

Estudio del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos

Pereyra Domenech, J^{1,2}; Rios, N^{1,2}; Alvarez, M. N^{2,3}; Radi, R^{1,2}; Prolo, C^{1,2}

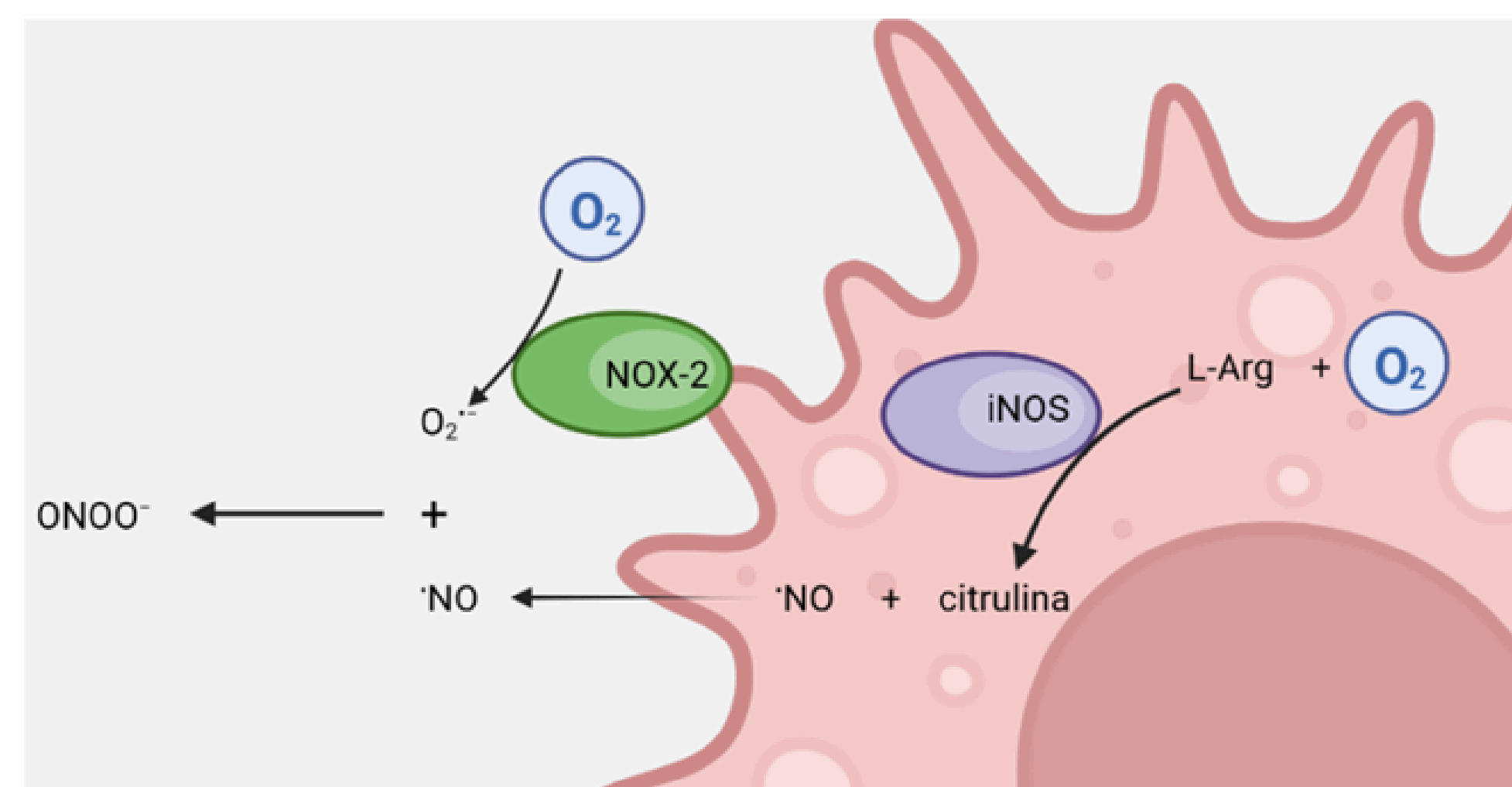
¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar

² Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Udelar.

³ Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, Udelar.

1 Introducción

Dentro de la respuesta oxidativa de los macrófagos, la producción de especies oxidantes es dependiente del oxígeno. Estas células cuentan con la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la NADPH oxidasa 2 (NOX-2), capaces de sintetizar óxido nítrico (NO) y superóxido ($O_2^{\cdot-}$), respectivamente. Ambas especies son altamente reactivas y capaces de modificar distintas biomoléculas de forma directa o a partir de la formación de derivados como el peroxinitrito ($ONOO^-$). Al ser mecanismos dependientes de O_2 como sustrato, es importante considerar como el microambiente celular. En este trabajo se evalúa el rol del oxígeno en la respuesta oxidativa de macrófagos adaptados 48hs a un rango de presiones de oxígeno (pO_2) entre 1-21%. Además se planteó el desarrollo de tres nuevas sondas derivadas de boronatos (Red-BI, Red-BII y Red-BIII) para la cuantificación selectiva de peroxinitrito con reactividad similar a las comúnmente utilizadas pero con mayor estabilidad a los cambios en el microambiente celular.



2 Objetivo General

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

3 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la exposición prolongada a distintas pO_2 en la expresión y actividad de iNOS y NOX-2 responsables de la producción de NO y $O_2^{\cdot-}$, y el oxidante derivado $ONOO^-$.
- Sintetizar y caracterizar un nuevo grupo de sondas denominadas Red-B, derivadas de xanteno para la detección de peroxinitrito en las distintas condiciones experimentales *in cellula*.

4 Resultados

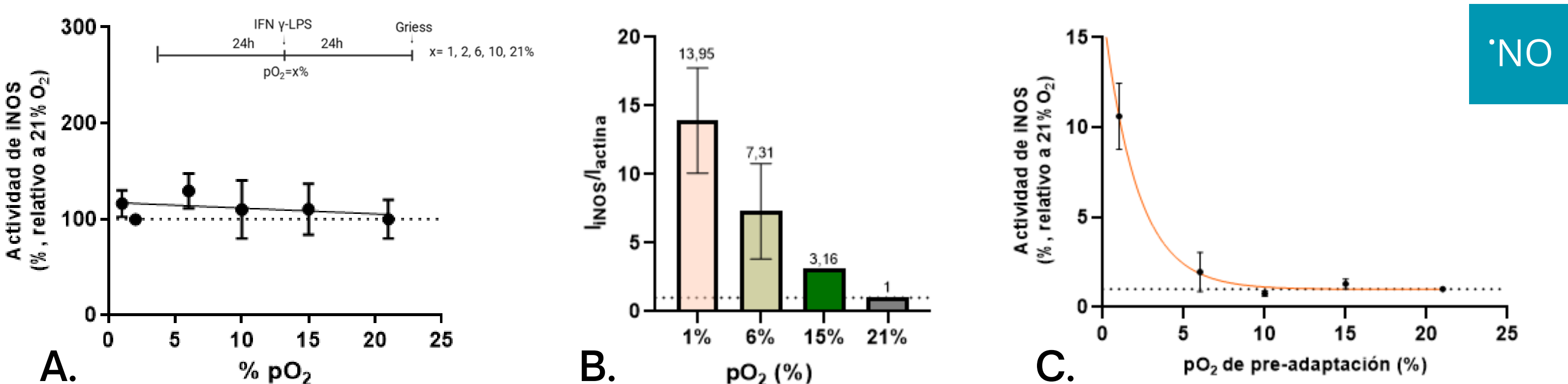


Figura 1: Efecto del oxígeno sobre la iNOS y producción de NO. Macrófagos murinos J774A-1 fueron cultivados a distintas pO_2 (1, 2, 6, 10, 15 y 21%) por 48hs e inmunestimados a las 24hs con IFN- γ y LPS para inducir la expresión de la iNOS. A. Producción de NO medido por ensayo de Griess a las 48hs. B. Expresión de iNOS luego de 48hs relativizado a la condición a 21% de pO_2 . C. Prueba de concepto: actividad de la iNOS luego de re-exposición a 21% en los macrófagos pre-adaptados a distintas pO_2 .

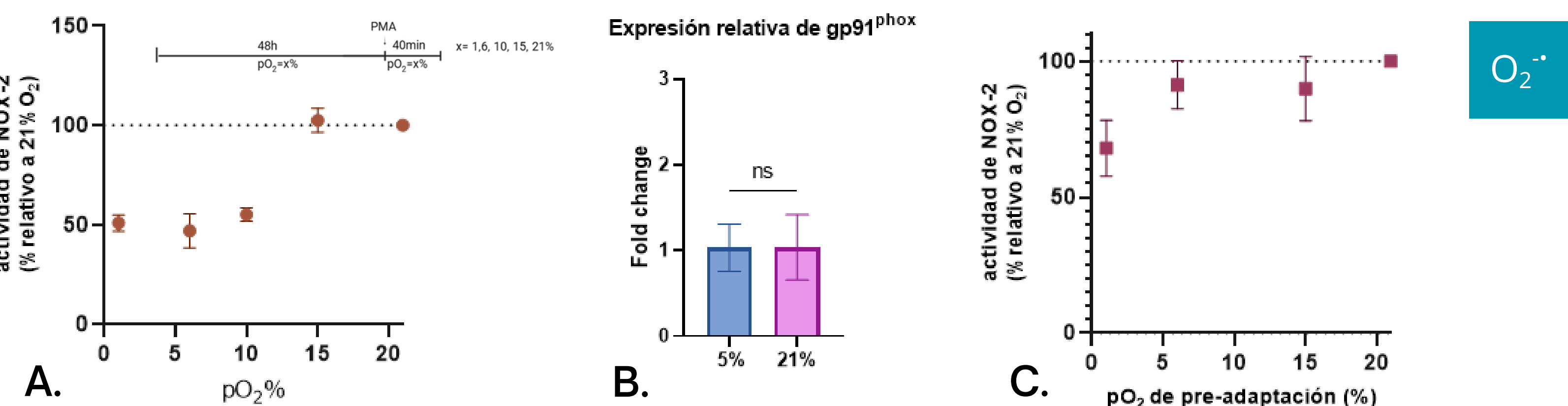


Figura 2: Efecto del oxígeno sobre la Nox-2 y producción de $O_2^{\cdot-}$. Macrófagos murinos J774A-1 fueron cultivados a distintas pO_2 (1, 6, 10, 15 y 21%) por 48hs e estimulados por 40 min con PMA inducir el ensamblaje de la Nox-2. A. Producción de $O_2^{\cdot-}$ medido con Amplex Red. B. Expresión de subunidad gp91^{phox} de Nox-2 por RT-PCR normalizado contra el gen constitutivo de actina, en macrófagos luego de 48hs a 5% pO_2 . Se expresa relativizado a la condición a 21% de pO_2 . C. Prueba de concepto: actividad de la Nox-2 luego de re-exposición a 21% en los macrófagos pre-adaptados a distintas pO_2 .

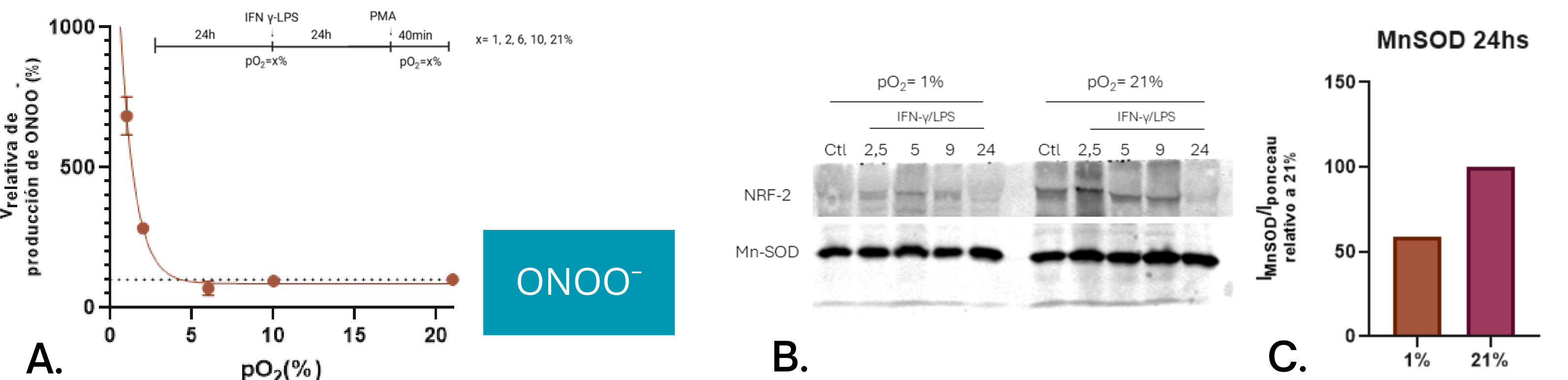


Figura 3: Efecto del oxígeno sobre la producción de $ONOO^-$. A. Producción de $ONOO^-$ en macrófagos murinos J774A-1 fueron cultivados a distintas pO_2 (1, 2, 6, 10, 15 y 21%) por 48hs, inmunestimados a las 24hs con IFN- γ y LPS para inducir la expresión de la iNOS y PMA para el ensamblaje de la Nox-2. B. Expresión de MnSOD y NRF-2 en macrófagos expuestos a una pO_2 1% y 21% e inmunestimados por 2,5, 5, 9 y 24hs. C. Expresión relativa de MnSOD luego de 48hs relativizado a la condición a 21% de pO_2 .

6 Conclusiones

- La expresión de iNOS aumenta durante la adaptación de macrófagos a bajas pO_2 de manera compensatoria a la disminución de sustrato de sustrato (O_2).
- La producción de superóxido disminuye al disminuir la pO_2 .
- La producción de peroxinitrito no sigue la tendencia de lo observado para la NO ni para $O_2^{\cdot-}$.
- La adaptación de los macrófagos a bajas pO_2 se asocia con una disminución de la expresión de Mn-SOD y NRF-2 como parte de mecanismos antioxidantes.
- Red-BI fue sintetizada en 6 pasos y presenta propiedades óptimas para la futura detección de peroxinitrito en este trabajo.

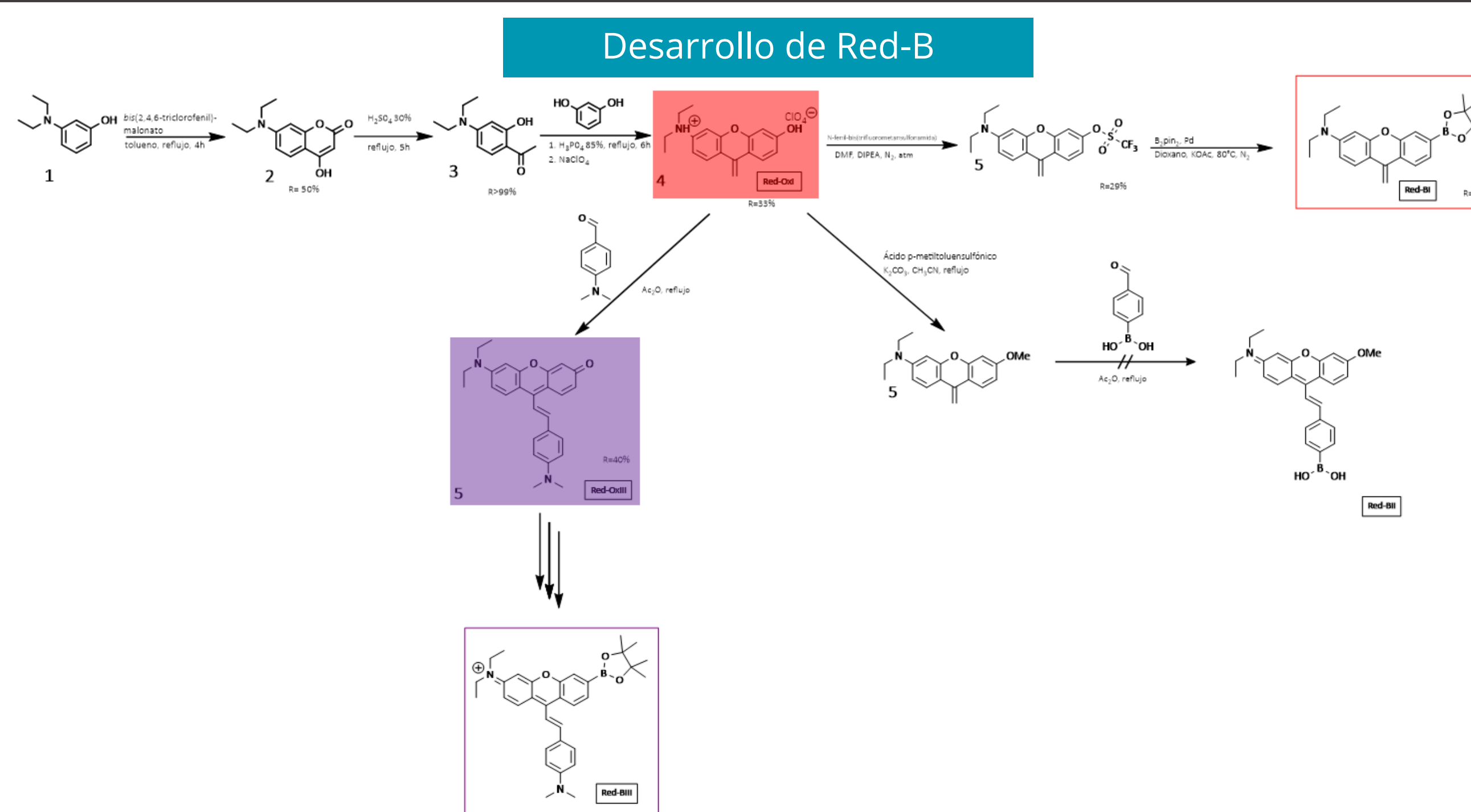


Figura 5: Ruta de síntesis de sondas Red-B.

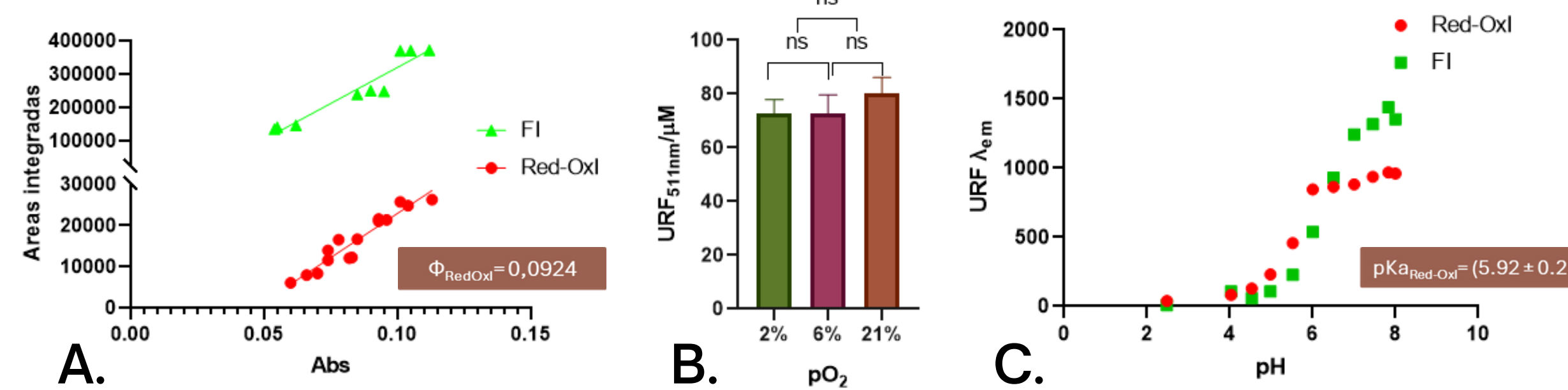


Figura 6: Caracterización del fluoróforo Red-OxI. A. Cálculo del rendimiento cuántico (Φ) teniendo como referencia a fluoresceína (FI) a pH 12,5. B. Pendientes (URF/ μM) calculadas a partir de curvas de calibración de Red-OxI (0- 0.33-0.46-0.73-0.96-1.23-2.72 μM) expuestas a distintas pO_2 (1, 6, 21%); λ_{exc} = 511nm; λ_{em} = 538nm. C. Dependencia de la fluorescencia con el pH para los fluoróforos Red-Ox y fluoresceína (FI).

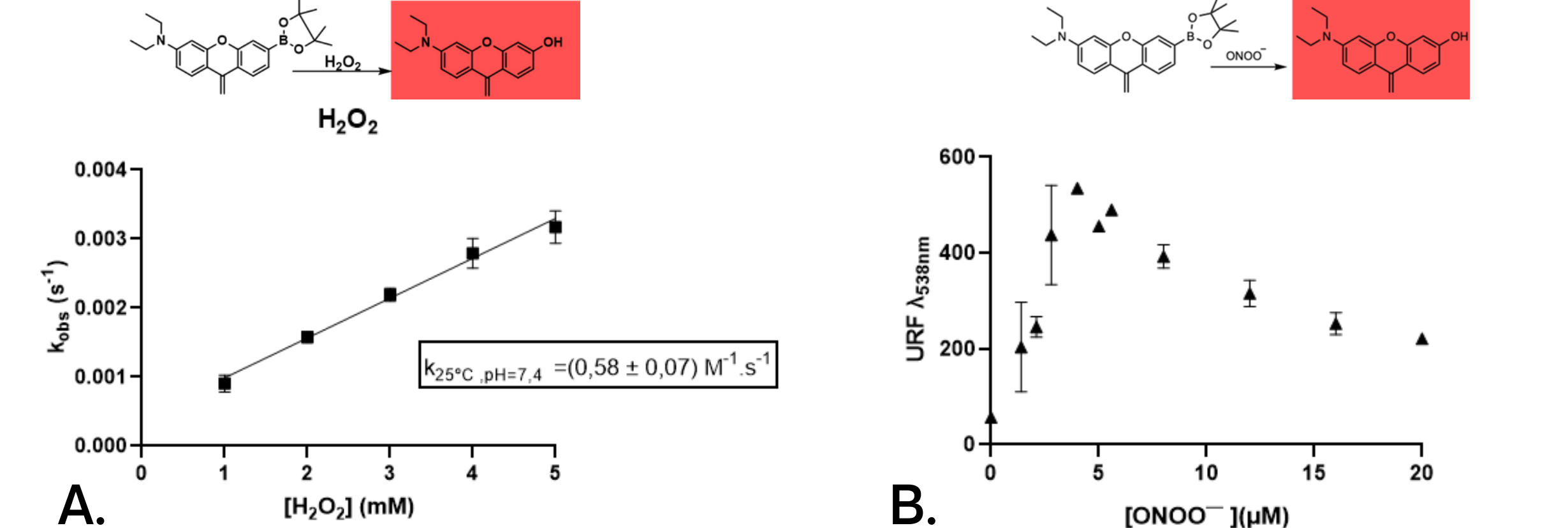


Figura 7: Reacción de Red-BI con distintos oxidantes. A. Reacción de Red-BI con H_2O_2 . Efecto de las concentraciones crecientes de H_2O_2 en las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) a 25°C, pH 7,4 y una concentración de Red-BI 50 μM . B. Efecto de la concentración de peroxinitrito sobre la intensidad de fluorescencia resultante de la oxidación de Red-BI (50 μM) a 25°C, pH 7,4.

7 Agradecimientos