

Informe final publicable de proyecto

Actividad citotóxica y metabolismo energético en el proceso de fagocitosis: efecto de la concentración de oxígeno.

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155586

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2023

ALVAREZ CAL, María Noel (Responsable Técnico - Científico)

PEREYRA DOMENECH, Josefina (Investigador)

PEREYRA DOMENECH, Josefina (Investigador)

ESTRADA SOSA, Carlos Damián (Investigador)

PIACENZA BENGOCHEA, María Lucía (Investigador)

PROLO BUZZALINO, Carolina (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS. FUNDACIÓN PARA EL DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS

Resumen del proyecto

La respuesta citotóxica de los macrófagos y otros fagocitos incluye la producción de óxido nítrico (.NO) y superóxido (O₂⁻) dependiente de la óxido nítrico sintasa y de la NADPH oxidasa. Ambas enzimas usan O₂ como sustrato, por lo que su actividad, así como la formación del producto de la reacción entre .NO y O₂⁻, el peroxinitrito, pueden verse afectadas por la concentración local de O₂. La pO₂ en los tejidos varía entre 2-15 %, mientras que la mayoría de los ensayos in vitro se realizan con una pO₂ de 21%.

Para establecer el efecto de la concentración de O₂, se expusieron macrófagos a diferentes concentraciones de O₂ y se determinó la velocidad de formación de O₂⁻, .NO y peroxinitrito. Los resultados muestran que la producción de O₂⁻ y .NO disminuyen cuando la pO₂ desciende por debajo de 10%, y por ende también se detecta menor formación de peroxinitrito. Sin embargo, a 6% de O₂, se conserva casi el 100% de la formación de O₂⁻ y un 60 % de la formación de ?NO y ONOO⁻.

Para evaluar la capacidad citotóxica en estas condiciones se utilizó el modelo de infección por el patógeno Trypanosoma cruzi. En línea con los resultados anteriores, se observó que la citotoxicidad es menor a 6% que a 21% de O₂. Sin embargo, aún a 6% de O₂, se observa que la activación de los macrófagos para formar peroxinitrito aumenta su capacidad de eliminación de T. cruzi, mostrando la relevancia de este oxidante como agente citotóxico en condiciones fisiológicas.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Bioquímica y Biología Molecular / Formación de especies reactivas y metabolismo

Palabras clave: macrófagos / oxígeno / fagocitosis /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Los macrófagos, en todas sus variantes tisulares, son las células responsables de detectar y responder a alteraciones homeostáticas, daño al tejido o invasión por patógenos. Cambios en sus rutas metabólicas le permiten reaccionar a cambios en su entorno en forma rápida. No existe un solo estado de activación, y si bien en la nomenclatura clásica se diferencian dos subgrupos denominados M1 (activación clásica o inflamatoria) y M2 (activación alterna o anti-inflamatoria), actualmente se acepta que se necesita un modelo multidimensional para comprender el amplio repertorio de fenotipos controlado por señales ambientales.

Las funciones efectoras de células del sistema inmune se acoplan directamente a cambios específicos en el metabolismo celular. Esta reprogramación metabólica ocurre en respuesta a señales microambientales específicas que incluye la exposición a citoquinas, disponibilidad de nutrientes y condiciones locales como pH y tensión de oxígeno.

Macrófagos y concentración de O₂.

El microambiente normal para los distintos macrófagos tisulares, o para monocitos que migran desde sangre, es diferente de las condiciones usadas generalmente en los experimentos in vitro, en los que las células son incubadas en una mezcla gaseosa donde el oxígeno ocupa el 20%. En los tejidos se han determinado concentraciones de O₂ entre 20 y 120?M (2-12%). Además de esas variaciones, muchos de los procesos patológicos en los que los macrófagos participan se caracterizan por hipoxia (ej. inflamación, tumores y placa de ateroma), con valores de oxígeno de hasta 5?M (1).

La respuesta transcripcional a bajas concentraciones de oxígeno está dirigida fundamentalmente por los factores inducidos por hipoxia (HIF) y NF-?B. Existen además mecanismos post-transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales que generan cambios (1-7).

La hipoxia y la activación proinflamatoria comparten mecanismos y fenotipos. Interesantemente la delección de HIF-1? en ratones mostró su importancia durante la infección de macrófagos en ambientes con baja, media y alta concentración de oxígeno. Asimismo, la interacción con TLR-4, lleva a la activación de HIF-1? (8,9).

Los efectos de la concentración de O₂ en la respuesta del macrófago no sólo lo implican como molécula señalizadora sino también como sustrato de enzimas fundamentales en la respuesta citotóxica.

Funciones efectoras y el oxígeno.

Parte importante de los mecanismos citotóxicos de los macrófagos dependen del oxígeno. Estos involucran la formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, por lo que comprender qué ocurre con ellos y su rol en la respuesta efectora a concentraciones de oxígeno fisiológicas es especialmente importante.

Durante la fagocitosis se activa el ensamblaje del complejo enzimático NADPH oxidasa (NOX2) en la membrana del fagosoma. Esta enzima cataliza la reducción del O₂ a partir del NADPH para formar superóxido (O₂⁻) que deriva en especies oxidantes como peróxido de hidrógeno y peroxinitrito (1). Por otro lado, se induce la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), que genera óxido nítrico (.NO) a partir de arginina, O₂ y NADPH. A su vez, el óxido nítrico y el superóxido reaccionan y forman peroxinitrito, especie fuertemente oxidante, capaz de generar nitración y oxidación de residuos proteicos (10). Los Km reportados de NOX2 e iNOS para el O₂ son 20 y 110 μM respectivamente, lo que implica que en el rango fisiológico la velocidad de ambas reacciones puede sufrir variaciones.

La producción de oxidantes puede verse afectada por lo tanto por la concentración O₂ y el perfil metabólico. Existen algunos reportes en la literatura acerca de la influencia del O₂ en la actividad y la expresión de estas enzimas, pero los datos aún son escasos (11-14).

Metodología/Diseño del estudio

1- Determinar la producción de especies reactivas del oxígeno en macrófagos expuestos a concentraciones fisiológicas de oxígeno.

Estudiaremos como influye la concentración de oxígeno en las principales fuentes de oxidantes en estas células: la NADPH oxidasa, la iNOS y la cadena de transporte de electrones. Realizaremos 2 abordajes de esta pregunta que nos permitirán discernir el rol del oxígeno como sustrato para la formación de especies reactivas y como molécula señalizadora capaz de regular la expresión de HIF-1?. En el primer caso, realizaremos incubaciones a bajas concentraciones de oxígeno luego de la activación de los macrófagos y se cuantificará la formación de oxidantes. En segundo lugar, se llevarán a cabo incubaciones a largo plazo para estudiar la influencia del oxígeno en la formación de oxidantes regulada por la expresión de HIF-1?.

Actividades específicas

Formación de superóxido. Los macrófagos serán incubados en una cámara hipóxica termostatzada, variando la concentración de O₂ en un rango entre 1 y 20%, durante períodos variables de tiempo y se medirá la formación de superóxido desencadenada por PMA y Trypanosoma cruzi. La cuantificación de superóxido se realizará indirectamente por medio de la sonda Amplex Red. Para determinar la fuente de formación de superóxido se utilizará un inhibidor específico Nox2

Formación de óxido nítrico y peroxinitrito. Se realizarán incubaciones a distintos tiempos en la cámara hipóxica de forma similar a lo descrito en la sección anterior y se inducirá la expresión de la iNOS. Se determinará la producción de óxido nítrico en el sobrenadante de los macrófagos por la técnica de Griess.

La activación simultánea de la NOX2 y la iNOS nos permite evaluar la formación de peroxinitrito, que cuantificaremos con la sonda fluoresceína-boronato, desarrollada en nuestro laboratorio.

Estabilización del factor HIF-1-?. Se estudiará el grado de estabilización del factor HIF-1-? por la activación de los macrófagos (PMA, IFN-γ/LPS, T.cruzi), como por la variación de la concentración de oxígeno por la técnica western blot.

Expresión de NOX2 e INOS. Se incubarán los macrófagos en diferentes concentraciones de oxígeno (2-24 h) y se lisarán las células para evaluar la expresión de las enzimas NOX2 e iNOS por western blot utilizando anticuerpos específicos.

2- Evaluar el éxito de los mecanismos citotóxicos en el fagosoma a distintas tensiones de oxígeno

Dado que la formación de especies reactivas depende del oxígeno como sustrato y que las principales enzimas que participan en este proceso son reguladas por factores como HIF1?, es importante realizar estudios a concentraciones fisiológicas de oxígeno. Estudiaremos si existen variaciones en el poder citotóxico de macrófagos infectados con T.cruzi en distintas concentraciones de oxígeno.

Actividades específicas

Infección de macrófagos. Los macrófagos serán infectados con T.cruzi en una relación 5:1 y mantenidos en la cámara hipóxica con presiones de oxígeno fijadas entre 1-20% durante dos horas, luego los cultivos serán mantenidos en la estufa convencional

por 24 horas adicionales. Finalmente, se fijarán los cultivos y se teñirán con DAPI para determinar la relación parásitos/macrófagos como índice de infección.

Resultados, análisis y discusión

1- Detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se expusieron macrófagos a distintas presiones parciales de O₂ (pO₂= 2, 6, 10, 15 y 21%) y se activó farmacológicamente la NADPH oxidasa. Para cuantificar la formación de radical O₂·- se hizo a través de la cuantificación con Amplex Red. del producto de su dismutación, el H₂O₂. Los resultados muestran que la velocidad de formación de H₂O₂ presenta una dependencia de tipo hiperbólica con el O₂, con un Km= 2, 9%. Esto implica que a 5% de O₂, condición similar a la de la mayoría de los tejidos, la producción de O₂·- alcanza el 60% de la actividad máxima, registrada a 21% (190?M) de oxígeno.

2- Producción de óxido nítrico (.NO)

Para evaluar la producción de óxido nítrico se pre-estimulan las células con citoquinas pro-inflamatorias (ej. IFN γ y LPS) que conducen a la inducción de la expresión de la isoforma 2 de la óxido nítrico sintasa (iNOS o NOS2). Luego de 4 horas, se inicia la detección en el lector de fluorescencia en placas (Varioskan Lux) con la sonda DAF-FM diacetato que reacciona con el radical dióxido de nitrógeno, derivado del .NO. Las medidas se realizaron en las mismas condiciones planteadas previamente. De la misma manera que para el H₂O₂, se observa una dependencia hiperbólica con la pO₂, pero con un Km mayor (Km= 4, 6%), por lo que en condiciones de 5% de O₂, la actividad de la iNOS es cercana al 50% de la observada en aire atmosférico (21%O₂)

3- Producción de peroxinitrito

La producción de peroxinitrito (ONOO?) depende de la formación simultánea de .NO por la iNOS y de O₂·- por la NOX2. Para la detección del peroxinitrito producido bajo distintas concentraciones de oxígeno, se utilizó la sonda boronada derivada de la cumarina (ácido cumarín-borónico) que reacciona selectivamente con el ONOO?.

La detección de ONOO? indica que esta especie se forma en las distintas condiciones y que aumenta con el incremento de la concentración de oxígeno alcanzando un máximo a partir de 10% de O₂ y por encima de esa presión parcial. En base a estos datos, se puede estimar que en condiciones fisiológicas (pO₂=5%) se forme un 60% del peroxinitrito que se forma a 21% de O₂.

4- Infección de macrófagos con T. cruzi

Para determinar si los cambios observados en la velocidad de formación de O₂·-, .NO y ONOO? a distintas pO₂ alteran la capacidad citotóxica de los macrófagos, se infectaron macrófagos "naive" o inmuoestimulados con tripomastigotas de T. cruzi en presencia de una atmósfera de 6% o 21% O₂ durante 2 horas y luego se transfirieron los cultivos a una incubadora tradicional. Se evaluó el éxito de la infección a las 24 horas, observándose que en las condiciones donde se forma ONOO? (inmuoestimulados) hay menor proliferación de los parásitos tanto a 6% como a 21%, demostrando la importancia de la formación de este oxidante en condiciones fisiológicas. Por otro lado, concomitantemente con la menor formación de ONOO? detectada a 6%, se evidencia un menor control de la proliferación del parásito por parte del macrófago.

Conclusiones y recomendaciones

1- Se determinó la formación de peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y peroxinitrito en atmósferas con distintas presiones parciales de O₂ observando que, incluso frente a tensiones de oxígeno correspondientes al valor mínimo del rango de concentración de O₂ en los tejidos, la producción de estas especies es relevante.

2- La formación de peroxinitrito muy importante para el control de la infección por Trypanosoma cruzi en el rango de concentraciones estudiado (6-21%)

Referencias bibliográficas

1. Qian, B. Z., and Pollard, J. W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39-51
2. Lewis, J. S., Lee, J. A., Underwood, J. C., Harris, A. L., and Lewis, C. E. (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *Journal of leukocyte biology* 66, 889-900
3. Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C. E. (2004) Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104, 2224-2234
4. Bosco, M. C., Puppo, M., Blengio, F., Fraone, T., Cappello, P., Giovarelli, M., and Varesio, L. (2008) Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* 213, 733-749
5. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 453-461
6. Coffelt, S. B., Hughes, R., and Lewis, C. E. (2009) Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1796, 11-18
7. Walmsley, S. R., Chilvers, E. R., and Whyte, M. K. (2009) Hypoxia. Hypoxia, hypoxia inducible factor and myeloid cell function. *Arthritis Res Ther* 11, 219
8. Blouin, C. C., Page, E. L., Soucy, G. M., and Richard, D. E. (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 103, 1124-1130
9. Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., and Fandrey, J. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 396, 517-527
10. Radi, R. (2013) Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem* 288, 26464-26472
11. Wiese, M., Gerlach, R. G., Popp, I., Matuszak, J., Mahapatro, M., Castiglione, K., Chakravorty, D., Willam, C., Hensel, M., Bogdan, C., and Jantsch, J. (2012) Hypoxia-mediated impairment of the mitochondrial respiratory chain inhibits the bactericidal activity of macrophages. *Infect Immun* 80, 1455-1466
12. Maddalena, L. A., Selim, S. M., Fonseca, J., Messner, H., McGowan, S., and Stuart, J. A. (2017) Hydrogen peroxide production is affected by oxygen levels in mammalian cell culture. *Biochem Biophys Res Commun*
13. Mi, Z., Rapisarda, A., Taylor, L., Brooks, A., Creighton-Gutteridge, M., Melillo, G., and Varesio, L. (2008) Synergistic induction of HIF-1alpha transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages. *Cell cycle* 7, 232-241
14. Zinkernagel, A. S., Peyssonnaud, C., Johnson, R. S., and Nizet, V. (2008) Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. *The Journal of infectious diseases* 197, 214-217

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)