

Rol del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos: formación de óxido nítrico y peroxinitrito.

Pereyra, Josefina^{1,2}; Casella, Ana Clara; Prolo, Carolina^{1,2}; Rios, Natalia^{1,2}; Radi, Rafael^{1,2}; Alvarez, Maria Noel^{2,3}.

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Centro de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

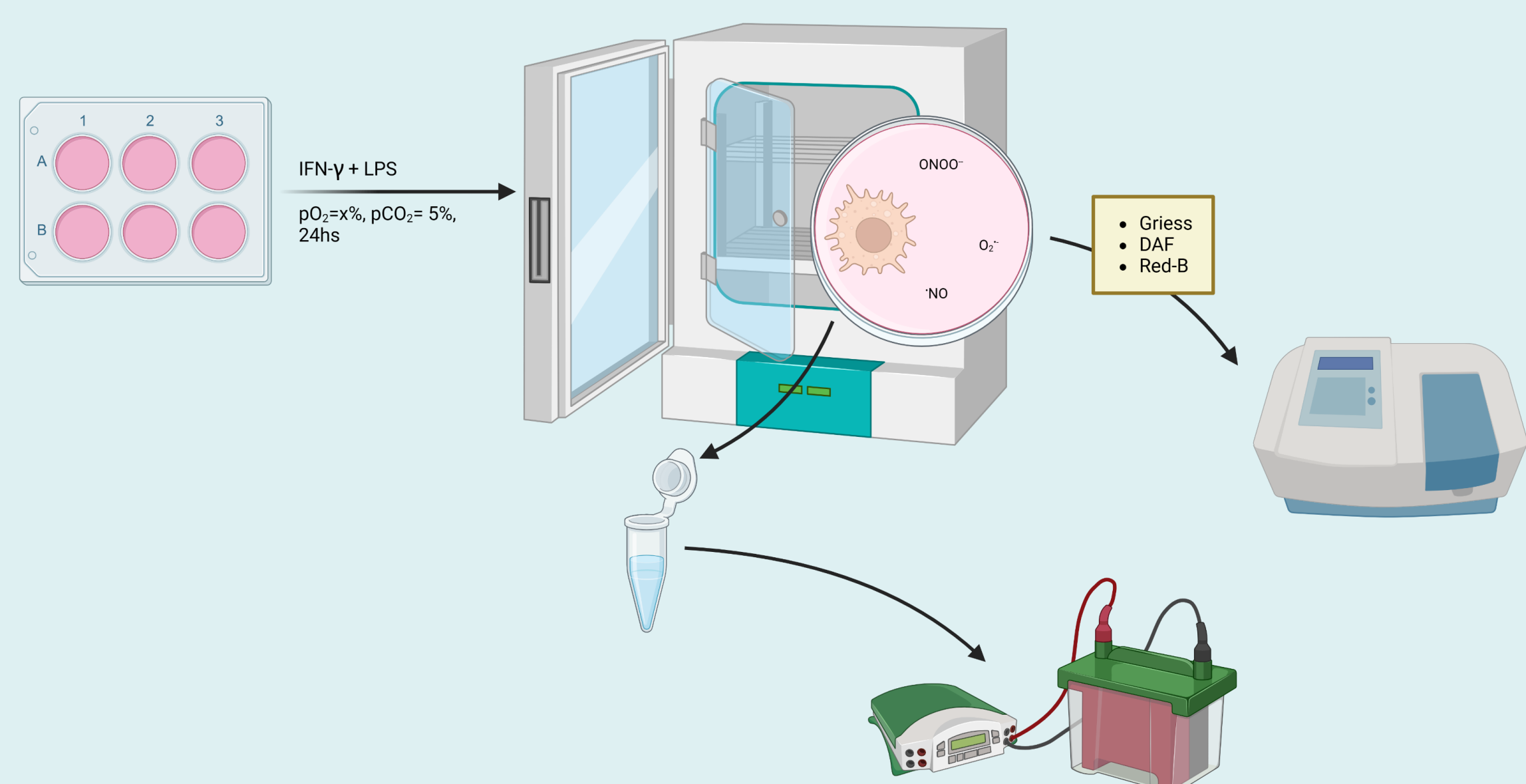
³Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Introducción

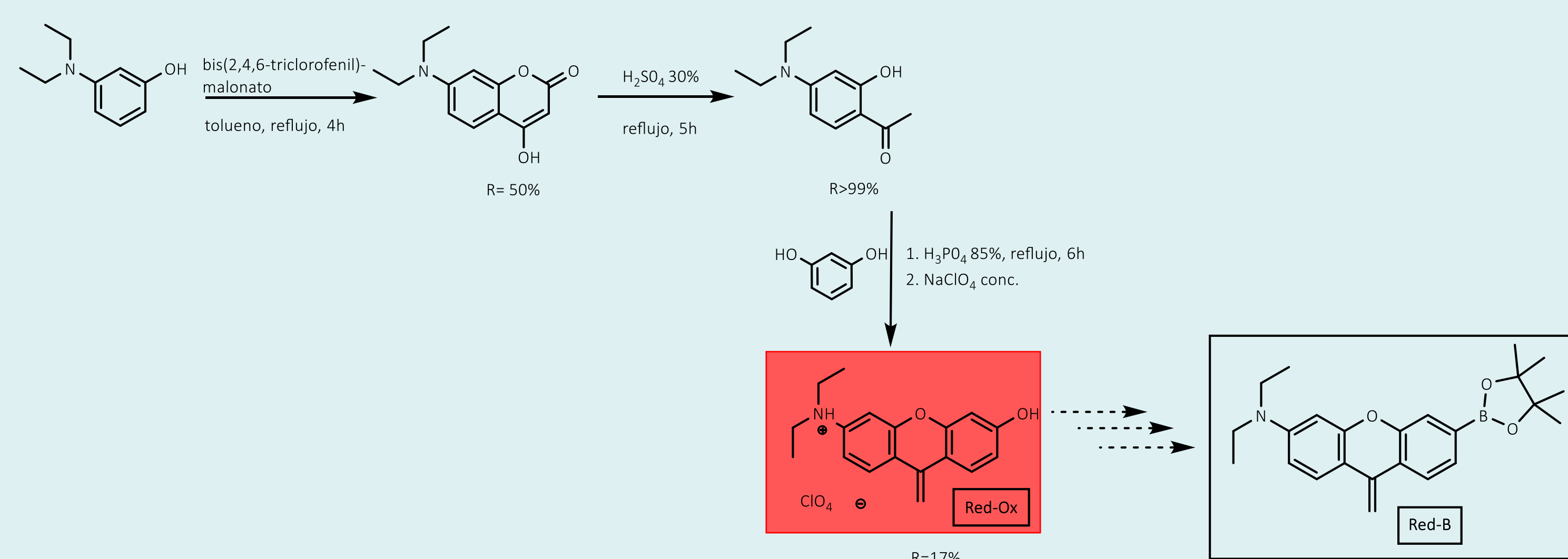
La respuesta citotóxica de los macrófagos depende del oxígeno (O_2) como sustrato principal para la producción de especies oxidantes. Este es utilizado por la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la NADPH-oxidasa-2 (NOX-2) para la producción de óxido nítrico ($\bullet NO$) y superóxido ($O_2^{\bullet-}$) respectivamente. La reacción entre estos dos radicales genera un potente oxidante biológicamente relevante denominado peroxinitrito ($ONOO^-$), capaz de generar daño a partir de reacciones de oxidación y nitración. Recientemente, se ha vuelto de gran interés el estudio de estos procesos *in cellula* considerando el microambiente fisiológico. Reportes previos de nuestro grupo han demostrado que la producción de oxidantes en macrófagos depende de la presión parcial de oxígeno (pO_2) en el rango fisiológico. La detección de $ONOO^-$ muestra una tendencia similar a la producción de $\bullet NO$ en exposiciones cortas. Sin embargo, el uso de las sondas hasta ahora desarrolladas está limitado a ciertas metodologías debido a sus propiedades espectroscópicas. Además, son sensibles a cambios en el pH intracelular y la pO_2 . Por lo tanto, estamos desarrollando una nueva sonda fluorescente (Red-B) derivada de boronatos, para la detección de peroxinitrito en diferentes condiciones celulares.

Materiales y Métodos

Medida de producción de $\bullet NO$ y expresión de iNOS



Ruta de síntesis de Red-B



Conclusiones

- La velocidad de producción de $\bullet NO$ no varía en las pO_2 evaluadas.
- Se observa un aumento en la expresión de la iNOS al disminuir la pO_2 , lo cual podría constituir un mecanismo de compensación a la falta de sustrato.
- El fluoróforo Red-Ox fue sintetizado y caracterizado por espectroscopia, mostrando propiedades óptimas ($\lambda_{exc} = 511nm$; $\lambda_{em} = 538nm$, $\epsilon_{511nm} = 66.748M^{-1}cm^{-1}$).
- Se determinó para Red-Ox un $pKa \approx 5.5$, considerando entonces una baja dependencia con el pH en el rango fisiológico.

Objetivos

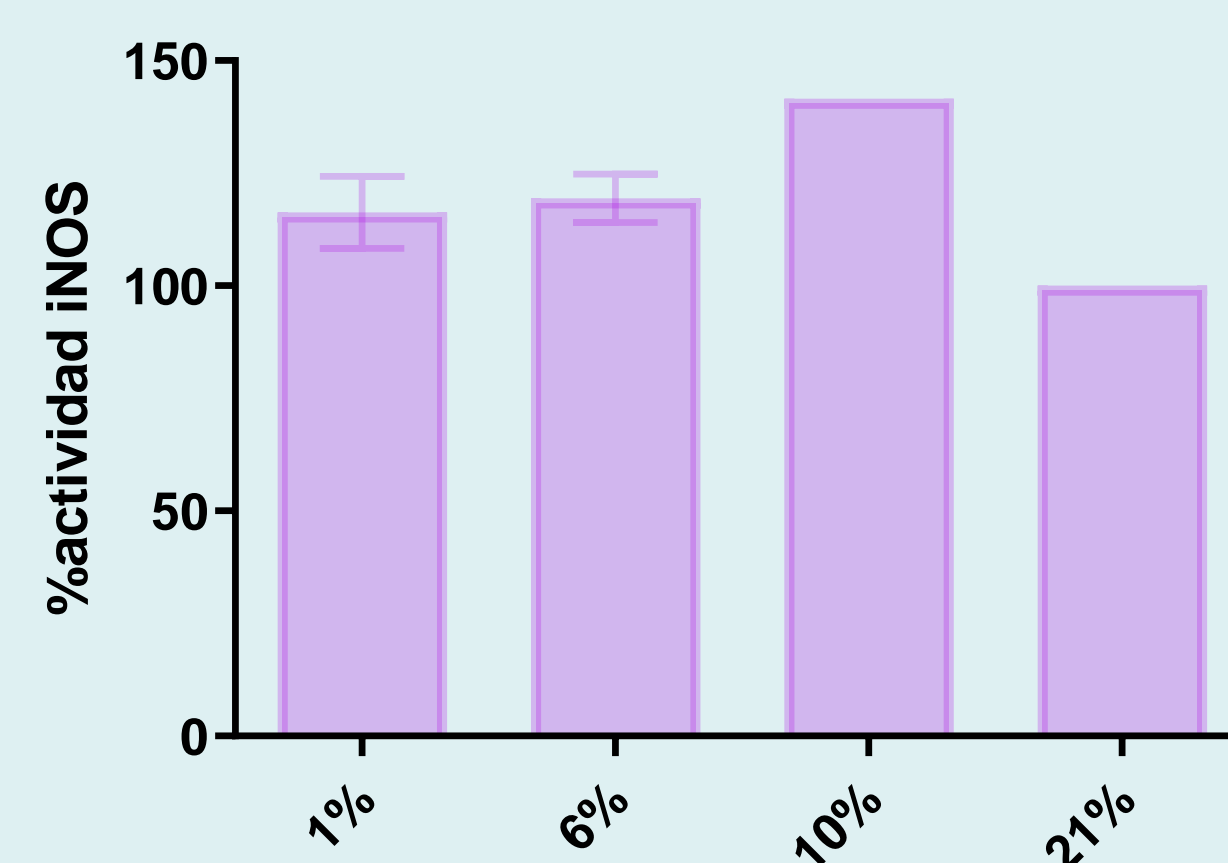
Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la concentración de O_2 en la respuesta oxidativa de macrófagos.

Objetivos específicos:

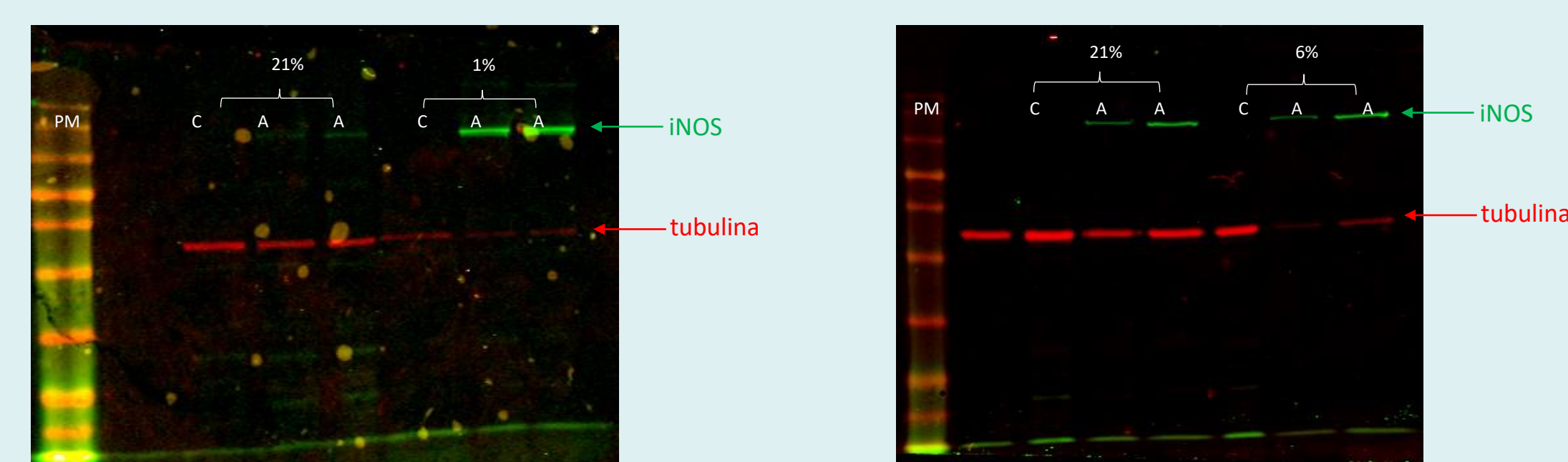
- Determinar el efecto de las concentraciones O_2 en la modulación de la expresión y actividad de las enzimas responsables de la producción de óxido nítrico: iNOS.
- Sintetizar y caracterizar sonda derivada de xanteno (Red-B) para la detección de peroxinitrito en las distintas condiciones experimentales *in cellula*.

Resultados



• Se observa que la producción de $\bullet NO$ se mantuvo constante a las distintas pO_2 evaluadas.

Figura 1. Producción de $\bullet NO$ por macrófagos expuestos a distintas pO_2 . Macrófagos murinos J774A-1 fueron cultivados a 1, 6, 10 y 21% de pO_2 durante 24hs y luego tratados con IFN- γ y LPS para inducir la expresión de la iNOS. A las 24 h se cuantificó el NO_2^- (derivado estable del $\bullet NO$) en el sobrenadante.



• Se evidencia el aumento en la expresión de la iNOS a medida que disminuye la pO_2 .

Figura 2. Expresión de la iNOS en macrófagos expuestos a distintas pO_2 . Macrófagos incubados a distintas pO_2 por 24 horas y luego tratados con IFN- γ y LPS. La expresión de iNOS fue evaluada con anticuerpo anti-iNOS (Novus) en el lector de detección infrarroja Odyssey, Li-cor.

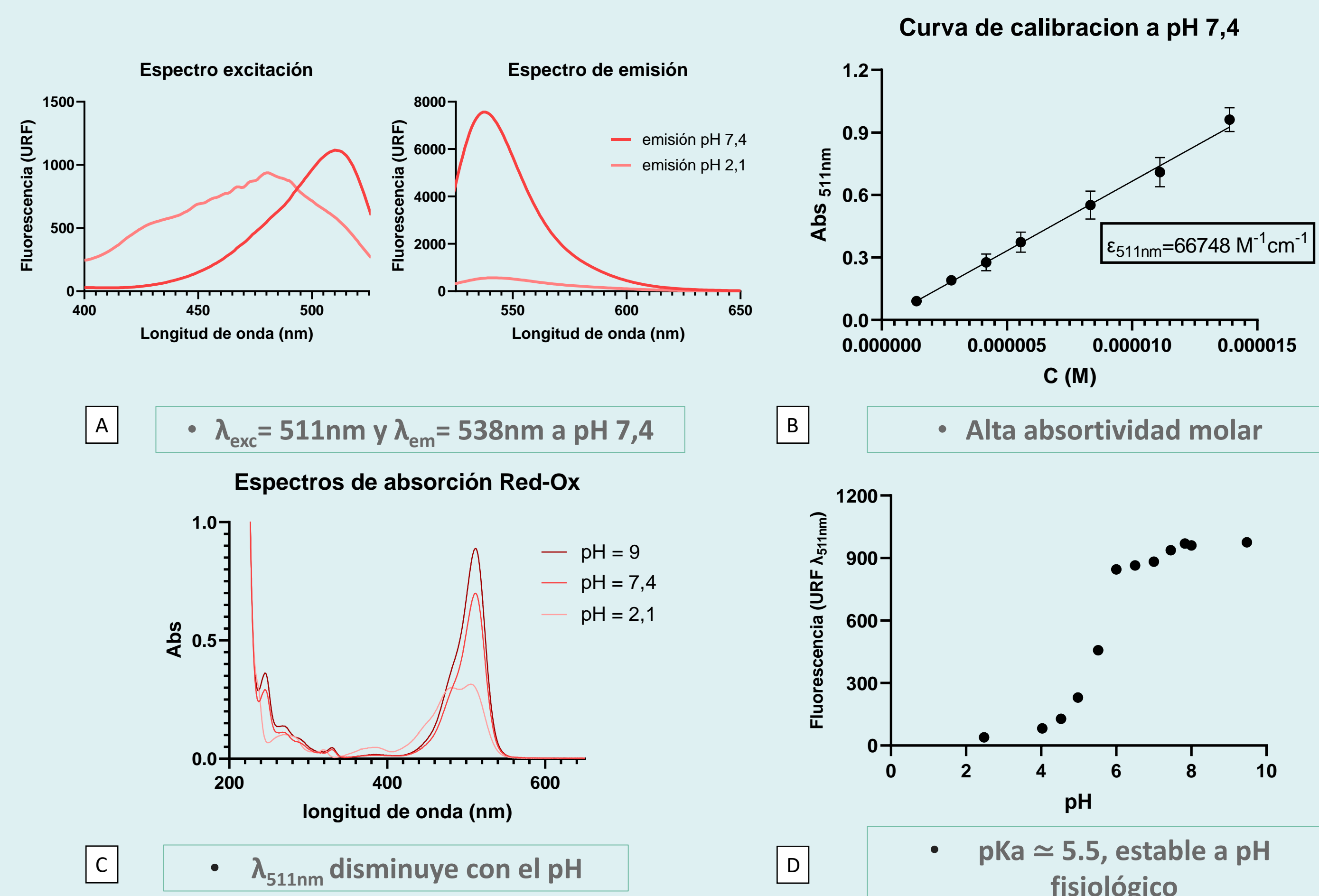


Figura 3. Propiedades espectroscópicas de Red-Ox y dependencia con el pH. A) Espectros de emisión y excitación de Red-Ox ($10 \mu M$) a pH 2.1 y 7.4. B) Determinación del coeficiente de absorptividad molar (ϵ) a pH 7.4, calculada a partir de la Ley Lambert-Beer ($A = \epsilon b C$). C) Espectro de absorción de Red-Ox ($10 \mu M$) a distintos pH. D) Influencia del pH sobre la emisión de fluorescencia.

Agradecimientos:

- Agencia Nacional Investigación e Innovación (ANII)
- PEDECIBA Química
- Facultad de Medicina