

29. Salud Humana

El óxido nítrico como mediador en la disfunción mitocondrial y cardíaca durante la endotoxemia leve y severa

Autor: Vico, Tamara Antonela; tvico@ffyb.uba.ar

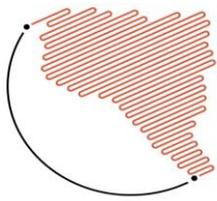
Co-autores: Vanasco, Virginia; Adán Areán, Juan Santiago; Marchini, Timoteo; Calabró, Valeria; Garcés, Mariana; Mazo, Tamara; Ginart, Santiago; Lorenzetti, Mario Alejandro; Ferrero, Mariana; D'annunzio, Verónica; Gelpi, Ricardo; Corach, Daniel; Evelson, Pablo

Orientador: Alvarez, Silvia; salvarez@ffyb.uba.ar

Cátedra de Fisicoquímica
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires

Resumen

Los procesos inflamatorios se han relacionado con diversas enfermedades cardiovasculares. Además, las alteraciones mitocondriales desempeñan un papel central en estas patologías. Los objetivos del presente trabajo son, por un lado, establecer una relación entre la severidad de la endotoxemia y el grado de disfunción mitocondrial, y por otro la función cardíaca, centrándonos en el óxido nítrico (NO) como molécula mediadora. Se utilizó un modelo experimental en rata de endotoxemia leve (inyección ip 0,5 mg LPS por kg de peso corporal) y otro de endotoxemia severa (inyección ip 8 mg LPS por kg de peso corporal), donde luego de 6 h se analizaron diferentes parámetros. Los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6 aumentaron gradualmente con la dosis de LPS. Asimismo, los niveles de NO aumentaron 4 y 11 veces en endotoxemia leve y severa, respectivamente, comparado con el control ($p < 0,05$). En corazón, la reserva contráctil y lusitrópica disminuyó en ambos modelos, aunque el tiempo de relajación en condiciones basales fue menor en la endotoxemia severa ($p < 0,05$). La producción de ATP mitocondrial disminuyó un 30% en la endotoxemia severa ($p < 0,05$), mientras que el potencial de membrana interna disminuyó 13% y 20% en endotoxemia leve y severa ($p < 0,05$), indicando que la disfunción mitocondrial depende de la severidad de la endotoxemia. El aumento en la producción de H₂O₂ mitocondrial (40-60%, $p < 0,05$) y de nitración de las proteínas mitocondriales (73%; $p < 0,05$) refuerzan el resultado. La inhibición del NO sistémico previno la disfunción mitocondrial y la alteración en el estado contráctil del corazón, situando al NO como posible molécula conectora entre la respuesta inflamatoria y la función mitocondrial, impactando así en la función cardíaca.



Palabras claves

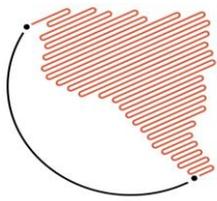
DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL, INFLAMACIÓN, ÓXIDO NÍTRICO

Introducción

La inflamación es un común denominador en diversas patologías crónicas como enfermedades neurodegenerativas (Glass *et al.*, 2010), enfermedades cardiovasculares (Neves *et al.*, 2013), diabetes y cáncer (Coussens & Werb, 2002), como también en enfermedades agudas como la sepsis (Alvarez *et al.*, 2016), e incluso hasta en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Glaros *et al.*, 2013). La inflamación es parte de la respuesta inmunológica innata que se activa en presencia de un patógeno. La misma cursa con aumento de quimiocinas dan dirección a las células fagocíticas encargadas de eliminar al agente extraño, con aumento de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y de óxido nítrico (NO) encargados de la activación del endotelio, reclutamiento de más células fagocíticas y de activar células de la respuesta inmune adaptativa; y con aumento de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10, que regulan el proceso inflamatorio (Dobrovolskaia & Vogel, 2002). Sin embargo, cuando este sistema regulatorio falla, se genera un estado de inflamación persistente, capaz de generar daño a los tejidos (Morris *et al.*, 2014).

Hay evidencia de que la inflamación cursa con niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Naik & Dixit, 2011). Así surge como interrogante la participación de la mitocondria en el desarrollo de la inflamación, ya que, si bien las mitocondrias tienen el rol principal de producir ATP en las células, son además la fuente principal de producción de ROS en condiciones fisiológicas (Venditti *et al.*, 2013). Aún se encuentran en estudio las vías que conectan los procesos inflamatorios con la disfunción mitocondrial. En este escenario, el NO surge como posible molécula conectora entre los dos fenómenos, dado que, durante los procesos inflamatorios mediados por la activación de NF- κ B, se genera una producción exacerbada de NO (Sharma *et al.*, 2007). El NO es un regulador fisiológico de la cadena respiratoria mitocondrial, aunque en condiciones fisiopatológicas puede reaccionar con el O₂⁻ mitocondrial para producir peroxinitrito (ONOO⁻), un poderoso oxidante que conduce al daño tisular y la falla orgánica (Radi *et al.*, 2002).

En el presente trabajo, se hipotetiza que la disfunción mitocondrial se relacionaría con el grado de inflamación sistémica, y que el NO participaría como molécula conectora



entre los dos procesos fisiopatológicos. Además, como el ATP producido por las mitocondrias es necesario para el proceso de contractilidad muscular, el mantenimiento de la función mitocondrial resulta esencial para el correcto funcionamiento cardíaco. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial llevaría a una falla en la función cardíaca, siendo otra de las consecuencias que surgen de patologías como la sepsis, aterosclerosis, diabetes, entre otras (Antonucci *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2013). Para corroborar esta hipótesis, se evaluó la función mitocondrial cardíaca en dos modelos endotoxemia leve y severa, donde se induce la respuesta inflamatoria sistémica por la inoculación de lipopolisacárido (LPS) bacteriano (endotoxina proveniente de las membranas bacterias Gram negativas). Se evaluó además la función cardíaca en ambos modelos, y el posible rol del NO como molécula conectora en estos síndromes inflamatorios.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son, por un lado, establecer una relación entre la severidad de la endotoxemia y el grado de disfunción mitocondrial, y por otro la función cardíaca, centrándonos en el óxido nítrico como molécula mediadora.

Materiales y Métodos

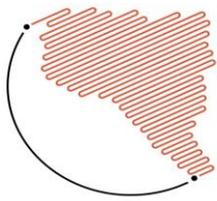
1. Modelo experimental

Se trabajó con ratas Sprague Dawley hembras de entre 45 y 55 días de edad (180 g aproximadamente), provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Para inducir endotoxemia leve, los animales se inyectaron i.p. con LPS 0,5 mg por kg de peso corporal (*Escherichia coli*, serotipo 026: B6; Sigma-Aldrich) y para inducir endotoxemia severa, las ratas se inyectaron i.p. con LPS 8 mg por kg de peso corporal. Los animales control recibieron un volumen equivalente de vehículo. Después de 6 h de tratamiento, los animales se sacrificaron, y se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca y se extrajo el corazón para su análisis. Para estos protocolos se solicitó la aprobación de Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA Exp. N° 0054032/15.

2. Caracterización de la respuesta inmune sistémica

2.1 Recuento total de leucocitos

Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca de los animales tratados. Se realizó el recuento total de leucocitos mediante una cámara de Neubauer.



2.2 Cuantificación de citoquinas en plasma

Se cuantificaron los niveles de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en plasma mediante la técnica de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales específicos (BD Biosciences OptEIA). Los resultados se expresan en pg mL⁻¹.

2.3 Activación intravascular de leucocitos

Luego de obtener sangre periférica de los animales tratados por punción cardíaca, se aislaron leucocitos por centrifugación, realizando una hemólisis previa con un buffer de lisis 1:10 (155 mM NH₄Cl, 5,7 mM K₂HPO₄, 0,1 mM EDTA, pH 7,3). La suspensión (2x10⁶ células mL⁻¹) se incubó con 10 mM de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) diacetato durante 30 minutos a 37°C. La DCF indica el estado redox intracelular ya que se oxida en presencia de especies oxidantes generando un producto fluorescente. Se procedió de igual manera para medir NO intracelular, utilizando la sonda 10 μ M 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) diacetato; la cual penetra la membrana plasmática y reacciona con el NO generando un producto fluorescente llamado triazolfluoresceína. Luego de la incubación, se adquirieron las células en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) (Marchini *et al.*, 2014; Tiscornia *et al.*, 2009; Walrand *et al.*, 2003). Las diferentes poblaciones de leucocitos se separaron por sus propiedades de dispersar

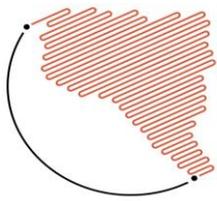
la luz (tamaño y complejidad). Tanto la señal de DCF como la de DAF-2, se analizaron por separado en el canal FL-1 utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA), y se cuantificaron por su intensidad de fluorescencia media.

2.4 Niveles de NO sistémico

Los niveles de NO sistémico se evaluaron por dos métodos distintos. En primer lugar, se realizó una medida directa del aducto NO-Hemoglobina en sangre periférica por resonancia paramagnética electrónica (EPR) a 77 K (en nitrógeno líquido), utilizando un espectrómetro Bruker ECS106, según Galleano *et al.* (Galleano *et al.*, 2004). Los resultados se expresan como área bajo la curva del espectro obtenido en unidades arbitrarias. En segundo lugar, se cuantificaron las concentraciones de nitratos/nitritos en plasma mediante la técnica de Griess modificada. En presencia de hemoglobina a temperatura fisiológica, el NO sistémico se oxida a nitrato, por lo que medir su concentración indica de manera indirecta la cantidad de NO presente. Los resultados se expresan como μ M NO_x⁻ (Miranda *et al.*, 2001).

3. Evaluación de la función cardíaca y análisis de signos de inflamación local en corazón

3.1 Función cardíaca mediante la técnica de órgano aislado Langendorff



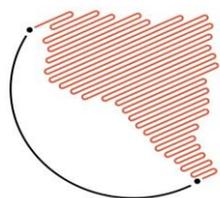
Luego del tratamiento, se anestesiaron los animales (pentobarbital 150 mg kg⁻¹, y heparina sódica 500 UI kg⁻¹) y se les extrajo el corazón. Se canuló la aorta y se perfundieron los corazones con buffer Krebs-bicarbonato (118,5 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 1,5 mM CaCl₂, 24,8 mM NaHCO₃ y 10 mM glucosa, pH 7,4). Mediante el uso de un marcapasos para mantener la frecuencia cardíaca constante, y la inserción de un transductor de presión (Deltram II, Utah Medical System) en el ventrículo izquierdo, se analizó la presión ventricular izquierda (PDVI), que se utiliza para evaluar la contractilidad cardíaca, y se calcula como la diferencia entre la presión sistólica máxima y la presión ventricular izquierda diastólica final (Buchholz *et al.*, 2014). A su vez, se analizó la relajación isovolumétrica como el tiempo requerido para que la presión desarrollada caiga a un valor del 50% respecto al pico máximo (t50) (Sutherland *et al.*, 2003). Los resultados se expresaron en mmHg y ms, respectivamente. La reserva contráctil y diastólica se evaluaron mediante el porcentaje de cambio de los valores de PDVI y t50 antes y después del agregado del agente β-adrenérgico isoproterenol (ISO) 1 mM al medio de perfusión (Jain *et al.*, 2001).

3.2 Cuantificación de la expresión de ARNm de citoquinas en corazón por RT-qPCR

La expresión de ARNm de las citoquinas IL1-β y TNF-α se evaluó mediante la técnica RT-qPCR para evidenciar inflamación en el tejido cardíaco. Se diseñaron primers específicos para los genes de interés mediante el software online IDT PrimerQuest Tool (incluido el gen de referencia β-actina). Luego de aislar el ARN total del tejido cardíaco con el kit comercial ReliaPrep™ ARN Tissue Miniprep System kit (Promega, Madison, WI, USA), se purificó la muestra con una digestión con RQ1 RNAsa-free DNAsa (Promega, Madison, WI, USA). La síntesis de ADN copia se realizó con el kit Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA), y luego se amplificó mediante la reacción de qPCR en el equipo Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los resultados se evaluaron por cuantificación relativa respecto del gen de referencia, utilizando el método de Pfaffl *et al.* (Pfaffl, 2001).

3.3 Arquitectura del tejido cardíaco por microscopía de transmisión electrónica

Para analizar la ultraestructura del tejido cardíaco, se realizaron cortes de ventrículo izquierdo en cubos de 1 mm³, que posteriormente fueron fijados en glutaraldehído al 2,5% en medio de fosfato pH 7,4. Luego, se realizó una segunda fijación con tetróxido de osmio 1% en buffer fosfato 0,1 M, seguida de una incubación



con 5% de acetato de uranilo, y finalmente las muestras fueron fijadas en una resina Durcupan (Fluka AG, Suiza). Se realizaron cortes ultrafinos y se analizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109 (Oberkochen, Alemania), donde las imágenes se capturaron con cámara CCD GATAN ES1000W (CA, USA) (Vanasco *et al.*, 2014).

4. Análisis de la función mitocondrial

4.1 Aislamiento de mitocondrias

Una vez obtenido el tejido de ventrículo izquierdo de corazón, se procedió a cortar el mismo en cubos y en realizar una digestión con 2,5 UI mL⁻¹ de proteasa bacteriana tipo XXIV (Sigma-Aldrich) durante 4 minutos. Posteriormente, se homogeneizó el tejido y se realizó una primera centrifugación a 8000 g durante 10 min para descartar el exceso de proteasa. A continuación, se resuspendió el pellet y se realizó otra centrifugación a 800 g durante 10 min para descartar los núcleos y restos celulares. Finalmente, se centrifugó el sobrenadante obtenido a 8000 g para obtener así el pellet de mitocondrias. Todo el procedimiento se realizó a 4°C (Vanasco *et al.*, 2012).

4.2 Producción de ATP mitocondrial

La producción de ATP se determinó en mitocondrias aisladas y frescas por el método luminiscente basado en la

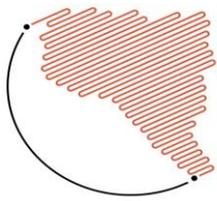
utilización del sistema luciferina-luciferasa, donde la bioluminiscencia generada es directamente proporcional a los niveles de ATP (Vanasco *et al.*, 2012; Vives-Bauza *et al.*, 2007). Las medidas se realizaron en un lector de placa con detector luminiscente (Varioskan® LUX, Thermo Scientific, MA, USA). Los resultados se expresaron como nmoles de ATP min⁻¹ mg proteína⁻¹.

4.3 Potencial de membrana interna

La determinación del potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_{mit}$) se realizó utilizando una sonda potenciométrica catiónica lipofílica DIOC₆. Las mitocondrias aisladas (5 mg proteína mL⁻¹) se incubaron en oscuridad con DIOC₆ 120 nM a 37°C durante 20 minutos en un buffer MSH (manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, Hepes 5 mM, 1 mM PBS, pH 7,4), suplementadas con 0,2 mM de malato y 0,5 mM de glutamato como sustratos. Las mitocondrias se adquirieron por un citómetro de flujo FACSCalibur (Cimolai *et al.*, 2014).

4.4 Actividad de los complejos de la cadena respiratoria

Se analizó la actividad de los complejos I-III y II-III (NADH- citocromo c reductasa y succinato-citocromo c reductasa respectivamente) en membranas mitocondriales por espectrofotometría. Las medidas se realizaron agregando



membranas mitocondriales (0.02 mg mL^{-1}) a un medio conteniendo buffer fosfato 100 mM pH 7,4, citocromo c^{3+} $25 \text{ }\mu\text{M}$, KCN 0.5 mM , con el sustrato NADH $0,2 \text{ mM}$ o succinato 5 mM , respectivamente. Se midió la reducción del citocromo³⁺ a citocromo²⁺ a 550 nm ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Los resultados se expresaron en $\text{nmol NADH o succinato min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. La actividad del complejo IV (citocromo oxidasa) se evaluó, en el mismo buffer de reacción, a través de la oxidación aeróbica del citocromo c^{2+} $60 \text{ }\mu\text{M}$ a 550 nm (Yonetani, 1967). La velocidad de oxidación del citocromo c^{2+} se expresó en función de la constante de pseudo-primer orden de la reacción ($k' \text{ mg proteína}^{-1}$).

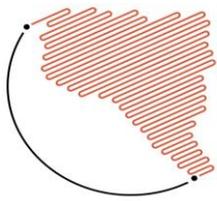
5. Estrés oxidativo y nitrosativo en mitocondrias

Se evaluó la producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial a partir del método de Amplex Red–peroxidasa de rábano (HRP), en un buffer de reacción conteniendo sacarosa 125 mM , KCl 65 mM , Hepes 10 mM , KH_2PO_4 2 mM , MgCl_2 2 mM , y BSA $0,01\%$ (p/v) (pH 7.2), junto con malato 2 mM y glutamato 5 mM como sustratos. Los resultados se expresaron como $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ mg proteína}^{-1}$ (Chen *et al.*, 2003). Por otro lado, se evaluaron los niveles de nitración de proteínas por Western Blot. Las membranas mitocondriales se resuspendieron en Tris

0.1 M , glicerol 24% , azul de bromofenol $0,01\%$, SDS 8% , b-mercaptoetanol 2% , pH 6,8. Las proteínas se separaron por electroforesis, utilizando un gel de poliacrilamida al $7,5\%$ (SDS-PAGE). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia (CAPS 10 mM , metanol 10% , pH 11). Los sitios de unión inespecífica se bloquearon y luego de repetidos lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo específico anti-3-nitrotirosina (Santa Cruz Biotech). La membrana se lavó e incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa. La detección de las proteínas inmunoreactivas se realizó por quimioluminiscencia utilizando ECL como reactivo revelador (Vanasco *et al.*, 2014).

6. Efecto del NO sobre la disfunción mitocondrial y cardíaca en endotoxemia

Para evaluar el rol del NO en la disfunción mitocondrial y cardíaca en la endotoxemia, se utilizó un tratamiento *in vivo* utilizando un inhibidor de la síntesis de NO, ω -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME; Sigma-Aldrich). Se realizó una co-inyección ip L-NAME 20 mg por kg de peso corporal, junto con las diferentes dosis de LPS; obteniendo los siguientes grupos experimentales: LPS $0,5 + \text{L-NAME}$, y LPS $8 + \text{L-NAME}$. Luego de las 6 h de tratamiento, se procedió a sacrificar a los animales, obtener muestras



de sangre para controlar los valores de NO, junto con el corazón para evaluar la función cardíaca y mitocondrial como se detalló en la sección 3.1, y 4, de la corriente sección.

7. Estadística

Los resultados se expresaron como la media de los valores \pm erros estándar de la media (SEM), y representan la media de al menos 4 experimentos independientes. Los valores se analizaron mediante el test de ANOVA seguido de un post-test Tukey para analizar las diferencias entre los grupos experimentales. La diferencia entre grupos se consideró estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

Resultados y discusión

1. La respuesta pro-inflamatoria sistémica aumenta con la severidad de la endotoxemia.

Se analizó la respuesta inmune sistémica generada por los dos modelos de endotoxemia leve y severa. Como primera aproximación, se realizó un recuento de leucocitos totales donde se observó una disminución del 51% en el grupo de endotoxemia severa respecto del control ($p < 0,05$) (**Fig. 1 A**), probablemente por un aumento en la infiltración de las células del sistema inmune hacia el foco de infección. En paralelo, se evaluó en leucocitos aislados el estallido respiratorio como producción de ROS y NO, donde se observó

un aumento en la población de polimorfonucleares en la endotoxemia leve, distinguiéndose del grupo de endotoxemia severa donde se observó una disminución de todas las poblaciones linfocitarias (**Fig. 1 B**). Respecto al estallido respiratorio, ambos modelos evidenciaron un aumento en la producción de ROS del 88% y 94% para endotoxemia leve y severa respectivamente ($p < 0,05$) y de NO del 42% y 60% para endotoxemia leve y severa, respectivamente ($p < 0,05$), indicando una respuesta inflamatoria sistémica activada (**Fig. 1 C**). En plasma, el aumento de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 verificaron la activación de la respuesta inmune innata, siendo mayores los niveles de citoquinas al aumentar la severidad de la endotoxemia (**Fig. 1 D**). Siguiendo esta tendencia, los niveles de NO en sangre medidos directamente por la concentración del aducto NO-Hb (**Fig. 2 A-B**) o bien en plasma medidos indirectamente por su descomposición a nitratos/nitritos (**Fig. 2 C**), se mostraron aumentados a medida que aumentaba la dosis de LPS inyectada. Ambos métodos de detección mostraron un aumento de 4 veces en los animales con endotoxemia leve y un aumento de 11 veces en animales con endotoxemia severa, con respecto a los animales controles. En particular, la presencia de NO elevado en sangre se corresponde con una

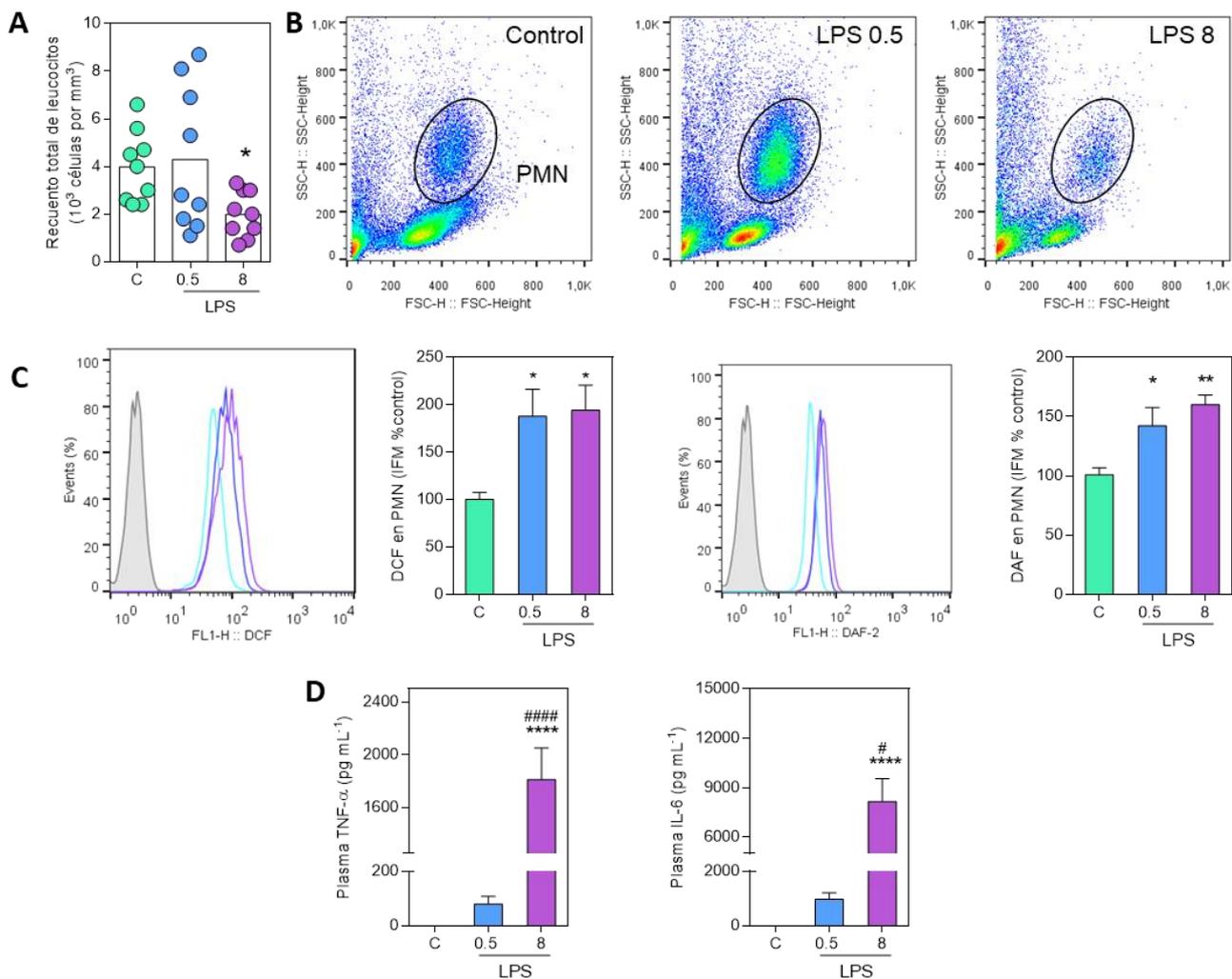
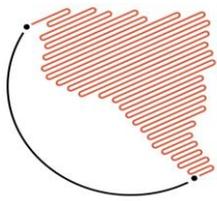


Figura 1. La respuesta inmune sistémica depende del grado de endotoxemia. **A)** Recuento total de leucócitos. **B)** Producción de ROS y NO por citometría de flujo, representación de la población de PMN caracterizadas por su capacidad de dispersar la luz por citometría de flujo, **C)** cuantificación de la señal de IFM de las células, relativos al grupo control; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ ($n=9$). **D)** Niveles de TNF- α e IL-6 en plasma; **** $p < 0,0001$ comparado con el grupo control, # $p < 0,05$ y ##### $p < 0,0001$ comparado con

característica evidenciada en pacientes con sepsis, donde se produce una hipotensión generada por la producción en exceso de NO (Alvarez *et al.*, 2016). Estos parámetros indicarían que ambas dosis de LPS generaron una respuesta inflamatoria

sistémica, siendo mayor para los animales con endotoxemia severa. Además, sugieren la participación del NO como un mediador importante en el desarrollo de esta respuesta.

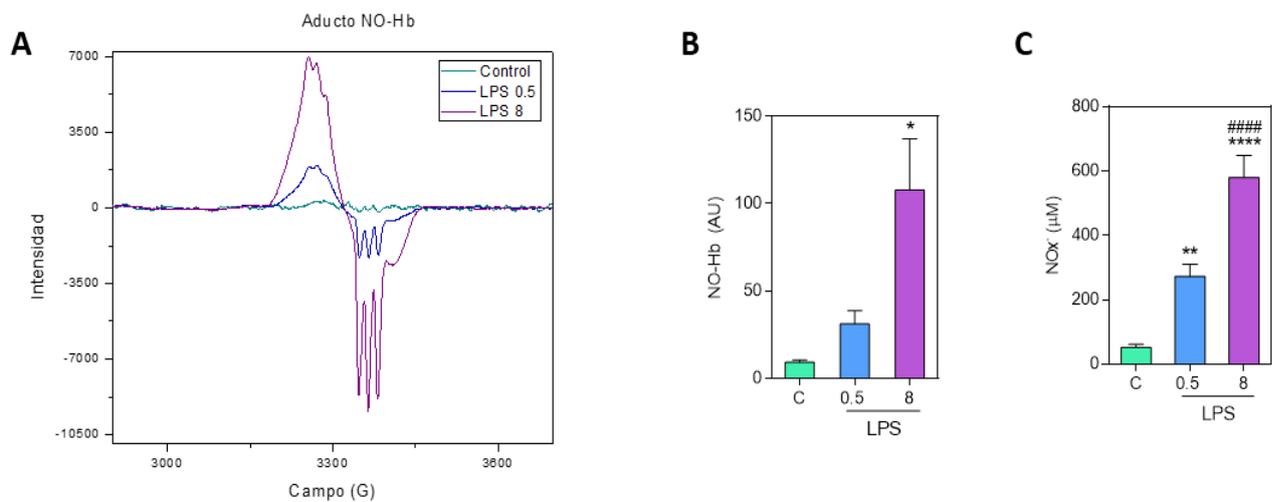
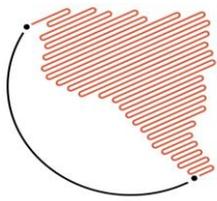


Figura 2. Aumento en los niveles de NO sistémicos mediados por el grado de endotoxemia. **A)** Niveles de NO-Hb en sangre medida por EPR, espectro representativo ($g = 2.033$), **B)** cuantificación del área bajo la curva; * $p < 0,05$ respecto del grupo control, # $p < 0,05$ respecto de los animales LPS 0,5 ($n=3$). **C)** Niveles de nitratos/nitritos (NO_x^-) en plasma; ** $p < 0,01$ y **** $p < 0,0001$ respecto del grupo control, #### $p < 0,0001$ respecto de los animales LPS 0,5 ($n=10$).

2. La función cardíaca se ve afectada por el grado de inflamación sistémica.

Debido a que distintas patologías que cursan con inflamación sistémica pueden llevar a la disfunción cardíaca, el siguiente paso fue evaluar la función cardíaca en nuestros modelos de endotoxemia. En condiciones basales, el estado contráctil no se vio afectado en los distintos tratamientos (**Fig. 3 A**). Sin embargo, al provocar un estímulo β -adrenérgico, la diferencia en la PDVI al compararlo con el estado basal fue menor en los animales con endotoxemia leve (21%) y severa (18%), respecto de los animales control (38%) ($p < 0,05$) (**Fig. 3 B**). Esto indica que, frente a una sobrecarga de trabajo, la reserva contráctil está disminuida

en los animales tratados con LPS respecto de los controles. A su vez, se evaluó la capacidad del corazón de relajarse, en condiciones basales y frente al estímulo con ISO (**Fig. 3 C**). En este caso, ya en condiciones basales se ve una disminución del 26% en el tiempo de relajación solamente en los animales con endotoxemia severa ($p < 0,05$). Cuando se evalúa además la reserva lusitrópica, se observa una disminución en ambos grupos experimentales (17% y 11% para endotoxemia leve y severa, respecto del t50 basal, comparado con el 37% del grupo control; $p < 0,05$), indicando que existiría una disfunción en los mecanismos de relajación en estos animales (**Fig. 3 D**).

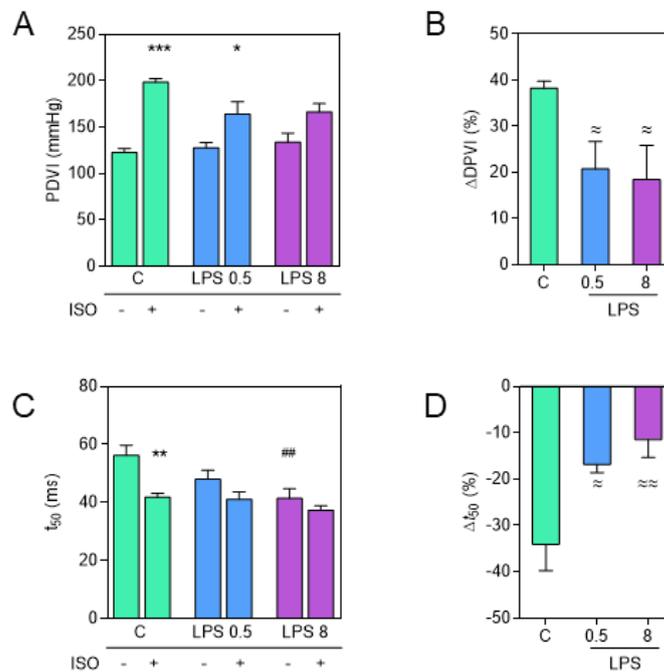


Figura 3. Disfunción en el estado contráctil y en la relajación cardíaca en la endotoxemia. **A)** Función sistólica ventricular. Evaluación de la PDVI, y **B)** reserva contráctil (%ΔPDVI); * $p < 0,05$ comparado con el correspondiente grupo en condiciones basales, ≈ $p < 0,05$ comparado con %ΔPDVI respecto grupo control (n=5). **C)** Función diastólica ventricular. Evaluación de t₅₀ y **D)** de la reserva lusitrópica (Δt₅₀); ** $p < 0,01$ comparado con el correspondiente grupo en condiciones basales, ## $p < 0,01$ comparado con el grupo control, ≈ $p < 0,05$ comparado con Δt₅₀ respecto grupo control (n=5).

Para evaluar los posibles mecanismos involucrados en esta disfunción cardíaca, se evaluó la presencia de marcadores inflamatorios locales que se podrían haber activado frente a la noxa. Se evaluó la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 β , cuya activación se encuentra vinculada a respuestas a corto plazo por efectos de LPS o bien citoquinas sistémicas, ya sea por la vía NF- $\kappa\beta$ o la activación del inflammasoma (Tschopp, 2011). En ambos modelos de endotoxemia, se encontraron aumentados los niveles de

ARNm de ambas citoquinas, cuyo aumento fue gradual dependiendo del grado de endotoxemia (**Fig. 4 A-B**). Para descartar que las citoquinas proviniesen de infiltrado celular, se evaluó por histopatología la presencia de leucocitos en tejido, cuyos resultados fueron negativos (datos no mostrados). Por otro lado, se evaluó la ultraestructura de las fibras cardíacas por microscopía de transmisión electrónica (**Fig. 4 C**) para evaluar posibles alteraciones que perjudiquen a la función cardíaca. Se encontró un evidente desarreglo en las

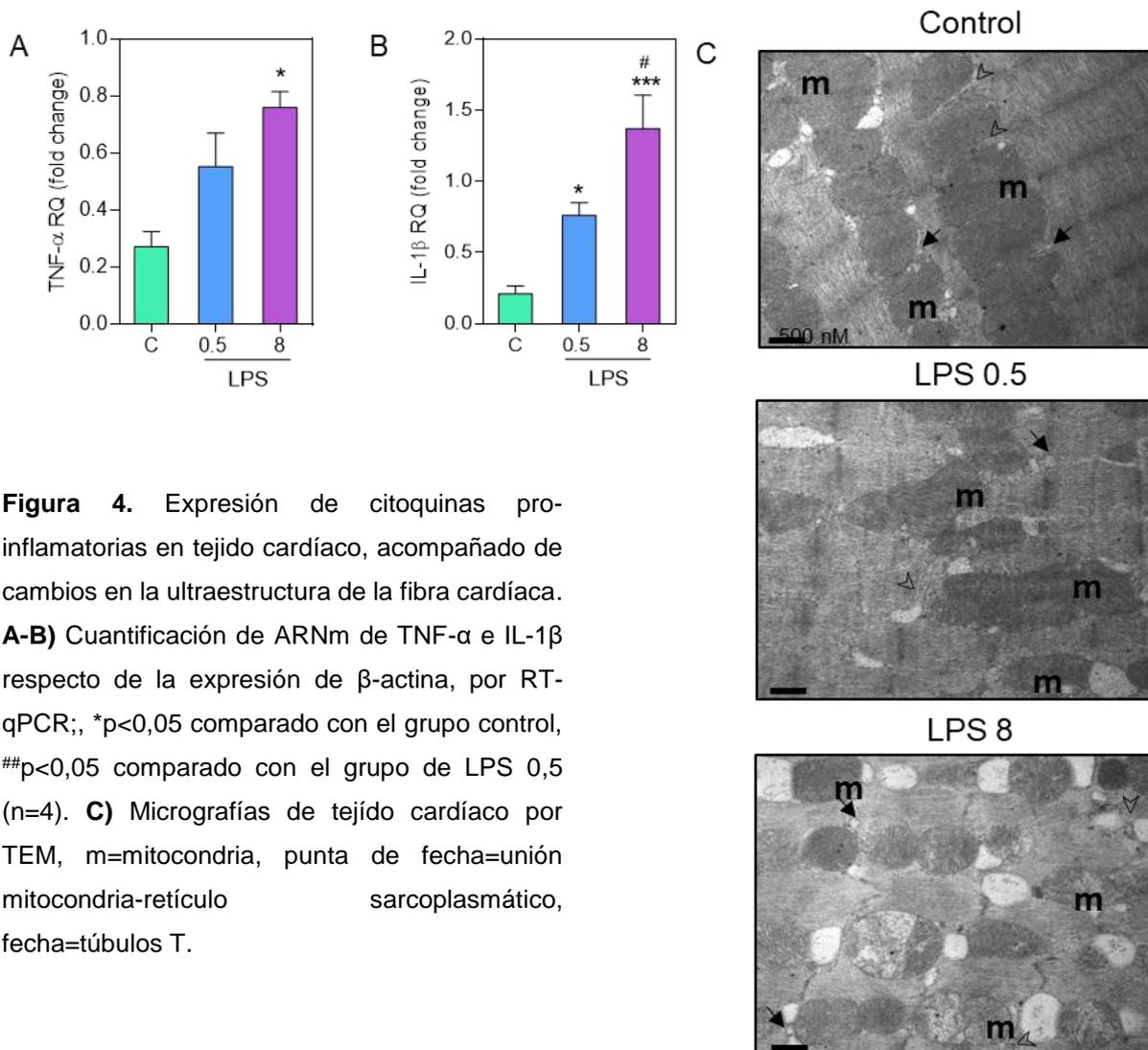
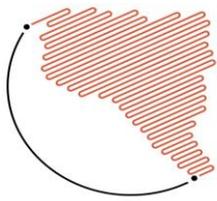


Figura 4. Expresión de citoquinas pro-inflamatorias en tejido cardíaco, acompañado de cambios en la ultraestructura de la fibra cardíaca. **A-B)** Cuantificación de ARNm de TNF- α e IL-1 β respecto de la expresión de β -actina, por RT-qPCR; *, * $p < 0,05$ comparado con el grupo control, ## $p < 0,05$ comparado con el grupo de LPS 0,5 (n=4). **C)** Micrografías de tejido cardíaco por TEM, m=mitocondria, punta de fecha=unión mitocondria-retículo sarcoplasmático, fecha=túbulos T.

fibras de los animales con endotoxemia severa: las uniones retículo sarcoplasmático y mitocondria se encontraron alteradas, como así también cambios de la forma y arquitectura de las mitocondrias. Las poblaciones mitocondriales mostraron hinchamiento, ruptura de crestas, y desintegración de la membrana interna. Los animales con endotoxemia leve mostraron un menor

desarreglo en las fibras, y mitocondrias intactas, aunque con estructuras más grandes y redondeadas. Los resultados muestran que hay alteraciones en las organelas involucradas en los aparatos de contracción y relajación del corazón durante la endotoxemia.



3. Disfunción mitocondrial y su relación con la inflamación sistémica.

Debido a la notoria alteración en la estructura de las mitocondrias, el aumento significativo de NO sistémico, y la importancia clave de la mitocondria para preservar la bioenergética celular cardíaca, se evaluó la función mitocondrial mediante distintos acercamientos. La producción de ATP mitocondrial de los animales con endotoxemia severa, mostró una disminución del 30% ($p < 0,05$) (**Fig. 5 A**), mientras que el potencial de membrana interno mitocondrial, el cual se encontró disminuido tanto en la endotoxemia leve (13%) como en la severa (20%) comparado con el control ($p < 0,05$) (**Fig. 5 B-C**). En su conjunto, estos resultados muestran que la disfunción mitocondrial se incrementa con la severidad de la endotoxemia. Para realizar un estudio más profundo, se evaluaron las actividades de los complejos de la cadena respiratoria, observándose una disminución del 22% en la actividad del complejo I ($p < 0,05$) en los animales con endotoxemia severa (**Fig. 5 D**).

4. La disfunción mitocondrial cardíaca se relaciona con un aumento de ROS y aumento de nitración de proteínas.

Debido a que la mitocondria es una de las principales fuentes de ROS intracelular, se evaluó la producción de H_2O_2 en mitocondrias de corazón. Se observó un aumento del 40% y del 60% para los

animales con endotoxemia leve y severa respectivamente ($p < 0,05$) (**Fig. 6 A**). Debido al aumento de NO presente en sangre periférica, y el aumento en de ROS mitocondrial, se evaluó la nitración de proteínas por peroxinitrito ($ONOO^-$), un poderoso oxidante que se forma a partir de anión superóxido y NO, y que podría ser uno de los responsables de la disfunción mitocondrial observada. Se observó un aumento del 73% en la nitración de las proteínas mitocondriales en ambos tratamientos ($p < 0,05$) (**Fig. 6 B**).

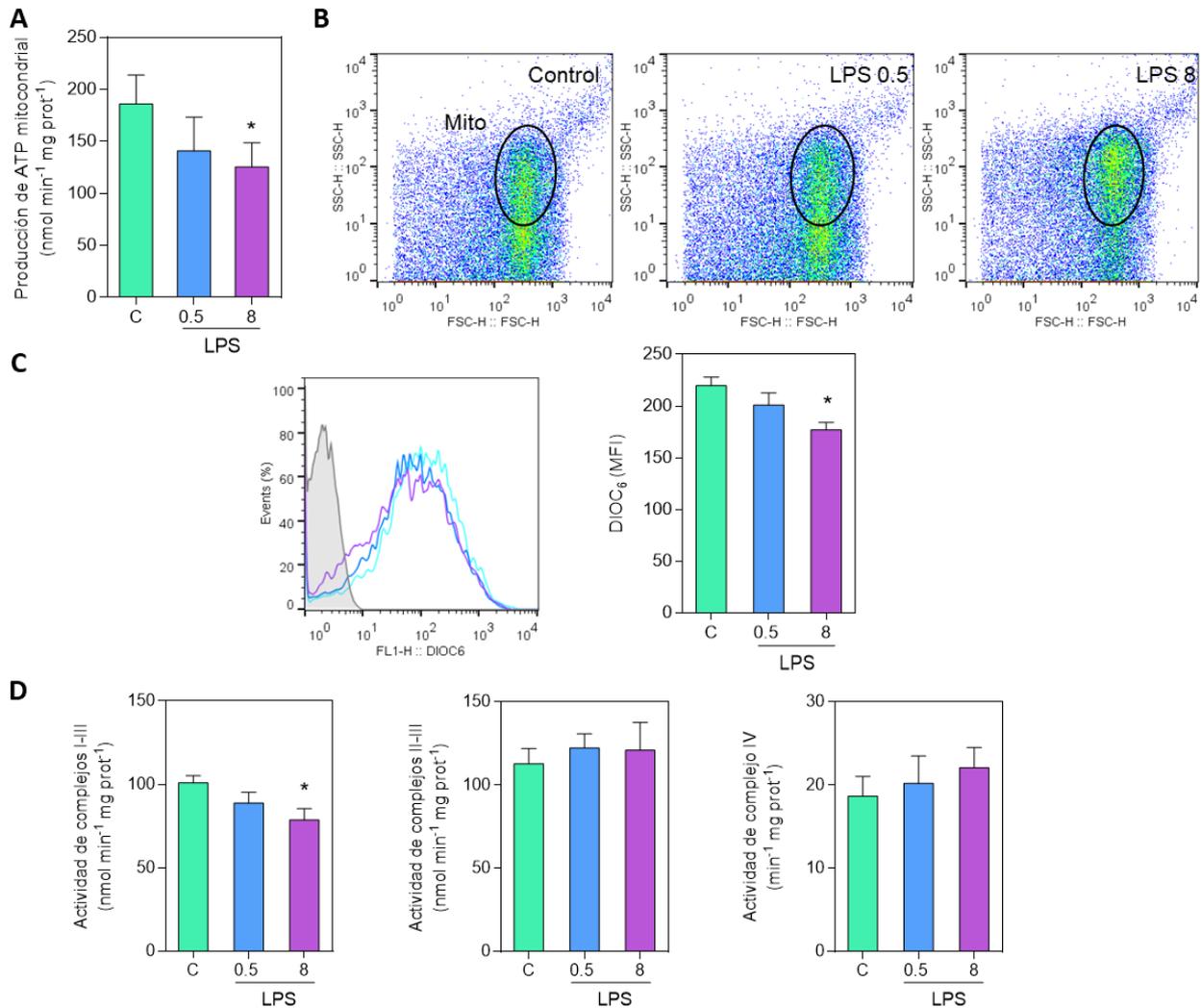
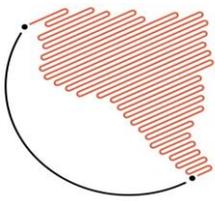


Figura 5. Disfunção mitocondrial cardíaca depende do grau de endotoxemia. **A)** Produção de ATP em mitocôndrias isoladas; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. **B)** Avaliação do potencial de membrana interna mitocondrial por citometria de fluxo, representação da população de mitocôndrias isoladas DIOC_6^+ em diferentes grupos experimentais, e **C)** histograma dos eventos mitocondriais em função da intensidade de fluorescência, e sua quantificação por intensidade de fluorescência média (IFM); * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. **D)** Atividade dos complexos da cadeia respiratória: complexo I-III, complexo II-III e complexo IV de esquerda para a direita; * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

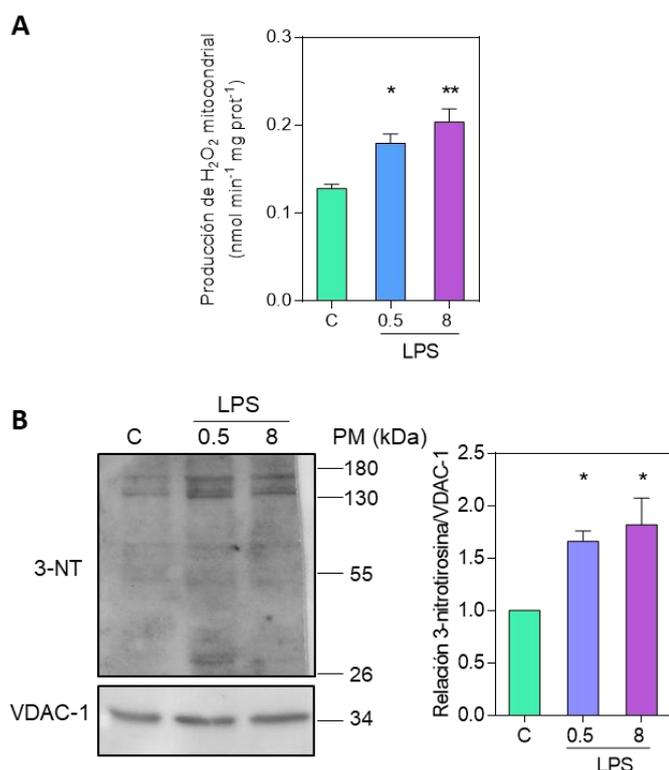
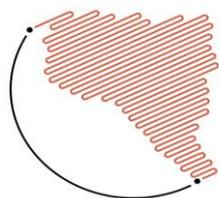


Figura 6. Aumento de ROS y nitración de proteínas en mitocondrias durante la endotoxemia leve y severa. **A)** Producción de H₂O₂ por mitocondrias aisladas; *p<0,05 y **p<0,001 comparado con grupo control (n=6). **B)** Evaluación de la nitración de proteínas por Western Blot en mitocondrias aisladas utilizando el anticuerpo anti-3-nitrotirosina (panel superior) y usando el anticuerpo anti-VDAC-1 (panel inferior) como control de carga. Cuantificación por densitometría de los tratamientos respecto al control; *p<0,05 comparado con grupo control (n=3).

5. El NO como efector de la disfunción mitocondrial y cardíaca en endotoxemia

A fin de dilucidar si el NO participa activamente de la disfunción mitocondrial y cardíaca observada durante la endotoxemia, se realizó un co-tratamiento de LPS con L-NAME (inhibidor de las óxido nítrico sintasas). La co-inyección de L-NAME, logró inhibir un 40% y 35% (p<0,05) de NO sistémico, para los grupos de endotoxemia leve y severa respectivamente (**Fig. 7 A**). Como parámetro de funcionalidad mitocondrial, se evaluó el potencial de membrana interna mitocondrial, donde ambos grupos de endotoxemia (leve y severa) no mostraron

diferencias significativas con el grupo control (p<0,05) (**Fig. 7 B**). Interesantemente, al evaluar la función cardíaca nos encontramos con una mejora tanto en los valores de reserva contráctil (% Δ PDVI) en los grupos de endotoxemia leve y severa, similares a los valores del grupo control (p<0,05) (**Fig. 7 C**); como en los valores de reserva lusitrópica, donde el % Δ t50 de los animales con endotoxemia severa, mostró una tendencia a acercarse a los valores del grupo control (**Fig. 7 D**). Estos resultados indican que el tratamiento con L-NAME previene la disfunción mitocondrial y cardíaca observada en los modelos de endotoxemia estudiados.

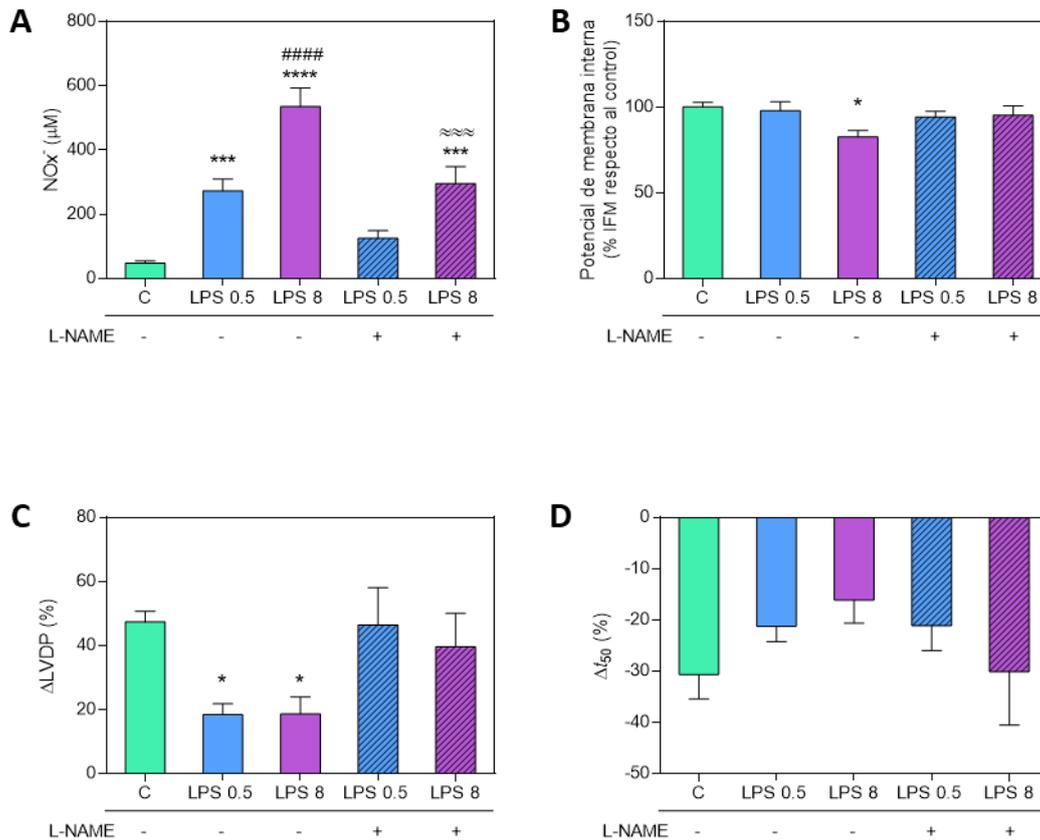
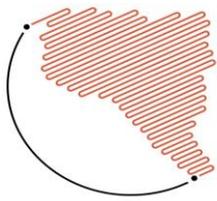
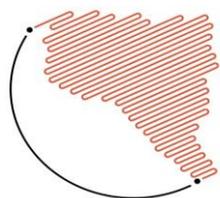


Figura 7. Participación del NO en la disfunción mitocondrial y cardíaca en la endotoxemia leve y severa. Utilización del inhibidor de la síntesis de NO a partir de las óxido nítrico sintasas: L-NAME. **A)** Niveles de NO sistémico determinado por la concentración de nitratos/nitritos en plasma, en animales tratados con LPS, y en animales co-inyectados con LPS y L-NAME 20 mg/kilo; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ respecto del grupo control, #### $p < 0.0001$ respecto de los animales LPS 0.5, ≈≈≈ $p < 0.001$ respecto al grupo LPS 8 ($n=8$). **B)** Función mitocondrial cardíaca evaluada por el potencial de membrana interna mitocondrial por citometría de flujo, utilizando la sonda DIOC₆, representado como % de IFM respecto del control; * $p < 0.05$ respecto del grupo control. **C)** Función cardíaca determinada por la reserva contráctil (%ΔPDVI), y **D)** por la reserva lusitrópica (%Δt₅₀) en animales tratados con LPS y co-inyectados con LPS y L-NAME; * $p < 0.05$ respecto del grupo control.

Conclusiones

Los dos modelos de endotoxemia leve y severa generaron una respuesta inflamatoria sistémica creciente, que se

evidenció por el aumento de citoquinas pro-inflamatorias y NO en sangre periférica. El grado de disfunción mitocondrial mostró una dependencia con la severidad de la



endotoxemia, siendo el NO una de las vías conectoras entre la respuesta inflamatoria y la función mitocondrial. A su vez, se encontraron alteraciones en la función cardíaca, incluso en el modelo de endotoxemia leve. Si bien la inhibición de las óxido nítrico sintasas recuperaron parte de la funcionalidad mitocondrial y cardíaca, no se puede dejar de tener en cuenta el rol de las citoquinas que, por ejemplo, está descrito que tienen un rol cardio-depresor en la sepsis (Kakihana *et al.*, 2016). Describir los mecanismos involucrados en el inicio de la endotoxemia y la sepsis, contribuye a mejorar no solo la interpretación de la patología, sino que también brinda nuevas posibilidades para la generación de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento en la clínica.

Referencias

Alvarez, S., Vico, T., & Vanasco, V. (2016). Cardiac dysfunction, mitochondrial architecture, energy production, and inflammatory pathways: Interrelated aspects in endotoxemia and sepsis. *Int J Biochem Cell Biol*, 81(Pt B), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.032>

Antonucci, E., Fiaccadori, E., Donadello, K., Taccone, F. S., Franchi, F., & Scolletta, S. (2014). Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *Journal of*

Critical Care, 29(4), 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.03.028>

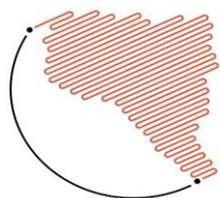
Buchholz, B., D Annunzio, V. V., Giani, J. F., Siachoque, N., Dominici, F. P., Turyn, D., ... Gelpi, R. J. (2014). Ischemic postconditioning reduces infarct size through the alpha1-adrenergic receptor pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 63(6), 504–511. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000074>

Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem*, 278(38), 36027–36031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200> [pii]

Cimolai, M. C., Vanasco, V., Marchini, T., Magnani, N. D., Evelson, P., & Alvarez, S. (2014). alpha-Lipoic acid protects kidney from oxidative stress and mitochondrial dysfunction associated to inflammatory conditions. *Food Funct*, 5(12), 3143–3150. <https://doi.org/10.1039/c4fo00489b>

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>

Dobrovolskaia, M. A., & Vogel, S. N. (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection*, 4(9), 903–914. Retrieved from



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106783>

Galleano, M., Simontacchi, M., & Puntarulo, S. (2004). Nitric oxide and iron: effect of iron overload on nitric oxide production in endotoxemia. *Mol Aspects Med*, 25(1–2), 141–154.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.015>

Glaros, T. G., Chang, S., Gilliam, E. A., Maitra, U., Deng, H., & Li, L. (2013). Causes and consequences of low grade endotoxemia and inflammatory diseases. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 5, 754–765. <https://doi.org/10.2741/s405>

Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.016>

Jain, M., Lim, C. C., Nagata, K., Davis, V. M., Milstone, D. S., Liao, R., & Mortensen, R. M. (2001). Targeted inactivation of Galpha(i) does not alter cardiac function or beta-adrenergic sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(2), H569-75. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.2.H569>

Kakahana, Y., Ito, T., Nakahara, M., Yamaguchi, K., & Yasuda, T. (2016). Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *Journal of Intensive Care*, 4(1), 22.

<https://doi.org/10.1186/s40560-016-0148-1>

Marchini, T., Magnani, N. D., Paz, M. L., Vanasco, V., Tasat, D., González Maglio, D. H., ... Evelson, P. A. (2014). Time course of systemic oxidative stress and inflammatory response induced by an acute exposure to Residual Oil Fly Ash. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274(2), 274–282.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.11.013>

Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>

Morris, M. C., Gilliam, E. A., & Li, L. (2014). Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol*, 5, 680.

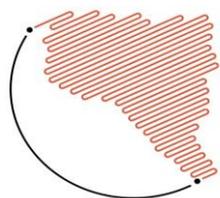
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00680>

Naik, E., & Dixit, V. M. (2011). Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production: Figure 1. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(3), 417–420.

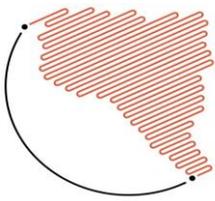
<https://doi.org/10.1084/jem.20110367>

Neves, A. L., Coelho, J., Couto, L., Leite-Moreira, A., & Roncon-Albuquerque, R. (2013). Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *Journal of Molecular Endocrinology*, 51(2), R51-64.

<https://doi.org/10.1530/JME-13-0079>



- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., & Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 33(11), 1451–1464. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446202>
- Sharma, J. N., Al-Omran, A., & Parvathy, S. S. (2007). Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*, 15(6), 252–259. <https://doi.org/10.1007/s10787-007-0013-x>
- Sutherland, F. J., Shattock, M. J., Baker, K. E., & Hearse, D. J. (2003). Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(11), 867–878. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14678252>
- Tiscornia, A., Cairolì, E., Marquez, M., Denicola, A., Pritsch, O., & Cayota, A. (2009). Use of diaminofluoresceins to detect and measure nitric oxide in low level generating human immune cells. *J Immunol Methods*, 342(1–2), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.014>
- Tschopp, J. (2011). Mitochondria: Sovereign of inflammation? *European Journal of Immunology*, 41(5), 1196–1202. <https://doi.org/10.1002/eji.201141436>
- Vanasco, V., Magnani, N. D., Cimolai, M. C., Valdez, L. B., Evelson, P., Boveris, A., & Alvarez, S. (2012). Endotoxemia impairs heart mitochondrial function by decreasing electron transfer, ATP synthesis and ATP content without affecting membrane potential. *J Bioenerg Biomembr*, 44(2), 243–252. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9426-3>
- Vanasco, V., Saez, T., Magnani, N. D., Pereyra, L., Marchini, T., Corach, A., ... Alvarez, S. (2014). Cardiac mitochondrial biogenesis in endotoxemia is not accompanied by mitochondrial function recovery. *Free Radic Biol Med*, 77, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.009>
- Venditti, P., Di Stefano, L., & Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13(2), 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
- Vives-Bauza, C., Yang, L., & Manfredi, G. (2007). Assay of mitochondrial ATP synthesis in animal cells and tissues. *Methods Cell Biol*, 80, 155–171. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80007-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80007-5)
- Walrand, S., Valeix, S., Rodriguez, C., Ligot, P., Chassagne, J., & Vasson, M. P. (2003). Flow cytometry study of



polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clin Chim Acta*, 331(1–2), 103–110. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12691870>

Yonetani, T. (1967). Cytochrome oxidase: beef heart. In *Methods in Enzymology* (Vol. 10, pp. 332–335).

Financiamiento

El trabajo presentado fue financiado a través de los subsidios para la investigación y desarrollo de la Universidad de Buenos Aires (UBA; 20020150100186BA), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT; PICT: 2013-3227), y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET; PIP 11220120100321).