

## Tesis de Licenciatura

# Estudio de funciones inmunológicas de Astrocitos, en cultivo

Lavista Llanos, Sofía

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Lavista Llanos, Sofía. (). Estudio de funciones inmunológicas de Astrocitos, en cultivo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000548\\_LavistaLlanos](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000548_LavistaLlanos)

**Cita tipo Chicago:**

Lavista Llanos, Sofía. "Estudio de funciones inmunológicas de Astrocitos, en cultivo". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. . [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000548\\_LavistaLlanos](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000548_LavistaLlanos)

---

T E S I S   D E   L I C E N

**ESTUDIO DE FUNCIONES INMUNOLÓGICAS  
DE ASTROCITOS, EN CULTIVO.**

REALIZADA POR

**SOFÍA LAVISTA LLANOS**

BAJO LA DIRECCIÓN DE

**DRA. A. ROLDÁN**

LA COORDINACIÓN DE

**DR. E. RODRÍGUEZ**

EN EL

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y**

**MEDICINA EXPERIMENTAL**

EN

**BUENOS AIRES, OCTUBRE DE 1997**

**Nº 548** 

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

## ABREVIATURAS

ABC	complejo avidina biotina
199	medio de cultivo 199.
CMH I	complejo mayor de histocompatibilidad tipo I
CMH II	complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
Cort	corticosterona
DAB	diaminobencidina
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle Medium sin rojo fenol
Dex	dexametasona
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
GC	glucocorticoides
GFAP	proteína gliofibrilar ácida
GFAP-ir	GFAP inmunoreactivo
IL-1	interleuquina-1
IL-6	interleuquina-6
LPS	lipopolisacárido
MEM	minimal essential medium
NGF	factor de crecimiento nervioso
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa
NOSc	óxido nítrico sintetasa constitutiva
NOSi	óxido nítrico sintetasa inducible
PBS	solución buffer fosfato
PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
RG	receptores de glucocorticoides
SFB	suero fetal bovino
SN	sistema nervioso
SNC	sistema nervioso central
Td-R	timidina-H <sup>3</sup> (radioactiva)

TGF- $\beta$ 1 factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1

TNF  $\alpha$  factor de necrosis tumoral  $\alpha$

## RESUMEN

La producción de NO<sup>•</sup> junto a otras funciones inmunológicas de las células de la glía está implicada en la patofisiología del SNC. En la primera parte de este Seminario se estudió la producción de NO<sup>•</sup> por astrocitos de cerebro en cultivo, y su regulación por los glucocorticoides. Los resultados corroboran la presencia de las enzimas NOS constitutiva e inducible (NOS<sub>c</sub> y NOS<sub>i</sub>) en astrocitos, siendo la fagocitosis un estímulo capaz de inducir la producción de NO<sup>•</sup>. Los glucocorticoides tuvieron un efecto dual, incrementando la producción constitutiva de NO<sup>•</sup> y disminuyendo la inducida por fagocitosis. A su vez, el efecto inhibitorio de la Dex sobre la producción de NO<sup>•</sup> se correlacionó con una disminución de la fagocitosis.

Los resultados obtenidos en el primer Capítulo muestran algunas de las funciones inmunológicas que aparentemente los astrocitos de cerebro cumplen en el SNC. Esta experiencia nos sirvió para encarar el estudio de astrocitos provenientes de la médula espinal de ratones Wobbler, modelo animal de la Esclerosis Lateral Amiotrófica considerada por algunos de origen autoinmune, que tiene la característica de presentar degeneración en las motoneuronas y una pronunciada astrocitosis en la médula espinal.

De acuerdo a ello, en el segundo Capítulo se presentan los resultados obtenidos con cultivos de astrocitos provenientes de la médula de estos animales. En todos los casos estudiados la proliferación de las células *wr/wr* resultó menor que la de sus controles (*wr/+*), y mientras que en estos últimos la IL-1 y la corticosterona (Cort) aumentaron la proliferación, solamente el TGF- $\beta$ 1 fue activo en *wr/wr* y no en controles. La inactividad mitogénica de Cort *in vitro* no se correspondió con la presencia de receptores para glucocorticoides (GR) en astrocitos *wr/wr*, los que

resultaron funcionales en la regulación de la proteína GFAP. Por otra parte, se estudiaron la expresión de la proteína GFAP y el área astrocitaria, resultando ambas aumentadas en los astrocitos wr/wr.

Los resultados obtenidos muestran, en los cultivos de astrocitos provenientes de ratones Wobbler (wr/wr), anomalías morfológicas, disminución de proliferación basal e insensibilidad a los agentes proliferativos usuales, con respuesta anormal al TGF- $\beta$ 1. Esto sugiere una importante patología astrocitaria en la médula espinal del modelo murino de ELA.

## I N T R O D U C C I Ó N G E N E R A L

Dentro del SNC las neuronas han sido las células más estudiadas, debido a que el mismo ha sido estudiado principalmente desde un punto de vista neurofisiológico. Al ser las neuronas células excitables confieren al cerebro su capacidad de procesar información, estableciendo de esta forma vías de comunicación entre el medio externo y los órganos efectores del cuerpo. Para ello se requieren un perfecto aislamiento de las vías neuronales así como una fina regulación de la composición iónica del espacio extraneuronal, siendo las células de la glía las encargadas de cumplir estas funciones.

El término de neuroglía con que se describió a las regiones entre neuronas fue dado por R. Virchow (1846), quien la consideró como análoga al tejido conectivo encontrado en otros órganos. De hecho, hasta hace poco tiempo se la consideró un tejido de sostén de las células neuronales. Sin embargo, la diversidad de tipos celulares y la distribución particular de éstos en distintas zonas del cerebro y médula espinal, sugieren funciones diversas y específicas para cada tipo celular dentro del tejido nervioso (Wilkin y col. y Miller y col.). Es así que Ramón y Cajal y del Rio Hortega, utilizando técnicas de impregnación metálica desarrollaron un sistema de clasificación de células gliales hasta hoy utilizado (Somjen G.G.).

Dentro de la neuroglía se diferencian tres principales tipos de células: la astrogλία, oligodendrogλία y microglía. Las dos primeras constituyen el grupo mayoritario de células gliales, poseyendo ambas un origen ectodérmico; la microglía en cambio es de origen mesodérmico y se encuentra en menor número. Las células de la microglía son comparables a las células fagocíticas mononucleares originadas en la médula ósea ya que, al igual que los monocitos y macrófagos del

sistema inmune, son células presentadoras de antígenos (expresan CMH I y II), tienen capacidad fagocítica, y poseen receptores de membrana para inmunoglobulinas y factores peptídicos del sistema de complemento (Loughlin y col. y Piani y col.)

Los oligodendrocitos por ser el principal tipo celular involucrado en la formación de mielina en el SNC se encuentran recubriendo los axones neuronales en la sustancia blanca, mientras que en los nervios periféricos esta función la cumplen las células de Schwann. En la sustancia gris las funciones de los oligodendrocitos son menos conocidas.

Por su parte, la astrogliá está compuesta por células de distinto origen. Los astrocitos tipo-1 aparecen temprano durante el desarrollo del SNC y sintetizan factores que regulan el desarrollo de células progenitoras O-2A, las que a su vez darán origen a los astrocitos tipo-2 y oligodendrocitos (Armstrong y col.). Morfológicamente pueden diferenciarse dos tipos principales de células: los astrocitos fibrosos, que predominan en la sustancia blanca, son pequeños y muy ramificados y contienen un gran número de filamentos intermedios en su citoesqueleto; los protoplasmáticos, más grandes y redondeados, tienen ramificaciones cortas y un menor número de filamentos intermedios en su citoesqueleto, éstos se encuentran principalmente en la sustancia gris. Ambos tipos de astrocitos pueden ser identificados por la detección de la proteína GFAP, que por estar asociada a filamentos intermedios del citoesqueleto puede ser utilizada como un marcador específico de astrocitos en cultivo y cortes de tejido (Laping y col. y Oudega y col).

Se ha observado que en afecciones del sistema nervioso como: infecciones virales, procesos inflamatorios demielinizantes, traumatismos agudos y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la Esclerosis Lateral Amiotrófica, se produce un aumento del número y el tamaño de las células que expresan la proteína GFAP; denominado astrocitosis (Hertz y col.). Esta astrociti-



tosis podría deberse tanto a un cambio fenotípico de los astrocitos residentes, como a una proliferación ó migración astrocitaria a la zona afectada. Es por ello que para analizar las causas de astrocitosis en cada situación particular es necesario realizar estudios *in vivo* e *in vitro*.

Una de las funciones más importantes de la glía, ejercida por los astrocitos y la microglía, consiste en mecanismos de reparación y regeneración tisular que comprenden la digestión de restos celulares (fagocitosis) así como la producción de factores neurotróficos en respuesta a daños neuronales (Eddleston y Mucke). Tanto los astrocitos como las células de la microglía son activados por elementos celulares y humorales del sistema inmune, que ven facilitado su acceso ante la permisividad aumentada de la barrera hematoencefálica en los casos patológicos antes mencionados.

Entre los elementos humorales que intervienen en la respuesta inmune se encuentran las citoquinas, y de ellas la IL-1 fue una de las primeras en ser identificada (Durum y col.). Se ha demostrado que además de ser secretada en sus tipos IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por células del sistema inmune, la IL-1 es producida por otras células donde ejerce distintas funciones, entre las cuales la más importante es la proliferativa; siendo ésa la razón por la que muchos autores consideran a la IL-1 un factor de crecimiento.

Dentro del SNC la microglía es capaz de sintetizar IL-1 cuando es estimulada, por lo que el LPS es capaz de inducir su secreción *in vitro* (Yao y col.). La IL-1 así liberada es uno de los factores principales en la estimulación de los astrocitos, los que a su vez liberan una serie de péptidos como IL-6 (Norris y col.), TGF- $\beta$ 1 (da Cunha y col.), NGF (Gadient y col.) y prostaglandinas (Katsura y col.).

Es sabido que las IL-1 e IL-6 son cofactores esenciales para la iniciación de la proliferación de linfocitos T y en procesos inflamatorios (Durum y col. y Van Snick J.). Se ha demostrado también que ambas interleuquinas, junto con otras citoquinas, son factores de crecimiento importantes en la regeneración del tejido nervioso dañado (Giulian y col., Mattson y col., Houle y col.). Debido a ello juegan un papel importante en patologías de la neuroglía, ya que al favorecer la proliferación de astrocitos éstos pueden llegar a formar escaras que terminan dañando a neuronas y oligodendrocitos. Además se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo*, la capacidad que tienen los astrocitos de ejercer otras funciones semejantes a las de los macrófagos/monocitos como son, la expresión del CMH II (Smith y col.), la fagocitosis (Roldán y col. y Noske y col.) y la producción de radicales libres (Murphy y col, 1990 y 1993)

La fagocitosis, ejercida por macrófagos y células polimorfonucleares, es la respuesta primaria del organismo ante la presencia de agentes infecciosos. Una vez fagocitados, los parásitos y microorganismos son destruidos por una serie de mecanismos que incluyen procesos enzimáticos, pH-dependientes y la producción de radicales libres como el NO<sup>•</sup>. Es así que la síntesis de NO<sup>•</sup> es uno de los componentes de citotoxicidad de los macrófagos (Wei y col.), participando en consecuencia en la defensa contra infecciones (MacMicking y col.). Sin embargo una producción elevada de NO<sup>•</sup> resulta nociva para las células y tejidos del organismo, razón por la cual el NO<sup>•</sup> está implicado en la patogénesis de daños cerebrales. Tanto la microglía (Colton y Gilbert) como los astrocitos (Chao y col.) están involucrados en esta producción y aunque éstos últimos lo hacen en menor medida son el tipo celular más abundante del SN.

El NO<sup>•</sup> es producido por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), utilizando L-arginina como sustrato (Stamler y col.). En el SNC existen dos isoformas de NOS, la NOS<sub>c</sub> es expresada

por las neuronas en forma constitutiva y está regulada por  $\text{Ca}^{++}$  (Dawson y col.) y la NOSi, clonada en macrófagos, que es  $\text{Ca}^{++}$  independiente y se expresa en astrocitos y células de la microglía (Galea y col.). Ambas enzimas poseen un sitio de unión para NADPH responsable de una actividad diaforasa (White y Marletta), cuya activación puede ser utilizada como un marcador para la detección de la NOS activa.

Por otra parte, es conocido el efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la actividad de la NOSi (Di Rosa y col. y Kunz y col.). En nuestro laboratorio se ha demostrado recientemente que la Dex es capaz de reducir la actividad fagocítica de astrocitos en cultivo (Roldán y col., 1997); además, en trabajos previos también realizados por nosotros se ha descrito *in vitro* un efecto proliferativo de los GC sobre dichas células (Roldán y col., 1995). Teniendo en cuenta el efecto antiinflamatorio de los GC, muchos autores han propuesto su uso en el tratamiento de patologías del SN. De hecho se ha comprobado que los GC resultan terapéuticamente efectivos en pacientes con traumatismos de médula espinal y otras enfermedades neurodegenerativas (Reder y col. y Braken y col.).

En el laboratorio del Dr. De Nicola desde hace varios años se estudian las acciones de los GC en patologías del SNC, en particular sobre la médula espinal de los ratones Wobbler. Estos ratones sufren una mutación autosómica recesiva, que en estado homocigota lleva a una degeneración severa de las motoneuronas en la zona cervical de la médula espinal y el tallo cerebral (Ma y Vacca-Galloway). Histológicamente, esta progresiva neuropatía se caracteriza por la cromatolisis y vacuolización de las motoneuronas- $\alpha$  (Mitsumoto y Bradley), y una prominente astrocitosis con niveles elevados de GFAP en la médula espinal (Laage y col.), la que ha sido considerada una respuesta secundaria a la degeneración neuronal, cuya causa es desconocida. Las características

patológicas de estos animales son de carácter progresivo, apareciendo las primeras evidencias de la enfermedad al mes de vida ( estadio 1-2 según Young y col.), y con un avance de la misma en las siguientes seis semanas ( estadio 3-4), no sobrepasando los tres meses de vida.

Estos animales son especialmente interesantes como modelo de estudio de atrofas espinales humanas, como la ELA y Atrofia Espinal Muscular Infantil. En el laboratorio del Dr. De Nicola se realizan experimentos *in vivo*, analizando características histológicas *in situ* como la presencia de receptores de glucocorticoides y la distribución de células GFAP positivas en las sustancias blanca y gris de la médula espinal de ratones Wobbler (González Deniselle y col., 1996 y 1997).

En el primer Capítulo de este Seminario se investiga la capacidad de producción de NO por los mecanismos de fagocitosis de astrocitos de corteza cerebral, en relación con la actividad de la enzima NADPH-diaforasa, y su regulación por los GC. En la segunda parte de este Seminario se describen los resultados obtenidos en cultivos de astrocitos de médula espinal de ratones Wobbler, comparando el comportamiento *in vitro* de los astrocitos provenientes de ratones enfermos al de animales sanos.

## CAPÍTULO - 1

### REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NO<sup>•</sup> POR ASTROCITOS Y MACRÓFAGOS DE RATA, *IN VITRO*.

Teniendo en cuenta que la síntesis de NO<sup>•</sup> puede ser inducida por la fagocitosis, en este primer Capítulo se informan los efectos de la Dex en la acumulación temporal de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por astrocitos y macrófagos como consecuencia de la fagocitosis de partículas de Zymosán. A su vez, se estudia la relación de la producción de NO<sup>•</sup> con la activación de las enzimas NOSi y NOSc, que fue detectada por localización histoquímica de la NADPH-diaforasa activa.

#### 1.1-MATERIALES Y MÉTODOS.

##### 1.1.1- *Cultivo de astrocitos cerebrales de rata*

Se utilizaron ratas neonatas Sprague Dawley de menos de 48 h de nacidas, siguiendo la técnica de McCarthy y de Vellis (McCarthy y de Vellis) previamente descrita en Roldán y col. Brevemente; la corteza de ambos hemisferios cerebrales se separó en forma estéril retirando las meninges y el material se resuspendió en MEM 10 % SFB, adicionado con 50 µg/ml de gentamicina y 2,5 µg/ml de fungizona. Las células se cultivaron en frascos de 25 cm<sup>2</sup> en estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, por dos semanas aproximadamente. Una vez en confluencia los cultivos se agitaron a 200 rpm y 37 °C durante toda la noche para remover oligodendrocitos y células de la microglía. Los

astrocitos se disociaron por tripsinización y se sembraron en placas de 6, 8 y 96 pozos, a razón de  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$  y  $10^4$  células / pozo respectivamente. Se incubaron en estufa, cambiando el medio de cultivo 24h después de repicados para remover neuronas y células muertas.

### 1.1.2- *Obtención de macrófagos peritoneales*

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 250-300 g de peso, a las que se les inyectó intraperitonealmente 15 ml de medio de cultivo 1% SFB adicionado con 5 U/ml de heparina. A los 15 min se recogió el líquido peritoneal en un tubo cónico siliconado, el que se centrifugó a 1200 rpm durante 15 min. En algunos casos fue necesario lisar los glóbulos rojos con 3 ml H<sub>2</sub>O + 1 ml 3,1% Cl Na; estudiándose en todos los casos la viabilidad celular por exclusión de azul tripán. Las células así obtenidas se sembraron en placas de 6 pozos a razón de  $3 \times 10^5$  células / pozo y se incubaron a 37 °C por 2 horas, enjuagándose luego con PBS para retirar las células no adheridas. Finalmente el medio de cultivo se cambió por 1,5 ml / pozo de D-MEM, con ó sin Dex  $10^{-6}$  M, incubándose 16 hs antes de agregar el Zymosán (500 µg/ml).

La acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> se determinó 1 y 2 días luego de la estimulación en la misma forma que para los astrocitos de cerebro.

### 1.1.3- *Producción y cuantificación de la síntesis de NO*

Una vez en confluencia, el medio de cultivo de los astrocitos de cerebro se cambió por 1,5 ml / pozo de D-MEM, con ó sin Dex  $10^{-6}$  M. Luego de 16 hs se agregaron 500 µg/ml de Zymosán al medio de cultivo, como partículas fagocitables.

La acumulación de  $\text{NO}_2^-$  en el sobrenadante se midió utilizando el método colorimétrico del reactivo de Griess (Green y col.), a los tiempos indicados y por triplicado en alícuotas de  $200\mu\text{l}$  cada una. Para ello se mezclaron volúmenes iguales de las muestras y el reactivo (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1 naftil)etil-enediamina dihidrocloro en 2,5% ácido fosfórico), incubándose 15 minutos a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia a 530 nm. Los valores de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  se obtuvieron por extrapolación de los datos de absorbancia en una curva de calibración construida con  $\text{NO}_2^- \text{Na}$  como estándar. Todas las muestras fueron leídas contra un blanco de reacción, utilizando medio de cultivo D-MEM 10 % SFB.

Tanto para los astrocitos de cerebro como para los macrófagos peritoneales la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  se expresó por mg de proteína, la cual fue determinada por el método de Bradford utilizando seroalbúmina bovina como proteína estándar.

#### 1.1.4- *Detección intracelular de partículas de Zymosán.*

Las partículas fagocitadas de Zymosán fueron visualizadas por fluorescencia (Greenberg y col.). Las células (astrocitos y macrófagos peritoneales) se cultivaron en placas de petris de 5 cm de diámetro, y (antes de que el cultivo de astrocitos llegue a confluencia) el Zymosán ( $500\mu\text{g/ml}$ ) se agregó al medio de cultivo (con ó sin  $\text{Dex } 10^{-6} \text{ M}$ ) durante los tiempos requeridos por el protocolo. Las placas se enjuagaron bien con PBS para retirar las partículas de Zymosán no ingeridas y luego se fijaron las células con paraformaldehído 2%. Inmediatamente se incubaron con 3 ml de naranja de acridina  $1\mu\text{g/ml}$  en PBS, en oscuridad durante 30 minutos. Se enjuagaron las placas nuevamente y se dejaron secar en oscuridad antes de montarlas en glicerol. Los preparados se observaron a 1000 X en un microscopio equipado con una fuente de luz UV. El Zymosán ingerido

por las células aparece como partículas fluorescentes rodeadas de un halo oscuro, en el citoplasma celular teñido de azul.

#### 1.1.5- *Detección histoquímica de la actividad NADPH-diaforasa.*

Los astrocitos y macrófagos se fijaron ( paraformaldehído 2%) a las placas de 8 pozos en que fueron cultivados. Se incubaron con 0,4 ml de 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 0,1% Triton X-100 / 1 mM NADPH / 0,2 mM nitrobluetetrazolium a 37 °C, en oscuridad durante 60-90 minutos. El blanco de reacción se incubó con 0,4 ml de 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 / 0,1% Triton X-100 / 0,2 mM nitrobluetetrazolium (sin NADPH), en las mismas condiciones. La reacción se frenó con PBS y los portaobjetos se montaron con glicerol. Las células NADPH-diaforasa positivas aparecen teñidas de color azul ( los blancos de reacción sin color).

#### 1.1.6- *Proliferación de astrocitos, in vitro.*

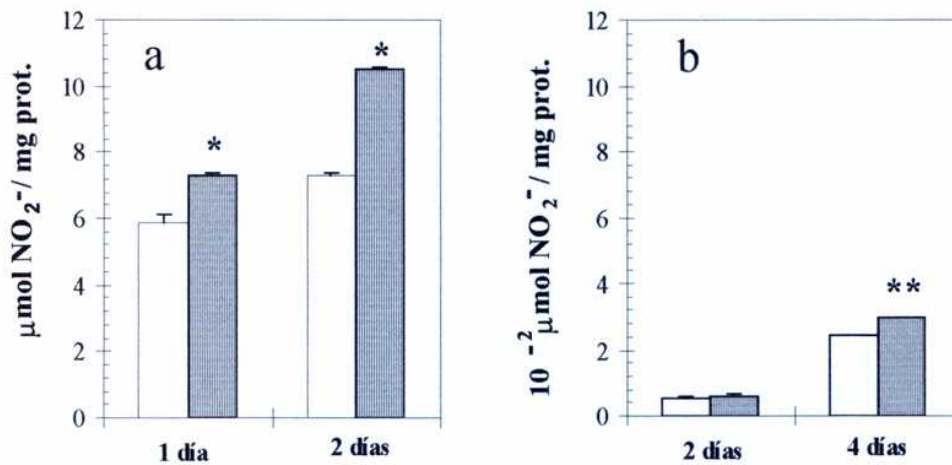
Se sembraron  $10^4$  astrocitos / pozo en placas de 96 pozos, cultivándose por 24 hs antes de agregar IL-1 (500U/ml) ó Dex ( $10^{-6}$  M) al medio de cultivo. Se midió la incorporación de Td-R (0,5  $\mu$ Ci / pozo) durante 24 hs, en pozos por cuadruplicado para cada condición el 4° día de cultivo. Se midió también la incorporación de Td-R los días 5° y 6° (datos que no se muestran) para descartar que los cultivos hubieran alcanzado el estado de confluencia. Las células se cosecharon con un cosechador manual y la radioactividad de cada muestra se midió en un contador de centelleo líquido.





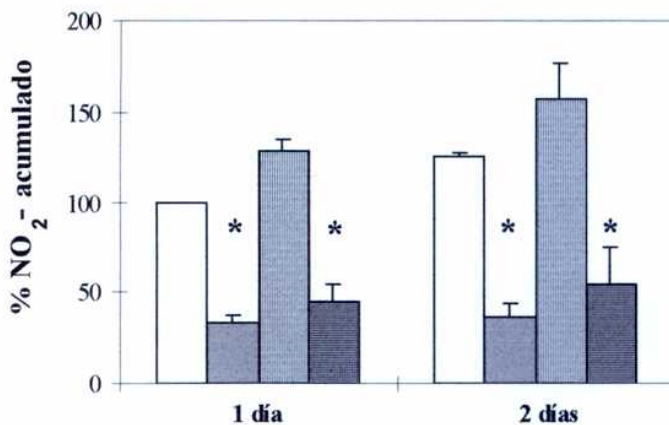
## 1.2-RESULTADOS.





Es sabido que los macrófagos producen grandes cantidades de  $\text{NO}^{\cdot}$  como consecuencia de la fagocitosis; una forma de cuantificar esta producción es midiendo la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  en el sobrenadante de células en cultivo. En nuestros experimentos, los cultivos de macrófagos tratados con Zymosán por un día incrementaron significativamente la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  (23 %) con respecto a los no estimulados, y al cabo de dos días los valores alcanzados fueron 43 % más altos que los controles (Fig. 1a ). Cuando los mismos experimentos se realizaron en cultivos de astrocitos, se observó una muy baja concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el medio luego de dos días de cultivo, que resultó igual para células estimuladas y no estimuladas. Fueron necesarios cuatro días de incubación para detectar un aumento del 22 % en cultivos estimulados con Zymosán (Fig 1b). La producción de  $\text{NO}_2^-$  observada en astrocitos fue 1000 veces menor que la producida por macrófagos, coincidiendo con los resultados obtenidos por Galea y col (Galea y col).

En la Fig 2 se muestran los efectos de la Dex en macrófagos estimulados y no estimulados. En el cultivo control sin estimular, la Dex disminuyó 60 % la acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , permaneciendo los mismos valores alcanzados al segundo día. En células estimuladas con Zymosán, la presencia del esteroide previno el aumento producido por la fagocitosis, manteniendo el mismo efecto inhibitorio que sobre las células control.

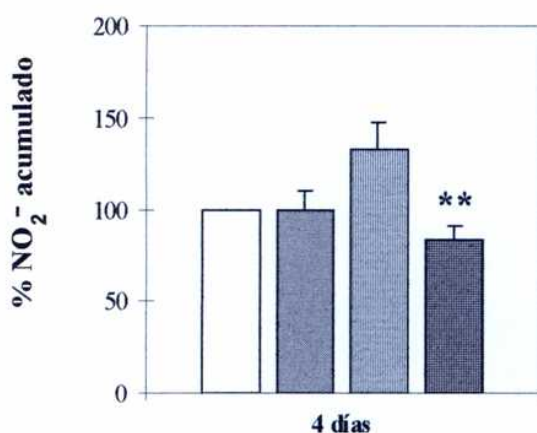






**Figura 1** Acumulación de  $\text{NO}_2^-$  por efecto de la fagocitosis de partículas de Zymosán en (a) macrófagos y (b) astrocitos. Los cultivos fueron incubados con Zymosán (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  por el tiempo indicado, siendo los controles células incubadas en ausencia de Zymosán . Los datos representan la media  $\pm$  SD de triplicados de uno de tres experimentos por separado. \*  $P < 0,001$  \*\*  $P < 0,05$  (estadístico *t* de Student)



**Figura 2** Efectos de la Dex en la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  por macrófagos. Las células se cultivaron con Dex ( $10^{-6}$  M) por 16 h previo al agregado del Zymosán (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), durante el tiempo indicado, en presencia  ó ausencia  de Dex. Los controles fueron células no estimuladas con  ó sin  Dex. Los resultados se compararon con el control del primer día, considerando este valor como el 100 %. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de por lo menos tres determinaciones por separado. \*  $P < 0,001$  (estadístico *t* de Student)

Cuando se agregó Dex a los cultivos de astrocitos, la baja acumulación de  $\text{NO}_2^-$  observada los primeros días aumentó en un 50 % ( $0,53 \pm 0,05$  vs  $0,8 \pm 0,03 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/mg}$   $P < 0,05$ ). Sin embargo en la figura 3 puede observarse que luego de cuatro días de estimulación con Zymosán, la presencia de Dex no produjo cambios en los valores control, aunque inhibió en un 50 % el aumento producido por la fagocitosis.



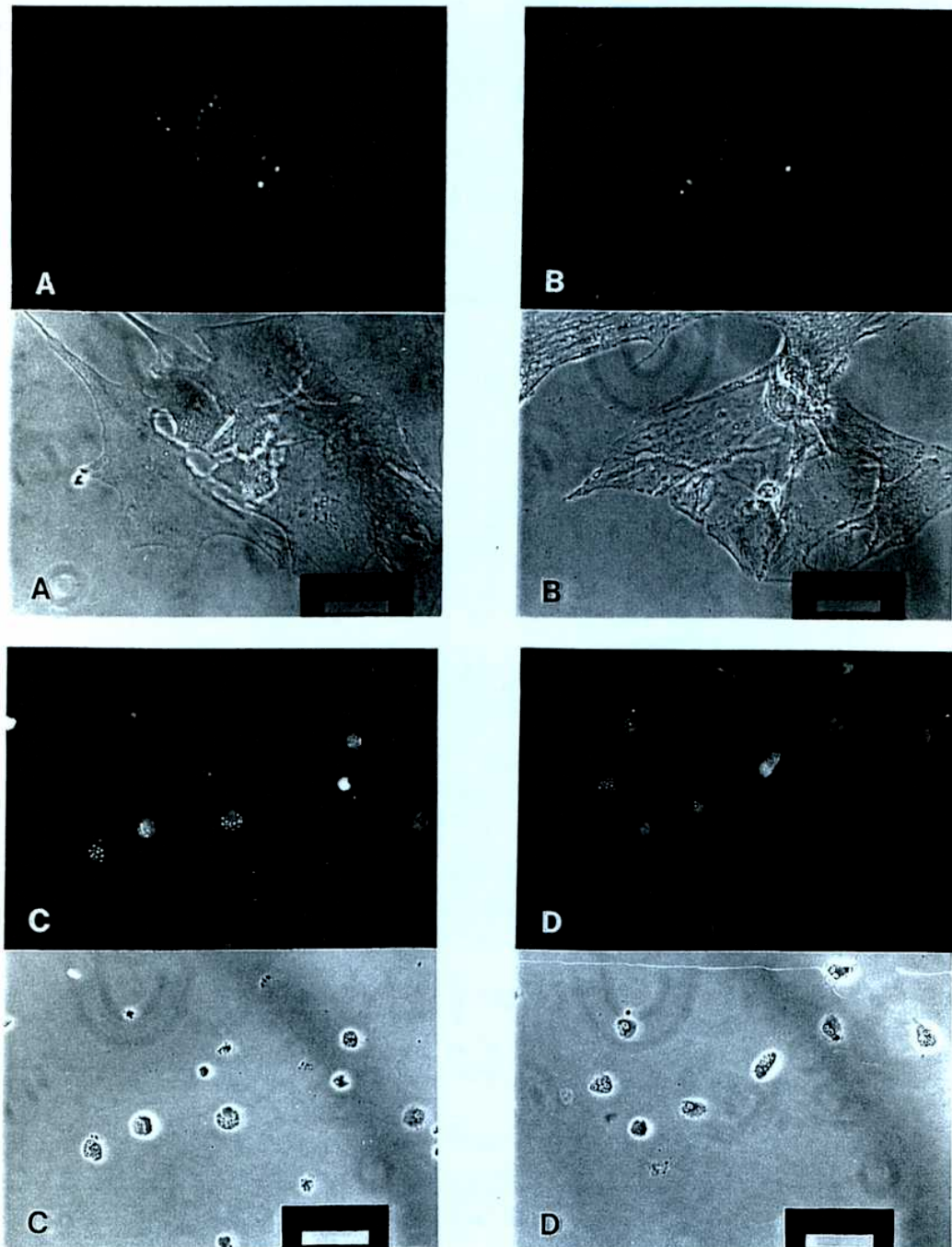
**Figura 3** Efectos de la Dex en la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  por astrocitos. Las células se cultivaron con Dex ( $10^{-6}$  M) por 16 h previo al agregado del Zymosán (500  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 4 días, en presencia  ó ausencia de  Dex. Los controles fueron células no estimuladas con  ó sin  Dex. Los resultados se compararon con el control, considerado el 100 %. Cada valor representa la media  $\pm$  SD de por lo menos tres determinaciones por separado. \*\*  $P < 0,05$  (estadístico *t* de Student)

Con el propósito de averiguar si la baja producción de  $\text{NO}$  por astrocitos después de dos días de estímulo podría deberse a que en ese período las células no hayan todavía fagocitado suficientes partículas, necesarias para desencadenar la producción de  $\text{NO}$ ; investigamos la presencia de partículas de Zymosán dentro de la célula. Para ello el Zymosán se visualizó tiñendo las partícu-

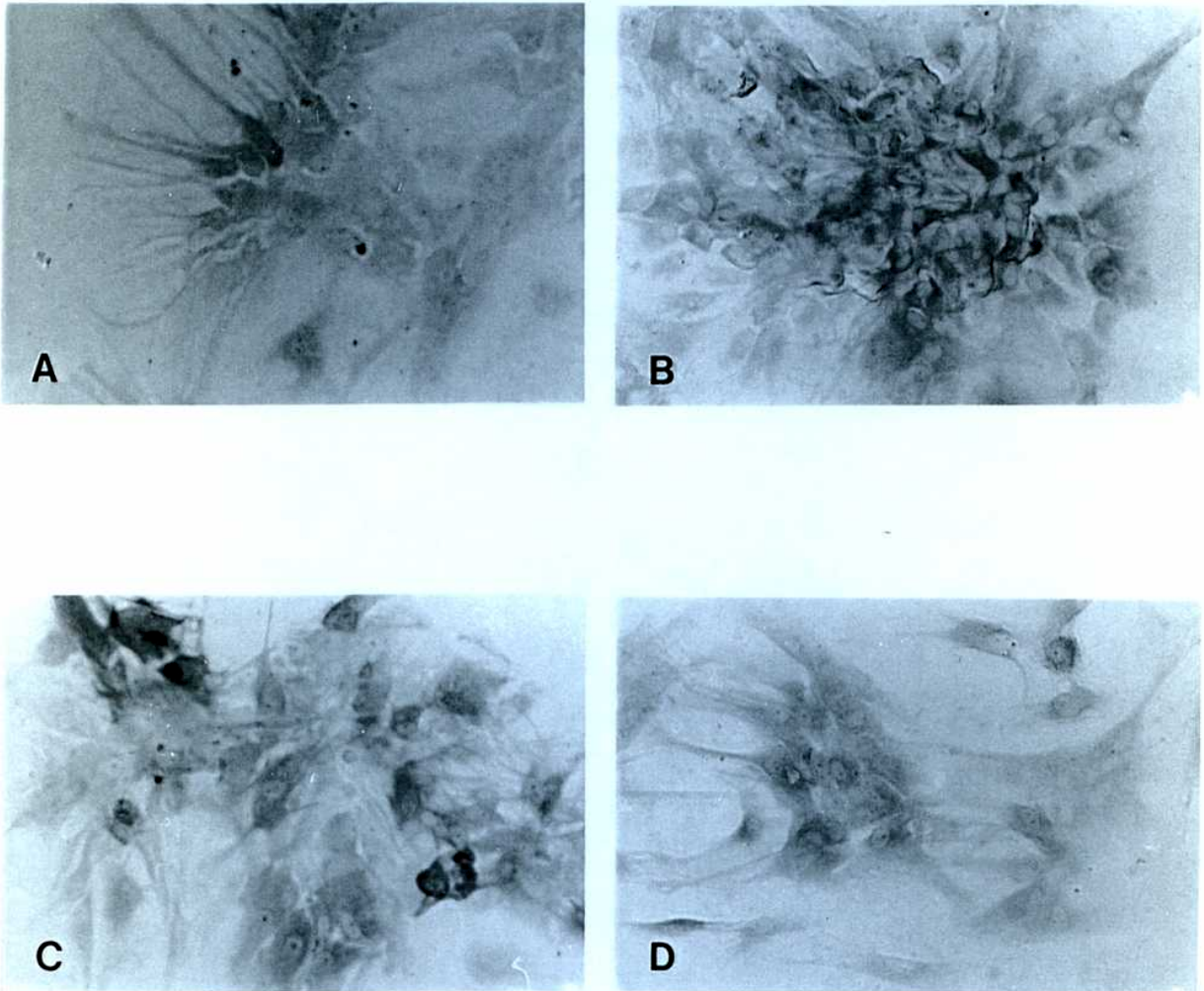
las con Naranja de Acridina, según Materiales y Métodos. Al microscopio óptico se observó que los astrocitos cultivados durante un día en presencia de Zymosán contenían muy pocas partículas, que no pudieron ser detectadas por fotografía. Fueron necesarios cuatro días de incubación con Zymosán para observar partículas dentro de la célula, las que disminuyeron dramáticamente en presencia de Dex (Fig 4). Los macrófagos en cambio después de solo 2 h de cultivo con Zymosán estaban cargados de partículas, sin variar su contenido en presencia de Dex.

Para determinar si la baja producción de  $\text{NO}$  por astrocitos era consecuencia de una incapacidad de producir peróxidos a tiempos cortos, los cultivos se trataron con un activador específico de NOSi, el PMA (Colton y col.); detectándose la activación de la NOS por localización de la NADPH-diaforasa activada. En la Fig 5 se puede observar que algunos astrocitos antes de estar en contacto con el PMA mostraron actividad NADPH-diaforasa débil, que fue más intensa cuando al cultivo se agregó Dex. A pesar de que en los tiempos estudiados no se observó incremento en la producción de  $\text{NO}_2^-$  por efecto del PMA, después de un día con dicho factor se observaron células con diferente intensidad en la expresión de la NADPH-diaforasa, que aumentó durante las siguientes horas de cultivo. En la misma figura se muestra que la preincubación con Dex produjo una disminución de la actividad NADPH-diaforasa únicamente en los cultivos tratados con PMA.

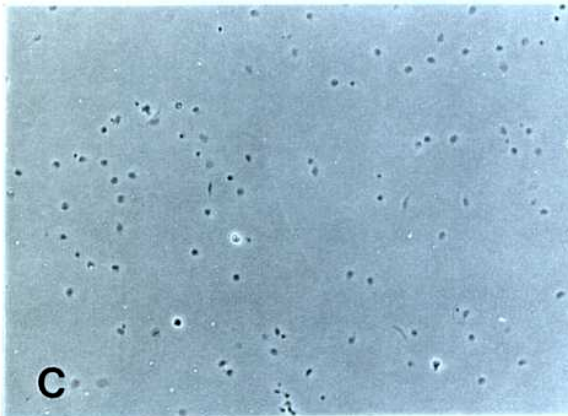
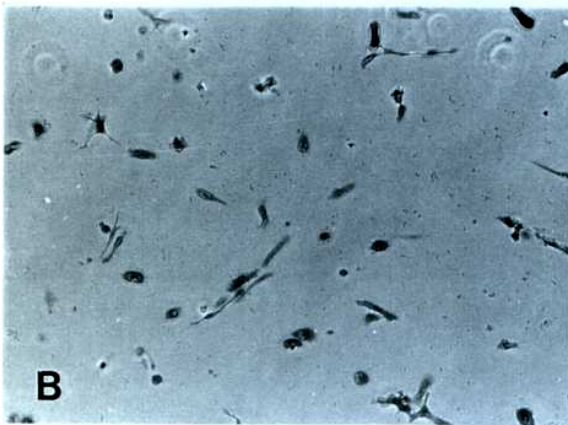
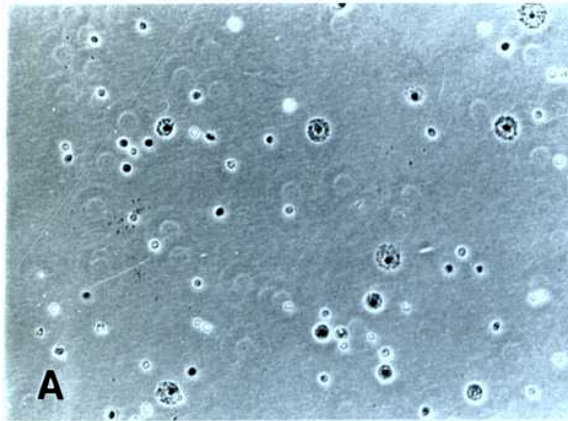
La actividad NADPH-diaforasa también fue evaluada en macrófagos (Fig 6). Allí se observó que inmediatamente después de ser extraídas del peritoneo, en las células adheridas a la placa de Petris se detectó una baja actividad NADPH-diaforasa, que 2h de cultivo con PMA hizo que resultaran fuertemente positivas. La Dex aparentemente inhibió la activación de la enzima NOS ya que las células revelaron una menor positividad para la actividad NADPH-diaforasa.



**Figura 4** Fagocitosis de partículas de Zymosán, visualizadas por fluorescencia. Las células en las microfotografías de la derecha fueron cultivadas con Dex ( $10^{-6}$  M); (A, B) astrocitos cultivados con Zymosán por 4 días, (C, D) macrófagos estimulados con Zymosán por 2h. Las fotografías se tomaron bajo un microscopio de fluorescencia, y por contraste de fase. Aumento: 1000X



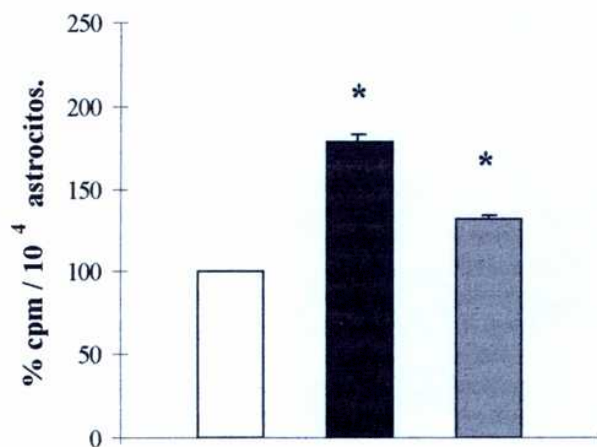
**Figura 5** Localización histoquímica de la enzima NADPH-diaforasa activa, en cultivos de astrocitos: (A) células control; (B) células control cultivadas en presencia de Dex por 1 día; (C) células estimuladas con PMA por 1 día; (D) células cultivadas en presencia de PMA + Dex, 1 día. Aumento: 20 X






**Figura 6** Localización histoquímica de la enzima NADPH-diaforasa activa, en cultivos de macrófagos peritoneales: (A) control ( células inmediatamente después de extraídas del peritoneo); (B) células cultivadas 2h con PMA; (C) células cultivadas con Dex por 16h previo al agregado de 2h de PMA. Aumento: 20 X

Por último se decidió confirmar la capacidad proliferativa de los GC sobre los astrocitos, de acuerdo a lo anteriormente observado en nuestro laboratorio (Roldán y col. 1995). Con tal objeto, se estudió el efecto de la Dex en la proliferación de astrocitos cultivados, según el sistema utilizado en el presente trabajo.

Para ello se midió la incorporación de Td-R por astrocitos de acuerdo a lo descrito en el punto 1.1.3. de Materiales y Métodos, utilizando como control positivo la IL-1. La figura 7 muestra que la IL-1 aumentó 79 % la incorporación de Td-R y la presencia de Dex produjo un aumento del 31,5 % con respecto a los valores obtenidos para astrocitos cultivados en ausencia del esteroide.



**Figura 7** Proliferación de astrocitos de corteza cerebral de rata. Los resultados de la incorporación de Td-R en las células estimuladas con IL-1 (500 U/ml)  y con Dex (10<sup>-6</sup> M)  se compararon con las células control , cuyo valor se consideró el 100%. Cada valor representa la media ± SD de triplicados, de un experimento representativo. \* P < 0,05 (estadístico *t* de Student)



### 1.3-DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que los macrófagos peritoneales de rata tienen una gran capacidad fagocítica, además de ser de fácil acceso y representar otras poblaciones de macrófagos como la microglía (Roldán y col.), se decidió utilizar estas células como controles para el estudio de la producción de  $\text{NO}^{\cdot}$ .

Los resultados presentados indican que, a diferencia de la rápida y abundante producción de  $\text{NO}_2^-$  producida por la fagocitosis de los macrófagos, la de astrocitos requirió de un período mucho más prolongado para alcanzar una concentración detectable. Una de las causas de esta menor actividad podría ser que las células necesitaran un período más prolongado para la síntesis de  $\text{NO}^{\cdot}$ , o quizás que la producción sea tan baja durante los primeros días de fagocitosis que haría imposible la detección por la técnica colorimétrica. Sin embargo, como 1 día de estímulo con PMA fue suficiente para poder observar en astrocitos la expresión de NADPH-diaforasa, esto indicaría como más factible la segunda hipótesis, ya que al ser capaces de inducir la NOS<sub>i</sub> lo son también de sintetizar  $\text{NO}^{\cdot}$ .

En los últimos años se ha comenzado a reconocer al  $\text{NO}^{\cdot}$  como una molécula difundible, mediadora en la comunicación entre células en todo el organismo y también como un agente citotóxico. En el primer caso la NOS<sub>c</sub> es responsable de su producción tal como ocurre en la transmisión nerviosa (Dawson y col.), mientras que en el segundo interviene la NOS<sub>i</sub>, actuando el  $\text{NO}^{\cdot}$  como agente nocivo en la estimulación de macrófagos (MacMicking y col.).

Es sabido que la producción de  $\text{NO}^{\cdot}$  por inducción de la NOS<sub>i</sub> es inhibida por los glucocorticoides, siendo éste uno de los mecanismos de acción antiinflamatoria ejercida sobre macrófa-

gos y otros tipos de células (Di Rosa y col.). En este Seminario se demuestra que los astrocitos también están incluidos, ya que el efecto inhibitorio de la Dex sobre la actividad NADPH-diaforasa y  $\text{NO}_2^-$  en astrocitos estimulados en cultivo se correlacionó con la disminución de la fagocitosis. Por otro lado, el aumento significativo de la producción de  $\text{NO}_2^-$  por la Dex observado en cultivos de astrocitos no estimulados, confirma la presencia de una forma activa de NOSc no inhibible por Dex en ninguno de los tiempos estudiados.

La correlación entre producción de  $\text{NO}^{\cdot}$  y fagocitosis no se verificó en el caso de los macrófagos, pues la Dex inhibió la síntesis de  $\text{NO}_2^-$  producida por la fagocitosis, sin llegar a tener efecto sobre esta última. Es ampliamente conocido el efecto inhibitorio que los glucocorticoides ejercen sobre la producción de  $\text{NO}^{\cdot}$  en macrófagos y células mesangiales, no así sus efectos sobre la fagocitosis propiamente dicha. Los resultados que figuran en este Seminario sugieren que la Dex es más efectiva en la prevención de mecanismos inducidos por la fagocitosis, como la activación de NOSi y de la fosfolipasa A2 (Brenner y col.), que sobre la fagocitosis en sí.

Dado que los macrófagos no expresan NOSc, es difícil explicar la alta producción de  $\text{NO}_2^-$  observada en células no estimuladas y la inhibición por Dex en todos los tiempos estudiados, así como la actividad NADPH-diaforasa observada en las células una vez adheridas a la placa. Sin embargo, por provenir las células del peritoneo de rata y no de una línea celular, los niveles basales de  $\text{NO}_2^-$  podrían responder a una activación de las células *in vivo*.

Por último, el efecto proliferativo de la Dex sobre los astrocitos descrito anteriormente por nosotros y confirmado en este Seminario, contrasta con la acción inmunosupresora que se manifiesta en los resultados expuestos por inhibición de la producción de  $\text{NO}^{\cdot}$ . Estos resultados resaltan la complejidad de la función de los glucocorticoides en la glía, hasta ahora poco conocida,

sugiriendo que los GC cumplirían un doble papel en los casos de injurias del SNC; por una parte favorecerían la cicatrización y por otra atenuarían el proceso inflamatorio desatado por la injuria.

## CAPÍTULO 2

### **ESTUDIOS *IN VITRO* DE ASTROCITOS DE MÉDULA ESPINAL DE RATONES NORMALES (WR/+) Y WOBBLER (WR/WR).**

Teniendo en cuenta que una de las características patológicas de los ratones *wr/wr* es un aumento del número de astrocitos GFAP inmunoreactivos en la médula espinal y el tallo cerebral, y que éstos han sido estudiados especialmente utilizando técnicas de inmunohistoquímica *in situ* (Laage y col. y González Deniselle y col.), en la segunda parte de este Seminario se analizan los resultados del estudio de la proliferación *in vitro* utilizando cultivos primarios de astrocitos de médula espinal de ratones *wr/wr* y ratones fenotípicamente normales (*wr/+*). Con el objeto de diferenciar a los astrocitos provenientes de ratones *wr/wr* de los *wr/+* se utilizaron técnicas de inmunocitoquímica para el análisis de la expresión de la proteína GFAP y la cuantificación de los receptores de glucocorticoides en repiques de cultivos primarios.

#### **2.1-MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### *2.1.1- Cultivo de astrocitos de médula espinal de ratón*

Los machos fenotípicamente normales y las hembras NFR/*wr* fueron obtenidos en Genetic Resource Section, National Institutes of Health (Bethesda, MD, U.S.A.) y apareados en nuestro instituto. Los ratones homocigotas (*wr/wr*) presentaron las primeras evidencias patológicas de

la enfermedad a las cuatro semanas de vida, permitiendo reconocer a los animales fenotípicamente normales heterocigotas ( $wr/+$ ), dentro de su camada.

Para cada cultivo se utilizó una pareja de ratones  $wr/+$  y  $wr/wr$  de un mes de edad, de la misma camada. En el laboratorio se establecieron las condiciones óptimas para el cultivo de astrocitos de médula espinal y su repique, basándonos en el protocolo descrito por Hantaz y col. La médula espinal de estos ratones se retiró en forma estéril y se disgregó en 1,5 ml de tripsina 0,01% + glucosa 0,2%, incubándose 20 minutos a 37 °C. El material se resuspendió en medio de cultivo MEM/199 (70% / 30%) con 20 % SFB y se centrifugó a 1200 rpm por 8 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en MEM/199 20% SFB adicionado con 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina y 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de fungizona y se sembró en frascos de 25  $\text{cm}^2$  pretratados con polyL-lisina. Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37 °C y 5%  $\text{CO}_2$ . El medio de cultivo se cambió cada 4 días aproximadamente, llevando al 10 % SFB en el tercer cambio. Al cabo de 40-45 días de incubación los cultivos se repicaron. Los astrocitos se levantaron con tripsina 0,25% / glucosa 0,2% / EDTA 0,075%, y se sembraron en placas (pretratadas con polyL-lisina) de 96 y 8 pozos a razón de  $10^4$  y  $2 \times 10^4$  células/pozo respectivamente. En todos los casos se estudió la viabilidad celular por exclusión de azul tripán.

### 2.1.2- Proliferación de astrocitos

Los experimentos de incorporación de Td-R se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 1 para los astrocitos de cerebro. En este caso se utilizaron las drogas: Cort  $10^{-6}$  M, IL-1 500 U/ml y TGF- $\beta$ 1 20 ng/ml, mostrándose los efectos en la incorporación de Td-R (0,5  $\mu\text{Ci}$  / pozo) durante 24 h, el 4° día de cultivo. Se midió también la incorporación de Td-R los días

5° y 6° (datos que no se muestran) para descartar que los cultivos hubieran alcanzado el estado de confluencia.

### 2.1.3- *Inmunocitoquímica de la proteína GFAP*

La inmunocitoquímica se realizó siguiendo la técnica descrita por Ferrini M. (comunicación personal), con algunas variaciones para células en cultivo. Los astrocitos se fijaron con paraformaldehído 2% durante 2 min, en las placas de 8 pozos en que fueron cultivados. Luego de 2 lavados con PBS/tritón 0,01% se preincubaron 10 min con suero de cabra 10% a 37 °C , incubándose durante toda la noche en una dilución 1/250 del anticuerpo policlonal anti-GFAP hecho en conejo, en una atmósfera húmeda a 4°C. El blanco de reacción se incubó en ausencia de éste primer anticuerpo, en las mismas condiciones. Al día siguiente, una vez a temperatura ambiente, se hicieron 2 lavados con PBS/tritón 0,01% y se incubó con el segundo anticuerpo anti-conejo hecho en cabra, biotinilado, durante 30 min a T° ambiente. El segundo anticuerpo se reveló incubando en una dilución del complejo ABC (sin tritón) 30 min y exponiendo los cultivos a 0,25 mg/ml de DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 % por 6-8 minutos, en oscuridad. Por último los portaobjetos se lavaron con PBS, se deshidrataron en alcoholes graduados y se montaron con glicerol/PBS.

Los preparados se observaron bajo el microscopio óptico, visualizando las células GFAP-inmunoreactivas por su coloración marrón, ausente en las células correspondientes al blanco de reacción. Se realizó un análisis computarizado densitométrico de la inmunoreactividad de GFAP, restando el valor correspondiente a las células control. Los resultados se expresan como la inversa de la integral de grises / área (ILIGV / AREA). También se calcularon los valores del área celular, que se expresan en  $\mu^2$ .

#### 2.1.4- Detección intracelular de receptores de glucocorticoides nucleares.

Las células se cultivaron en placas de 8 pozos en MEM/199 10%FCS durante 3 días, incubándose en MEM/199 sin SFB durante 16h. Previo a la inmunocitoquímica se agregó un pulso de 1h Dex  $10^{-6}$  M para provocar la traslocación de los RG al núcleo de las células.

Los astrocitos se fijaron con paraformaldehído 2% y luego de 2 lavados con PBS/tritón 0,01% se preincubaron con suero de cabra 10% a 37 °C por 10 min. Se incubaron durante toda la noche en una dilución 1/100 del anticuerpo policlonal anti-RG hecho en conejo, en una atmósfera húmeda a 4°C. El blanco de reacción se incubó en ausencia del anticuerpo, en las mismas condiciones. Al día siguiente, una vez a temperatura ambiente, se hicieron 2 lavados con PBS/tritón 0,01% y se incubó durante 30 min con el segundo anticuerpo anti-conejo hecho en cabra, biotinilado. Éste se reveló incubando con el complejo ABC durante 30 min y luego por exposición de los preparados a 0,25 mg/ml de DAB + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01 % + níquel de 6 a 8 min, en oscuridad. Por último los portaobjetos se lavaron con PBS, se deshidrataron en alcoholes graduados y se montaron con glicerol/PBS.

Las células se observaron bajo microscopio óptico, donde los RG se visualizaron por el producto de reacción de color negro, no observando coloración en las células del blanco de reacción. Se realizó un análisis computarizado densitométrico de la inmunoreactividad de RG nucleares, expresando los resultados como la inversa de la integral de grises / área (ILIGV / AREA).

#### 2.1.5 Análisis estadísticos

Todos los datos se expresan como la media  $\pm$  ES. Las diferencias significativas se calcularon con el estadístico de Student- *t*.

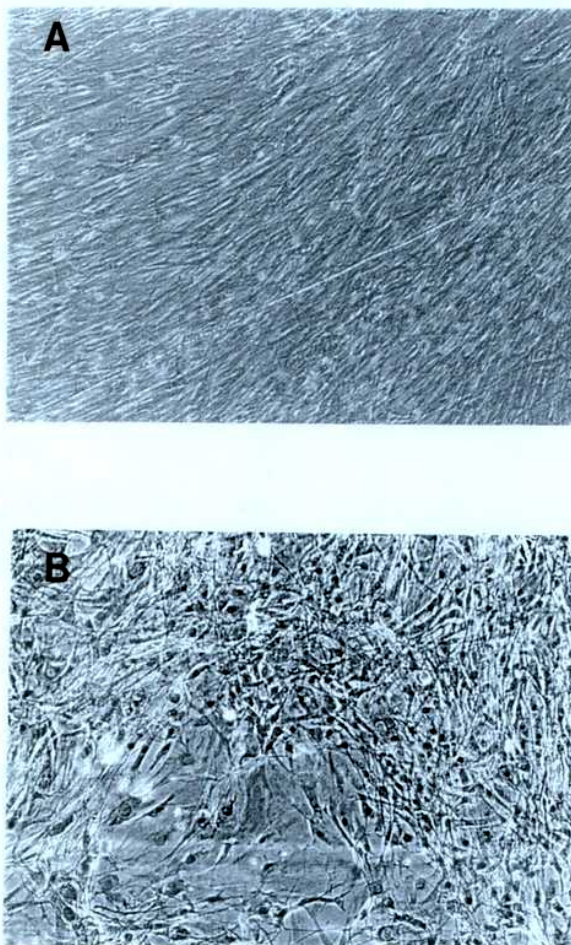
## 2.2-RESULTADOS

Las condiciones óptimas para el cultivo de astrocitos de médula espinal fueron determinadas en nuestro laboratorio. Para ello, en primer lugar se intentó cultivar la médula espinal de ratas neonatas, en las mismas condiciones en que se cultivaron los astrocitos de cerebro utilizados en los experimentos del primer Capítulo. Sin embargo, aunque ambos tejidos provenían del mismo animal las células de la médula espinal, cultivadas en estas condiciones, no proliferaron.

Finalmente, basándonos en el protocolo descrito por Hantaz. y col. (Hantaz y col.) en el que mantienen en cultivo astrocitos de médula de ratones de 1 mes de edad durante 2 a 3 semanas, se obtuvieron cultivos primarios de astrocitos de médula de ratones Wobbler de 1 mes de edad; aunque en nuestro caso se mantuvieron en cultivo por aproximadamente 45 días pudiéndose de esta manera repicar en número suficiente para realizar los experimentos aquí expuestos.

Las células obtenidas de los repiques fueron solamente astrocitos de acuerdo a la técnica de inmunocitoquímica para GFAP (Fig 8). Al microscopio óptico se pudieron diferenciar dos tipos de morfología celular: unas de cuerpo pequeño con múltiples prolongaciones delgadas, semejantes a los astrocitos fibrosos y otras más grandes con prolongaciones cortas y anchas, características de los astrocitos protoplasmáticos.





**Figura 8** Astrocitos de médula espinal de ratones Wobbler de 1 mes de edad, en cultivo. **(A)** Cultivo primario de la médula espinal de un ratón  $wr/+$ , en estado de confluencia. Las células adoptan una morfología tipo fibroblasto. **(B)** Inmunocitoquímica de la proteína GFAP en un repique del cultivo primario. El 100% de las células son GFAP-ir, pudiéndose diferenciar dos tipos de morfologías de astrocitos; Astrocitos Fibrosos y Astrocitos Protoplasmáticos. Aumento: 10 X

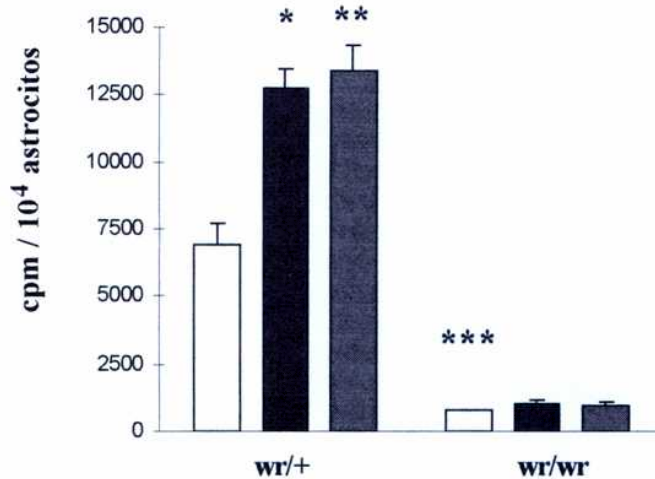
## A)- PROLIFERACIÓN

Una vez conseguidos los cultivos, y considerando que la astrocitosis es una característica propia de la médula de los ratones *wr/wr*, se decidió investigar la capacidad proliferativa de estas células con referencia a las provenientes de ratones *wr/+*; para lo que se utilizó la técnica de incorporación de Td-R descrita en el capítulo anterior. La tabla 1 muestra que, pese a la astrocitosis descrita *in situ*, en todos los casos estudiados la incorporación de Td-R fue menor en las células de ratones *wr/wr* que en la de ratones *wr/+*, manteniéndose una relación (*wr/+* vs. *wr/wr*) de  $2,78 \pm 0,54$ , coincidiendo con lo observado en el laboratorio: una menor velocidad de crecimiento con menor recuperación celular.

**Tabla 1** Incorporación de Td-R (cpm /  $10^4$  células) por astrocitos de ratón *wr/+* y de ratón *wr/wr* en estadio 1-2 de la enfermedad.

	<i>wr / +</i>	<i>wr / wr</i>	
	<i>media</i> $\pm$ <i>ES</i>	<i>media</i> $\pm$ <i>ES</i>	<i>cpm wr/+ / cpm wr/wr</i>
<i>Experimento 1</i>	16513 $\pm$ 1105	** 6339 $\pm$ 484	2,60
<i>Experimento 2</i>	16225 $\pm$ 1376	* 11400 $\pm$ 312	1,42
<i>Experimento 3</i>	6114 $\pm$ 99	** 1344 $\pm$ 103	4,55
<i>Experimento 4</i>	8063 $\pm$ 120	** 2395 $\pm$ 96	3,36
<i>Experimento 5</i>	4526 $\pm$ 601	* 2283 $\pm$ 80	1,98
	<i>n</i> = cuadruplicado	*P < 0,05    ** P < $2 \times 10^{-8}$	

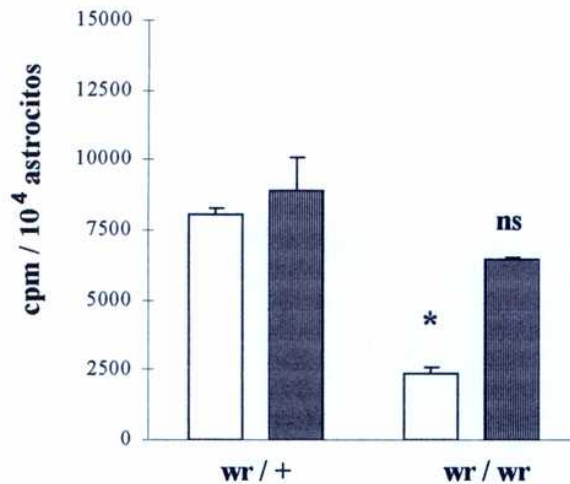
En vista de estos resultados se decidió investigar el efecto de diversas drogas que según la bibliografía podrían regular la proliferación de los astrocitos. Como muestra la Fig 9, tanto la IL-1 como la Cort causaron un aumento del 83 % y 50 % respectivamente de la síntesis de ADN en astrocitos de ratones *wr/+*, sin tener efecto sobre los astrocitos de ratones *wr/wr*.





**Figura 9** Proliferación de astrocitos de médula espinal de ratón, *wr/+* y *wr/wr*. Las células se incubaron en presencia de IL-1 (500U/ml) ■ ó Cort (10<sup>-6</sup> M) ▨ . Las células control □ se incubaron en ausencia de drogas. Los resultados de la incorporación de Td-R representan la media ± ES de cuadruplicados, de uno de cuatro experimentos por separado. \* P < 0,03 \*\* P < 0,003 \*\*\* P < 0,0003

Por otra parte, debido a una relación descrita entre la IL-1 y el TGF-β1 en patologías del SN (da Cunha y col.), este último fue otro de los factores de crecimiento estudiados. La figura 10 muestra que la presencia del TGF-β1 en el medio de cultivo produjo en las células provenientes de *wr/wr* un incremento del 170 % en la síntesis de ADN tendiendo a igualar su proliferación con

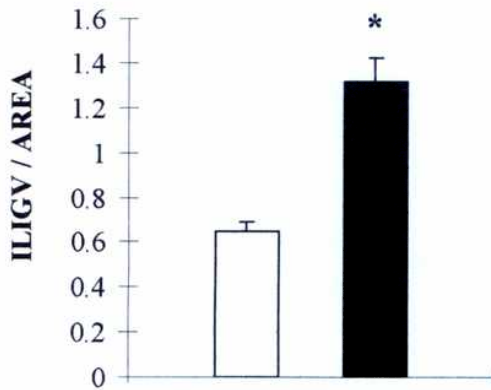
respecto a los controles. Mientras tanto no tuvo efecto en los cultivos *wr/+*. En esta figura también se confirma la diferencia existente en la incorporación de Td-R entre ambos grupos.





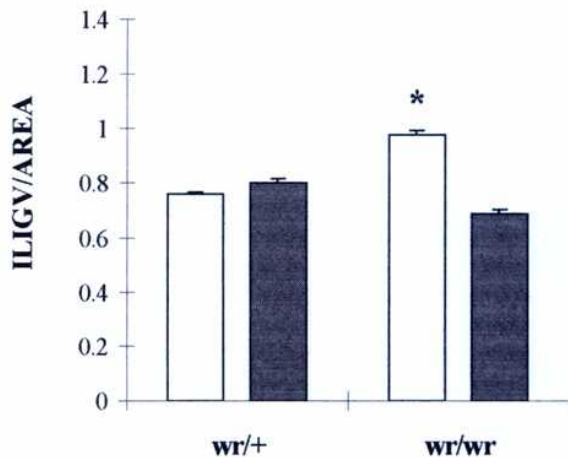
**Figura 10** Proliferación de astrocitos de médula espinal de ratón *wr/+* y *wr/wr*. Las células se incubaron en ausencia  ó presencia  de TGF-β1. Los resultados de la incorporación de Td-R representan la media ± ES de cuadruplicados de uno de dos experimentos por separado. \*  $P < 2 \times 10^{-8}$ , **ns** (vs cnt *wr/+*)



La carencia de actividad proliferativa de la Cort en los cultivos *wr/wr* no se correspondió con la presencia de receptores para glucocorticoides en estas células (mayor número que en las células *wr/+*), que se traslocaron al núcleo luego de 1h de incubación con Dex, Fig 11.

Para confirmar la funcionalidad de estos receptores se investigó el efecto de los GC en la expresión de la proteína GFAP. La Fig 12 muestra que la Cort normalizó la elevada inmunoreactividad para GFAP en *wr/wr*, no variando su expresión en los cultivos *wr/+*.



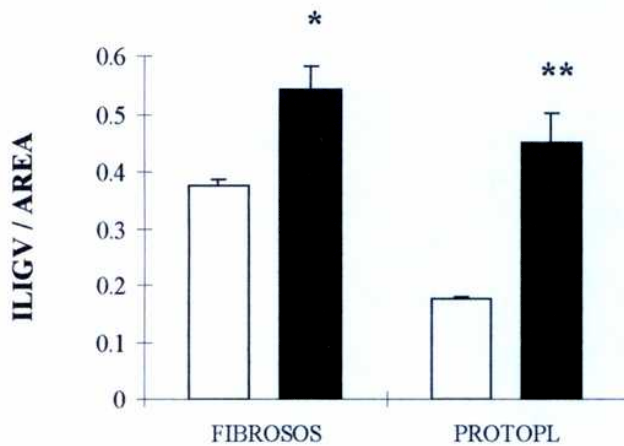
**Figura 11** Inmunocitoquímica de receptores de glucocorticoides de astrocitos wr/+  y wr/wr , en cultivo. Las células se cultivaron en ausencia de SFB, dando un pulso de Dex (1h) para provocar la traslocación de los receptores al núcleo. Los valores de la intensidad de inmunoreactividad se obtuvieron por análisis densitométrico computarizado (como se describe en el punto 2.1.4), representados por la media  $\pm$  ES del ILIGV / AREA \* P < 0,001



**Figura 12** Efecto de la Cort en la expresión de la proteína GFAP de astrocitos wr/+ y wr/wr, en cultivo. Las células se incubaron en presencia de Cort ( $10^{-6}$  M)  (wr/+ n = 48 y wr/wr n = 13) ó en ausencia del esteroide  (células control) (wr/+ n = 48 y wr/wr n = 26). Los valores de la intensidad de inmunoreactividad para GFAP se obtuvieron por análisis densitométrico computarizado (como se describe en el punto 2.1.3), representados por la media  $\pm$  ES del ILIGV / AREA \* P < 0,005 (vs wr/+ cnt.)

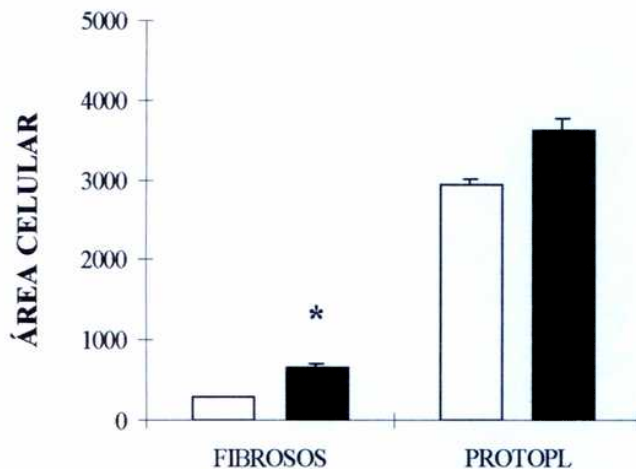
B)- DIFERENCIACIÓN ENTRE WR/+ Y WR/WR

La astrocitosis descrita por Gonzalez Denisselle y col. de la médula espinal de los ratones *wr/wr*, comprende un aumento del número de astrocitos y una mayor expresión de la proteína GFAP. Para investigar la expresión de esta proteína *in vitro*, se cuantificó por densitometría ( según Materiales y Métodos) la inmunoreactividad para GFAP de ambos tipos de astrocitos. Las células fueron clasificadas por su morfología de acuerdo a la Fig 8, siendo los astrocitos fibrosos de ambos cultivos más pequeños y más inmunoreactivos que los protoplasmáticos. La Fig 13 muestra una mayor expresión de la proteína GFAP con respecto a los controles en ambos tipos de astrocitos *wr/wr*, coincidiendo con lo observado *in situ*.



**Figura 13** Expresión de la proteína GFAP de astrocitos *wr/+*  y astrocitos *wr/wr* , en cultivo. Los valores de inmunoreactividad para GFAP se obtuvieron por análisis densitométrico de la intensidad (como se describe en el punto 2.1.3), sobre los astrocitos fibrosos y protoplasmáticos, de cada cultivo. Ambos tipos de células se diferenciaron morfológicamente. Se muestran los valores de la media  $\pm$  ES del ILIGV / AREA de  $n = 10$  ast.F y  $n = 25$  ast. P *wr/+*;  $n = 10$  ast.F y  $n = 12$  ast. P *wr/wr*. \*  $P < 0,0001$   
\*\*  $P < 0,01$

Cuando en las mismas muestras se analizó el área celular (Fig 14), los astrocitos fibrosos *wr/wr* fueron 2,3 veces más grandes que los *wr/+*. Para los astrocitos protoplasmáticos, aunque se observó una tendencia a un mayor tamaño, las diferencias del área celular entre astrocitos *wr/wr* y *wr/+* no resultaron significativas.

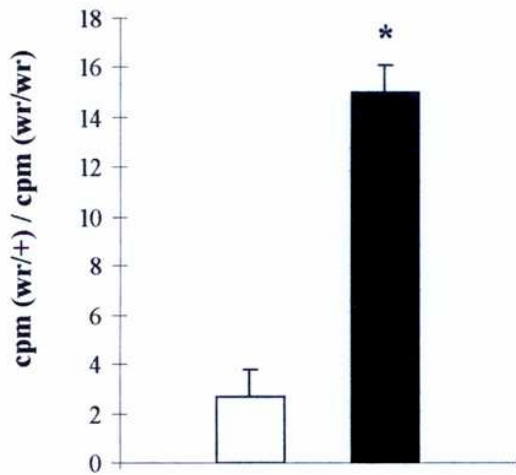


**Figura 14** El área celular de astrocitos *wr/+* (□) y astrocitos *wr/wr* (■) se calculó sobre  $n = 24$  ast. F y  $n = 33$  ast. P *wr/+*;  $n = 12$  ast. F y  $n = 15$  ast. P *wr/wr*, en cultivo. Las células se identificaron por inmunocitoquímica de GFAP, diferenciando ambos tipos de astrocitos según su morfología. Los valores representan la media  $\pm$  ES del área celular en  $\mu^2$ . \*  $P < 0,005$

Hasta aquí, los resultados de este trabajo permitieron caracterizar a los astrocitos de la médula espinal de ratones fenotípicamente normales y ratones Wobbler con grado 1-2 de enfermedad, en cuanto a su capacidad proliferativa y a la respuesta a factores de crecimiento *in vitro*. También se definió morfológicamente la población celular de los cultivos de médula de estos ratones.

Con el objeto de determinar si el carácter progresivo de la enfermedad en los wr/wr se reflejaba en cambios de comportamiento de los astrocitos en cultivo, se estudiaron los parámetros antes descritos en una población proveniente de un ratón en estadio 3-4 de enfermedad.

La incorporación de Td-R de astrocitos wr/wr estadio 3-4 tuvo valores más bajos que los de grado 1-2 ( $816 \pm 11$  cpm /  $10^4$  células) siendo menor que los cultivos control de animales de la misma edad ( $12284 \pm 1046$  cpm /  $10^4$  células). Éstas a su vez tuvieron la misma capacidad de síntesis de ADN que los controles correspondientes al grado 1-2 (tabla 1). La Fig 14 muestra que la relación en la incorporación de Td-R entre controles y wr/wr grado 1-2 fue menor que la correspondiente a grado 3-4.



**Figura 15** Relación de la proliferación de astrocitos wr/+ y wr/wr, con respecto al avance de la enfermedad. La incorporación de Td-R por astrocitos en cultivo, provenientes de animales wr/wr en estadio 1-2  y estadio 3-4  se expresó en relación a la incorporación de Td-R de células en cultivos de animales sanos provenientes de la misma camada, respectivamente. Los valores representan la media  $\pm$  ES de cinco experimentos por separado para el estadio 1-2; y la media  $\pm$  ES de cuadruplicados de un experimento para el estadio 3-4. \*  $P < 0,00001$



Con respecto a las características morfológicas de los astrocitos provenientes del ratón en estadio avanzado de la enfermedad, el 100 % de las células en cultivo resultó GFAP positivas pudiéndose identificar los tipos de astrocitos anteriormente descritos (Fig 15). Con los valores del área celular e intensidad de GFAP se realizaron histogramas en los que aparecen representadas las poblaciones de astrocitos fibrosos y protoplasmáticos (Fig 15). En ellos se observa un aumento de la expresión de GFAP en los astrocitos wr/wr, que se hace máxima para los astrocitos fibrosos en el estado avanzado de la enfermedad. Con respecto al tamaño celular, los astrocitos fibrosos wr/wr fueron mayores que los controles independientemente del avance de la enfermedad (wr/wr (1-2)  $501 \pm 63,2$  vs wr/+  $138 \pm 19,7$   $P < 0,005$ ; wr/wr (3-4)  $480 \pm 52,5$  vs wr/+  $108 \pm 11,04$   $P < 1 \times 10^{-7}$ ) mientras que los protoplasmáticos provenientes de wr/wr (3-4) resultaron 10,4 veces más grandes que los controles correspondientes ( $20441 \pm 3482$  vs  $1966 \pm 325$   $P < 1 \times 10^{-7}$ ).

**Figura 16** Expresión de la proteína GFAP en cultivos de astrocitos de médula espinal de ratón: (A) wr/+, (B) wr/wr grado 1-2 y (C) wr/wr grado 3-4 de enfermedad, por inmunocitoquímica de GFAP descrita en el punto 2.1.3. En las microfotografías se observan astrocitos fibrosos y protoplasmáticos según su morfología, antes descrita. Con los valores del ILIGV / AREA y el área celular de los astrocitos fibrosos (•) y protoplasmáticos (°), se construyeron los histogramas que se muestran a la derecha de cada microfotografía. (A)  $n_{\bullet} = 24$ ,  $n_{\circ} = 33$ ; (B)  $n_{\bullet} = 13$ ,  $n_{\circ} = 16$ ; (C)  $n_{\bullet} = 32$ ,  $n_{\circ} = 28$ . Las escalas de ambos ejes para (A) y (B) coinciden, mientras que la escala del eje de abscisas de (C) es 3 veces mayor. Aumento: 20 X



## 2.4-DISCUSIÓN

La técnica del cultivo de tejidos ofrece muchas ventajas para el estudio de la actividad celular, debido a que permite controlar en forma precisa las variables fisicoquímicas como también mantener constantes las condiciones fisiológicas del cultivo, aunque estas últimas no siempre puedan ser totalmente definidas. Sin embargo, debe ponerse énfasis en las limitaciones propias de la técnica, ya que una célula en cultivo no siempre se comporta igual que formando parte del tejido. En este trabajo se observó que células de la astrogliá provenientes de diferentes zonas del SNC de un mismo animal tienen requerimientos distintos para su cultivo, probablemente debido a una composición celular diferente.

La corteza cerebral es una zona enriquecida en sustancia gris, donde la mayoría de los astrocitos son protoplasmáticos, mientras que la médula espinal al estar formada por sustancia blanca y gris presenta ambas morfologías de astrocitos. Además hay que tener en cuenta que los cultivos de astrocitos de corteza de cerebro, provenientes de animales neonatos, cuando llegan a confluencia no presentan características morfológicas típicas por lo que quizás deriven de astrocitos inmaduros tipo 1. En cambio, en los cultivos de médula espinal por obtenerse de animales adultos podrían predominar las células tipo 2; cualquiera sea su origen éstas conservan su morfología aún en confluencia.

Teniendo en cuenta la astrocitosis presente en la médula espinal de los ratones *wr/wr*, llama la atención la baja proliferación observada *in vitro* con respecto a los controles. Esto sugiere que la astrocitosis dependería *in vivo* de factores y/o células presentes en la médula de animales enfermos; esta contradicción entre lo observado *in vivo* e *in vitro* se agudizó con el avance de la

enfermedad. Por otro lado, las células provenientes de animales *wr/wr* no respondieron a factores proliferativos de astrocitos de cerebro como son la IL-1 y los GC, y sí lo hicieron los astrocitos provenientes de animales sanos. Como no se conoce el mecanismo de proliferación de estos esteroides cabe pensar que ellos podrían estar alterando alguna fase del ciclo celular, o que por una acción “permissiva” inhibirían algún factor inhibitorio o activaría factores proliferativos. Cualquiera sea el mecanismo proliferativo de los GC, éste no se observó en los astrocitos *wr/wr*. Sin embargo, estas células no fueron incapaces de responder a factores de crecimiento ya que el TGF- $\beta$ 1 aumentó la proliferación, llegando casi a igualar los valores obtenidos para células control, sin tener efecto en estas últimas.

La incapacidad de los GC de aumentar la síntesis de ADN en los cultivos *wr/wr* no se debe ni a la ausencia de sus receptores ni a la disfunción de los mismos, ya que en éstas células la Cort disminuyó la expresión de GFAP, lo que coincide con la regulación de la expresión de esta proteína por la Cort, observada *in vivo* (González Denisselle y col.). El hecho de que estos esteroides no sean proliferativos sería una consecuencia positiva en el tratamiento de enfermedades degenerativas con astrocitosis, sin impedir, por otra parte, los mecanismos inmunosupresores típicos de los GC en tratamientos terapéuticos de estas enfermedades. De ser así, se pone de manifiesto la importancia de los GC en la regulación de mecanismos inmunológicos, según lo demostrado en el primer Capítulo.

Es importante destacar que en numerosas patologías del SNC, las neuronas por lo general presentan alteraciones que las invalida en el cumplimiento de sus funciones, mientras que las células de la glía responden en forma hiperactiva. Entre ellas los astrocitos adquieren fenotipos *reactivo* (Eddleston M. y col.), que podrían ser consecuencia de alteraciones propias y/o ser inducidos

por otros tipos celulares presentes en el tejido afectado. En el caso de la médula espinal de los ratones *wr/wr*, las diferencias morfológicas observadas en los astrocitos en cultivo se mantuvieron aún después de ser repicados, lo que sugiere la presencia de alteraciones genéticas que se ven magnificadas con el avance de la enfermedad. Estas alteraciones observadas *in vitro* podría agravarse *in vivo* por alteraciones del medio, lo que llevaría a una astrocitosis de la médula espinal. Por lo tanto, cabe pensar que dicha astrocitosis podría ser consecuencia de una hiperproliferación astrocitaria o también de una inhibición de los mecanismos apoptóticos propios de las células.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armstrong R. C., L. Harvath, M. E. Dubois-Dalcq. 1990. Type 1 Astrocytes and Oligodendrocyte-Type 2 Astrocyte Glial Progenitors Migrate Toward Distinct Molecules. *Journal of Neuroscience Research* 27:400-407
2. Brenner T., A. Boneh, E. Shohami, O. Abramsky y J. Weidenfeld. 1992. Glucocorticoid regulation of eicosanoid production by glial cells under basal and stimulated conditions. *J. Neuroimmunol.* 40: 273-280
3. Braken M.B., M.J. Shepard, W.F. Collins, T.R. Baskin, H.M. Eisenberg, E.S. Flamm, L. Leo-Summers, L.F. Marshall, P.L. Perot, J. Piepmeyer, V.K.H. Sonntag, F.C. Wagner, J.E. Wilberger, H.R. Winn y W. Young. 1992. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up :results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J. Neurosurg.* 76: 23-31.
4. Chao C. C., S. Hu, W. S. Sheng, D. Bu, M. I. Bukrinsky y P. K. Peterson. 1996. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism *Glia* 16: 276-284
5. Colton C. A. y D. L. Gilbert. 1993. Microglia an *in vivo* source of reactive oxygen species in the brain *Advances in Neurology* 59: 321-326
6. Colton C.A., J.Snell, O. Chernyshev y D. Gilbert. 1994. Induction of superoxide anion and nitric oxide production in culture. *Microglia Annals N.Y. Acad. Science* 738: 54-63
7. da Cunha A., J. A. Jefferson, R. W. Jackson y L. Vitkovic'. 1993. Glial cell-specific mechanisms of TGF- $\beta$ 1 induction by IL-1 in cerebral cortex. *J. of Neuroimmunology* 42: 71-86

8. da Cunha A., J. J. Jefferson, W. R. Tyor, J. D. Glass, F. S. Jannotta, L. Vitkovic'. 1993. Control of astrogliosis by interleukin-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 in human brain. *Brain Research* 631: 39-45
9. Dawson T. M., V. L. Dawson y S. H. Snyder. 1992. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.* 32: 297-311
10. Di Rosa M., M. Radomski, R. Carnuccio y S. Moncada. 1990. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Bioch. Biophys Res. Comm.* 172, 3: 1246-1252
11. Durum S. K., J. A. Schmith, J. J. Oppenheim. 1985. Interleukin 1: An Immunological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 3: 263-287
12. Eddleston M., L. Mucke. 1993. Molecular profile of reactive astrocytes - Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 1: 15-36
13. Gadiant R. A., K. C. Cron y U. Otten. 1990. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neuroscience Letters* 117: 335-340
14. Galea E., D. L. Feinstein y D. J. Reis. 1992. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10945-10949
15. Giulian D., L. B., Lachman. 1985. Interleukin-1 Stimulation of Astroglial Proliferation After Brain Injury. *Science* 228: 497-498
16. González Deniselle M. C., S. L. González, G. G. Pirolí, A. E. Lima y A. F. De Nicola. 1995. The 21-Aminosteroid U-74389F Increases the Number of Glial Fibrillary Acidic Protein-

Expressing Astrocytes in the Spinal Cord of Control and Wobbler Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology* 16, 1: 61-72

17. González Deniselle M. C., S. L. González, G. G. Piroli, M. Ferrini, A. E. Lima y A. F. De Nicola. 1997. Glucocorticoid Receptors and Actions in the Spinal Cord of the Wobbler Mouse, a Model for Neurodegenerative Diseases. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 60, 3-4: 205-213
18. Green L.C., D. A. Wagner, Y. Glouwgovski, P. L. Skepper, J. S. Wishnok y S. R. Tennebaum. 1982. Analysis of nitrate biological fluids. *Anal. Biochem.* 124: 131-138
19. Greenberg S.J., J. E. Khoury, E. Kaplan y S. C. Silverstein. 1991. A fluorescent technique to distinguish attached from ingested erythrocytes and zymosan particles in phagocytosing macrophages. *Immunology Methods* 139: 115-122
20. Hantaz-Ambroise D., D. Cambier, A. Ait-Ikhlef, Ph. Parvy, M. Murawsky y F. Rieger. 1995. Excess Extracellular and Low Intracellular Glutamate in Poorly Differentiating Wobbler Astrocytes and Astrocyte Recovery in Glutamine-Depleted Culture Medium. *Journal of Neurochemistry* 65, 3: 1199-1204
21. Hertz L., D. E. McFarlin y B. H. Waksman. 1990. Astrocytes: auxiliary cells for immune responses in the central nervous system? *Immunology Today* Vol. 11 265-268
22. Houle J.D., J.H. Ye y C.J.M. Kane. 1996. Axonal regeneration by chronically injured supraspinal neurons can be enhanced by exposure to insulin-like growth factor, basic fibroblast growth factor or transforming growth factor beta. *Restorative Neurology and Neuroscience* 10:205-215
23. Katsuura G., P. E. Gottschall, R. R. Dahl y A. Arimura. 1989. Interleukin-1 *beta* Increases Prostaglandin E<sub>2</sub> in Rat Astrocyte Cultures: Modulatory Effect of Neuropeptides. *Endocrinology* 124, 6: 3125-3127



24. Kunz D., G. Walker, W. Eberhardt, J. Pfeilschifter. 1996. Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1b-stimulated mesangial cells: Evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 255-259
25. Laage S., G. Zobel, H. Jockusch. 1988. Astrocyte Overgrowth in the Brain Stem and Spinal Cord of Mice Affected by Spinal Atrophy, Wobbler. *Dev. Neurosci.* 10: 190-198
26. Laping N. J., B. Teter, N. R. Nichols, I. Rozovsky y C. E. Finch. 1994. Glial Fibrillary Acidic Protein: Regulation by Hormones, Cytokines, and Growth Factors. *Brain Pathology* 1:259-275
27. Loughlin A. J., M. N. Woodroffe y M. L. Cuzner. 1992. Regulation of Fc receptor and major histocompatibility complex antigen expression on isolated rat microglia by tumor necrosis factor, interleukin-1 and lipopolysaccharide: effects on interferon-gamma induced activation. *Immunology* 75:170-175
28. Ma W. y L. L. Vacca-Galloway. 1991. Reduced Branching and Length of Dendrites Detected in Cervical Spinal Cord Motoneurons of Wobbler Mouse, a Model for Inherited Motoneuron Disease. *The J. of Comparative Neurology.* 311: 210-222
29. MacMicking J., Q. Xie y C. Nathan. 1997. Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350
30. Mattson M. P., S. W. Barger, K. Furukawa, A. J. Bruce, T. Wyss-Coray, R. J. Mark y L. Mucke. 1997. Cellular signaling roles of TGF- $\beta$ 1, TNF $\alpha$  and  $\beta$ APP in brain injury responses and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 23:47-61

31. McCarthy K.D. y J. de Vellis. 1980. Preparation of Separate Astroglial and Oligodendroglial Cell Cultures from Rat Cerebral Tissue. *J. Cell Biology* 85: 890-902
32. Miller R. H., H. Zhang, J. Fok-Seang. 1994. Glial Cell Heterogeneity in the Mammalian Spinal Cord. *Perspectives on Developmental Neurobiology* 2, 3: 225-231
33. Mitsumoto H. y W. G. Bradley. 1982. Murine Motor Neuron Disease (the Wobbler mouse) Degeneration and Regeneration of the Lower Motor Neuron. *Brain* 105: 811-834
34. Murphy S., M. L. Simmons, L. Agullo, A. Garcia, D. L. Feinstein, E. Galea, D. J. Reis, D. Minc-Golomb y J. P. Schwartz. 1993. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends in Neurosciences* 16, 8: 323-328
35. Murphy S., R. L. Minor Jr., G. Welk y D. G. Harrison. 1990. Evidence for an Astrocyte-Derived Vasorelaxing Factor with Properties Similar to Nitride Oxide. *J. of Neurochemistry* 55, 1: 349-351
36. Norris J. G., L. Tang, S. M. Sparacio, E. N. Benveniste. 1994. Signal Transduction Pathways Mediating Astrocyte IL-6 Induction by IL-1  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . 1994. *Journal of Immunology* 152: 841-850
37. Noske W., H. Lentzen, K. Lange y K. Keller. 1982. Phagocytotic Activity of Glial Cells in Culture. *Experimental Cell Research* 142: 437-445
38. Oudega M., E. Marani. 1991. Expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein in the developing rat spinal cord: an immunocytochemical study of the spinal cord glial system. *J. Anat* 179: 97-114
39. Piani D., D. B. Constam, K. Frei, A. Fontana. 1994. Macrophages in the Brain: Friends or Enemies? *NIPS* 9: 80-84

40. Reder A.T., M.T. Lowy, H. Y. Meltzer y J. P. Antel. 1987. *Neurology* 37: 849-853
41. Roldán A., S. Gogg, M. Ferrini, R. Schillaci y A.F. De Nicola. 1997. Glucocorticoid regulation of *in vitro* astrocyte phagocytosis. *Biocell* 21: 93-99
42. Roldán A., S. Gogg, M. Ferrini, R. Schillaci y A.F. De Nicola. 1995. Glucocorticoids regulate proliferation and phagocytic properties of cultured astrocytes. 9th Congreso Internacional de Inmunología, San Francisco CA. EE.UU. N° Res 2454
43. Smith M. E., D. E. McFarlin, S. Dhib-Jalbut. 1993. Differential effect of interleukin-1 $\beta$  on Ia expression in astrocytes and microglia. *J. of Neuroimmunology* 46: 97-104
44. Somjen, G.G. 1988. Nervenkitz: Notes on the History of the Concept of Neuroglia. *GLIA* 1:2-9
45. Stamler J. S., D. J. Singel y J. Loscalzo. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902
46. Van Snick J. 1990. Interleukin-6: An Overview. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 253-278
47. Wei X., I.G. Charles, A. Smith, J. Ure, G. Feng, F. Huang, D. Xu, W. Muller S. Moncada y F. Liew. 1995. Altered immune responses in mice lacking oxide synthase. *Nature* 375: 408-411
48. White K. A. y M. A. Marletta. 1992. Nitric Oxide Synthase Is a Cytochrome P-450 Type Hemoprotein. *Biochemistry* 31, 29: 6627-6631
49. Wilkin G. P., D. R. Marriott, A. J. Cholewinski. 1990. Astrocyte heterogeneity. *TINS* 13, 2: 43-45

50. Yao J., J. E. Keri, R. E. Taffs y C. A. Colton. 1992. Characterization of interleukin-1 production by microglia in culture. *Brain Research* 591: 88-93
51. Young K.K.L., F. Tang, y L.L. Vacca-Galloway. 1992. Changes of neuropeptides in spinal cord and brain stem of Wobbler mouse at different stages of motoneuron disease. *Neuroscience* 50: 209-222

*Luis F. G. G.*

*Haue*