

**PEDECIBA Biología** Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas Sub-área Neurociencias



# EFECTOS DEL ALCOHOL Y LA DEFICIENCIA DE

# HIERRO EN CULTIVOS DE ASTROCITOS

# Licenciada Mariana Perata

Tutora: Dra. Silvia Olivera-Bravo Co-tutor: Dr. Luis Barbeito Neurobiología Celular y Molecular (NBCM) Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) Montevideo-Uruguay

Diciembre, 2017

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi tutora Dra. Silvia Olivera Bravo por haberme apoyado, enseñado y guiado durante la realización de la investigación. Gracias a su dedicación pude alcanzar este objetivo.

A mi amiga Eugenia Isasi por su ayuda constante a lo largo del proceso.

A mis padres y hermano por confiar siempre en mí y brindarme el estímulo para no rendirme ante los obstáculos.

A las integrantes del tribunal, Dras. Patricia Cassina, Giselle Prunell y Cecilia Scorza por corregir mi tesis.

| INDICE  | 3  |
|---|----|
| RESUMEN   | 5  |
| INTRODUCCIÓN  | 6  |
| Astrocitos  | 6  |
| Biología de los astrocitos  | 6  |
| Papel en el daño y la protección del SNC                              | 8  |
| <u>Alcoholismo</u>  | 10 |
| <u>Etanol</u>   | 10 |
| Generalidades y metabolización  | 10 |
| Efectos sobre el SNC  | 12 |
| Efectos sobre los astrocitos  | 14 |
| <u>Hierro</u>   | 15 |
| Deficiencia de hierro   | 16 |
| Efectos de la DH en el SNC  | 16 |
| Efectos de la DH en astrocitos  | 19 |
| Efectos del EtOH y la DH  | 20 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO  | 22 |
| OBJETIVO GENERAL  | 22 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 22 |
| ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN   | 23 |
| MATERIALES Y MÉTODOS  | 23 |
| Animales  | 23 |
| Reactivos   | 24 |
| Cultivos celulares  | 24 |
| Cultivos de astrocitos  | 24 |
| Preparación del sustrato para cultivos de oligodendrocitos            | 25 |
| Cultivo primario de oligodendrocitos                                  | 25 |
| Obtención de la suspensión de neuronas hipocampales                   | 26 |
| Co-cultivo de astrocitos y neuronas                                   | 26 |
| Tratamientos  | 26 |
| Determinación de la concentración de trabajo de EtOH                  | 26 |
| Determinación de concentración de trabajo de DFO                      | 27 |
| Modelo experimental para analizar los efectos conjuntos de DFO y EtOH | 27 |
| Análisis realizados   | 27 |
| Evaluación de viabilidad celular mediante conteo de núcleos           | 27 |
| Ensayo de viabilidad celular mediante sulforrodamina B                | 28 |
| Estudio de la actividad mitocondrial de astrocitos mediante MTT       | 29 |
| Evaluación del potencial mitocondrial de astrocitos empleando         |    |
| MitoTracker red (MT)  | 29 |
| Análisis de los niveles de glutatión en astrocitos                    | 30 |

| Análisis de los niveles de diclorodifluoroacetato en astrocitos          | 30 |  |
|--|----|--|
| Análisis de los tratamientos sobre la proliferación astrocitaria         |    |  |
| Inmunocitoquímica  | 32 |  |
| Análisis de la expresión de proteínas por Western blot                   | 33 |  |
| Extracción de proteínas  | 34 |  |
| Cuantificación de proteínas totales                                      | 34 |  |
| Desnaturalización de proteínas   | 35 |  |
| Armado de los geles  | 35 |  |
| Electrotransferencia (blotting) a la membrana de PVDF                    | 36 |  |
| Bloqueo e incubación con anticuerpos                                     | 37 |  |
| Revelado mediante quimioluminiscencia enzimática (ECL)                   | 37 |  |
| Análisis estadístico   | 38 |  |
| RESULTADOS   | 39 |  |
| I EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL EtOH SOBRE LOS ASTROCITOS                | 39 |  |
| I.1 Determinación de la concentración de trabajo de EtOH                 | 39 |  |
| I.2 Efectos de EtOH 130 mM sobre astrocitos en cultivo                   | 40 |  |
| I.2.1. Análisis de los efectos sobre la reactividad y la proliferación   | 40 |  |
| I.2.2. Efectos sobre los niveles de estrés oxidativo y de RE             | 44 |  |
| I.2.3. Repercusión del tratamiento de astrocitos sobre                   |    |  |
| la viabilidad neuronal   | 45 |  |
| II. EFECTOS CONJUNTOS DE DFO Y EtOH SOBRE ASTROCITOS                     | 46 |  |
| II.1. Determinación de la concentración de trabajo de DFO                | 46 |  |
| II.1.2. Selección del paradigma experimental                             | 47 |  |
| II.2. Influencia sobre la reactividad y proliferación                    | 48 |  |
| II.3. Efectos sobre la funcionalidad mitocondrial                        | 53 |  |
| II.4. Influencia sobre los niveles de estrés de RE y de estrés oxidativo | 53 |  |
| II.5. Análisis de los efectos sobre la inmunoreactividad de fosfoCREB    | 58 |  |
| III. EFECTOS DEL TRATAMIENTO DE ASTROCITOS CON DFO-EtOH                  |    |  |
| SOBRE LA VIABILIDAD DE NEURONAS Y OLIGODENDROCITOS                       | 59 |  |
| III.1. Efectos sobre la viabilidad neuronal                              | 59 |  |
| III.2. Efectos sobre la morfología y la viabilidad de oligodendrocitos   | 61 |  |
| DISCUSIÓN  | 63 |  |
| Efectos del EtOH sobre cultivos de astrocitos                            | 65 |  |
| Efectos del EtOH y DFO sobre astrocitos, neuronas y oligodendrocitos     | 67 |  |
| PERSPECTIVAS   | 69 |  |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 70 |  |

#### RESUMEN

La co-existencia de alcoholismo y deficiencia nutricional parece potenciar el daño al sistema nervioso central (SNC), aunque los mecanismos subvacentes son mayormente desconocidos. Dado que los astrocitos mantienen la homeostasis del SNC, la exposición crónica a la deficiencia de hierro (DH) sumada a una exposición aguda al alcohol podría modificar la morfología y funcionalidad de los astrocitos agravando secundariamente el daño que estas dos condiciones producen por separado. Para validar esta hipótesis, expusimos cultivos de astrocitos corticales de ratas neonatas a desferroxamina (DFO) para reproducir una DH crónica y a etanol (EtOH) para mimetizar una exposición aguda al alcohol. Luego analizamos si algunos parámetros astrocitarios relevantes para la homeostasis cerebral se alteraron en grado suficiente para repercutir negativamente en la sobrevida de neuronas y oligodendrocitos. En todas las condiciones experimentales [control, DFO (96 h), EtOH (24 h), DFO (96 h)-EtOH (24 h)], evaluamos viabilidad celular, potencial y funcionalidad mitocondrial, niveles de estrés oxidativo y de retículo endoplasmático, tasa de proliferación y expresión de marcadores astrocitarios y de citoesqueleto. En otros experimentos analizamos los efectos de los distintos tratamientos sobre la morfología y la viabilidad de neuronas en co-cultivos con astrocitos tratados y de oligodendrocitos en cultivos mixtos astrocitos-oligodendrocitos sometidos a las diferentes condiciones experimentales. La co-exposición de DFO y EtOH agravó los parámetros funcionales analizados en general pero no tuvo efectos sobre la morfología de los astrocitos. En este sentido, DFO-EtOH produjo una disminución significativa de la proliferación y de la funcionalidad mitocondrial, además de una tendencia no significativa estadísticamente al aumento del estrés de retículo endoplasmático y a la disminución del potencial mitocondrial y de los niveles de glutatión. En esta condición, se observó una disminución significativa de la sobrevida neuronal mediada por la respuesta astrocitaria en los co-cultivos astrocitos-neuronas y en la sobrevida y morfología de los oligodendrocitos en cultivos mixtos enriguecidos en oligodendrocitos. La exposición a DFO también afectó la morfología y sobrevida de oligodendrocitos indicando su mayor sensibilidad a la falta de hierro. Los resultados obtenidos indican que el modelo empleado parece reproducir algunos de los efectos sinérgicos entre la falta de hierro sostenida y el EtOH sobre parámetros astrocitarios vinculados con la homeostasis cerebral. El empeoramiento de estos parámetros podría explicar en parte algunos de los efectos agravados observados cuando coexisten alcoholismo y deficiencia nutricional en las personas.

### INTRODUCCIÓN

### <u>Astrocitos</u>

#### Biología de los astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del Sistema Nervioso Central (SNC) y tienen un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema. Estas células gliales forman parte de la macroglía y están en estrecho contacto funcional y espacial con las neuronas proporcionando intermediarios energéticos, defensas antioxidantes y captando glutamato (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y Parpura, 2010). Los astrocitos son componentes esenciales de la sinapsis formando junto a las neuronas la sinapsis tripartita donde los procesos astrocitarios envuelven los componentes pre- y postsinápticos y liberan los gliotransmisores (químicamente similares a los neurotransmisores) que modulan la transmisión y plasticidad sináptica (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y Parpura, 2010).

Los astrocitos se clasifican clásicamente en dos subtipos teniendo en cuenta su localización preferente y su morfología. Los astrocitos protoplasmáticos están presentes en la sustancia gris y poseen numerosísimos procesos cortos que envuelven las sinapsis. Los astrocitos fibrosos se localizan en la sustancia blanca y poseen procesos largos poco ramificados que contactan con los nodos de Ranvier. Ambos tipos de astrocitos, forman parte de las unidades neurovasculares y envuelven a más del 95% de los capilares en el SNC (Sofroniew y Vinters, 2010).

Los astrocitos son células eléctricamente no excitables debido en parte a la gran cantidad de canales de K<sup>+</sup> que poseen lo que impide llegar al umbral necesario para la generación del potencial de acción. No obstante, los astrocitos responden a cambios en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> que pueden producirse por la liberación intrínseca desde sus reservorios intracelulares, por su ingreso a las células, por la liberación de neurotransmisores como el glutamato al espacio extracelular o por su propagación por el sincitio astrocitario formado por astrocitos vecinos que se comunican entre sí por medio de uniones gap (Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y Parpura, 2010).

El papel central de los astrocitos es el mantenimiento de la homeostasis del SNC a todos los niveles. Estas células regulan la concentración de iones, de neurotransmisores y neurohormonas y expresan transportadores de neurotransmisores como glutamato, GABA y glicina que son necesarios para eliminarlos del espacio sináptico finalizando su actividad y regulando su concentración extracelular. En el compartimento intracelular del astrocito, los neurotransmisores son convertidos en sus precursores, por ejemplo el glutamato en glutamina, que luego son liberados y reciclados en las neuronas para ser empleados como neurotransmisores activos. La conversión del glutamato en glutamina sirve además para detoxificar al SNC del amoníaco residual producido por actividad y reciclado de proteínas. Empleando los neurotransmisores captados, los astrocitos también sintetizan los precursores del glutatión que es la principal defensa celular antioxidante (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010).

Los astrocitos detectan y responden a fluctuaciones de los niveles de CO<sub>2</sub>, pH y Na<sup>+</sup>. Además, regulan el flujo sanguíneo cerebral dependiendo de la actividad neuronal provocando el aumento o disminución del diámetro de los vasos sanguíneos mediante la liberación de sustancias vasoactivas como prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010).

Los astrocitos tienen prolongaciones que contactan con los vasos sanguíneos llamados podocitos, de donde obtienen la glucosa para proveer de energía a las neuronas. Por otra parte, los astrocitos son el principal reservorio de glucógeno del SNC. El glucógeno se utiliza en períodos de hipoglicemia o alta actividad neuronal, donde degrada se а





glucosa, la que luego mediante la glucólisis genera lactato que es la fuente de energía para las neuronas (Magistretti y cols., 2006).

Los astrocitos también cumplen funciones esenciales en el desarrollo del SNC. Están involucrados en la neurogénesis y en la migración neuronal y son importantes para el desarrollo correcto del circuito neuronal, transmisión sináptica y plasticidad sináptica. Secretan moléculas involucradas en la modulación de la sinaptogénesis y proteínas de la matriz extracelular y factores tróficos necesarios para el crecimiento y migración neuronal (Sloan y Barres, 2014). También, tienen funciones en la maduración, función y mantenimiento de la barrera hematoencefálica durante el desarrollo (Sofroniew y Vinters, 2009; Verkhratsky y cols., 2011). Un resumen de las funciones realizadas por los astrocitos se esquematiza en la Fig. 1.

### Papel en la protección y el daño del SNC

Los astrocitos mantienen la homeostasis del SNC en condiciones fisiológicas. En condiciones patológicas, la homeostasis del sistema se pierde generando el daño y eventualmente causando la muerte del tejido nervioso. La respuesta del astrocito frente al daño pude ser protectora y de supervivencia, limitando el área de daño mediante la formación de la cicatriz glial y promoviendo la remodelación y recuperación de la función neuronal; o deletérea y tóxica. En este caso, la respuesta astrocitaria aumenta el daño en el sistema nervioso mediante la generación de edema, exitotoxicidad por glutamato, incrementando la necrosis, por aumento de agentes infecciosos e inflamación por fallas en la barrera hematoencefálica y facilitando la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la liberación de mediadores inflamatorios (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010).

Los astrocitos responden ante el daño del sistema nervioso a través de un proceso conocido como astrogliosis, un espectro de cambios continuos, progresivos y graduados a nivel molecular, celular y funcional que varían con la severidad del daño. Estos cambios están regulados específicamente por el contexto mediante señales intra- y extracelulares y tienen el potencial de alterar al astrocito a través de la pérdida o la ganancia de funciones que pueden impactar en forma positiva o detrimental a las células circundantes (Sofroniew y Vinters, 2010). Sofroniew y Vinters (2010) reconocen tres niveles de astrogliosis reactiva: mediana a moderada, severa difusa y reactiva severa con formación de cicatriz glial (Fig. 2). La astrogliosis mediana a moderada consiste en una sobreexpresión variable de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) con moderada hipertrofia del cuerpo y los procesos celulares y proliferación leve o nula. Se mantiene la individualidad celular y los procesos no se entremezclan con los de los astrocitos vecinos. Se genera en regiones con traumas no penetrantes o contusivos, activación de la respuesta inmune innata por infección viral o bacteriana y en áreas cercanas a la lesión del SNC. Una vez resuelto el daño, los astrocitos vuelven a su fenotipo basal (Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2011).

En la astrogliosis severa difusa hay una pronunciada sobreexpresión de GFAP, hipertrofia del cuerpo y los procesos celulares y una gran proliferación astrocitaria. No se mantiene la individualidad celular y los procesos de astrocitos vecinos se entremezclan. Estos cambios permiten reorganizar el tejido dañado sin la formación de la cicatriz glial. Se da en regiones con lesiones severas locales, infecciones o áreas neurodegenerativas (Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2011).

En la astrogliosis reactiva severa con formación de cicatriz glial compacta se observa una marcada sobreexpresión de GFAP, una gran hipertrofia y proliferación astrocitaria. Los procesos de los astrocitos reactivos se solapan para formar bordes compactos alrededor de áreas con tejido muy dañado formando la cicatriz glial que actúa como barrera neuroprotectora que defiende al SNC de células inflamatorias y agentes infecciosos. La cicatriz glial se caracteriza por la deposición de matriz extracelular donde se encuentran numerosos mediadores que inhiben la migración axonal y la regeneración neuronal. Implica la reorganización del tejido dañado y persiste luego de su resolución impidiendo la regeneración (Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky y cols., 2011). Durante la astrogliosis reactiva con formación de la cicatriz glial los astrocitos no cumplen sus funciones normales en cuanto a regulación del flujo sanguíneo, generación de energía, homeostasis de iones. neurotransmisores, flujo extracelular, en la regulación de la función sináptica. La persistencia en la pérdida de estas funciones conlleva a la disfunción del SNC en la mayoría de los casos.

9





En resumen, la plasticidad funcional que presentan los astrocitos los convierte en células claves tanto para el mantenimiento de la funcionalidad del SNC como en su respuesta al daño.

# <u>Alcoholismo</u>

El consumo abusivo de alcohol es uno de los problemas de salud más relevantes y costosos en el mundo, desde lo sanitario, lo social y lo económico. Los datos recientes muestran además un consumo de alcohol cada vez mayor en sectores tradicionalmente considerados no consumidores (mujeres y jóvenes). Según la OMS, en 2012, aproximadamente 3,3 millones de defunciones (el 5,9% del total mundial), fueron atribuibles al consumo de alcohol (Nota descriptiva Nº 349, Enero 2015). En nuestro país, 63000 personas presentan un consumo de alcohol problemático (JND, 2011). El consumo de alcohol está relacionado con muchas enfermedades y trastornos mentales y comportamentales, enfermedades no transmisibles como la cirrosis hepática, algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, además de traumatismos derivados de la violencia y los accidentes de tránsito (Harper y Matsumoto 2005, Izquierdo 2002, ONU Nota descriptiva 2015).

# <u>Etanol</u>

#### Generalidades y metabolización

(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, EtOH) es el componente principal de los El etanol componentes activos de las bebidas alcohólicas y el responsable de los efectos más importantes (Izquierdo, 2002; Bosco y Díaz, 2012). Contienen como componentes minoritarios metanol, butanol, aldehídos, ésteres, histaminas, fenoles, taninos, hierro, plomo y cobalto (Izquierdo, 2002). El etanol es una molécula orgánica pequeña, dos carbonos, que pertenece al grupo de alcoholes alifáticos de cadena corta, muy soluble en agua y a la vez en solventes orgánicos. Esta característica anfipática le permite difundir fácilmente en medio acuoso y lipídico así como atravesar fácilmente las membranas celulares, la barrera hematoencefálica, llegando al cerebro pocos minutos después de su ingesta o atravesar la barrera placentaria y pasar a la leche materna en un 95% (Izquierdo, 2002, Bosco y Díaz, 2012). El EtOH ingerido por vía oral se absorbe en un 80% en el intestino delgado y en un 20% en el estómago por difusión simple a través de las membranas gastrointestinales. Una vez absorbido, el etanol se metaboliza principalmente en el hígado y un pequeño porcentaje en el estómago. Dependiendo de la dosis, entre un 2% y un 10% se elimina sin metabolizar a través de la respiración, orina y sudor (Izquierdo, 2002).

Se describen tres vías de metabolización del EtOH oxidándose a acetaldehído: 1) el 90% es oxidado por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa hepática (ADH), la ADH gástrica oxida un pequeño porcentaje; 2) hasta un 10% es metabolizado por la vía microsomal (Citocromo P450IIE1-CYP2E1) inducible luego de la ingesta masiva de etanol, y 3) el remanente, a nivel del cerebro, es oxidado por la enzima catalasa (Izquierdo, 2002). El acetaldehído producido por las tres vías es mayormente oxidado a acetato por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH); el acetato es transformado a acetil-CoA por la enzima Acetil-CoA sintetasa y pasa al ciclo de Krebs (Izquierdo, 2002). Una pequeña parte del acetaldehído no es oxidada, pasa como tal a la sangre y podría llegar al cerebro. El acetaldehído es una molécula altamente reactiva con aminas, es capaz de establecer enlaces covalentes con proteínas e inducir la activación de las enzimas NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa inducible generando especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno

(ROS) que además van a reaccionar entre sí produciendo peroxinitrito (ONOO-), mucho más potente y de acción mucho más rápida que los anteriores. A su vez, el alcohol altera los niveles de antioxidantes produciendo estrés oxidativo significativo y potenciando la capacidad del sistema microsomal de generar ROS (Ku y cols., 2006; Alikunju y cols., 2011).

### Efectos sobre el SNC

El consumo excesivo de alcohol puede conducir a un deterioro funcional y estructural del SNC. Las deficiencias de la función neurológica comúnmente observadas incluyen efectos negativos sobre la capacidad de resolución de problemas abstractos, el aprendizaje visoespacial y verbal, alteraciones en la memoria y en las habilidades motrices perceptivas incluyendo la función motora (Harper y Matsumoto, 2005). El alcoholismo además, agrava las funciones cognitivas en otras enfermedades co-mórbidas como la esquizofrenia (Sullivan 2003 citado por Harper y Matsumoto, 2005), u otras comúnmente observadas en alcohólicos como el síndrome de Wernicke-Korsakoff y la encefalopatía hepática (Harper y Matsumoto, 2005).

Con respecto a los cambios estructurales en el cerebro, se reporta que los alcohólicos presentan reducción de la masa cerebral en forma correlacionada con la tasa y la cantidad de alcohol consumido durante toda la vida. Esta reducción se explica en gran parte por una disminución de la sustancia blanca (Harper, 1998). Se ha descripto que el alcohol produce mielinolisis pontina y extrapontina en los ganglios basales, tálamo, las capas profundas de la corteza cerebral, en las uniones sustancia blanca-gris y en los extremos de las capas del cerebelo. Se ha documentado además pérdida neuronal y activación glial relacionada con el alcohol en la corteza de asociación frontal superior, hipotálamo y cerebelo y disminución del volumen hipocampal (Sullivan y Marsh 2003, citados por Harper y Matsumoto, 2005). La exposición prenatal y posnatal a etanol reduce el árbol dendrítico y la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo y en las neuronas piramidales de la neocorteza, conduciendo en conjunto a un cuadro patológico denominado Síndrome Alcóholico Fetal que podría afectar hasta el 1% de los recién nacidos afectados por causas no genéticas. El síndrome alcohólico fetal produce daños neurológicos permanentes que impactan sobre el aprendizaje, la memoria, la

12

atención y las funciones ejecutivas y las habilidades motoras (Rufer y cols., 2012).

En cuanto a los mecanismos de daño cerebral relacionado con el alcohol, se han descripto varios que no son mutualmente excluyentes. Cuando se administra etanol en forma aguda en una dosis farmacológicamente relevante, el etanol inhibe selectiva y potentemente la función de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA). El sitio preciso de acción aún no ha sido demostrado. La exposición crónica al etanol causa una regulación positiva adaptativa en la sensibilidad de los receptores NMDA tanto in vivo como in vitro, lo que puede resultar en una mayor vulnerabilidad para la respuesta citotóxica inducida por glutamato (excitotoxicidad). Esta "sensibilización" de las células neuronales a los insultos excitotóxicos es uno de los factores más importantes en el mecanismo subyacente al daño cerebral inducido por el etanol. El aumento de la entrada de calcio a través de los receptores NMDA está fuertemente unido a la captación en las mitocondrias y provoca la producción de ROS que interfieren con la función de las mitocondrias y las membranas plasmáticas (Izquierdo, 2002; Harper y Matsumoto, 2005).

Estudios recientes sugieren que la exposición crónica al etanol puede reducir la disponibilidad de BDNF y alterar la función y/o los niveles de los receptores TrKB y TrKA (Climent y cols., 2002). Estos cambios podrían llevar a una alteración de las vías de señalización intracelular que controlan la supervivencia y la muerte de las células. Por lo tanto, es razonable postular que la alteración de estas cascadas químicas podría subyacer en la fisiopatología de la muerte celular neuronal, así como cambios en los circuitos neuronales que podrían interferir con la función cerebral normal y aumentar la susceptibilidad al daño celular inducido por el etanol. Se han demostrado además, que el etanol induce rupturas de la cadena de ADN en las neuronas y las células gliales (Lamarche y cols., 2003; Ikegami y cols., 2003).

El acetaldehído y los productos aldehídicos de la peroxidación lipídica pueden unirse a proteínas para formar aductos estables asociados con la gravedad del daño hepático alcohólico a través de respuestas inmunológicas humorales y mediadas por células. En los modelos animales de toxicidad del etanol, la formación de aductos de acetaldehído proteína se ha demostrado en la sustancia blanca en neuronas de la corteza frontal (Niemela, 2001). La pérdida de materia blanca en alcohólicos humanos se correlaciona con alteraciones en el razonamiento no verbal, en la atención y la rapidez psicomotora, entre otros (Harper y Matsumoto, 2005). Se ha reportado además reducción en la inmunoreactividad en la proteína básica de mielina (MBP), la glicoproteína carbónica anhidrasa C asociada a mielina y la transferrina (de la Monte y Kril, 2013).

#### Efectos sobre los astrocitos

Las células gliales tienen un rol preponderante en los efectos negativos producidos por el alcohol sobre el cerebro. A modo de ejemplo, la muerte neuronal y los cambios celulares y comportamentales de larga duración asociados con el alcoholismo se vinculan a reactividad glial significativa y la consecuente elevación de los niveles de citoquinas proinflamatorias producidas fundamentalmente por microglía y astrocitos (Izquierdo, 2002; Saito y cols., 2016).

Cuando los astrocitos son cultivados en presencia de etanol en concentraciones moderadas, los niveles de GFAP se incrementan inicialmente y luego disminuyen probablemente por un incremento en la metilación del ADN en la región promotora del GFAP (Guerri y cols., 2001). El incremento de la expresión de GFAP podría generarse por un efecto directo del alcohol sobre los astrocitos, o por un efecto secundario causado por un daño neuronal, liberación de citoquinas proinflamatorias por la microglia o daño de los vasos sanguíneos del cerebro (Wilhelm y Guizzetti, 2016).

Se ha reportado además que el alcohol disminuye la proliferación de los astrocitos alterando la señalización de la Fosfolipasa D (PLD). La PLD está asociada a receptores de membrana incluyendo receptores asociados a proteína G, receptores tirosina quinasa, o integrinas, involucradas en su activación. PLD activada hidroliza fosfatidilcolina para producir colina y ácido fosfatídico. Éste último, activa moléculas de señalización involucradas en la proliferación, tráfico y sobrevida celular. El etanol compite por la PLD produciéndose fosfatidiletanol en vez de ácido fosfatídico, de esta manera impide la activación de moléculas de señalización involucradas en la proliferación, tráfico y sobrevida celular (Guerri y cols., 2001; Guizzetti y cols., 2014; Wilhelm y Guizzetti, 2016).

14

La exposición de cultivos de astrocitos a dosis únicas de EtOH aumentó la expresión de proteínas de la vía autofágica y el número de autofagosomas y lisosomas (Pla y cols., 2016). Como además, la inhibición de la vía autofágica aumentó la liberación de mediadores inflamatorios y la muerte apoptótica y necrótica de los astrocitos expuestos a EtOH, los autores sugieren que la autofagia es una respuesta protectora frente al alcoholismo. Los efectos del EtOH sobre las vías autofágicas en los astrocitos parecen ser diferentes a los que el EtOH ocasiona en neuronas. En este tipo celular, el EtOH inhibe la autofagia lo que podría ser un mecanismo de muerte neuronal (Pla y cols., 2016).

Además, Guizzetti y cols. (2010) reportaron una reducción en la neuritogénesis y la sobrevida neuronas hipocampales sembradas sobre astrocitos tratados durante 24 h con dosis de hasta 100 mM de EtOH en presencia de carbacol. Los autores sostienen que el EtOH fue capaz de inhibir el efecto promotor de la neuritogénesis que es mediado en parte por la activación de receptores muscarínicos astrocitarios, lo que conlleva además a la inhibición de la liberación de factores astrocitarios promotores de la neuritogénesis como la laminina y la fibronectina, generando un ambiente represivo para el desarrollo neuronal (Guizzetti y cols., 2010).

A su vez, los astrocitos podrían potenciar los efectos directos negativos del alcohol sobre la mielina y los oligodendrocitos (Alfonso-Loeches y cols., 2012) afectando la señalización astrocitaria que participa en la promoción de la diferenciación de los oligodendrocitos que es necesaria para la correcta mielinización (Sloan y Barres, 2014).

#### <u>Hierro</u>

Hay una alta demanda de hierro en el cerebro. Este elemento interviene en el transporte de oxígeno en la sangre, en la producción de algunos de sus componentes, es cofactor de numerosas proteínas que participan en procesos críticos como la respiración mitocondrial y la síntesis de ADN. Además, el hierro es altamente necesario para las enzimas de la ruta de las pentosasfosfato y para otras enzimas que participan en procesos cerebrales altamente especializados como la formación de las sinapsis, la síntesis de

neurotransmisores, la diferenciación de los oligodendrocitos y la mielinización (Hernández-Martínez y cols., 2010; Rao y cols., 2012, Beydoun y cols., 2017). También es esencial para el crecimiento neuronal y el desarrollo cerebral durante el período fetal tardío y neonatal (Rufer y cols., 2012). Sin embargo, niveles elevados de hierro son tóxicos, por lo que su concentración cerebral está finamente regulada (Hernández-Martínez y cols., 2010; Duck y Connor, 2016) En efecto, la deficiencia o el exceso de hierro se asocian con diversas enfermedades neurológicas. Mientras que la deficiencia de hierro se asocia con deficiencias estructurales cognitivas y cerebrales, su exceso está implicado en enfermedades de Alzheimer, Parkinson y otras enfermedades las neurodegenerativas (Duck y Connor, 2016).

La transferrina (Tf) son los principales transportadores de hierro en sangre, mientras que el transportador divalente de metales 1, la ferroportina y los receptores de transferrina están involucrados en su transporte a través de la membrana celular. Las células endoteliales captan hierro mediado por transferrina y la unión de esta proteína a sus receptores activa la endocitosis mediada por receptor que es el modo fisiológico canónico de suministro de hierro a las células (Mc Carthy y Kosman, 2013).

La entrada de hierro en el cerebro está regulada por la barrera hematoencefálica, y las células endoteliales y los astrocitos que forman el eje regulador de dicha barrera, modulan el transporte de hierro desde la sangre al intersticio del cerebro (McCarthy y Kosman, 2013). En condiciones de alta concentración de hierro, se ha observado que los niveles de receptores de transferrina en las células endoteliales disminuyen (Mc Carthy y Kosman, 2013). Por otra parte, se ha demostrado que factores parácrinos liberados por los astrocitos vecinos comunican los niveles cerebrales de hierro a las células endoteliales y que éstas regulan diferencialmente la expresión y distribución de los receptores de transferrina (Simpson y cols., 2015).

# Deficiencia de hierro

La deficiencia de hierro (DH) o ferropenia es la carencia nutricional más común a nivel mundial y se estima que afecta a más del 30% de la población mundial (OMS, 2017). Está presente en todos los grupos etarios, sin embargo, las poblaciones más vulnerables son las mujeres embarazadas y los niños en edad preescolar. La incidencia de la anemia por deficiencia de hierro durante el embarazo alcanza valores del 59% en países en desarrollo y el 24% en países industrializados (Radlowski y Johnson, 2013). Por otra parte, se plantea que la DH potencia los efectos negativos producidos por diversos estímulos nocivos entre los que se encuentra los agentes infecciosos en los países menos desarrollados (OMS, 2017) y el alcohol en forma general (Rufer y cols., 2012).

La carencia de hierro afecta a más personas que cualquier otra afección, produciendo trastornos de salud considerados menores, impedimentos al desarrollo físico y cognitivo, mayor riesgo de morbilidad en niños y hasta la muerte prematura. Se considera que la anemia es responsable de un 20% del total de muertes maternas (OMS, 2017).

# Efectos de la DH en el SNC

La DH ocurre comúnmente durante el neurodesarrollo, donde la vida fetal y la infancia temprana son particularmente vulnerables (Georgieff, 2008). La DH fetal ocasiona alteraciones electrofisiológicas entre las que se encuentran deficiencias asociadas a la memoria de reconocimiento auditivo y a las estructuras que median la memoria (por ejemplo, no llegan a discriminar la voz materna de la voz de un extraño). También presentan alteraciones en el temperamento y reflejos anormales, así como un desempeño escolar más pobre durante la infancia (Georgieff, 2008). Efectos similares, aunque de grado variable se han demostrado en DH neonatales producidos por la dieta (Shafir y cols., 2006). Se ha demostrado además que existe una correlación directa entre los efectos de la DH gestacional/neonatal con las fallas observadas en la mielinización y la presencia de retardos sicomotores y mentales (Lozoff y Georgieff, 2006; Beard y cols., 2006; Beard, 2007), la disminución de las habilidades cognitivas y los problemas de comportamiento (Oski y cols., 1983; Grantham-McGregor y Ani, 2003) que se atribuyen en gran parte a alteraciones en la mielinización. Por otra parte, los efectos de la deprivación de hierro durante el desarrollo parecen ser irreversibles en gran parte, pues persisten aún luego de la suplementación posterior (Beard y cols., 2006; Beard, 2007).

En cuanto a las causas, se considera que la DH fetal y neonatal resulta de condiciones sanitarias de la madre que restringen la cantidad de hierro disponible para el hijo (anemia por deficiencia de hierro, tabaquismo,

17

hipertensión, diabetes mellitus) (Siddappa y cols., 2007). Estas condiciones producen una reducción en los depósitos hepáticos de hierro y concentraciones de ferritina sérica anormalmente bajas. La baja concentración de hierro en hígado compromete los niveles cerebrales ya que el hierro es preferentemente derivado a los glóbulos rojos para la síntesis de hemoglobina (Siddappa y cols., 2007). Además, las consecuencias neurológicas de la DH no son dependientes de la anemia y los defectos asociados con deficiencias en la oxigenación y el metabolismo cerebral (Dallman, 1986). Este autor demostró disminución de citocromo c cerebral independiente de la presencia de anemia y propuso que la DH tiene efectos primarios en el tejido cerebral y además que la reducción de las concentraciones de hierro en el tejido cerebral alteran el metabolismo energético mitocondrial produciendo una generación ineficaz de ATP y fallas en la cadena de electrones. Posteriormente se demostró que los efectos de la DH en el cerebro no son homogéneos y que el hipocampo y la corteza frontal son particularmente vulnerables (Lozoff y Georgieff, 2006). La DH tiene efectos a corto y largo plazo sobre el metabolismo de la dopamina probablemente porque el hierro es cofactor de la tirosina hidroxilasa (Shafir y cols., 2006). Las fallas en la mielinización observadas en pacientes fueron luego correlacionadas con concentraciones alteradas de ácidos grasos debido a defectos en la actividad de las enzimas responsables de la síntesis que emplean al hierro como cofactor (Lozoff y Georgieff, 2006; Beard y cols., 2006; Beard, 2007). Además, la DH durante la gestación y lactancia reduce los niveles de BDNF y la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, así como también reduce las células piramidales y granulares presentes en el hipocampo (Ranade y cols., 2013; Lozoff y cols., 2006). Recientemente, Beydoun y colegas (2017) han mostrado en un modelo murino de DH que el fracaso energético compromete procesos altamente dependientes de energía, tales como la arborización dendrítica y la sinaptogénesis en la capa CA1 del hipocampo, reducción en la concentración de la proteína post-sináptica PSD-95 y alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica hipocampal que en conjunto podrían explicar la escasa eficacia sináptica en el área del hipocampo más implicada en el aprendizaje y la memoria (Beydoun y cols., 2017).

Sin embargo, si bien no es sorprendente que la DH cause disfunción cerebral durante el período de deficiencia, aún no se comprende totalmente

porque los efectos de daño persisten aún luego de la suplementación con hierro. Los efectos a largo plazo de la DH se observan aún en la edad adulta en los tres blancos más vulnerables a la falta de hierro: la estructura y función hipocampal, el metabolismo de las monoaminas y la mielinización (Beard y cols., 2003; Jorgenson y cols., 2003; Felt y cols., 2005; Lozoff y Georgieff, 2006). Estos hallazgos parecen sugerir por una parte que la falta de hierro durante los períodos de desarrollo produce alteraciones permanentes que no serán reparadas por la repleción del nutriente en falta. La arquitectura deficiente producida por DH ocasiona una reducción en la LTP y alteraciones en la eficacia sináptica que podrían comprometer el aprendizaje y el desempeño posterior. Los defectos sobre la mielinización también son en gran parte irreversibles aún luego de la reposición de hierro (Beard y cols., 2006; Beard, 2007; Georgieff, 2008). La DH podría alterar además la expresión de genes implicados en cambios dependientes de la experiencia en el SNC incluyendo la plasticidad sináptica. En este sentido, se han identificado algunos genes en cerebro de ratas DH que han permanecido significativamente desregulados por un tiempo significativo (Carlson y cols., 2007). Entre estos genes se encuentra MAP-2 que codifica una proteína de andamiaje importante en la respuesta morfogénica dendrítica a estímulos externos durante la formación de la memoria; BDNF y su receptor TrKB (Carlson y cols., 2007).

En resumen, el metabolismo energético alterado fundamentalmente en corteza e hipocampo, las fallas en algunos sistemas de neurotransmisores y las alteraciones en la mielinización parecen ser los procesos que explican por qué el hierro es necesario para el desarrollo y función adecuados del cerebro.

#### Efectos de la DH en astrocitos

Existe escasa literatura al respecto y los resultados obtenidos no arrojan luz sobre la respuesta astrocitaria. La mayoría de los trabajos reportados emplean la desferroxamina (DFO), un sideróforo que es de amplio uso en la clínica como desintoxicante de hierro y de aluminio. En investigación se emplea como quelante para disminuir la participación de hierro en el daño oxidativo al SNC (di Nicola y cols., 2015). En este sentido se ha demostrado que la DFO participa en la mejora de los daños cerebrales en un modelo *in vitro* de hipoxia isquémica producido por deprivación de oxígeno y glucosa (Zhang y cols.,

2014). En astrocitos, la aplicación de DFO en forma aguda (200 µM, 2h) luego del daño disminuyó la hinchazón celular, retrasó la ruptura de la membrana plasmática y disminuyó la muerte por apoptosis debido a la disminución de los niveles de caspasa-3 clivada y de los ROS generados (Zhang y cols., 2014).

Otros estudios en co-cultivos de astrocitos y fibroblastos tratados con TGF-β, como modelo de cicatriz glial, mostraron que la DFO (10 μM, 7días) disminuyó el número o el tamaño de los acúmulos de astrocitos y fibroblastos al disminuir los componentes de la matriz extracelular. Asimismo, mejoró el crecimiento neurítico de neuronas co-cultivadas sobre los acúmulos de astrocitos y fibroblastos tratados previamente con TGF-β, probablemente debido a la disminución de la concentración de proteínas inhibitorias del crecimiento axonal. Resultados similares fueron obtenidos aplicando DFO sobre una hemisección dorsal de la médula espinal torácica realizada en rata. El tratamiento con DFO redujo la cicatriz, incrementó la regeneración del tracto corticoespinal y mejoró la locomoción (Vogelaar y cols., 2015).

Durante la escritura de este trabajo de tesis surgieron dos publicaciones referentes a los efectos de la DH sobre células gliales cercanas a los astrocitos. Beydoun y cols. (2017) mostraron que los medios condicionados de células de la línea C6 expuestos a DFO (200 µM, 24 h) provocaron la elevación de los niveles totales de hierro en las células endoteliales microvasculares del cerebro humano. Los autores proponen que esta respuesta astrocitaria está mediada por señales solubles que comunican la falta de hierro a las células endoteliales y son capaces además de regular la expresión de los receptores de ferritina en las células endoteliales. Sugieren además, que este podría ser el primer paso para compensar la falta de hierro a nivel cerebral, indicando que los astrocitos pueden actuar como sensores del estatus del hierro cerebral y no solo como reguladores del mismo.

El trabajo de Rosato-Sirí y cols. (2017) muestra que los astrocitos obtenidos de animales con DH fetal y cultivados bajo protocolos que son diferentes a los que empleamos nosotros, presentan una proliferación exacerbada y un fenotipo inmaduro. Los autores han reportado además, incremento de mediadores relacionados a inflamación, sugiriendo una respuesta negativa de los astrocitos inducida por DH.

Por lo tanto, la escasa literatura encontrada sugiere que los astrocitos no

20

presentan una vulnerabilidad a la falta de hierro del nivel presentado por las neuronas y los oligodendrocitos. Sin embargo, parecen sensar los distintos niveles de hierro y modificar parte de su señalización ocasionando posibles efectos en otros tipos celulares.

#### Efectos del EtOH y la DH

Los hijos de madres DH o de madres alcohólicas pueden presentar trastornos cognitivos y comportamentales que incluyen deficiencias atencionales, dificultades de aprendizaje y en las funciones motoras y ejecutivas (Rufer y cols., 2012; Carter y cols., 2014). También presentan alteraciones en la mielinización y en la formación de dendritas y probablemente una neuroquímica cerebral alterada en regiones y sistemas similares (Huebner y cols., 2015). Además, los datos epidemiológicos indican que los peores efectos del alcohol se producen en los contextos más comprometidos donde la deficiencia nutricional está presente usualmente (Rufer y cols., 2012).

Sin embargo, hay escasos reportes sobre la interacción de ambas condiciones, sobre como el alcohol afecta los niveles de hierro, o como los bajos niveles de hierro influyen sobre los efectos del alcohol. Algunos trabajos muestran que el consumo de alcohol prenatal genera deficiencia de hierro en los hijos, aun en madres con niveles normales de hierro. La anemia ferropénica producida por consumo de alcohol durante la gestación se observó en hijos de hasta 12 meses de edad, posiblemente por deficiencia en el consumo, absorción o acumulación de hierro (Carter y cols., 2014). Estudios anteriores en ratas hijas de madres expuestas a alcohol indican que la exposición prenatal al alcohol redujo los niveles de hierro, ferritina y transferrina en la corteza cerebral, el cerebro anterior y el tronco cerebral desde el nacimiento y hasta la edad adulta, sugiriendo que el EtOH es capaz de alterar la homeostasis del hierro en el SNC en forma permanente (Miller y cols., 1995). El alcohol altera además el metabolismo de hierro en alcohólicos adultos (Harrison-Findik y cols., 2006, citado por Huebner y cols., 2016).

Rufer y cols. (2012) estudiaron los efectos de la interacción del alcohol con una dieta DH en el período post natal 4-9 en rata equivalente al tercer trimestre de gestación en humanos (etapa en la cual se genera un crecimiento rápido del cerebro). En el cerebelo se observó que la muerte celular se

21

incrementó por la interacción de ambos factores así como una reducción en el contenido de melina (Rufer y cols., 2012). Se piensa que muchos aspectos de los Desórdenes Asociados al Alcohol resultan de una interacción entre el alcohol y una deficiencia nutricional materna (Rufer y cols., 2012). Sin embargo, poco se sabe de cómo el nivel de hierro afecta el daño generado por el alcohol durante el neurodesarrollo y de sus efectos sobre el hipocampo.

Más recientemente, Huebner y colegas (2015; 2016) mostraron que la deficiencia de micronutrientes es común en mujeres gestantes consumidoras de alcohol y que la DH, como deficiencia más frecuente, empeora el desempeño cognitivo de los hijos luego de la exposición perinatal al alcohol, siendo los circuitos vinculados al aprendizaje (hipocampo y cerebelo) los más afectados funcional y estructuralmente ya que los autores observaron una pérdida significativa de neuronas en ambos circuitos. Los autores mostraron además que la suplementación con hierro, mitiga pero no revierte los efectos, sugiriendo que los niveles normales de hierro son capaces de proteger contra el alcohol y que la deficiencia de hierro es un factor de riesgo que exacerba los daños producidos por alcohol.

# HIPÓTESIS DE TRABAJO

La co-existencia del etanol y la deficiencia de hierro potencian los efectos negativos sobre algunas funciones astrocitarias relacionadas con la homeostasis del SNC, repercutiendo negativamente en la sobrevida de las neuronas y de los oligodendrocitos.

# **OBJETIVO GENERAL**

Aportar al conocimiento de los efectos de la coexistencia del etanol y la deficiencia de hierro sobre el fenotipo astrocitario y su repercusión sobre la viabilidad de neuronas y oligodendrocitos.

# **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1. Evaluar los efectos del etanol sobre los astrocitos.
  - 1.1. Determinar la concentración de trabajo de EtOH.
  - 1.2. Analizar los efectos sobre la reactividad y la proliferación.

- 1.3. Estudiar los efectos sobre los niveles de estrés oxidativo y de retículo endoplasmático.
- 1.4. Analizar la repercusión del tratamiento de astrocitos sobre la viabilidad neuronal.
- Estudiar los efectos conjuntos de etanol y depleción de hierro sobre el fenotipo astrocitario.
  - 2.1. Determinar la concentración de trabajo de DFO
  - 2.2. Seleccionar el paradigma experimental.
  - 2.3. Estudiar la influencia sobre la reactividad y la proliferación.
  - 2.4. Analizar los efectos sobre la funcionalidad mitocondrial.
  - 2.5. Estudiar la influencia sobre los niveles de estrés de retículo endoplasmático y de estrés oxidativo.
  - 2.6. Analizar los efectos sobre la inmunoreactividad de fosfoCREB.
- Analizar los efectos de los astrocitos sometidos a etanol y depleción de hierro en la sobrevida y morfología de neuronas y oligodendrocitos.
  - 3.1. Estudiar los efectos sobre la viabilidad neuronal
  - 3.2. Estudiar los efectos sobre la morfología y la viabilidad de oligodendrocitos.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para realizar esta tesis se emplearon cultivos de astrocitos de corteza de ratas neonatas de la cepa Sprague Dawley (SD) para analizar los efectos del EtOH, la DH y su combinación sobre parámetros astrocitarios vinculados con sus funciones homeostáticas (objetivo 1 y 2) y posteriormente, para analizar los efectos del tratamiento de astrocitos en la sobrevida y morfología de neuronas y oligodendrocitos en co-cultivos o en cultivos mixtos, respectivamente (objetivo 3).

Para ejecutar los objetivos 1 y 2 se realizaron las siguientes actividades:

1. Se analizó la dependencia de la viabilidad astrocitaria con la concentración de etanol.

2. Se evaluaron los efectos de una concentración alta de EtOH (130 mM) sobre algunos parámetros astrocitarios que podrían repercutir sobre la viabilidad

neuronal, pero de los que se tenía escasa información en la literatura disponible. Se realizó la prueba de concepto de que el tratamiento de astrocitos con 130 mM de EtOH disminuye la viabilidad de las neuronas en co-cultivo.

3. Se determinó la dependencia de la viabilidad de astrocitos con la concentración de DFO.

4. Se seleccionaron las concentraciones de trabajo de EtOH y DFO se determinó el modelo experimental a emplear incluyendo los grupos experimentales: i-controles; ii- DFO; iii- EtOH; iv-DFO-EtOH.

| Parámetros  | Abordajes                                   |  |
|---|---|--|
| Morfológicos  |   |  |
| Citoesqueleto de actina   | Faloidina-rodamina//MCC                     |  |
| Citoesqueleto de tubulina   | Anticuerpo específico//MCC                  |  |
| Filamentos intermedios  | Anticuerpo anti-GFAP//MCC                   |  |
| 2º marcador astrocitario  | Anticuerpo anti-S100β//MCC                  |  |
| Funcionales   |   |  |
| Proliferación   | Incorporación de BrdU//ICC anti-BrdU//MCC   |  |
| Viabilidad  | Conteo de núcleos DAPI//MCC                 |  |
|   | Sulforodamina B//Espectrofotometría         |  |
| Potencial mitocondrial  | MT/MCC células vivas//Espectrofotometría    |  |
| Funcionalidad mitocondrial  | MTT// MCC células vivas//Espectrofotometría |  |
| Estrés oxidativo  | Anticuerpo anti-iNOS//WB                    |  |
|   | Monoclorobimano//MCC//Espectrofotometría    |  |
|   | Carboxi-H2DFFDA//Espectrofotometría         |  |
| Estrés de RE  | Anticuerpo anti-BiP//MCC//WB                |  |
| Activación de CREB  | Anticuerpo anti-pCREB//MCC                  |  |
| Abreviaciones: MCC: Microscopía Confocal, BrdU: Bromo deoxi uridina, ICC: Inmunocitoquímica, DAPI: Deamino            |   |  |
| fenil indol, MT: Mitotracker red, MTT: 3(4,5-dimetialdiazo 1-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Inos: Óxido nítrico sintasa |   |  |

Los parámetros y abordajes empleados se resumen en la siguiente tabla:

inducible, WB: Western Blot, BiP: Binding immunoglobulin protein, CREB: cAMP response element binding.

Para realizar el objetivo 2, sobre astrocitos de los cuatro grupos experimentales se sembraron neuronas de hipocampo obtenidas de ratas neonatas, luego se analizó la viabilidad y morfología neuronal a los 3-4 días post-cultivo. Otro grupo de experimentos fue realizado en cultivos mixtos de astrocitos y oligodendrocitos, donde se evaluó sobrevida y morfología de los oligodendrocitos según método de Sholl modificado. Los abordajes empleados fueron:

| Parámetros                     | Abordajes  |
|--------------------------------|--|
| Morfología de neuronas         | Tamaño cuerpo, número y longitud de neuritas//   |
|                                | Microscopía de campo claro (en primeros          |
|                                | experimentos)                                    |
| Viabilidad                     | Número de neuronas por campo//Campo claro        |
|                                | Porcentaje de neuronas positivas a NF200/células |
|                                | totales (DAPI+)                                  |
| Morfología de oligodendrocitos | Sholl modificado                                 |
| Viabilidad de oligodendrocitos | Número por campo//Campo claro                    |

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

# Animales

Los cultivos celulares se realizaron con ratas SD criadas en el bioterio del IIBCE. Los animales fueron albergados en cajas con alimento y agua ad libitum, con un régimen controlado de temperatura y ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se cumplieron las normas vigentes institucionales en conformidad con la Ley de Experimentación Animal (Ley Nº 18.611). Todos los procedimientos experimentales realizados con animales fueron aprobados por el Comité de Ética del IIBCE. Se utilizaron 2-3 animales de cada nacimiento independiente. Se emplearon animales de aproximadamente 12 nacimientos.

# Reactivos

Se emplearon reactivos químicos comerciales puros para análisis (Sigma, Applichem) y aptos para cultivos celulares (Gibco, Invitrogen, PAA). Los anticuerpos empleados provinieron fundamentalmente de abcam, Invitrogen o Sigma. Los insumos generales fueron comprados a proveedores nacionales.

# Cultivos celulares

# Cultivos de astrocitos

El protocolo empleado para la realización de los cultivos primarios de

astrocitos se basó en Saneto y de Vellis (1987) con modificaciones menores para cultivos de astrocitos corticales (Olivera y cols., 2008). Brevemente, se sacrificaron ratas SD de 1 o 2 días de vida por decapitación, se les extrajo el cerebro y se disecó la corteza bajo lupa. Luego de retirar todas las meninges, el tejido se cortó con bisturí y se colectó en tubo Falcon de 15 mL. Posteriormente, se realizó una digestión enzimática agregando 1 mL de solución de tripsinización (0.5% Tripsina-EDTA) y se incubó 25 min a 37°C. El tratamiento enzimático se detuvo con la adición de DMEM + 10% FBS, se agregó 50 µl de ADNasa 1 mg/mL y se completó la disgregación del tejido mecánicamente. La suspensión celular se filtró en una malla de 80 µm, colectándose en un nuevo tubo Falcon de 15 mL. Se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm (Centrífuga CL2, Thermo). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de DMEM +10% FBS. Se contaron las células con cámara de Neubauer y se plaquearon aproximadamente 1,5x10<sup>6</sup> células por botella de 25 cm<sup>2</sup>. Se adicionaron 5 mL de medio de cultivo de astrocitos conteniendo DMEM suplementado con 10% FBS, 3.6 g/l HEPES, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Se incubó la botella en estufa a 37°C, en atmósfera saturada en agua y con 95% aire/5% CO2. Para permitir una correcta adhesión de las células, las botellas no se movilizaron, al menos, por 48 h. Los medios se cambiaron cada dos días hasta confluencia del cultivo. Luego de confluencia, el séptimo día aproximadamente el cultivo mixto fue enriquecido en astrocitos mediante agitación significativa durante 48 h en agitador orbital a 180 rpm que permite el desprendimiento de la microglía y oligodendroglía. Luego, se lavaron las botellas con PBS y se agregó nuevamente DMEM + 10% FBS. El cultivo enriguecido posee más del 95% de determinado previamente astrocitos, tal como se ha mediante inmunocitoquímica para GFAP (Saneto y de Vellis, 1987). Las células se dejaron en reposo hasta el día 14, momento en el que fueron tripsinizadas y replaqueadas para ser empleadas. Para ello, se retiró el medio de cada botella, se enjuagó 2 veces con PBS 10 mM, pH 7.4 y se agregó 1 mL de solución de tripsinización. Se incubó 5 min a 37°C, se agregó 2 mL de DMEM + 10% FBS y las células se resuspendieron mediante pipeteo repetido. La suspensión se recogió en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó 10 min a 1000 rpm. Se contaron las células con cámara de Neubauer y se plaquearon entre 2500028000 cel/ mL en vidrios cortados a la medida para cada pocillo de placas de 24 a 96 pocillos.

El sustrato para el cultivo enriquecido en oligodendrocitos se preparó utilizando polilisina 0.1mg/mL en agua de cultivo estéril y se sembró 10 µL por cada pocillo. Se incubó en estufa de cultivo toda la noche a 37°C. Al día siguiente se lavó 3 veces con agua de cultivo estéril y se dejó secar bajo campana de flujo laminar. Este sustrato se utilizó dentro de las 3 semanas de preparado (Olivera-Bravo y cols., 2011).

#### Cultivo primario de oligodendrocitos

Para la realización de cultivos de oligodendrocitos se empleó el protocolo de Yang y cols. (2005) con pequeñas modificaciones. Se partió de un cultivo mixto de células gliales de neonatos preparado de la misma forma que el cultivo de astrocitos. Cuando el cultivo llegó a confluencia se agitó en agitador orbital durante 1 a 2 h para desprender la microglía. Posteriormente, se cambió el medio y se dejó agitando a 180 rpm toda la noche. Se retiró el medio y se centrifugó por 10 min a 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de DMEM + 10% FBS. Se contaron las células con cámara de Neubauer y se plaquearon en multipocillos de 24 o en vidrios colocados en cada pocillo que fueron previamente tratados con polilisina 0.1 mg/mL. Al día siguiente del plaqueo, el medio de cultivo se retiró completamente y se adicionó Neurobasal + 2% B27 + 10 ng/mL de PDGFAA. Tres días después, el medio se sustituyó por Neurobasal + 2% B27 y se realizaron los distintos tratamientos.

### Cultivos mixtos astrocitos-oligodendrocitos

Se empleó el protocolo para obtención de oligodendrocitos aislados (Yang y cols., 2005). Sin embargo, la agitación realizada no permitió la separación de oligodendrocitos de los astrocitos, lo que pudo ser constatado solo días después de sembrar las células recogidas en el sobrenadante de la agitación. Los denominamos cultivos mixtos astrocitos-oligodendrocitos dada la relación astrocito:oligodendrocito observada en dichos cultivos.

#### Obtención de la suspensión de neuronas hipocampales

Se realizó la disección y retiro de las meninges de los hipocampos de 2 ratas SD de 1 a 3 días de vida. Los hipocampos limpios se colocaron en 1 mL de medio Neurobasal conteniendo 2% de B27 y 2% de FBS. Luego se procedió a la disgregación mecánica mediante pipeteo repetido con pipeta Pasteur de vidrio. Se contaron las neuronas y se llevaron a una dilución final de 300000 neuronas/mL.

#### Co-cultivo de astrocitos y neuronas

Luego de realizar el tratamiento de todas las condiciones experimentales, se removió totalmente el medio de las monocapas de astrocitos y se adicionó medio de cultivo fresco (DMEM + 10% FBS) para evitar el contacto directo de las neuronas con alcohol o DFO. Luego de 3 a 6 h, el medio se retiró completamente y se colocó la mitad de medio de co-cultivo (Neurobasal + 2% B27 +2% FBS) durante al menos 2 h. Este medio se retiró completamente inmediatamente antes de sembrar 100 µl de una dilución de alrededor de 300.000 neuronas/mL sobre la monocapa de astrocitos en multiwell de 24 o 500 µl en placa de Petri de 35 mm. Se dejó incubar en estufa entre 20 y 30 min para favorecer la adhesión de las neuronas a los astrocitos. Se completó el volumen de medio hasta 400 µl finales por cada multiwell de 24 o 1500 µl por cada placa de Petri de 35 mm. Tres o cuatro días después, los co-cultivos fueron fijados con paraformaldehído (PAF) 4% y observados por microscopía de luz (Olivera-Bravo y cols., 2015) o empleados para inmunocitoquímica.

# **Tratamientos**

#### Determinación de la concentración de trabajo de EtOH

En base a la bibliografía disponible se seleccionó un rango de concentraciones de 0 a 500 mM (Guerri y cols., 2001; Wilheml y Guizzetti, 2016) para tratar a los astrocitos y analizar los efectos sobre su viabilidad y funcionalidad mitocondrial mediante ensayos de sulforrodamina B (Voigt, 2005) y (3(4,5-dimetialdiazo 1-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT (Mathers y Roberts, 1998; Olivera y cols., 2008). El tiempo de tratamiento de EtOH seleccionado

fue 24 h porque es usual en la literatura y porque permite observar cambios en el fenotipo y la funcionalidad astrocitaria de acuerdo a los resultados del grupo.

# Determinación de la concentración de trabajo de DFO

La DFO es un sideróforo que se obtiene de la bacteria Streptomyces pilosus y es usado ampliamente en la clínica y en la investigación como quelante de hierro en diferentes modelos experimentales. En el organismo, la DFO es capaz de combinarse con el hierro férrico de los depósitos de ferritina y hemosiderina y en mucho menor grado con el hierro complejado con la transferrina. La DFO no se une con el hierro de la hemoglobina, la mioglobina o los citocromos. Aproximadamente 1 g de DFO se combina con 85 mg de hierro férrico según el único reporte encontrado (Heras Ballestero y cols., 1995).

En base a los datos bibliográficos se seleccionó un rango de concentraciones de 0-200  $\mu$ M y de tiempos (2 h a 7 días) (Erikson y Aschner, 2006; Vogelaar y cols., 2015) de DFO para tratar los cultivos de astrocitos. Luego se analizaron los efectos sobre la viabilidad y funcionalidad mitocondrial mediante sulforrodamina B y (3(4,5-dimetialdiazo 1-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT).

# Determinación del modelo experimental para analizar los efectos conjuntos de DFO y EtOH

Se realizó un proceso secuencial que constó de varios pasos: determinación de las relaciones dosis-respuesta para EtOH y DFO en astrocitos confluentes, selección de las concentraciones y los tiempos de tratamientos, análisis de los efectos de todas las condiciones experimentales sobre astrocitos, oligodendrocitos, neuronas. Se planificaron cuatro grupos experimentales: i- controles (sin tratamiento); ii- DFO; iii- EtOH; iv-EtOH-DFO.

# <u>Análisis realizados</u>

# Evaluación de viabilidad celular mediante conteo de núcleos

Cultivos de astrocitos confluentes fueron tratados con diferentes concentraciones de DFO (0 – 200  $\mu$ M) durante 24 y 96 h, o con EtOH (0-500 mM) durante 24 h. Posteriormente, se fijaron durante 20 min con PAF 4% y se

lavaron con PBS 10 mM, pH 7.4. Para analizar la viabilidad, se adicionó 1 μg/mL de diaminofenilindol (DAPI) a las células fijadas durante 5 min. La señal se visualizó mediante fluorescencia empleando el láser UV de 405 nm y captando la emisión entre 430 y 460 nm. Se tomaron fotos de 5 campos de cada condición experimental realizada por triplicado y se contaron los núcleos empleando la aplicación Cell Counter del programa IMAGE J.

### Ensayo de viabilidad celular mediante sulforrodamina B

Este ensayo se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Sigma). La sulforrodamina B (SRB) permite medir la biomasa total tiñendo las proteínas celulares por unión electrostática y en forma dependiente del pH (Voigt, 2005). La SRB se une en condiciones ácidas a las proteínas celulares, se extrae en condiciones básicas y se solubiliza antes de realizar la medida de absorbancia a 490 y 530 o 565 y 690 nm.

Para realizar este ensayo, los cultivos tratados con diferentes concentraciones de EtOH (0-500 mM), DFO (0-200 µM) o DFO-EtOH fueron fijados con ¼ de volumen de ácido tricloroacético (TCA) 50% (w/v) y se dejaron incubando por 1 h a 4 ºC. Posteriormente, se lavó varias veces con agua destilada para remover el TCA. Se dejó secar a temperatura ambiente al menos una noche. Cuando las células estuvieron secas, se agregó 50 µl de 0,4% de SRB en ácido acético 1% para cubrir la superficie del cultivo y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar el período de tinción, se realizaron varios lavados rápidos con 1% de ácido acético y se dejó secar totalmente a temperatura ambiente. Una vez completamente seco, se incorporó 100 µL de TRIS 10 mM a cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min con agitación suave para permitir la completa disolución del precipitado coloreado. A continuación, se leyó la absorbancia a 490, 530, 565 y 690 nm en Varioskan. Se graficó absorbancia neta restando la lectura de fondo correspondiente (565-690 nm o 490-530 nm) a cada concentración utilizada. Cada condición se analizó por quintuplicado y se repitió el experimento entre 3 y 5 veces.

#### Estudio de la actividad mitocondrial de astrocitos mediante MTT

En las células estrictamente dependientes de la funcionalidad mitocondrial, el ensayo del (3(4,5-dimetialdiazo 1-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT) que evalúa la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada es un indicador consensuadamente aceptado de viabilidad celular (Levitz y Diamond, 1985). En cambio en astrocitos, el ensayo de MTT es utilizado para estimar la funcionalidad mitocondrial y no la sobrevida, ya que estas células poseen rutas metabólicas alternativas que permiten su supervivencia (Olivera y cols., 2008).

El principio de la técnica es el siguiente: el MTT (amarillo soluble) es captado por las células y reducido por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble (formazán) de color azul violáceo. El formazán queda retenido en las células y se libera mediante su disolución con DMSO (Mathers y Roberts, 1998). El desarrollo de color se mide espectrofotométricamente y es un indicador de la funcionalidad mitocondrial en el caso de los astrocitos y no de sobrevida dada sus rutas metabólicas alternativas (Magistretti y cols., 2006).

Las células se incubaron con 0,8 mg/mL de MTT durante 30 min a 37 °C en estufa de cultivo hasta la formación de los acúmulos oscuros intracelulares (Olivera y cols., 2008). Cuando el colorante comienza a detectarse extracelularmente, la reacción se detiene aspirando el medio y adicionando 120 µL DMSO a cada pocillo. Entre los 10 y 30 min siguientes, se lee absorbancia a 570 nm con filtro de referencia a 630 nm (Varioskan R Flash, Thermo Scientific). Cada condición se hizo por triplicado y se repitieron entre 3 y 5 veces. Otros grupos de células de las distintas condiciones experimentales con MTT fueron observados al microscopio de luz para observar la formación intracelular de los precipitados en tamaño y localización compatible con la presencia de mitocondrias.

#### Evaluación del potencial mitocondrial empleando MitoTracker red (MT)

En condiciones normales la membrana mitocondrial presenta una diferencia de voltaje, siendo el interior negativo y el exterior positivo. Se ha reconocido que la pérdida de potencial de membrana es un evento temprano en la apoptosis (lijima, 2006) en células dependientes principalmente de la

fosforilación oxidativa. La pérdida de potencial mitocondrial parece ser además un indicador temprano de disfunción mitocondrial en astrocitos (Robb y cols., 1999).

El compuesto *MitoTracker red* (Invitrogen) permite evaluar el potencial y la integridad de la membrana mitocondrial en células vivas (Buckman y cols., 2001). Esta sonda fluorescente es capaz de permear la membrana celular y acumularse en las mitocondrias en forma dependiente del potencial mitocondrial ya que posee un residuo clorometilo que es medianamente reactivo a los tioles y permite su unión a las mitocondrias. En células con mitocondrias correctamente polarizadas, una vez agregado al medio en concentraciones menores a 1  $\mu$ M, este colorante se acumula en la matriz mitocondrial formando agregados que fluorecen a 644 nm (rojo). La estabilidad de los agregados fluorescentes permite su observación mediante imagenología o su estimación mediante espectrometría.

Para evaluar el potencial mitocondrial de los cultivos de astrocitos en las distintas condiciones experimentales, se retiró el medio de cultivo, se enjuagó rápidamente con PBS tibio y se adicionó durante 15 min PBS glucosado completo conteniendo 100 nM de MT. Luego se retiró el colorante y las células se mantuvieron en PBS glucosado. Se midió la absorbancia a 590 nm en el espectrofotómetro Varioskan R Flash. Cada condición experimental se hizo por triplicado y se repitieron entre 3 y 5 veces en forma independiente.

Otros grupos de células fueron montados en PBS y observados inmediatamente en el microscopio confocal empleando el láser He-Ne de 633 nm para observar la emisión en el rojo lejano. Se obtuvieron imágenes de 5 campos de cada condición experimental manteniendo las condiciones de adquisición en todos los casos. Se evaluó luego intensidad de fluorescencia roja por unidad de área empleando el programa Image J.

# Análisis de los niveles de glutatión en astrocitos

El glutatión es la principal defensa antioxidante soluble de las células (Chatterjee y cols., 1999; Miller y cols., 2010). Su capacidad neuroprotectora se analiza en función de la relación entre glutatión oxidado (GSSG) y glutatión reducido (GSH). Cuando las células están expuestas a altos niveles de estrés oxidativo la concentración de GSSG aumenta y por consiguiente la relación

glutatión oxidado/glutatión reducido se hace mayor. Una técnica que se utiliza para medir GSH en células en cultivo consiste en adicionar monoclorobimano (MCB) al medio de cultivo. MCB es un compuesto heterocíclico no fluorescente que al conjugarse con tioles, como el GSH, aumenta su eficiencia cuántica y fluoresce a 460-490 nm (azul) (Chatterjee y cols, 1999). La reacción se considera selectiva para el GSH ya que el MCB se une con baja afinidad a otros tioles celulares.

Para realizar este ensayo, cultivos de astrocitos tratados con las diferentes condiciones experimentales se enjuagaron con PBS tibio y se adicionó 40 µM de MCB disuelto en PBS conteniendo glucosa 20 mM. Las células se incubaron 20 min en oscuridad a 37 °C en estufa con 95% aire/ 5% CO<sub>2</sub>, luego se retiró el PBS completo+ MCB y se agregó 200 µL de PBS + 0,1 % Tween 20. La emisión 460-490 nm se leyó por fluorimetría luego de una excitación a 390 nm (Varioskan R Flash). Cada condición se hizo por triplicado y se realizaron entre 3 y 5 experimentos independientes.

Otro grupo de células de las distintas condiciones experimentales fueron montados en PBS y observados en el microscopio confocal Olympus FV300 empleando el diodo de 405 nm como fuente de excitación y con filtro de emisión a 420 nm. Las imágenes fueron adquiridas manteniendo los parámetros de adquisición iguales en todas las condiciones experimentales. Se evaluó intensidad de la señal por unidad de área empleando Image J.

#### Análisis de los niveles de diclorodifluoroacetato en astrocitos

La sonda carboxi-acetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (carboxi-H2DFFDA) atraviesa la membrana es hidrolizada por esterasas intracelulares perdiendo el grupo acetato y pasando a diclorofluoresceína (DCFH) que en presencia de ROS se convierte a la forma oxidada (DCF) que es fluorescente (Schwarzer y cols., 2007) y cuya intensidad de señal es dependiente de los niveles de peróxido formado.

Para proceder al ensayo, se cambió el medio de las placas de 96 pocillos conteniendo astrocitos en todas las condiciones experimentales por PBS glucosado conteniendo 5 µM carboxy-H2DFFDA. Se incubó durante 1 h en estufa de cultivo (Olivera-Bravo y cols., 2011). Luego se agregó 1 µg/mL DAPI, las células se enjuagaron y se midió fluorescencia a 405 y 488 nm en el

equipo Varioskan institucional. La medida de DCF fue normalizada por la medida obtenida a 405 nm (DAPI) ya que fue empleada como indicador de densidad celular. Cada condición se hizo por triplicado y se realizaron entre 3 y 5 experimentos independientes.

#### Análisis de los tratamientos sobre la proliferación astrocitaria

Los astrocitos pueden sufrir cambios en la tasa de proliferación en respuesta a distintas condiciones de daño del SNC (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010). Para evaluar si los distintos tratamientos realizados en este estudio afectan la proliferación, analizamos la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) en todas las condiciones experimentales. El BrdU es un nucleósido sintético análogo a la timidina que mientras está biodisponible se incorpora al ADN de las células que estén en la fase S del ciclo celular (Knapp, 1992). Para realizar los ensayos, se agregó BrdU (1µg/mL) el mismo día que se trató con EtOH. A las 24 h, las células se fijaron con PAF 4% para preservar su integridad estructural. Luego se realizó una permeabilización en condiciones estándares (30 min, temperatura ambiente, Triton X-100 0.3%) para permitir la entrada de anticuerpos o reactivos fluorescentes (DAPI) y reconocimiento los posibilitar del de antígenos correspondientes. Posteriormente, se desnaturalizó el ADN incubando con HCI 2N durante 45 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células con PBS 10 mM, pH 7.4 repetidas veces y luego se incubaron con anticuerpo anti-BrdU monoclonal (1:800 en BSA 5%, Dako) a 4°C, toda la noche en cámara húmeda. Luego se continuó con el protocolo estándar de inmunocitoquímica (ver más adelante). Se estimó la tasa de proliferación de astrocitos contando el número de células que incorporaron BrdU respecto al número total de células marcadas con DAPI y expresándolas como porcentaje (% BrdU+/DAPI+).

# Inmunocitoquímica

Esta técnica permite la identificación y localización de antígenos de interés en las células en cultivo mediante una reacción específica del antígeno presente en la muestra y el anticuerpo selectivo aportado por el ensayo (Cruickshank y Currie, 1958). El empleo de anticuerpos conjugados a marcas fluorescentes permite además el análisis simultáneo de dos o tres antígenos

presentes en una misma muestra. El procedimiento estándar consta de pasos básicos consistentes en la fijación, permeabilización, bloqueo e incubación de la muestra con anticuerpos primarios selectivos para los antígenos de interés y anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos estándares. La fijación facilita el mantenimiento de la estructura, la permeabilización permite la llegada de los anticuerpos a los epítopes no superficiales, el bloqueo permite obtener una señal más específica disminuyendo la probabilidad de ocurrencia de "falsos positivos". El bloqueo puede realizarse con el suero de la especie donde se desarrolló el anticuerpo o en forma más general empleando albúmina de suero bovino (BSA) que compite con los anticuerpos por los sitios de unión inespecíficos.

El procedimiento general empleado fue el siguiente: las células se fijaron con PAF 4% durante 20 min y se lavaron con PBS 10 mM, pH 7.4, 3 veces durante 5 min cada vez. Se permeabilizó durante 20 min con Tritón 0,3%, se bloqueó 30 min a temperatura ambiente con PBS 10 mM, pH 7.4 conteniendo 5% de BSA. Luego se incubó con los anticuerpos primarios para reconocer marcadores de citoesqueleto de astrocitos (GFAP 1:400; S100
ß 1:500; tubulina 1:500, Sigma), de estrés oxidativo (iNOS 1:300 abcam), de estrés de retículo (BiP/GRP78 1:300 abcam), fosfoCREB (1:500 abcam). Las neuronas fueron reconocidas con un anticuerpo monoclonal que reconoce a los neurofilamentos de 200 kDa (1:300, Sigma). Luego de la incubación con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4ºC en cámara húmeda, las células se lavaron 3 x 10 min en PBS 10 mM y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados a sonda fluorescentes que se excitan y emiten en distintas longitudes de onda. Generalmente se empleó 1:800 anti-ratón Alexa Fluor 488 (Invitrogen) solo o en conjunto con 1:800 anti-conejo Alexa Fluor 546 (Invitrogen) o Alexa Fluor 633 (Invitrogen). Luego de una incubación de 90 min a temperatura ambiente, las células se lavaron 3 veces durante 10 min con PBS y se montaron en glicerol 30% conteniendo DAPI (1µg/ml). Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal (Olympus BX61, FluoViewTM FV300) con láseres de excitación 405, 488, 543 y 633 nm.

#### Análisis del citoesqueleto de actina

La faloidina es un compuesto purificado del hongo Amanita phalloides

que presenta alta afinidad por la actina fibrilar sobre la globular, con alta estabilidad y especificidad (Lengsfeld y cols., 1974). Para realizar esta tinción, las células fijadas con PAF 4% de las distintas condiciones experimentales fueron permeabilizadas durante 20 min con Triton X-100 0.1%. Luego se lavaron con PBS y se expusieron a una dilución 1:250 de faloidina-rodamina (Invitrogen) durante 20 min a temperatura ambiente. Se enjuagaron dos veces con PBS 10 mM, pH 7.4 durante 2 veces y se montaron en glicerol: DAPI. Se observaron inmediatamente en microscopio confocal empleando el láser 543 nm (Olivera y cols., 2008). Cada condición se realizó por triplicado y en 3 experimentos independientes.

#### Análisis de la viabilidad de neuronas en co-cultivos astrocitos-neuronas

Durante la puesta a punto del protocolo con EtOH, 3-4 días después de realizado el co-cultivo, se tomaron fotografías de campo claro de 7 a 9 campos elegidos al azar por cada placa de Petri de 35 mm. Las neuronas que se contaron fueron aquellas de apariencia saludable que presentaban dos o más neuritas con al menos dos veces el diámetro del cuerpo. Se evaluó tamaño celular, longitud y número de neuritas en al menos 9 neuronas por cada campo fotografiado.

Para realizar la cuantificación del número de neuronas por campo o como porcentaje de células totales, además de la evaluación por microscopía de luz, se empleó el anticuerpo anti-neurofilamento 200 (Sigma) y se evaluaron las células positivas presentes en 7 a 9 campos. Las células totales se evaluaron por DAPI. Cada condición se analizó por triplicado, cada uno de 3 a 5 experimentos independientes. Se realizó el promedio del número de neuronas por campo para cada condición experimental.

# Análisis de la viabilidad y morfología de los oligodendrocitos en cultivos mixtos con astrocitos.

4 a 5 días después de realizadas las 4 condiciones experimentales, las células fueron fijadas con PAF 4% y se fotografiaron 7 a 9 campos elegidos al azar a 60x y en campo claro. Se contaron todas las células que se encontraran sobre la monocapa de astrocitos y que tuvieran apariencia de oligodendrocitos (cuerpos pequeños y con numerosos procesos claramente diferentes a los
astrocitos, Yang y cols., 2005). Cada condición se analizó por triplicado en 3 a 5 experimentos independientes. Se realizó el promedio del número de oligodendrocitos por campo para cada condición experimental.

El análisis de la morfología de los oligodendrocitos se realizó con una modificación del método de Sholl presente en el programa libre Image J. Para ello, se determinó el diámetro de cada célula a analizar y se realizaron medidas del número de procesos e intersecciones presentes en círculos realizados hasta 5 diámetros celulares. Se contaron 20-25 células por cada condición realizada por triplicado y en 3 a 5 experimentos separados e independientes.

## Análisis de la expresión de proteínas por Western blot

Los niveles de expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la chaperona BiP/GRP78 se evaluaron mediante la técnica de Western blot. El aumento de BiP es un indicador consensuado de estrés de retículo endoplasmático (RE) (Rashid y cols., 2015) ya que se produce como un requerimiento para unirse a la cantidad creciente de proteínas mal plegadas presentes en el lúmen del RE cuando hay estrés. Por tanto, el aumento de la disponibilidad de BiP es un intento de recuperar el funcionamiento normal de la célula (Bánhegyi y cols., 2007).

La técnica de Western blotting posibilita la detección y evaluación semicuantitativa del nivel de expresión de proteínas de interés (Mahmood y Ping-Chang, 2016). Para su realización se requiere la extracción de proteínas, cuantificación de proteínas, desnaturalización de proteínas, armado de los geles, corrida electroforética, electrotransferencia a la membrana de PVDF, incubación con anticuerpos y revelado. Para realizar el análisis de Western blotting deben realizarse los siguientes pasos:

## Extracción de proteínas

Placas de Petri de 35mm de diámetro conteniendo astrocitos en todas las condiciones experimentales se enjuagaron dos veces con PBS 10 mM, pH 7,4 y luego se rastrillaron con 100 µL de buffer de lisis conteniendo 50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0.5% Tritón X-100 y una pastilla de la mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma). Se trabajó sobre hielo para evitar la degradación de las proteínas debido a la acción de las proteasas.

Posteriormente, las muestras se sonicaron (3 pulsos de 3 segundos cada uno) para romper las membranas celulares y liberar el contenido celular y fueron cuantificadas antes de proceder a su desnaturalización.

# Cuantificación de las proteínas totales

Se realizó de acuerdo a la técnica del ácido bicinconínico, cuyo principio consiste en la formación de un complejo Cu2+-proteína, en condiciones alcalinas, con la consiguiente reducción del ión Cu2+ a Cu+. El ión Cu+ reacciona con el BCA formando un complejo púrpura intenso que presenta una absorbancia máxima a 562 nm (Smith, 1987). Para obtener valores absolutos de concentración de proteínas, se realizó una curva de calibración estándar, preparando seis diluciones desde 0,25 mg/mL hasta 2 mg/mL a partir de un estándar de 10 mg/mL de BSA en PBS 10 mM, pH 7,4. Se colocó el mismo volumen de todas las muestras por duplicado en una microplaca de 96 pocillos, 10 µL de las muestras problema, los estándares de BSA y el blanco (buffer de lisis) y se agregaron 150 µL de solución BCA: sulfato cúprico (1:50) en cada pocillo. La placa se colocó en estufa a 37ºC durante 30 min y luego se midió la absorbancia a 562 nm en el lector de microplacas Varioskan. Posteriormente, se graficaron los datos de absorbancia en función de las concentraciones estándar de BSA, se ajustaron los puntos a una recta y se determinó el coeficiente de regresión, determinándose una aceptabilidad mínima en R<sup>2</sup>> 0,98. En función de dicha curva, se calcularon las concentraciones de proteína de las muestras problema.

### Desnaturalización de las proteínas

La desnaturalización de las proteínas consiste en la pérdida de su estructura nativa, secundaria y terciaria, lo cual es necesario para lograr su separación en función solamente del peso molecular. Para lograr la correcta conservación y completa desnaturalización de las proteínas de las muestras, se utilizan agentes preservantes, reductores y surfactantes presentes en el buffer de carga. En nuestro caso, empleados un buffer de carga que contiene dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris base,  $\beta$ -mercaptoetanol y azul de bromofenol (Díaz-Amarilla y cols., 2011). El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza y se une a las proteínas de forma estequiométrica. Los complejos

SDS-proteína adoptan una forma única desplegada y un valor carga/masa constante y por lo tanto se separan de acuerdo a su tamaño cuando migran desde el cátodo al ánodo a una velocidad relacionada con su peso molecular. El Tris actúa como buffer de pH, lo cual es muy importante en los sistemas de electroforesis discontinua que requieren un pH específico. El glicerol hace a la muestra más densa y permite que ésta permanezca en el fondo del pocillo y no se disperse. El azul de bromofenol permite seguir y controlar la corrida puentes disulfuros intra е intercatenarios permitiendo lograr la desnaturalización completa de las proteínas.

A las muestras enriquecidas en proteínas ya cuantificadas, se agregó  $\frac{1}{4}$  de volumen total de buffer de carga 5x conteniendo 15% SDS; Tris 0,3 M, pH 6,8; 25 % glicerol; 1,5 M  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,01% de azul de bromofenol). Las muestras se dejaron 5 min a 95°C en termobloque y se guardaron a -20°C hasta su sembrado en el gel.

## Armado de los geles

prepararon dos geles, un gel concentrador (stacking gel que Se contiene 4% poliacrialmida y es levemente ácido (pH 6,8)) y un gel separador (resolving gel 10 o 12% de poliacrilamida, básico (pH 8,8)). La concentración de acrilamida empleada determina el tamaño de los poros del gel, a mayor concentración, menor es el tamaño del poro. Primero se preparó el gel separador, se adicionó de forma uniforme isopropanol para evitar la deshidratación y se aguardó su polimerización. Se retiró el isopropanol totalmente, se adicionó el gel concentrador y se colocó el peine de plástico para formar los carriles correspondientes. Luego de la polimerización del gel separador, los geles se pasaron al soporte de electroforesis, se colocaron adentro de la cuba y se añadió buffer de corrida 1x (30.3 g/L Tris, 14.4 g/L glicina, 10 g/L SDS) en un volumen aproximado de 700 mL para 2 geles suficiente para cubrir totalmente el área entre el par de geles. Se retiró el peine de cada gel y se sembraron las muestras en los pocillos con una jeringa Hamilton. Se sembró entre 20 y 40 µg de proteína por carril y 5 µL del marcador de peso preteñido (Thermo Scientific) en 1 o 2 carriles. El marcador de peso molecular permite monitorear la corrida electroforética, verificar la

eficiencia de transferencia y estimar el tamaño de las proteínas de interés. Las corridas se realizaron a 60 mA con voltaje libre durante un tiempo aproximado de 3:30 horas. Cuando el frente de corrida abandona el gel, la electroforesis se finaliza.

## Electrotransferencia (blotting) a la membrana de PVDF

Mediante el procedimiento de electrotransferencia las proteínas son transferidas desde el gel a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) gracias a la acción de un campo eléctrico que es orientado perpendicular a la superficie del gel. Para realizar tal transferencia, se cortó una membrana de PVDF del tamaño del gel (5.6 cm x 8.4 cm), se sumergió 2 min en metanol 100% y se lavó con buffer de transferencia. Se armó el "sándwich" con el gel y la membrana de PVDF en un casquete de plástico sumergido en el buffer de transferencia respetando el siguiente orden: esponja (polo positivo) - 3 papeles de filtro - membrana - gel - 3 papeles de filtro - esponja (polo negativo). Se quitaron las burbujas de aire con la ayuda de un rodillo, especialmente las que se formaron entre la membrana y el gel y se cerró el sándwich que fue colocada en el dispositivo de electrotransferencia vertical que contenía buffer de transferencia (3.03 g/L Tris, 14.4 g/L glicina, 0.2 l/L etanol 95%). Se agregó hielo y agitación moderada para prevenir los aumentos de temperatura durante la transferencia. La transferencia se realizó a 300 mA y voltaje libre (en promedio, 150 V); durante un tiempo aproximado de 1 h 15 min.

Para controlar la eficacia de transferencia, la membrana se incubó 4 min en Rojo Ponceau 1x. Este colorante se une de forma inespecífica a la totalidad de proteínas presentes que han sido transferidas a la membrana. Luego, el Rojo Ponceau debe ser eliminado, lavando repetidamente la membrana con TBS-Tween 0.1%. Cuando la membrana queda incolora se procede al bloqueo de los anticuerpos.

#### Bloqueo e incubación con anticuerpos

El paso de bloqueo evita que los anticuerpos y otras proteínas involucradas en la detección se peguen inespecíficamente a la membrana y de esta manera disminuye el riesgo de tener un elevado "background" o falsos positivos (Kurien y Scofield, 2006). Para bloquear la membrana, se incubó 1 h a temperatura ambiente y agitación suave, con leche descremada 5% en TBS-Tween 0.1%. Posteriormente, se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal anti-βactina (1:4000, Sigma) como control de carga, anti-iNOS (1:1000 abcam) y anti-GRP78 (1:1000, abcam). Luego de la incubación de los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron con TBS-Tween 0.1% (3x 10 min) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario correspondiente (anti-ratón o anti-conejo) conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Se lavó con TBS-Tween 0.1% y se procedió a revelar por quimioluminiscencia.

## Revelado mediante quimioluminiscencia enzimática (ECL)

El revelado se basó en una reacción enzimática empleando fosfatasa alcalina y HRP para oxidar un sustrato luminiscente. La reacción quimioluminiscente ocurre cuando la energía de una reacción química se emite en forma de luz. En particular, HRP, en presencia de peróxido de hidrógeno, cataliza la oxidación del luminol. Este compuesto al oxidarse, pasa a un estado excitado que al retornar a su estado basal, emite luz. Esta reacción se produce sobre una membrana que vela una película de autorradiografía cuando entra en contacto con ella.

Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios, la membrana de PVDF se incubó con una mezcla de los reactivos 1 y 2 de ECL (Pierce Western Blotting substrate) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Luego de 2-3 min de incubación, se retiró el excedente de los reactivos, se envolvió en papel film y se colocó dentro de un cassette junto con la placa autorradiográfica durante 10 min aproximadamente. Luego se reveló manualmente con revelador y fijador comerciales (Química Cenit, SA).

#### Análisis estadístico

El procesamiento de todas las imágenes de microscopía de fluorescencia y de Western blotting, la cuantificación de las áreas, número de células e intensidades de fluorescencia por unidad de área, se realizó con el programa Image J (NIH, USA). Todos los resultados que se muestran han sido obtenidos por la realización de 2-5 experimentos independientes cada uno por triplicado o quintuplicado. El análisis estadístico se realizó con el test *t* de

Student o ANOVA de una vía utilizando el programa Sigma Stat versión 2.0 u Origin 8.5. Si es necesario, se empleó el test de rangos de Tukey *post hoc* de acuerdo a las sugerencias del programa estadístico empleado. Se consideró significación estadística cuando p<0.05. Los datos mostrados en las gráficas corresponden a la media  $\pm$  DE (desviación estándar).

# RESULTADOS

# I.- EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL EtOH SOBRE LOS ASTROCITOS I.1.- Determinación de la concentración de trabajo de EtOH

El tratamiento de cultivos confluentes de astrocitos con concentraciones crecientes de EtOH en el rango de concentraciones reportado en la literatura mostró efectos sobre la viabilidad celular y la funcionalidad mitocondrial mediante los ensayos de SRB y MTT. La viabilidad de los astrocitos disminuyó medida que aumentó la concentración de EtOH alcanzando а aproximadamente el 50% de su valor original a una concentración mayor a 260 mM. Las concentraciones de 100 y 130 mM de etanol mostraron una viabilidad de 80% y 70% respectivamente (Fig. 3).



Fig. 3. Efectos del EtOH sobre la viabilidad astrocitaria. Se muestran los valores de absorbancia relativos al control, obtenidos en astrocitos confluentes tratados con distintas concentraciones de EtOH durante 24 h y analizados con SFRB. Los valores muestran la media  $\pm$  SD. Las diferencias fueron estadísticamente significativas a concentraciones mayores a 180 mM (\*, p<0.05).

El ensayo de MTT mostró que al aumentar la concentración de EtOH, los astrocitos disminuyen gradualmente su actividad mitocondrial y que llegan al

50% de la actividad en condiciones control a concentraciones de EtOH cercanas a 260 mM. Para los valores de concentración de 100 y 130 mM la actividad mitocondrial correspondió al 57% y 54% respecto al valor original (Fig. 4).



Fig. 4. Efectos del EtOH sobre la funcionalidad mitrocondrial de astrocitos Se muestran los valores de absorbancia (% del control) determinados en astrocitos confluentes tratados con distintas concentraciones de EtOH durante 24 h y analizados mediante la técnica de MTT. Los valores muestran la media  $\pm$  SD. Las diferencias fueron estadísticamente significativas para concentraciones  $\geq$ 100 mM (p<0.05).

Los resultados obtenidos con las dos aproximaciones empleadas indican que a concentraciones iguales o mayores a 130 mM de EtOH no hay efectos sobre la viabilidad de los astrocitos pero si sobre la funcionalidad mitocondrial, lo que es compatible con los datos de la literatura que indican que los astrocitos presentan rutas metabólicas alternativas que compensan la disfunción mitocondrial y permiten su supervivencia (Magistretti y cols., 2006; Maragakis y Rothstein, 2006). Por tanto, ésta concentración ha sido empleada para realizar el análisis de los efectos del EtOH sobre astrocitos sobre los parámetros astrocitarios que consideramos de interés para la sobrevida neuronal y de los que disponemos de escasa información.

## I.2.- Efectos de EtOH 130 mM sobre astrocitos en cultivo

Cultivos confluentes de astrocitos de corteza fueron tratados durante 24 h con EtOH 130 mM. Luego de ese tiempo, las células fueron fijadas para realizar ensayos de inmunocitoquímica, levantadas en buffer de lisis para realizar Western blotting o sometidas a ensayos bioquímicos de funcionalidad.

# I.2.1. Análisis de los efectos sobre la reactividad y la proliferación

Como los pilares fundamentales de la reactividad astrocitaria son los cambios morfológicos y el aumento de proliferación (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010; Pekny y cols., 2014), en primera instancia se evaluó el efecto del EtOH sobre ambos procesos. Para conocer los efectos del EtOH sobre la morfología y el citoesqueleto de astrocitos se realizó inmunocitoquímica para GFAP, que es la principal proteína de los filamentos intermedios, para S100β, una proteína de unión al calcio que es considerada un marcador prototípico de astrocitos inmaduros, tubulina que es la proteína que se une a los microfilamentos de actina.

Luego de 24 h de tratamiento con EtOH 130 mM no se observaron cambios por microscopía de luz en la morfología de los astrocitos, los que conservaron la disposición en monocapas y las formas poliédricas con escasos procesos y sin variaciones evidentes en el tamaño (Fig. 5A). Asimismo, la inmunomarcación de tubulina y la marcación con faloidina no mostraron diferencias luego del tratamiento con EtOH (Fig. 5B-C).

En cambio, se evidenció un aumento significativo de la inmunomarcación para GFAP en los astrocitos tratados con EtOH 130 mM respecto al control. No hubo cambios significativos en la señal de S100β y la relación de señales GFAP/S100β exhibió una tendencia al aumento que sugiere una reactividad clásica asociada con incrementos de la inmunoreactividad para GFAP (Fig. 6).

Los efectos del EtOH sobre la proliferación de astrocitos se evaluaron adicionando BrdU 1 µg/mL al medio de cultivo en el mismo momento del tratamiento con EtOH. Luego de 24 h, se realizó la inmunocitoquímica y se determinó la tasa de proliferación definida como el porcentaje de células BrdU positivas respecto de las células totales (% cél BrdU+/cél DAPI+). La tasa de proliferación mostró una tendencia al aumento en los astrocitos tratados con EtOH del orden del 20% (Fig. 7). CONTROL

EtOH 130 mM



**Fig. 5. Efectos del EtOH sobre el fenotipo astrocitario I.** A) Las fotos de luz muestran que el tratamiento con EtOH no produjo cambios morfológicos que sugieran cierto grado de reactividad típica en astrocitos tratados respecto de sus controles. B) Tampoco se observaron modificaciones significativas en la señal de tubulina ni en la de faloidina que evidencia el citoesqueleto de actina C). Las imágenes son representativas de todos los resultados obtenidos.



**Fig. 6. Efectos del EtOH sobre el fenotipo astrocitario II.** A) El tratamiento con EtOH aumentó la inmunorreactividad para GFAP y no pareció alterar la de S100 $\beta$ . No se observaron cambios morfológicos evidentes. B) La cuantificación de la densidad de intensidad de cada señal (*mean gray value, MGV*) muestra un aumento significativo de la señal para GFAP luego del tratamiento con EtOH y ausencia de efectos sobre la de S100 $\beta$ . Se representa la media±DE de 3 experimentos independientes. \*: p<0.05.



Fig. 7. Efectos del EtOH sobre el fenotipo astrocitario III. A) El tratamiento con EtOH produjo un aumento de la incorporación de BrdU (rojo). B) La cuantificación de la relación núcleos BrdU+/ núcleos totales DAPI+ indica una tendencia al aumento del orden del 20%. Se representa la media  $\pm$  la DE (n=5). Barra = 50 µm.

## I.2.2. Efectos sobre los niveles de estrés oxidativo y de RE

El EtOH es capaz de inducir estrés oxidativo en cultivos de astrocitos

mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, depleción de glutatión, inducción de la óxido (iNOS) v de nítrico sintasa la ciclooxigenasa 2 (Alfonso-Loeches, 2014; Guizzetti y cols., 2014). Aunque no parece ser un inductor poderoso de estrés de retículo endoplasmático (ER), el EtOH fue capaz de exacerbar el estrés de RE inducido por tunicamicina 0 tapsigargina (Chen y cols., 2008). Los astrocitos tratados con EtOH 65 y 130 mM durante 24 h mostraron una tendencia al aumento de la marcador RE expresión del de **BiP/GRP78** (Fig. 8). No se observaron cambios en la expresión de iNOS.



Fig. 8. Efectos del EtOH sobre estrés oxidativo y de retículo endoplasmático. A) Señales de WB de BiP/GRP78 y de iNOS obtenidas en un experimento. B) Cuantificación de las áreas de las bandas de BiP relativas al área de actina en un experimento con cada condición por duplicado mostrando una tendencia al aumento. No hubo significación estadística luego de realizar 3 experimentos independientes.

# I.2.3. Repercusión del tratamiento de astrocitos sobre la viabilidad neuronal

Como el EtOH inhibe enzimas antioxidantes como la glutation reductasa y potencia algunos inductores de estrés oxidativo (Alfonso-Loeches, 2014; Guizzetti, 2014) que podrían ocasionar muerte neuronal, se analizaron los efectos de astrocitos tratados con 130 mM de EtOH sobre la viabilidad de neuronas de hipocampo. Se sembró igual número de neuronas sobre astrocitos control o pre-tratados con EtOH y a los 3 días se evaluó la densidad neuronal (número de neuronas viables/área pocillo) en cada condición. Se observó una disminución significativa luego del pre-tratamiento con EtOH del orden del 20%. El tratamiento de astrocitos con EtOH no produjo cambios en la morfología neuronal (Fig. 9).



**Fig. 9. Efectos sobre la viabilidad neuronal de la respuesta astrocitaria al EtOH.** Las imágenes muestran el menor número de neuronas supervivientes sobre la monocapa de astrocitos tratados con EtOH. La gráfica muestra el promedio de neuronas supervivientes en cada condición. \*: p<0.05, n=5.

El conjunto de estos resultados muestra que EtOH 130 mM produce efectos negativos sobre los astrocitos provocando un fenotipo potencialmente neurotóxico que se caracteriza por la tendencia al aumento de la proliferación, de la expresión de GFAP y del estrés de retículo que parece ser suficiente para dañar neuronas.

# **II. EFECTOS CONJUNTOS DE DFO Y ETOH SOBRE ASTROCITOS**

#### II.1. Determinación de la concentración de trabajo de DFO

Para estudiar los efectos de la deficiencia de hierro en astrocitos empleamos la DFO que es capaz de combinarse con el hierro en forma estable produciendo la depleción de la forma libre de hierro. Para determinar la concentración de trabajo de DFO se comenzó empleando el rango de concentraciones reportado en la literatura (Erikson y Aschner, 2005; Vogelaar y cols., 2016). Como además los efectos podrían ser pasajeros debido al contenido de hierro presente en el medio de cultivo (0.1 mg/mL como nitrato férrico, fuente Invitrogen), se realizaron incubaciones de cultivos confluentes de astrocitos con concentraciones crecientes de DFO (0, 25, 50,100 y 200 μM) durante 24 y 96 h. Luego se determinó la viabilidad celular por conteo directo del número de núcleos y mediante espectrometría empleando el método de la SFRB.

El conteo directo del número de núcleos DAPI para la misma área en cada condición experimental indica que el número de núcleos disminuyó de forma creciente al aumentar la concentración de DFO tanto a las 24 como a los 96 h. Sin embargo, la disminución fue mayor cuando el cultivo fue expuesto a DFO durante 96 h (Fig. 10A). El ensayo de viabilidad con la SRB determinó que luego del tratamiento con DFO (0, 2, 5, 10, 25, 50,100 y 200 µM) durante 96 h hubo una disminución de la viabilidad a medida que aumentó la concentración de DFO. No se observaron cambios en la viabilidad respecto al control en cultivos tratados por 24 h (Fig. 10B). Dado que los datos de conteo directo podrían tener sesgos debido al operador y que los resultados de SRB presentaron menor dispersión decidimos tomar estos como referencia. Por esta razón, la concentración de trabajo seleccionada fue 25 µM para 96 h de tratamiento.



**Fig. 10. Determinación de la concentración de trabajo de DFO.** A) Número de núcleos DAPI determinados luego de la exposición de astrocitos confluentes a distintas concentraciones de DFO durante 24 (gráfica izquierda) y 96 horas (gráfica derecha). B) Ensayo de SFRB en astrocitos confluentes sometidos a DFO durante 24 y 48 horas. Se observa una tendencia una tendencia a la disminución de la biomasa total a las 96 horas a medida que aumenta la concentración de DFO.

# II.1.2. Selección del paradigma experimental

Dados los efectos observados en astrocitos tratados con EtOH y con DFO en forma separada, hemos decidido evaluar los efectos combinados de ambos empleando una concentración de 100 mM que produce efectos sobre la funcionalidad astrocitaria según los resultados anteriores y 25 µM DFO ya que es un valor donde la viabilidad astrocitaria parece preservarse teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la SRB. Esta concentración está en el orden de las empleadas en tratamientos largos (Vogelaar y cols., 2015). Se ha seleccionado un tiempo de tratamiento de 96 h para mimetizar una falta de hierro sostenida en el tiempo. 24 h de tratamiento con EtOH parecen ser un tiempo razonable para mimetizar una exposición única y está en el rango de tiempo de los tratamientos reportados en la literatura (Guerri y cols., 2001;

Guizzetti y cols., 2014; Wilhelm y Guizzetti, 2016). El protocolo seleccionado que se esquematiza en la figura 11.

| DFO   |   | DFO   | EtOH |             |
|-------|---|-------|------|-------------|
| 25 µM |   | 25 µM | 100  | mM Fijación |
| L     | Μ | Mi    | J    | V           |

Fig. 11. Esquema de tratamiento conjunto DFO-EtOH en astrocitos confluentes. El día lunes se procede al cambio de medio total, se reemplaza por medio nuevo conteniendo DFO 25  $\mu$ M. El procedimiento se repite el miércoles. El jueves se adiciona EtOH a una concentración final de 100 mM y el viernes se procede a la fijación o realización de los experimentos bioquímicos o co-cultivo.

# II.2. Influencia sobre la reactividad y la proliferación

La reactividad astrocitaria se caracteriza por cambios morfológicos y en la proliferación (Maragakis y Rothstein, 2006; Sofroniew y Vinters, 2010). Los posibles cambios morfológicos fueron evaluados analizando el citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina y mediante inmunocitoquímica empleando anticuerpos contra S100β, GFAP y tubulina en todas las condiciones experimentales.

La disposición de los filamentos de actina no mostró cambios significativos en ninguna condición experimental, la cuantificación de la intensidad de la señal por unidad de área no mostró cambios estadísticamente significativos entre las distintas condiciones experimentales (Fig. 12).

La inmunocitoquímica para tubulina, mostró un descenso significativo de la señal luego de la incubación con DFO que no fue observado en la condición DFO-EtOH (Fig. 13). La inmunorreactividad para S100β y GFAP no varió en grado significativo respecto del control en todas las condiciones experimentales. Sin embargo, se observó una tendencia (estadísticamente no significativa) al aumento en la señal de GFAP en astrocitos tratados con DFO, mientras que el tratamiento con EtOH indujo una tendencia a la baja. La relación entre las inmunorreactividades GFAP/S100β también fue mayor para la condición DFO aunque no alcanzó significación estadística para p<0.05 (Fig. 14).



**Fig. 12. Marcado con faloidina en las distintas condiciones experimentales.** A) El tratamiento con DFO produjo una disminución de la intensidad de la señal cuando se obtuvieron las imágenes con las mismas condiciones de adquisición. B) Cuantificación de la intensidad de la señal de faloidina por unidad de área (*mean gray value*, MGV). La disminución de la señal luego del tratamiento con DFO no fue estadísticamente significativa luego de realizar 5 experimentos independientes todos por duplicado.



Fig. 13. Señal de la tubulina. A) Inmunocitoquímica para tubulina en todas las condiciones experimentales. No se observaron cambios en la morfología astrocitaria. B) Cuantificación de la media  $\pm$  DE de la señal de tubulina mediante Image J en tres experimentos independientes. Se observa una disminución significativa del MGV luego del tratamiento con DFO. \*: p<0.05.

# S100<sub>β</sub>/GFAP/DAPI





El análisis de los efectos de DFO-EtOH sobre la proliferación se realizó por inmunocitoquímica luego de adicionar BrdU al momento del tratamiento con EtOH. Los astrocitos tratados con EtOH presentaron una tendencia al aumento de la proliferación del 25%. En cambio, los astrocitos tratados con DFO presentaron una tendencia a la disminución de la tasa de proliferación y la disminución fue estadísticamente significativa para DFO-EtOH (Fig. 15).



**BrdU/DAPI** 



#### II.3. Efectos sobre la funcionalidad mitocondrial

Se evaluó el potencial y la actividad mitocondrial de los astrocitos de las distintas condiciones experimentales mediante los ensayos de MT y MTT. Las imágenes confocales obtenidas en astrocitos vivos de las 4 condiciones experimentales no muestran cambios en la señal de MT, aunque pareciera haber una mayor condensación de la marca en los astrocitos tratados con DFO-EtOH (Fig. 16A). Los datos obtenidos midiendo MT por espectrometría a 590 nm muestran una disminución no significativa del potencial mitocondrial en los astrocitos tratados con EtOH del 15% y del 20% para los tratados con DFO-EtOH respecto del control (Fig. 16B).

Los ensayos de MTT en astrocitos tratados con DFO o EtOH en forma separada no mostraron diferencias respecto del control (Fig. 17A). Los puntos oscuros presentes en las células evidencian mitocondrias con el compuesto reducido (formazán). Se evidencian menos puntos en la condición DFO-EtOH. La cuantificación de la señal de MTT mediante espectrometría, confirma que los astrocitos tratados con DFO-EtOH presentaron una disminución significativa de la señal correspondiente a MTT reducido (Fig. 17B).

## II.4. Influencia sobre los niveles de estrés de RE y de estrés oxidativo

Se empleó el marcador de estrés de RE, BiP7/GRP78 por Western blotting (Fig, 18) y por inmunocitoquímica (Fig. 19) en todas las condiciones experimentales. Pese a que los resultados de WB e inmunocitoquímica parecen ser contrapuestos en algunas condiciones, no se observaron cambios significativos ni en la inmunoreactividad ni en el nivel de expresión en ninguna de las condiciones de tratamiento.

Para evaluar estrés oxidativo se analizaron en las distintas condiciones experimentales los niveles de glutatión, la primer defensa antioxidante celular que es principalmente astrocitaria (Maragakis y Rothstein, 2006) y los niveles de diclorodifluoresceína (DCF) que indica estrés oxidativo (Halliwell y Whiteman, 2004). Las imágenes indican que los astrocitos de todas las condiciones sintetizaron glutatión en concentraciones suficientes para formar aductos con el MCB. Se observó una tendencia a la disminución que no alcanzó significación estadística en DFO-EtOH tanto por imagenología como por espectrometría (Fig. 20A, B).

56



Fig. 16. Efectos de DFO y EtOH en el potencial mitocondrial. A) Imágenes de microscopía confocal de astrocitos vivos de todas las condiciones experimentales marcados con la sonda vital MitoTracker red (MT). B) Intensidad de emisión de los astrocitos de todas las condiciones experimentales incubados con MT. No se observan cambios estadísticamente significativos entre las distintas condiciones experimentales. La gráfica representa los valores obtenidos en 5 experimentos independientes.



Fig. 17. Efectos de DFO y EtOH sobre la actividad mitocondrial. A) Imágenes de campo claro de astrocitos de todas las condiciones experimentales incubados con MTT. (B) Gráfico de absorbancia obtenida de ensayos de MTT en astrocitos de todas las condiciones experimentales. Se observó disminución significativa de la absorbancia en la condición DFO-EtOH.



Fig. 18. Ausencia de efectos de DFO y EtOH sobre los niveles de BiP/GRP78. A) Bandas positivas para BiP/GRP78 y βactina en homogenatos de astrocitos de todas las condiciones experimentales. B) Cuantificación de las áreas de la señal de BiP relativa a la de β-actina para cada condición experimental. La gráfica muestra el promedio obtenido en 3 experimentos independientes.



DFO y EtOH sobre el nivel de estrés de retículo endoplasmatico. A) Las imágenes muestran la inmunorreactividad (rojo) para **BiP/GRP78** en las distintas condiciones experimentales. Se empleó tubulina (verde) para identificar la localización de la señal de BiP/GRP78. B) Cuantificación de la intensidad por unidad de área de la señal de BiP/GRP78 en todas las condiciones. No se observaron diferencias significativas. Se graficó el promedio de 3 experimentos separados e independientes.

Fig. 19. Efectos de







**Fig. 20. Niveles de glutatión y DCF en astrocitos tratados con DFO y EtOH.** A) Las imágenes muestran los aductos glutatión-MCB en todas las condiciones experimentales. B) Valores de emisión del aducto glutatión-MCB a 488 nm mostrando una disminución no significativa en la condición DFO-EtOH. C) Los valores de emisión de DCF en todas las condiciones experimentales no muestran diferencias significativas. Ambas gráficas muestran la media ± DE de 3 experimentos independientes realizados por quintuplicado.

# II.5. Análisis de los efectos sobre la inmunoreactividad de fosfoCREB

Se reporta que la actividad de CREB (elemento de respuesta a AMP cíclico) juega un rol clave en la promoción de la sobrevida neuronal (entre otros potenciando la síntesis de BDNF, Walton y Dragunow, 2000) y está involucrada en mecanismos subyacentes a la memoria y el aprendizaje. CREB es activada por fosforilación (Walton y Dragunow, 2000; Ryu y cols., 2005). La inmunocitoquímica para pCREB en las distintas condiciones experimentales mostró una clara disminución de la señal nuclear en astrocitos tratados con EtOH mientras que las otras condiciones no mostraron diferencias significativas respecto al control (Fig. 21).



Fig. 21. Efectos de DFO y EtOH sobre la señal de pCREB. A) Señal nuclear de pCREB en todas las condiciones experimentales, mostrando disminución de la intensidad luego del tratamiento con EtOH. B) La medida de la intensidad de señal por unidad de área mostró una disminución significativa causada por EtOH. Se araficó la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes. \*: p<0.001.

# III. EFECTOS DEL TRATAMIENTO DE ASTROCITOS CON DFO Y EtOH SOBRE LA VIABILIDAD DE NEURONAS Y OLIGODENDROCITOS

## III.1. Efectos sobre la viabilidad neuronal

Para llevar a cabo estos experimentos, se sembró igual número de neuronas de hipocampo sobre astrocitos de todas las condiciones experimentales (Fig. 22). Luego de 3 días de co-cultivo, no se observaron efectos significativos sobre la morfología neuronal en ninguna de las condiciones experimentales.



Fig. 22. Efectos del pre-tratamiento de astrocitos con DFO y EtOH sobre neuronas en co-cultivo. Las imágenes de campo claro muestran neuronas sobre monocapas de astrocitos de todas las condiciones experimentales. Se observa una disminución en el número de neuronas pero la morfología neuronal no parece sufrir cambios significativos. Magnificación: 32x.

La evaluación del número de neuronas viables/campo y del porcentaje de neuronas respecto de las células totales en cada condición se realizó luego del reconocimiento de las neuronas mediante inmunocitoquímica para neurofilamento pesado (NF200) (Fig. 23A). Se observó una disminución significativa del número de neuronas/campo luego del pre-tratamiento de astrocitos con EtOH (p<0.05) y con DFO-EtOH (p<0.01). DFO produjo una tendencia a disminuir el número de neuronas viables. El pre-tratamiento DFO- EtOH produjo efectos significativamente mayores que los producidos por DFO y EtOH en forma separada (Fig. 23B). El porcentaje de neuronas viables respecto de las células totales mostró una disminución significativa en todas las condiciones respecto al control (Fig. 23C).





**Fig. 23. Efectos del pretratamiento de astrocitos con DFO y EtOH sobre la viabilidad neuronal.** A) Imágenes de microscopía confocal de co-cultivos de astrocitos y neuronas de todas las condiciones experimentales. Las neuronas se reconocieron con el anticuerpo anti-NF200 que fundamentalmente marcó el cuerpo neuronal pero no las neuritas. B) Número de neuronas/campo en todas las condiciones. EtOH y DFO-EtOH produjeron una disminución significativa respecto del control. Todas las imágenes fueron tomadas en iguales condiciones de adquisición, resolución y magnificación para asegurar que el área de cada campo fuera igual. C) Porcentaje de neuronas respecto al número de células totales (DAPI+) en cada condición experimental. En todas las condiciones hubo una disminución significativa del porcentaje de neuronas respecto del control (\*, p<0.05). Las gráficas muestran la media ± DE de 3 y 5 experimentos independientes realizados por triplicado.

## III.2. Efectos sobre la morfología y viabilidad de oligodendrocitos

Dado que no se obtuvieron cultivos primarios de oligodendrocitos, los ensayos se realizaron en cultivos de oligodendrocitos con un porcentaje significativo de astrocitos. En estos cultivos se reconocieron oligodendrocitos con dos morfologías diferentes: oligodendrocitos multipolares (Bjartmar, 1998) que presentan muchas prolongaciones de longitud media, finas y muy ramificadas, presentes fundamentalmente en los cultivos sin tratamiento (Fig. 24, flechas negras). Otros oligodendrocitos a los que denominamos escasamente ramificados presentaron prolongaciones más largas, pero menos numerosas y poco ramificadas (Fig. 24, flechas blancas) y fueron particularmente abundantes luego del tratamiento con DFO.



Fig. 24. Efectos de DFO y EtOH sobre cultivos enriquecidos en oligodendrocitos. Las imágenes de campo claro muestran las dos morfologías predominantes: los oliaodendrocitos multipolares (flechas negras) y los oligodendrocitos escasamente ramificados (flechas blancas). El tratamiento con EtOH y con DFO parece alterar los oligodendrocitos predominantemente de una morfología determinada. Magnificación: 60x.

La cuantificación del número total de oligodendrocitos en los cultivos mixtos de todas las condiciones experimentales muestra que DFO y DFO-EtOH produjeron una disminución significativa del orden del 20% (Fig. 25A). Se observó además una tendencia a la disminución del porcentaje de oligodendrocitos multipolares luego del tratamiento con DFO o EtOH y una disminución significativa luego del tratamiento con DFO-EtOH (Fig. 25B). El porcentaje de oligodendrocitos escasamente ramificados tendió a aumentar en dichas condiciones y aumentó significativamente en DFO y DFO-EtOH. La razón entre los oligodendrocitos multipolares y los escasamente ramificados disminuyó al 50% en la condición DFO-EtOH sugiriendo una vulnerabilidad mayor de los oligodendrocitos multipolares (Fig. 25C).

El análisis de Sholl del patrón de ramificaciones de los oligodendrocitos en las diferentes condiciones experimentales que se realizó midiendo el número de prolongaciones e intersecciones desde el borde del soma hasta el fin de la prolongación más larga muestra una disminución del número de ramificaciones en los distintos tratamientos (Fig. 25D).



**Fig. 25. Efectos de DFO y EtOH sobre cultivos mixtos enriquecidos en oligodendrocitos.** El tratamiento DFO-EtOH produjo una disminución significativa del número de oligodendrocitos totales respecto al control (\*: p<0.05). B-C) Los oligodendrocitos más afectados parecen ser los multipolares que presentaron una disminución significativa del porcentaje respecto de los oligodendrocitos ramificados (#: p<0.01). D) El número de interesecciones estimadas de acuerdo a Sholl muestra una disminución del número de ramificaciones cortas en las condiciones DFO y EtOH. Sin embargo los oligodendrocitos supervivientes en la condición DFO-EtOH presentan un número similar de ramificaciones que los controles. Las gráficas muestran la media ± DE de 5 a 7 experimentos independientes. El análisis de Sholl se realizó en 20-25 oligodendrocitos por cada condición.

# DISCUSIÓN

Este trabajo fue diseñado para conocer y caracterizar los efectos combinados de la deficiencia de hierro y el EtOH en cultivos de astrocitos corticales de rata e iniciar el conocimiento de la repercusión de este co-tratamiento sobre la morfología y la viabilidad de neuronas y oligodendrocitos de hipocampo.

Para ejecutar los objetivos planteados realizamos la determinación de la dosis-respuesta de la viabilidad y la funcionalidad mitocondrial de astrocitos con respecto a la concentración de EtOH y determinamos 130 mM como la concentración de trabajo inicial. Con esta concentración realizamos una caracterización primaria de los efectos sobre astrocitos y determinamos que fue suficiente para impactar negativamente en la viabilidad de neuronas en co-cultivadas sobre astrocitos pretratados con EtOH.

Posteriormente analizamos la dosis-respuesta de la viabilidad de astrocitos con DFO y observamos efectos a concentraciones similares a las reportadas en la literatura para tiempos largos de exposición. Con base a los resultados obtenidos, elegimos a 25 µM como la concentración de trabajo.

Dado que pretendíamos analizar posibles efectos sinérgicos entre las dos condiciones y los cambios producidos por EtOH 130 mM podrían enmascarar los efectos producidos por DFO, decidimos emplear EtOH 100 mM como concentración de trabajo.

El tiempo de tratamiento seleccionado fue de 72 h de pre-tratamiento con DFO 25  $\mu$ M y 24 h adicionales de DFO 25  $\mu$ M y EtOH 100 mM. Este diseño experimental pretendió mimetizar una situación de DH persistente a la que se suma una exposición única de EtOH a alta concentración.

Luego de realizar la caracterización de los efectos de DFO y EtOH sobre parámetros que consideramos relevantes para la sobrevida y la funcionalidad astrocitaria, analizamos los efectos sobre la viabilidad de neuronas cocultivadas sobre astrocitos de las distintas condiciones experimentales y sobre la morfología y la viabilidad de oligodendrocitos presentes en cultivos mixtos enriquecidos.

Los principales resultados obtenidos para el objetivo 1 (la exposición de 24 h a EtOH 130 mM) fueron los siguientes:

-no se afectó la morfología astrocitaria ni el citoesqueleto de actina o tubulina,

-se observó un aumento significativo en la señal de GFAP,

-se indujo una tendencia no significativa al aumento del estrés de RE,

-la viabilidad de neuronas en co-cultivo disminuyó significativamente.

Los resultados obtenidos en el objetivo 2 (tratamiento de 96 h de DFO 25 µM con las últimas 24 h en presencia de EtOH 100 mM) observados fueron: -la disminución significativa de la proliferación y de la funcionalidad mitocondrial evaluada por MTT,

-una tendencia no significativa estadísticamente a la disminución del potencial mitocondrial y de los niveles de glutatión además de una tendencia no significativa al aumento de la expresión e inmunoreactividad de BiP/GRP78 y de los niveles de DCF;

-la recuperación de la inmunoreactividad para pCREB comparado con EtOH;

67

En lo que respecta al objetivo 3, los datos obtenidos indican que:

-la viabilidad de neuronas co-cultivadas sobre astrocitos pretratados 96 h con DFO 25 μM y las 24 h últimas con EtOH 100 mM disminuyó significativamente. La morfología neuronal no pareció afectarse al menos en grado evidente al evaluar inicialmente tamaño, número y longitud de neuritas en imágenes tomadas por microscopía de campo claro;

-la viabilidad y la morfología de oligodendrocitos presentes en cultivos mixtos enriquecidos se afectó en las condiciones DFO y DFO-EtOH.

#### Efectos del EtOH sobre cultivos de astrocitos

Estudios previos han reportado efectos negativos del EtOH sobre los astrocitos. Trabajos de hace un tiempo reportan que concentraciones del orden de 50 a 100 mM son capaces de inducir la fragmentación del ADN y producir la muerte de astrocitos (Holownia y cols., 1997). Por su parte, las concentraciones altas (mayores a 150 mM) parecen bloquear el ciclo celular en Go/G1, impidiendo la entrada a la fase S y por tanto disminuyendo el número de células mitóticas (Guizzetti y Costa, 1995). Otros reportes muestran que concentraciones clínicamente relevantes (10-100 mM) interfieren en la transducción de las señales astrocitarias, principalmente las que involucran el inositol fosfato (Guizzetti y Costa, 1995) y la activación de la fosfolipasa D (PLD). La PLD activada hidroliza fosfatidilcolina produciendo colina y ácido fosfatídico que es capaz de activar moléculas involucradas en la señalización de la proliferación (Kotter y Klein, 1999). Parece que el alcohol es capaz de alterar la señalización y la activación de la PLD pues compite con el sustrato de la PLD ocasionando que se sintetice fosfatidiletanol en lugar de ácido fosfatídico impidiendo así la activación de moléculas de señalización involucradas en la proliferación, el tráfico y la sobrevida celular (Guerri y cols., 2001; Guizzetti y cols., 2014; Wilhelm y Guizzetti, 2016).

Nuestros resultados indican que las concentraciones que generaron una tendencia a la disminución en la viabilidad celular y la funcionalidad mitocondrial de astrocitos (100 y 130 mM) se corresponden con los niveles de alcohol en sangre que los alcohólicos pueden mantener cierta sobriedad y la responsabilidad de su comportamiento, según los datos obtenidos en pacientes que llegan a la emergencia hospitalaria debido a distintos inconvenientes (Urso y cols., 1981). Por otra parte, el aumento en la expresión de GFAP que hemos observado luego del tratamiento de 24 h concuerda con los reportes que muestran aumentos iniciales de GFAP (Guerri y cols., 2001), a los que este mismo grupo atribuye a efectos directo sobre los astrocitos y no como respuesta a un daño neuronal primario en un modelo de alcoholismo en roedores. Dado nuestro paradigma experimental, solamente podemos aportar evidencia sobre un efecto directo del EtOH sobre astrocitos pero no podemos compararlo con la respuesta producida en el SNC y menos descartar que un efecto secundario causado por daño neuronal, liberación de citoquinas proinflamatorias o daño de los vasos sanguíneos cerebrales (Wilhelm y Guizzetti, 2016), pueda contribuir al aumento de GFAP. La tendencia -no significativa estadísticamente- al aumento de la expresión de la proteína BiP/GRP78 que es un indicador consensuado de estrés de RE (Rashid y cols., 2015) parece estar de acuerdo con los datos obtenidos por Ke y cols. (2011) que reportaron que el EtOH induce estrés de RE en neuronas inmaduras durante el neurodesarrollo en diversas regiones cerebrales (Ke y cols., 2011).

La disminución significativa del número de neuronas en los co-cultivos de astrocitos pretratados con EtOH 130 mM concuerda con los datos reportados por Guizzetti y cols. (2010). Sin embargo, a diferencia de estos autores que reportan una reducción en la neuritogénesis, no observamos cambios significativos en la morfología neuronal en ninguna de las condiciones experimentales. Probablemente, el hecho de emplear neuronas postnatales P1-P3 en lugar de las neuronas embrionarias E21 que emplean los autores pueda explicar en parte los efectos diferentes.

Por otra parte, los resultados obtenidos donde el tratamiento de astrocitos solamente y el retiro y lavado del EtOH antes de la siembra de las neuronas indica que los astrocitos expuestos a EtOH son capaces de afectar directamente a las neuronas. Así, los astrocitos podrían participar en el daño neuronal reportado por alcohol, incluyendo la disminución en el número de neuronas y en la plasticidad morfológica en el hipocampo de crías de ratas expuestas al alcohol durante el período de gestación (Berman y Hannigan, 2000) y/o en las alteraciones en la morfogénesis neurocortical y cerebelosa observada (Fernández-Mayoralas y Fernández-Jaén, 2011).

#### Efectos de la DFO sobre los astrocitos

Más allá de la disparidad de resultados obtenidos con los distintos métodos para evaluar viabilidad que hemos discutido en resultados, el tratamiento de los astrocitos con DFO 25 µM durante 96 h fue suficiente para alterar algunos parámetros astrocitarios, fundamentalmente asociados al citoesqueleto de los astrocitos. El resultado más significativo desde el punto de vista estadístico parece ser la disminución de la señal de tubulina, la que podría interpretarse como una señal protectora ya que hemos observado aumento de la inmunoreactividad de tubulina en astrocitos aberrantes obtenidos en el laboratorio (Jiménez-Riani y cols., 2017). La DFO produjo efectos importantes que no alcanzaron significación estadística, probablemente por la dispersión entre experimentos) en el citoesqueleto de actina reconocido por faloidina lo que podría implicar alteraciones en la agregación de actina y en el equilibrio actina polimerizada y en monómeros que podría alterar el transporte intracelular de proteínas tal como ha sido descripto por el grupo de Guerri y cols. (2001) en astrocitos sometidos a EtOH. Alteraciones en el citoesqueleto de actina podrían participar además la localización y funcionalidad de organelos cruciales como las mitocondrias como se ha observado en los (Jiménez-Riani cols., 2017). astrocitos aberrantes y Otro efecto estadísticamente no significativo de la DFO sobre astrocitos ha sido la tendencia a la disminución de la proliferación que se asemejaría a los efectos reportados por EtOH en astrocitos (Guerri y cols., 2001).

# Efectos de DFO-EtOH en astrocitos, neuronas y oligodendrocitos

Los efectos de la DH en astrocitos en cultivo son poco conocidos y bastante contradictorios. Se reportan efectos positivos (Robb y cols., 1999; Zhang y cols., 2014; Vogelaar y cols., 2015) y efectos negativos (Rosato-Siri y cols., 2017) dependiendo del abordaje experimental, de la concentración de quelante y del tiempo de tratamiento. En nuestros experimentos empleamos DFO como quelante de hierro a una concentración que es mucho menor a las empleadas en ensayos cortos (Zhang y cols., 2014, Beydoun y cols., 2017), pero es del orden de las utilizadas en ensayos *in vitro* de 1 semana (Vogelaar y cols., 2015). Esta concentración (25 µM) no pareció afectar significativamente

la viabilidad y la funcionalidad astrocitaria pero pareció volver al astrocito más vulnerable al EtOH sugiriendo sinergia en algunos parámetros funcionales.

En este sentido, los resultados obtenidos muestran que la coexistencia de ambas condiciones produjo efectos peores que las condiciones aisladas en la mayoría de los parámetros funcionales evaluados, entre los que se destaca la disminución significativa de la funcionalidad mitocondrial. Sin embargo, aunque no hubo una disminución significativa del potencial mitocondrial, ni de los niveles de glutatión ni un aumento significativo de BiP/GRP78 y de DCF cuando los observamos por separado, la suma de todas estas alteraciones no significativas podría tener efectos deletéreos sobre las neuronas u oligodendrocitos. Además de la adopción de un fenotipo glicolítico que es menos trófico y aporta menos soporte anaplerótico a las neuronas que es producido por la depolarización mitocondrial (Magistretti y cols., 2006), los cambios en todos los parámetros mencionados configuran un empeoramiento de las funciones astrocitarias vinculadas a la protección y al mantenimiento de la homeostasis (Chatterjee y cols., 1999; Miller y cols., 2010; Maragakis y Rothstein, 2006: Sofroniew y Vinters, 2010).

En este sentido Robb y colegas (1999) sostienen que aunque la quelación de hierro podría ser positiva durante tiempos cortos como ha sido reportado, el mantenimiento de la DH en astrocitos puede volverse nocivo debido a la disminución de la cantidad de hierro disponible para las reacciones de óxido-reducción y participar en el daño al SNC (di Nicola y cols., 2015). Además, la escasez mantenida de hierro libre podría afectar la funcionalidad de las enzimas que lo emplean como cofactor incluyendo las que pertenecen a la ruta de las pentosas fosfato, una vía alternativa que los astrocitos podrían emplean cuando sus mitocondrias se depolarizan (Dhur y cols., 1989).

De acuerdo con el empeoramiento de los parámetros funcionales de los astrocitos tratados con DFO-EtOH se observó una disminución de la sobrevida neuronal mediada por la respuesta astrocitaria en los co-cultivos astrocitos-neuronas. Esta acción fue mediada por astrocitos ya que descartamos una la acción directa de DFO o EtOH sobre las neuronas porque el medio fue retirado, los astrocitos mantenidos en otro medio y luego recién se sembraron las neuronas.

En general la condición con peores resultados resultó ser la coincubación DFO-EtOH sugiriendo que el empeoramiento de la funcionalidad astrocitaria impacta en forma proporcional sobre la viabilidad neuronal, lo que está de acuerdo con reportes anteriores (Guerri y cols., 2001; Guizzetti y cols., 2010; 2016). En este sentido, la recuperación de la inmunorreactividad de una señal protectora como pCREB involucrada en la supervivencia neuronal (Ryu y cols., 2005) que fue observada en la condición DFO-EtOH comparada con la de EtOH, no repercutió significativamente sobre la viabilidad neuronal.

En forma llamativa, no observamos cambios en la morfología neuronal lo que era esperable tanto por los efectos de la DH que se ha demostrado que compromete procesos tales como la arborización dendrítica y la sinaptogénesis hipocampal (Beydoun y cols., 2017) como por el EtOH que afecta los procesos de diferenciación neuronal (Guerri y cols., 2001; Harper y Matsumoto, 2005; Guizzetti y cols., 2010; Wilhelm y Guizzetti, 2016). Probablemente la edad de los animales de los que obtuvimos neuronas pueda influir. Probablemente el conocimiento más profundo de los mecanismos implicados en la disfunción astrocitaria que provocan la disminución de la viabilidad neuronal, puedan ayudar a entender esta discordancia con los resultados reportados en la literatura. No obstante, todos los mecanismos subyacentes a los parámetros funcionales que han empeorado en astrocitos sometidos a la co-incubación DFO-EtOH podrían ser suficientes para producir muerte neuronal.

En la misma dirección de efectos peores en la coexistencia de las dos condiciones, observamos que DFO-EtOH en cultivos mixtos enriquecidos en oligodendrocitos produjo una disminución significativa de la sobrevida y alteró la morfología de los oligodendrocitos. La sola exposición a DFO también afectó ambos parámetros, aunque en menor medida, indicando como era esperable (Duck y Connor, 2016) que los oligodendrocitos son más sensibles a la falta de hierro que los astrocitos. La DH sostenida en el tiempo fue suficiente para afectar la sobrevida y la morfología de los oligodendrocitos lo que podría afectar la mielinización como ha sido reportado extensamente (Lozoff y Georgieff, 2006; Beard y cols., 2006; Beard, 2007). Lamentablemente con el abordaje que empleamos no podemos conocer la incidencia de los efectos mediados por astrocitos, ya que ambos tipos celulares estuvieron expuestos simultáneamente a las dos condiciones de daño. Sin embargo, el paradigma
experimental empleado parece reproducir la mayor vulnerabilidad de los oligodendrocitos frente a los astrocitos a la DH y eventualmente al EtOH, lo que concuerda con la literatura existente

En resumen, el conjunto de resultados obtenidos con este trabajo permite concluir que la co-existencia de DH sostenida y EtOH altera en forma significativa algunos parámetros funcionales de los astrocitos que repercuten negativamente en la supervivencia neuronal, sugiriendo que la disfunción astrocitaria podría participar en la muerte neuronal reportada por DH y alcohol y posiblemente en los efectos descriptos en pacientes que sufren ambas condiciones (Rufer y cols., 2012).

## PERSPECTIVAS

El trabajo realizado abre una cantidad muy grande de preguntas sobre las que debe profundizarse. Entre las que se encuentran actividades como:

-aumento del número de experimentos de las distintas condiciones experimentales para confirmar o descartar la significación estadística de aquellos parámetros que mostraron tendencia al cambio;

-realizar los mismos abordajes con concentraciones ligeramente mayores de cada estímulo para obtener resultados de significación estadística;

 -complementar los análisis de MTT y MT para profundizar en el estudio de los efectos de EtOH y DFO sobre la funcionalidad mitocondrial;

-determinar los niveles de hierro libre remanente en las distintas condiciones experimentales;

-correlacionar los niveles de hierro libre con las alteraciones en los parámetros funcionales analizados;

-analizar la posible irreversibilidad de los efectos producidos por la DH sostenida mediante suplementación de hierro a los astrocitos en las distintas condiciones experimentales;

-identificar los efectos sobre las principales proteínas involucradas en el metabolismo de hierro en el astrocito;

-identificar los mecanismos principales subyacentes a los efectos negativos sobre la viabilidad neuronal;

73

-realizar los abordajes sobre cultivos aislados de neuronas empleando medios condicionados de astrocitos de las distintas condiciones;

-obtener cultivos de oligodendrocitos que no tengan astrocitos como contaminantes;

-analizar los efectos de medios condicionados de astrocitos de las distintas condiciones experimentales sobre cultivos puros de oligondendrocitos;

-a muy largo plazo, identificar si los efectos producidos sobre la viabilidad de neuronas u oligodendrocitos son mediados por proteínas de matriz o por señales solubles secretadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfonso-Loeches S, Ureña-Peralta JR, Morillo-Bargues MJ, Oliver-De La Cruz J, Guerri C (2014) Role of mitocondria ROS generation in etanol induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. Front Cell Neurosci 8:216.
- Alikunju S, Abdul Muneer PM, Zhang Y, Szlachetka AM, Haorah J (2011) The inflammatory footprints of alcohol-induced oxidative damage in neurovascular components. Brain Behav Immun 1:129–136.
- Bánhegyi G, Baumeister P, Benedetti A, Dong D, Fu Y, Lee AS, Li J, Mao C, Margittai E, Ni M, Paschen W, Piccirella S, Senesi S, Sitia R, Wang M, Yang W (2007) Endoplasmic reticulum stress. Ann N Y Acad Sci 1113:58-71.
- Berman RF, Hannigan JH (2000) Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus: spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy. Hippocampus 10:94-110.
- Beard JL, Connor JR (2003) Iron status and neural functioning. Ann Rev Nutr 23:41– 58.
- Beard JL, Murray-Kolb LE, Rosales FJ, Solomons NW, Angelilli ML (2006) Interpretation of serum ferritin concentrations as indicators of total-body iron stores in survey populations: the role of biomarkers for the acute phase response. Am J Clin Nutr 84(6):1498-1505.
- Beard J (2007) Recent evidence from human and animal studies regarding iron status and infant development. J Nutr 137(2):524S-530S.
- Beydoun R, Hamood MA, Gomez Zubieta DM, Kondapalli KC (2017) Na+/H+ Exchanger 9 Regulates Iron Mobilization at the Blood-Brain Barrier in Response to Iron Starvation. J Biol Chem 292(10):4293-4301.
- Bjartmar C (1998) Morphological heterogeneity of cultured spinal and cerebral rat oligodendrocytes. Neurosci Lett 247(2-3):91-94.
- Bosco C, Díaz E (2012) Placental hypoxia and foetal development versus alcohol exposure in pregnancy. Alcohol Alcohol 47(2):109-117.
- Buckman JF, Hernández H, Kress GJ, Votyakova TV, PalS, Reynolds IJ (2001) MitoTrackerlabeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. J Neurosci Meth 104(2):165-176.
- Carlson ES, Stead JD, Neal CR, Petryk A, Georgieff MK (2007) Perinatal iron

deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. Hippocampus 17(8):679-691.

- Carter RC, Jacobson SW, Molteno CD, Jacobson SW (2014) Fetal alcohol exposure, iron deficiency anemia, and infant growth. Pediatrics 120:559-567.
- Chatterjee S, Noack H, Possel H, Keilhoff G, Wolf G (1999) Glutathione levels in primary glial cultures: monochlorobimane provides evidence of cell type-specific distribution. Glia 27:152-161.
- Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras J, Guerri C (2002) Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. J Neurosci Res 68(2):213-225.
- Cruickshank B, Currie AR (1958) Localization of tissue antigens with the fluorescent antibody technique: application to human anterior pituitary hormones. Immunol (1):13-26.
- Dallman PR (1986) Biochemical basis for the manifestations of iron deficiency. Annu Rev Nutr 6:13-40.
- de la Monte SM, Kril JJ (2014) Human alcohol-related neuropathology. Acta Neuropathol 127:71–90.
- Di Nicola M, Barteselli G, Dell'Arti L, Ratiglia R, Viola F (2015) Functional and Structural Abnormalities in Deferoxamine Retinopathy: A Review of the Literature. Biomed Res Int 215:249617.
- Dhur A, Galan P, Hercberg S (1989) Effects of different degrees of iron deficiency on cytochrome P450 complex and pentose phosphate pathway dehydrogenases in the rat. J Nutr 119(1):40-47.
- Díaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragnolini A, Martínez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. PNAS 108(44):18126-18131.
- Duck KA, Connor JR (2016) Iron uptake and transport across physiological barriers. Biometals 29(4):573-591.
- Erikson KM, Aschner M (2005) Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. Neuro Toxicol 27:125–130.
- Felt B, Jimenez E, Smith J, Calatroni A, Kaciroti N, Wheatcroft G, Lozoff B (2006) Iron deficiency in infancy predicts altered serum prolactin response 10 years later. Pediatr Res 60(5):513-517.
- Fernández-Mayoralas A, Fernández Jaén A (2011) Fetopatía alcohólica: puesta al día. Rev Neurol 52 (Supl 1): S53-57.
- Georgieff MK (2008) The role of iron in neurodevelopment: fetal iron deficiency and the developing hippocampus. Biochem Soc Trans 6:1267-1271.
- Grantham-McGregor S, Ani C (2003) Cognition and undernutrition: evidence for vulnerable period. Forum Nutr 56:272-275.
- Guizzetti M, Costa L (1996) Inhibition of muscarinic receptor stimulated glial cell proliferation by ethanol. J Neurochem 67:2236-2245.
- Guizzetti M, Moore NH, Giordano G, VanDeMark KL, Costa LG (2010) Ethanol inhibits neuritogenesis induced by astrocyte muscarinic receptors. Glia 58(12):1395-1406.

- Guizzetti M, Zhang X, Goeke C, Gavin DP (2014) Glia and neurodevelopment: focus on fetal alcohol spectrum disorders. Front Ped 2(123): 1-12.
- Guerri C, Pascual M, Renau-Piqueras J (2001) Glia and Fetal Alcohol Syndrome. Neurotoxicol 22:593-599.
- Harper C (1998) The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? J Neuropathol Exp Neurol 57(2):101-110.
- Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. Curr Op Pharmacol 5:73–78.
- Hernandez-Martinez C, Canals J, Aranda N, Ribot B, Escribano J, Arija V (2010) Effects of iron deficiency on neonatal behavior at different stages of pregnancy. Early Human Dev 87:165-169.
- Heras Ballestero MC, García Martín MA, García González F (1995) Quelantes del hierro: situación actual y perspectivas terapéuticas. Farm Hosp 19(6): 323-329.
- Holownia A, Ledig M, Braszko JJ, Ménez JF (1999) Acetaldehyde cytotoxicity in cultured rat astrocytes. Brain Res 833:202-208.
- Huebner SM, Tran TD, Rufer ES, Crump PM, Smith SM (2015) Maternal iron deficiency worsens the associative learning deficits and hippocampal and cerebellar losses in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders. Alcohol Clin Exp Res 39(11):2097-2107.
- Huebner SM, Blohowiak SH, Kling PJ, Smith SM (2016) Prenatal alcohol exposure alters fetal iron distribution and elevates hepatic hepcidin in a rat model of Fetal Alcohol Spectrum disorders. J Nutr 146(6):1180–1188.
- lijima T (2006) Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. Neurosci Res 55:234-43
- Ikegami Y, Goodenough S, Inoue Y, Dodd PR, Wilce PA, Matsumoto I (2003) Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. Neurosci Lett 349(3):201-205.
- Izquierdo I (2002) Intoxicación alcohólica aguda. Adicciones 14:175-193.
- Junta Nacional de Drogas (2011) 5ta encuesta nacional de hogares sobre consumo de drogas, Uruguay.
- Jorgenson LA, Wobken JD, Georgieff MK (2003) Perinatal iron deficiency alters apical dendritic growth in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Dev Neurosci 25(6):412-420.
- Ke Z, Wang X, Liu Y, Fan Z, Chen G, Xu M, Bower KA, Frank JA, Li M, Fang S, Shi X, Luo J (2011) Ethanol induces endoplasmic reticulum stress in the developing brain. Alcohol Clin Exp Res 35(9):1574-1583.
- Knapp PE (1992) The cell cycle of glial cells grown in vitro: an immunocytochemical method of analysis. J Histochem Cytochem 40:1405-1411.
- Kotter K, Klein J (1999) Ethanol inhibits astroglial cell proliferation by disruption of phospholipase D-mediated signaling. J Neurochem 73:2517-2523.
- Ku BM, Joo Y, Mun J, Roh GS, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Kim HJ (2006) Hemeoxygenase protects hippocampal neurons from ethanol-induced neurotoxicity. Neurosci Lett 405(3):168-171.

Kurien BT, Scofield RH (2006) Western blotting. Methods 38(4):283-293.

Lamarche F, Gonthier B, Signorini N, Eysseric H, Barret L (2003) Acute exposure of cultured neurones to ethanol results in reversible DNA single-strand breaks;

whereas chronic exposure causes loss of cell viability. Alcohol Alcohol 38(6):550-558.

- Lengsfeld AM, Löw I, Wieland T, Dancker P, Hasselbach W (1974) Interaction of phalloidin with actin. Proc Natl Acad Sci U S A 71:2803-2807.
- Levitz SM, Diamond RD (1985) A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. J Infect Dis 152(5):938-945.
- Lozoff B, Georgieff MK (2006) Iron deficiency and brain development. Semin Pediatr Neurol 13(3):158-165.
- Lozoff B, Beard J, Connor J, Barbara F, Georgieff M, Schallert T (2006) Long lasting neural and behavioral effects of iron deficiency in infancy. Nutr Rev 64:S34–S43.
- Maragakis NJ, Rothstein (2006) Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative diseases. Nat Clin Pract Neurol 2(12):679-689.
- Mathers JP, Roberts PE (1998) Introduction to cell and tissue culture: theory and technique. Nueva York, Ed. Plenum Press.
- Mahmood T, Yang PC (2012) Western Blot: technique, theory, and trouble shooting. North Am J Med Sci 9:429–434.
- Magistretti PJ (2006) Neuron–glia metabolic coupling and plasticity. J Exp Biol 209:2304-2311.
- McCarthy RC, Kosman DJ (2013) Ferroportin and exocytoplasmic ferroxidase activity are required for brain microvascular endothelial cell iron efflux. J Biol Chem 288(24):17932-17940.
- Miller MW, Roskams AJ, Connor JR (1995) Iron regulation in the developing rat brain: effect of in utero ethanol exposure. J Neurochem 65:373–380.
- Miller VM, Lawrence DA, Mondal TK, Seegal RF (2010) Reduced glutathione is highly expressed in white matter and neurons in the unperturbed mouse brain, implications for oxidative stress associated with neurodegeneration. Brain Res 1276:22–30.
- Niemelä O (2001) Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. Free Radic Biol Med 31(12):1533-1538.
- Olivera-Bravo S, Ribeiro C, Isasi E, Trías E, Leipnitz G, Díaz-Amarilla P, Woontner M, Beck C, Goodman SI, Souza M, Wajner M, Barbeito L (2015) Striatal neuronal death mediated by astrocytes from the Gcdh-/- mouse model of glutaric acidemia type I. Hum Mol Genet 24(16):4504-4515.
- Olivera S, Fernandez A, Latini AS, Rosillo JC, Casanova G, Wajner M, Cassina P, Barbeito L (2008) Astrocytic proliferation and mitochondrial dysfunction induced by accumulated glutaric acidemia I (GAI) metabolites: possible implications for GAI pathogenesis. Neurobiol Dis 32:528-534.
- Olivera-Bravo S, Fernández A, Sarlabós MN, Rosillo JC, Casanova G, Jiménez M, Barbeito L (2011) Neonatal astrocyte damage is sufficient to trigger progressive striatal degeneration in a rat model of glutaric acidemia-I. PlosOne 6(6): e20831.
- OMS (2015) Alcohol, Nota descriptiva Nº 349, www.who.int/mediacentre/alcohol.
- OMS (2017) Prevalencia mundial de la anemia y número de personas afectadas 1993-2005, www.who.int/vmnis/database/anaemia/anaemia\_data\_status\_t2/es/.
- Oski FA, Honig AS, Helu B, Howanitz P (1983) Effect of iron therapy on behavior performance in nonanemic, iron-deficient infants. Pediatrics 71(6):877-880.
- Pla A, Pascual M, Guerri C (2016) Autophagy Constitutes a Protective Mechanism

against Ethanol Toxicity in Mouse Astrocytes and Neurons. PLosOne 11(4):e0153097.

- Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M (2014) The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. Neurosci Lett 565:30-8.
- Radlowski EC, Johnson RW (2013) Perinatal deficiency and neurocognitive development. Front Hum Neurosci 7:585.
- Ranade SC, Nawaz S, Chakrabarti A, Gressens P, Mani S (2013) Spatial memory deficits in maternal iron deficiency paradigms are associated with altered glucocorticoid levels. Horm Behav 64:26-36.
- Rao R, Tkac I, Unger EL, Ennis K, Hurst A, Schallert T, Connor J, Felt B, Georgieff (2012) Iron supplementation dose for perinatal iron deficiency differentially alters the neurochemestry of frontal cortex and hippocampus in adult rats. Ped Res 73:31-37.
- Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ (2015) ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. Autophagy 11(11):1956-1977.
- Rosato-Siri MV, Marziali L, Guitart ME, Badaracco ME, Puntel M, Pitossi F, Correale J, Pasquini JM (2017) Iron availability compromises not only oligodendrocytes but also astrocytes and microglial cells. Mol Neurobiol, doi: 10.1007/s12035-016-0369-2.
- Robb SJ, Robb-Gaspers LD, Scaduto RC JR, Thomas AP, Connor JR (1999) Influence of calcium and iron on cell death and mitochondrial function in oxidatively stressed astrocytes. J Neurosci Res 55:674–686.
- Rufer ES, Tran TD, Attridge MM, Andrezejewski ME, Flentke GR, Smith SM (2012) Adequacy of maternal iron status protects against behavioral, neuroanatomical, and growth deficits in Fetal Alcohol Spectrum Disorders. PlosOne 6:1-10.
- Ryu H, Lee J, Impey S, Ratan RR, Ferrante RJ (2005) Antioxidants modulate mitochondrial PKA and increase CREB binding to D-loop DNA of the mitochondrial genome in neurons. PNAS 102(39):13915–13920.
- Saito M, Chakraborty G, Hui M, Masiello K, Saito M (2016) Ethanol-induced neurodegeneration and glial activation in the developing brain. Brain Sci 6 (31):1-18.
- Saneto RP, Chiappelli F, de Vellis J (1987) Interleukin-2 inhibition of oligodendrocyte progenitor cell proliferation depends on expression of the TAC receptor. J Neurosci Res 18:147–154.
- Schwarzer C, Illek B, Suh JH, Remington SJ, Fischer H, Machen TE (2007) Organelle redox of CF and CFTR-corrected airway epithelia. Free Radic Biol Med 43(2):300-316.
- Shafir T, Angulo-Barroso R, Calatroni A, Jimenez E, Lozoff B. (2006) Effects of iron deficiency in infancy on patterns of motor development over time. Hum Mov Sci 25(6):821-838.
- Simpson IA, Ponnuru P, Klinger ME, Myers RL, Devraj K, Coe CL, Lubach GR, Carruthers A, Connor JR (2015) A novel model for brain iron uptake: introducing the concept of regulation. J Cereb Blood Flow Metab 35(1):48-57.
- Sloan SA, Barres BA (2015) Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. Curr Opin Neurobiol 27:75–81.
- Siddappa AM, Rao R, Long JD, Widness JA, Georgieff MK (2007) The assessment of newborn iron stores at birth: a review of the literature and standards for ferritin concentrations. Neonatol 92(2):73-82.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto

EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1987) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 163 (1):279.

- Sofroniew MW, Vinters HJ (2009) Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol 119:7-35.
- Urso T, Gavaler JS, Van Thiel DH (1981) Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. Life Sci 28:1053-1056.
- Verkhratsky A, Parpura V (2010) Recent advances in (patho) physiology of astroglia. Acta Pharmacol Sinica 31:1044–1054.
- Verkhratsky A, Sofroniew MW, Messing A, de Lanerolle NC, Rempe D, Rodríguez JJ, Nedergaard M (2011) Neurological diseases as primary gliopathies: a reassessment of neurocentrism. ASN NEURO 4(3): art: e00082.
- Vogelaar CF, König B, Krafft S, Estrada V, Brazda N, Ziegler B, Faissner A, Müller HW (2015) Pharmacological suppression of CNS scarring by deferoxamine reduces lesion volume and increases regeneration in an in vitro model for astroglial-fibrotic scarring and in rat spinal cord Injury in vivo. PlosOne 10(7):1-33.
- Voigt W (2005) Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. Meth Mol Med 110:39-48.
- Yang F, Luo J (2015) Endoplasmic Reticulum Stress and Ethanol Neurotoxicity. Biomolecules 5(4):2538-2553.
- Yang Z, Watanabe M, Nishiyama A (2005) Optimization of oligodendrocyte progenitor cell culture method for enhanced survival. J Neurosci Meth 149(1):50-56.
- Wilhelm CJ, Guizzetti M (2016) Fetal Alcohol Spectrum Disorders: an overview from the glia perspective. Front Integr Neurosci 9:65.