

# EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE OXIGENO EN LA RESPUESTA EFECTORA DE LAS CELULAS DEL SISTEMA INMUNE

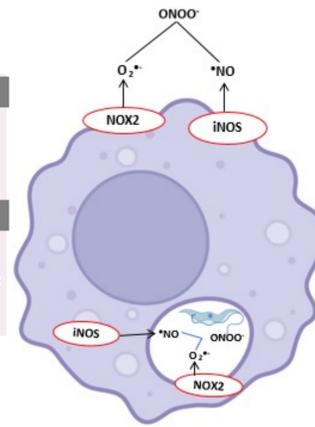
Casella, Ana Clara <sup>1</sup>; Pereyra, Josefina <sup>1</sup>; Álvarez, María Noel <sup>2</sup>; Prolo, Carolina <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UdelaR

<sup>2</sup> Departamento de Educación Médica, Facultad de Medicina, UdelaR.

## INTRODUCCIÓN

La respuesta citotóxica de los macrófagos y otros fagocitos incluye la producción de óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) y superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) dependiente de la óxido nítrico sintasa y de la NADPH oxidasa. Ambas enzimas usan  $\text{O}_2$  como sustrato, por lo que su actividad, así como la formación del producto de la reacción entre  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , el peroxinitrito, pueden verse afectadas por la concentración local de  $\text{O}_2$ . En este trabajo se evaluó el efecto de la concentración de  $\text{O}_2$  en la producción de especies reactivas del oxígeno por parte de macrófagos y su toxicidad sobre agentes patógenos

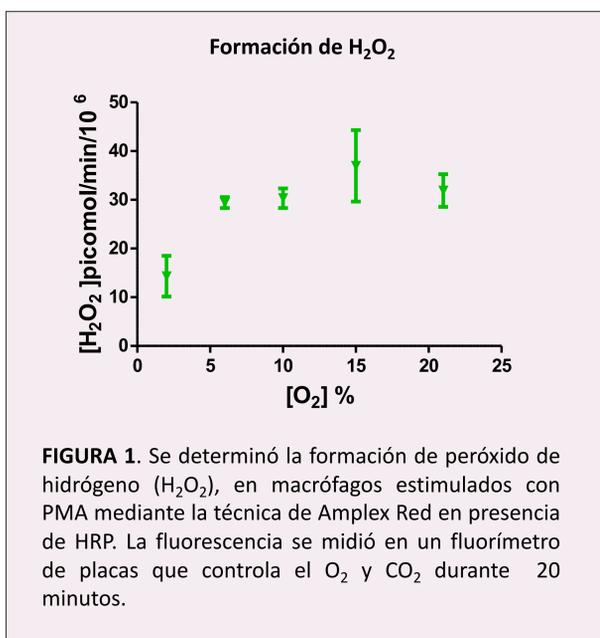


Concentraciones de oxígeno en diferentes tejidos

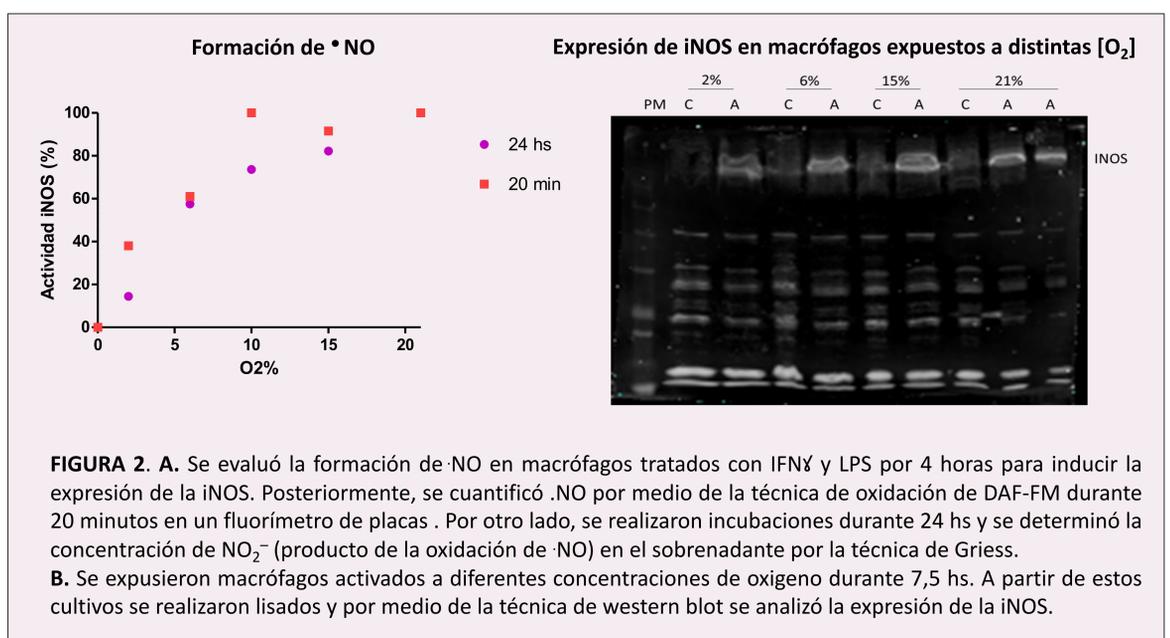
	pO <sub>2</sub> %
Aire en alveolo	14,5
Sangre arterial	13,2
Tejido intestinal	7,6
Musculo	3,8
Célula	1,3-2,5
Riñón	9,5
Higado	5,4

## RESULTADOS

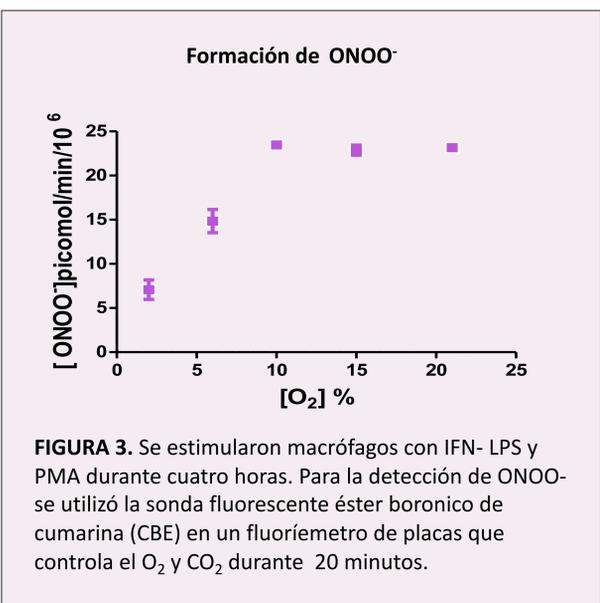
✓ Se expusieron macrófagos de línea celular (J774A.1) a diferentes concentraciones de oxígeno se evaluó la respuesta citotóxica dependiente de la formación de  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante diferentes técnicas



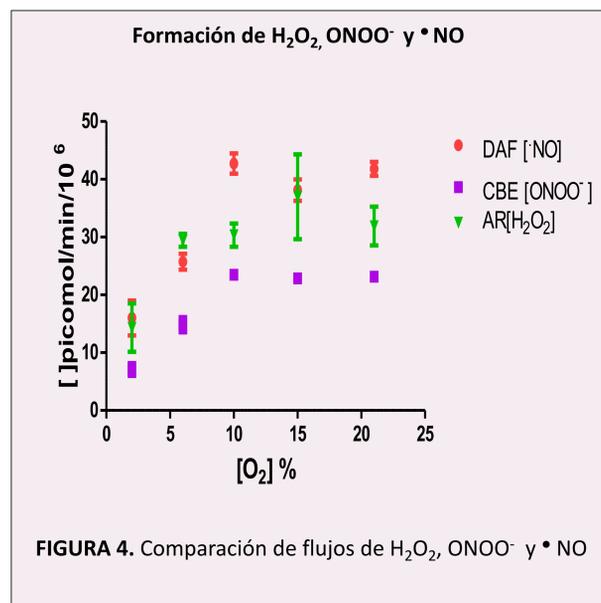
**FIGURA 1.** Se determinó la formación de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), en macrófagos estimulados con PMA mediante la técnica de Amplex Red en presencia de HRP. La fluorescencia se midió en un fluorímetro de placas que controla el  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  durante 20 minutos.



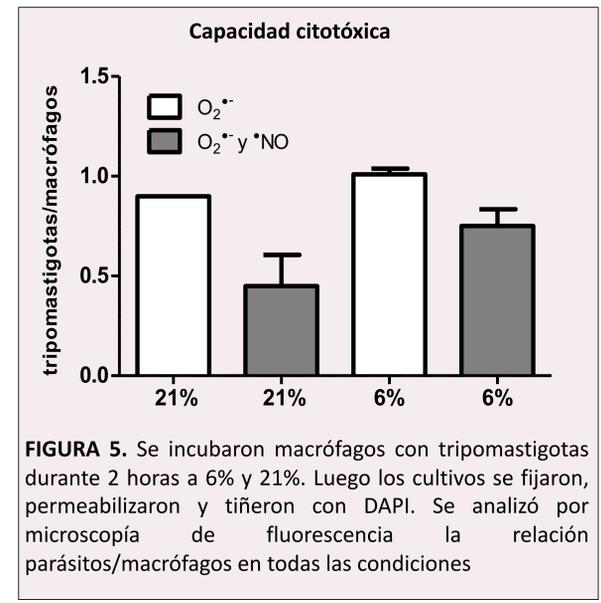
**FIGURA 2. A.** Se evaluó la formación de  $\cdot\text{NO}$  en macrófagos tratados con  $\text{IFN}\gamma$  y LPS por 4 horas para inducir la expresión de la iNOS. Posteriormente, se cuantificó  $\cdot\text{NO}$  por medio de la técnica de oxidación de DAF-FM durante 20 minutos en un fluorímetro de placas. Por otro lado, se realizaron incubaciones durante 24 hs y se determinó la concentración de  $\text{NO}_2^-$  (producto de la oxidación de  $\cdot\text{NO}$ ) en el sobrenadante por la técnica de Griess.  
**B.** Se expusieron macrófagos activados a diferentes concentraciones de oxígeno durante 7,5 hs. A partir de estos cultivos se realizaron lisados y por medio de la técnica de western blot se analizó la expresión de la iNOS.



**FIGURA 3.** Se estimularon macrófagos con  $\text{IFN}\gamma$ -LPS y PMA durante cuatro horas. Para la detección de  $\text{ONOO}^-$  se utilizó la sonda fluorescente éster borónico de cumarina (CBE) en un fluorímetro de placas que controla el  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  durante 20 minutos.



**FIGURA 4.** Comparación de flujos de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\cdot\text{NO}$



**FIGURA 5.** Se incubaron macrófagos con tripomastigotas durante 2 horas a 6% y 21%. Luego los cultivos se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con DAPI. Se analizó por microscopía de fluorescencia la relación parásitos/macrófagos en todas las condiciones

## CONCLUSIONES

- ✓ La producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{NO}$  y  $\text{ONOO}^-$  se mantienen hasta una  $\text{pO}_2$  de 10%, y por debajo de esa concentración se observa una disminución de las velocidades de formación de estas especies.
- ✓ A 6% de  $\text{O}_2$ , se conserva casi el 100% de la formación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y un 60 % de la formación de  $\cdot\text{NO}$  y por ende la formación de  $\text{ONOO}^-$ .
- ✓ Los resultados muestran que en los tiempos ensayados no existen diferencias en la expresión de la iNOS, por lo que la variación en la producción de  $\cdot\text{NO}$ , se debe probablemente al rol del  $\text{O}_2$  como sustrato de la iNOS.
- ✓ La citotoxicidad es menor a 6% que a 21% de  $\text{O}_2$ . Sin embargo, aún a 6% de  $\text{O}_2$  se observa que la activación de los macrófagos para formar peroxinitrito aumenta su capacidad de eliminación de *T. cruzi*, mostrando la relevancia de este oxidante como agente citotóxico en condiciones fisiológicas.