

# Estudio del oxígeno como modulador de la respuesta oxidativa de macrófagos

Pereyra Domenech, J<sup>1,2</sup>; Rios, N<sup>1,2</sup>; Alvarez, M. N<sup>2,3</sup>; Radi, R<sup>1,2</sup>; Prolo, C<sup>1,2</sup>

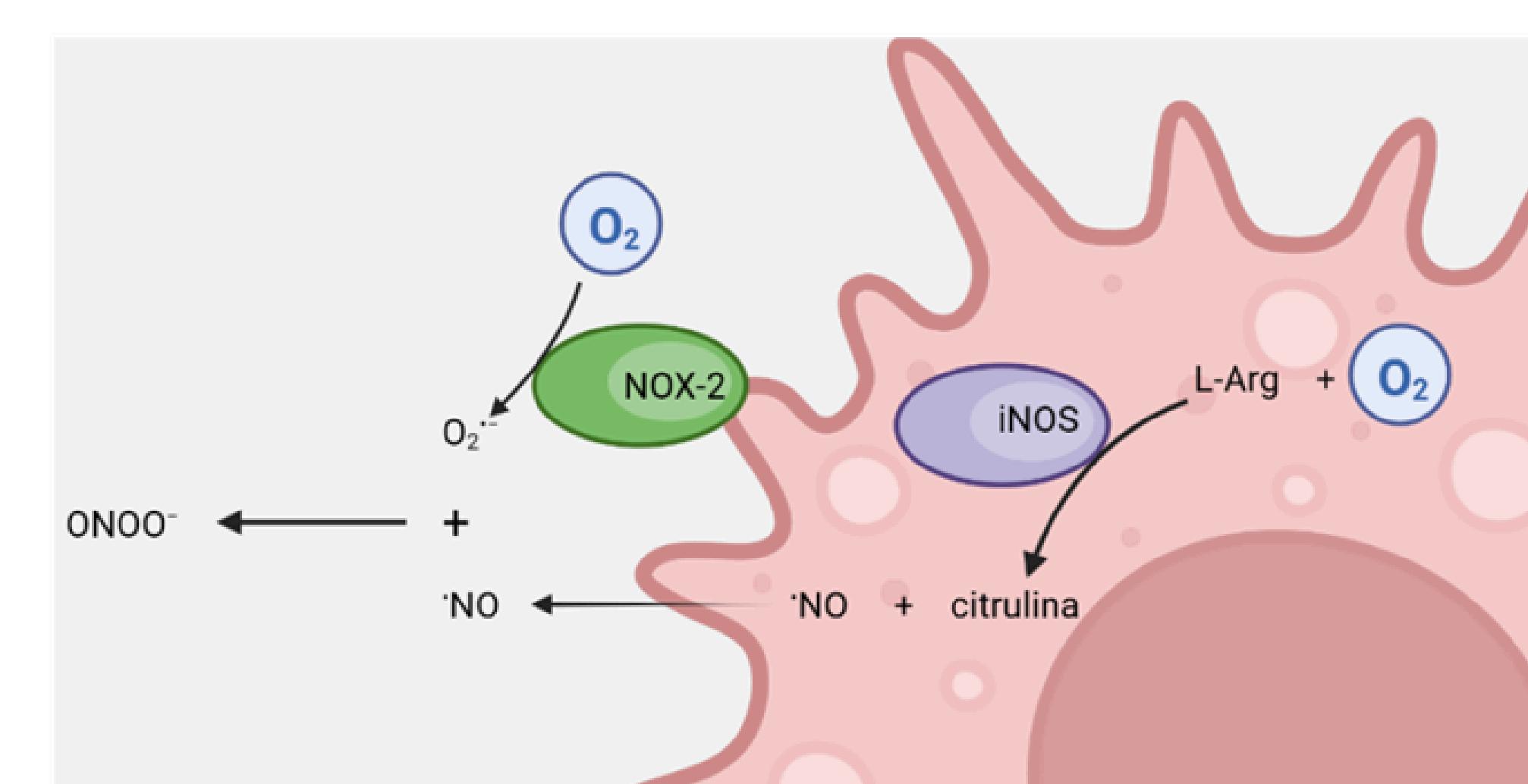
<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Udelar

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Udelar.

<sup>3</sup> 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 ( $O_2^-$ ), 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<sup>-</sup>). 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  $O_2^-$ , y el oxidante derivado ONOO<sup>-</sup>.
- 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

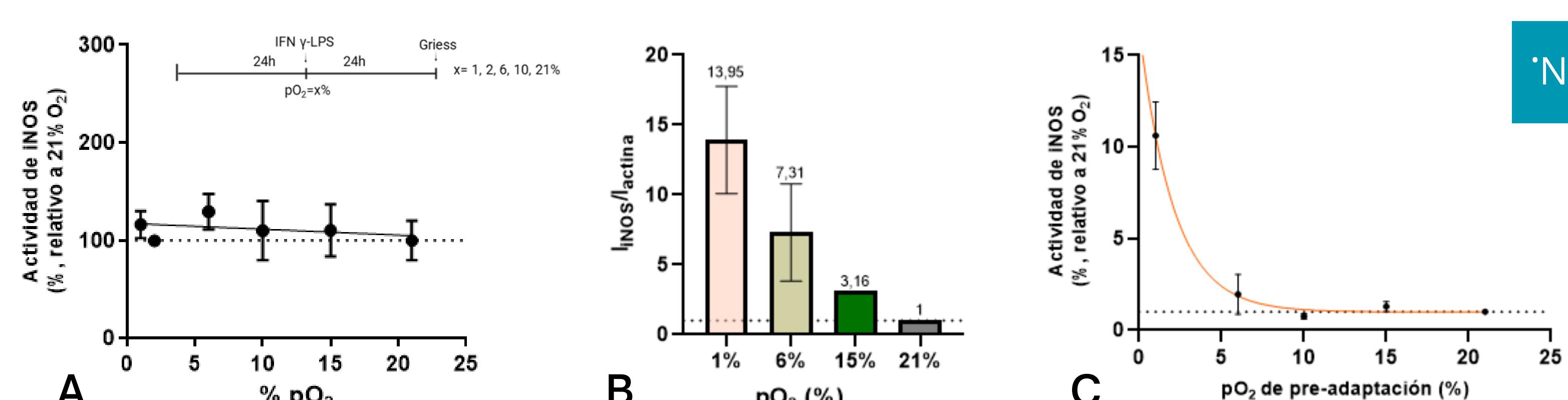


Figura 1: Efecto del oxígeno sobre la iNOS y producción de 'NO. Macrófagos murinos J774A-1 fueron cultivados a distintas  $pO_2$  (1, 2, 6, 10, 15 y 21%) por 48hs e inmunoestimulados a las 24hs con IFN-γ y LPS para inducir la expresión de la iNOS. A. Producción de 'NO medida por ensayo de Griess a las 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  $O_2^-$ . 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  $O_2^-$  medida con Amplex Red. B. Expresión de subunidad gp91<sup>phox</sup> de NOx-2 por RT-PCR normalizada 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  $pO_2$ .

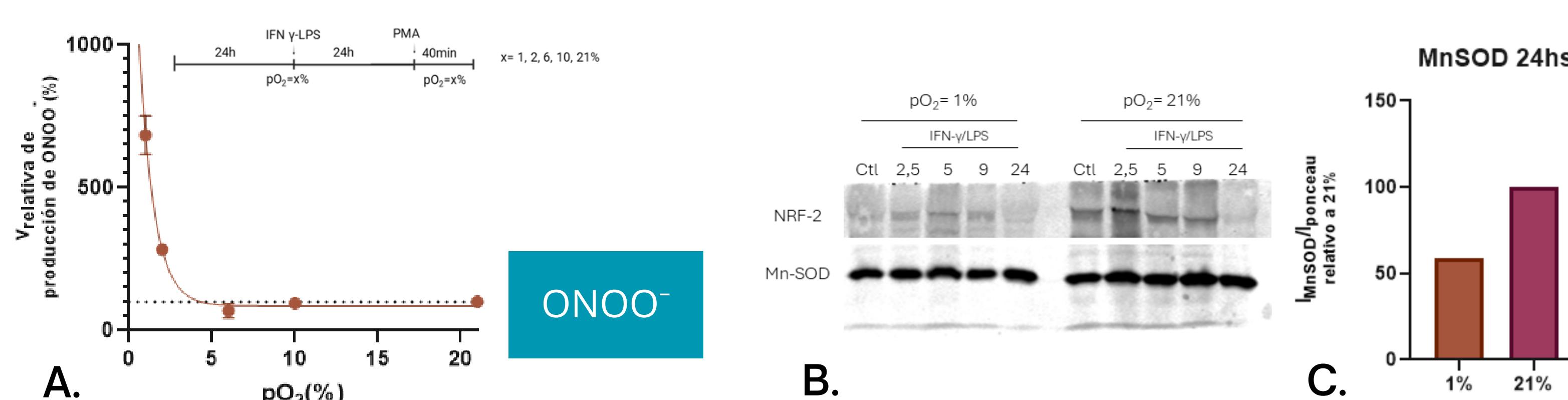


Figura 3: Efecto del oxígeno sobre la producción de ONOO-. A. Producción de ONOO<sup>-</sup> en macrófagos murinos J774A-1 fueron cultivados a distintas  $pO_2$  (1, 2, 6, 10, 15 y 21%) por 48hs, inmunoestimulados a las 24hs con IFN-γ y LPS para inducir la expresión de la iNOS y PMA para el ensamblaje de la Nox-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  $O_2^-$ .
- 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.

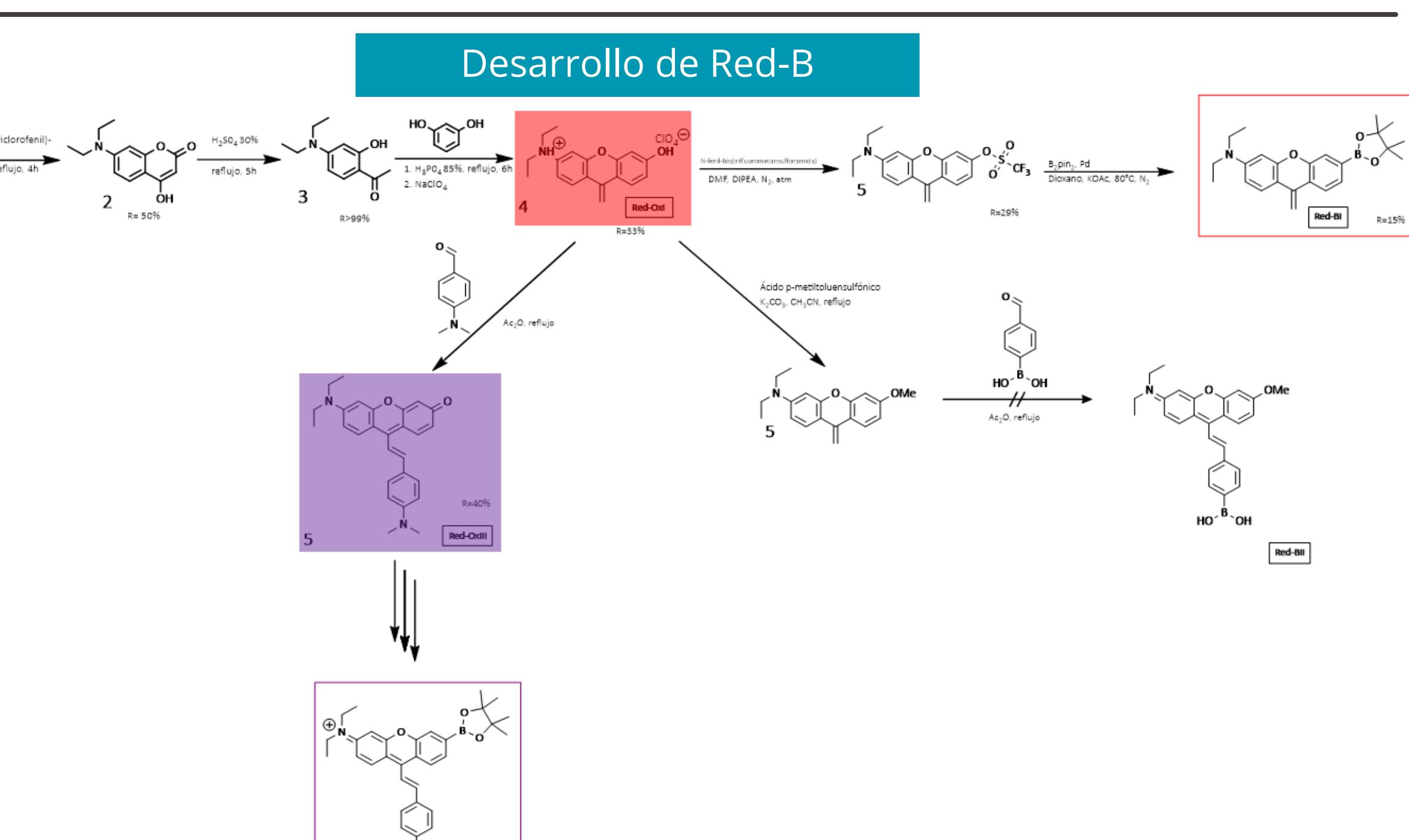


Figura 5: Ruta de síntesis de sondas Red-B.

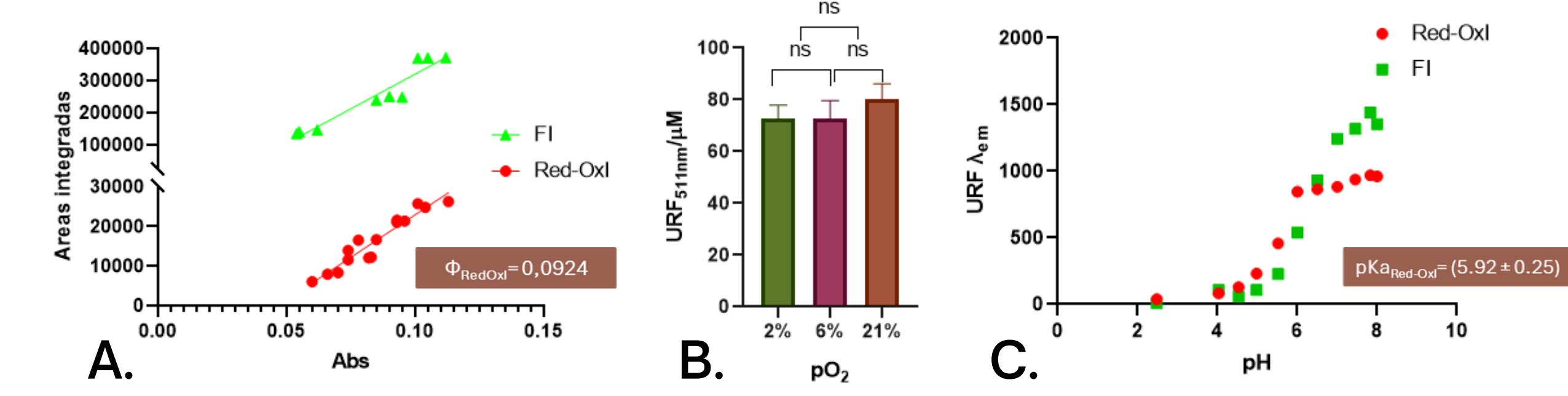


Figura 6: Caracterización del fluoróforo Red-Oxi. A. Cálculo del rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) teniendo como referencia a fluoresceína (Fl) a pH 12.5. B. Pendientes (URF/ $\mu$ M) calculadas a partir de curvas de calibración de Red-Oxi (0-0.33-0.46-0.73-0.96-1.23-2.72  $\mu$ M) expuestas a distintas  $pO_2$  (1, 6, 21%);  $\lambda_{ex}=538nm$ ;  $\lambda_{em}=538nm$ . C. Dependencia de la fluorescencia con el pH para los fluoróforos Red-Oxi y fluoresceína (Fl).

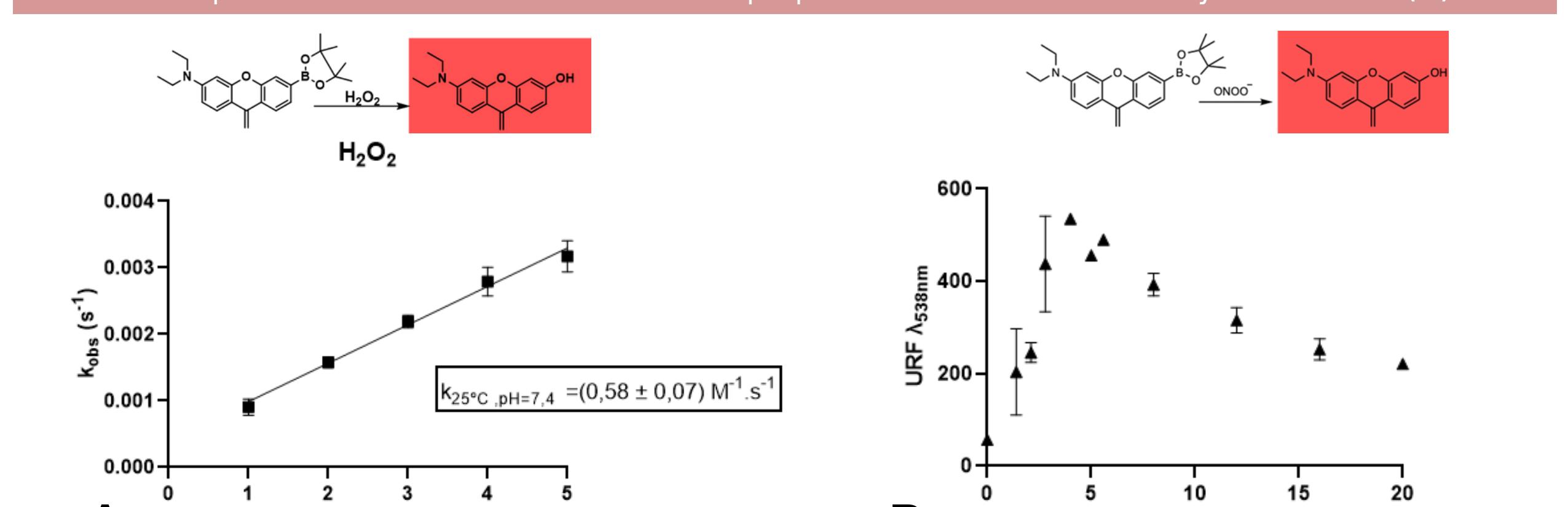


Figura 7: Reacción de Red-BI con distintos oxidantes. A. Reacción de Red-BI con  $H_2O_2$ . Efecto de las concentraciones crecientes de  $H_2O_2$  en las constantes de velocidad observadas ( $k_{obs}$ ) a 25°C, pH 7.4 y una concentración de Red-BI 50  $\mu$ M. B. Efecto de la concentración de peroxinitrito sobre la intensidad de fluorescencia resultante de la oxidación de Red-BI (50  $\mu$ M) a 25°C, pH 7.4.

## 7 Agradecimientos