

# EVALUACIÓN DEL ROL DEL OXÍGENO COMO MODULADOR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS

**Bach. Josefina Pereyra Domenech**

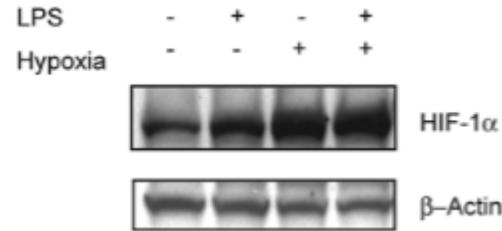
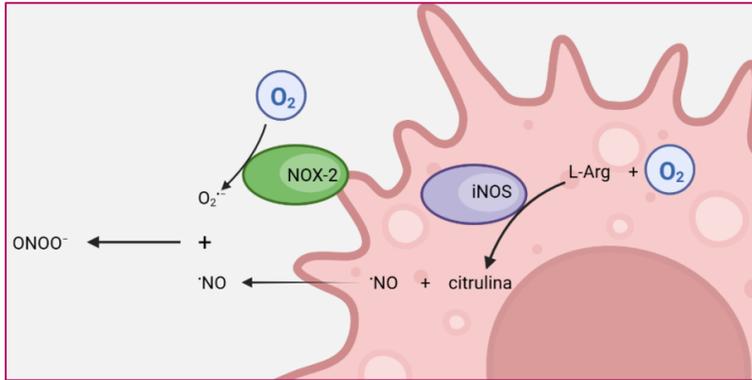
Dra. Carolina Prolo, Dra. Natalia Rios, Dra. M.N. Álvarez,

Dr. Rafael Radi

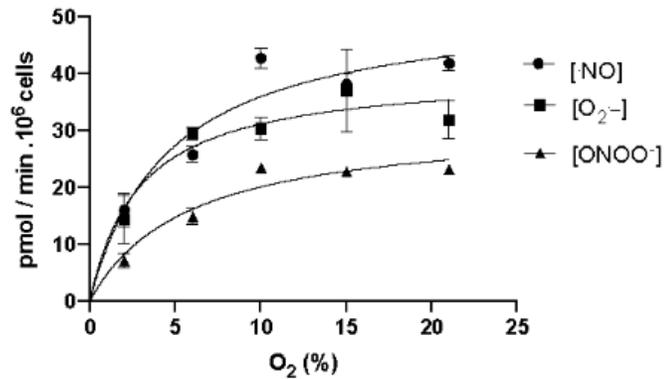
Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdeLaR

# ANTECEDENTES



Aumento de la expresión HIF-1 $\alpha$  en hipoxia (1%) o por exposición a LPS



Producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO y ONOO<sup>-</sup> a distintas concentraciones de oxígeno, en un tiempo de exposición de 20 minutos.

Tejido	%pO <sub>2</sub>
aire en el alveolo	14,5
sangre arterial	13,2
sangre venosa	5,3
tejido nervioso	4,1-4,7
mucosa intestinal	7,3-7,9
hepatocitos	4,7-6,1
tejido muscular	3,6-4,0
riñón	6,9-12,1

Rango de %pO<sub>2</sub> dependiendo del tejido en el cuerpo humano.

- Antecedentes
- Objetivos
- Resultados
- Conclusiones parciales

# ANTECEDENTES

## Detección de peroxinitrito en células

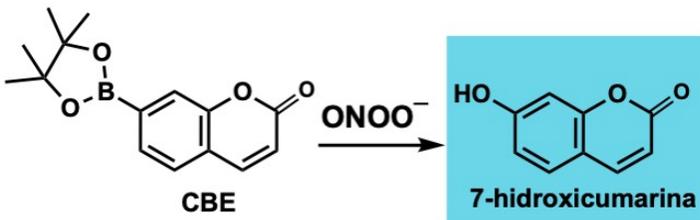
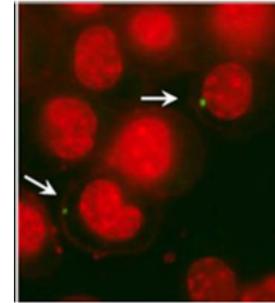
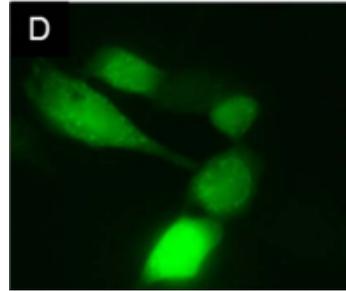
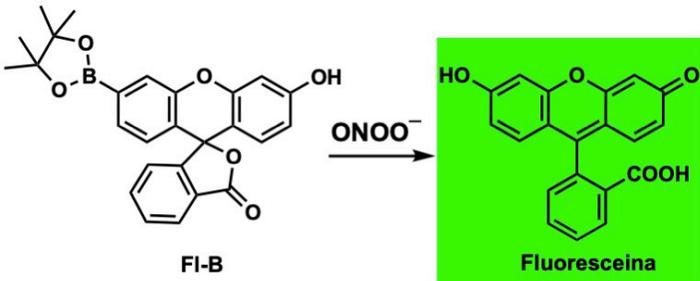
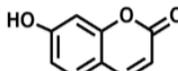


Tabla 8. Comparación de  $\lambda_{exc}$  y  $\lambda_{em}$  máximas de los diferentes fluoróforos obtenidos.

Entrada	Nº de compuesto	Estructura química	$\lambda_{exc}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
1	COH		332	470

Oxidante	$k$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) CBE	$k$ ( $M^{-1} s^{-1}$ ) FI-B
$\text{ONOO}^-$	$(1,30 \pm 0,60) \times 10^6$	$(1,70 \pm 0,05) \times 10^6$
$\text{H}_2\text{O}_2$	$1,47 \pm 0,56$	$1,70 \pm 0,20$

- Antecedentes
- Objetivos
- Resultados
- Conclusiones parciales

# OBJETIVOS

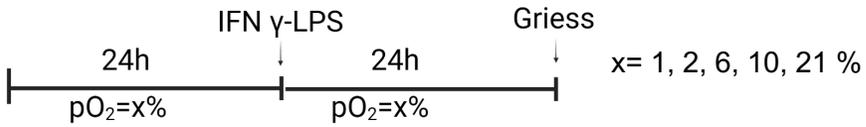
OBJETIVO GENERAL: Evaluar el efecto de la concentración de  $O_2$  en la respuesta oxidativa de macrófagos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

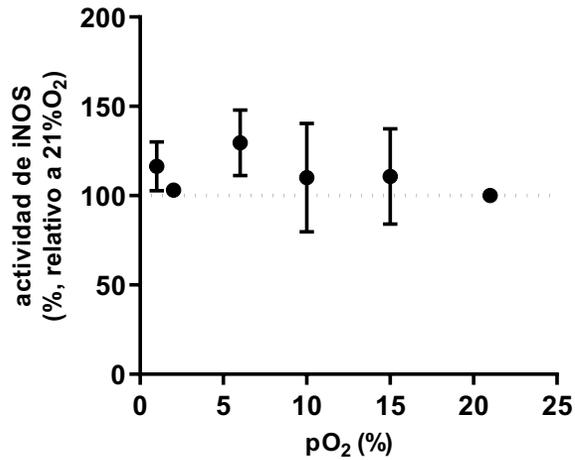
- Determinar el efecto de la concentración de  $O_2$  en la modulación de la expresión y actividad de iNOS responsable de la producción de  $\bullet NO$ , y el oxidante derivado  $ONOO^-$ .
- Sintetizar y caracterizar Red-B, una sonda derivada de xanteno para la detección de peroxinitrito en las distintas condiciones experimentales *in celulla*.

- Antecedentes
- **Objetivos**
- Resultados
- Conclusiones parciales

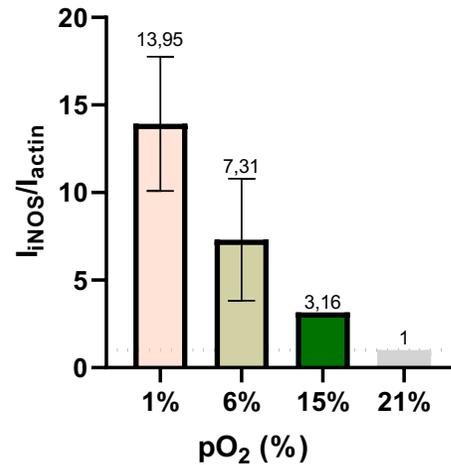
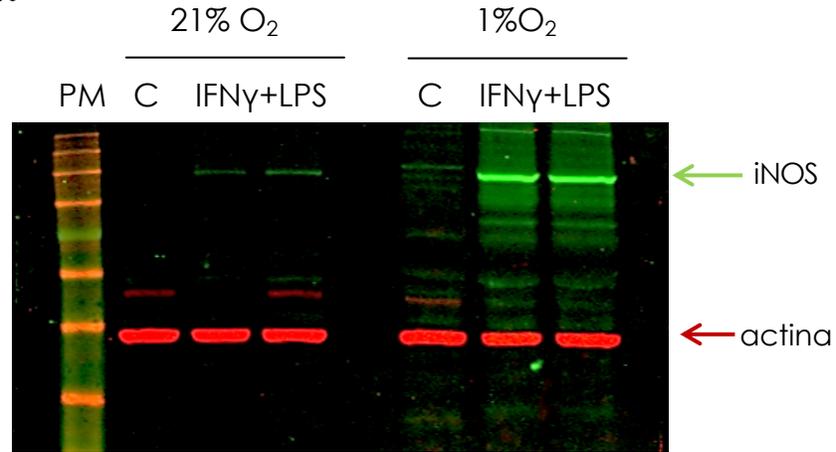
# RESULTADOS



Actividad de la iNOS en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO<sub>2</sub>



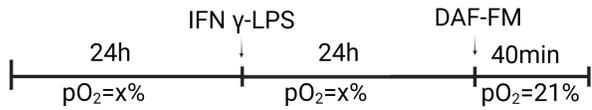
La tasa de producción de  $\cdot$ NO no varía en un rango de pO<sub>2</sub> de 1-21% a expensas de un aumento en la expresión de iNOS



Relación de la intensidad iNOS/actina en células adaptadas por 48hs.

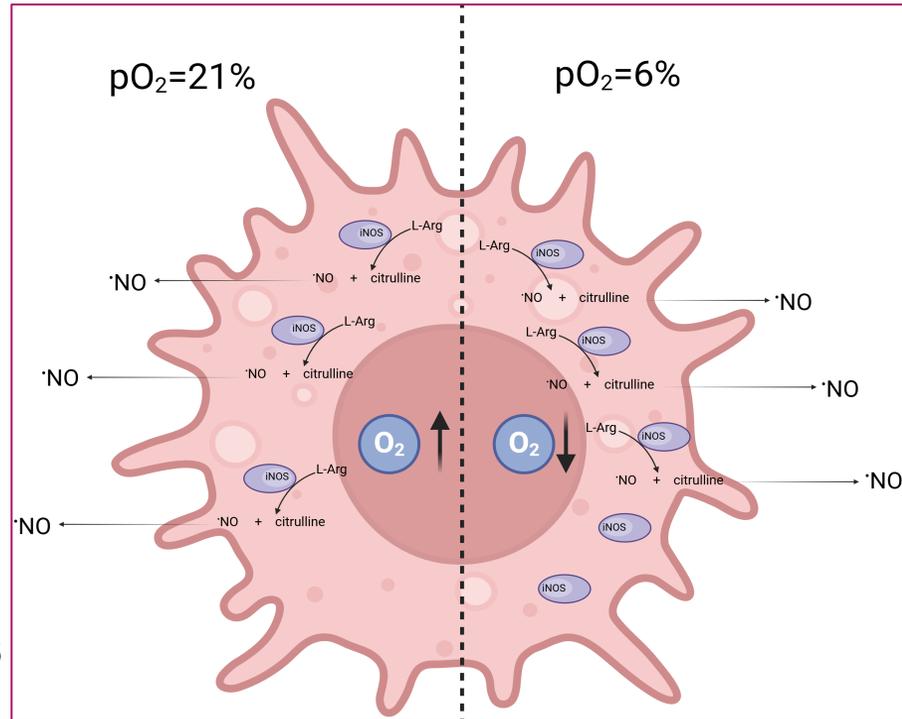
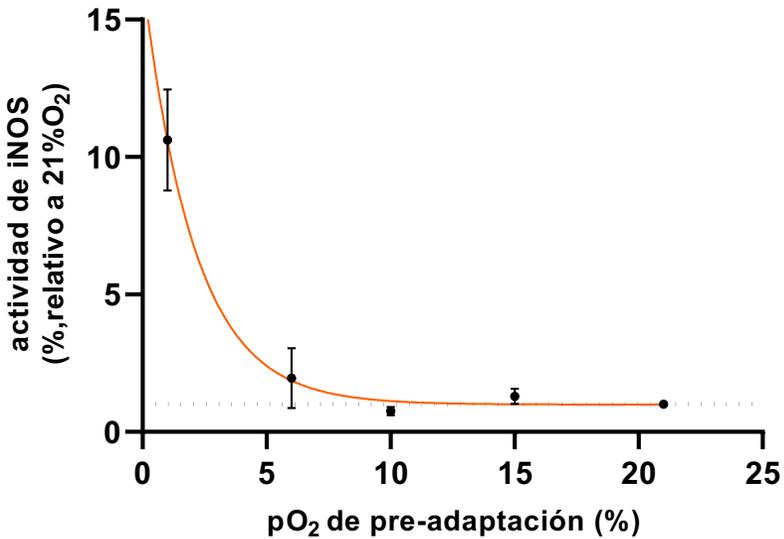
- Antecedentes
- Objetivos
- **Resultados**
- Conclusiones parciales

# RESULTADOS



x= 1, 6, 15, 21%

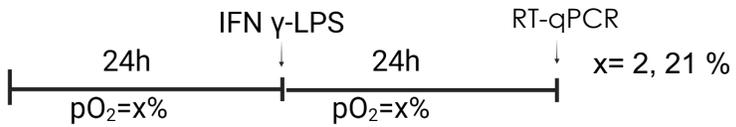
Actividad iNOS medida a 21 %  $pO_2$  en macrófagos pre-adaptados a distintas  $pO_2$



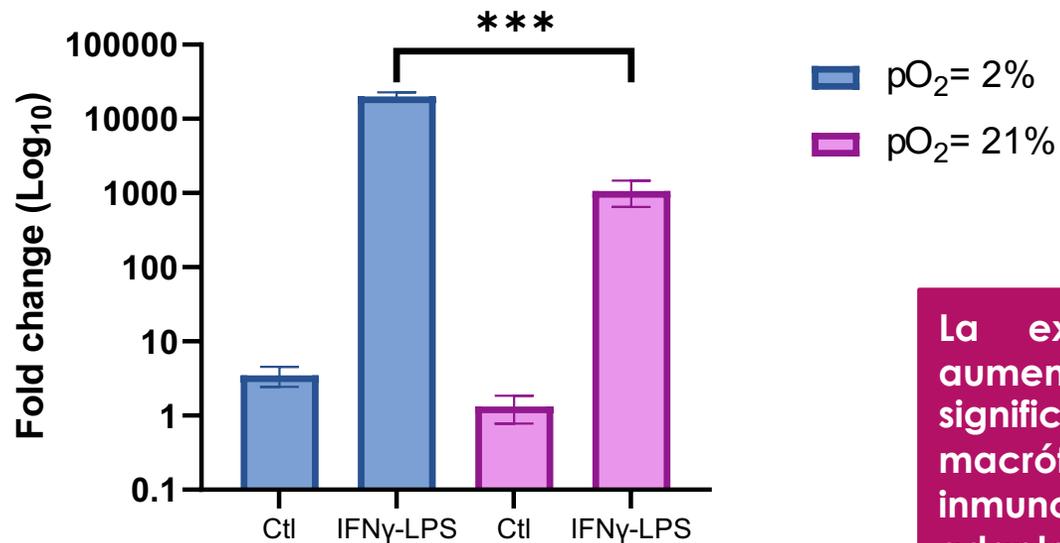
La tasa de producción de  $NO$  es mayor durante la reoxigenación debido al aumento en la expresión de la iNOS.

- Antecedentes
- Objetivos
- **Resultados**
- Conclusiones parciales

# RESULTADOS



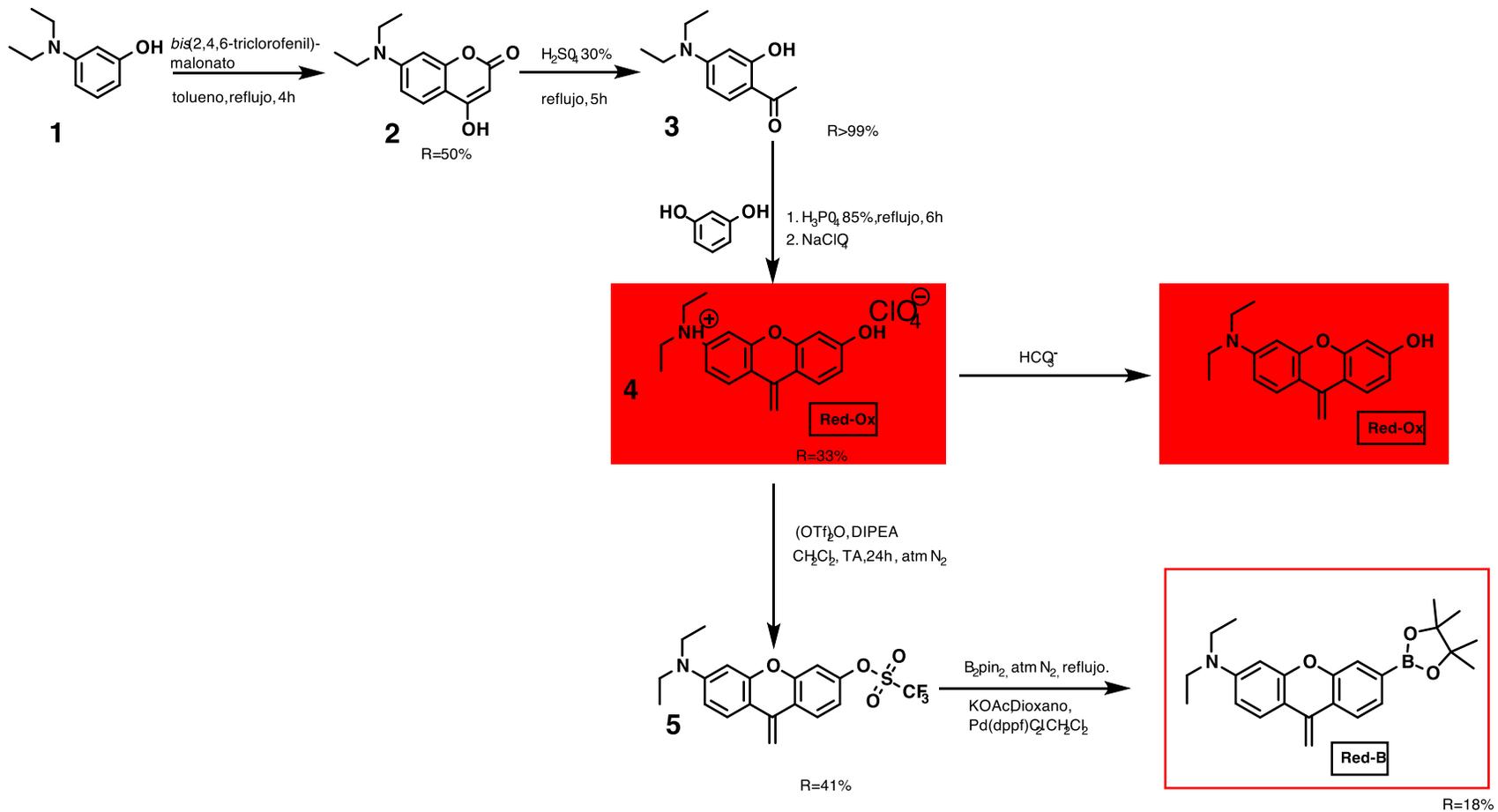
## Expresión de IL-1 $\beta$



La expresión de IL-1 $\beta$  aumenta de forma significativa en macrófagos inmunoestimulados adaptados 2% de pO<sub>2</sub> comparado con los adaptados a 21%

# RESULTADOS

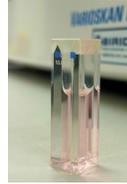
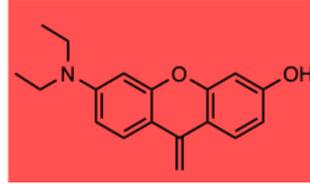
## Ruta sintética de Red-B



- Antecedentes
- Objetivos
- **Resultados**
- Conclusiones parciales

# RESULTADOS

## Caracterización de Red-Ox

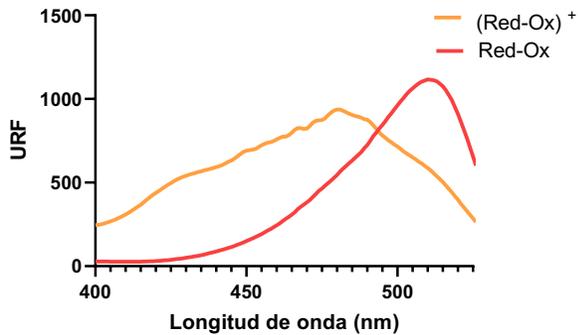


Red-Ox  
pH= 7,4

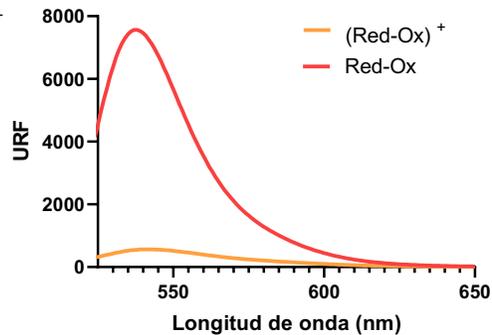


(Red-Ox)<sup>+</sup>  
pH= 2,1

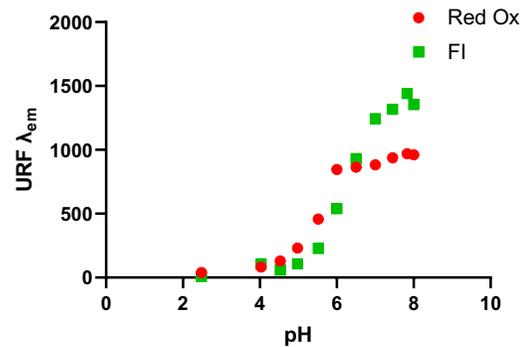
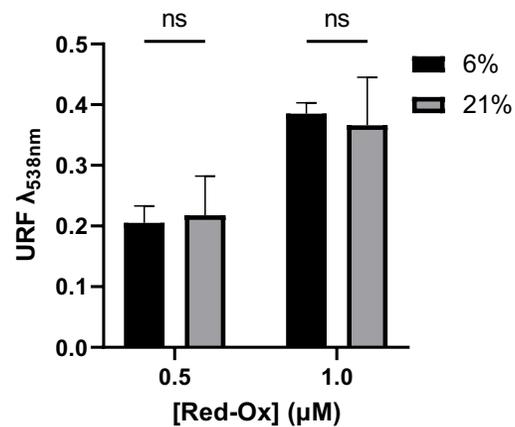
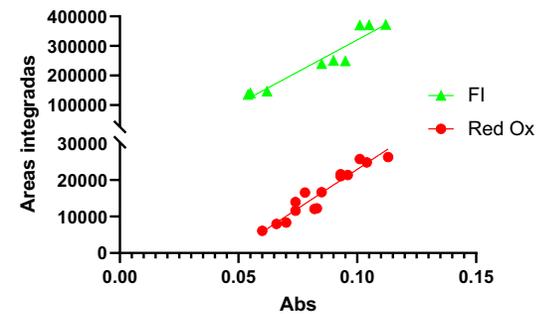
Espectro de excitación



Espectro de emisión



	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)
(Red-Ox) <sup>+</sup>	490	538
Red-Ox	511	538



$\Phi = 0,0924$

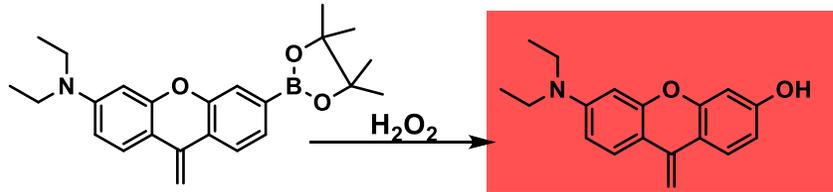
Efecto quenching del oxígeno no significativo en [Red-Ox] < 1µM

$pK_{a_{Red-Ox}} = (5.92 \pm 0.25)$

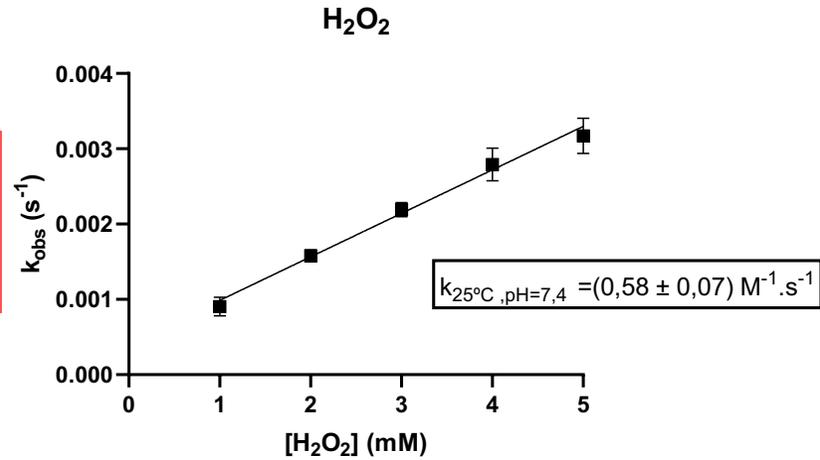
- Antecedentes
- Objetivos
- Resultados
- Conclusiones parciales

# RESULTADOS

## Caracterización de Red-B



Cinética de segundo orden para la reacción con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

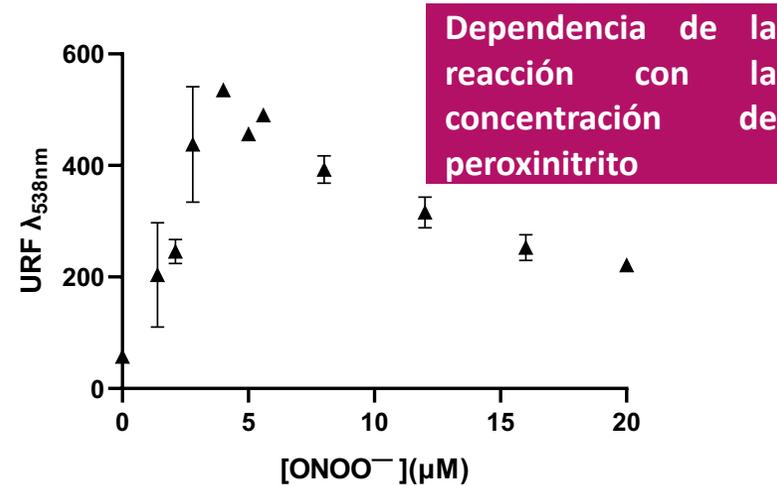
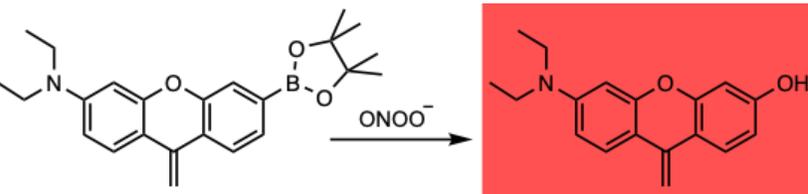


- Antecedentes

- Objetivos

- **Resultados**

- Conclusiones parciales



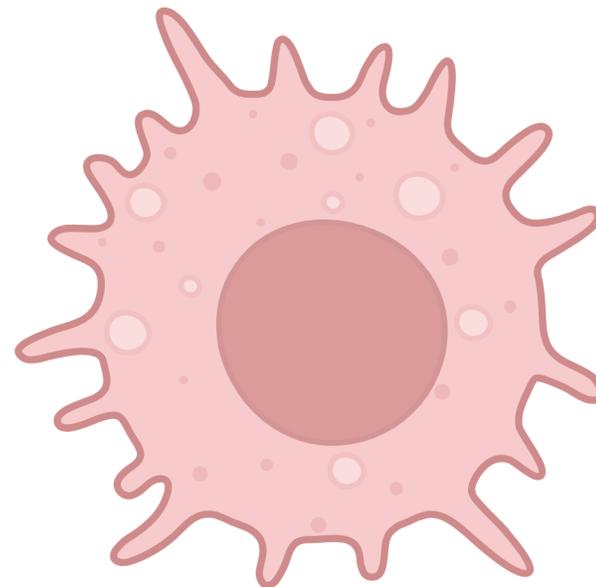
Dependencia de la reacción con la concentración de peroxinitrito

# CONCLUSIONES

- La expresión de iNOS aumenta durante la adaptación de macrófagos a bajas  $pO_2$ .
- El aumento de iNOS genera que el flujo de  $\cdot NO$  sea similar en todas las  $pO_2$  estudiadas a pesar de la variación de sustrato ( $O_2$ ).
- Red-B fue sintetizada en 6 pasos y presenta propiedades óptimas para la futura detección de peroxinitrito en este trabajo.

- Antecedentes
- Objetivos
- Resultados
- **Conclusiones parciales**

MUCHAS GRACIAS



jornada  
**XIV SBBM**  
SOCIEDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**ANII** AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN

**proinbio**  
Programa para la Investigación Biomédica



**CEINBIO**



Ministerio  
de Educación  
y Cultura

Dirección Nacional  
de Innovación, Ciencia  
y Tecnología