. Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerban F: Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol.* **72**:727-734;2002.
246. Stempin CC, Tanos TB, Coso OA, Cerban FM: Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol.* **34**:200-209;2004.
247. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A: The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol.* **22**:2501-2506;1992.
248. Silva JS, Machado FS, Martins GA: The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci.* **8**:s314-325;2003.
249. Bergeron M, Olivier M: *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J Immunol.* **177**:6271-6280;2006.
250. Martins GA, Vieira LQ, Cunha FQ, Silva JS: 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;1999.
251. Cummings KL, Tarleton RL: Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* **72**:4081-4089;2004.
252. Tanaka Y, Kiyotaki C, Tanowitz H, Bloom BR: 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;1982.
253. Tanaka Y, Tanowitz H, Bloom BR: Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism. *Infect Immun.* **41**:1322-1331;1983.
254. Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Freeman GL: Differential regulation of nitric oxide synthase isoforms in experimental acute chagasic cardiomyopathy. *Clin Exp Immunol.* **121**:112-119;2000.
255. Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, Bhatia V, Garg N: An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. *An Acad Bras Cienc.* **77**:695-715;2005.
256. Giulivi C, Davies KJ: Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods Enzymol.* **233**:363-371;1994.

257. Malencik DA, Sprouse JF, Swanson CA, Anderson SR: Dityrosine: preparation, isolation, and analysis. *Anal Biochem.* **242**:202-213;1996.
258. Baxter MA, Leslie RG, Reeves WG: 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;1983.
259. Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S: Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* **106**:1349-1358;1988.
260. Piacenza L, Peluffo G, Radi R: L-arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* in the regulation of programmed cell death. *Methods Enzymol.* **359**:286-302;2002.
261. Walrand S, Valeix S, Rodriguez C, Ligot P, Chassagne J, Vasson MP: Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta.* **331**:103-110;2003.
262. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB, Jr.: Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol.* **268**:142-151;1996.
263. Ryer-Powder JE, Forman HJ: Adhering lung macrophages produce superoxide demonstrated with desferal-Mn(IV). *Free Radic Biol Med.* **6**:513-518;1989.
264. Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC, Vuillier F, Gualco G, Dighiero G, Radi R, Cayota AM: Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *Journal of Immunology.* **162**:3356-3366.;1999.
265. Zhang H, Andrekopoulos C, Joseph J, Chandran K, Karoui H, Crow JP, Kalyanaraman B: Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein: intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. *J Biol Chem.* **278**:24078-24089;2003.
266. Liochev SI, Fridovich I: On the role of bicarbonate in peroxidations catalyzed by Cu,Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* **27**:1444-1447;1999.
267. Singh RJ, Karoui H, Gunther MR, Beckman JS, Mason RP, Kalyanaraman B: Reexamination of the mechanism of hydroxyl radical adducts formed from the reaction between familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn superoxide dismutase mutants and H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:6675-6680;1998.
268. Villamena FA, Locigno EJ, Rockenbauer A, Hadad CM, Zweier JL: Theoretical and experimental studies of the spin trapping of inorganic radicals by 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). 2. Carbonate radical anion. *J Phys Chem A Dyn Kinet Environ Chem Spectrosc Struct Theory.* **111**:384-391;2007.
269. Behar DC, G. and Duchovny, I.: Carbonate Radical in Flash Photolysis and Pulse Radiolysis of Aqueous Carbonate Solutions. *J.Phys. Chem.* **74**:2206-2210;1970.
270. Winterbourn CC: The ability of scavengers to distinguish OH. production in the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction: comparison of four assays for OH. *Free Radic Biol Med.* **3**:33-39;1987.
271. Buxton GVE, A.J.: Rate constant for reaction of hydroxyl radicals with bicarbonate ions. *Radiat.Phys.Chem.* **27**:241-243;1986.
272. Buxton GVG, C.L.; Helman, W.P.; Ross, A.B.: Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons,Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals (.OH/.O-)in Aqueous Solution. *J.Phys. Chem.Ref.Data.* **17**:513-886;1988.
273. Elliot JM, D. R.; Buxton, G. V. and Wood, N. D.: Estimation of rate constants for near-diffusion-controlled reactions in water at high temperatures. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **86**:1539-1547;1990.
274. Chen SN, Hoffman MZ: Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution. *Radiat Res.* **56**:40-47;1973.

275. Holcman JB, E.; Sehested, K. : *Proc. Tihany Symp. Radiat. Chem.* **6**:149-153;1986.
276. Solar SS, W.; and Getoff, N.;;: Reactivity of OH with Tyrosine In Aqueous Solution Studied by Pulse Radiolysis. *J.Phys. Chem.* **88**:2091-2095;1984.
277. Sankarapandi S, Zweier JL: Bicarbonate is required for the peroxidase function of Cu, Zn-superoxide dismutase at physiological pH. *J Biol Chem.* **274**:1226-1232;1999.
278. Yim MB, Chock PB, Stadtman ER: Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:5006-5010;1990.
279. Zhang H, Andrekopoulos C, Joseph J, Crow J, Kalyanaraman B: The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and alpha-synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products. *Free Radic Biol Med.* **36**:1355-1365;2004.
280. Kalyanaraman B, Joseph J, Zhang H: Bicarbonate enhances nitration and oxidation reactions in biological systems--role of reactive oxygen and nitrogen species. *Adv Exp Med Biol.* **500**:175-182;2001.
281. Karunakaran C, Zhang H, Joseph J, Antholine WE, Kalyanaraman B: Thiol oxidase activity of copper, zinc superoxide dismutase stimulates bicarbonate-dependent peroxidase activity via formation of a carbonate radical. *Chem Res Toxicol.* **18**:494-500;2005.
282. Zhang H, Joseph J, Crow J, Kalyanaraman B: Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu, Zn superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* **37**:2018-2026;2004.
283. Gatti RM, Alvarez B, Vasquez-Vivar J, Radi R, Augusto O: Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* **349**:36-46;1998.
284. Augusto O, Gatti RM, Radi R: Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinopyridone N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch Biochem Biophys.* **310**:118-125;1994.
285. Cardoni RL, Rottenberg ME, Segura EL: Increased production of reactive oxygen species by cells from mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Immunol.* **128**:11-21;1990.
286. White CR, Darley-Usmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, Parks DA, Tarpey MM, Freeman BA: Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:8745-8749;1996.
287. Chakraborty S, Massey V: Reaction of reduced flavins and flavoproteins with diphenyliodonium chloride. *J Biol Chem.* **277**:41507-41516;2002.
288. Stolk J, Hiltermann TJ, Dijkman JH, Verhoeven AJ: Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **11**:95-102;1994.
289. Green SP, Hamilton JA, Uhlinger DJ, Phillips WA: Expression of p47-phox and p67-phox proteins in murine bone marrow-derived macrophages: enhancement by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha but not colony stimulating factor 1. *J Leukoc Biol.* **55**:530-535;1994.
290. Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F: Molecular basis of interferon-gamma and lipopolysaccharide enhancement of phagocyte respiratory burst capability. Studies on the gene expression of several NADPH oxidase components. *J Biol Chem.* **265**:20241-20246;1990.
291. Rosen GM, Cohen MS, Britigan BE, Pou S: Application of spin traps to biological systems. *Free Radic Res Commun.* **9**:187-195;1990.
292. Kotake Y, Reinke LA, Tanigawa T, Koshida H: Determination of the rate of superoxide generation from biological systems by spin trapping: use of rapid oxygen depletion to measure the decay rate of spin adducts. *Free Radic Biol Med.* **17**:215-223;1994.

293. Zhang H, Joseph J, Vasquez-Vivar J, Karoui H, Nsanzumuhire C, Martasek P, Tordo P, Kalyanaraman B: Detection of superoxide anion using an isotopically labeled nitron spin trap: potential biological applications. *FEBS Lett.* **473**:58-62;2000.
294. Turner MW: Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today.* **17**:532-540;1996.
295. Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC: The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* **13**:74-78;2001.
296. Stahl PD, Ezekowitz RA: The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol.* **10**:50-55;1998.
297. Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM: Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature.* **351**:155-158;1991.
298. Rothe G, Valet G: Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol.* **47**:440-448;1990.
299. Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS: Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett.* **63**:113-120;1998.
300. Nathan C, Shiloh MU: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:8841-8848;2000.
301. Blanchette J, Racette N, Faure R, Siminovitch KA, Olivier M: Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol.* **29**:3737-3744;1999.
302. Forget G, Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M: Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun.* **74**:6272-6279;2006.
303. Olivier M, Romero-Gallo BJ, Matte C, Blanchette J, Posner BI, Tremblay MJ, Faure R: Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression. *J Biol Chem.* **273**:13944-13949;1998.
304. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS: Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun.* **64**:128-134;1996.
305. Piacenza L, Peluffo G, Radi R: L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:7301-7306;2001.
306. Peluffo G, Piacenza L, Irigoien F, Alvarez MN, Radi R: L-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Trends Parasitol.* **20**:363-369;2004.
307. Rangel-Aldao R, Allende O, Triana F, Piras R, Henriquez D, Piras M: Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* **22**:39-43;1987.
308. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC: Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* **5**:227-231;1992.
309. Lawrence A, Jones CM, Wardman P, Burkitt MJ: Evidence for the role of a peroxidase compound I-type intermediate in the oxidation of glutathione, NADH, ascorbate, and dichlorofluorescein by cytochrome c/H₂O₂. Implications for oxidative stress during apoptosis. *J Biol Chem.* **278**:29410-29419;2003.
310. Trujillo M, Naviliat M, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R: Peroxynitrite Biochemistry: Formation, Reactions and Detection. *Analisis, EurJAC.* **28**:518;2000.
311. Flohe L, Budde H, Bruns K, Castro H, Clos J, Hofmann B, Kansal-Kalavar S, Krumme D, Menge U, Plank-Schumacher K, Sztajer H, Wissing J, Wylegalla C, Hecht HJ:

- Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys.* **397**:324-335;2002.
312. Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L: Peroxiredoxins. *Biol Chem.* **383**:347-364;2002.
313. Detweiler CD, Deterding LJ, Tomer KB, Chignell CF, Germolec D, Mason RP: Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* **33**:364-369;2002.
314. Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Mason RP, Barbeito L, radi R: Mitochondria dysfunction and oxidative stress in SODG93A-bearing astrocytes promote motoneuron degeneration. . *Proc Natl Acad Sci U S A.* **en proceso de revisión**2007.
315. Giordanengo L, Guinazu N, Stempin C, Fretes R, Cerban F, Gea S: Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol.* **32**:1003-1011;2002.
316. Gazzinelli RT, Denkers EY: Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* **6**:895-906;2006.