



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

Estudiante: Josefina Pereyra Domenech

Directora académica: Dra. Carolina Prolo

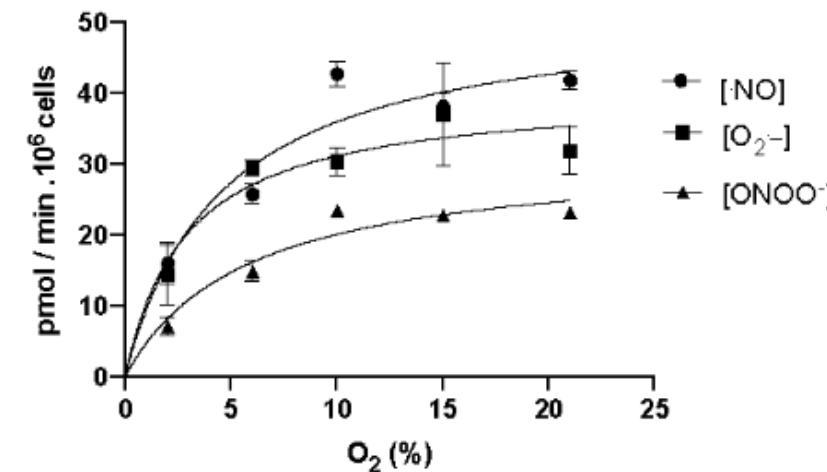
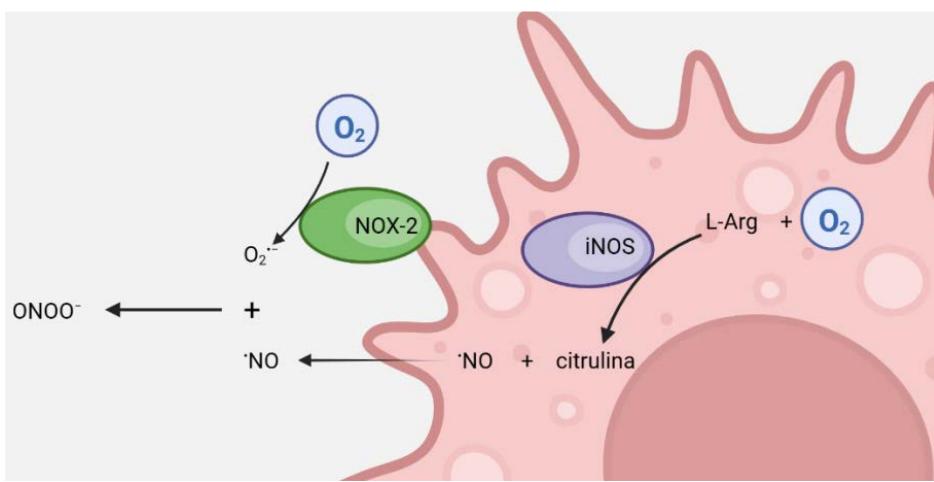
Co-Directora: Dra. Natalia Rios

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

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



Antecedentes



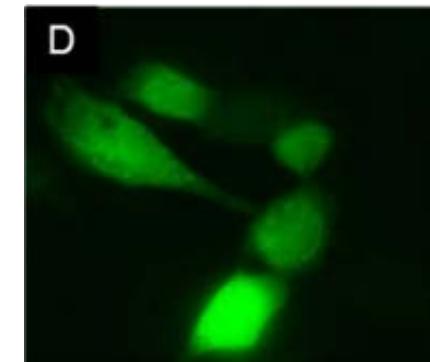
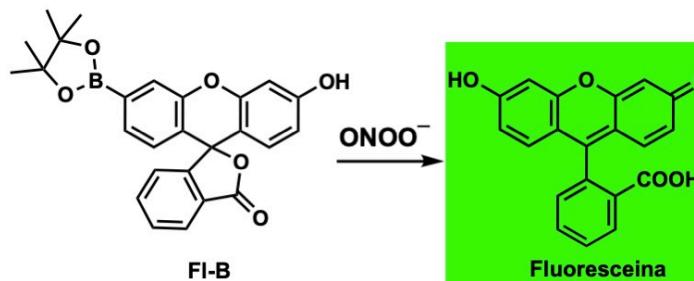
Producción de O_2^- , $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- a distintas concentraciones de oxígeno, en un tiempo de exposición de 20 minutos.

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 ⁻	$(1,30 \pm 0,60) \times 10^6$	$(1,70 \pm 0,05) \times 10^6$
H ₂ O ₂	$1,47 \pm 0,56$	$1,70 \pm 0,20$

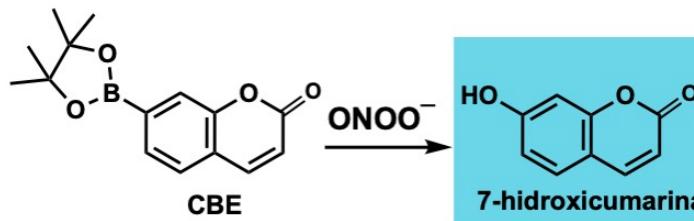


Tabla 8. Comparación de λ_{exc} y λ_{em} máximas de los diferentes fluoróforos obtenidos.

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 O₂ en la respuesta oxidativa de macrófagos.

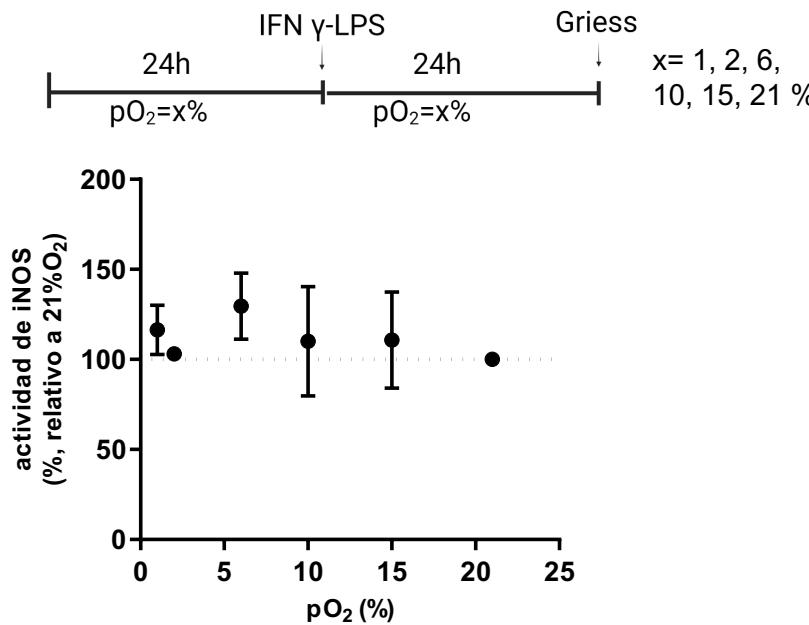
OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Determinar el efecto de la concentración de O₂ en la modulación de la expresión y actividad de iNOS responsable de la producción de •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*.
- 

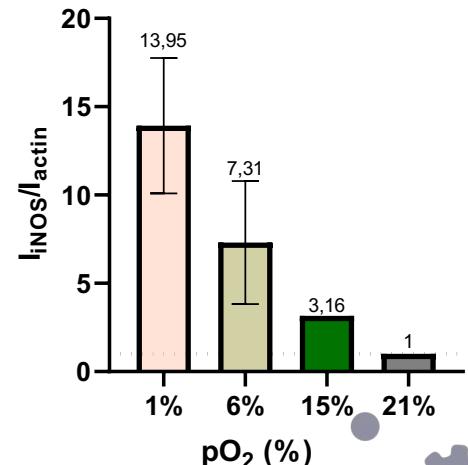
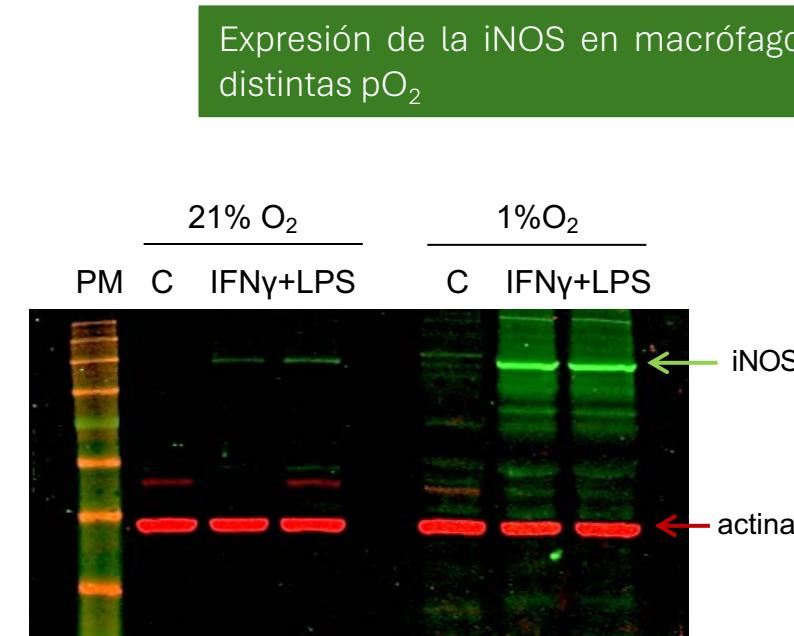
Resultados

Obj. Esp. 1

Actividad de la iNOS en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO₂



Expresión de la iNOS en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO₂

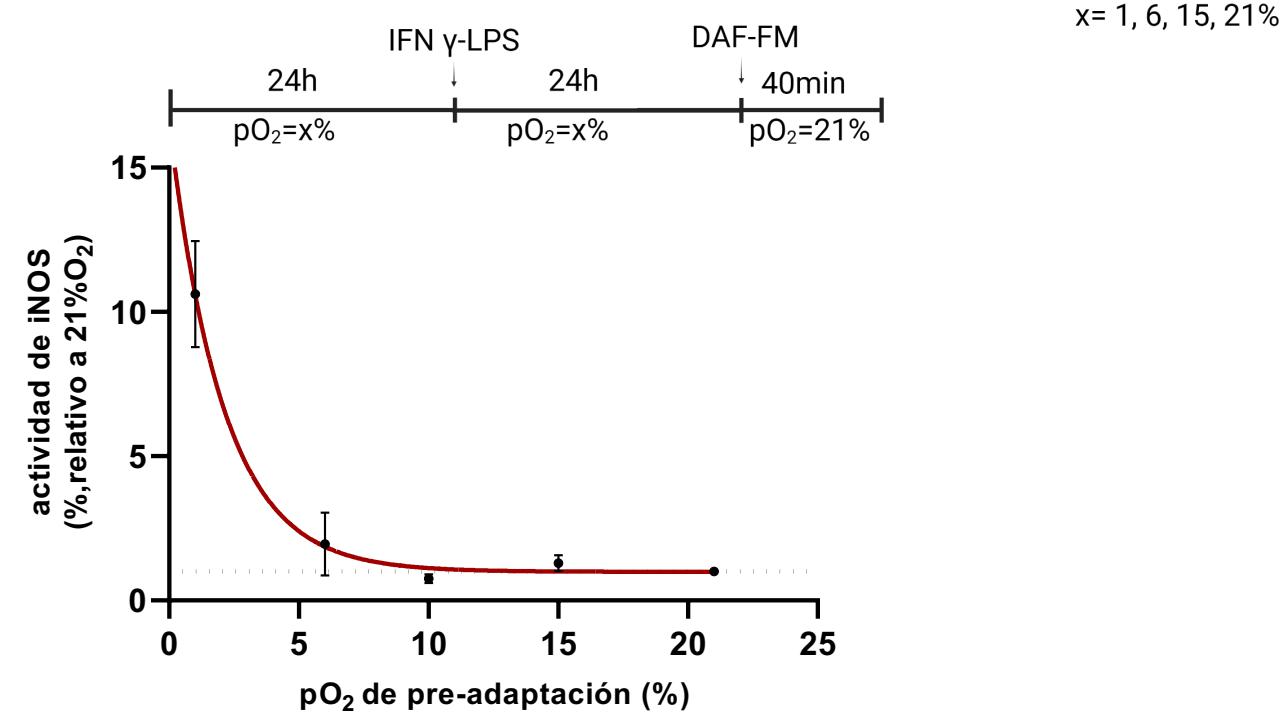


El aumento en la expresión de la iNOS compensa la falta de sustrato (O₂).

Obj. Esp. 1

Resultados

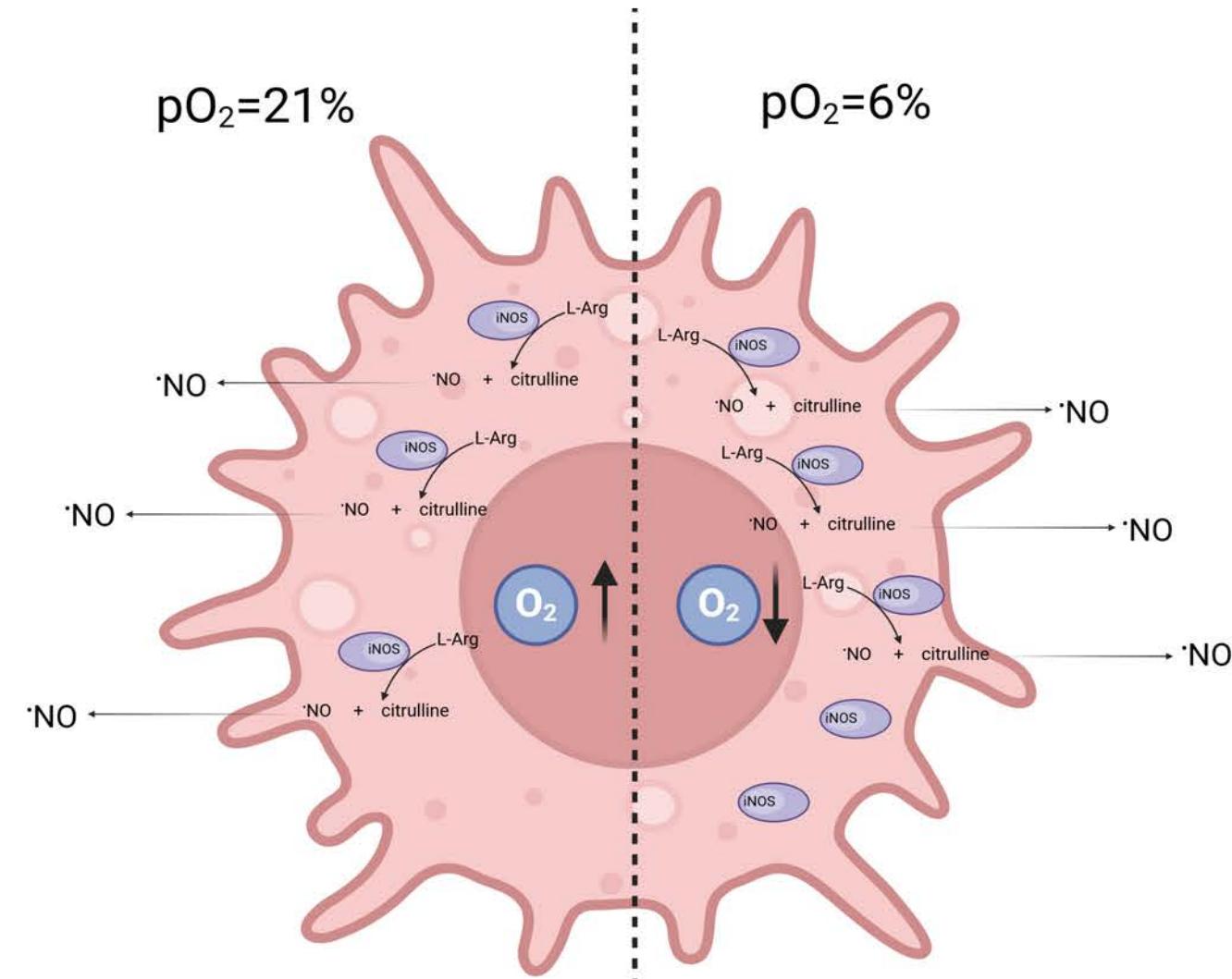
Actividad iNOS medida a 21 % pO₂ en macrófagos pre-adaptados a distintas pO₂



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

Resultados

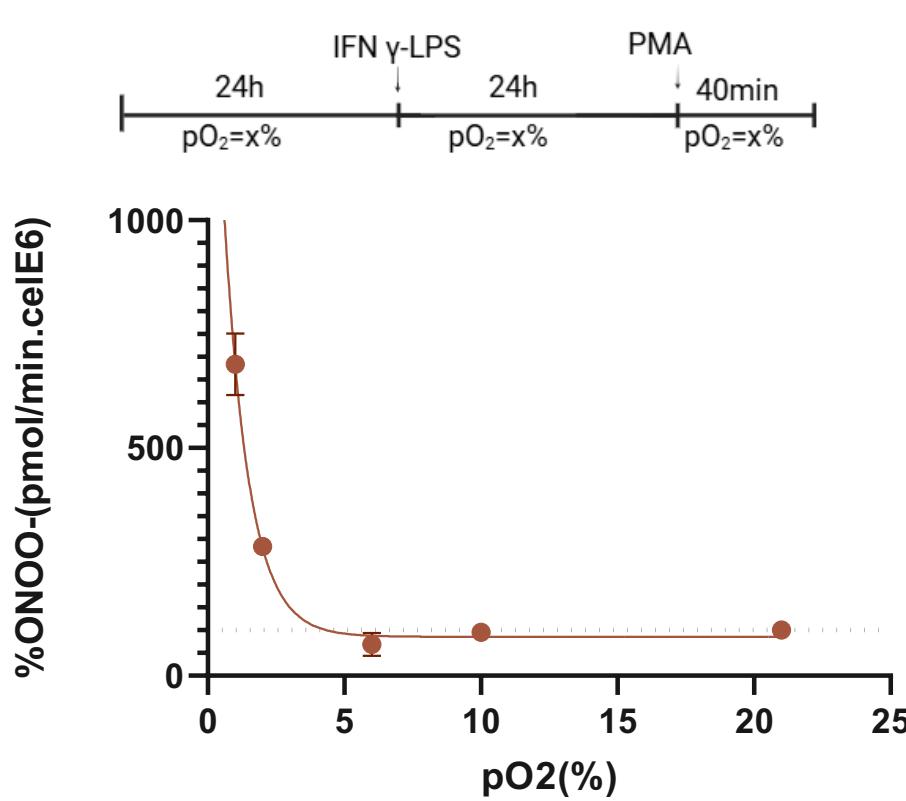
Obj. Esp. 1



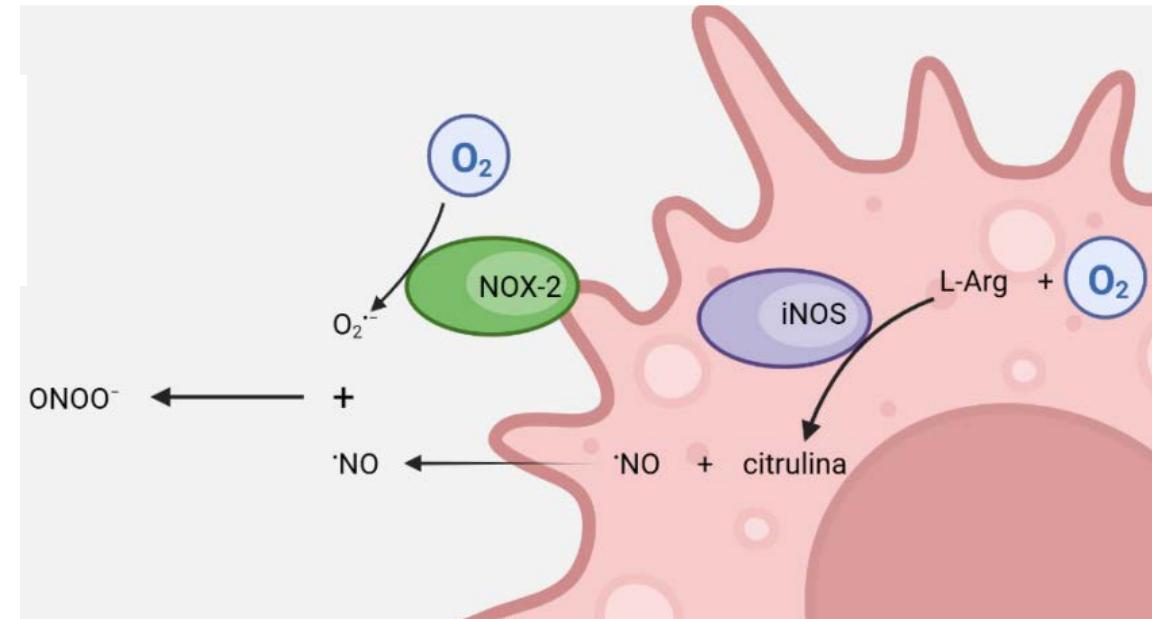
Resultados

Obj. Esp. 1

Producción de ONOO⁻ en macrófagos J774-A1 adaptados a distintas pO₂



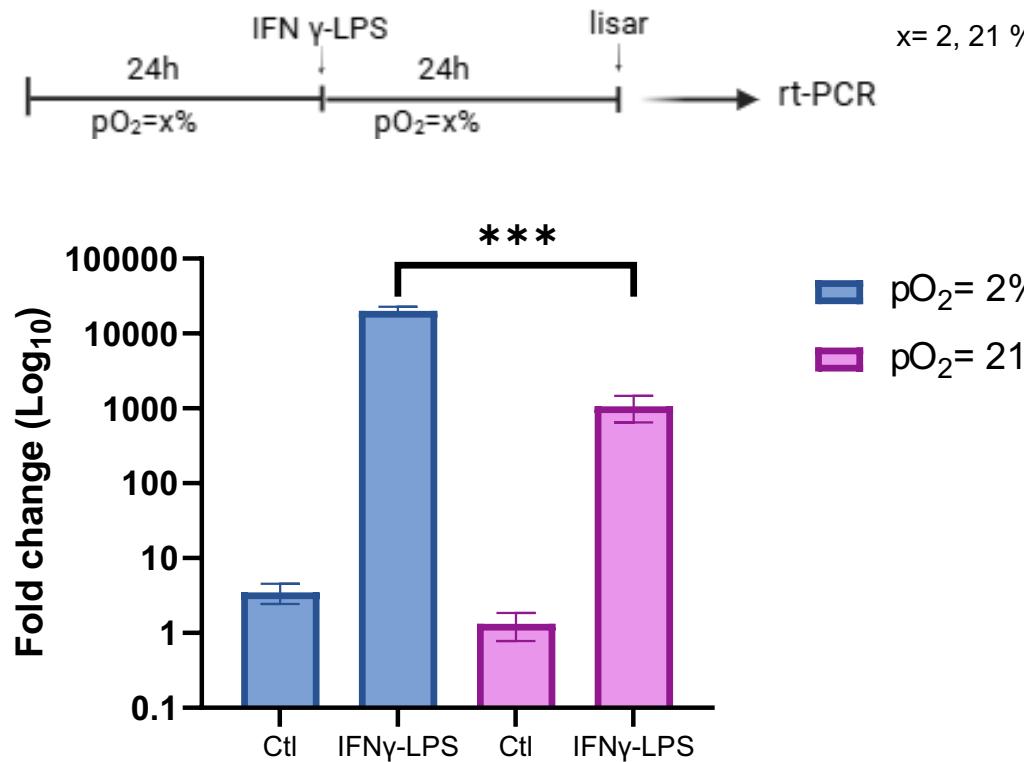
La producción de ONOO⁻ es mayor a menores pO₂



Resultados

Obj. Esp. 1

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

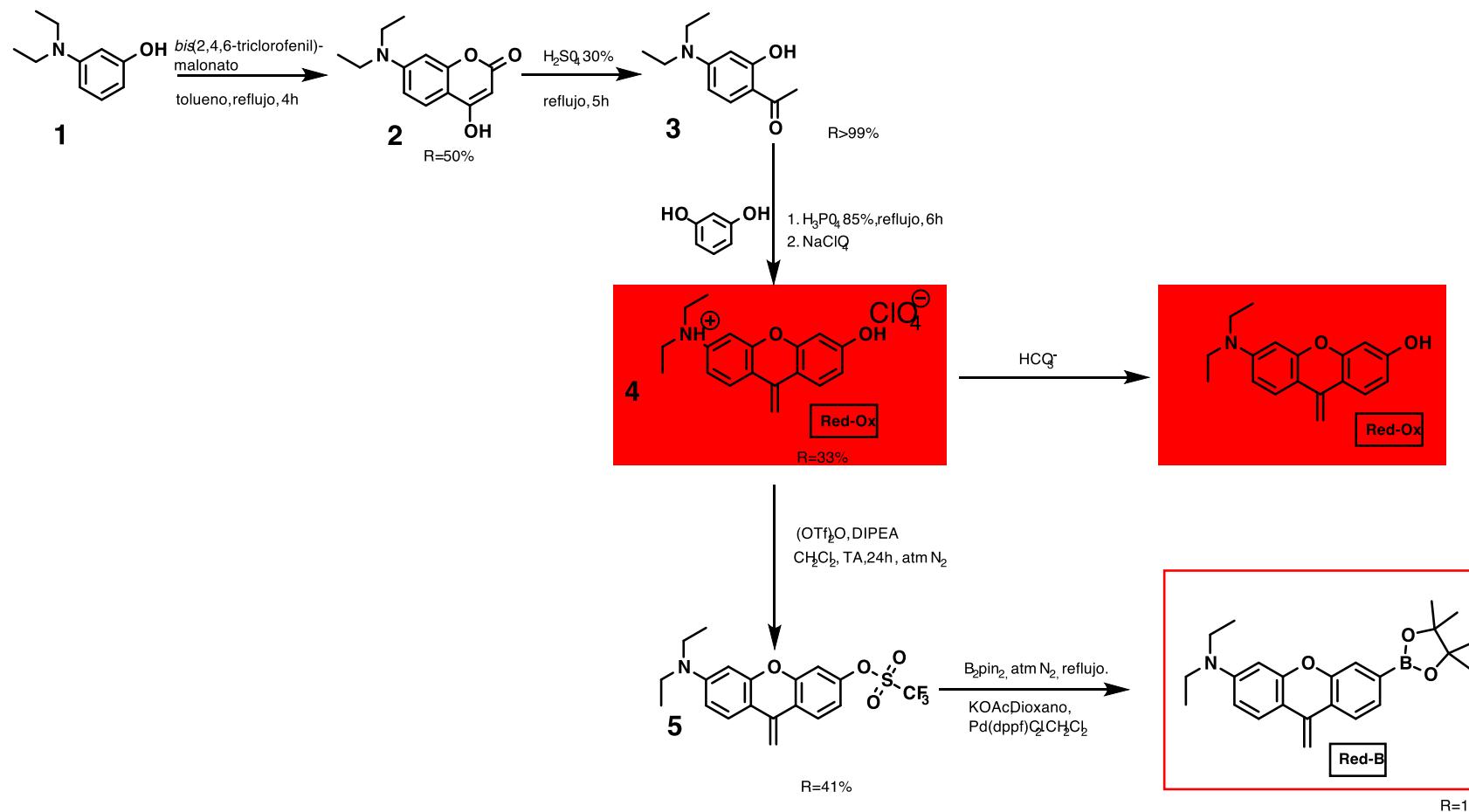


La expresión de IL-1 β aumenta de forma significativa en macrófagos activados adaptados 2% de pO₂ comparado con los activados a 21%

Resultados

Obj. Esp. 2

Ruta sintética de Red-B

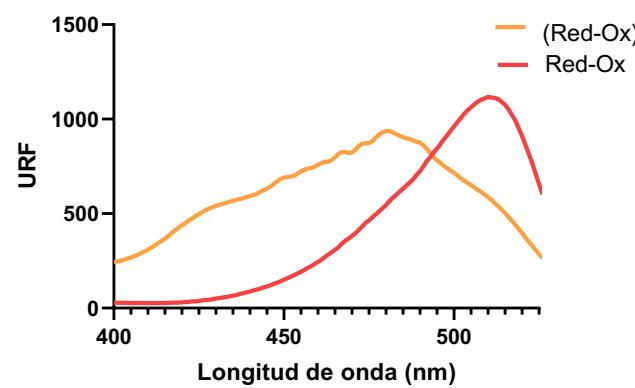


Resultados

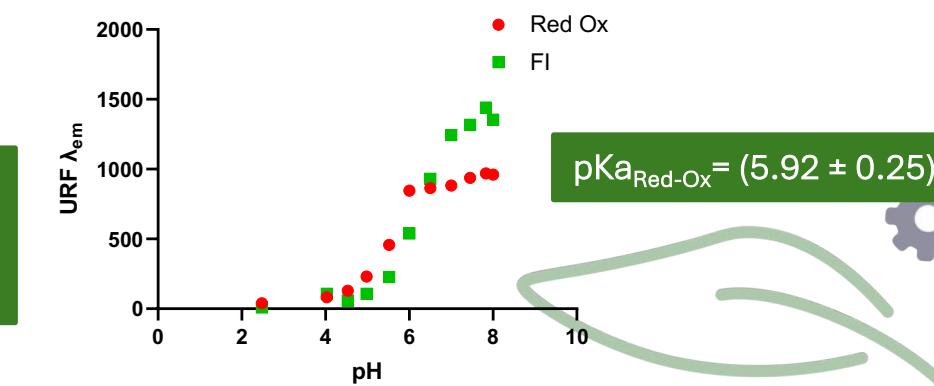
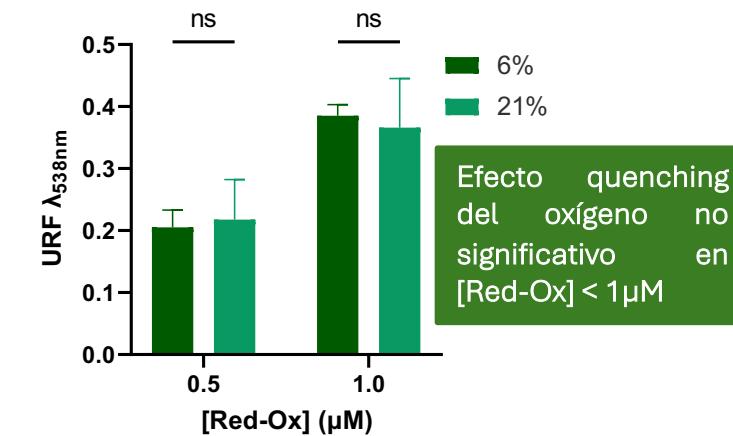
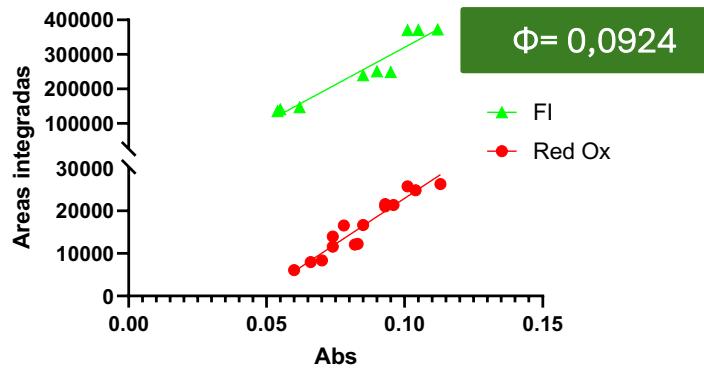
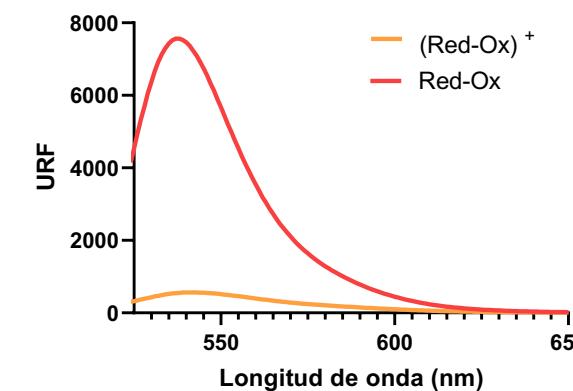
Obj. Esp. 2

Caracterización de Red-Ox

Espectro de excitación



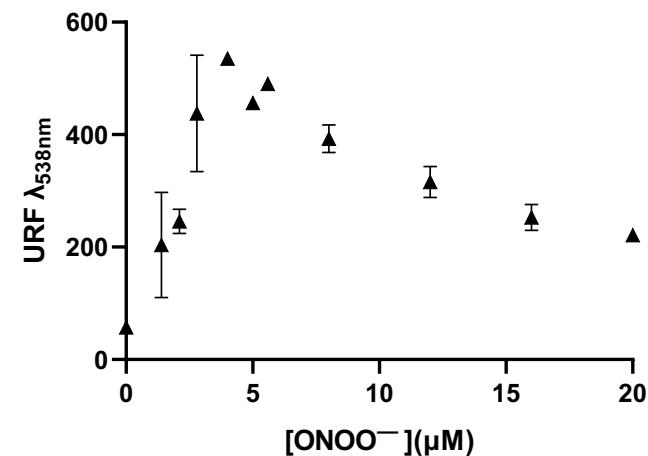
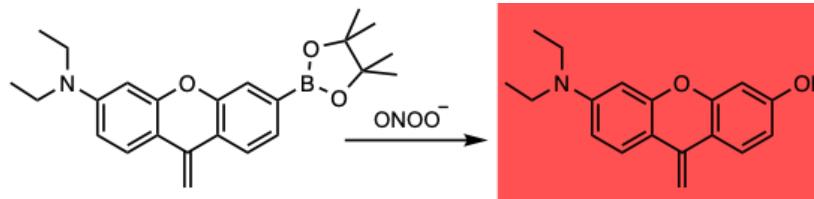
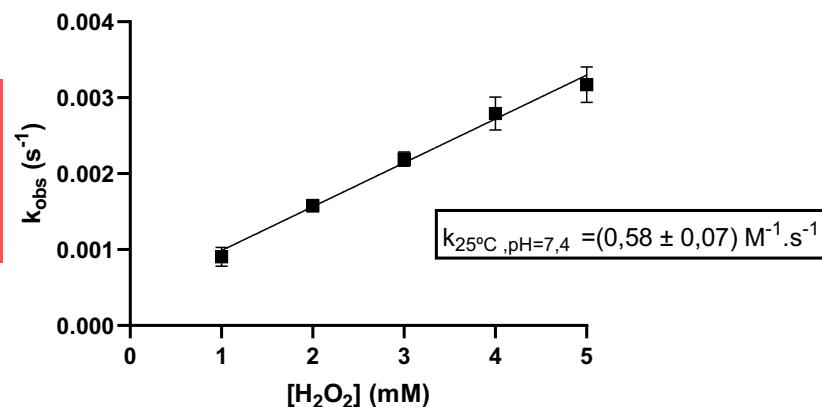
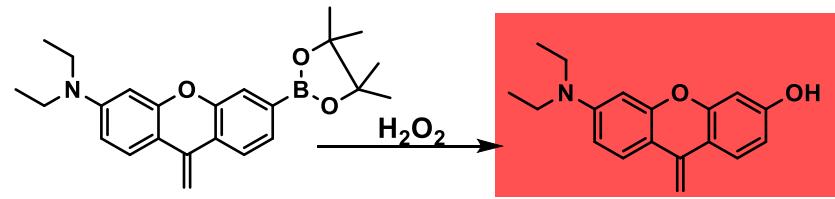
Espectro de emisión



Resultados

Obj. Esp. 2

Caracterización de Red-B



Dependencia de la reacción con la concentración de peroxinitrito

Cinética de segundo orden para la reacción con H_2O_2



Conclusiones parciales y perspectivas

- La expresión de iNOS aumenta durante la adaptación de macrófagos a bajas pO₂.
- El aumento de iNOS genera que el flujo de •NO sea similar en todas las pO₂ estudiadas a pesar de la variación de sustrato (O₂).
- La producción de peroxinitrito no sigue la tendencia de lo observado para la •NO.
- Red-B fue sintetizada en 6 pasos y presenta propiedades óptimas para la futura detección de peroxinitrito en este trabajo.

- 
- El efecto del O₂ 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.

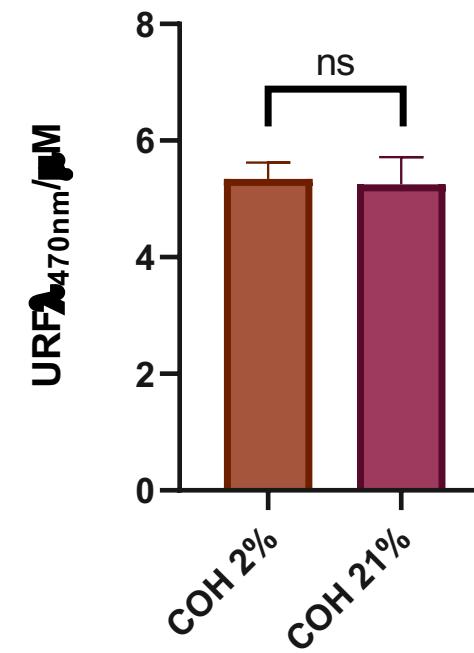
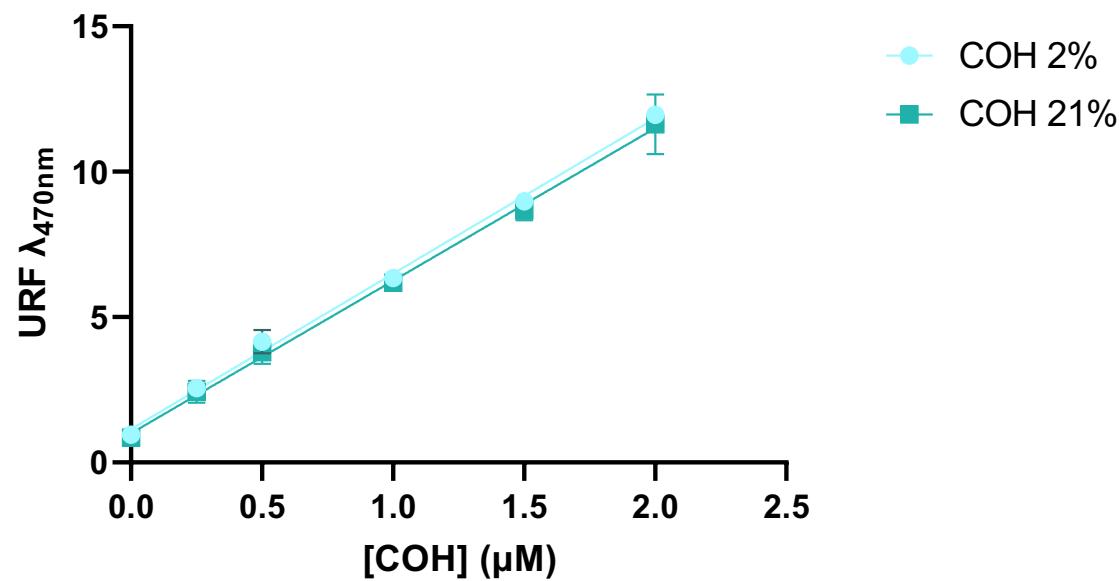


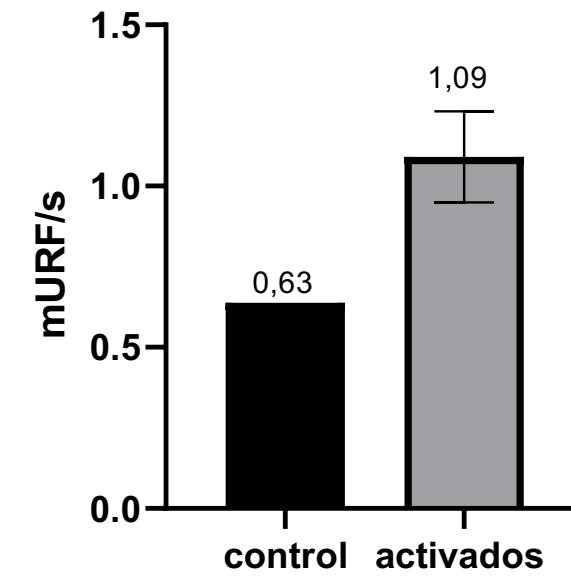
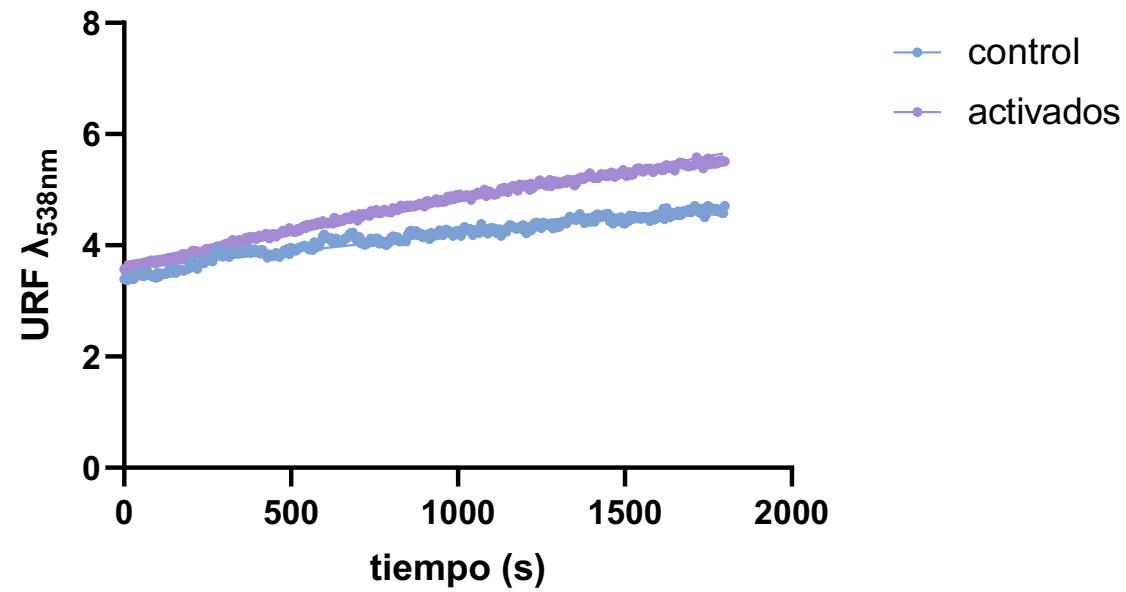
Agradecimientos

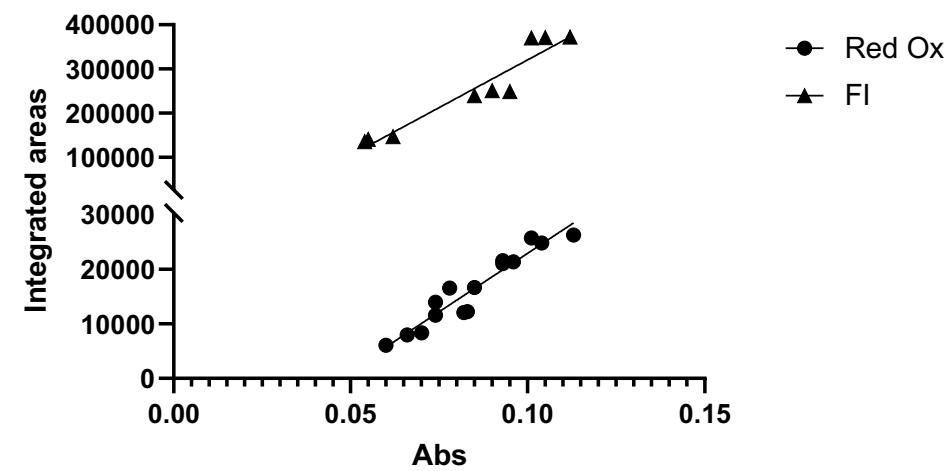


¡Muchas gracias!

Curva calibración de COH







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

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