

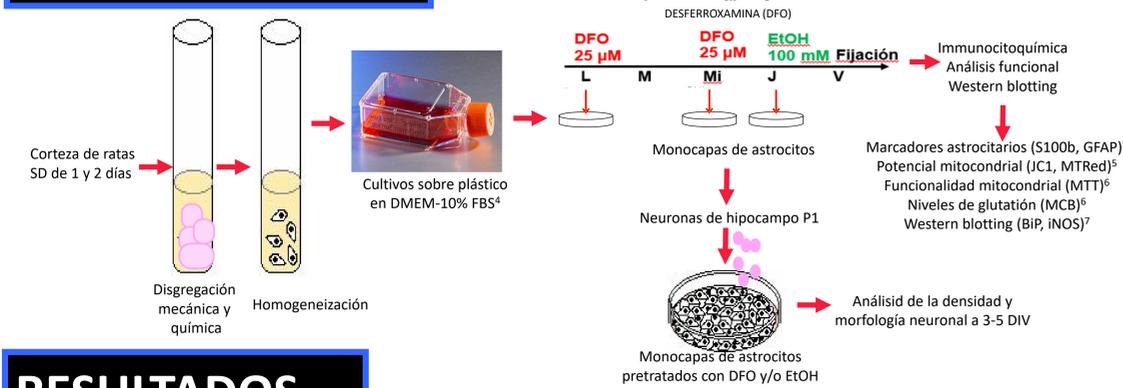
INTRODUCCIÓN

M. Perata, E. Isasi, S. Olivera Bravo

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE

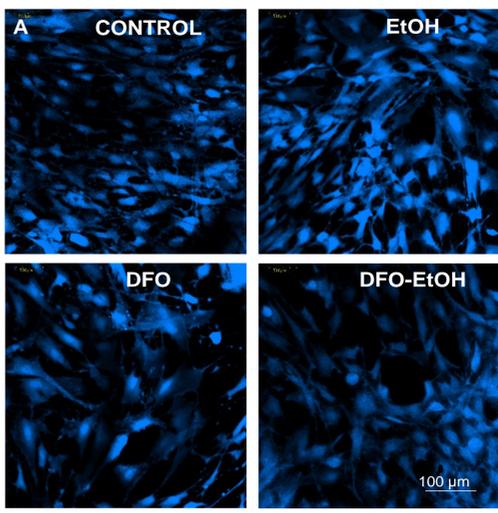
La deficiencia de hierro (DH) es la condición nutricional más prevalente afectando fundamentalmente a mujeres en edad fértil y sus hijos desde la gestación hasta la adolescencia temprana¹. Por su parte, el consumo abusivo de alcohol es responsable de aproximadamente el 1% de las enfermedades neonatales no atribuibles a causas genéticas y de casi el 6% de las muertes mundiales². La co-existencia de ambas condiciones altera irreversiblemente al sistema nervioso central (SNC) a través de mecanismos celulares que en general son poco conocidos³. Nuestra hipótesis sostiene que la **co-existencia de DH y alcohol afecta a los astrocitos, las células gliales responsables del mantenimiento de la homeostasis del SNC y que su respuesta es determinante para la perpetuación del daño a dicho sistema.**

METODOLOGÍA



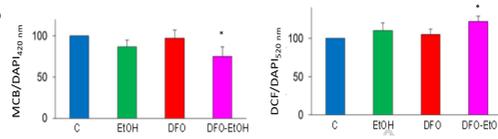
RESULTADOS

DISMINUCIÓN EN LOS NIVELES DE GLUTATION Y AUMENTO DE LOS NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO

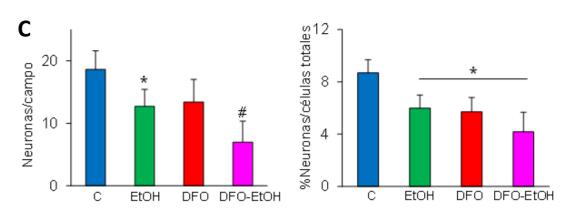
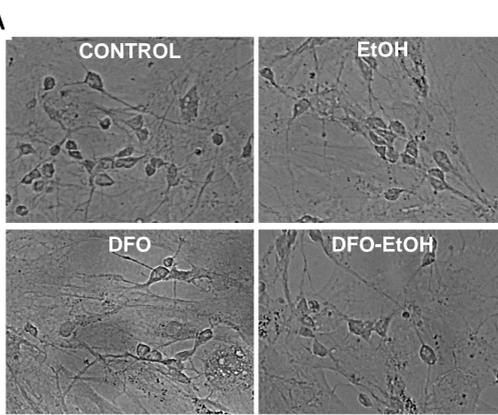


A- Fluorescencia de aductos monoclorobimano-glutación en astrocitos vivos. En un grupo de experimentos, los cultivos confluentes de astrocitos se sometieron a todas las condiciones experimentales y luego se incubaron con monoclorobimano que es capaz de formar aductos con el glutatión sintetizado por los astrocitos. Los aductos de monoclorobimano y glutatión fluorescen en UV coloreando los cuerpos astrocitarios donde está presente el glutatión.

B- Cuantificación de la intensidad de señal de glutatión y diclorofluoresceína en las distintas condiciones experimentales. Las gráficas muestran los niveles de emisión medidos espectrofotométricamente de los aductos de monoclorobimano-glutatión y de emisión del indicador de estrés oxidativo diclorofluoresceína (DCF). La condición DFO-EtOH es la que mostró disminución significativa del glutatión y aumento de estrés oxidativo. (*): p<0.05.



DISMINUCIÓN DE LA SOBREVIVENCIA DE NEURONAS HIPOCAMPALES CO-CULTIVADAS SOBRE ASTROCITOS TRATADOS CON EtOH Y DFO

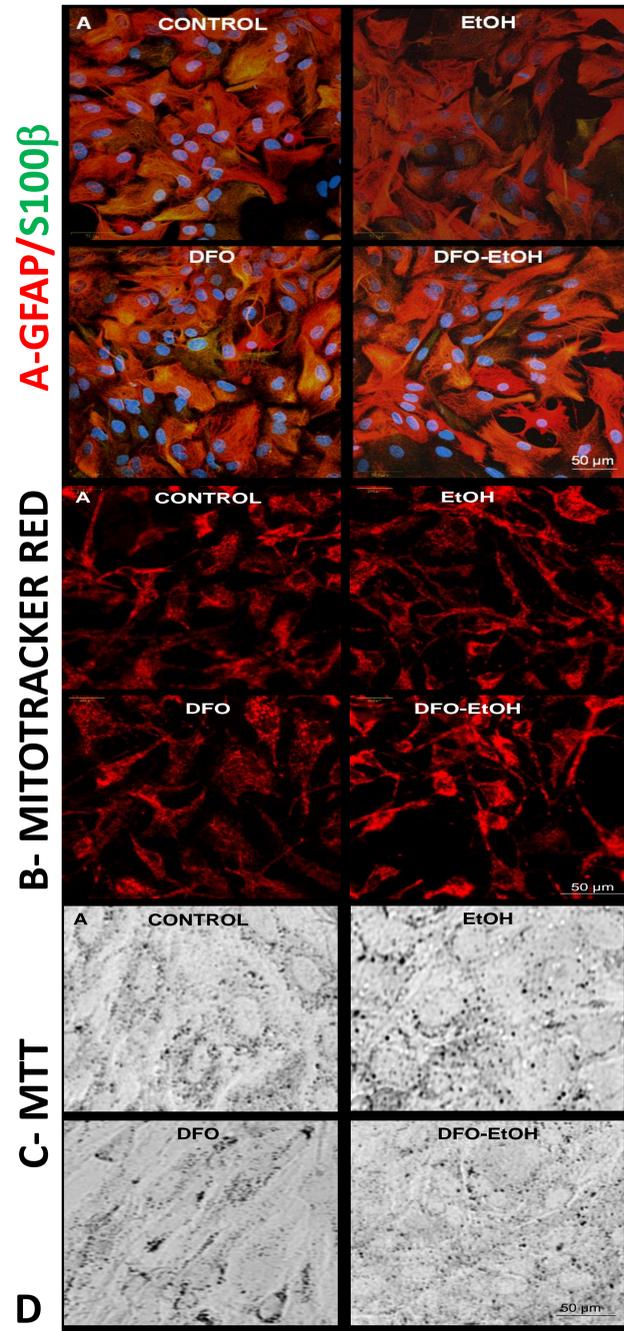


A- Apariencia de los co-cultivos de astrocitos pretraados con cada condición experimental y neuronas de hipocampo a los 3 días del cultivo. Magnification: 40X.

B- Disminución de la densidad de neuronas positivas para neurofilamento 200 (NF200). Las neuronas positivas a NF200 (verde) disminuyen su densidad respecto del número de células totales marcadas con DAPI (azul).

C- Cuantificación de neuronas en microscopía de luz y de neuronas NF200+. Las gráficas muestran disminución significativa para EtOH y DFO-EtOH. (*): p<0.05.

ALTERACIÓN DEL POTENCIAL Y LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL SIN PRODUCIR CAMBIOS MORFOLÓGICOS

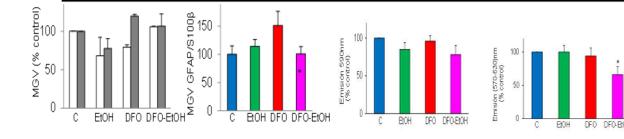


A- Inmunomarcado para GFAP y S100β. Se muestran imágenes de microscopía confocal de cultivos confluentes de astrocitos corticales de todas las condiciones experimentales mostrando los marcadores típicos GFAP (rojo) y S100β (verde). La colocalización de las señales se muestra en Amarillo. Los núcleos celulares se tiñieron con diaminofenilindol (DAPI) que fluoresce en celeste.

B- Potencial mitocondrial estimado con la sonda vital Mitotracker Red. En rojo se observan las mitocondrias que preservan el potencial necesario para la fosforilación oxidativa. Nótese en la condición EtOH y fundamentalmente en DFO-EtOH la menor densidad de mitocondrias polarizadas parece indicar una retracción de los cuerpos celulares, lo que no ocurre de acuerdo a las señales de marcadores astrocitarios en la misma condición.

C- Funcionalidad mitocondrial evaluada con MTT. La técnica se realiza con células vivas expuestas a MTT. Los puntos oscuros muestran mitocondrias que son funcionales y capaces de reducir al MTT formando precipitados oscuros de formazán. Nótese la disminución de la densidad de puntos oscuros en la condición DFO-EtOH.

D- Cuantificación de los niveles de los distintos parámetros analizados en todas las condiciones experimentales: parámetros astrocitarios en gráficas de la izquierda, potencial mitocondrial en la del medio y funcionalidad mitocondrial en la de la derecha. Nótese que la peor condición en todos los casos es la coexistencia de EtOH y DFO. Las gráficas son los valores medios ± SEM de 5 experimentos independientes cada uno realizado por triplicado o quintuplicado. (*): p<0.05.



CONCLUSIONES

Los resultados experimentales indican que la DH y el alcohol alteran el fenotipo astrocitario aumentando algunas variables asociadas al daño (disminución de potencial y funcionalidad mitocondrial, estrés oxidativo) y disminuyendo algunas asociadas a protección como los niveles de glutatión, lo que repercute negativamente en la supervivencia neuronal. Por lo tanto, si estos mecanismos operan *in vivo*, los astrocitos podrían participar en el mantenimiento del daño al SNC producido por alcohol en condiciones de falta de nutrientes. Por lo tanto, los astrocitos son un blanco potencial al momento de diseñar estrategias terapéuticas asociadas al control del daño producidos por alcohol.

REFERENCIAS: 1-<https://www.who.int/topics/anaemia/en/>; 2-Ethen y cols. 2009, Matern Child Health J. 2009 Mar;13(2):274-85. doi: 10.1007/s10995-008-0328-2; 3-Rufer y cols. 2012, PLoS One. 2012;7(10):e47499. doi: 10.1371/journal.pone.0047499; 4-Olivera y cols. 2008, Neurobiol Dis. 2008 Dec;32(3):528-34. doi: 10.1016/j.nbd.2008.09.011; 5-Olivera-Bravo y cols. 2011, PLoS One. 2011;6(6):e20831. doi: 10.1371/journal.pone.0020831; 6-Olivera-Bravo y cols. 2015, Hum Mol Genet. 2015 Aug 15;24(16):4504-15. doi: 10.1093/hmg/ddv175; 7-Jiménez-Riani y cols. 2017, Cell Tissue Res. 2017 Dec;370(3):391-401. doi: 10.1007/s00441-017-2681-1.