


Impacto del oxígeno en la regulación de la respuesta oxidativa en macrófagos

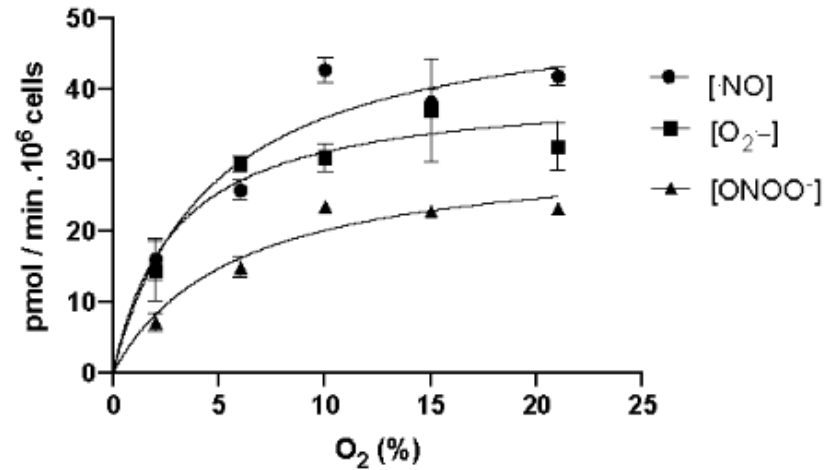
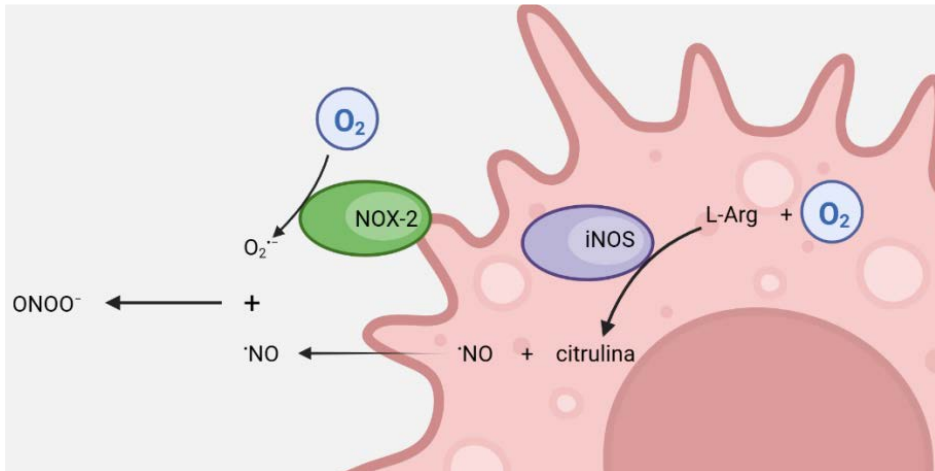
Estudiante: Josefina Pereyra Domenech
Directora académica: Dra. Carolina Prolo
Co-Directora: Dra. Natalia Rios

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar

Congreso Nacional de Biociencias
Montevideo, 28-30 mayo de 2025



Antecedentes



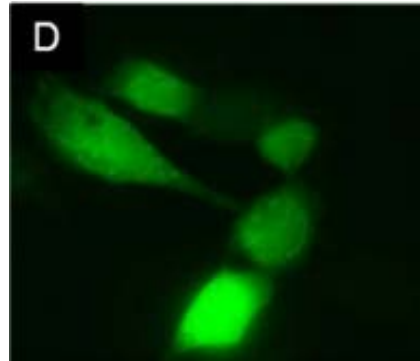
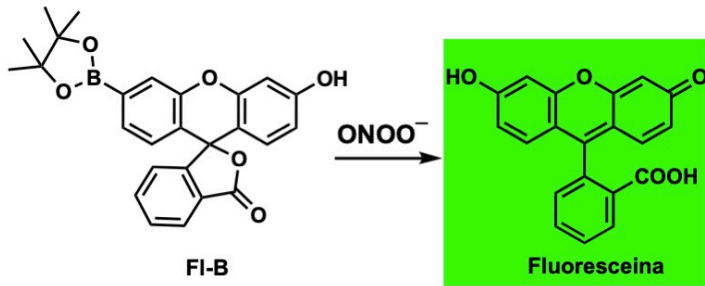
Producción de $O_2^{\bullet -}$, $\bullet NO$ y $ONOO^{\bullet -}$ a distintas concentraciones de oxígeno, en un tiempo de exposición de 20 minutos.

Tejido	pO ₂ (%)
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 %pO₂ dependiendo del tejido en el cuerpo humano.

Antecedentes

Detección de peroxinitrito en células



Oxidante	k (M ⁻¹ s ⁻¹)CBE	k(M ⁻¹ s ⁻¹)FI-B
ONOO ⁻	(1,30 ± 0,60) × 10 ⁶	(1,70 ± 0,05) × 10 ⁶
H ₂ O ₂	1,47 ± 0,56	1,70 ± 0,20

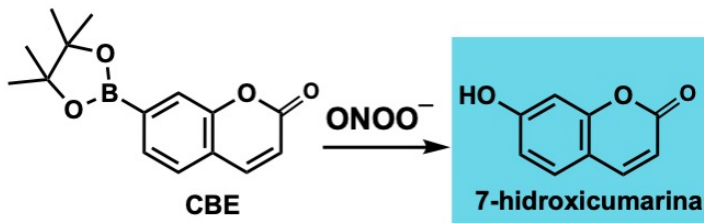
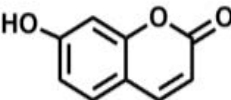


Tabla 8. Comparación de λ_{exc} y λ_{em} máximas de los diferentes fluoróforos obtenidos.


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



Objetivos

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

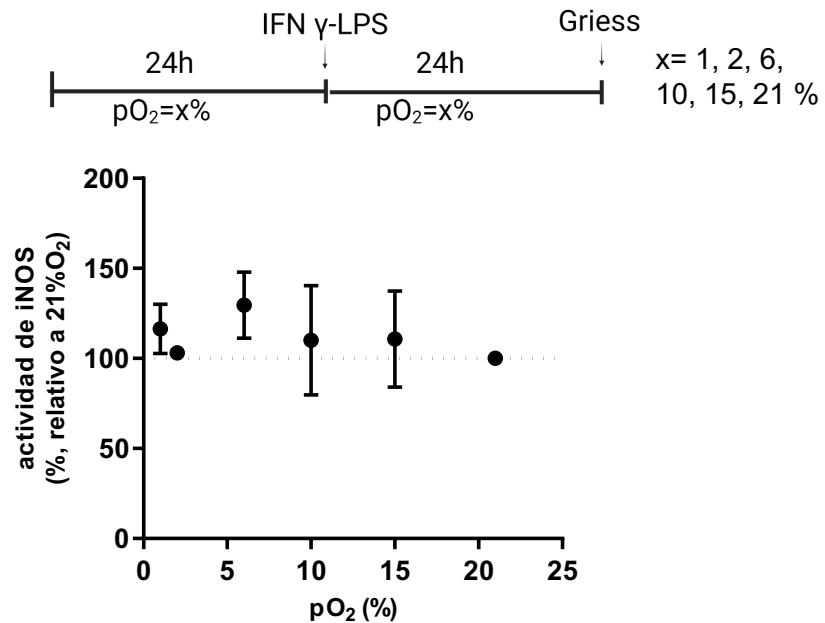
OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. 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 $ONOO^-$.
 2. Sintetizar y caracterizar Red-B, una sonda derivada de xanteno para la detección de peroxinitrito en las distintas condiciones experimentales *in cellula*.
- 

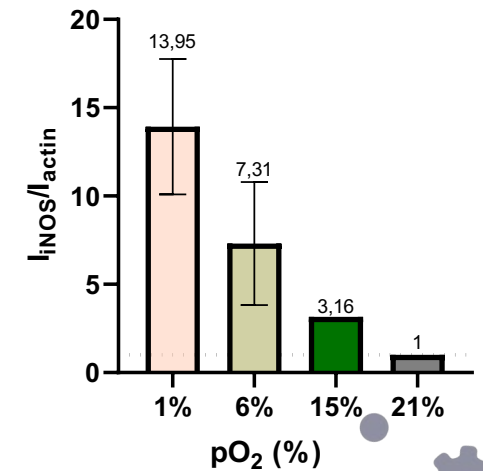
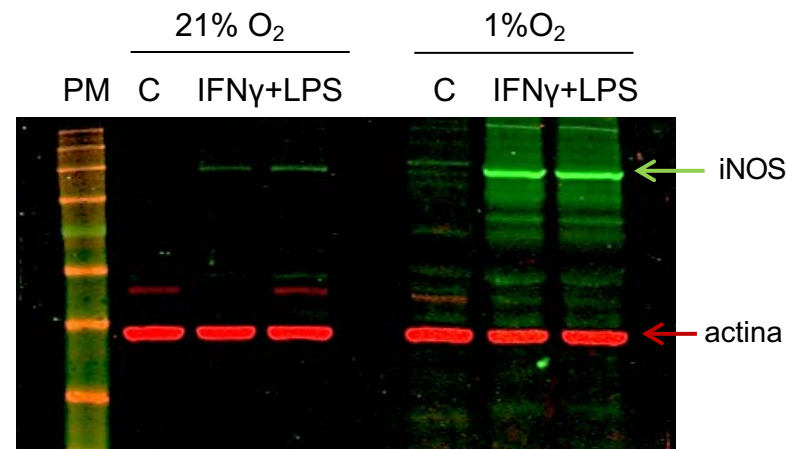
Resultados

Obj. Esp. 1

Actividad de la iNOS en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO_2



Expresión de la iNOS en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO_2



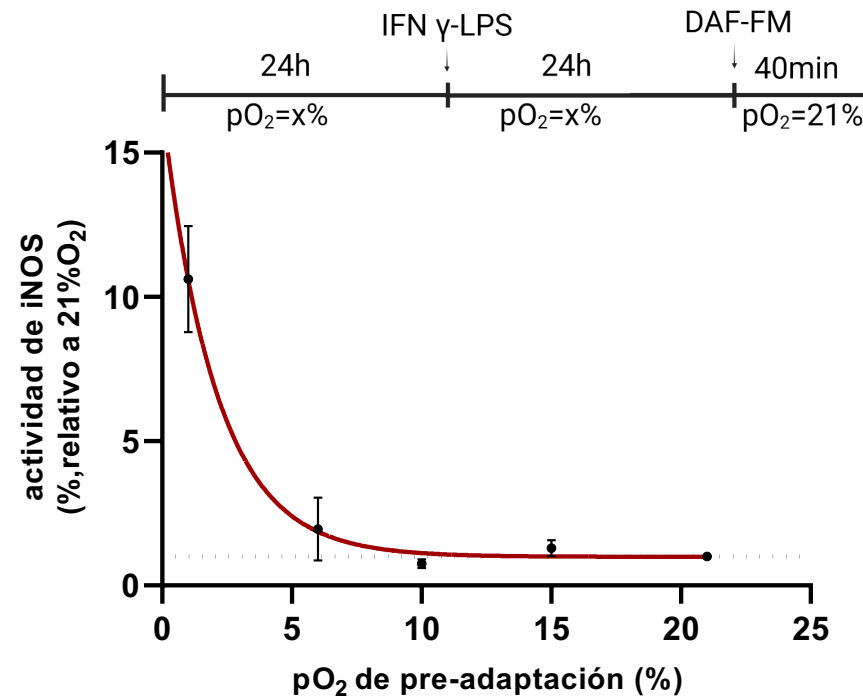
El aumento en la expresión de la iNOS compensa la falta de sustrato (O_2).

Resultados

Obj. Esp. 1

Actividad iNOS medida a 21 % pO₂ en macrófagos pre-adaptados a distintas pO₂

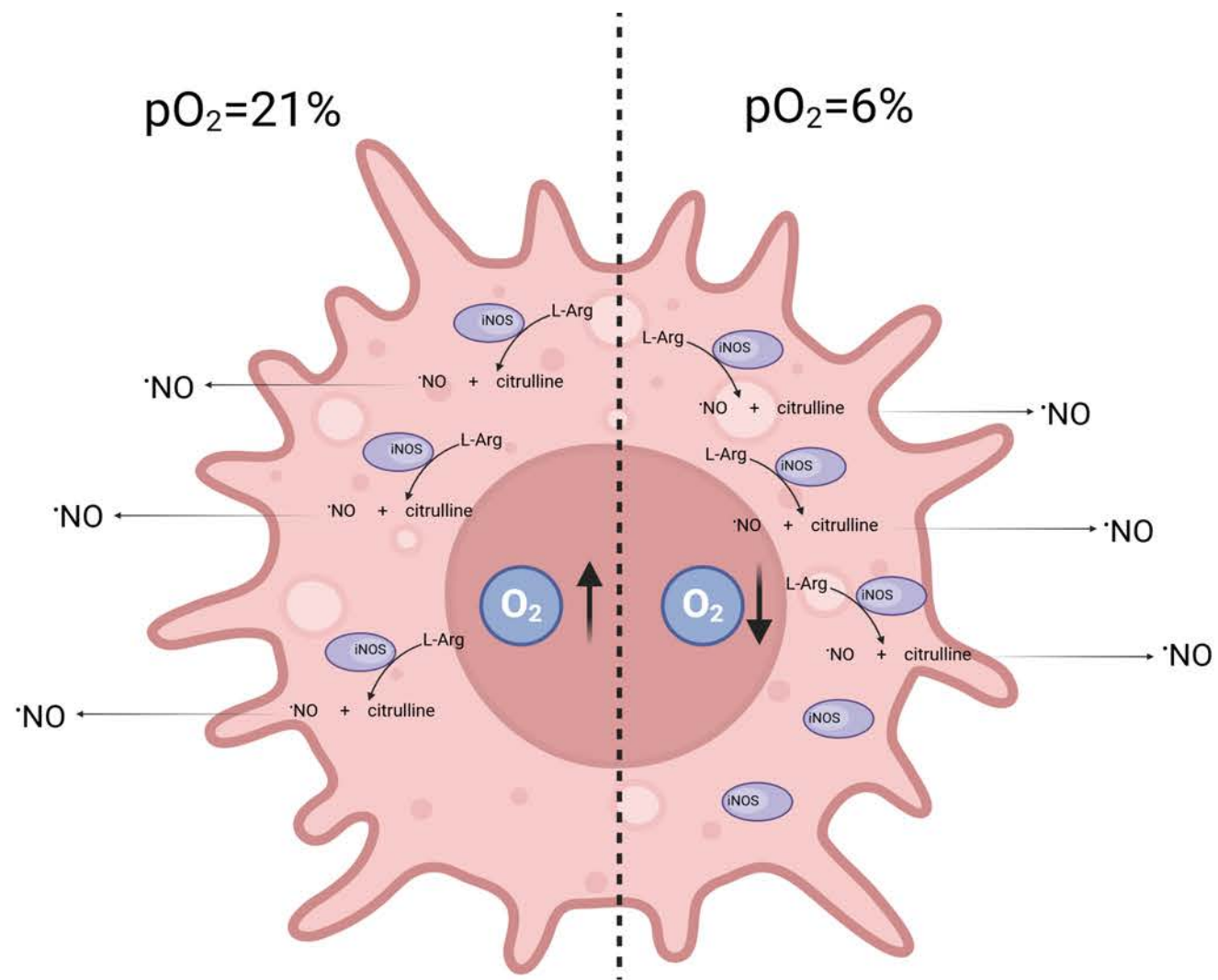
x = 1, 6, 15, 21%



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

Resultados

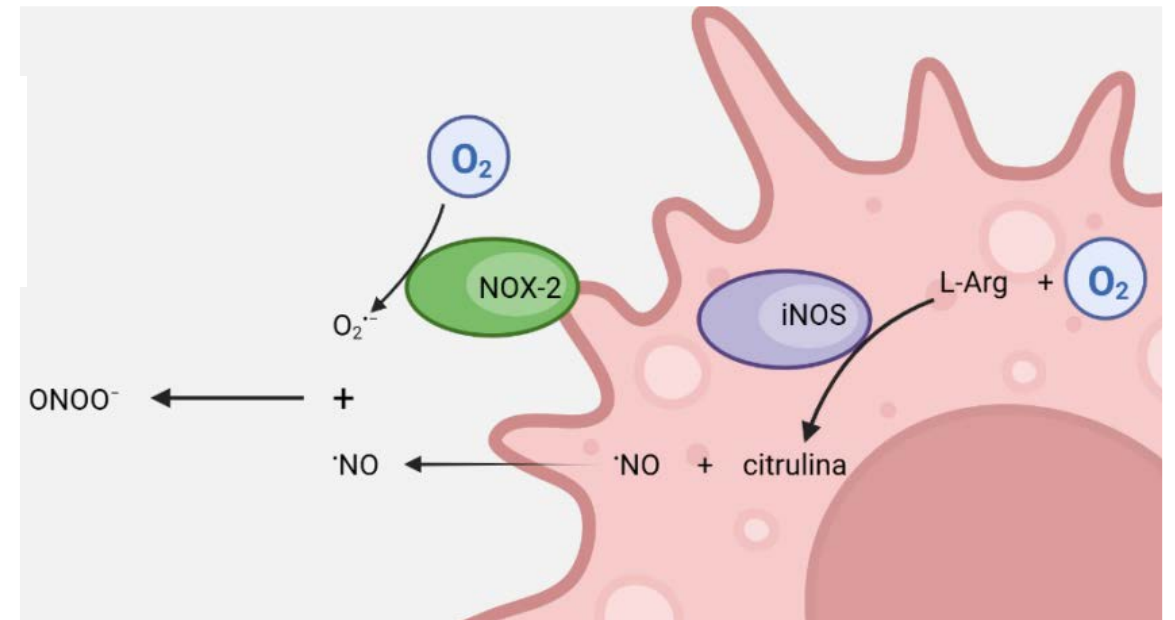
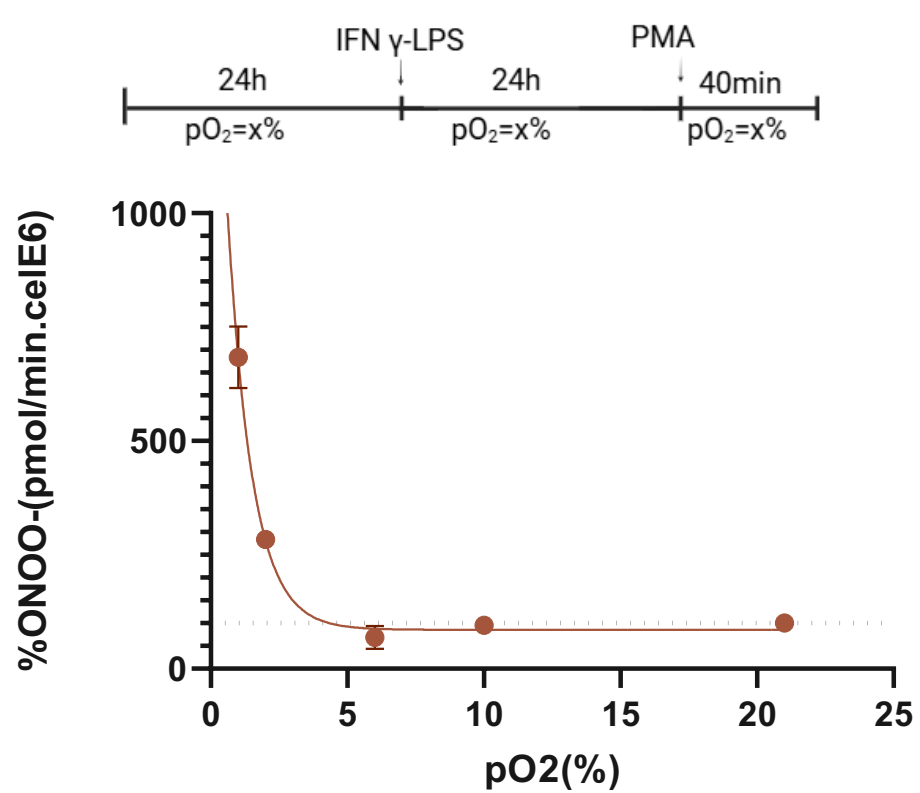
Obj. Esp. 1



Resultados

Obj. Esp. 1

Producción de ONOO^- en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO_2

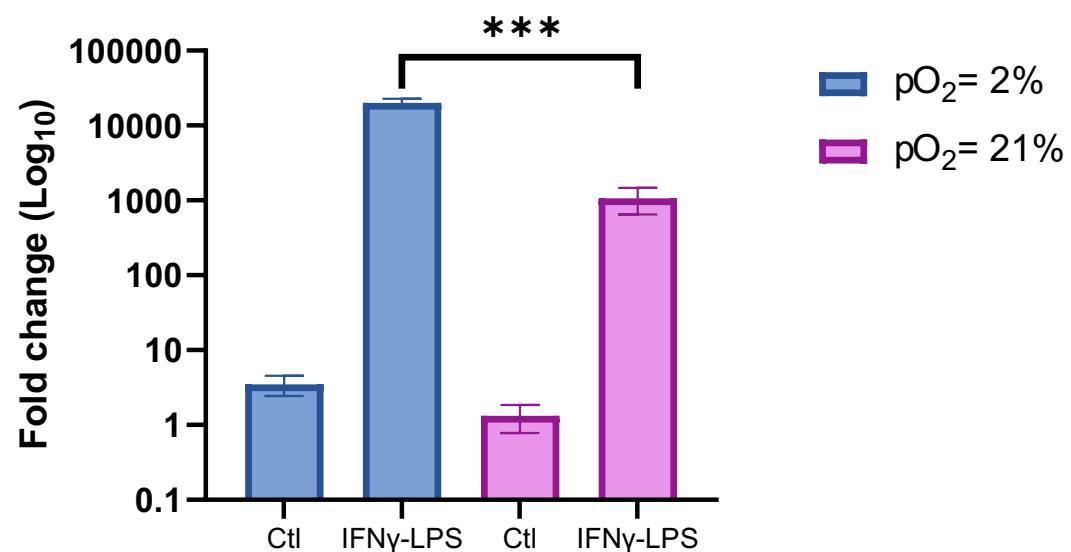
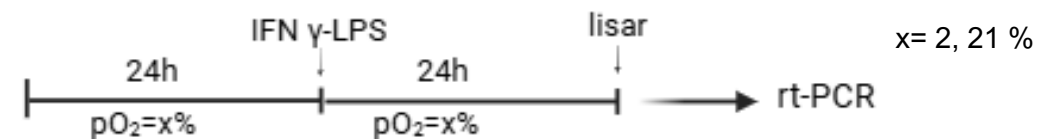


La producción de ONOO^- es mayor a menores pO_2

Resultados

Obj. Esp. 1

Expresión de IL-1 β en macrófagos J774-A1 adaptados a pO₂ de 2% y 21%

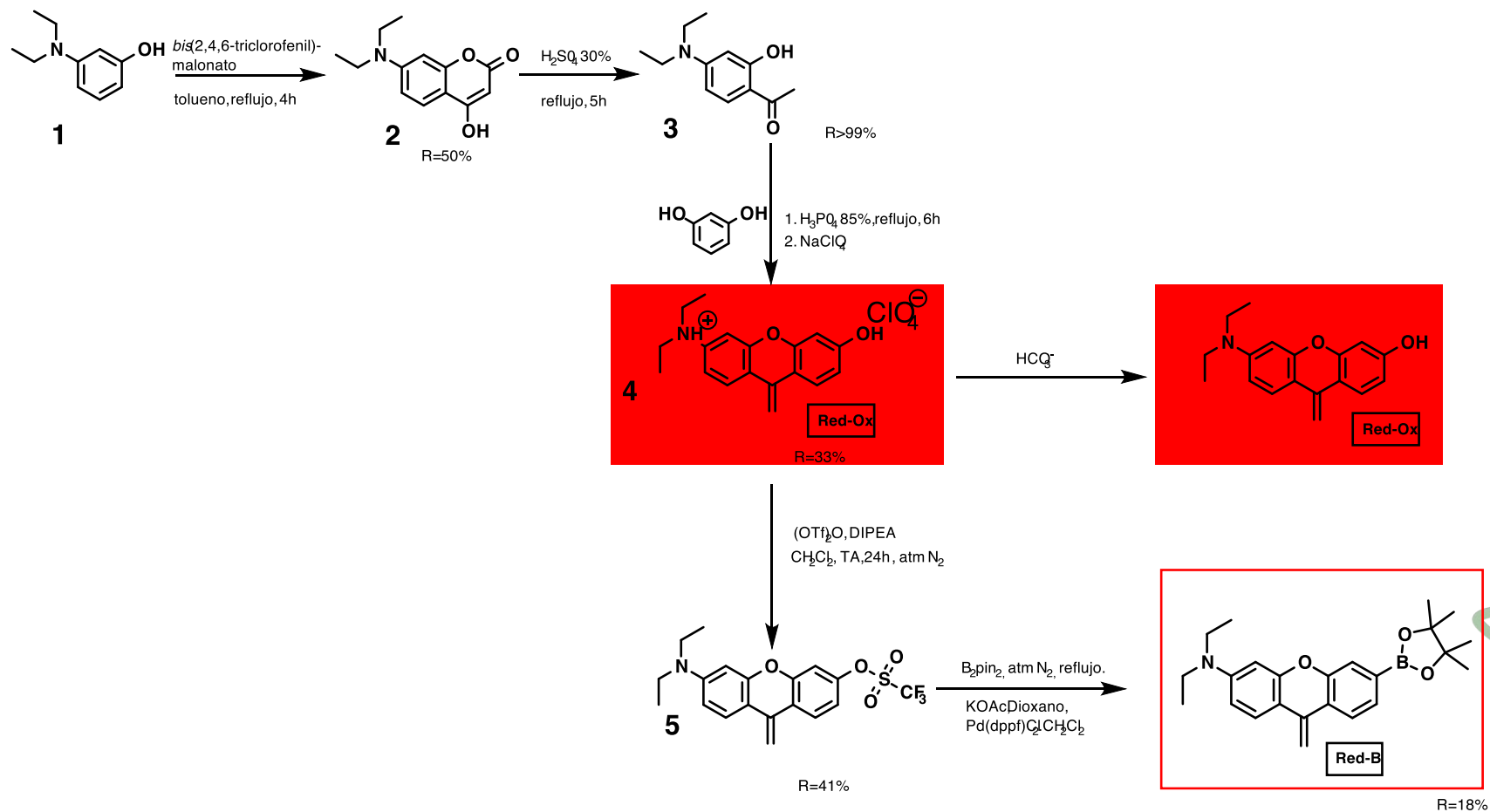


La expresión de IL-1 β aumenta de forma significativa en macrófagos activados adaptados 2% de pO₂ comparado con los activados a 21%

Resultados

Obj. Esp. 2

Ruta sintética de Red-B

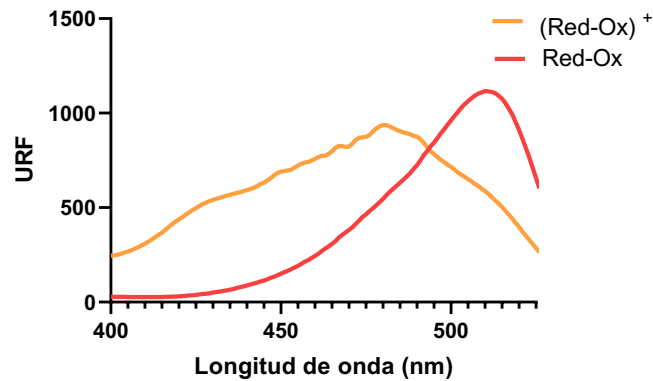


Resultados

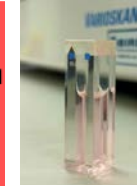
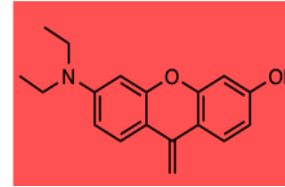
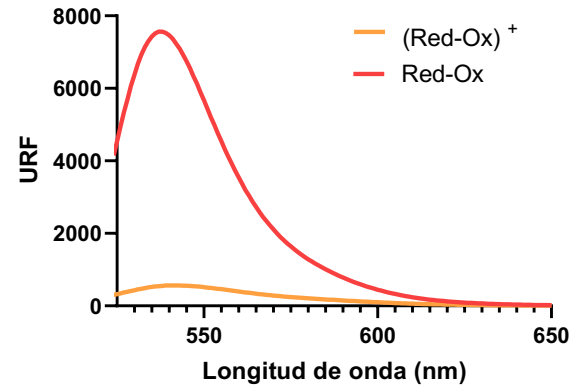
Obj. Esp. 2

Caracterización de Red-Ox

Espectro de excitación



Espectro de emisión

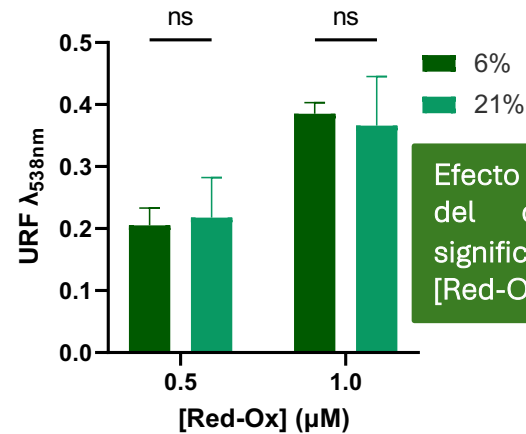
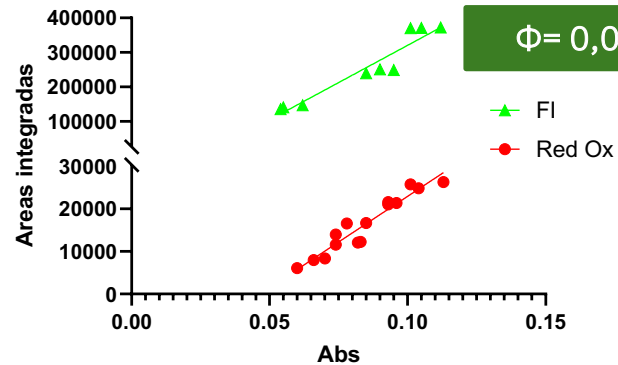


Red-Ox
pH= 7,4

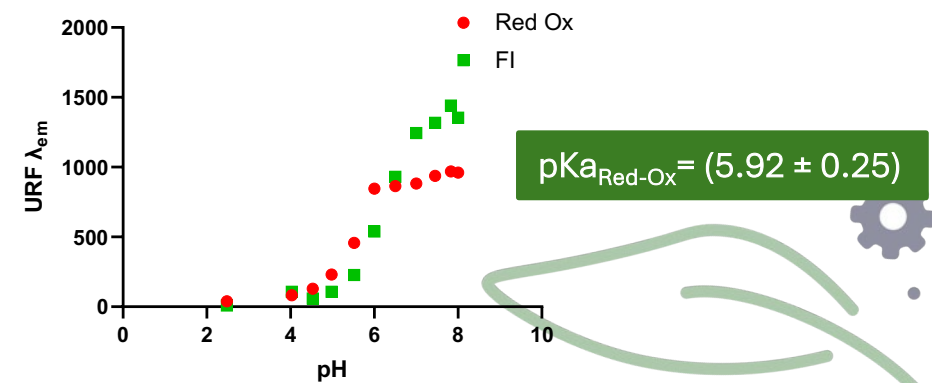


(Red-Ox)⁺
pH= 2,1

	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
(Red-Ox) ⁺	490	538
Red-Ox	511	538



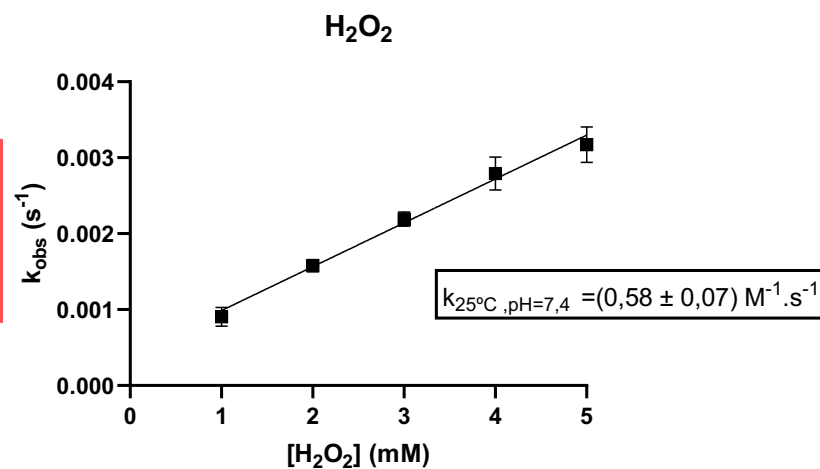
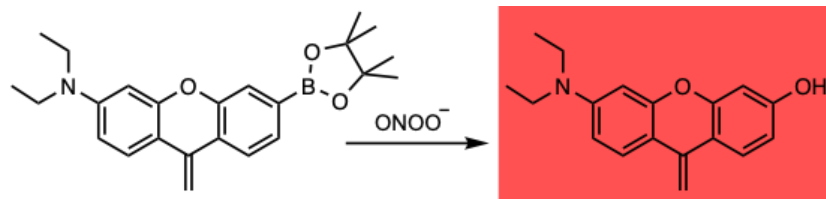
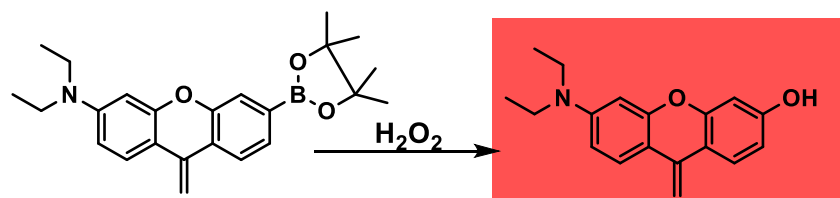
Efecto quenching
del oxígeno no
significativo en
[Red-Ox] < 1 μM



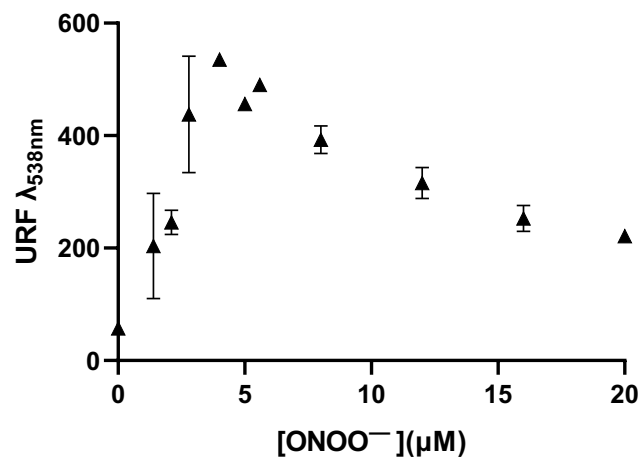
Resultados

Obj. Esp. 2

Caracterización de Red-B




Cinética de segundo orden para la reacción con H_2O_2



Dependencia de la reacción con la concentración de peroxinitrito



Conclusiones parciales y perspectivas

- La expresión de iNOS aumenta durante la adaptación de macrófagos a bajas pO_2 .
 - El aumento de iNOS genera que el flujo de $\bullet NO$ sea similar en todas las pO_2 estudiadas a pesar de la variación de sustrato (O_2).
 - La producción de peroxinitrito no sigue la tendencia de lo observado para la $\bullet NO$.
 - Red-B fue sintetizada en 6 pasos y presenta propiedades óptimas para la futura detección de peroxinitrito en este trabajo.
- El efecto del O_2 en la expresión de NOX-2, su regulación y la producción de superóxido.
 - Influencia del oxígeno sobre los sistemas antioxidantes del macrófago.
 - Calcular la constante de la reacción de Red-B con peroxinitrito y validar la sonda para su uso en este trabajo.
- 

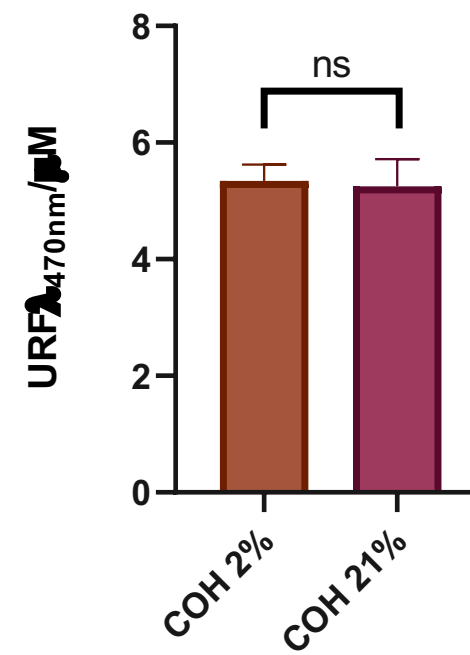
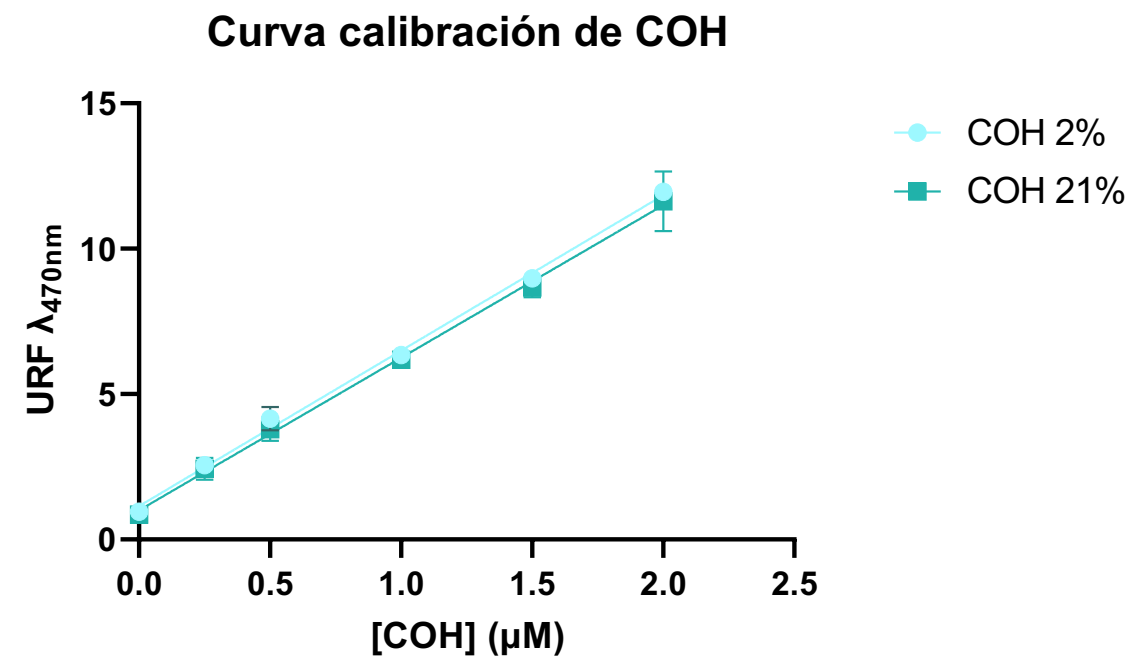
Agradecimientos

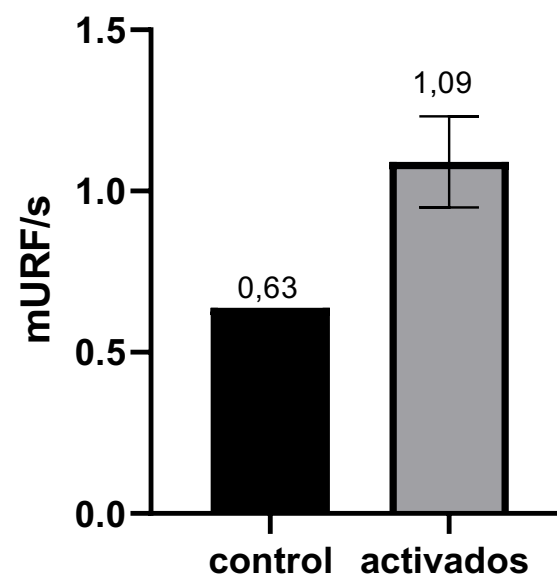
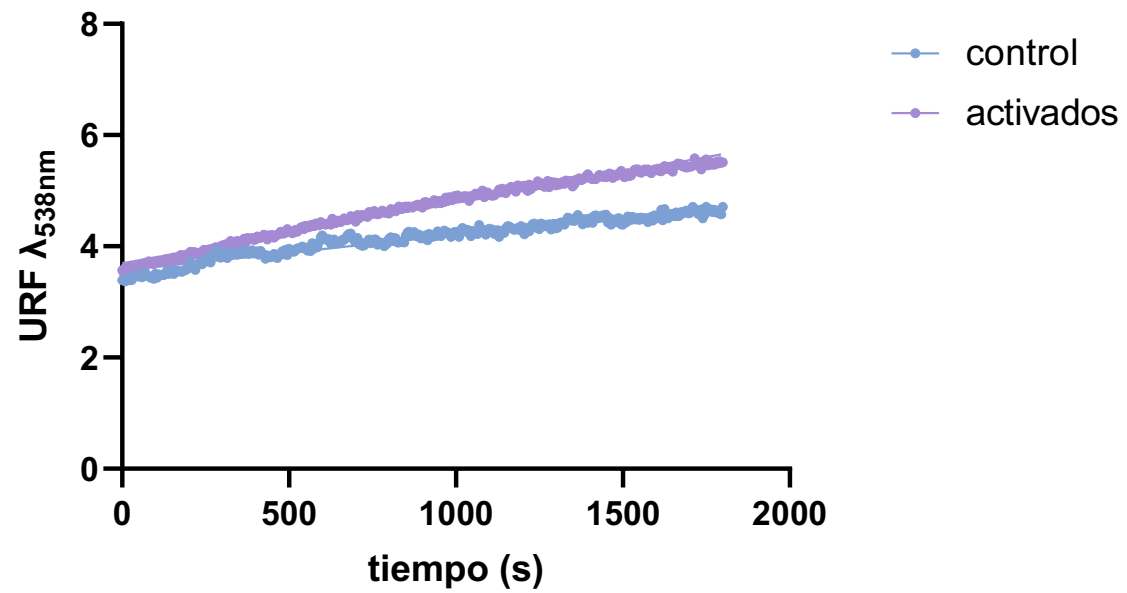


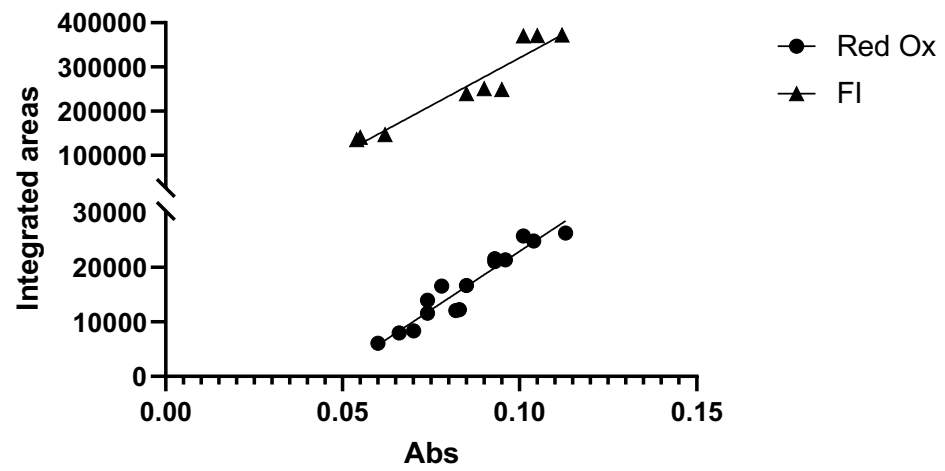


¡Muchas gracias!









$$Q_s = Q_r \left(\frac{A_r}{A_s} \right) \left(\frac{E_s}{E_r} \right) \left(\frac{n_s}{n_r} \right)^2 \quad (2)$$

$$Q_s = Q_r \left(\frac{m_s}{m_r} \right) \left(\frac{n_s}{n_r} \right)^2 \quad (3)$$