

Netosis: desarrollo de bioensayos costo-efectivos para screening y caracterización de compuestos inductores y antagonistas

Schierloh Luis P.^{1,2}, Sigot, Valeria², Erbes Luciana^{1,2}, Sampedro Florencia¹, Machtey, Matías¹
Adur, Javier^{1,2}

Autoras/es: ¹Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos. Ruta provincial 11, km 10 Oro Verde, Entre Ríos, Argentina. ²Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB-CONICET-UNER)

Contacto: pablo.schierloh@uner.edu.ar

ARK: <https://id.caicyt.gov.ar/ark:/s22504559/iirqg0riq>

Resumen

En búsqueda de alternativas costo-efectivas para el desarrollo de micrométodos de screening multiwell para el monitoreo de NETosis, se analizaron varios intercalantes de DNA. A partir de preparaciones comerciales de Methyl Green-Pyronin Y se encontró que el segundo componente posee propiedades espectroscópicas compatibles con los objetivos buscados. Trabajando con cromatografía analítica se desarrolló un sencillo método de purificación mediante extracción sólido-líquido en acetona. El compuesto purificado, disuelto en DMSO y diluido en PBS presenta una coloración rosada, es bio-compatible, fotoestable y sólo es internalizado en células no viables o fijadas químicamente. Este sistema exhibe una absorción máxima a 548nm por lo que es excitable por líneas 514nm y 561nm, con un pico de emisión de 571nm. Experimentos de 2,5hs de incubación de leucocitos polimorfonucleares humanos con Glucosa Oxidasa confirmaron la utilidad de Pyronin Y en la detección de figuras NETóticas. Ensayos de microscopía de superresolución indican que el compuesto permite detectar las alteraciones en los núcleos multilobulados de PMN que constituyen los pasos iniciales de entrada en NETosis. Microscopías de tiempo de vida media de fluorescencia (FLIM) en dominio temporal demuestran la utilidad del compuesto para diferenciar entre NETs vertidas al medio extracelular y el material genético constituyente del núcleo.

Palabras clave: Pyronin Y, NETosis, Microscopía de barrido láser confocal de Superresolución óptica (SR-LSCM), Microscopía de vida media de fluorescencia (FLIM).

Objetivos propuestos y cumplidos

Nuestro proyecto tuvo por objetivo el desarrollo de nuevos micrométodos multipocillo sensibles y costo-efectivos basados en LSCM para el screening de nuevos fármacos agonistas y antagonistas de NETosis y otras formas de muerte celular programada. En esta línea, en el presente trabajo nos propusimos la identificación, purificación y posterior caracterización de un compuesto intercalante xantenoide fluorescente -clásicamente empleado en microscopía de campo claro- que, en función de sus características funcionales, espectroscópicas y bajo costo relativo, demostró un alto potencial tecnológico para ser utilizado en determinación de NETosis mediante técnicas multimodales de LSCM.

Marco teórico y metodológico

Hace menos de 20 años se descubrió que los granulocitos neutrófilos (PMN, polimorfonucleares) inducidos a producir cantidades suficientemente altas de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) de manera intracelular, reaccionan extruyendo al medio extracelular cromatina decorada con proteínas bactericidas (Brinkmann, et al. 2004). Debido a que la cromatina liberada forma una estructura similar a una red (“NET” que en inglés significa “red” y además es acrónimo de “Neutrophil Extracellular Traps”) y que este fenómeno conduce a la muerte de la célula, se lo bautizó “NETosis” en alusión a otras formas de muerte celular mejor conocidas por entonces: Necrosis, Apoptosis y Piroptosis (Fuchs et al. 2007). Los mismos autores también advirtieron que debido a su contenido de histonas y proteínas granulares, las NETs pueden unir y matar bacterias y levaduras (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009). A la luz de la evidencia acumulada desde entonces, hoy se considera a la formación de NETs un evento central en la inmunidad innata contra microorganismos extracelulares dado que evita su propagación fijándolos a una matriz reticular que contiene una elevada concentración local de agentes antimicrobianos. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), que no pueden generar NETs debido a mutaciones en alguna subunidad de la enzima NAD(P)H oxidasa, son muy susceptibles a diversas infecciones (“chicos de la burbuja”) (Steinberg & Grinstein 2007). Recientemente se demostró que la restauración -mediante terapia génica- de la formación de NETs da lugar a resistencia a dichas infecciones en niños nacidos con CGD (Bianchi et al. 2009).

Por otro lado, la formación excesiva de NETs, puede inducir lesión de células endoteliales vasculares (Doring et al. 2013), trombosis (Fuchs et al. 2012) y retardo en la curación de heridas diabéticas (Wong, et al. 2015). Además, se ha demostrado que defectos en la regulación de la NETosis y la remoción ineficaz de las NETs están involucrados en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, incluidos lupus eritematoso sistémico (SEL) (Hakkim, et al. 2010) y vasculitis asociada a autoanticuerpos contra antígenos citoplasmáticos del neutrófilo (ANCA) (Kessenbrock et al. 2009, Nakazawa et al. 2014).

Laboriosos métodos microscópicos (Ej: Microscopía de barrido electrónico (SEM), inmuno-TEM y microscopía de barrido láser confocal (LSCM) combinado inmunofluorescencia multicolor y reconstrucción en 3D) han desempeñado un papel fundamental en el descubrimiento y posterior caracterización mecanicista de la NETosis (Papayannopoulos & Zychlinsky 2009). Los rigurosos estándares experimentales impuestos típicamente por estos estudios seminales, como así también la naturaleza lábil y reactiva

de los granulocitos *in vitro*, signaron la investigación ulterior, limitando y restringiendo el desarrollo de bioensayos “*high throughput*” en este campo (Masuda et al. 2016).

Durante los últimos años, empleando métodos convencionales como “*gold-standards*” se han ido validando una serie de ensayos alternativos tendientes a simplificar, acelerar, automatizar y/o abaratar el análisis *in vitro* de la NETosis. En esta línea, bioensayos basados en citometría de flujo (Masuda et al. 2017), “*Flow imagine*” (Lelliott et al. 2019), LSCM “*end-point*” (Kraaij et al. 2016) y LSCM “*time-lapse*” (Hoppenbrouwers et al. 2017) demostraron alta correlación con los métodos convencionales y claras ventajas sobre su posibilidad de miniaturización (micrométodo) y su consecuente aplicabilidad en estudios de *screening* farmacológico. En particular, los estudios basados en video-microscopía (LSCM “*time-lapse*”) presentan una ventaja adicional dado que permiten una caracterización dinámica del proceso, permitiendo discernir entre los dos tipos de mecanismos fundamentales de NETosis: i) “NETosis suicida”, dependiente de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS) y de desarrollo lento (3hs) post-estimulación y ii) “NETosis vital”, independiente de ROS y rápida respuesta (10-30min) (Yipp & Kubes 2013, Rochael, et al. 2015).

Con el objeto de identificar nuevas drogas que inhiban o promuevan la NETosis, hemos decidido innovar en nuevas aproximaciones experimentales que sean a la vez automatizables y económicas. Como primer paso, comparamos el desempeño de diferentes tipos y combinaciones de intercalantes y colorantes de contraste fluorescente como DAPI, PI, Azul de Evans, Verde de Metilo, Brillant green, CFDA, Safranina O entre otros. En este trabajo proponemos que *Pyronin Y*, un reactivo clásico de la histología comercializado en mezcla con verde de metilo, presenta altas prestaciones para el monitoreo de este particular mecanismo de muerte mediante técnicas multimodales de LSCM.

Resultados y conclusiones

Un trabajo relativamente reciente propone la utilización del intercalante *Methyl Green* como una alternativa económica para teñir núcleos de células muertas o fijadas químicamente en los equipos modernos de LSCM equipados con láser de 633nm (Prieto et al 2014). Nuestros experimentos preliminares orientados a la adaptación de esta técnica a nuestro equipo con una mezcla comercial de *Methyl Green- Pyronin Y*, nos llevaron a apreciar accidentalmente ciertas propiedades espectroscópicas muy útiles en el segundo componente de la mezcla (Figura 1A). Con el fin de caracterizar sistemáticamente tales observaciones desarrollamos un sencillo método de extracción sólido-líquido basado en la extracción secuencial con cloroformo, acetona y PBS (Figura 1C) basado en el análisis sistemático del comportamiento de la mezcla frente a diferentes sistemas de solventes (Figura 1B, sección 2 de M&M). El método de extracción sólido-líquido secuencial propuesto aquí permite separar de manera reproducible y sistemática ambos componentes de interés (i.e: *Methyl green* y *Pyronin Y*) además de librarnos de un producto de descomposición espontánea del *Methyl Green* ampliamente conocido como cristal violeta, que tiene aparejado el problema de actuar como un quencher de la fluorescencia del *Methyl Green*, además de una elevada citotoxicidad. Más aún, el método descrito se puede escalar fácilmente para la obtención de cantidades mayores empleando la metodología de Soxhlet, permitiendo reducir el volumen de solvente de extracción por efecto del reflujo.

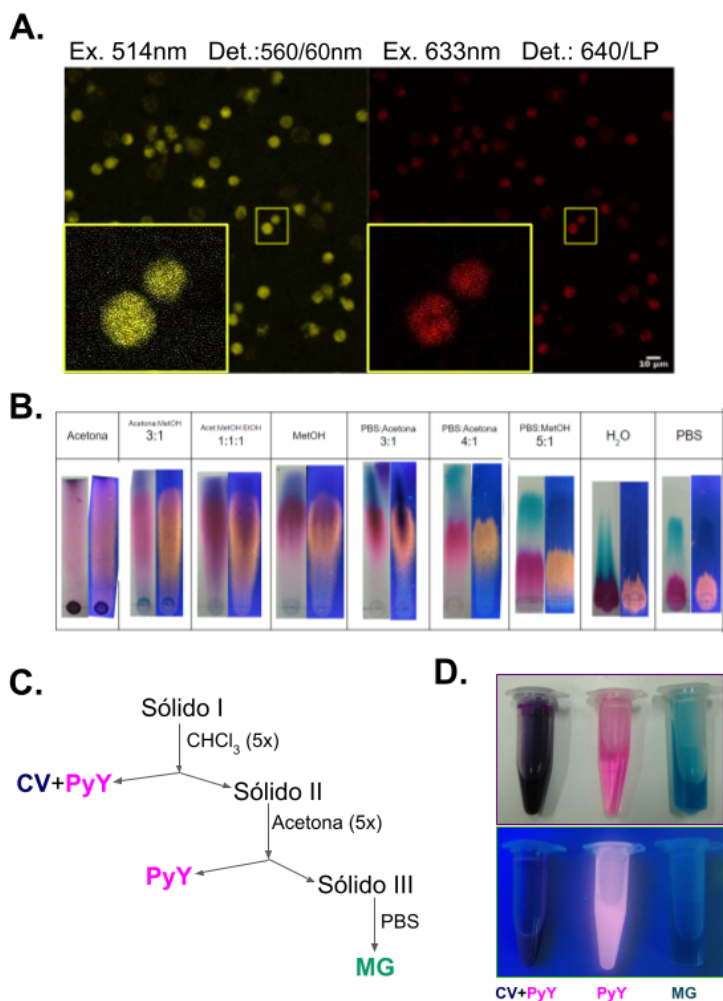


Figura 1: Obtención de Pyronin Y a partir de una mezcla comercial. **A.** Micrografías de barrido láser confocal (LSCM) de PMN humanos fijados (PFA 1%) y marcados con una dilución 1/1000 de la fracción acuosa de una extracción liq-liq (H₂O:CHCl₃ 1:1) del reactivo comercial. Se observa a la derecha, la fluorescencia característica del Methyl Green (Excitación 633nm, Detección 650/ long pass) y a la izquierda, una fluorescencia compatible con la de Pyronin Y (Excitación 514nm, Detección 560/60nm Band pass). **B.** Análisis del comportamiento cromatográfico del reactivo comercial (Gurr's Certistain, Lyon et al. 1987) frente a diferentes sistemas de solventes. **C.** Secuencia de extracción Sólido-Líquido empleada para obtener Pyronin Y (PyY) y Methyl Green (MG) en estado puro. **D.** Muestras de las fracciones de purificación iluminadas bajo luz blanca y luz negra.

A partir del producto puro redissuelto en un sistema de solventes biocompatible y estéril (PBS autoclavado con menos de 0,05%v/v de DMSO de calidad Biología molecular, pH 7,2) caracterizamos la absorbancia en el espectro UV-visible. El producto obtenido presenta un espectro de absorción perfectamente compatible con Pyronin Y (Figura 2A y datos no presentados) con un pico de absorción máximo en el visible de 548+2nm y la ausencia de picos correspondientes a cristal violeta (585nm) y Methyl Green (631nm). El análisis espectrofotométrico de las restantes fracciones obtenidas corroboran la presencia de Pyronin Y junto a Cristal violeta en la fracción clorofórmica y de Methyl Green casi exclusivamente en la fracción de PBS (Figura 1C, 1D y datos no presentados).

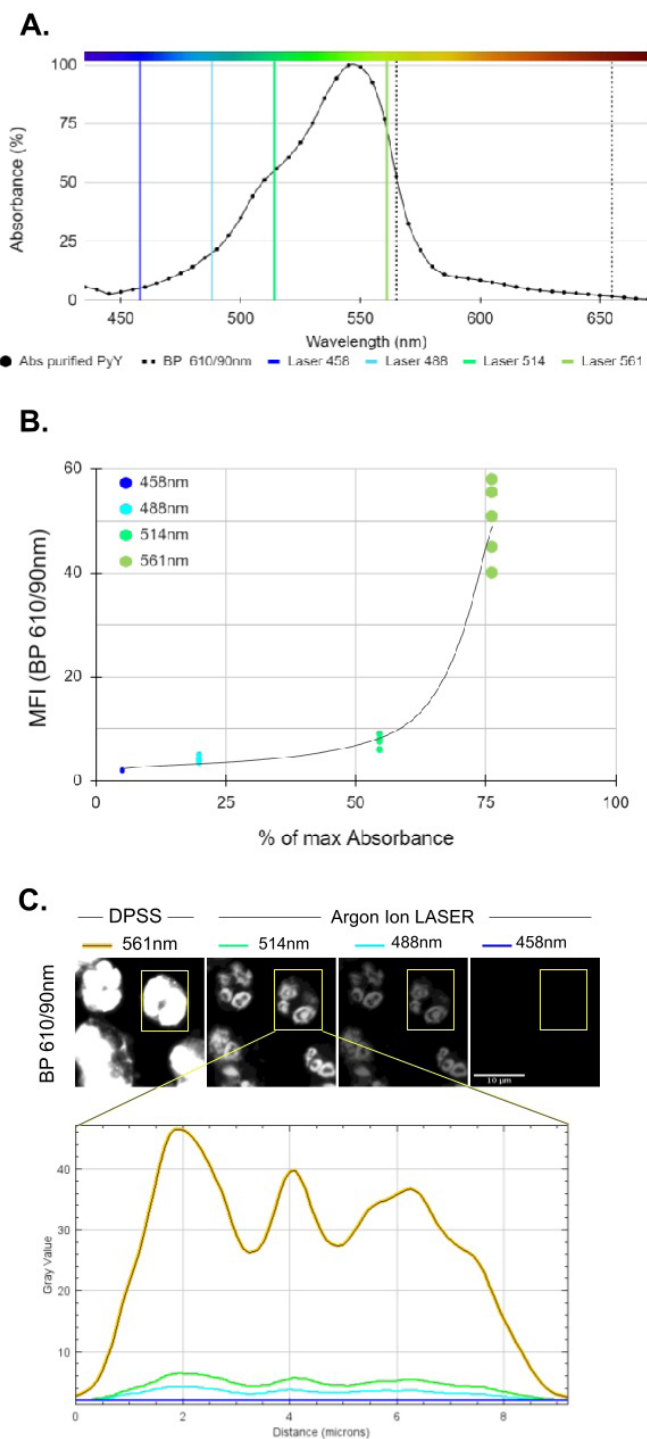


Figura 2: Propiedades espectroscópicas de Pyronin Y. **A.** Espectro de absorción en el visible del producto de purificación obtenido por extracción Sólido-Líquido (Acetona) disuelto en PBS-DMSO (0.01%v/v) plotado junto a 4 líneas de excitación visible disponibles en el sistema LSM880 (Zeiss). **B.** Eficiencia de estas líneas de excitación fijadas a 0,2% de potencia sobre la emisión de PMN humanos marcados con *Pyronin Y* detectada en la banda 610/90(565-655)nm a ganancia fija (en función de la absorbancia relativa del producto de purificación disuelto en PBS-DMSO). **C.** Ejemplo representativo (n=5) de un análisis de intensidad de fluorescencia media de un núcleo de PMN humano (área rectangular destacada) teñido con *Pyronin Y* bajo las condiciones de excitación indicadas en **B.** Con fines demostrativos, para que la señal sea perceptible en condiciones subóptimas de excitación (488 y 458nm), se aplicó el mismo incremento de contraste digital a todas las imágenes.

Coincidentemente con el espectro de absorción obtenido en solución, los PMN humanos periféricos teñidos con el producto purificado presentan mayor eficiencia en la recolección de señal fluorescente en la banda 610/90nm empleando la línea de excitación de DPSS 561-10nm (Figura 2B y 2C) y no se detecta emisión por encima de 635nm al excitarlo con la línea 633nm a diferencia de la mezcla comercial (Mix) que contiene Methyl Green (Figura 3 y 1A).

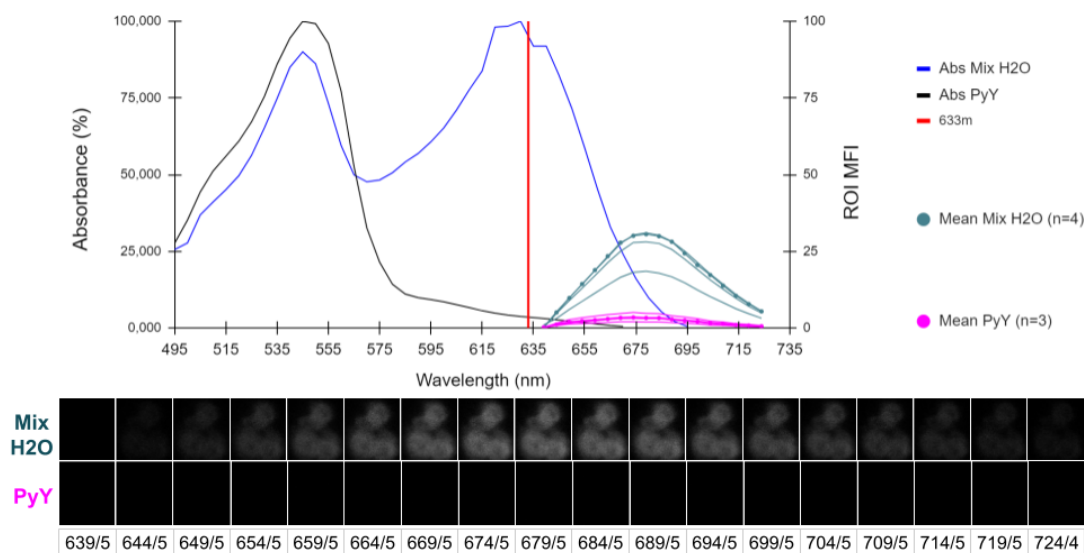


Figura 3: Emisión en el rojo del extracto acuoso de la mezcla comercial (Mix H2O) y del producto purificado (PyY). El gráfico muestra absorción en el visible (eje Y-izq., curva azul: MixH2O; curva negra: Py Y) junto a espectros de emisión (eje Y-der., curvas verdes: MixH2O; curvas magenta: Py Y) obtenidos bajo la modalidad λ -stack (rango de barrido 635-725nm, paso 5nm) para análisis espectral de la fluorescencia empleando el láser rojo HeNe 633nm al 0,2% de potencia como fuente de excitación (n=4).

Con el objeto de optimizar las condiciones de adquisición de imágenes de núcleos de PMN teñidos con Pyronin Y, se realizó un barrido espectral empleando el láser de 561nm como fuente de excitación y un arreglo de fotodetectores que permiten una adquisición discretizada de la señal en bandas de 5nm (modalidad λ -stack). En la figura 4A se observa el espectro de emisión con un pico situado a 579,0+2,5nm. A partir de estos resultados definimos una banda de detección óptima ($\approx 85\%$ área bajo la curva) comprendida entre los 570-620nm (Band Pass 595/50nm, coloquialmente “paso de banda centrado en una longitud de onda de 595nm con 50nm de ancho”) lo que abre la posibilidad de emplear el Pyronin Y en combinación con otros fluoróforos de menor y mayor emisión como DAPI, Methyl Green, FITC y Evan’s Blue (Figura 5) entre muchos otros.

Habiendo definido las condiciones óptimas de excitación y de adquisición de la señal de fluorescencia del Pyronin Y, lo siguiente que nos propusimos fue desarrollar estrategias de LSCM que nos permitan extraer información útil sobre alteraciones prematuras en la estructura del núcleo celular de los PMN indicativas del proceso de NETosis. Como los objetos de interés de nuestro estudio (subdominios de lóbulos nucleares) están en el orden del límite de resolución óptica ($\approx 0,2 \mu\text{m}$), decidimos primero evaluar las prestaciones del módulo de detección Airyscan implementado en el

sistema LSM 880 (Zeiss). En la figura 4B puede apreciarse un ejemplo del aspecto mejorado que tienen las imágenes de núcleos teñidos con Pyronin Y luego de la aplicación del procesamiento de superresolución. Más aún, sólo es mediante esta modalidad de adquisición- procesamiento que se hacen evidentes en el citoplasma celular señales provenientes de los gránulos azurófilos (gránulos primarios) lo cual es un hallazgo interesante dado que no ha sido reportada previamente su afinidad por Pyronin Y. En tal sentido, un hecho que resulta sugestivo es la elevada similitud estructural que existe entre este colorante y Azure A, justamente el colorante que da el nombre a dichos gránulos (Figura 6).

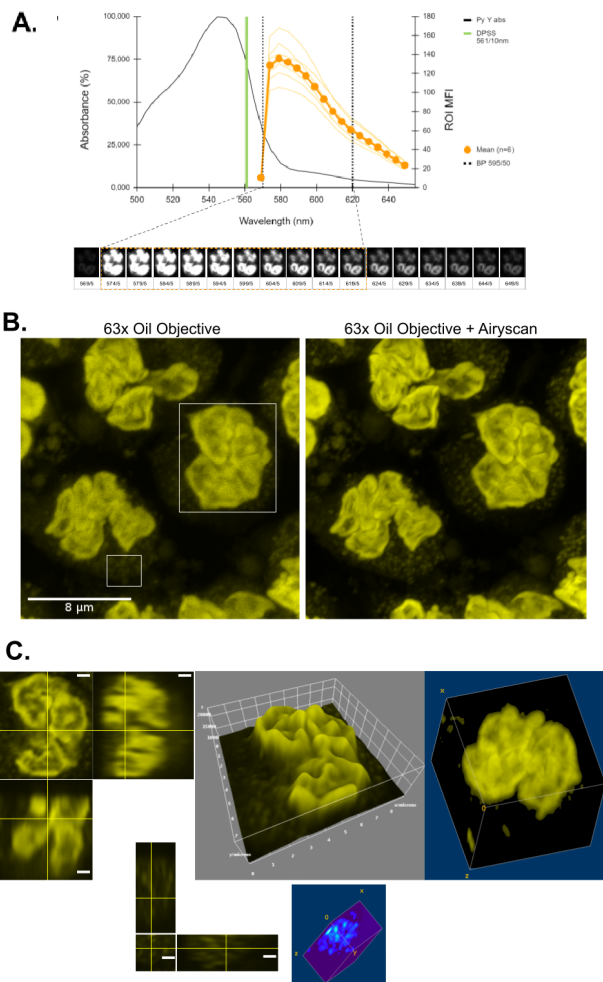


Figura 4: Condiciones y modalidades de adquisición de PMN humanos teñidos con Pyronin Y. **A.** Absorción en el visible de Pyronin Y junto al espectro de emisión obtenido bajo la modalidad λ -stack (rango de barrido 564-654nm, paso 5nm) para análisis espectral de la fluorescencia (n=6) empleando el láser DPSS 561-10nm al 0,2% de potencia como fuente de excitación. Esto permitió definir una banda de detección óptima (BP 595/50nm). **B.** Análisis morfológico de PMN fijados (PFA 2%) empleando las condiciones de adquisición establecidas en **A.** La micrografía de la izquierda es una proyección en eje z de intensidades máximas obtenida al límite de resolución óptica (Objetivo 63x, AN 1,4, inmersión en aceite). La micrografía de la derecha fue adquirida y procesada en modo de superresolución AiryScan®(Zeiss) lo que se traduce en un aumento efectivo de 1,7X sobre la resolución óptica efectiva. **C.** La micrografía superior de la izquierda corresponde a una proyección ortogonal en el plano confocal medio del espacio recuadrado en **B.** y la micrografía inferior de la izquierda es una proyección ortogonal en el plano confocal medio del espacio granular recuadrado en **B.** Las barras blancas indican 1μm. A la derecha, la proyección tridimensional (fondo gris) y las reconstrucciones volumétricas (fondo azul) representadas en pseudocolor (amarillo) o mapas de calor (abajo) corresponden a las mismas áreas seleccionadas en **B.** Se presenta un ejemplo representativo de n=4 experimentos independientes realizados.

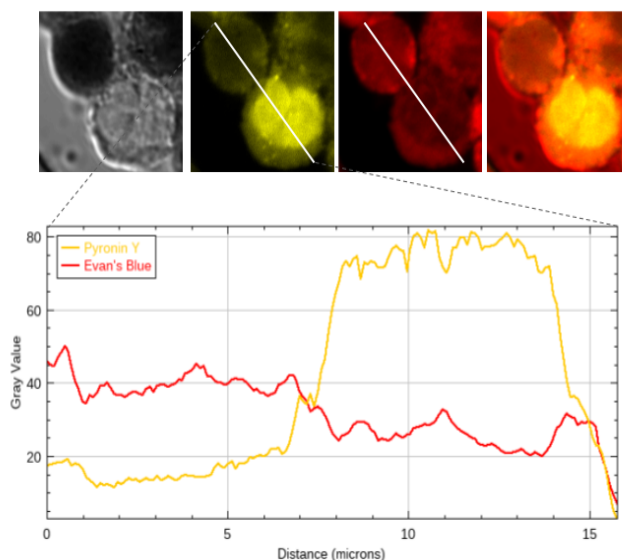


Figura 5: Tinción combinada de Pyronin Y con Evan's Blue en leucocitos humanos. Perfil de intensidad de emisión fluorescente de una transecta diagonal (línea blanca, $1\text{pxl} \times 16\ \mu\text{m}$) trazada sobre células teñidas simultáneamente con Pyronin Y (Ex. 561nm, Detección BP 595/50, canal "amarillo") y Evans Blue (Ex. 633nm Detección 650/LP, canal "rojo"). En el ejemplo se observa cualitativamente el efecto de *quenching* que tiene la sobrecarga de Evans Blue (área oscura en imagen de DIC) sobre la fluorescencia de Pyronin Y (célula pequeña) y viceversa (célula grande). Una caracterización formal de dicho fenómeno se encuentra en proceso con varios colorantes intercalantes y de contratinción.

El siguiente paso fue evaluar la NETosis en las condiciones establecidas de adquisición-procesamiento de imágenes. La figura 6 demuestra que Pyronin Y es un reactivo útil para el monitoreo de NETosis. Más aún, el análisis de la intensidad de fluorescencia en proyecciones volumétricas de las células expuestas a GO por 2,5hs permite diferenciar núcleos que se encuentran en diferentes estadios del proceso NETótico.

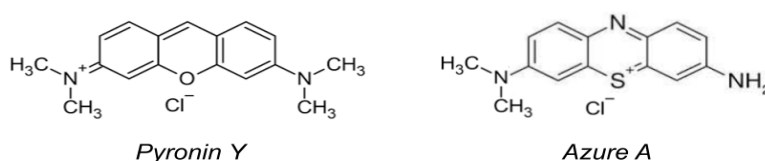


Figura 6: Similitud estructural entre Pyronin Y y Azure A. Estructuras de 2 colorantes xantenidos. La comparación resulta pertinente dada la aparente afinidad de Pyronin Y por los gránulos azurófilos de los PMN.

Otra propiedad de los fluorocromos intercalantes que podría ser explotada en bioensayos de NETosis podría ser su fotoestabilidad y vinculado a esta, la posibilidad de estudiar su afinidad de interacción con los ácidos nucleicos mediante estudios de FRAP (Recuperación de fluorescencia luego de fotoblanqueo). Debido a que esta propiedad no ha sido reportada para Pyronin Y decidimos realizar una serie de determinaciones sobre PMN fijados y luego marcados con Pyronin Y. Sorprendentemente, el colorante mostró una elevada fotoestabilidad frente a una prolongada irradiación ($\approx 1\ \text{min.}$) con luz violeta de 440nm de elevada intensidad (100% de potencia), presentando una reducción menor al 50% de la señal inicial y un tiempo de recuperación medio ($\tau_{1/2}$) de 10 segundos (Figura 8).

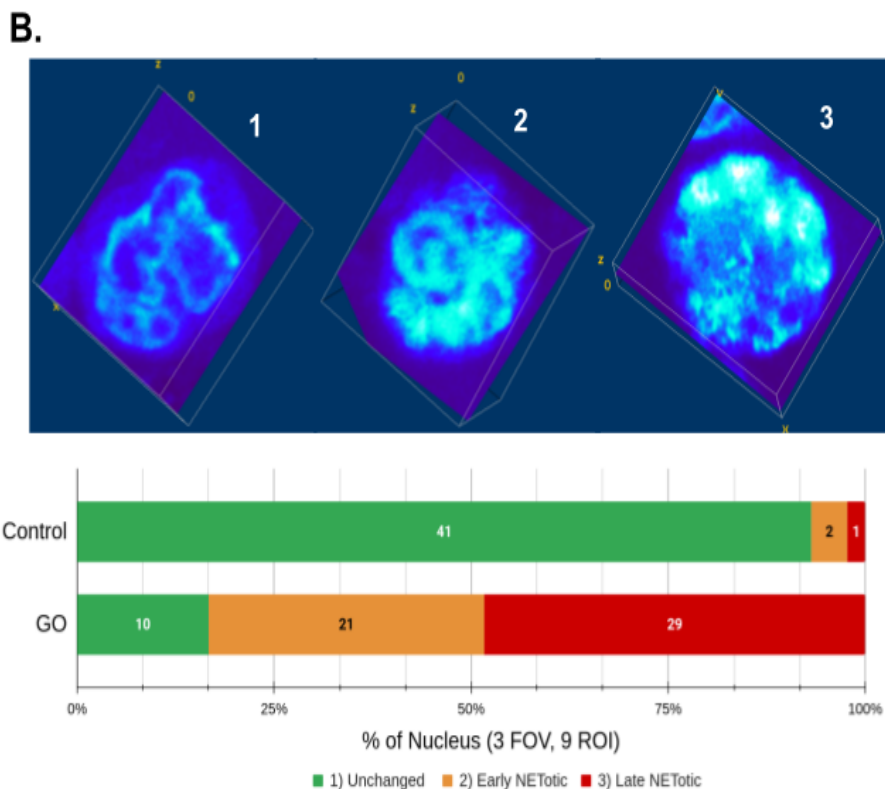


Figura 7: Análisis de PMN en NETosis teñidos con Pyronin Y. A. Análisis morfológico de PMN incubados en presencia de Glucosa Oxidasa (GO) por 150min. y luego fijados (PFA 2%), marcados con Pyronin Y y finalmente microfotografiados y analizados según figura 4B. A la derecha se presenta una región de interés (ROI) de un experimento representativo (n=4). Con el fin de resaltar la presencia de NETs, en la fotografía de la izquierda se intensificó el contraste de manera digital. Debajo y a la derecha de esta imagen se presenta la proyección ortogonal z-x y z-y de 2 planos centrados en una protrusión de una NET. En las áreas rectangulares delimitadas en la imagen de la derecha se muestran 3 ejemplos de núcleos con diferentes grados de alteración en respuesta al tratamiento con GO: 1) Núcleo sin cambios aparentes, 2) Núcleo con alteración en la morfología lobular y aumento de la descondensación de la cromatina (mayor incorporación de colorante), 3) Núcleo con pérdida total de la morfología lobular, descondensación de cromatina y/o vertido de material genético al medio extracelular. **B.** En la imagen superior se muestra la proyección volumétrica de un mapa de calor de la distribución de intensidad de fluorescencia de los espacios recuadrados en **A**. Debajo, se resumen los datos obtenidos a partir de 3 campos de observación (FOV) tomados al azar sobre los que se trazaron a su vez 3 ROI contabilizando 9 ROI por tratamiento (18 ROI por experimento). Los resultados presentados corresponden a 1 experimento independiente representativo de 4 realizados.

El siguiente objetivo fue evaluar la posibilidad de realizar determinaciones de FLIM con este colorante empleando la configuración disponible en nuestra estación de trabajo que cuenta con 2 líneas de excitación pulsada (405 y 440nm) y 2 canales de recolección de fotones (Ch1: 450-500 y Ch2:500-550nm) para este tal fin. En teoría, dada la fotoestabilidad del compuesto (Figura 8), si aumentamos lo suficiente la intensidad de iluminación podríamos obtener el nivel de señal necesaria ($Chi_2 > 1$) para realizar el ensayo empleando el Ch2 de detección. Para confirmar esta presunción se efectuó un barrido espectral (Figura 9A) y se observó que una pequeña cola de la gaussiana de emisión ($\approx 7\%$ del área bajo la curva) caía dentro del rango de detección. Otro problema que enfrentamos es que dentro de las poblaciones de granulocitos periféricos se

encuentran los Eosinófilos (Eo) cuyos gránulos intracitoplasmáticos presentan elevada autofluorescencia en las condiciones de trabajo (Yakimov et al. 2019). En vistas de esto, realizamos una serie de experimentos exploratorios de FLIM donde fijamos 3 variables de interés: i) Potencia mínima necesaria de la fuente de excitación; ii) tiempo mínimo de recolección de fotones emitidos por los complejos Pyronin Y-DNA y iii) Grado de interferencia de objetos autofluorescentes (i.e: gránulos de Eo). En la figura 9 se observa que el seteo del láser de 440nm al 4% de su intensidad permite el análisis FLIM en el dominio temporal. Más aún, estas condiciones de adquisición- procesamiento de la imagen permiten resolver 2 componentes fluorescentes: un componente de corta vida media que se asocia a los gránulos de los Eo y otro de mayor vida media que se atribuye a Pyronin Y unido al DNA de los núcleos celulares.

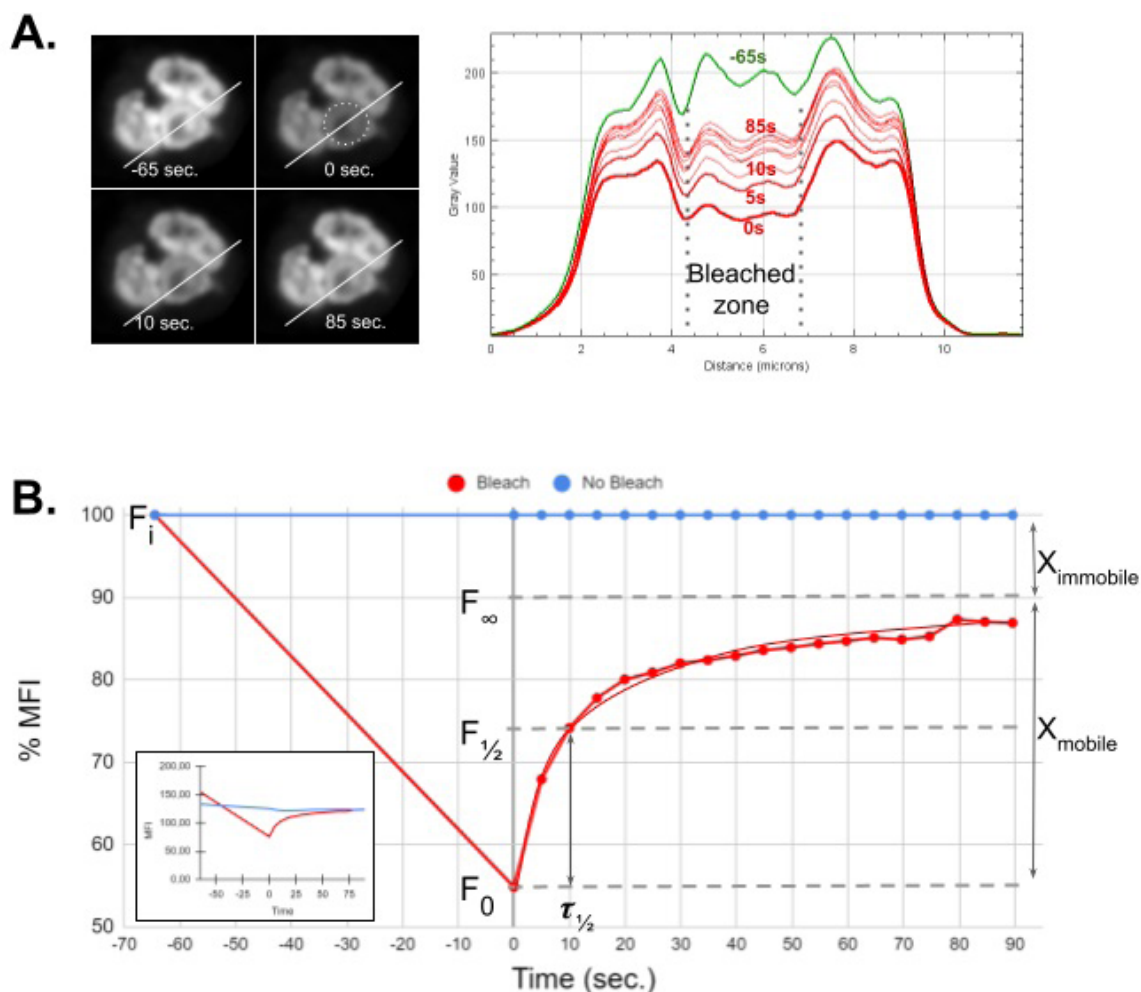


Figura 8: Fotoestabilidad y recuperación post-fotoblanqueo (FRAP) de Pyronin Y unido a núcleos de PMN humanos.

A. Perfil de emisión de una transecta (línea blanca, $1\text{pxl} \times 12\mu\text{m}$) antes (-65 segundos, imagen superior izquierda, curva verde) y luego de irradiación (imagen sup. derecha, área dentro de circunferencia punteada $\varnothing 2,5\mu\text{m}$) con láser de diodo pulsado de 440nm a máxima potencia (curvas rojas). Al cabo del fotoblanqueo sólo se observa un 50% de reducción en la emisión inicial promedio del área irradiada ($F_i=200\pm 35$ a.u. vs $F_0=98\pm 18$ a.u.). **B.** Análisis FRAP de un experimento representativo. Inset, datos crudos. Los resultados demuestran una rápida tasa de recuperación post-fotoblanqueo ($\tau_{1/2}=10''$) lo que podría explicar la relativamente baja eficiencia de fotoblanqueo observada en **A.** Se presenta un experimento representativo de 5 realizados.

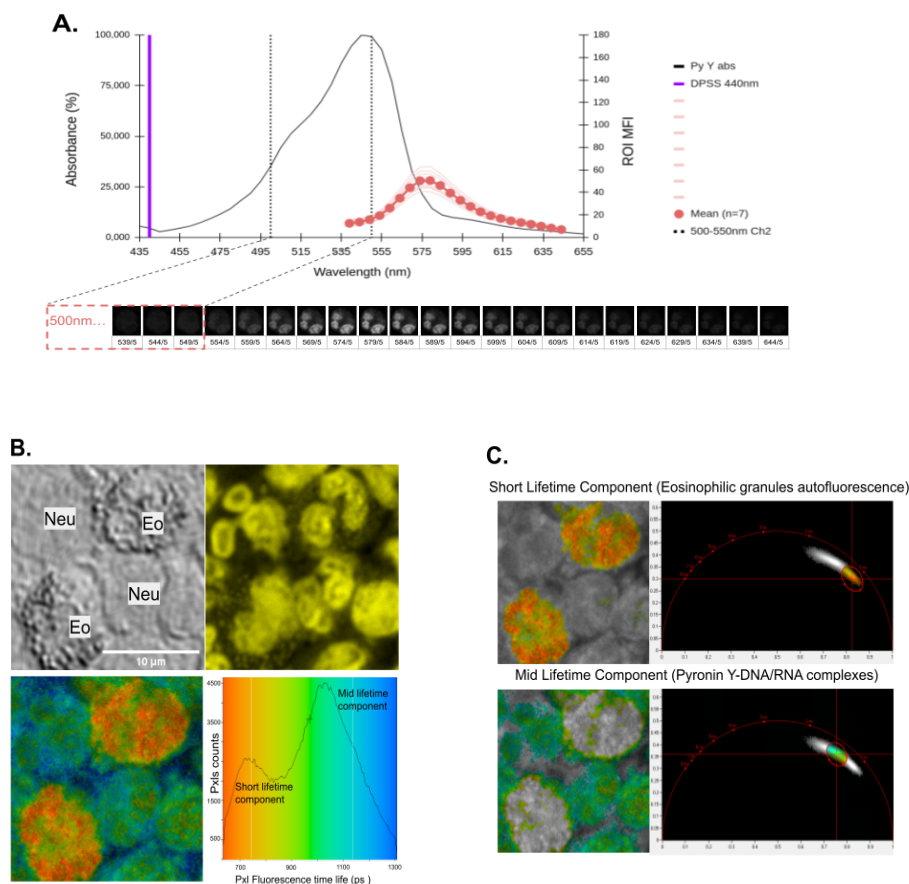


Figura 9: Condiciones de adquisición y análisis de leucocitos teñidos con Pyronin Y para estudios de FLIM en dominio temporal. **A.** Análisis espectral (λ -stack, ventanas de 5nm) de núcleos de PMN fijados (PFA 2%) teñidos con Pyronin Y, excitados con un Laser de Diodo pulsado 440nm 30mW al 4% de potencia para verificar la detección de señal en el intervalo 500-550nm (Channel 2) condición necesaria para realizar estudios de FLIM en el dominio temporal con el sistema Becker & Hickl implementado en la estación de trabajo LSM880 (Zeiss). **B.** Análisis de intensidad (imagen superior derecha) y de tiempo de vida media de fluorescencia FLIM (imagen inf. izq. e histograma) en PMN neutrófilos (Neu) y Eosinófilos (Eo) humanos periféricos fijados (PFA 2%) y teñidos con Pyronin Y. **C.** Análisis en el dominio temporal (time domain FLIM, Phasor plots) que permite diferenciar en el citoplasma de Eo un componente autofluorescente (C1) diferente de los complejos Pyronin Y-Ácido nucleico del núcleo celular (C2). Los tiempos de vida media observados son $\tau_{1/2}=730ps$ para C1 y de $\tau=1050ps$ para C2).

Dada la gran diferencia entre la intensidad de fluorescencia del núcleo y de la NET, el registro microfotográfico de la NETosis plantea evidentes problemas en relación al ajuste de contraste: si se quieren evidenciar las NETs se hace necesario aumentar la ganancia de los fotodetectores lo que implica la saturación de los pixeles nucleares (Figura 7A). En función de esto, el análisis de FLIM se plantea como una alternativa potencialmente útil ya que las NETs - expuestas al medio extracelular-proporcionan al colorante unido un entorno molecular diferente al encontrado en el núcleo celular lo cual podría afectar su tiempo de vida media de fluorescencia característica. Para probar esto se repitieron los experimentos con GO de igual manera que en figura 7 pero en esta ocasión las imágenes se adquieren y procesan en la modalidad FILM (Becker & Hickl, Alemania).

El análisis en el dominio temporal (nuestro equipamiento no permite el análisis en el dominio frecuencial) mediante diagramas de fasores permite demostrar claramente la aplicabilidad de esta técnica al ámbito de la NETosis ya que el colorante unido a las NETs presenta un aumento en el $\tau_{1/2}$ respecto de cuando se halla unido a los núcleos. Un hallazgo marginal interesante y frecuente fué la presencia de glóbulos rojos atrapados en las NETs. Resulta interesante notar que en éstas células anucleadas se evidencia una autofluorescencia con vida media muy corta que podría explicarse por la emisión del grupo Hemo de la hemoglobina y/o sus productos de oxidación Hemina y Hemoxina (Yakimov et al. 2019). Otra posibilidad que aún no podemos descartar es la formación de complejos o agregados entre Pyronin Y, y hemoglobina de los glóbulos rojos, lo que no ha sido reportado previamente.

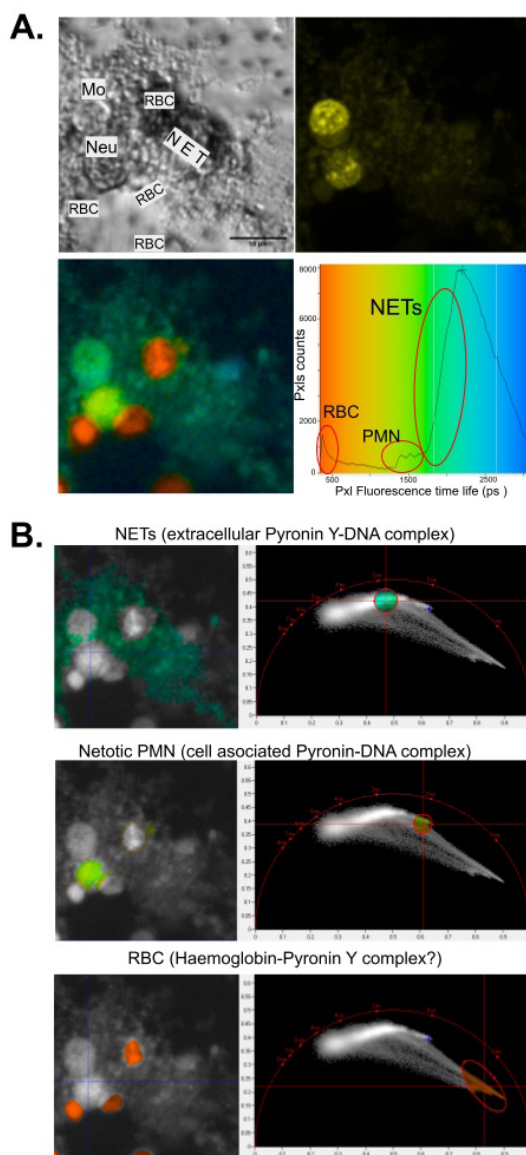


Figura 10: Aplicabilidad de Pyronin Y para estudios de NETosis mediante técnica FLIM. A. Análisis de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) en PMN neutrófilos humanos periféricos estimulados por 2,5hs con GO para inducir NETosis. Cumplido el cultivo las células fueron fijadas (PFA 2%) y teñidas con Pyronin Y. **B.** Gracias al análisis en el dominio temporal (*time domain FLIM-Phasor plot*) es posible diferenciar entre NETs, núcleos de células NETóticas, glóbulos rojos y células “viables” fijadas (Monocitos).

Se logró identificar, purificar y caracterizar in vitro un compuesto intercalante fluorescente con alto potencial tecnológico. La utilidad de Pyronin Y en la detección de NETosis temprana quedó claramente demostrada empleando métodos de microscopía multimodal de vanguardia. Encontrar nuevas aplicaciones para este reactivo clásico de la histología permitirá el desarrollo de nuevos micrométodos automatizables y económicos para el screening de drogas que afecten las vías de transducción de señales vinculadas a diferentes tipos de muerte celular programada en leucocitos y otros tipos celulares.

Indicadores de producción

Los resultados del presente proyecto han sido publicados en el *International Journal of Biochemistry & Physiology (IJBP ISSN: 2577-4360)*, con el título "Revisiting Pyronin Y, A Classical Photostable Xanthene Dye useful for Cost Effective Multimodal Fluorescence Microscopy" (DOI: [10.23880/ijbp-16000222](https://doi.org/10.23880/ijbp-16000222)).

Artículos publicados en revistas de difusión científica

FINA B; SANTAMARÍA B; FERREYRA M; SCHIERLOH LP; CHAMORRO JC; CEJAS E; PREVOSTO L.

Innovative application of plasma-activated water in the inactivation of Escherichia coli: Temperature-dependent chemical processes leading to the synergistic microbicidal effect. *FOOD CONTROL*; Año: 2024, vol. 163

MICAELA A. CHAMBI VELASQUEZ, ROMINA PAVÉ, MARÍA A. ARGOITIA, PABLO SCHIERLOH, MARÍA G. PICCIRILLI, VALERIA C. COLOMBO, FERNANDO J. BELTRÁN, DANIEL M. CISTERNA, DIEGO A. CARABALLO Revisiting Molossus (Mammalia: Chiroptera: Molossidae) diversity: Exploring southern limits and revealing a novel species in Argentina. <https://vertebrate-zoology.arphahub.com/article/122822/element/2/15/>

ROMINA PAVÉ, PABLO SCHIERLOH, MICAELA CHAMBI, MARÍA GUADALUPE PICCIRILLI, SABRINA ULMAN, SILVINA SAAVEDRA, DANIEL M. CISTERNA & DIEGO A. CARABALLO Morphological and molecular analyses confirm the presence of the newly described bat species

Molossus melini in the Espinal ecoregion from Argentina. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13364-023-00679-1>

Bibliografía

1. Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., & Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 114(13), 2619–2622. doi:10.1182/blood-2009-05-221606
2. Brinkmann, V. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>
3. Doring, Y., Weber, C., & Soehnlein, O. (2013). Footprints of Neutrophil Extracellular Traps as Predictors of Cardiovascular Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1735–1736. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.301889>
4. Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., ... Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>

5. Fuchs, T. A., Brill, A., & Wagner, D. D. (2012). Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(8), 1777–1783. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.111.242859>
6. Hakkim, A., Furnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., ... Zychlinsky, A. (2010). Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9813–9818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909927107>
7. Hoppenbrouwers, T., Autar, A. S. A., Sultan, A. R., Abraham, T. E., van Cappellen, W. A., Houtsmuller, A. B., de Maat, M. P. M. (2017). In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLOS ONE*, 12(5), e0176472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176472>
8. Kraaij, T., Tengström, F. C., Kamerling, S. W. A., Pusey, C. D., Scherer, H. U., Toes, R. E. M., ... Teng, Y. K. O. (2016). A novel method for high-throughput detection and quantification of neutrophil extracellular traps reveals ROS-independent NET release with immune complexes. *Autoimmunity Reviews*, 15(6), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.018>
9. Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemmarck, U., Back, W., Gross, W. L., Werb, Z., ... Jenne, D. E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*, 15(6), 623–625. <https://doi.org/10.1038/nm.1959>
10. Lelliott, P. M., Momota, M., Lee, M. S. J., Kuroda, E., Iijima, N., Ishii, K. J., & Coban, C. (2019). Rapid Quantification of NETs In Vitro and in Whole Blood Samples by Imaging Flow Cytometry. *Cytometry Part A*. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23767>
11. Lyon, H., Jakobsen, P., Høyer, P., & Andersen, A. P. (1987). An investigation of new commercial samples of Methyl Green and Pyronin Y. *The Histochemical Journal*, 19(6-7), 381–384. <https://doi.org/10.1007/bf01680456>
12. Masuda, S., Nakazawa, D., Shida, H., Miyoshi, A., Kusunoki, Y., Tomaru, U., & Ishizu, A. (2016). NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta*, 459, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.029>
13. Masuda, S., Shimizu, S., Matsuo, J., Nishibata, Y., Kusunoki, Y., Hattanda, F., ... Ishizu, A. (2017). Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. *Cytometry Part A*, 91(8), 822–829. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23169>
14. Nakazawa, D., Shida, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Nishio, S., Atsumi, T., & Ishizu, A. (2014). Enhanced Formation and Disordered Regulation of NETs in Myeloperoxidase-ANCA-Associated Microscopic Polyangiitis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(5), 990–997. <https://doi.org/10.1681/asn.2013060606>
15. Papayannopoulos, V., & Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology*, 30(11), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.07.011>
16. Prieto, D., Aparicio, G., Morande, P. E., & Zolessi, F. R. (2014). A fast, low cost, and highly efficient fluorescent DNA labeling method using methyl green. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(3), 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1215-0>
17. Rochoael, N. C., Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., DeSouza-Vieira, T. S., Oliveira, M. P., Garcia e Souza, L. F., ... Saraiva, E. M. (2015). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep18302>

18. Steinberg, B. E., & Grinstein, S. (2007). Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Science's STKE*, 2007(379), pe11-pe11. <https://doi.org/10.1126/stke.3792007pe11>
19. Wong, S. L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A. B., ... Wagner, D. D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*, 21(7), 815–819. <https://doi.org/10.1038/nm.3887>
20. Yakimov, B.P., Gogoleva, M.A., Semenov, A.N., Rodionov, S.A., Novoselova, M.V., Gayer, A.V., ... Shirshin, E.A. (2019) Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis. *Biomedical Optics Express* 10(8), 4220-4236. <https://doi.org/10.1364/BOE.10.004220>
21. Yipp, B. G., & Kubes, P. (2013). NETosis: how vital is it? *Blood*, 122(16), 2784–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>

PID 6211

Denominación del Proyecto

Netosis: desarrollo de bioensayos costo-efectivos para screening y caracterización de compuestos inductores y antagonistas

Unidad de ejecución

Universidad Nacional de Entre Ríos

Dependencia

Facultad de Ingeniería

Cátedra, Área o disciplina científica

Estructuras Biomoleculares y Genética. Departamento de Biología (FI-UNER). Inmunología y Microscopía. Laboratorio de Microscopía Aplicada (LMAE).

Instituciones intervinientes

Instituto de Investigación y desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB)-CONICET.

Contacto: pablo.schierloh@uner.edu.ar

Integrantes del proyecto

Director

Schierloh Luis Pablo

Codirectora

Sigot, Valeria (IBB-UNER-CONICET)

Integrantes internos/docentes UNER

Erbes Luciana (Becaria Postdoctoral CONICET); Sampedro Florencia (Personal de Apoyo CONICET).

Colaboradores: Machtey, Matías (FI-UNER) y Adur, Javier (FI-UNER)

Fecha de iniciación y finalización efectivas

02/03/2020 y 22/01/2024

Aprobación del Informe Final por Resolución C.S N° 354/25 (07-11-2025)