



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DESCRIPCIÓN DEL FUNCIONAMIENTO MITOCONDRIAL
DEL MÚSCULO GASTROCNEMIO EN UN MODELO ANIMAL DE
NEURODEGENERACIÓN.**

Que para obtener el título de

Biólogo

P R E S E N T A

Hernández López Rafael Enezer

ASESORA

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

**Laboratorio de neurofisiología del desarrollo y
neurodegeneración**

Unidad de Biomedicina

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2013.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofisiología del desarrollo y neurodegeneración en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica y Bioenergética, Unidad de Biomedicina en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Este trabajo se apoyó parcialmente con una Beca del proyecto PAPIIT IN220811 de la DGAPA

I Abreviaturas	7
II Dedicatorias	8
III Agradecimientos	9
IV Resumen	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 La Enfermedad de Huntington (EH)	11
1.2 Historia	13
1.3 Causas genéticas de la EH	14
1.4 Tratamiento farmacológico	14
1.5 Modelos murinos	15
1.5.1 R6/1 y R6/2.....	15
1.6 Modelo farmacológico	16
1.6.1 Ácido 3-nitropropiónico (3-NP).....	17
1.7 Dato histórico 3-NP	17
1.8 3-NP como herramienta farmacológica	18
1.9 Músculo Esquelético	19
1.10 Fibras musculares	20
1.10.1 Fibras Tipo 1 (Contracción lenta).....	20
1.10.2 Fibras Tipo 2 (Contracción rápida).....	20
1.11 Músculo gastrocnemio	21
1.12 La Mitocondria	22
1.12.1 Membrana Externa.....	23
1.12.2 Espacio Intermembranal.....	23
1.12.3 Membrana Interna.....	23
1.12.4 Matriz mitocondrial.....	24
1.13 Cadena Respiratoria Mitocondrial	25
1.13.1 Complejo I.....	25
1.13.2 Complejo II.....	25

1.13.3 Coenzima Q.....	25
1.13.4 Complejo III.....	26
1.13.5 Citocromo c.....	26
1.13.6 Complejo IV.....	26
1.14 Enfermedades Neurodegenerativas y disfunción mitocondrial.....	27
1.15 Radicales libres (RL) y estrés oxidativo.....	29
2. ANTECEDENTES.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. OBJETIVOS.....	33
5. METODOLOGÍA.....	33
5.1 Inducción al modelo neurodegenerativo de la EH.....	34
5.2 Obtención del músculo esquelético.....	34
5.3 Extracción de mitocondrias de músculo esquelético.....	34
5.4 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial.....	35
5.5 Determinación de la concentración de proteína mitocondrial por UV.....	35
5.6 Ensayo 2, actividad de los complejos I y II.....	36
5.7 Ensayo 1, actividad de los complejos III y IV.....	37
6. RESULTADOS.....	38
6.1 Obtención de las mitocondrias.....	38
6.2 Actividad de los cuatro complejos mitocondriales.....	38
6.3 Inhibición de los complejos mitocondriales.....	39
6.4 Actividad de los cuatro complejos mitocondriales (SOD y catalasa).....	41
6.5 Inhibición de los complejos mitocondriales (SOD y catalasa)	42
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIÓN.....	49
9. PERSPECTIVAS	50
10. LITERATURA CITADA.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Balance negativo de energía, pérdida de peso cuando el gasto energético supera la ingesta de energía.....	12
Figura 2 Número aproximado de publicaciones de la enfermedad de Huntington citada para ese año en la lista actual de la literatura médica (antes de 1966) y en PubMed (1967 en adelante).	13
Figura 3 Músculo gastrocnemio, señalando los tipos de fibras que lo conforman así como su color y tipo de contracción.....	21
Figura 4 Fotografía de una mitocondria hepática por micrografía electrónica (100nm) en la que se señalan las cuatro partes en que se divide la mitocondria: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna y matriz mitocondrial.....	24
Figura 5 Esquema de la cadena de transporte de electrones, mostrando los cuatro complejos mitocondriales así como el citocromo c y coenzima Q.....	27
Figura 6 Principales enfermedades Neurodegenerativas, tipo de mutación y alteración mitocondrial.....	28
Figura 7 Diagrama de la metodología.....	33
Figura 8 Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos I y II. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo.....	36
Figura 9 Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos III y IV. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo.....	37
Figura 10 Actividad de los cuatro complejos respiratorios expresada en nmol/min/mg de proteína. Se muestra un decremento en la actividad del Complejos II (Succinato deshidrogenasa) con una diferencia significativa (*) entre los grupos control y 3-NP. El complejo I (NADH deshidrogenasa) al igual que el complejo III (ubiquinol citocromo c	

oxidoreductasa) presentaron un decremento en su actividad sin ser significativo. Por otro lado el complejo IV (citocromo c oxidasa) presentó un decremento significativo (*) 3-NP con respecto al control (n=7). Se consideró * $p \geq 0.05$**39**

Figura 11 Inhibición de los complejos respiratorios con inhibidores específicos expresada en porcentaje. Se muestra una mayor inhibición en los complejos III y IV e insuficiente para complejo I. (No significativos entre grupo control y 3-NP (n=7)).....**40**

Figura 12 Actividad de los cuatro complejos respiratorios en presencia de las enzimas antioxidantes SOD y Catalasa expresada en nmol/min/mg de proteína. Los Complejos II (Succinato deshidrogenasa) y IV (citocromo c oxidasa) presentaron un decremento significativo (*) en su actividad en el tratamiento 3-NP con respecto al control. El complejo I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol citocromo c oxidoreductasa) presentaron un decremento sin ser significativo (n=7). Se consideró * $p \geq 0.05$**41**

Figura 13 Inhibición de los complejos respiratorios con inhibidores específicos en presencia de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, expresada en porcentaje. Se muestra una mayor inhibición en los complejos III y IV e insuficiente para complejo I. (No significativos entre grupo control y 3-NP). No se muestra complejo II ya que este fue bloqueado con 3-NP en los animales tratados (n=7).....**42**

I ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
APase	Fosfatasa alcalina
ATP	Adenosín Trifosfato
CAT	Catalasa
CoQ	Coenzima Q
COX	Citocromo c Oxidasa
CRM	Cadena Respiratoria Mitocondrial
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EP	Enfermedad de Parkinson
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Mononucleótido de flavina
GSH	Glutación
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
NMDA	N-Metil-D- aspartato
ON	Óxido Nítrico
OH	Hidroxilo
O₂	Superóxido
ONOO₂	Peroxinitrito
RL	Radicales Libres
ERO	Especies Reactivas del oxígeno
ERN	Especies Reactivas del Nitrógeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SOD	Superóxido Dismutasa
3-NP	Acido 3-nitropropiónico

II AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray por aceptar ser mi tutora aún sin conocerme, por la confianza que desde el principio depositó en mí. Por su experiencia transmitida, constantes enseñanzas, sus consejos y por brindarme su amistad.

A la Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid titular del laboratorio de Bioquímica y Bioenergética por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por haber revisado el trabajo final de la tesis.

Al M. en C. Ernesto Mendoza Duarte por su ayuda técnica para la realización de esta tesis, su paciencia, respuestas a cada pregunta y sobre todo por su amistad.

A la M. en C. Tecilli Cabellos Avelar que me brindo toda la ayuda técnica y consejos necesarios en el desarrollo de este trabajo, su paciencia y confianza.

A mis compañeros de laboratorio Elizabeth, Edmundo, Víctor, Isaac, y Jorge por la compañía, las charlas amenas, los buenos ratos y momentos divertidos de compañerismo y amistad tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mis compañeros y amigos durante la licenciatura con los que pase tantos momentos divertidos y otros en ocasiones estresantes Brisa, Alejandra, Fátima, Aurora y Alan.

A mi compañera, amiga y gran persona Gina Araceli por los grandes momentos compartidos, su apoyo en días difíciles y sobre todo con quien eh crecido como persona.

A mi familia por el gran esfuerzo que realizaron para ayudarme a culminar mis estudios, pero sobre todo por su comprensión por mis grandes ausencias.

A la UNAM que me enseñó como recorrer el camino y de la que me llevo el mejor recuerdo y los mejores momentos.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos muy difíciles de mi vida. Algunas siguen conmigo y otras están en mis recuerdos, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado.

III DEDICATORIAS

A ti mamá, la persona que más admiro en este mundo, por tu esfuerzo, esmero y dedicación que siempre has tenido, con el único afán de que cada día sea una mejor persona y logre cada uno de mis sueños.

A Roger por llegar a la familia y formar parte de ella, por sus enseñanzas, paciencia, desvelos que llegue a ocasionar, pero sobre todo por cuidar de mi mamá, sonreír con ella y agregar más alegría a su maravillosa vida.

A mis abuelos, María y Vicente por apoyarme y contarme esas historias que fueron más que una guía para conocer la vida y me brindaron tanto cariño así como su apoyo incondicional.

A mis tíos, Carmen, Mario, Adela y Mario, Vicente y Nadia, Luis y María por sus consejos y apoyo durante toda mi vida, les agradezco.

A mis primos que son como mis hermanos, Erick, Paola, Elizabeth, Rodrigo, Daniel, Juan Carlos, Janine, Jeovana, Estefany y Antonio, algunos ya lo son y otros serán grandes profesionistas.

Al ángel que me cuida desde el cielo y a quien le dedico este logro.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Albert Einstein

IV RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) pertenece a un grupo de enfermedades neurodegenerativas, en las cuales se ha documentado la presencia de alteraciones del metabolismo energético y la función mitocondrial, que tienen un papel fundamental en la fisiopatología de dichas enfermedades (*Hernández-Echeagaray, 2004; Reddy et al., 2009*). Para el estudio de la EH se han utilizado herramientas farmacológicas como el 3-ácido nitropropiónico (3-NP) que reproduce alteraciones similares a la EH (*Ahuja et al., 2007*). Esta toxina produce una alteración en el metabolismo energético, permitiendo comparar el daño producido con la fisiopatología de la enfermedad, tanto en el sistema nervioso como en la periferia, por ejemplo el músculo (*Hernández- Echeagaray, 2010; Breuer et al., 2011*).

En el presente trabajo se midió la actividad de los cuatro complejos respiratorios de mitocondrias extraídas del musculo esquelético (gastrocnemio) de ratones tratados con 3-NP, estas mediciones se realizaron en ausencia y presencia de SOD y Catalasa.

Se observó un decremento en la actividad del complejo II como se esperaba, pues el 3-NP produce un bloqueo total e irreversible de este complejo. Por otro lado el complejo I no presentó ningún cambio mientras que el complejo III presentó un ligero cambio en su actividad y el complejo IV decremento significativamente. Estos resultados se observaron en ambas condiciones, lo que demuestra que esta toxina produce un daño en la función mitocondrial similar a las observadas en la EH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH)

La EH es una enfermedad autosómica de herencia dominante neurodegenerativa, se presenta de entre 4 a 10 por cada 100,000 personas principalmente de origen caucásico. La EH es una enfermedad que aparece en la mediana edad, con algunos casos excepcionales de inicio temprano a los 2 años de edad y de aparición tardía a mediados de los 80 años de edad (*Reddy et al., 2009*).

Esta enfermedad se hereda de modo mendeliano, es decir, cada descendiente de un progenitor afectado tiene un 50% de posibilidades de padecer la enfermedad (*Reddy et al., 2009*).

Las manifestaciones clínicas de la EH aparecen con mayor frecuencia entre los 35 y los 50 años de edad (*Fernández, 2001*), caracterizándose por corea (la palabra griega para danza) que es un síndrome de rigidez-acinesia, convulsiones, depresión y demencia (*Hernández-Echeagaray, 2004*).

La mayoría de los pacientes sufren deterioro muscular y pérdida de peso, resultado de un desequilibrio entre la ingesta, la digestión y la absorción energética, así como a los movimientos involuntarios a causa de la corea, los cuales gastan mucha energía a pesar de la ingesta calórica constante (*Aziz et al., 2008*) *Figura 1*. La corea tiende a incapacitar, pero a medida que la enfermedad progresa se substituye lentamente por un cuadro de rigidez muscular (*Fernández, 2001*).

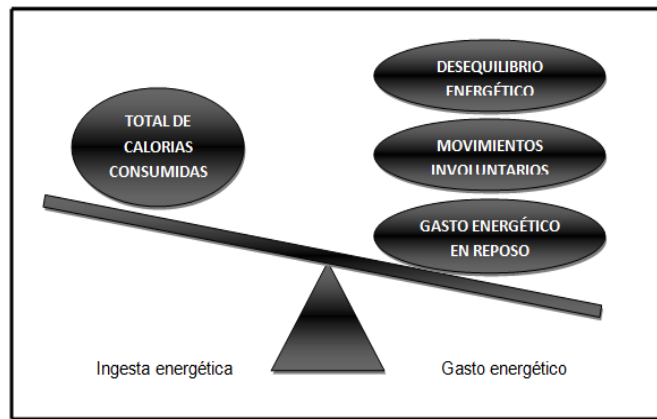


Figura 1. Balance negativo de energía, pérdida de peso cuando el gasto energético supera la ingesta de energía.

Las capacidades lingüísticas de los individuos con enfermedad de Huntington se ven afectadas en diverso grado, tanto en lo concerniente a las tareas de tipo léxico-semántico (nominación, definición de conceptos o interpretación de significados ambiguos, figurados o inferenciales), como en lo que atañe a la generación de palabras individuales y de oraciones (fluidez categorial, construcción oracional) (*Benites-Burraco, 2009*).

Los trastornos psiquiátricos, como depresión, manía, perturbación obsesivo-compulsiva y ansiedad, pueden preceder a las manifestaciones motoras, mientras que las funciones cognitivas generalmente sólo se afectan en la fase más avanzada de la enfermedad, que evoluciona hacia un cuadro de demencia (*Fernández, 2001*). En pacientes jóvenes la sintomatología es considerablemente diferente, se caracteriza por bradicinesia (escasez de movimientos), temblor, rigidez y distonía (contracciones involuntarias de los músculos), aunque la corea puede estar completamente ausente. Los niños afectados también pueden sufrir ataques epilépticos (*Gil & Rego, 2008*).

La esperanza de vida en pacientes con EH una vez diagnosticada la enfermedad, es de 17-20 años (*Roos, 2010*). La muerte generalmente se produce como consecuencia de la insuficiencia cardíaca o neumonía por aspiración. (*Gil & Rego, 2008*).

1.2 HISTORIA

La enfermedad fue descrita por primera vez en el siglo XIX por George Huntington, quien identificó las características clínicas y su patrón de transmisión familiar, *Figura 2*.

Sin embargo, no fue sino hasta 1993 que un consorcio organizado por la Fundación de Enfermedades Hereditarias descubrieron la mutación real del gen EH (*Gil & Rego, 2008*).

En 1983 el gen de la EH fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 16 y después de 10 años de intensa búsqueda con técnicas de Biología molecular y colaboraciones entre varios laboratorios de todo el mundo, en 1993 el gen de la EH fue identificado (*Reddy et al., 2009*).

AÑO	EVENTO	NÚM.PUBLICACIONES
1374	Descripción de la epidemia de baile	..
1500	Paracelso sugiere al CNS para el origen de la corea	..
1686	Thomas Sydenham describe la corea post-infecciosa	..
1832	John Elliotson identifica la forma hereditaria de la corea 1	..
1872	George Huntington caracteriza la enfermedad de Huntington	..
1953	Estructura del ADN dilucidado	5
1955	La enfermedad de Huntington se describe en la Región del Lago de Maracaibo de Venezuela	13
1967	Reunión de la Federación Mundial de Neurología sobre la enfermedad de Huntington	38
1976	Primer modelo animal de la enfermedad de Huntington (ácido kaínico)	100
1983	Gen marcador para la enfermedad de Huntington	138
1993	Identificación del gen de la EH	172
1996	Ratón transgénico	242
2000	Medicamentos examinados para la EH en animales transgénicos	344

Figura 2. Número aproximado de publicaciones de la enfermedad de Huntington citada para ese año en la lista actual de la literatura médica (antes de 1966) y en PubMed (1967 en adelante). Tomado de Walfer, 2007.

1.3 CAUSAS GENÉTICAS DE LA EH

La EH se debe a la presencia de una expansión anormal del triplete CAG en la secuencia del gen HTT, lo cual resulta patológico cuando el número de repeticiones supera las 34 y se advierte una correlación directa entre la longitud del segmento repetido y la precocidad con que se manifiesta el trastorno (*Benites-Burraco, 2009*).

En la población normal, el número de repeticiones CAG varía entre 6 y 35, en individuos afectados por la EH este número se eleva (40-121 repeticiones) (*Hernández-Echeagaray, 2010*).

En condiciones normales, el gen HTT codifica para una proteína citoplasmática llamada huntingtina, cuya función se desconoce hasta el momento (*Hernández-Echeagaray, 2004*) y se expresa de forma ubicua en el cerebro y tejidos periféricos (*Reddy et al., 2009*).

1.4 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

No existe un tratamiento específico para enfermedades neurodegenerativas como la EH plantea, por el momento, las maniobras terapéuticas consisten en la reducción de la corea y de los trastornos psiquiátricos (*Gatto, 2002*).

El tratamiento de la corea se basa en el uso de inhibidores de los receptores D2 de la dopamina, como neurolépticos del grupo de las fenotiacinas (mesoridacina, tioridacina, acetofenacina y perfenacina) o compuestos heterocíclicos (haloperidol, loxapina, molindona, pimocida y risperidona (*Fernández, 2001*), la agresión, depresión e irritabilidad responderán favorablemente a los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina; en tanto que en ocasiones la carbamazepina y el ácido valproico podrán ser útiles en el

tratamiento de la irritabilidad e inestabilidad emocional. Sin embargo, el uso de neurolépticos a largo plazo contribuye a la pérdida neuronal en los pacientes con EH (Gatto, 2002; Fernández, 2001).

Estudios recientes permiten una comprensión mejor de la fisiopatogenia de la enfermedad, posibilitan una visión crítica del tratamiento actual y aportan nuevas esperanzas para un tratamiento más eficaz ya que debido a su naturaleza hereditaria y progresiva no existe algún tratamiento que cure en su totalidad esta enfermedad en la actualidad (Fernández, 2001).

1.5 MODELOS MURINOS

Si bien la EH es una enfermedad hereditaria, existen diversos modelos experimentales para abordar su estudio (Gatto, 2002). Hasta la fecha encontramos tres tipos de modelos murinos modificados con técnicas de ingeniería genética: los ratones knock-in (la mutación se introduce dentro de un gen endógeno del hospedero), aquellos knock out (se elimina un gen del genoma del animal), y los transgénicos (un gen mutado extraño es inducido en el genoma del hospedero; Hernández-Echeagaray, 2004).

1.5.1 R6/1 Y R6/2

El modelo transgénico R6 / 2 contiene una mutación en el dominio N-terminal del segmento del gen HTT con una expansión de 155 repeticiones del triplete CAG en el exón 1, expresado en múltiples tejidos, incluyendo cerebro y músculo esquelético (Tabrizi et al., 2000). Los animales muestran deficiencias motoras y déficit de aprendizaje un mes después de su nacimiento, con síntomas más pronunciados a los dos meses, y es fatal de tres a cuatro meses. La patología del cerebro de estos ratones muestra inclusiones nucleares presentes en todo el cerebro, y pueden ser detectadas a las tres

semanas después del nacimiento. Es importante destacar que, estas inclusiones se han observado también en cerebros *post mortem* de pacientes con la EH (Breuer et al., 2011). Las similitudes entre el ratón R6 / 2 y la EH a nivel patológico también hacen de este ratón un modelo ideal para el estudio de las alteraciones bioquímicas en la enfermedad (Tabrizi et al., 2000). El modelo de ratones R6 / 1 es similar a R6 / 2, estos muestran la misma sintomatología, pero con una progresión de la enfermedad más lenta y un fenotipo menos agresivo, debido a que tienen una expansión del triplete CAG más pequeña con 155 repeticiones (Breuer et al., 2011). Debido a lo anterior, los modelos murinos han sido una herramienta muy importante para dilucidar los procesos celulares que subyacen a la EH (Hernández-Echeagaray, 2004).

1.6 MODELO FARMACOLÓGICO

Los modelos farmacológicos han dominado el campo de la investigación en la EH. Aunque George Huntington fue el primero en describir la EH en 1972, fue hasta 1993 cuando la enfermedad fue formalmente identificada; por esto se dio el retraso en el desarrollo de modelos genéticos apropiados hasta la década pasada. Los modelos farmacológicos inducen también muerte celular por mecanismos excitotóxicos como en el caso del ácido quinolínico o por afectación a la maquinaria mitocondrial como el ácido 3-nitropropiónico (Pérez, 2008).

1.6.1 ÁCIDO 3- NITROPROPIÓNICO (3-NP)

El ácido 3-nitropropiónico es un inhibidor del complejo II (Succinato Deshidrogenasa, SDH o succinato: quinol óxido reductasa), se usa como un modelo de inducción para EH; después de la exposición, los animales muestran disfunciones motoras a través de la degeneración de las neuronas estriatales, similares a los pacientes que sufren de EH. Se cree que este compuesto genera excitotoxicidad (indirecta) a través de la estimulación de los receptores de NMDA en la estriado, pero esto sigue siendo una cuestión de cierta controversia (*Breuer et al., 2011*).

1.7 DATO HISTÓRICO 3-NP

La historia del 3-NP ha sido ampliamente revisada por Ludolph (1991); esta toxina fue inicialmente caracterizada como un agente responsable de encefalopatía aguda en el ganado de las regiones del oeste de Norte América. Los animales accidentalmente ingerían hiervas y pequeños arbustos del género *Astragalus*, que contenía altas cantidades de 3-nitropropanol, el cual *per se* no es tóxico para los mamíferos, pero puede convertirse en 3-NP por acción de la alcohol deshidrogenasa hepática. Posteriormente, se demostró que el 3-NP es un inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa, la cual es parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (*Pérez, 2008*).

Tiempo después, fueron reportados cerca de 1000 casos de envenenamiento por 3-NP en China cuando ingirieron caña de azúcar infestada con el hongo *Artrinium* durante la celebración del año nuevo chino. Esta intoxicación produjo encefalopatía en niños y adultos, seguido en la mayoría de los casos por distonia y discinesia asociadas a la

degeneración del caudado y del putamen, lo cual fue observado a través de una tomografía computarizada (*Brouillet et al., 2005*).

Flint Beal en 1993 fue el primero en plantear la hipótesis de que el tratamiento crónico con 3-NP en ratas podría replicar los defectos mitocondriales parciales y permanentes vistos en pacientes con EH, al producir una degeneración estriatal selectiva. En apoyo de esta hipótesis, se encontró que la administración constante o crónica de 3-NP por más de 4 semanas con mini bombas osmóticas en ratas dio lugar a la degeneración preferencial de medianas neuronas espinosas con preservación de las terminaciones nerviosas aferentes, las grandes interneuronas colinérgicas (*Brouillet et al., 2005*).

1.8 EL 3-NP COMO HERRAMIENTA FARMACOLÓGICA

El 3-NP es un inhibidor irreversible del Complejo II también llamado; Succinato Deshidrogenasa, SDH o succinato: quinol óxido-reductasa. Entre sus acciones están el ser un potente modulador de la apoptosis neuronal y su acción es independiente de la apertura de los poros de transición de la permeabilidad mitocondrial, además su acción disminuye los niveles de ATP en el cerebro (*Gatto, 2002; Ahuja et al., 2007*).

Por ésta y otras razones descritas anteriormente el 3-NP es una herramienta farmacológica que puede reproducir el fenotipo de los trastornos que presentan degeneración estriatal debido a una disfunción mitocondrial, tales como EH y ciertos trastornos metabólicos hereditarios (*Hernández-Echegaray, 2010*).

El 3-NP cruza la barrera hematoencefálica por lo que puede ser administrado sistémicamente a ratas, ratones y primates no humanos. Para su administración sistémica, se pueden emplear tanto bombas osmóticas subcutáneas como la inyección directa subcutánea o intraperitoneal (*Pérez, 2008*).

Dado que se administra de forma sistémica para reproducir las alteraciones motoras e histopatológicas asociadas a la degeneración estriatal, revisaremos cómo el músculo podría afectarse con la administración de esta toxina.

1.9 MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético es el tejido más abundante en los vertebrados constituyendo aproximadamente el 40% de la masa total del cuerpo. Este tipo de músculo no solo hace posible los movimientos de las articulaciones, sino que también es el sitio de mayor actividad metabólica y el reservorio más grande de proteína (*Ortiz & Hernández, 2010*).

El músculo esquelético está compuesto por numerosas células contráctiles llamadas miocitos conocidas comúnmente como fibras musculares. Existe diversidad en las fibras musculares dependiendo de su velocidad de contracción, estructura y propiedades metabólicas (*Ortiz & Hernández, 2010*).

Los músculos se clasifican según su color en rojos y blancos, cuya coloración es adquirida por el tipo de fibras que lo conforman. Los músculos formados por fibras rojas tienden a estar altamente vascularizados y ser ricos en mioglobina, una proteína sarcoplásmica, responsable del transporte y almacenamiento del oxígeno dentro del tejido muscular. Los músculos formados por fibras blancas están menos vascularizados y tienen un nivel de hemoglobina más bajo, pero se contraen rápidamente (*Kardong, 1998*).

1.10 FIBRAS MUSCULARES

1.10.1 Fibras de tipo I (contracción lenta o fibras rojas).

Estas fibras son de pequeño diámetro, contienen numerosas mitocondrias y poco glucógeno, se presentan en gran número en los músculos rojos.

Las fibras I son resistentes a la fatiga: se utilizan sobre todo en ejercicios poco intensos y prolongados como el mantenimiento de la postura (*De Sant, 2003*).

1.10.2 Fibras de tipo II (contracción rápida o fibras blancas)

Son de mayor diámetro, presentan pocas mitocondrias, están poco vascularizadas pero contienen mucho glucógeno, se presentan en los músculos pálidos.

Estas fibras, son poco resistentes a la fatiga aunque muy potentes, se utilizan en los ejercicios breves pero intensos como trotar (*De Sant, 2003*).

En este trabajo estudiamos el músculo gastrocnemio, por lo que a continuación hacemos una breve descripción del mismo

1.11 MÚSCULO GASTROCNEMIO

El gastrocnemio es el músculo dorsal más prominente de la pierna. En los mamíferos tiene dos cabezas, resultado de la fusión de dos predecesores filogenéticos. El gastrocnemio medial (gastrocnemio medialis) y el flexor largo del pulgar (flexor hallucis longus) de los mamíferos, proceden del gastrocnemio interno reptiliano. El gastrocnemio lateral (gastrocnemius lateralis) junto con el soléo (soleus) y el plantar (plantaris) tienen su origen en el gastrocnemio extremo de los reptiles (*Kardong, 1998*).

El músculo gastrocnemio está constituido por dos tipos de fibras musculares (contracción rápida y lenta), lo cual le confiere la habilidad de obtener energía por diferentes vías, la glucolítica haciendo uso de las fibras blancas y la vía oxidativa echando mano de fibras rojas, *Figura 3*. Esta característica concibe que el estudio de este músculo sea de gran interés para indagar los cambios que pudieran presentarse en patologías que involucran el metabolismo en el músculo, ya que las biopsias de músculo esquelético sigue siendo un importante procedimiento de selección inicial para evaluar el funcionamiento mitocondrial y explorar la presencia de enfermedades mitocondriales en seres humanos (*Andrey, 2008*).

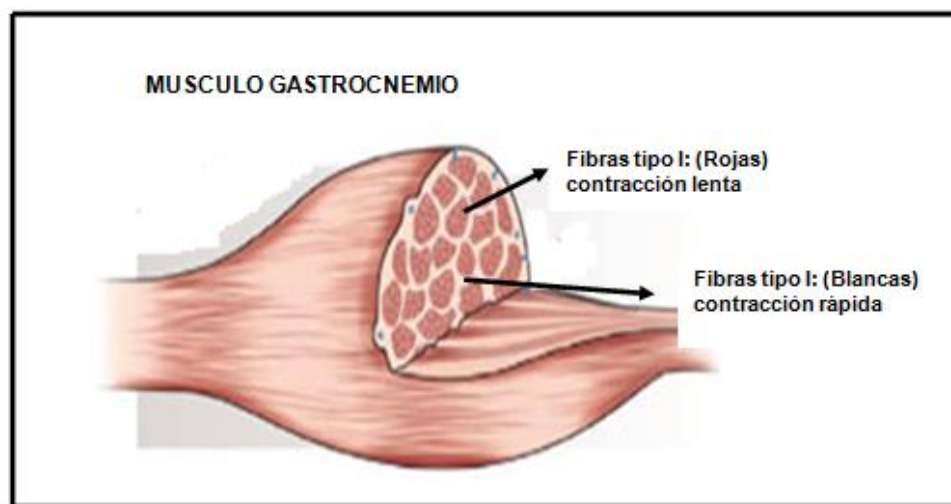


Figura 3. Músculo gastrocnemio, señalando los tipos de fibras que lo conforman así como su color y tipo de contracción. Tomado de Ortiz-Tinoco & Hernández-Gallegos 2010.

1.12 LA MITOCONDRIA

El término mitocondria (procedente de *mitos*: hilo, filamento y *chondros*: gránulo) fue introducido por Brenda por primera vez en 1898, pero su presencia ya había sido descrita 40 años antes. Kolliker las describió en 1856 y Altmann realizó los primeros estudios sobre su estructura y función en la célula, aunque no fue hasta décadas después cuando se detalló su papel fundamental en el metabolismo energético celular (*Rodríguez, 2000*).

Las mitocondrias son organelos esenciales de las células eucariotas (*Stefan et al., 2002*). El tamaño medio de una mitocondria es de 0.3-1.0 por 5-10µm aproximadamente. Está dividida en 4 partes: membrana externa, espacio intermembranal, membrana interna y matriz mitocondrial, *Figura 4. (Revisado en Lodish et al., 2007)*.

La función principal de la mitocondria en la mayoría de los tejidos es la de producir energía en forma de Adenosín Trifosfato (ATP) a partir de la oxidación de sustratos energéticos por parte de la cadena respiratoria. Este proceso consiste básicamente en reacciones acopladas de oxidación y reducción que liberan la energía libre contenida en las moléculas que impulsan un gradiente de protones que será utilizado para la síntesis de ATP (una formas de energía química), esta serie de reacciones se conoce como fosforilación oxidativa (*Justo, 2005; Claudio, 2010*).

1.12.1 MEMBRANA EXTERNA

La membrana mitocondrial externa está constituida por una bicapa fosfolipídica compuesta por un 60% de lípidos y un 40% de proteínas. Esta bicapa contiene estructuras protéicas conocidas como porinas que le confieren permeabilidad a moléculas 10 kDa. Las dos membranas que separan a la mitocondria del citoplasma celular definen dos espacios en el interior de la mitocondria: la matriz y el espacio intermembranal (*Revisado en Lodish et al., 2007*).

1.12.2 ESPACIO INTERMEMBRANAL

Este contiene alrededor del 56% de las proteínas totales en las mitocondrias, siendo el citocromo c la proteína más abundante en este espacio, además de ser el sitio en el cual se translocan los protones durante el transporte de electrones (*Revisado en Alberts et al., 2002*).

1.12.3 MEMBRANA INTERNA

La membrana interna mitocondrial presenta pliegues denominadas crestas que permiten aumentar la superficie para realizar diversas acciones bioquímicas. Está compuesta por 75% de proteínas y 25% lípidos. Es permeable solamente a O₂, CO₂ y H₂O. Además de las proteínas de la cadena de transporte de electrones, contiene numerosas proteínas de transporte, que controlan el paso de ATP, ADP, piruvato, Calcio y fosfato. Esta impermeabilidad controlada permite la generación de un gradiente de protones a través de ella, lo cual resulta en la compartimentalización de funciones entre el citoplasma y el organelo. (*Revisado en Alberts et al., 2002*).

1.12.4 MATRIZ MITOCONDRIAL

En la matriz mitocondrial se efectúan diversas rutas metabólicas, tales como, el ciclo de Krebs y la beta-oxidación. En este sitio podemos encontrar el DNA mitocondrial (*Revisado en Lodish et al., 2007*).

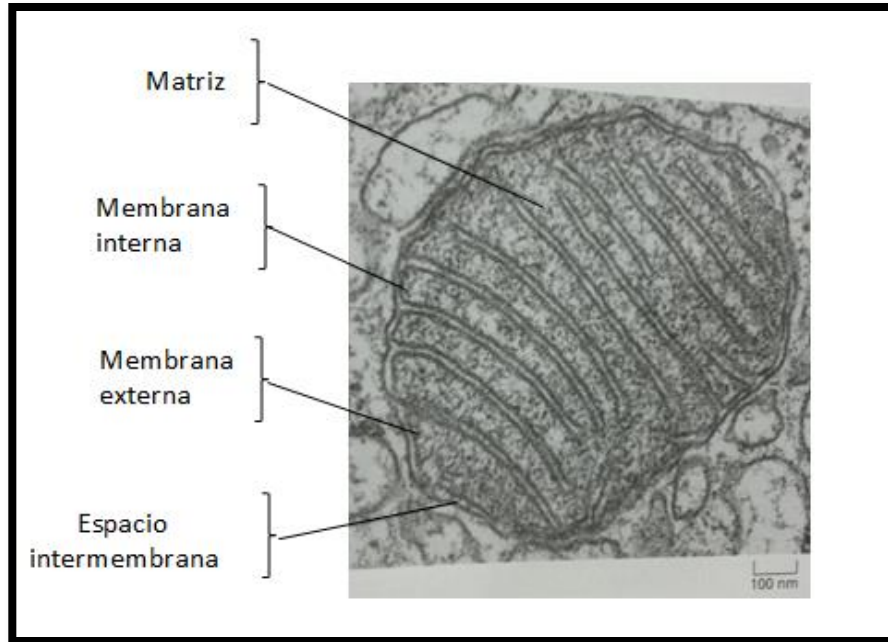


Figura 4. Fotografía de una mitocondria hepática por micrografía electrónica (100nm) en la que se señalan las cuatro partes en que se divide la mitocondria: membrana externa, espacio entermembranal, membrana interna y matriz mitocondrial. Tomado de Alberts et al., 2002.

1.13 CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

La cadena respiratoria o cadena mitocondrial está compuesta de cuatro complejos enzimáticos embebidos en la membrana interna de la misma, así como de 2 tipos de acarreadores de electrones: La ubiquinona y el citocromo *c*, *Figura 5*.

1.13.1 COMPLEJO I

NADH: ubiquinona óxido reductasa o NADH deshidrogenasa, tiene un peso de 1000 kDa, cuenta con 46 subunidades y un mononucleótido de flavina (FMN). Oxida al NADH que es un dinucleótido que se reduce con electrones de alta energía proveniente del ciclo del ácido cítrico. Los electrones son transferidos desde el NADH a la coenzima Q (CoQ) a través del FMN. Al pasar de un transportador al siguiente, los electrones liberan energía que es utilizada por el complejo I para translocar protones (H⁺) de la matriz al espacio intermembranal. Esto genera un gradiente transmembranal de H⁺ utilizado por la enzima ATPsintasa para sintetizar ATP. (*González, 2004; Claudio, 2010; Monza et al., 2010*).

1.13.2 COMPLEJO II

También llamado Succinato:coenzima Q reductasa o Succinato deshidrogenasa, transfiere electrones del succinato a la CoQ, cuenta con cuatro subunidades proteicas y una masa molecular de 125 kDa. (*González, 2004*).

1.13.3 COENZIMA Q

La coenzima Q (CoQ o Ubiquinona) capta los electrones provenientes de las deshidrogenasas flavoproteicas, en su estado oxidado se le denomina ubiquinona, presentando dos grupos cetónicos en posición para que se transforma en semiquinona cuando se reduce uno de ellos aceptando un electrón, o ubiquinol cuando acepta los dos

electrones, presentando dos grupos hidroxilo y actuando como un potente antioxidante (*Parrado, 2010*).

1.13.4 COMPLEJO III

El complejo III (complejo bc_1 o ubiquinol citocromo c óxidoreductasa), es uno de los complejos transductores de energía más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Tiene una masa molecular de 240 kDa y posee 11 subunidades entre las que se encuentran el citocromo c_1 . Su principal función es catalizar la oxidación del ubiquinol y la reducción del citocromo c , la energía aportada por este complejo para el bombeo de protones es suficiente para formar ATP. (*González, 2004; Monza et al., 2010*).

1.13.5 CITOCROMO C

El citocromo c es una proteína que se localiza en el lado externo de la membrana interna mitocondrial. Su peso molecular es de 13 kDa y su cadena proteica tiene 104 residuos de aminoácidos, su función consiste en transferir un electrón a la vez desde el complejo III al IV (*Parrado, 2010*).

1.13.6 COMPLEJO IV

El complejo IV es la enzima citocromo c oxidasa (COX) utiliza al citocromo c como sustrato. La enzima toma 4 electrones de cuatro citocromos c y los transfiere a dos moléculas de oxígeno formando agua. Esta es la única circunstancia en que el oxígeno (que por su estructura atómica solo puede tomar uno o a lo sumo dos electrones a la vez), adquiere en forma simultánea 4 electrones. Cuenta con 13 subunidades proteicas y una masa molecular de 195 kDa (*González, 2004*).

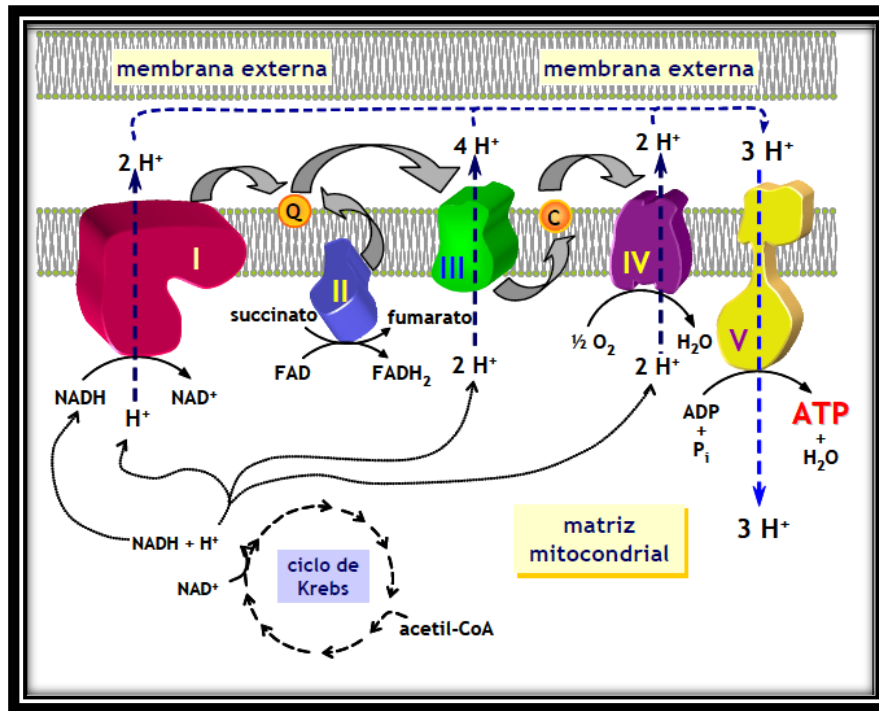


Figura 5. Esquema de la cadena de transporte de electrones, mostrando los cuatro complejos mitocondriales así como el citocromo c y coenzima Q. Tomado de Rodríguez, 2000.

1.14 ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

En los últimos años, algunas enfermedades neurodegenerativas se han relacionado con disfunciones mitocondriales de diferente tipo (Tornero *et al.*, 2002), entre las que se encuentran la enfermedad de Huntington (EH), la ataxia de Friedreich, la paraplejia espástica familiar, la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Como se puede observar en la Figura 6 a pesar de las diferencias clínicas que existen entre estas enfermedades, presentan una característica general: el déficit energético, lo que indica la existencia de un mecanismo común en la neurodegeneración basado en una alteración subyacente del metabolismo energético mitocondrial (Rodríguez, 2000). Así la evaluación adecuada de la fosforilación

oxidativa mitocondrial es esencial para las investigaciones de la energética celular, también contribuye significativamente a los estudios de los mecanismos de apoptosis de la fisiopatología de una variedad de enfermedades humanas, incluyendo el gran grupo de las encefalomiopatías y algunas enfermedades neurodegenerativas (*Andrey et al., 2008*).

Mutaciones genes nucleares afectando proteínas mitocondriales		
Ataxia de Friedreich	FRDA1	Frataxina
Paraplejía espástica familiar	SPG7	Paraplegina
Enfermedad de Wilson	ATP7B	ATPasa transportadora de Cu
Síndrome de Mohr-Tranebjaerg	TIMM8A	Translocasa de membrana interna mitocondrial
Mutaciones gen nuclear con involucro mitocondrial		
Alzheimer	PS1 y PS2	Presenilina 1 y 2 Péptido amiloide-beta
Huntington	HD	Huntingtina
Parkinson	SNCA	Alfa-sinucleína
	PARK2 (parkina)	Ligasa de ubiquitina
	UBC	Ubiquitina
	DJ1	Sensor REDOX
	PINK1	Cinasa Ser/thr mitocondrial
	LRRK2	Cinasa GTPasa
	HTRA2	Proteasa apoptótica
Parálisis supranuclear progresiva	PSNP1	Proteína tau
Esclerosis lateral amiotrófica	SOD1	Superóxido dismutasa

Figura 6. Principales enfermedades Neurodegenerativas, tipo de mutación y alteración mitocondrial. Tomado de *Rodríguez et al., 2010*.

1.15 RADICALES LIBRES (RL) Y ESTRES OXIDATIVO

El concepto químico de radical libre fue descrito en 1954, cuando Gerschman postuló a los radicales libres del oxígeno (O_2^- y $HO\cdot$) como responsables del mecanismo molecular de la toxicidad del oxígeno (*Keating, 2008*).

Los RL son moléculas de oxígeno o nitrógeno que poseen uno o más electrones desapareados en su órbita más externa, y que también pueden ser generados cuando ocurre una adición a un doble enlace. Los RL son muy inestables y reaccionan con otras moléculas, entregando o recibiendo electrones. Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se definen como entidades moleculares que reaccionan con componentes celulares, resultando en alteraciones en su función (*Pérez, 2008*).

La formación de radicales libres es responsable del consumo de cerca del 2% del oxígeno usado en la respiración (*Fernández, 2001*). Las mitocondrias desempeñan un papel prominente por constituir la fuente más importante de producción continua de anión superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (NO) que, a su vez, inician reacciones generadoras de otras especies reactivas, como el H_2O_2 y finalmente el HO (*González, 2004*). Durante el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa, estos se generan en niveles muy bajos en condiciones fisiológicas normales, mientras que se ve aumentado el nivel de estos oxidantes en varias condiciones patológicas (*Boveris, 2005*).

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la generación y la eliminación de radicales libres y de especies reactivas de nitrógeno (*Rodríguez, 2000*). Este desempeña un papel importante en el deterioro cognitivo que acompaña al envejecimiento (*Keating, 2008*). La hipótesis que sugiere la participación de los radicales libres en el envejecimiento plantea que la acumulación de radicales libres durante la vida ocasionaría daño a los principales componentes de la célula (*Rodríguez, 2000*).

Durante años se ha pensado que la muerte neuronal en los pacientes afectados por enfermedades neurodegenerativas se debía en parte a la generación de estrés oxidativo (*Hernández-Echeagaray, 2010*). Las hipótesis que tienden a explicar la muerte neuronal en la EH implican la disminución del metabolismo energético, alteraciones de la función mitocondrial, estrés oxidativo y neurotoxicidad (*Fernández, 2001*). Las moléculas ERO y ERN están implicadas en estos procesos, así es posible que diversos mecanismos se complementen en la promoción de la lesión celular parcial (*Fernández, 2001*).

Cuando la CRM se encuentra dañada o inhibida, la producción de ERO puede aumentar permitiendo así la aparición de daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos mitocondriales y celulares. Existen defensas antioxidantes celulares, (por ejemplo), las enzimas (catalasa, GPx, MnSOD, Cu/ZnSOD) ofrecen protección contra la acumulación de ERO. A pesar de que estas defensas restringen el daño potencial que causaría la producción de ERO y ERN, si estas moléculas se generan continuamente, los mecanismos defensivos se encontraran superados, iniciando una secuencia de efectos perjudiciales que finalizan con la muerte celular por apoptosis o por necrosis (*Rodríguez, 2000*).

En el presente trabajo nos enfocamos en describir los cambios que se producen en el músculo esquelético por la inhibición del complejo II mitocondrial, para tal efecto hemos centrado nuestra atención en el músculo gastrocnemio de ratones C57BL/6, creemos que cambios a nivel muscular pueden incrementar las alteraciones motoras que se observan en las enfermedades degenerativas. Esta idea cambia la forma de ver las alteraciones degenerativas y ponen a la periferia en el campo de las estrategias terapéuticas para contender con las alteraciones neurodegenerativas.

2. ANTECEDENTES

Estudios iniciales han demostrado que en los modelos animales de la EH existen alteraciones en el músculo y estos cambios podrían deberse a alteraciones en la función mitocondrial, por ejemplo:

1.- *Tabrizi y cols., 2000*, Demostraron el desarrollo del trastorno del movimiento y la pérdida de masa muscular en la HD y los ratones R6/2.

2.- *Tabrizi y cols., 2000*, estudiaron en ratones transgénicos de la línea R6/2, la actividad de los complejos respiratorios, donde observaron que la actividad de los complejos I y III no presentó diferencia significativa. Solo se reportó una reducción en la actividad de la citocromo c oxidasa (Complejo IV ó COX), con respecto a los valores del control.

3.- *Hernández-Echegaray y cols., 2011*, estudiaron los cambios en los músculos de ratones tratados con dosis bajas de 3-NP (15 mg / kg, i.p., durante 5 días). En este estudio se evaluó la actividad histoquímica de la fosfatasa alcalina (APase), la Succinato deshidrogenasa (SDH), y la citocromo c oxidasa (COX), en los músculos gracilis y gastrocnemio, mostrando cambios significativos para ATPasa y SDH, en ambos músculos y de la COX sólo en el gastrocnemio.

3. JUSTIFICACIÓN

Para el estudio de la Enfermedad de Huntington se han empleado distintos modelos animales, uno de ellos es el uso de la toxina mitocondrial ácido 3-NP que imita la histopatofisiología de la enfermedad, sin embargo la mayor parte de los estudios que usan al 3-NP se concentran en las alteraciones que ocurren en núcleo estriado y hasta el momento nadie había abordado cambios en la periferia a nivel muscular lo cual resulta de suma importancia ya que las alteraciones en el músculo esquelético pueden agravar la ejecución motora.

En este trabajo se realizó por primera vez el análisis en los cambios de la actividad de los complejos mitocondriales en músculo gastrocnemio producido por la administración sistémica de la toxina mitocondrial 3-NP.

4. OBJETIVOS

Describir los cambios del funcionamiento mitocondrial de músculo gastrocnemio en un modelo animal de neurodegeneración que imita a la Enfermedad del Huntington.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la actividad de los cuatro complejos mitocondriales de músculo gastrocnemio de ratones control y 3-NP mediante la técnica espectrofotométrica descrita por *Bénit y cols., 2006*.
- Evaluar la actividad de los cuatro complejos mitocondriales de músculo gastrocnemio de ratones control y 3-NP en presencia de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa mediante la técnica espectrofotométrica descrita por *Bénit y cols., 2006*.

5. METODOLOGIA

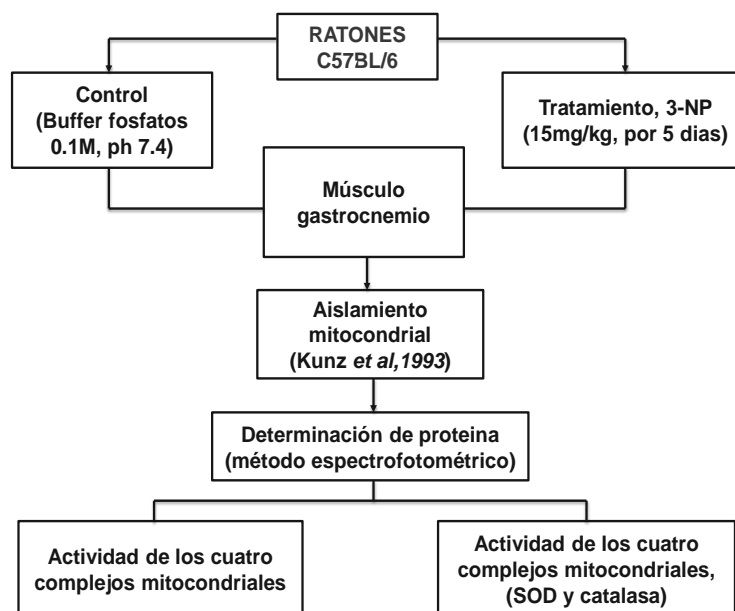


Figura 7. Diagrama de la metodología

5.1 TRATAMIENTO

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 40 días de edad, separados en un grupo control al cual sólo se le administró el vehículo de buffer de fosfatos (0.1 M Fosfato de Sodio Monobásico, 0.1M Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro), pH de 7.4, y un grupo en tratamiento, administrado a 15 mg/kg, por 5 días con ácido 3-NP disuelto en buffer de fosfatos.

5.2 OBTENCIÓN DE MÚSCULO ESQUELÉTICO (GASTROCNEMIO)

Se cortaron las patas traseras de cada ratón en ambos grupos experimentales, se quitó la piel y posteriormente se separó el músculo gastrocnemio de los músculos adjuntos (gracilis y tibialis).

5.3 EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Por cada extracción de mitocondrias se utilizó el músculo gastrocnemio de cuatro ratones de la cepa C57/BL6, con un peso aproximado del tejido total en el grupo control de 1.4 g y 0.9 g en el grupo con 3-NP.

El músculo se cortó en pedazos finos con tijeras y fue incubado a 4°C por 30 minutos en medio de aislamiento adicionado con 1mg de Tripsina por cada 10ml agregando inhibidores de proteasas para tripsina (Sigma P-8465) (10 ml por cada 500 ml de medio) después de haber sido incubado el músculo, se homogenizó usando un potter frío y en hielo. Se centrifugó a 600 x g por 5 min, recuperando el sobrenadante y se filtró con una malla de nailon, se centrifugó a 10 000 x g por 10 min. El pellet mitocondrial se resuspendió en medio de lavado con 0.5 mg de Albúmina Suero de Bovino (BSA por sus siglas en inglés) por ml, se centrifugó a 10 000 x g por 10 min, el pellet final se

resuspendió en medio de aislamiento. Se obtuvieron varias alícuotas, las cuales se almacenaron a -70°C (Kunz *et al.*, 1993).

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL

Una vez obtenidas las mitocondrias se determinó la concentración de proteínas totales por el método Lowry, utilizando una curva patrón de albúmina con 0-200 μg de proteína midiendo la absorbancia de todos los tubos a 750 nm (Lowry *et al.*, 1951).

La determinación de proteína por el método de Lowry fue sustituida, debido a que esta requería una mayor cantidad de muestra. Por tal razón se utilizó la técnica espectrofotométrica de UV.

5.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL POR LA TÉCNICA ESPECTOFOTOMÉTRICA DE UV

Se agregó 10 μl de mitocondrias aisladas en 1ml de dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%, posteriormente se hizo la lectura de la absorbancia (Abs) a 280nm. Se determinó la cantidad de proteína mitocondrial utilizando un rango estándar de 0.12 Abs ----- 10mg/ml, además de la absorbancia de la muestra.

5.6 ENSAYO 2, ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS I Y II

Las mitocondrias fueron diluidas 1:3 e incubadas a 4° C en buffer de actividad (0.25mM sacarosa, 50mM fosfatos de K, 0.2Mm EDTA pH 7.4 0.1%Tween-20, 1mM NaN₃) durante 30 min.

En una celdilla del espectrofotómetro se colocó buffer de actividad y se agregaron los diferentes sustratos e inhibidores además de las mitocondrias en este orden: 1mM NaCN, 0.2 mg de proteína mitocondrial, 40µM DCPIP, 50 µM NADH, 8µM Rotenona, 5mM Succinato, 1mM PMS, 4mM TTFA, 80µM DQ. Los cambios de absorbancia se midieron en las siguientes longitudes de onda: 600 y 750nm, utilizando el modo dual del espectrofotómetro marca Aminco DW2 con modernización OLIS. Se obtuvo la velocidad de reducción u oxidación del DCPIP mediante la medición de las pendientes de cada adición del trazo de absorbancia contra tiempo y se utilizó el coeficiente de extinción de: $\epsilon_{550-540} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, *Figura 9 (Bénil y cols., 2006)*.

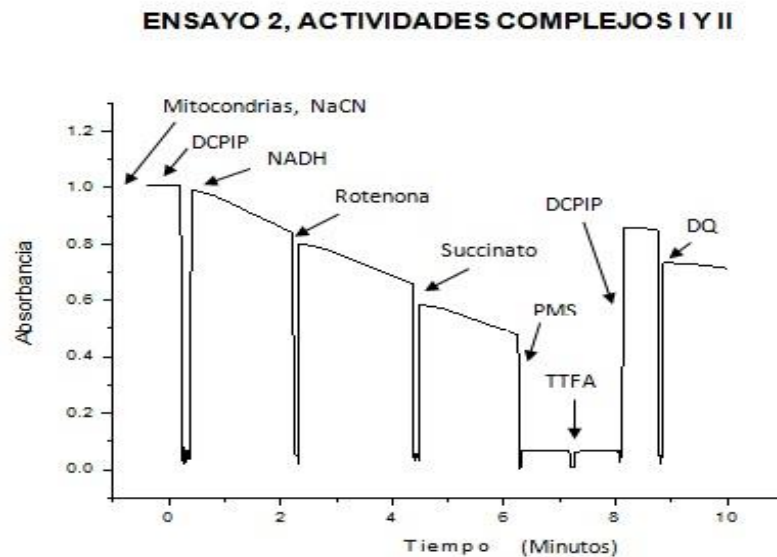


Figura 8 .Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos I y II. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo.

5.7 ENSAYO 1, ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS III Y IV

Las mitocondrias fueron diluidas 1:3 e incubadas a 4° C en buffer de actividad (0.25mM sacarosa, 50mM fosfatos de K, 0.2Mm EDTA pH 7.4 0.1%Tween-20) durante 30 min.

En una celdilla del espectrofotómetro se colocó buffer de actividad y se agregaron los diferentes sustratos e inhibidores además de las mitocondrias en este orden: 10µM citocromo c reducido, 8µM Rotenona, 0.1mg de proteína mitocondrial, 1mM NaCN, 30µM citocromo c oxidado, 2mM TTFA, 333µM EDTA, 50µM DBH₂, 1µM Antimicina.

Los cambios de absorbancia se midieron en las siguientes longitudes de onda: 550 y 540nm, utilizando el modo dual espectrofotómetro marca Aminco DW2 con modernización OLIS. Se obtuvo la velocidad de reducción u oxidación del citocromo c mediante la medición de las pendientes de cada adición del trazo de absorbancia contra tiempo y se utilizo el coeficiente de extinción de: $\epsilon_{550-540} = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, *Figura 8 (Bénit y cols., 2006)*.

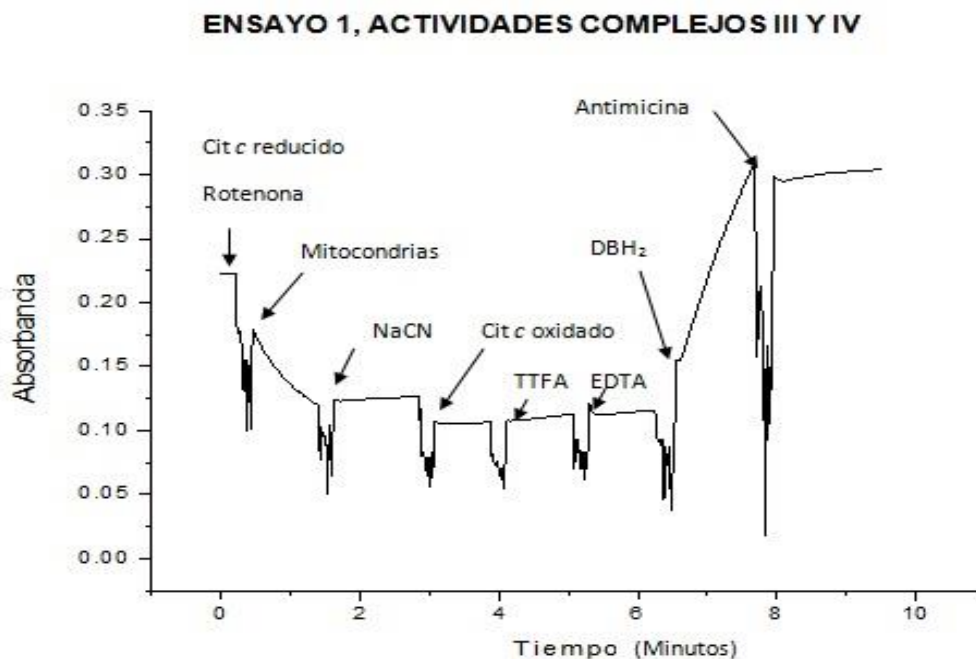


Figura 9 .Trazo obtenido al medir la actividad de los complejos III y IV. Se muestra el orden en que deben agregarse los distintos sustratos e inhibidores a lo largo del tiempo.

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE LAS MITOCONDRIAS

Por cada extracción de mitocondrias se utilizó el músculo gastrocnemio de cuatro ratones de la cepa C57/BL6, con un peso promedio aproximado de tejido de 1.4g y 0.9g, un volumen aproximado de 550µl y 400µl de mitocondrias aisladas y un promedio de 10.42mg y 8.3mg de proteína para el grupo control y 3-NP respectivamente, con un total de 7 extracciones mitocondriales.

6.2 ACTIVIDAD DE LOS CUATRO COMPLEJOS MITOCONDRIALES

Una vez obtenidas las mitocondrias en condiciones óptimas se midió la actividad de los cuatro complejos mitocondriales. El ensayo 1 permitió evaluar al complejo III o ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa y complejo IV o citocromo *c* oxidasa, mientras que con el ensayo 2 se evaluó al complejo I o NADH deshidrogenasa y complejo II o Succinato deshidrogenasa. Se realizaron siete experimentos (n=7) con dos repeticiones por cada ensayo.

Se observó que el tratamiento con 3-NP produjo una reducción significativa en la actividad de los complejos II y IV sin afectar los complejos I y III como se muestra en la *Figura 10*.

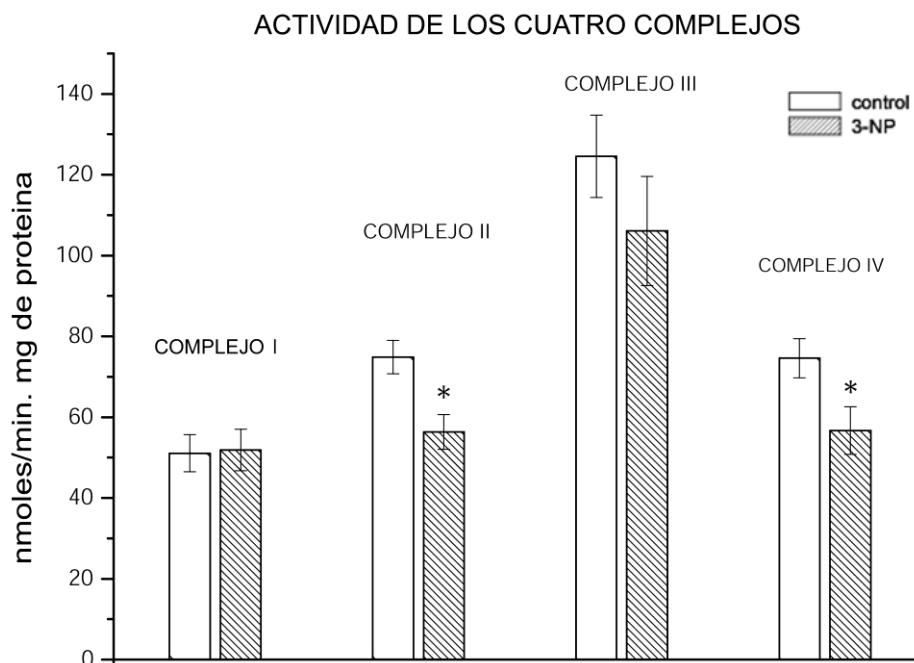


Figura 10. Actividad de los cuatro complejos respiratorios expresada en nmol/min/mg de proteína. Se muestra un decremento en la actividad del Complejos II (Succinato deshidrogenasa) con una diferencia significativa (*) entre los grupos control y 3-NP. El complejo I (NADH deshidrogenasa) al igual que el complejo III (ubiquinol citocromo c oxidoreductasa) presentaron un decremento en su actividad sin ser significativo. Por otro lado el complejo IV (citocromo c oxidasa) presentó un decremento significativo (*) 3-NP con respecto al control (n=7). Se consideró * $p \geq 0.05$

6.3 INHIBICIÓN DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES

En los ensayos para medir la actividad de los complejos respiratorios, se utilizaron inhibidores específicos para cada complejo: rotenona para el complejo I, antimicina para el complejo III y cianuro para el complejo IV. De esta manera se obtuvieron las inhibiciones de los mismos como se muestra en la *Figura 11*. En el caso del complejo II, no se utilizó ningún inhibidor durante los ensayos, ya que este fue bloqueado con 3-NP en los animales tratados.

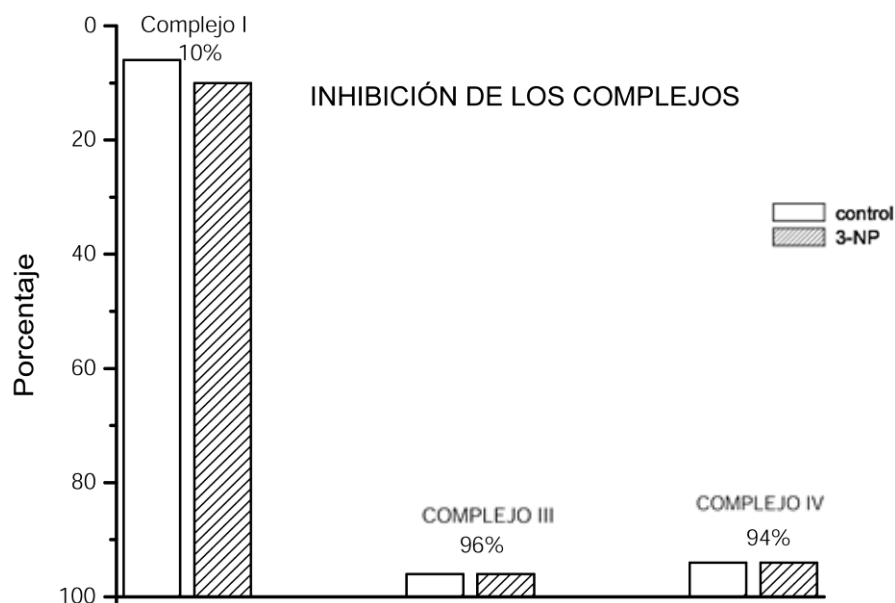


Figura 11. Inhibición de los complejos respiratorios con inhibidores específicos expresada en porcentaje. Se muestra una mayor inhibición en los complejos III y IV e insuficiente para complejo I. (No significativos entre grupo control y 3-NP (n=7)).

Observando estos resultados, podría decirse que la inhibición no es tan efectiva para el complejo I o NADH deshidrogenasa pues solo se alcanzó el 10 % de inhibición. Posiblemente exista una generación de especies reactivas del oxígeno, radicales producidos en el proceso normal de la cadena respiratoria, los cuales se acumulan en este complejo impidiendo una inhibición adecuada. Por esta razón, se decidió repetir las actividades de los complejos respiratorios utilizando las enzimas antioxidantes SOD y CAT capaces de neutralizar la actividad de los radicales superóxido.

6.4 ACTIVIDAD DE LOS CUATRO COMPLEJOS MITOCONDRIALES EN PRESENCIA DE SOD Y CATALASA

Se realizaron los distintos ensayos para medir la actividad de los cuatro complejos respiratorios. Ensayo 1 (complejo III o ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa y complejo IV o citocromo *c* oxidasa), Ensayo 2 (complejo I o NADH deshidrogenasa y complejo II o Succinato deshidrogenasa). Realizando siete experimentos (n=7) con dos repeticiones por cada ensayo.

Se observaron resultados similares a los ya mostrados cuando la SOD y catalasa no estaban presentes: los complejos II y IV presentaron un decremento en la actividad con el tratamiento 3-NP, el complejo III presentó un decremento sin ser significativo mientras que el complejo I no se vio afectado como se muestra en la *Figura 12*.

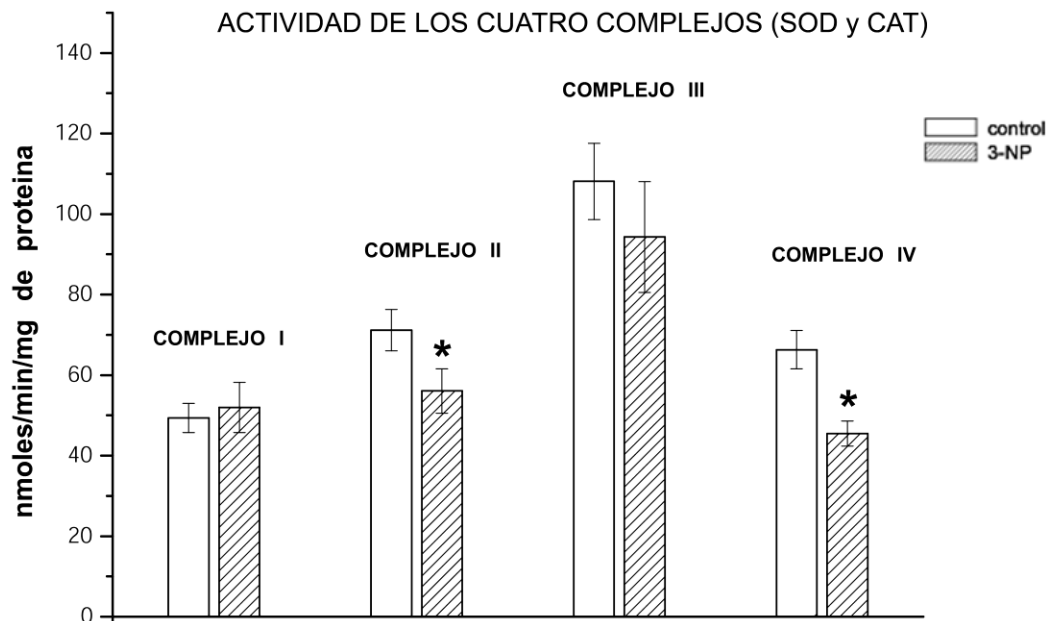


Figura 12. Actividad de los cuatro complejos respiratorios en presencia de las enzimas antioxidantes SOD y Catalasa expresada en nmol/min/mg de proteína. Los Complejos II (Succinato deshidrogenasa) y IV (citocromo *c* oxidasa) presentaron un decremento significativo (*) en su actividad en el tratamiento 3-NP con respecto al control. El complejo I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa) presentaron un decremento sin ser significativo (n=7). Se consideró * p \geq 0.05

6.5 INHIBICIÓN DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES EN PRESENCIA DE SOD Y CATALASA

Se observó un ligero aumento en la inhibición de los complejos I y IV en el tratamiento 3-NP con respecto al control sin ser significativa, aun así, la inhibición del complejo I sigue siendo poco efectiva después de haber utilizado las enzimas antioxidantes SOD y catalasa como se muestra en la *Figura 13*.

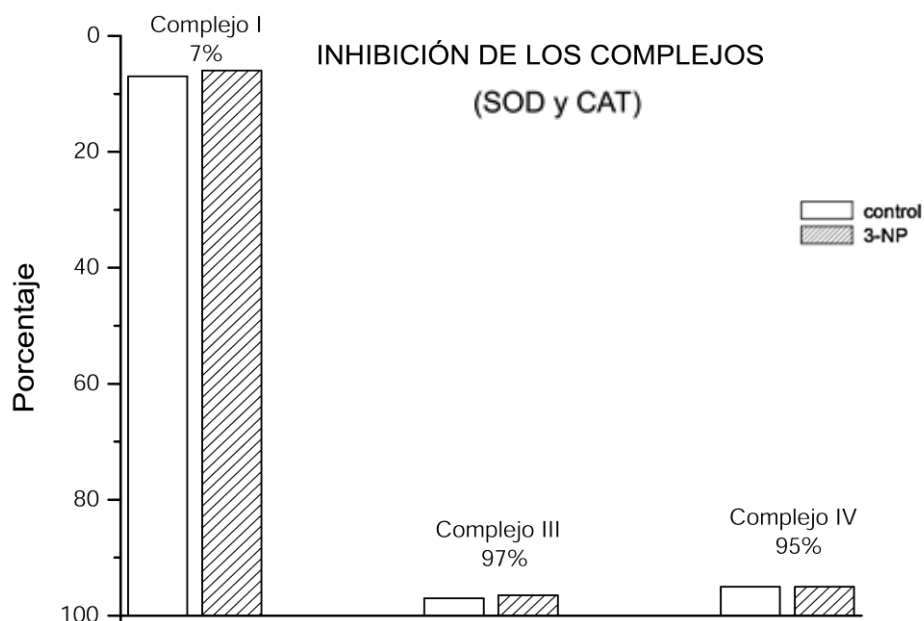


Figura 13. Inhibición de los complejos respiratorios con inhibidores específicos en presencia de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, expresada en porcentaje. Se muestra una mayor inhibición en los complejos III y IV e insuficiente para complejo I. (No significativos entre grupo control y 3-NP). No se muestra complejo II ya que este fue bloqueado con 3-NP en los animales tratados (n=7).

7. DISCUSIÓN

En los últimos años se han descrito numerosas enfermedades asociadas al metabolismo energético mitocondrial, tales como la EH. El funcionamiento mitocondrial se ha estudiado por su participación en diversos mecanismos vitales para la célula y se ha convertido en un modelo para explicar muchos de los defectos metabólicos observados en los pacientes con EH (*Brown et al., 1997*). Los principales defectos mitocondriales observados son la disminución de la actividad de la CRM, el aumento del estrés oxidativo debido a la producción de ROS en la CRM y la baja producción de ATP (*Yau-Huei et al., 2001*). Estos defectos a su vez están relacionados con otros mecanismos que son los que pueden conducir a la neurodegeneración (*Ready, 2009*).

El estudio de la EH se ha concentrado en su gran mayoría en las alteraciones que ocurren en cerebro, principalmente en núcleo estriado. En la actualidad son escasos los trabajos que abordan los cambios a nivel muscular, por tal motivo resultó importante el estudio del músculo esquelético ya que éste agrava la ejecución motora en pacientes con EH.

Para este estudio se utilizó el músculo gastrocnemio, un músculo mixto, constituido por los dos tipos de fibras musculares, por lo tanto, éste adquiere energía por vías metabólicas distintas. En este músculo fue posible observar las alteraciones en los complejos mitocondriales en condiciones normales y con el tratamiento 3-NP, principalmente el complejo II o Succinato deshidrogenasa.

La extracción de mitocondrias por el método de Kunz *et al.*, 1993, resultó favorable, ya que permitió la obtención de mitocondrias viables, además de obtener un volumen de muestra adecuado para realizar la determinación de proteína y los distintos ensayos para evaluar la actividad de los cuatro complejos mitocondriales.

ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES

Se observó un decremento en la actividad del complejo II en nuestro tratamiento. Éste resultado era esperado, pues el 3-NP produce un bloqueo total e irreversible de este complejo al interaccionar con la deshidrogenasa succínica e impide que el sustrato endógeno (ácido succínico) se una a ella.

A pesar del daño, se observó actividad en éste complejo, esto puede deberse a que existe un recambio de las subunidades de este complejo. Se sabe que el complejo II mitocondrial se sustituye en aproximadamente 12 horas (*Schulz et al., 1995*), por lo tanto para cuando se evaluó su actividad, éste complejo poseía proteínas distintas a las que tenía durante el tratamiento, de esta forma las alteraciones que se observaron se deben al daño específico sobre el funcionamiento mitocondrial y no a un efecto farmacológico, pues el 3-NP ya no estaba presente cuando se realizaron los ensayos bioquímicos.

El complejo I no presentó ningún cambio, esto debido a que es el lugar por donde ingresan la mayoría de los electrones a la CRM e inicia el proceso del transporte de electrones a los complejos sucesivos por lo que la actividad no se vio afectada.

El complejo III presentó un decremento en su actividad por un posible daño producto de la inhibición del complejo II por parte del 3-NP, la cual impedía el flujo de electrones hacia este complejo disminuyendo su actividad, aun así este decremento no fue significativo entre los grupos experimentales.

Por otra parte, la actividad del complejo IV decrementó significativamente, este complejo es el eslabón final en la CRM el cual recibe cuatro electrones del citocromo *c* y los transfiere al oxígeno, el aceptor final de electrones, que se reduce formando dos moléculas de agua (H_2O) y que transloca cuatro protones desde la matriz mitocondrial

hacia el espacio intermembranal, contribuyendo de esta manera a la síntesis de ATP mediante la ATPsintasa. El decremento en la actividad de este complejo, puede vincularse a la producción deficiente de ATP en el músculo esquelético de pacientes con EH, lo que conllevaría a un deterioro muscular y posteriormente a la pérdida de peso no sólo por el desequilibrio entre la ingesta calórica, la digestión y la absorción energética si no también a esta alteración en la maquinaria enzimática que involucra la producción de ATP.

El decremento en la actividad del complejo IV es la alteración de la CRM descrita con mayor frecuencia en pacientes con EH (*Rodríguez, 2000*). Tabrizi y colaboradores (2000) reportaron un decremento no significativo en la actividad de los complejos I-IV en músculo esquelético de ratones R6/2, pero también mencionan a este último como un blanco sensible de los radicales libres.

INHIBICIÓN DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES

Los complejos III y IV se inhibieron casi por completo con un 96% y 94% respectivamente en ambos grupos, en contraste con el complejo I el cual presentó una inhibición del 10%. En este punto se sugirió que al ser inhibido el transporte de electrones, los radicales producidos en el proceso normal de respiración se acumularon en los pasos iniciales de la CRM, específicamente en el complejo I como se observa en la *Figura 8*. Estos electrones pueden ser cedidos directamente al oxígeno molecular para generar radicales superóxido (O_2^-) que a su vez se detoxifican mediante la enzima superóxido dismutasa mitocondrial y generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (*Rodríguez, 2000*). Se ha vinculado a la excitotoxicidad en la generación de radicales superóxido, óxido nítrico y sus derivados (*Tabrizi et al., 1999; Tabrizi et al., 2000*), también se sabe que la disfunción mitocondrial

en la EH puede ser consecuencia del daño oxidativo causado por la producción de radicales libres. Una de las cuestiones de debate habituales es si el estrés oxidativo es un hecho primario o secundario en la EH (*Browne et al., 1997*).

ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES EN PRESENCIA DE SOD y CATALASA

Para corroborar la posible formación de radicales superóxido derivados de los acumulados en el complejo I, se utilizaron los antioxidantes SOD y catalasa capaces de neutralizar la actividad de estos radicales.

Sin embargo, se observaron resultados similares a los mostrados en un principio en condiciones normales, el complejo I y III no presentaron cambios en su actividad y se observó el mismo decremento en la actividad del complejo II y IV siendo significativo entre ambos grupos. De esta manera podemos decir que una vez que se ha producido el daño mitocondrial de forma sistémica con el 3-NP, los antioxidantes SOD y catalasa no revierten o ayudan a reparar este daño.

INHIBICIÓN DE LOS COMPLEJOS MITOCONDRIALES EN PRESENCIA DE SOD Y CATALASA

El complejo I presentó un ligero cambio sin ser significativo. La actividad de éste complejo es inhibida por rotenona, sin embargo, se observó una inhibición del 7% aún en presencia de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa, las cuales indicarían la probable presencia de radicales superóxido acumulados en éste complejo. Esto sugiere que la cantidad de rotenona utilizada en mitocondrias de músculo gastrocnemio, es baja, de tal forma que se tendría que aumentar dicha cantidad para observar su inhibición.

Los complejos III y IV presentaron una inhibición del 97% y 95% respectivamente. Resultados muy similares a los obtenidos en ausencia de SOD y catalasa. Estos datos sugieren que la mitocondria no solo se ve afectada por la producción de radicales superóxido, sino que también por los radicales provenientes del óxido nítrico, puesto que ambos se generan en niveles muy bajos durante la respiración mitocondrial en condiciones fisiológicas normales, mientras que se ve aumentado el nivel de estos en varias condiciones patológicas.

Esta idea es apoyada por trabajos de autores como Tabrizi y colaboradores (1999), (2000); Rodríguez (2000); quienes mostraron que la disminución de la actividad del complejo IV es debida a la generación de NO/O₂ y ONOO lo que permitía una sensibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad en la EH y con la progresión de la enfermedad, se proponía un aumento de radicales libres que llevarían a los complejos I y II a su inhibición y posteriormente a una muerte celular. Es probable que esto suceda de manera similar en el músculo esquelético el cual mostró una disminución en la actividad del complejo IV. Se sabe que concentraciones bajas de ONOO⁻ pueden llevar a la muerte celular apoptótica,

mientras que altas concentraciones causan necrosis, dependiendo también de los niveles de antioxidantes endógenos y el tiempo de exposición.

Por otra parte, se sabe que el metabolismo energético es la base de las funciones celulares. Una adecuada transferencia de electrones a través de una serie de reacciones redox garantiza la obtención de sustratos energéticos necesarios para el óptimo funcionamiento de las células (*Rodríguez, 2000*). En los últimos años se han descrito numerosas enfermedades asociadas al metabolismo energético deficiente de la mitocondria, tal es el caso de la EH, en la cual se ha observado una disminución en el metabolismo de la glucosa y el oxígeno en los ganglios basales (*Browne et al., 1997*). Esta disminución en el metabolismo energético mitocondrial parece deberse a su vez a la disminución en la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones (*Rodríguez, 2000*).

El déficit energético causado por una CRM anormal y por el daño oxidativo de las moléculas ERO sobre otros componentes celulares, pueden conducir a la disfunción del tejido (músculo esquelético).

Los músculos necesitan la energía a partir de la fosforilación oxidativa y la glucólisis para participar en la locomoción, la producción de calor y en general todo el metabolismo. Si bien, como se había mencionado, el músculo gastrocnemio está conformado por dos tipos de fibras musculares lo cual le confiere la habilidad de poder obtener energía de dos vías diferentes.

Es probable que después de bloquear el complejo II, el primer cambio en la mecánica del músculo sea producir más Succinato deshidrogenasa para contrarrestar la inhibición de la misma por 3-NP. Debido a que la fosforilación oxidativa fue bloqueada, es probable que la glucólisis se viera favorecida. Esta explicación es consistente con la idea de que las fibras musculares pueden cambiar su fuente de energía, dependiendo de las demanda energética sin cambiar la composición del tipo de fibra (*Hernández-Echagaray, 2010*).

8. CONCLUSIONES

- Lo ratones de la cepa C57BL/6 administrados con una dosis de 15 mg/kg, por 5 días con ácido 3-NP, presentaron una disminución en la cadena respiratoria mitocondrial.
- Se observó un decremento significativo en la actividad del complejo II entre en grupo control y 3-NP.
- El empleo de antioxidantes dirigidos a radicales superóxido (SOD y CAT) después de haber producido el daño mitocondrial con la toxina 3-NP, no presentó cambios significativos comparándolos en condiciones sin estos.
- El daño producido por 3-NP no se revierte con la presencia de los antioxidantes SOD y CAT.
- Se atribuye el decremento de la actividad de los complejos IV a la posible participación de radicales libres provenientes del Oxido Nítrico.

9. PERSPECTIVAS

- Sería interesante realizar estudios con antioxidantes dirigidos a Óxido Nítrico para corroborar la participación de estos radicales en el decremento de la actividad del complejo IV.
- También se podría aumentar la cantidad de rotenona para observar si existe algún cambio en la inhibición del complejo I.

10. LITERATURA CITADA

- Alberts.B, Hopkin. K, Jhonson. A, Lewis. J, Roberts. K, Wlter. P. 2001. Biología celular. Ed Panamericana. Buenos Aires. pp 457.
- Andrey V. Kuznetsovl, V. Veksler. F. Gellerich, V. Saks, R. Wolfram. 2008. Analysis of mitochondrial function in situ inpermeabilized muscle fibers, tissues and cells.2008. *Nature.P.G.* (3) 965-675.
- Ahuja. M & Chopra. K. 2007. Inflammatory and Neurochemical Changes Associated with 3-Nitropropionic Acid Neurotoxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 18:335–339, 2008.
- Arredondo. A, Venet. G, Guerra. O, Ramírez. E. 2012. Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. *Medisan* 2012; 16(5):795
- Aziz Ahmad.N, Van der Marck. M, Pijil. H, Olde Rikkert. M, Bloem.B, Roos. R. 2008. Weight loss in neurodegenerative disorders. *Journal of Neurology*. 255:1872-1880.
- Bénit. P, Gonclaves. S, Philippe Dassa. E, Briere. J, Martin. G, Rustin. P. 2006. Three spectrophotometric assays for the measurement
- of the five respiratory chain complexes in minuscule biological samples. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 374 (1-2), 81-6. Doi:10.1016/j.cca.2006.05.034.
- Benites-Burraco A. 2009. Enfermedad de Huntington: fundamentos moleculares e implicaciones para una caracterización de los mecanismos neuronales responsables del procesamiento lingüístico. *Rev NeuroL*; 48 (2): 75-84.

- Boveris. A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en Biología y Medicina. *Ars Pharm*; 46 (1): 85-95.
- Breuer. M, Willems. P, Russel. F, Koopman. W, Smeitink. J. 2011. Modeling mitochondrial dysfunctions in the brain: from mice to men. *J Inherit Metab Dis* (2012) 35:193–210.
- Brouillet. E, Jacquard. C, Bizat. N, Blum. D. 2005. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 95, 1521–1540.
- Browne. S, Robert. J, Ferrante. A, Beal. F. 1997. Oxidative Stress in Huntington Disease. *Brain Pathology* 9: 147-163.
- Claudio. F. 2010. Análisis del DNA mitocondrial y de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
- De Sant. J. 2003. Músculo esquelético. Federación española de enfermedades neuromusculares. Barcelona.
- Fernández J. 2001. La enfermedad de Huntington: una visión biomolecular. *Rev Neurol* 2001; 32 (8): 762-767.
- Gatto E. 2002. Enfermedad de Huntington: tratamiento. *Revista de Neuro-Psiquiatría* 2002; 65: 202-221.
- Gil. J & Rego. A. 2008. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 27, pp. 2803–2820.
- González. V. 2004. Parámetros respiratorios de mitocondrias aisladas de ratones mutantes de catalasa. Departamento de Ciencias De la Salud, División C.B.S. UAM-I.
- Hernandez-Echeagaray.2004.Avances sobre la Neurobiología de la enfermedad de Huntington. *Temas Selectos de Neurociencias III*. Ed Javier Velázquez Moctezuma UAM.
- Hernández-Echeagaray E. 2010. Advances in the neurobiology of Huntinton`s disease. *Nurobiol. Sciences*. 2010:43-65.
- Justo. R. 2005. Función y biogénesis mitocondrial. Diferencias entre géneros. Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, España.

- Keating. J. 2008. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *J. Neurochem* 104, 298–305.
- Kunz. W, Kuznetsuv. A, Schulze. W, Eichhorn. K, Schild. L, Striggow. F, Bohnensock. K, Neuhof. S, Grasshoff. H, Wolfram. N, Gellerich. F. 1993. Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1144 (1993) 46-53.
- Kardong. K. 1998. Vertebrados. Anatomía comparada, función, evolución. Segunda edición. Ed McGraw- Hill. Interamericana. 365-367 pp.
- Lodish. H. 2007. Molecular Cell Biology. Quinta edición. Ed, panamericana. 462-465 pp.
- Lowry. 2002. Cuantificación de proteínas. México. <http://acasti.webs.ull/docencia/practicas/4.pdf>.
- Monza. J, Borsani. O, Batista, Signorelli. L. 2010. Cadena respiratoria. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 11, pp. 1401-1412.
- Nardin. A & Johns. D. 2000. Mitochondrial dysfunction and neuromuscular disease. *Muscle Nerve* 24: 170–191, 2001.
- Ortiz-Tinoco. V, & Hernández-Gallegos. O. 2010. Cambios en las fibras del músculo esquelético inducidos por glucocorticoides y su relación con los niveles de expresión del gen mstn en ratas. Programa de Maestría en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.
- Parrado. C. 2010. Biosíntesis de coenzima Q: mantenimiento de la homeostasis redox y adaptación metabólica. Tesis Doctoral. Departamento de Biología celular. Universidad de Cordoba. 153 p.
- Pérez. V. 2008. Caracterización de los patrones de déficit energético y estrés oxidativo/nitrosativo inducidos por el peroxinitrito en modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Reddy. 2009. Mitochondrial Structural and Function Dynamics in Huntington's Disease. *Brain Res Rev*. June; 61 (1): 33-48.
- Ross. R. 2010. Huntington's disease: a clinical review. *Journal of Rare Diseases*, 5:40.
- Rodríguez. B. 2000. Análisis del DNA mitocondrial y de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial en la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádico. Tesis

Doctoral. Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología celular. 267 p.

- Rodríguez. M, Cervantes. A, Vargas. S, Corona. T. 2010. Papel de la función mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. Arch Neurocién (Mex) Vol. 15, No. 1: 39-46.
- Sanchez. R. & Arboleda. G. 2008. Mitocondria y muerte celular. Vol.6 No. 10:101-236.
- Stefan. K, Fritz. S, Fuchs. F, Messerschmitt.M, Weinbach.N, Neupert.W, Westermann.B. 2002. Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saaharomyces cerevisiae*.Molecular Biology of the Cell. Vol.13, 847-853, 2002.
- Schulz. JB, Matthews. RT, Jenkins. BG, Ferrante. RJ, Siwek D, Henshaw. DR, Cipolloni. PB, Mecocci. P, Kowall. NW, Rosen. BR, Beal. MF. 1995 Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J Neurosci* 15:8419–8429
- Tabrizi. S, Cleeter. M, Xuereb. J, Taanman. J, Cooper. J, Schapira. A. 1999. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol*; 45:25–32.
- Tabrizi. S, Workman. B, Hart. E, Mangiarini. L, Mahal. P, Bates. G, Cooper. M, Schapira. V. 2000. Mitochondrial Dysfunction and Free Radical Damage in the Huntington R6/2 Transgenic Mouse. *Ann Neurol*; 47:80–86.
- Tornero. D, Ceña. V, Jordán. N. 2002. La mitocondria como diana farmacológica en los procesos neurodegenerativos. Vol 21 Núm 11.
- Yau-Huei Wei, Ching-You Lu, Chia-Yu Wei, Yi-Shing Ma and Hsin-Chen Lee.2001. Oxidative Stress in Human Aging and Mitochondrial Disease–Consequences of Defective Mitochondrial Respiration and Impaired Antioxidant Enzyme System. *Chinese Journal of Physiology* 44(1): 1-11, 2001.

