



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA
CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN
ASTROCITOS AISLADOS DE CORTEZA, ESTRIADO E
HIPOCAMPO DE RATA ADULTA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

IRMA JANET ESPINOZA BELLO

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARISOL OROZCO IBARRA**

**ASESORA INTERNA:
DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**



México, D.F., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA

El presente trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (NMyC) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), bajo la dirección de la Dra. Marisol Orozco Ibarra.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del proyecto de CONACYT 168356. Además agradezco la beca que me fue otorgada a través de este programa, siendo mi número de becario el 22228.

México, D.F., a 15 de enero de 2016.

DEDICATORIAS

A mi madre:

Que a una edad muy temprana fomentaste en mi persona el deseo de siempre aprender y de superarme en los estudios, por tus cuidados, por todo el apoyo que recibí de ti y tus consejos en cada etapa de mi corta vida, en la cual siempre es grato saber que siempre continuarás a mi lado. ¡Te amo mamá, muchas gracias por todo!

A mi padre:

Que a pesar de ser muy diferente a mis demás hermanos jamás has dudado de mis habilidades para terminar cada una de las etapas que he emprendido, para lo cual siempre has tenido un consejo y una palabra de aliento con la cual hacerme seguir adelante, por tu compañía y tu cariño, esta tesis también es tuya, ¡te amo!.

A mis hermanos:

Raquel, Marcos, Jesús y Miriam, que aunque no estamos juntos en todo momento, es un gran orgullo saber que siempre están ahí para mí, y por todos los bonitos momentos que hemos pasado juntos, ustedes son muy importantes en mi vida, gracias por todo su apoyo y comprensión siempre, los amo mucho.

A mi pequeño León

Al más pequeño precioso de la casa que llena mis días de alegría, con su amor, calidez, ternura por toda tu empatía mi pequeño sobrino adorado, luz de mis ojos mi niño consentido te amo, eres la alegría de la casa y me enorgulleces cada día.

A mis compañeros de Laboratorio

Por su apoyo y consejos en la realización de esta tesis, por haberme permitido incorporarme al equipo de trabajo del laboratorio y por aceptarme como su amiga, por todas las pláticas, los momentos alegres que compartimos y sobre todo por su total interés en este proceso de titulación, se los agradezco muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis: Dra. Marisol Orozco Ibarra

Le agradezco haberme permitido realizar mi tesis con su equipo de trabajo y en el laboratorio que está bajo su cargo. Así como su disposición y dedicación en la revisión de este trabajo, sus consejos sobre cómo desenvolverme en el laboratorio y posteriormente en el ámbito profesional. Por orientarme y compartir sus conocimientos que han fomentado mi formación profesional. ¡Muchas gracias!

A la M. en C. Norma Serrano García

Normita te agradezco los consejos durante mi estancia en el laboratorio, así como tus sugerencias y observaciones durante la realización de este trabajo, las cuales contribuyeron directamente al enriquecimiento del mismo.

A mi tutora interna: Dra. Leticia Morales Ledesma

Muchas gracias por haber aceptado ser mi tutora interna así como sus observaciones y correcciones, además de su interés en la revisión de esta tesis.

A la Dra. Paty Rosas, Dr. Jorge Flavio y Dra. Lúcil Barrera

Por su amable disposición durante la revisión de esta tesis, así como sus amables contribuciones y observaciones que contribuyeron directamente a su enriquecimiento.

A la Dra. Juana Villeda

Por su amabilidad al facilitar el uso del microscopio para la toma de fotografías de las preparaciones de las células realizadas en este estudio.

GLOSARIO

SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
GFAP	Proteína Ácida Glial Fibrilar
ATP	Adenosin Trifosfato
PGE2	Prostaglandina 2
NO	Óxido Nítrico
AA	Ácido Araquidónico
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
FADH2	Dinucleótido de Flavina y Adenina
CTE	Cadena Transportadora de Electrones
ADP	Adenosin Difosfato
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
EP	Enfermedad de Parkinson
EH	Enfermedad de Huntington
6-OHDA	6 Hidroxidopamina
3-NP	Ácido 3-Nitropropiónico
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
EA	Enfermedad de Alzheimer
PFA	Paraformaldehído
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
PDL	Poli-D-Lisina

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
Sistema Nervioso	2
Células nerviosas	2
Astroglía	4
Clasificación	4
Modelos <i>in vitro</i> para la caracterización de la astroglía	6
Mitocondria	9
Cadena de transporte de electrones	11
Uso de inhibidores de la CTE para el estudio de la función mitocondrial en astrocitos	15
Importancia de la mitocondria en los astrocitos	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS PARTICULARES	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Hematoxilina-Eosina (HyE)	23
Inmunocitoquímica	23
Inmunodetección de proteínas por Western Blot	23
Actividad de los complejos de la CTE	23
Viabilidad Celular	24
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	25
ANÁLISIS DE RESULTADOS	34
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS	39
Anexo I	43



RESUMEN

Durante el siglo pasado las neurociencias se enfocaron en el estudio de la neurona, su dinámica y funcionamiento. Sin embargo, en los últimos años, ha ido en aumento el interés por el estudio de las células gliales, las cuales se pensaba que servían solo de soporte estructural y trófico para las neuronas. Recientemente se ha reportado que estas células aportan a las neuronas y al medio extracelular diferentes moléculas indispensables para mantener la homeostasis en el SN, como sustratos energéticos, antioxidantes, precursores de neurotransmisores, etc. Estos estudios se han realizado principalmente usando astrocitos aislados de roedores neonatos, sin embargo es importante considerar que muchas patologías del SN se presentan en individuos adultos, por lo que trabajar con células gliales aisladas de animales adultos podría dar resultados novedosos y podría representar un modelo que aporte más información y permita comprender mejor estas enfermedades. Por otro lado, uno de los datos más conocidos acerca del metabolismo energético de astrocitos es su gran dependencia de la glucólisis, pero no se ha abundado en el estudio de las características de las mitocondrias que poseen.

OBJETIVO: Desarrollar un método de aislamiento de astrocitos a partir de rata adulta, para determinar la actividad y nivel de proteína de los complejos de la CTE, así como el efecto de la administración de algunos inhibidores de CI (rotenona, 6-OHDA) y CII (3-NP, ácido malónico) sobre la viabilidad celular.

MÉTODO: Se diseñó un método para el aislamiento de astrocitos de cerebros de rata adulta de tres regiones cerebrales: corteza, estriado e hipocampo, que se mantuvieron en cultivo durante 23 días. Se realizaron cultivos de HyE, inmunocitoquímica, western blot, medición de actividad de los complejos mitocondriales y ensayos de viabilidad celular en presencia de inhibidores de la CTE.

RESULTADOS: Se comprobó la identidad de los astrocitos mediante la expresión de GFAP y la morfología poligonal fusiforme característica de astrocitos. En el análisis por WB, se detectó claramente la presencia de la subunidad de complejo V (ATP5A) y la del complejo III (UQCRC2), pero no fue posible detectar las subunidades del complejo IV (MTCO1), complejo II (SDHB) y complejo I (NDUFB8). En cuanto a la actividad de los complejos mitocondriales, se logró detectar la actividad de los complejos I, III y IV, pero no del complejo II. El tratamiento de los astrocitos con rotenona disminuyó la viabilidad celular en astrocitos aislados de corteza y estriado sólo en la concentración de 10 μ M, mientras que el tratamiento con 6-OHDA no tuvo efecto. El tratamiento de los astrocitos con inhibidores de CII (3-NP y malonato) disminuyó la viabilidad celular en las tres regiones estudiadas.



ANTECEDENTES

Sistema Nervioso

El sistema nervioso (SN) controla y regula el funcionamiento de los diversos órganos y sistemas, coordinando su interrelación y la relación del organismo con el medio externo. Anatómicamente, se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP).

El SNC comprende el cerebro y la médula espinal, mientras que el SNP se compone de nervios provenientes del cerebro (nervios craneales) y de la médula espinal (nervios espinales). Los nervios periféricos (craneales y espinales) transmiten mensajes neurales de los órganos y receptores sensoriales en el organismo al SNC y del SNC hacia los músculos y las glándulas del cuerpo.

La constitución del tejido que conforma el SNC es compleja, por lo que para su estudio, se ha subdividido en materia gris y materia blanca. La materia gris se compone de cuerpos celulares, dendritas, terminales nerviosas, sinapsis y células gliales (astrocitos protoplásmicos, microglía) y está altamente vascularizada. La materia blanca está constituida por los axones, que se encuentran en su mayoría mielinizados por oligodendrocitos, astrocitos fibrosos, carece de cuerpos celulares y la vascularización es menor a la de la materia gris¹.

Como se mencionó anteriormente, el SNP está constituido por conjuntos de cuerpos neuronales asociados a nervios periféricos. Cada fibra nerviosa del SNP está compuesta por tres elementos: axones, células de Schwann y vainas de mielina¹.

Células nerviosas

La neurona se ha considerado durante muchos años la unidad anatómica y funcional del SN. Las neuronas reciben estímulos provenientes de otras células, transmiten rápidamente la excitación resultante y tienen influencia sobre células musculares, células glandulares y otras neuronas. Son células altamente especializadas, no tienen capacidad proliferativa y pierden su viabilidad si se exponen a condiciones hipóxicas durante periodos de tiempo cortos¹.

La neurona está constituida estructuralmente por tres regiones definidas: (1) cuerpo celular (soma), (2) un número variable de dendritas, y (3) un axón simple. El cuerpo celular es el centro genómico y metabólico de la neurona. Las dendritas son los principales receptores de señales ambientales y neuronales; reciben las señales y las transmiten al soma. Los axones transmiten información del soma a la terminal nerviosa, en donde la señal es recibida por otra neurona o un tejido no neuronal¹.



Células gliales (glía)

Las células gliales son células de soporte que envuelven el cuerpo celular, las dendritas y los axones de las neuronas en el SNC y el SNP. La glía se caracterizó originalmente como un conjunto de células con un papel pasivo y limitado en el SN; sin embargo, con el transcurso del tiempo, se ha descubierto que estas células tienen múltiples funciones, algunas de las cuales se resumen en la Tabla I.

La clasificación clásica de las células gliales en el SNC incluye a la astrogliá, la oligodendrogliá, microgliá y células endimarias. La astrogliá y la oligodendrogliá en conjunto, son llamadas macrogliá, y tienen un origen ectodérmico, a diferencia de la microgliá, la cual tiene origen mesodérmico. Las células gliales no forman sinapsis y no generan potencial de acción, aunque se ha descrito que desempeñan un papel importante en la sinapsis neuronal¹.

Tabla I. Funciones de la glía en el SNC.

Tipo de célula glial	Funciones	Referencia
Oligodendrogliá	Produce y mantiene las vainas de mielina, envolviendo los axones de las neuronas, aislándolos, y agrupando los canales de sodio en los nodos de Ranvier, lo que permite al potencial de acción pasar de un nodo a otro. El desarrollo de la mielina y la conducción del impulso nervioso proporcionan la base para el procesamiento rápido de la información.	Aggarwal, 2011
Microgliá	Reconoce células dañadas y agentes patógenos, fagocitan células muertas y debris, pero también está implicada en la remodelación sináptica durante el desarrollo del sistema nervioso, ya que remueve conexiones inapropiadas a través del proceso de fagocitosis.	Allen y Barres 2009
Células endimarias	Son células ciliadas que revisten las cavidades del encéfalo y el conducto central de la médula espinal. Contribuyen al flujo del líquido cefalorraquídeo.	Snell, 2007
Astrogliá	Regula el flujo sanguíneo en el SNC, mantiene la homeostásis cerebral, y provee sustratos energéticos a las neuronas, entre otras funciones.	Sofroniew y Vinters, 2010

Astroglía

Los astrocitos (células parecidas a estrellas) son las células no neuronales más abundantes y diversas del SNC. Constituyen del 20 al 50% del volumen de la mayoría de las áreas del cerebro⁴. La definición clásica, se basa en su morfología estrellada y en la expresión de marcadores específicos, entre los cuales se destaca el uso de proteínas de filamentos intermedios que forman el citoesqueleto, como la vimentina y la proteína ácida glial fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés), siendo esta última el marcador clásico usado por excelencia para su identificación⁵. Sin embargo, la expresión de GFAP varía considerablemente entre las diferentes regiones cerebrales; por ejemplo, esta proteína es expresada por prácticamente todas las células de la glía de Bergmann (astrocitos de corteza del cerebelo) y por los astrocitos fibrosos de la materia blanca, mientras que se ha reportado en animales adultos, que solo del 15 al 20% de los astrocitos protoplásmicos corticales expresan GFAP⁶. Otras proteínas ampliamente utilizadas para identificar astrocitos son la glutamina sintetasa y proteína β de unión a calcio (S100 β).

Clasificación

Con base en su morfología, los astrocitos se pueden clasificar en dos tipos: fibrosos y protoplásmicos (Figura 1)^{4,7}. Los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca; por lo general tienen contornos regulares y apariencia de estrella, presentan prolongaciones llamadas “procesos pediculares” que tienen forma cilíndrica y se ubican entre las fibras nerviosas. Cada prolongación es larga, delgada, lisa y no muy ramificada. Los astrocitos protoplásmicos se localizan en la sustancia gris; tienen contornos irregulares y sus procesos pediculares se dirigen a los vasos sanguíneos adyacentes, transportan metabolitos y desechos de parte de la neurona, además recubren las porciones del axón neuronal que no está cubierto por la mielina⁷⁻⁹.

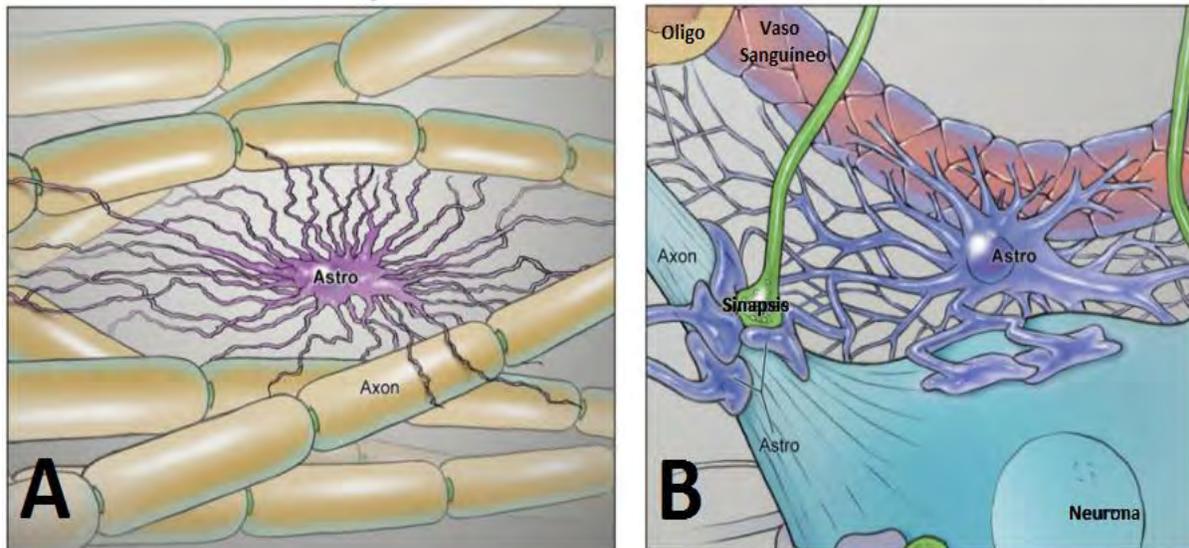


Figura 1. Representación esquemática de la morfología de la astroglia. Los astrocitos son morfológicamente heterogéneos. A. Astrocito fibroso. B. Astrocito protoplásmico. Tomado y modificado de Molofsky et al., 2012. Astro= astrocito, Oligo:oligodendrocito.

La identificación de astrocitos, requiere un conjunto bastante complejo de criterios, no sólo debido a la gran heterogeneidad astrogliar, sino también debido a cambios en el desarrollo del fenotipo. En algunos estudios, se han propuesto ocho criterios para la identificación de los astrocitos^{10,11}:

1. Ausencia de excitabilidad eléctrica (es decir, los astrocitos no pueden generar potencial de acción).
2. Potencial de membrana muy negativo (-80 a -90 mV), debido a una prevalencia de permeabilidad de iones K^+ de la membrana plasmática.
3. Expresión de transportadores funcionales para GABA y glutamato para permitir la homeostasis del neurotransmisor.
4. Un gran número de haces de filamentos intermedios, los cuales son sitios en los que se localiza la proteína GFAP.
5. Presencia de gránulos de glucógeno en el citoplasma.
6. Procesos de cada célula en contacto con los vasos sanguíneos circundantes.
7. Procesos perisinápticos elaborados.
8. Uniones con otros astrocitos por uniones GAP formadas por conexina 43 y/o 30.



Modelos *in vitro* para la caracterización de la astrogliá

Muchos de los protocolos reportados en la literatura para el aislamiento de astrogliá derivan del trabajo de Booher y Sensenbrenner (1972), o de la modificación posterior realizada por McCarthy y de Vellis (1980). A partir de estos métodos muchos laboratorios en el mundo han diseñado métodos propios para el aislamiento de estas células para caracterizar sus propiedades bioquímicas, farmacológicas y morfológicas¹²⁻¹⁴.

Estos protocolos se diseñaron para obtener astrocitos a partir de roedores en la etapa fetal o neonatal, ya que se ha demostrado que la edad óptima para el aislamiento de astrocitos es durante la astrogénesis; que ocurre después del pico de neurogénesis y antes del pico de oligodendrogénesis. En ratones y ratas esta ventana óptima se extiende por un período de 2 a 3 días postnatales en la corteza cerebral y la mayoría de las regiones del SNC, en el caso del cerebelo se extiende entre los días postnatales 4 y 7¹⁵. Es posible obtener un cultivo confluyente al paso de 7 a 14 días después del aislamiento, y otros tipos celulares (células endodimales, neuronas, fibroblastos, células endoteliales, oligodendrocitos y microglía) se encuentran en cantidades bajas¹⁵.

Estas ventajas han permitido que los cultivos de astrocitos aislados de animales neonatos sean ampliamente utilizados. Sin embargo, el tejido proveniente de animales de esta edad no forma conexiones bien definidas, por lo que es más lábil en comparación con animales adultos. Éstos presentan células diferenciadas, una mayor organización celular y conexiones establecidas con otro tipo de células. Además, diversas enfermedades neurogenerativas se asocian con el incremento de la edad del individuo¹⁶⁻¹⁸, por lo que el estudio de la función y respuesta de las células aisladas de cerebros de animales adultos podrían, dadas sus características, tener una respuesta diferente a los astrocitos aislados de animales neonatos ante un mismo estímulo.

Funciones de los astrocitos

La astrogliá fue descrita en 1846 por Rudholf Virchow y se caracterizó originalmente como un conjunto de células que proporcionaban soporte estructural a las neuronas adyacentes. Durante el último siglo, el conocimiento de la función de los astrocitos se ha ampliado notablemente debido al interés en comprender la fisiología de estas células. Se han caracterizado múltiples funciones relevantes de los astrocitos para numerosos aspectos del metabolismo y desarrollo del SN. Así, se ha demostrado que estas células son determinantes en el soporte trófico y metabólico del SNC¹²⁻¹⁴, tal como se resume en la Figura 2.

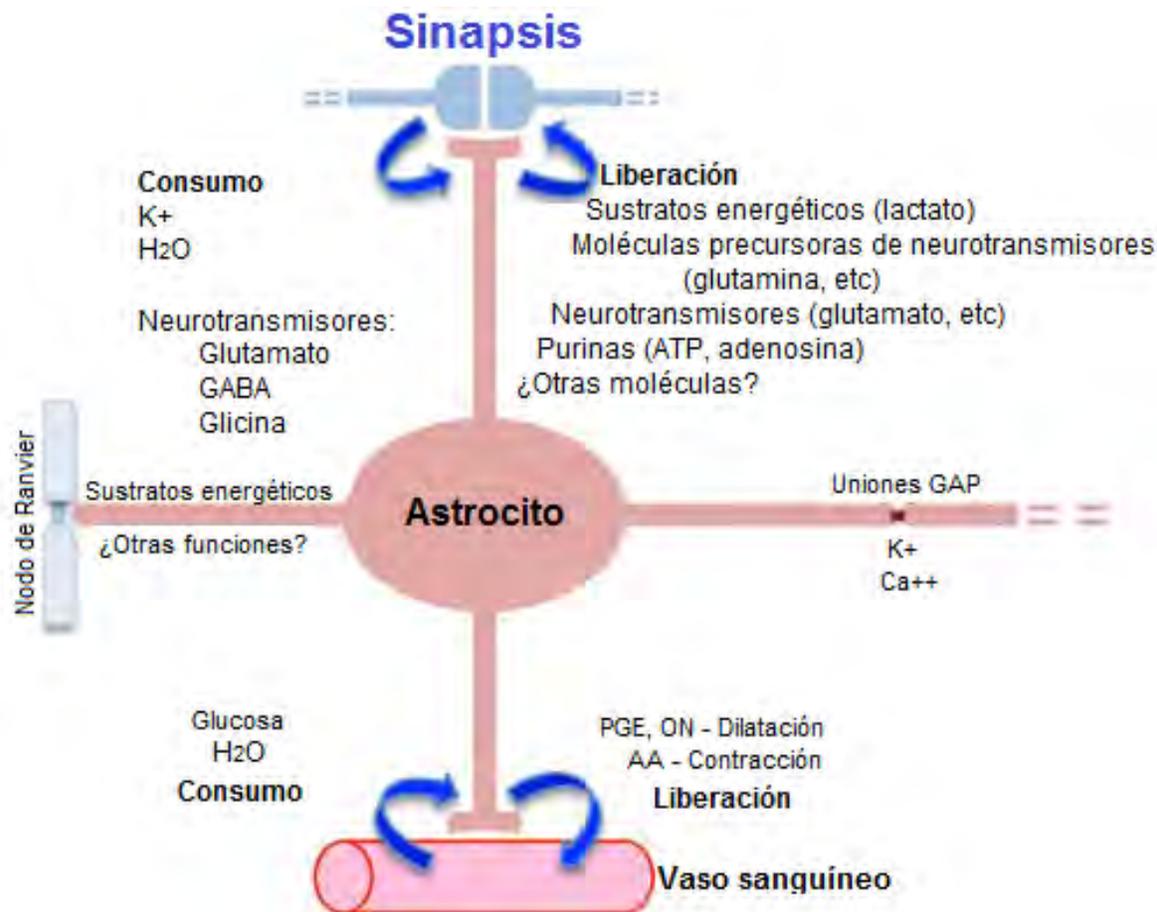


Figura 2. Representación esquemática de algunas funciones que desempeñan los astrocitos en el SNC. Tomado y modificado de Sofroniew y Vinters, 2010.

Los astrocitos tienen funciones centrales en aspectos de plasticidad y actividad neuronal a través de la liberación de neurotransmisores (glutamato, GABA, glicina). Además, contribuyen directamente a la regulación del flujo sanguíneo; regulan la transmisión sináptica a través de la liberación de moléculas involucradas en la sinapsis tales como glutamato, purinas (ATP y adenosina), GABA y D-serina cuya liberación ocurre en respuesta a los cambios de la actividad sináptica de las neuronas. Asimismo, los procesos de la astrogliá recubren las sinapsis neuronales, ejerciendo funciones esenciales en la regulación de la concentración de agua, mediante la absorción transcelular de agua a través de los canales de acuaporinas (AQP4), iones (K⁺) y pH en el espacio extracelular, manteniendo así la homeostasis durante y después de la sinapsis. Por otro lado, proveen de sustratos energéticos necesarios para la función neuronal (glutamina, glucosa, lactato), promueven la maduración neuronal, la formación de sinapsis, la supervivencia neuronal durante el desarrollo y regulan la angiogénesis, entre otras funciones^{4,19}. En la Tabla II se enlistan algunas de las funciones más representativas de los astrocitos.

Tabla II. Resumen de las funciones de los astrocitos.

Función	Descripción	Modelo	Referencia
Regulación de flujo sanguíneo	Producen y liberan moléculas que regulan la vasodilatación a través de prostaglandinas (PGE ₂), óxido nítrico (NO) y la vasoconstricción mediante ácido araquidónico (AA), modulando el diámetro de los vasos sanguíneos, regulando el flujo sanguíneo.	<i>In vivo</i>	Zonta et al., 2003
Expresión de receptores metabotrópicos	Expresan receptores metabotrópicos, con lo que regulan la cantidad intracelular de Ca ⁺⁺ u otros segundos mensajeros como AMP cíclico.	<i>In vivo</i>	Van Calker et al., 1979 y McCarthy y De Vellis, 1978
Consumo de Glutamato y GABA	Retiran glutamato y GABA del espacio sináptico. Estos compuestos ocasionan muerte neuronal si no son retirados.	<i>In vivo/ In vitro</i>	Berl et al., 1961 Martinez et al., 1977 Schousboe et al., 1977 y Levi et al., 1983
Regulación del pH	Controlan el pH extracelular, debido a la actividad de la anhidrasa carbónica.	<i>In vitro</i>	Tschirgi, 1958 y Kimelberg et al., 1979
Producción de lactato	La glucosa se transporta constantemente a través de los vasos sanguíneos que llegan al cerebro. El astrocito la convierte en lactato, y éste es transferido a la neurona como sustrato energético.	<i>In vitro</i>	Pellerin y Magistretti, 1996

Estas funciones tienen un papel determinante en el soporte estructural y metabólico del SNC; por lo que la demanda energética requerida por los astrocitos es alta, siendo capaces de producir energía a través de dos mecanismos: 1) glucólisis y producción de lactato (metabolismo anaerobio) y 2) fosforilación oxidativa, la cual depende del NADH y FADH₂ generados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la beta oxidación de ácidos grasos (metabolismo aerobio)^{20,21}.

Aún no se conocen muchos detalles sobre el metabolismo energético del astrocito, y diferentes estudios sugieren que la principal fuente energética de estas células se obtiene mediante el metabolismo anaerobio²². No obstante, se sabe que los astrocitos sí cuentan con mitocondrias y se reconoce que un porcentaje de la energía que producen se obtiene mediante metabolismo aerobio (fosforilación oxidativa). Dada la importancia que el conocimiento de los astrocitos puede tener para entender mejor la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, es necesario profundizar en el conocimiento de este tipo celular. Por lo tanto, en este trabajo, se propone evaluar algunos aspectos de la función de la mitocondria en astrocitos.

Mitocondria

La mitocondria está presente en el citoplasma celular; estructuralmente, está rodeada de una membrana externa fina y contiene una membrana interna muy invaginada²³ (Figura 3). La membrana externa es permeable a iones, metabolitos y polipéptidos, ya que contiene proteínas que forman poros, llamadas porinas, que permiten el paso de estas moléculas a través de ella; realiza relativamente pocas funciones enzimáticas o de transporte²⁴. Por su parte, la membrana interna carece de poros, por lo que es impermeable para la mayoría de las moléculas, especialmente las que tienen carga; contiene muchos sistemas de transporte transmembrana, que están implicados en la translocación de moléculas; y se encuentra intrincadamente plegada²⁴.

Se sabe que el número de mitocondrias varía en los diferentes tejidos, lo cual se ha comprobado mediante microscopía electrónica y a través del rendimiento obtenido al aislar mitocondrias de diferentes tejidos. En un trabajo reciente, Schulz et al. (2015) reportaron el siguiente rendimiento (mg de proteína mitocondrial/gramo de tejido): hígado (17.7±5.1), riñón (3.9±1.5), corazón (1.2±0.6) y cerebro (0.4±0.3). Estas diferencias podrían estar relacionadas con el metabolismo de cada tejido, pero aún se requiere profundizar los estudios al respecto.

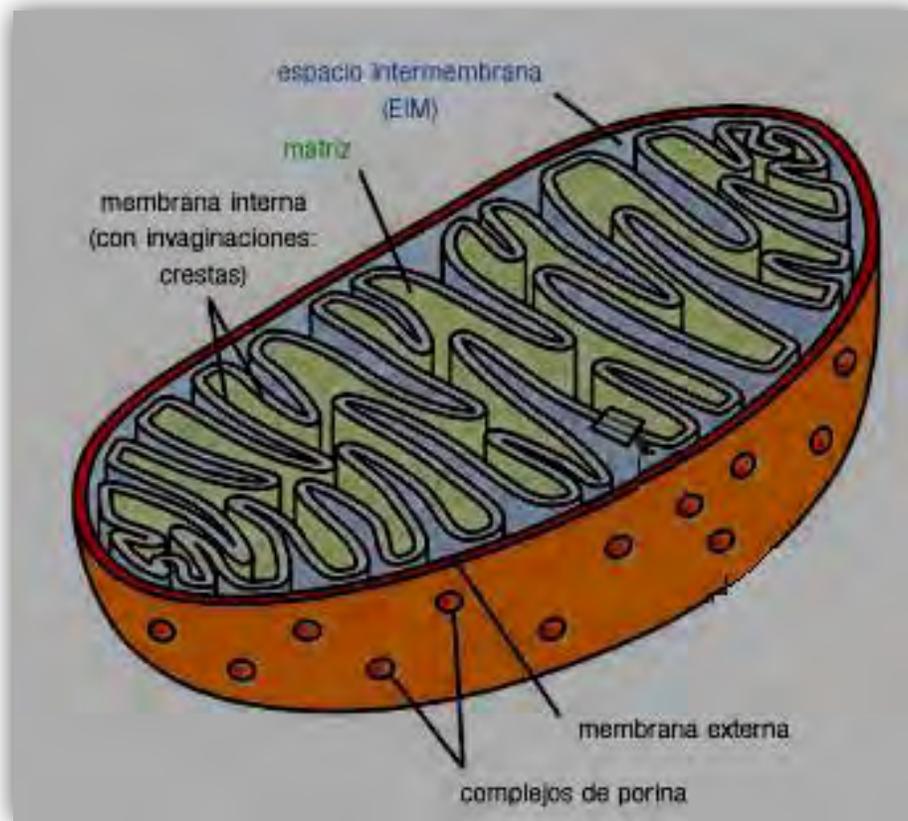


Figura 3. Representación esquemática de una sección transversal de una mitocondria. Se diferencia un lado de la matriz (en verde) y el espacio intermembrana en el lado girado (en azul) de la membrana mitocondrial interna. Los complejos de porina en la membrana mitocondrial externa permiten el intercambio libre de sustancias de bajo peso molecular entre el citosol y el espacio intermembrana. Tomada y modificada de Müller-Esterl 2008.

La mitocondria tiene diversas funciones en el metabolismo, dado que se encarga del mantenimiento de la homeostasis y puede desencadenar o amplificar señales que conducen a la muerte celular mediante el mecanismo conocido como apoptosis. Además, esta estructura, está involucrada en diferentes vías metabólicas, tales como gluconeogénesis, esteroideogénesis y ciclo de la urea. Sin embargo, la principal función es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs, β -oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, que es dependiente de la cadena transportadora de electrones (CTE)^{27,28}.

Cadena de transporte de electrones

La CTE consiste en una serie de transportadores electrónicos que funcionan como pares redox y que se localizan en la membrana mitocondrial interna. Fue descrita por primera vez en la década de 1950 usando técnicas espectrofotométricas, a través de las cuales se describieron los niveles de reducción-oxidación de los componentes de la cadena respiratoria en la transición que sigue a la adición de ADP, e identificaron los sitios que son termodinámica y cinéticamente compatibles con la transducción energética²⁹.

Se han descrito cuatro complejos multiproteicos (complejos I-IV) que conforman la CTE, y un quinto complejo que se encarga de completar la cadena respiratoria produciendo el ATP (Tabla III). La CTE comienza su función cuando los equivalentes metabólicos NADH y FADH₂, generados en la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la oxidación de ácidos grasos, ceden electrones al complejo I y al complejo II, respectivamente. Los electrones de estos dos donadores pasan a través de los complejos III y IV hasta el oxígeno, el cual se reduce para formar agua generando un gradiente de protones que es empleado por el complejo V para la generación de ATP, como se muestra en la Figura 4³⁰.

Componente	No. de subunidades (Codificadas por ADN mitocondrial)	Función
NADH deshidrogenasa (Complejo I)	46(7)	Oxidación de NADH, reducción de ubiquinona, transporte vectorial de protones
Succinato deshidrogenasa (Complejo II)	4(0)	Deshidratación de succinato, reducción de ubiquinona, enzima del ciclo de Krebs. No hay transporte de protones.
Citocromo c reductasa (Complejo III)	11(1)	Oxidación de ubihidroquinona, reducción de citocromo c, transporte vectorial de protones
Citocromo c oxidasa (Complejo IV)	13 (3)	Oxidación de citocromo c, reducción de O ₂ , transporte vectorial de protones
ATP sintasa (Complejo V)	16(2)	Flujo invertido de protones, ATP sintasa

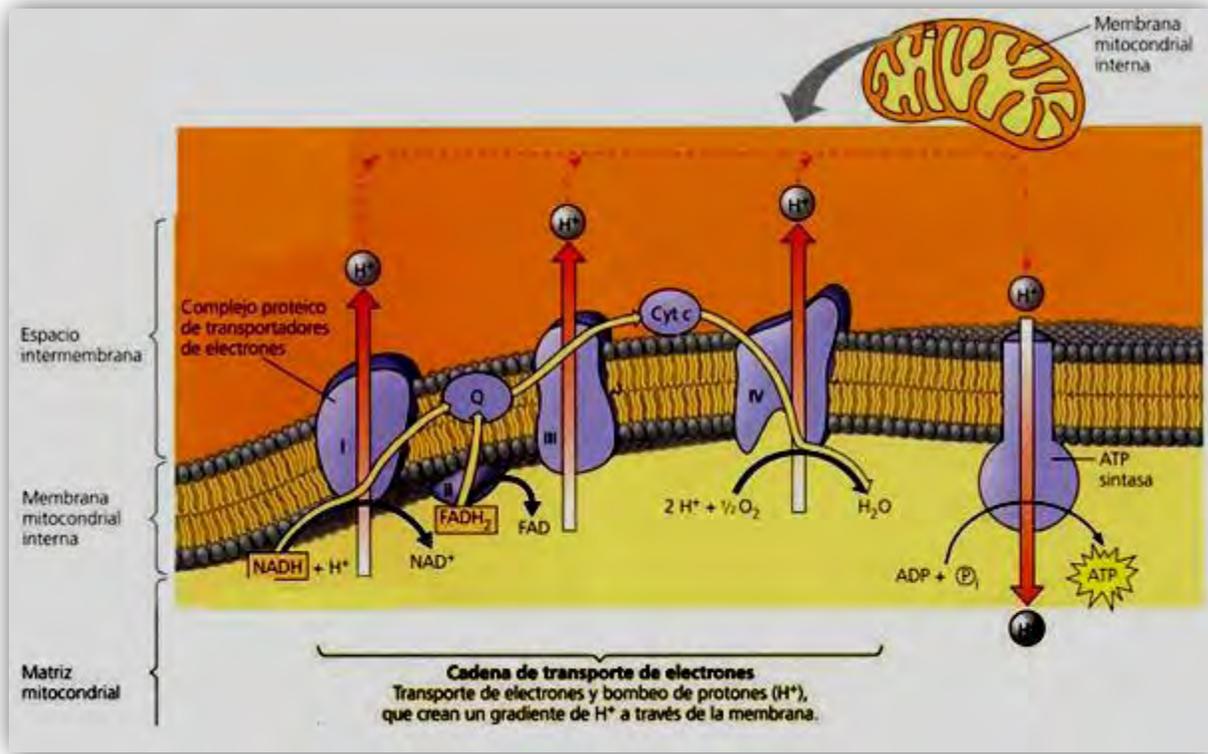


Figura 4. Cadena de transporte de electrones. Tomada de Campbell y Reece 2007.

Complejo I (COX I, NADH Deshidrogenasa o NADH: ubiquinonaoxidoreductasa)

Los transportadores de electrones en este complejo son flavinas, centros Fe-S y ubiquinonas. En conjunto, este complejo es el componente más grande de la cadena respiratoria, con cerca de 800-900 KDa; tiene forma de L, con el brazo largo como una proteína de membrana integral hidrofóbica, donde se encuentra la maquinaria de bombeo de protones, y el brazo corto constituido por un dominio globular hidrofílico situado en la matriz mitocondrial, que contiene la subunidad de unión al NADH y el centro activo de la enzima, constituido por una flavina y 9 centros Fe-S³¹. Este complejo cataliza la transferencia de dos electrones desde el NADH hasta el dominio de membrana donde se encuentran las quinonas. Así, la flavina acepta dos electrones simultáneamente del NADH y los transfiere, uno a uno, a los centros Fe-S. Estos, a su vez, reducen a quinol, la quinona, embebida en la membrana en dos pasos sucesivos de donación de un solo electrón³². Esta transferencia electrónica está acoplada al bombeo de cerca de cuatro protones a través de la membrana, ayudando a proporcionar la fuerza protón-motriz requerida para la síntesis de ATP³³. Este proceso supone cerca del 40% del gradiente de protones transmembrana generado en la oxidación del NADH por la cadena respiratoria mitocondrial³¹.



Complejo II (COX II Succinato Deshidrogenasa o Succinato- Ubiquinona Reductasa)

Está constituido por cuatro polipéptidos, codificados íntegramente en el ADN nuclear. Dos de las cuatro subunidades proteicas que lo componen conforman la enzima succinato deshidrogenasa, componente clave en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, mientras que las otras dos se encargan del anclaje de dicha enzima a la membrana. En su participación en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos interviene en la transferencia de electrones desde el succinato hasta el FAD, formando FADH₂, mientras que en su papel dentro de la cadena de transporte electrónico transfiere los electrones del FADH₂ a la ubiquinona³⁴.

Carece de sitio de acoplamiento energético. A diferencia del NAD⁺ que difunde libre en la matriz mitocondrial, el FAD no existe libre en disolución; por ello el complejo II contiene una molécula de FAD³⁴.

Complejo III (COX III, Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa o Complejo citocromo bc1)

El complejo III consta de once subunidades, tres de estas subunidades tienen función respiratoria (citocromo B, citocromo C1, proteína de Rieske) y poseen grupos prostéticos. La subunidad citocromo b alberga dos grupos hemo; el citocromo c tiene un grupo hemo, y el centro Fe-S (centro Rieske). Todos los elementos del complejo III están codificados por el ADN nuclear excepto el citocromo b, que lo está por el ADN mitocondrial³⁵.

Además, dentro del complejo III se ha propuesto un ciclo de transporte de electrones, denominado ciclo Q, donde coexisten distintas formas de la ubiquinona. Los detalles del proceso de transporte electrónico son complejos: el ubiquinol cede dos electrones, uno al centro Rieske que lo cede a su vez a un citocromo c para actuar como transportador hacia el complejo IV, mientras que el otro es reciclado a través del ciclo Q vía citocromos b₅₆₆ y b₅₆₀ y de semiquinonas³⁶. Este ciclo permite el bombeo de protones al citosol³⁷.

El complejo III utiliza la energía liberada por translocación vectorial de dos protones (H⁺/QH₂) de la matriz al espacio intermembrana, donde libera dos protones adicionales³⁸. Como se mencionó anteriormente, las formas semi-reducidas de ubiquinona participan en la transferencia de electrones / protones catalizada por el complejo III^{39,40}.



Complejo IV (COX IV o Citocromo c oxidasa)

Estructuralmente, el complejo IV es una proteína integral de membrana que incluye varios grupos prostéticos metálicos así como trece subunidades. De éstas, diez están codificadas por genes del genoma nuclear y tres del mitocondrial. El complejo posee dos grupos hemo, un citocromo a y otro a₃, así como dos centros de cobre (CuA y CuB). El citocromo a₃ y el CuB forman un centro binuclear en el cual se realiza la reducción tetravalente del oxígeno molecular produciendo agua³⁷.

Al igual que ocurre en los complejos I y III, la citocromo c oxidasa genera un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana asociado al transporte electrónico. Se ha encontrado que esta enzima, ampliamente distribuida en la naturaleza, es responsable del consumo de más del 90% del oxígeno en los organismos aerobios. Presenta gran afinidad por el oxígeno, por lo que se piensa que está adaptada a condiciones de escasez del mismo. Las unidades catalíticas del complejo están codificadas por el ADN mitocondrial, mientras que las estructurales lo están por el nuclear³⁷.

Los transportadores electrónicos y los complejos están organizados en “ensamblajes” con interacciones específicas proteína-proteína, que son efectivas para la transferencia rápida de electrones gracias a la limitación de las distancias intermoleculares entre ellas²⁹.

Complejo V (COX V, ATP sintasa o F1-F0-ATPasa)

La ATP sintasa también se reconoce como complejo V, y es una enzima multimonomérica que contiene 18 polipéptidos. Esta enzima no forma parte de la CTE como los cuatro complejos anteriores, sino se encuentra acoplada a ellos para llevar a cabo la fosforilación oxidativa; esto es, no realiza reacciones de óxido-reducción como el resto de los complejos, sino que utiliza la energía del gradiente electroquímico de protones generado por la CTE, para sintetizar ATP a partir de ADP.

Este complejo está formado por dos dominios funcionales, F1 y F0, conectados entre sí por otra subunidad. La estructura de la subunidad hidrofílica F1; fue resuelta en el año 1994 y está formada por cinco subunidades (a, b, d, g, e)⁴¹. En la subunidad que conecta los dos dominios funcionales y en F0, se encuentran las dos únicas subunidades codificadas por el genoma mitocondrial (ATPasa 6 y ATPasa 8). La subunidad F0 está inmersa en la membrana interna y funciona como poro de protones, transfiriendo la energía liberada por el flujo de protones hacia la subunidad catalítica F1, donde se forma el ATP. Se acepta un mecanismo motorrotatorio como forma a través de la cual la energía es transferida desde la bomba de protones (subunidad F0) a la subunidad catalítica (subunidad F1)⁴².

Uso de inhibidores de la CTE para el estudio de la función mitocondrial en astrocitos

En los últimos años ha habido un creciente interés en la caracterización de diversas patologías relacionadas con el SN. Para el estudio de estos padecimientos a nivel experimental se ha implementado el uso de modelos neurotóxicos en roedores y en primates no humanos tanto *In vivo* como *In vitro*. Un hecho interesante es que las neurotoxinas usadas para generar estos modelos experimentales tienen como mecanismo de acción la inhibición de la CTE, principalmente de los complejos I y II.

Algunos inhibidores de la CTE descritos son: rotenona y 6-hidroxidopamina (inhibidores de complejo I); ácido 3-nitropropiónico y malonato (inhibidores de complejo II). La administración de estos compuestos *In vivo* reproduce algunas características bioquímicas descritas en la enfermedad de Parkinson (EP: rotenona y 6-hidroxidopamina) o la enfermedad de Huntington (EH: ácido 3-nitropropiónico, malonato)^{21,43,44}.

La rotenona es un isoflavonoide sintetizado por plantas tropicales de los géneros *Derris*, *Lonchocarpus* y *Tephrosia*^{45,46}. Es una molécula hidrofóbica, que atraviesa la membrana celular y funciona como un inhibidor no competitivo del complejo I, afectando la producción de ATP²¹. Se ha demostrado que la administración sistémica continua de rotenona a ratas y ratones, causa síntomas similares a los de EP, incluyendo la degeneración selectiva del sistema dopaminérgico nigroestriatal (incluyendo las fibras del cuerpo estriado y neuronas), la activación de la astrogliosis y la microglia, así como trastornos del movimiento de los animales^{43,47-50}. Recientemente se reportó que la administración de rotenona a concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 μM a células de astroglioma C6, incrementa significativamente la expresión de GFAP y disminuye su viabilidad; lo cual es dependiente de la concentración y el tiempo de exposición de las células al compuesto neurotóxico. Además se incrementó la generación de especies reactivas de oxígeno, se alteró la función mitocondrial y se generaron daños en el ADN, en comparación con su control⁵¹.

La 6-hidroxidopamina (6-OHDA) también conocida como oxidopamina o 2,4,5-trihidroxipenilamina, es un compuesto neurotóxico orgánico sintético utilizado en el desarrollo de modelos experimentales de EP en roedores⁵². Se ha evaluado el efecto de la administración de este neurotóxico en células de astroglioma C6, en donde se determinó una disminución de la viabilidad de estas células y un incremento en la expresión de GFAP. Además de una disminución de la actividad de deshidrogenasas mitocondriales, en el potencial de membrana de la mitocodria, aumento de especies reactivas de oxígeno, condensación de la cromatina y daño al DNA. Los resultados mostraron que el tratamiento con 6-OHDA indujo muerte mediada por la disfunción mitocondrial de las células de glioma estudiadas⁵³.

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es una toxina producida por plantas del género *Indigofera* y algunos hongos de los géneros *Astragalus* y *Aspergillus*, la cual inhibe de manera irreversible a la enzima succinato deshidrogenasa del complejo II de la CTE. Esta enzima es responsable de la oxidación de succinato a fumarato y su inhibición conduce a la reducción de la síntesis de ATP, incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte neuronal. La ingesta accidental de 3-NP produce degeneración preferencial del putamen, núcleo caudado, corteza cerebral e hipocampo en humanos, lo cual se relaciona con la presencia de movimientos anormales y deterioro cognitivo. Esto es la base del uso de esta sustancia para generar un modelo experimental de EH en roedores⁵⁴.

El malonato es otro inhibidor selectivo de la enzima succinato deshidrogenasa que a diferencia del 3-NP, no cruza la barrera hematoencefálica, pero que también ha sido utilizado para generar un modelo experimental de EH al administrarlo en forma intraestriatal en roedores⁵⁵.

Importancia de la mitocondria en los astrocitos

En las células del SN, hay dos rutas para la producción energética: glucólisis y fosforilación oxidativa. La tasa y la velocidad de producción de ATP pueden variar considerablemente entre estas vías:

1. La glucólisis se lleva a cabo en el citoplasma, no consume oxígeno y sólo produce dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.
2. La fosforilación oxidativa está vinculada con el ciclo de los ácidos tricarbónicos y produce de 28 a 30 ATP por molécula de glucosa, usando oxígeno como aceptor final de electrones.

Se ha estimado que la energía requerida por los astrocitos es menor a la de las neuronas, y que aproximadamente 80% de la energía en astrocitos se obtiene a través de la glucólisis, mientras que solo el 20% es generado mediante fosforilación oxidativa²².

El estudio de la producción energética mediante fosforilación oxidativa en astrocitos es un campo poco estudiado y se ha destacado principalmente la producción energética en la glucólisis, por lo que aún no se conocen muchos detalles de la dinámica mitocondrial de los astrocitos. Esto es de suma importancia, ya que se han caracterizado algunas patologías en las cuales el disfuncionamiento mitocondrial es evidente en células gliales, tal es el caso de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), en donde se ha demostrado que existe una mutación en la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), que trae como consecuencia disfunción mitocondrial y alteración en la producción energética²².



También se ha propuesto que en la enfermedad de Alzheimer (EA), su origen podría estar relacionado con la alteración del funcionamiento mitocondrial. En este contexto, los estudios realizados en pacientes con EA y en modelos murinos han destacado la alteración de varios genes implicados en la glucólisis, ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. De acuerdo con estos hallazgos, esta patología está estrechamente relacionada con la disfunción en la regulación del metabolismo energético, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteraciones estructurales en la mitocondria²².



JUSTIFICACIÓN

Los astrocitos son las células no neuronales más abundantes y diversas del SNC, y tienen un papel central para mantener su homeostasis. Sin embargo, no han sido tan extensamente estudiadas como las neuronas. Para estudiar las características de los astrocitos, éstos se aíslan principalmente de ratas neonatas, sin embargo, el aislarlos de ratas adultas podría ser una herramienta más apropiada para estudiar características de la neurodegeneración, ya que ésta se presenta principalmente en edad adulta. Además, ya que el metabolismo de los astrocitos se considera principalmente glucolítico, aún no se estudian muchos detalles de su metabolismo y dinámica mitocondrial. Se ha reportado que varias patologías del SNC están relacionadas con la disfunción mitocondrial, lo que hace relevante el estudio de este organelo celular en todas las células que conforman el tejido nervioso.



HIPÓTESIS

Al lograr el aislamiento de astrocitos de rata adulta, se le podrá cuantificar la actividad enzimática a los complejos I a IV de la CTE, y se logrará la detección de una proteína de cada complejo. Además, al tratarlos con inhibidores de complejo I (rotenona, 6-OHDA) y complejo II (3-NP, ácido malónico), se espera encontrar una disminución de la viabilidad celular.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de aislamiento de astrocitos a partir de rata adulta, para determinar la actividad y concentración de proteína de los complejos de la CTE, así como el efecto de la administración de algunos inhibidores de CI (rotenona, 6-OHDA) y CII (3-NP, ácido malónico) sobre la viabilidad celular.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones que permitan aislar y cultivar astrocitos de diferentes regiones cerebrales (estriado, corteza e hipocampo) de ratas adultas.
- Confirmar la identidad de las células aisladas, a través de la inmunodetección de la proteína de filamentos intermedios GFAP.
- Realizar la inmunodetección de las siguientes proteínas de la CTE: complejo I: NDUFB8 (20kD), complejo II: SDHB (30 kD), complejo III: Core protein 2 (48 kD), complejo IV: MTCO1 (40kD) y complejo V: ATPSA (55 kD).
- Determinar la actividad enzimática de los complejos mitocondriales (I-IV).
- Evaluar la viabilidad celular de los astrocitos aislados tratados con cuatro compuestos tóxicos con la capacidad de inhibir los complejos I o II de la CTE: rotenona, ácido 3-nitropropiónico, 6-hidroxidopamina y ácido malónico.



MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar macho, de 250-300 g, mantenidas en condiciones controladas de luz-oscuridad (12 h/12 h), con libre acceso al agua y alimento, provenientes del bioterio del INNN. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo en estos animales de experimentación, se apegaron a la norma oficial mexicana NOM 062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

Reactivos y equipo véase Anexo I.

Cultivo celular

En la primera etapa de este trabajo, se establecieron las condiciones de aislamiento y cultivo de astrocitos de corteza, hipocampo y estriado de rata adulta.

Cada cultivo se realizó con lotes de tres ratas Wistar, se sacrificaron por decapitación y se les extrajo el cerebro, el tejido se mantuvo en Hepes Buffered Tyrode’s Solution 1x (HBTS) con rojo fenol, se retiraron las meninges y se realizó la disección de cada una de las regiones de interés (corteza prefrontal, hipocampo y cuerpo estriado). Posteriormente el tejido se cortó en cubos pequeños (1 mm) y el tejido se transfirió a un tubo cónico (para cada región), con tripsina al 0.05%, DNasa al 0.003% en HBTS con rojo fenol, durante 15 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se procedió a la trituración mecánica de cada una de las regiones con pipeta Pasteur sin introducir burbujas. Posteriormente se añadió HBTS a cada tubo y se centrifugó a 2000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se añadió la papaína (20 U/ml) con cisteína al 0.02% en HBTS, con la cual se incubó durante 25 minutos a 37°C. Se disgregó nuevamente con pipeta Pasteur y se añadió albúmina sérica bovina (BSA) (500 mg/ml) con DNasa (4 mg/ml) en HBTS con rojo fenol, y se centrifugó a 2000 rpm durante un minuto, se procedió a dar 4 lavados más con HTBS centrifugando bajo estas mismas condiciones y desechando el sobrenadante. Finalmente se resuspendió en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se sembraron en frascos de 75 cm³ pretratados con PDL.

Las células se mantuvieron en cultivo durante 23 días, con cambio de medio de cultivo dos veces a la semana. Transcurrido este tiempo se realizó la purificación del cultivo mediante agitación en un agitador orbital, a 180 rpm a 37°C durante toda la noche y se preparó un subcultivo de estas células. Los experimentos realizados se esquematizan en la figura 5.

Diseño experimental

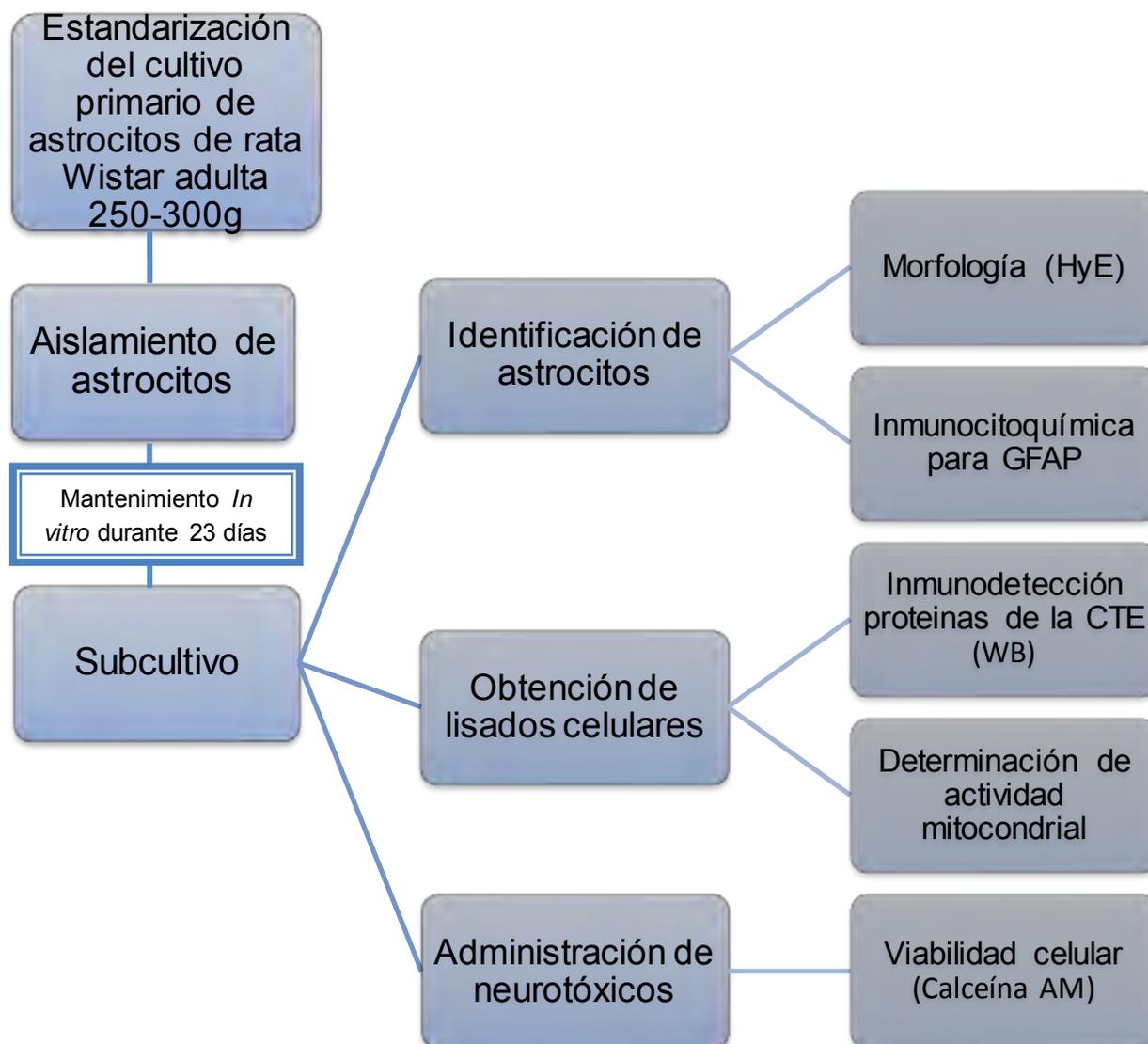


Figura 5. Esquema del diseño experimental

Preparación de lisado celular

Las células se lisaron con buffer de fosfatos de potasio con tritón al 0.1% con inhibidores de proteasas (bestatina, pepstatina y PMSF). Los lisados se almacenaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

Hematoxilina-Eosina (HyE)

Los astrocitos se colocaron en cubreobjetos de 1 cm de diámetro pretratados con PDL. Se fijaron con PFA 4% durante 20 minutos a 4°C, se permeabilizaron con etanol 80% durante 5 minutos y se mantuvieron en hematoxilina durante 60 minutos. Se lavaron con agua destilada se sumergieron rápidamente en agua amoniacal, se lavaron nuevamente con agua destilada. Se sumergieron en eosina durante 20 minutos. Se lavaron con agua destilada. Los cubreobjetos fueron montados con medio de montaje. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio óptico.

Inmunocitoquímica

Los astrocitos se sembraron en cubreobjetos de 1 cm de diámetro pretratados con PDL. Se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos en agitación suave a temperatura ambiente y se permeabilizaron con tritón 1% en PBS, se bloquearon las uniones inespecíficas con BSA al 2% en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFAP durante toda la noche. Se lavaron con PBS y se siguieron las instrucciones del fabricante del kit para inmunocitoquímica ABC STAINING SYSTEM. Posteriormente las muestras se montaron en portaobjetos para observación y captura de imágenes.

Inmunodetección de proteínas por Western Blot

Se determinó la presencia de una subunidad de cada complejo de la fosforilación oxidativa: complejo I, NDUF8 de 20kD; complejo II, SDHB de 30 kD; complejo III, Core protein 2 de 48 kD; complejo IV, MTCO1 de 40kD y complejo V, ATP5A de 55 kD. Para esto, se empleó el coctel de anticuerpos MitoProfile® Total OXPHOS WB Antibody Cocktail. Se utilizaron 25 µg de proteína por muestra, que se separó mediante electroforesis SDS-PAGE y se transfirió a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon durante 2 h con BSA al 5%. Después, se incubaron durante 12 h a 4°C con el coctel de anticuerpos. Después de lavar este anticuerpo, las membranas se incubaron durante 1.5 h con anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano. Las bandas reactivas se visualizaron mediante un sistema de detección quimioluminiscente

Actividad de los complejos de la CTE

Se realizó la determinación de la actividad de cada complejo de la CTE en lisados celulares, en los cuales se cuantificó la concentración de proteína y se empleó una mezcla de reacción específica para la determinación de cada complejo. Estas mediciones se realizaron según métodos previamente usados en el laboratorio de NMyC del INNN⁵⁶, como se describe en la tabla IV.

Tabla IV. Condiciones en las que se determinó la actividad de los complejos de la CTE

Complejo	Aceptor/ donador de electrones	Mezcla de reacción	Inicio de la reacción	Absorbancia/ tiempo
I	DCPIP	ASB 3 mg/ml, NADH 60 μ M, KCN 2 mM, antimicina A 2 μ M, y decilubiquinona 60 μ M en amortiguador de fosfato de potasio 10 mM	Adición de lisado celular (~20 μ g de proteína).	La reducción de DCPIP se registró a 600 nm por 3 minutos
II	DCPIP	Succinato 20 mM, antimicina A 2 μ M, rotenona 5 μ M, KCN 2 mM y DCPIP 50 μ M	Adición de decilubiquinon a 50 μ M.	La reducción de DCPIP se registró a 600 nm por 3 minutos.
III	Citocromo c oxidado	Solución de citocromo C oxidado 75 μ M, KCN 500 μ M, EDTA 100 μ M, tween 20 0.025% y amortiguador de fosfatos 25 mM	Adición de decilubiquinol 100 μ M.	La reducción de citocromo c se registró a 550 nm
IV	Citocromo c reducido	Solución de citocromo C reducido 60 μ M	Adición de lisado celular (~20 μ g de proteína).	La oxidación de citocromo c se registró a 550 nm

Viabilidad Celular

Esta prueba se basa en la determinación de células vivas mediante la administración de calceína AM. Esta sonda no es fluorescente, penetra en células vivas y se convierte por la actividad de esterasas intracelulares en el colorante polianiónico calceína, que es retenido por las células vivas y emite fluorescencia intensa que se detecta en verde (exc./em.~495nm/~515nm). Los astrocitos se sembraron en cajas de 24 pozos pretratadas con PDL, y posteriormente se administraron los diferentes neurotóxicos durante 24 horas: rotenona ó 6-hidroxi-dopamina como inhibidores de Complejo I (0, 1, 10 y 100 μ M). Como inhibidores de complejo II, se emplearon 3-NP o ácido malónico (0, 0.1, 1 y 10 mM). Las células se lavaron y se incubaron con calceína AM durante 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron nuevamente y se midió la fluorescencia emitida por las células en un lector de placas multimodal (Sinergy HT, Biotek).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm eem. Se analizaron con el software Prism 5.1 (GraphPad) por ANOVA seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. Las diferencias se consideraron significativas a valores iguales o menores a $p < 0.05$.

RESULTADOS

Hematoxilina y eosina (H&E)

Para confirmar la identidad de las células aisladas, la primera parte consistió en determinar la morfología mediante una tinción de hematoxilina y eosina. Bajo condiciones normales, en cultivos primarios, los astrocitos presentan una forma que va de poligonal a fusiforme, lo cual es notable en las tinciones presentadas en la Figura 8. No se observaron alteraciones morfológicas durante el periodo en cultivo.

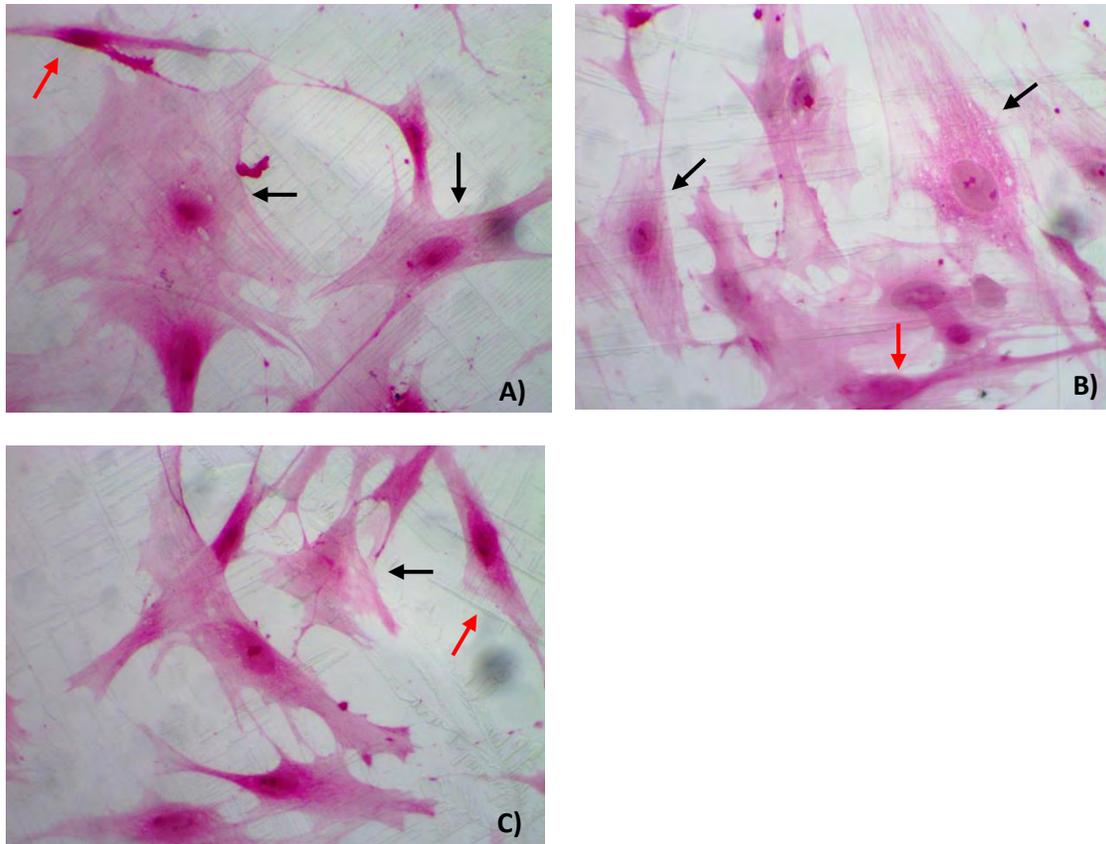


Figura 8. Bajo condiciones de cultivo estándar, los astrocitos aislados de animales adultos presentan una morfología poligonal o fusiforme, tinción hematoxilina-eosina. A) astrocitos corticales (400x), B) astrocitos de cuerpo estriado (400x) y C) astrocitos de hipocampo (400x). Flecha negra= astrocito poligonal, flecha roja= astrocito fusiforme.

Inmunocitoquímica

La segunda etapa para la identificación de las células aisladas fue a través del marcaje de éstas, mediante inmunocitoquímica con un anticuerpo específico para la proteína GFAP, en las fotografías que se presentan en la figura 9, es notable la expresión de dicha proteína en las células aisladas, lo cual sugiere que las células obtenidas son astrocitos.

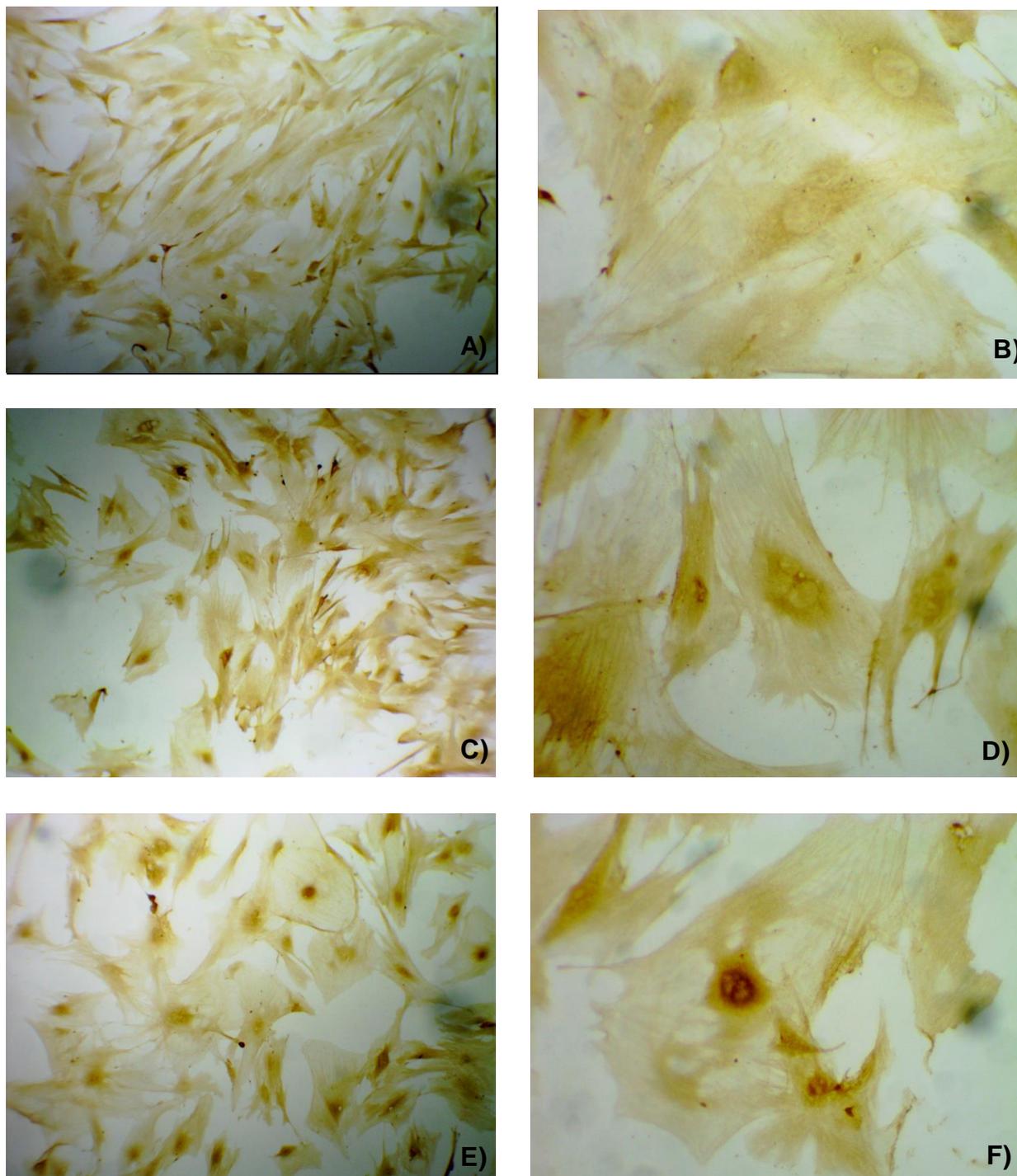


Figura 9. Inmunocitoquímica en astrocitos aislados de ratas adultas. Las células marcadas en color café son positivas a la expresión de GFAP. A) Astrocitos corticales 100x, B) astrocitos corticales 400X, c) astrocitos de hipocampo 100X, d) astrocitos hipocampo 400x, e) astrocitos estriado 100X, f) astrocitos estriado 400x.

Inmunodetección de proteínas por Western Blot

Se determinó la presencia de una subunidad de cada complejo de la cadena respiratoria en lisados totales de las células aisladas de corteza, estriado e hipocampo de cerebros de ratas Wistar adultas. Se empleó como control positivo un lisado total de neuronas aisladas de cerebelo de ratas Wistar de 7 días de edad. Como se observa en la figura 10, las subunidades MTCO1 (CIV), SDHB (CII) y NDUFB8 (CI) no se lograron detectar en ninguno de los lisados celulares de astrocitos. Sin embargo, las subunidades UQCRC2 (CIII) y ATP5A (CV) están presentes para todas las regiones.

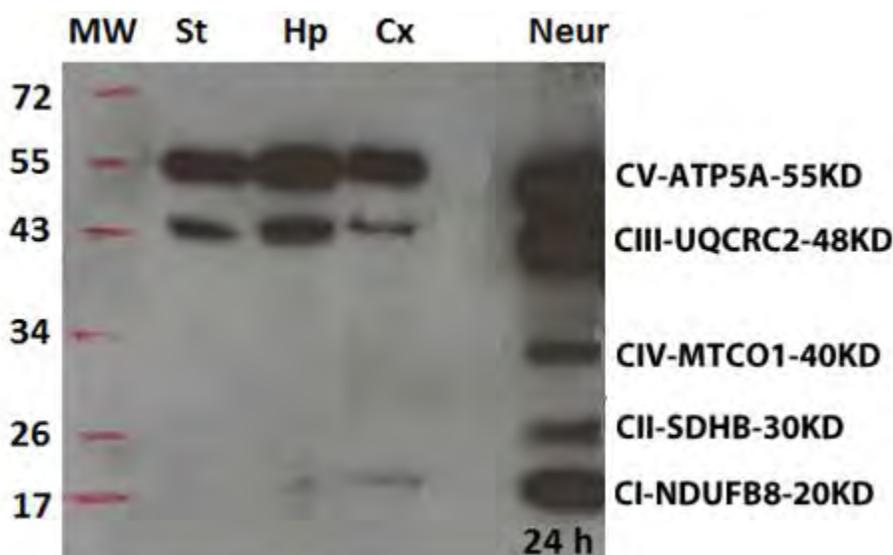


Figura 10. Expresión de las respectivas subunidades de los cinco complejos de la cadena respiratoria, en astrocitos aislados de ratas Wistar adultas. MW= marcador de peso molecular, St= lisado total de células de cuerpo estriado, Hp= lisado total de células de hipocampo, Cx= lisado total de células de corteza cerebral. Como control positivo se empleó el lisado de neuronas aisladas de cerebelo de ratas Wistar de 7 días de edad (Neur).

Determinación de actividad de los complejos mitocondriales de la CTE

En los astrocitos aislados de ratas adultas se detectó la actividad del CI, en promedio para los astrocitos corticales, se obtuvo una actividad de 2.1 nmol/min/mg proteína; para los astrocitos aislados de hipocampo la actividad de este complejo oscilo en 2.9 nmol/min/mg proteína y finalmente la actividad para los astrocitos aislados de cuerpo estriado fue de 3.0 nmol/min/mg proteína, como se presenta en la figura 11.

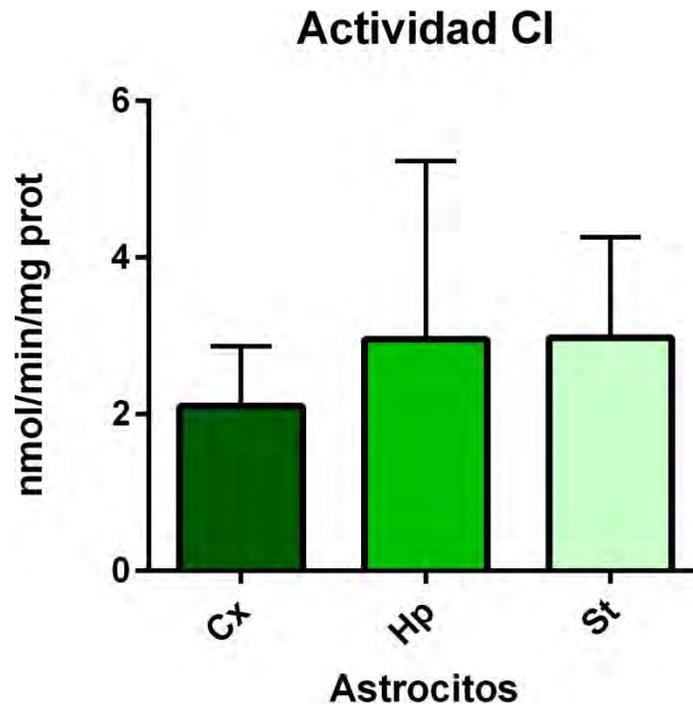


Figura 11. Determinación de la actividad de CI en los astrocitos aislados de corteza, hipocampo y estriado de cerebros de ratas adultas. Los resultados son expresados como media \pm eem. n=4.

La actividad del CII no fue detectada en los astrocitos de ninguna de las tres regiones estudiadas. Sin embargo, el control positivo usado (mitocondrias aisladas de corteza cerebral de ratas adultas), para este complejo, presentó una actividad de 50.6 nmol/min/mg proteína.

En cuanto a la detección de la actividad del CIII, para astrocitos corticales se determinó una actividad promedio de 2.0 nmol/min/mg proteína; para los astrocitos aislados de hipocampo la actividad de este complejo fue de 1.4 nmol/min/mg proteína y finalmente la actividad para los astrocitos aislados de cuerpo estriado fue de 1.0 nmol/min/mg proteína (figura 12).

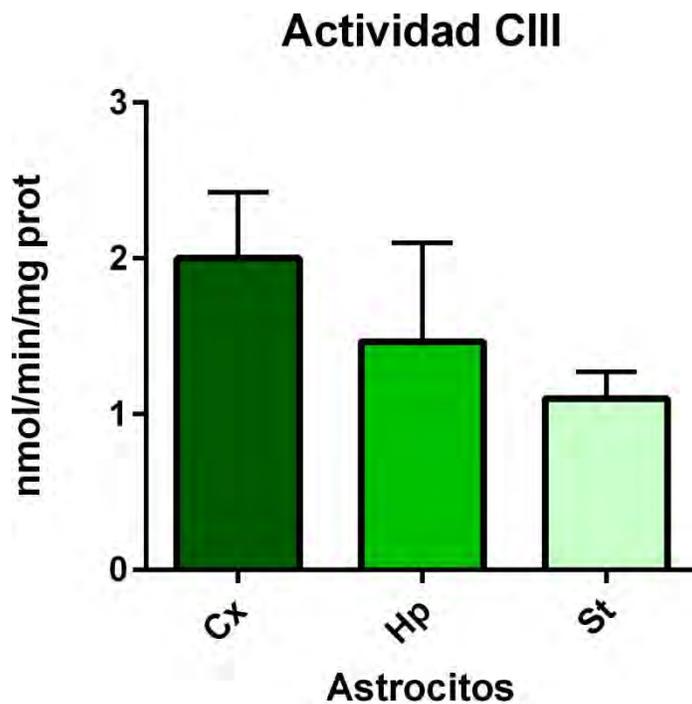


Figura 12. Determinación de la actividad de CIII en los astrocitos aislados de corteza, hipocampo y estriado de cerebros de ratas adultas. Los resultados son expresados como media \pm eem. n=3.

En los astrocitos aislados de corteza, durante la determinación de la actividad de complejo IV, se detectó en promedio una actividad de 3.5 nmol/min/mg proteína; para los astrocitos aislados de hipocampo la actividad de este complejo oscilo en 1.1 nmol/min/mg proteína y finalmente la actividad para los astrocitos aislados de cuerpo estriado fue de 1.7 nmol/min/mg proteína, como se presenta en la figura 13.

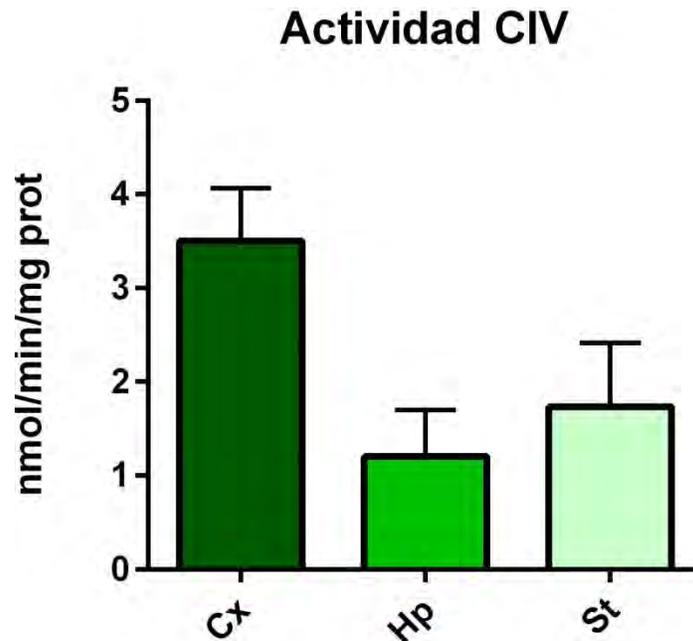


Figura 13. Determinación de la actividad de CIII en los astrocitos aislados de corteza, hipocampo y estriado de cerebros de ratas adultas. Los resultados son expresados como media \pm eem. n=3.

Viabilidad celular

En los astrocitos corticales tratados con rotenona, existe una disminución del 35% de células viables a la concentración de 10 μ M, en comparación con el control, como se observa en la figura 14a. En las células corticales tratadas con 6-OHDA no existen cambios entre el control y las tres concentraciones administradas del neurotóxico (figura 14b).

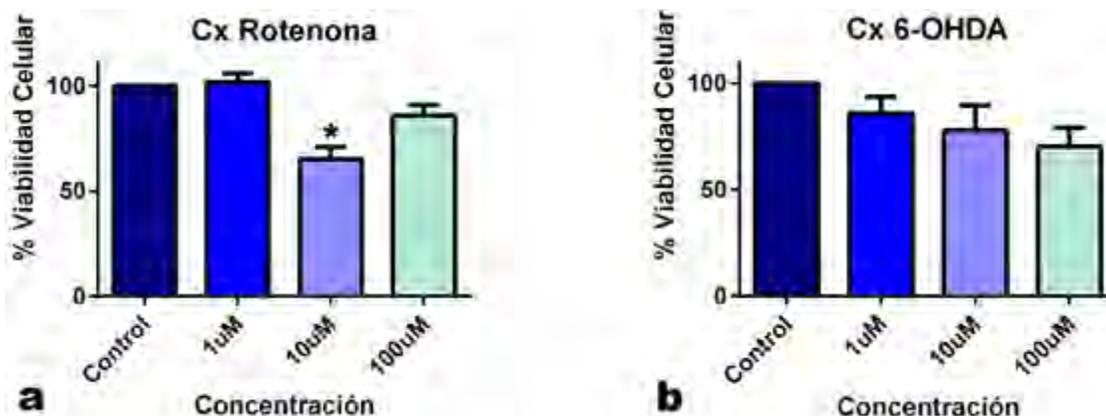


Figura 14. Administración de neurotóxicos inhibidores de CI en astrocitos aislados de corteza de ratas Wistar adultas. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de Dunnet), $n = 4$. Cx= corteza, 6-OHDA= 6 hidroxidopamina.

En las células tratadas con 3-NP la viabilidad celular disminuyó en 12%, 24% y 37% para las concentraciones 0.1 mM, 1 mM y 10 mM, respectivamente (figura 15a). En los astrocitos corticales tratados con ácido malónico, los porcentajes de viabilidad celular disminuyeron en 19%, 33% y 42% con respecto al incremento de la dosis del neurotóxico administrado (figura 15b).

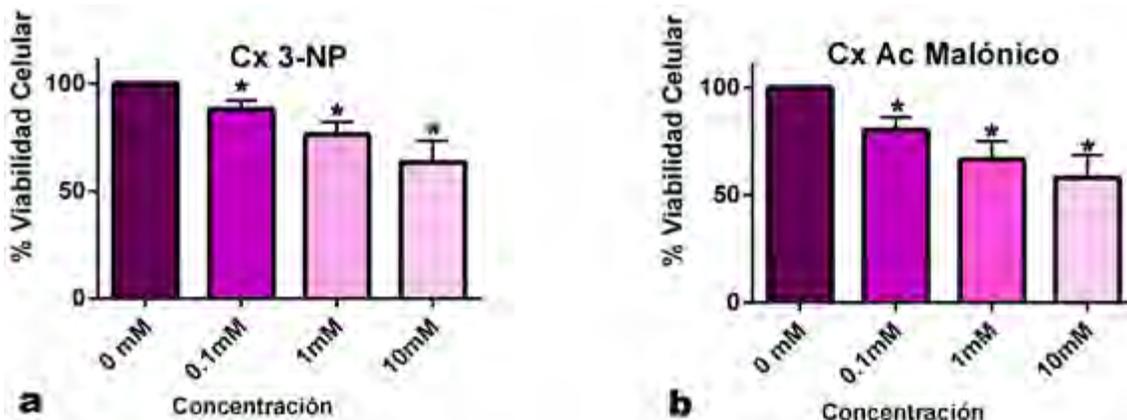


Figura 15. Administración de neurotóxicos inhibidores del CII en astrocitos corticales. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de Dunnet), $n = 3$. Cx= corteza, 3-NP= ácido 3-nitropropiónico, Ác. Malónico= ácido malónico.

En los astrocitos de hipocampo tratados con rotenona y 6-OHDA, no hubo cambios en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones administradas (figura 16a, b).

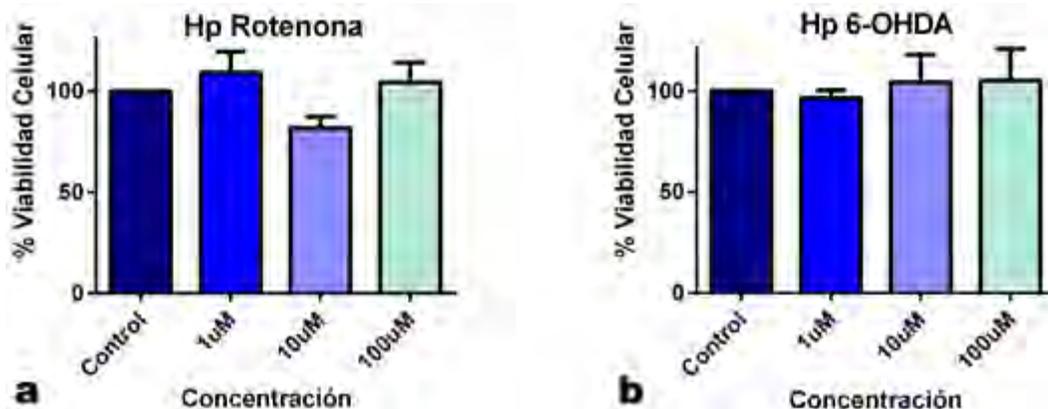


Figura 16. Administración de neurotóxicos inhibidores de CI en astrocitos aislados de hipocampo de ratas Wistar adultas. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de Dunnet), $n = 4$. Hp= hipocampo, 6-OHDA= 6 hidroxidopamina.

En la figura 17a, se observa que los astrocitos de hipocampo presentaron una disminución del 22% en su viabilidad en la concentración de 1 mM y del 30% en la concentración de 10 mM por la administración de 3-NP, con respecto al control. Hubo una disminución del 24% y del 21% en la viabilidad de estas células a las concentraciones de 1 mM y 10 mM de ácido malónico, respectivamente (figura 17b).

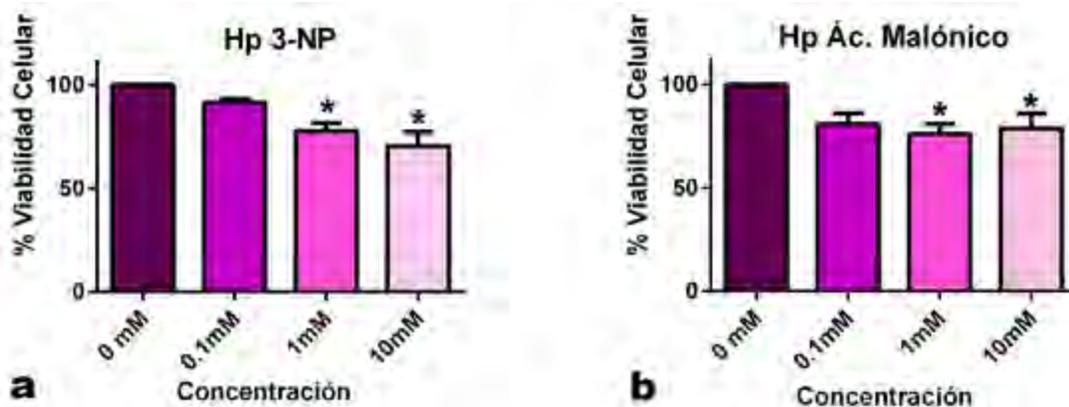


Figura 17. Administración de neurotóxicos inhibidores de CII en astrocitos aislados de hipocampo de ratas Wistar adultas. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de Dunnet), $n = 4$. Hp=hipocampo, 3-NP= ácido 3-nitropropiónico, Ác. Malónico= ácido malónico.

Al tratar con rotenona los astrocitos de cuerpo estriado, hubo una disminución del 26% en la viabilidad celular a la concentración de 10 μ M (figura 18a). Los astrocitos administrados con 6-OHDA no presentaron cambios en la viabilidad en ninguna de las concentraciones administradas (figura 18b).

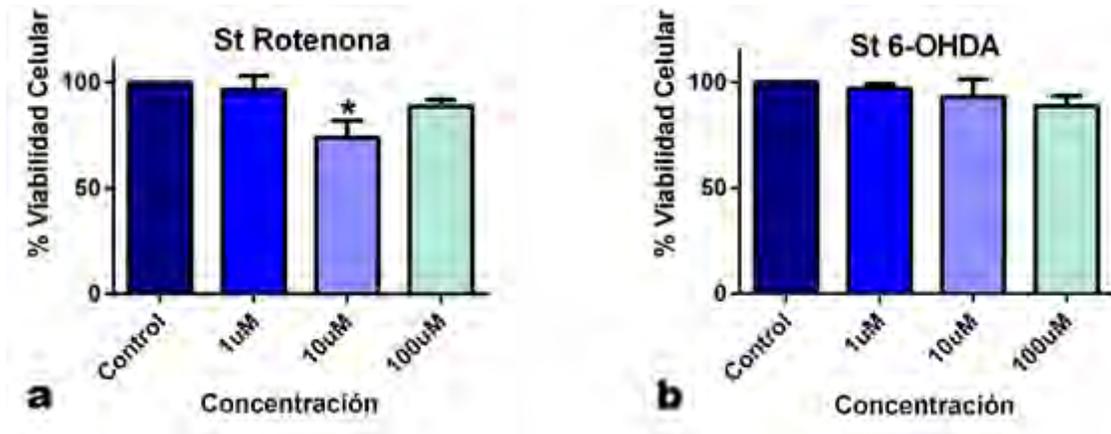


Figura 18. Administración de neurotóxicos inhibidores de CI en astrocitos aislados de cuerpo estriado de ratas Wistar adultas. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de Dunnet), $n = 4$, St= cuerpo estriado, 6-OHDA= 6 hidroxidopamina.

Los astrocitos de estriado tratados con 3-NP disminuyeron su viabilidad un 30% únicamente a la concentración de 10 mM (figura 19a). Cuando se les administro ácido malónico, las células no presentaron cambios en su viabilidad a ninguna de las concentraciones de empleadas (figura 19b).

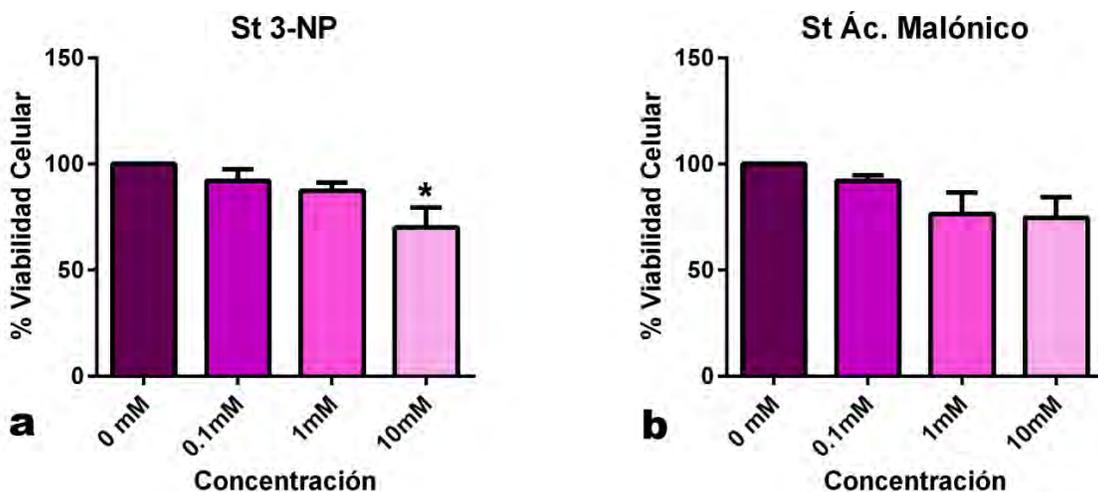


Figura 19. Administración de neurotóxicos inhibidores de CII en astrocitos aislados de hipocampo de ratas Wistar adultas. * $p < 0.05$ vs control (ANOVA de una sola vía seguida de la prueba de Dunnet), $n = 4$. St= cuerpo estriado, 3-NP= ácido 3-nitropropiónico, Ác. Malónico= ácido malónico.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muchos de los protocolos reportados en la literatura para el aislamiento de astrogliá derivan del trabajo de Booher y Sensenbrenner (1972), o de la modificación posterior realizada por McCarthy y de Vellis (1980). Estos protocolos se han enfocado principalmente al aislamiento de glía en animales neonatos¹²⁻¹⁴. Los astrocitos en cultivo de cerebro adulto podrían representar una herramienta importante para la comprensión de las funciones gliales; por ejemplo, muchos estudios utilizan células aisladas de ratas neonatas como modelos de envejecimiento, a pesar de su plasticidad y labilidad a los estímulos. Nuestro modelo de cultivo celular puede tener un perfil más similar al cerebro adulto, lo que sería útil para futuros estudios de envejecimiento⁵.

No es recomendable basarse en métodos de aislamiento de glía caracterizados en neonatos para el diseño de un protocolo en adultos, debido a que las diferencias entre la constitución de ambos tejidos es notable: en el caso de animales adultos, se presentan diferentes poblaciones celulares: células ependimales, neuronas, fibroblastos, células endoteliales, oligodendrocitos, microglía, entre otras¹⁵; y en el caso de animales neonatos el tejido cerebral esta principalmente constituido por células indiferenciadas (NG2, OPC, etc.)^{57,58}. Por otra parte, en el adulto, el contenido lipídico (mielina) presente en el encéfalo es alto, debido a que los oligodendrocitos en la mayoría de las regiones cerebrales se encuentran diferenciados y expresan una cantidad de vainas de mielina en sus procesos para la protección de las neuronas⁵⁸.

Es importante destacar que los astrocitos aislados de cerebros de ratas neonatas tienen un perfil de expresión génica que difiere significativamente de los aislados el día postnatal 7 ó 16⁵⁹ y de adultos⁶⁰; por lo que estas células en presencia de un mismo estímulo pueden responder de manera diferente, en cuanto a expresión de proteínas, metabolismo o bien, ante la aplicación de un fármaco determinado, lo cual dependería directamente de la edad del animal del que se realizó el aislamiento de estas células. Por estas razones, en este trabajo se diseñó un nuevo protocolo que permite obtener cultivos primarios de astrocitos aislados de diferentes regiones cerebrales de ratas Wistar adultas (90 días de edad).

Es importante mencionar, que los protocolos reportados en la literatura para el aislamiento de astrocitos de ratas adultas son escasos, y además omiten información indispensable en el establecimiento de un método para el aislamiento de este tipo de células, es por esto que se emplearon y descartaron diversos pasos en el diseño de este método^{5,61,62}.



Las células aisladas fueron caracterizadas como astrocitos, debido a que presentaron una morfología similar con la caracterizada en condiciones normales *in vitro*, las cuales presentaron una morfología poligonal o fusiforme⁵, y se comprobó por inmunocitoquímica que fueron positivas a GFAP^{9,13,61}.

Mediante WB, no se detectó la presencia de la subunidad MTCO1 perteneciente al CIV, cuya función es catalizar la reducción del oxígeno a agua (subunidad catalítica de citocromo C oxidasa); tampoco se detectó la expresión de la subunidad SDHB del CII, la cual participa en dos vías importantes de la producción energética: el ciclo del ácido cítrico (o ciclo de Krebs) convierte el succinato a fumarato y en la fosforilación oxidativa; en donde funciona como un sitio de unión para los electrones a medida que se transfieren en la CTE⁶³. La expresión de NDUFB8, subunidad del CI, se detectó solo para los lisados de astrocitos corticales y de hipocampo, esta subunidad es un polipéptido que contiene un átomo de Fe y está implicada en la transferencia electrónica en la CTE⁶⁴.

Con base en lo anterior, es importante destacar que en el control positivo empleado (neuronas aisladas de cerebelo de ratas Wistar de 7 días de edad), se detectó la expresión de las cinco subunidades de la cadena respiratoria, y a su vez existen reportes en la literatura en otros tipos celulares de roedores adultos (células de músculo esquelético o cardíaco) en donde la expresión de las cinco subunidades es indiscutible⁶⁵⁻⁶⁷. Estos datos son interesantes en contraste con nuestros resultados, dado que, bajo las condiciones en las que se mantuvieron los astrocitos aislados en este trabajo, no se determinó la presencia de dichas subunidades, lo cual podría sugerir, que en los astrocitos aislados de ratas adultas existe una isoforma diferente de estas subunidades, y la producción energética de los astrocitos vía fosforilación oxidativa es diferente a las células musculares o a las neuronas en las que se han detectado; además, también puede proponerse que estas subunidades no están presentes en este tipo de células, dado que su metabolismo es principalmente glucolítico²².

Además, estos resultados pueden correlacionarse con los datos obtenidos por nuestro equipo de trabajo (datos no publicados), en donde se evaluó la expresión de estas subunidades en astrocitos aislados de ratas neonatas, y en las cuales, no se detectó la expresión de la subunidad MTCO1, sin embargo, el resto de las subunidades sí fueron detectadas. Este resultado, sugiere que la expresión de las subunidades SDHB (no detectada) y NDUFB8 (baja expresión) en el caso de animales adultos, podría variar en función de la edad del organismo de acuerdo a lo previamente reportado, en cuanto a diferencias en el perfil de expresión génica en astrocitos aislados de ratas de diferentes edades^{59,60}.



En el caso de la subunidad MTCO1, que no fue detectada en astrocitos de neonatos ni de adultos, podría reforzar la idea de que dicha subunidad presenta una isoforma diferente que no está acoplada al anticuerpo empleado, o bien, podría ser que las condiciones *in vitro* que fueron empleadas en este trabajo, modificaron las características génicas de los astrocitos aislados⁶¹. Por lo tanto, sería interesante emplear técnicas de PCR y secuenciación de estas subunidades para determinar, si están presentes en astrocitos adultos y determinar si el metabolismo energético vía fosforilación oxidativa es diferente en astrocitos.

Por otra parte, en la medición de la actividad de los complejos en condiciones normales, se determinó actividad en los complejos I, III y IV; sin embargo, no fue posible detectar la presencia de actividad en el CII, lo cual a su vez, puede relacionarse con la ausencia de expresión de la subunidad SDHB, correspondiente a este complejo, la que no fue detectada en el WB. Dada la escasez de estudios detallados relacionados con actividad de los complejos mitocondriales de la CTE de astrocitos, no podemos relacionar estos datos con la literatura. Sin embargo, estos resultados pueden compararse con los datos obtenidos por nuestro laboratorio (datos no publicados), en donde en astrocitos aislados de cerebros de ratas neonatas, no fue detectada la actividad de CII, a pesar de haber detectado la SDBH por WB, lo cual podría sugerir que en los astrocitos mantenidos *in vitro* no existe producción energética vía CII, y que además la expresión de SDBH se pierde con la edad del organismo.

En el análisis de WB no se detectó la presencia de la subunidad MTCO1, correspondiente al CIV; sin embargo, la actividad de este complejo si fue detectada; a diferencia del CII, esto sugiere que este complejo funciona en condiciones distintas en estas células en particular. Por este motivo, es necesario investigar su funcionamiento tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar si esta tendencia es similar y dilucidar si este efecto es extrapolable en estos dos modelos de estudio, con lo cual se ampliaría el campo del estudio en bioenergética de astrocitos.

El uso de neurotóxicos inhibidores de los complejos I y II de la CTE ha sido una herramienta empleada para producir modelos experimentales *in vivo* de algunas patologías del SN. Los estudios *in vitro* se han utilizado para complementar estos datos, así como profundizar en algunos mecanismos implicados^{68,69}.

Se ha evaluado el efecto de rotenona *in vitro* en astrocitos aislados de fetos de roedores, en donde se observó una disminución consistente de la viabilidad celular (por exclusión de azul tripano) a partir de concentraciones de 0.5 μM ⁷⁰; lo cual no corresponde a los resultados obtenidos en este estudio, bajo las condiciones ya mencionadas, nuestro resultado demostró una reducción en la viabilidad celular solo en una de las concentraciones empleadas, y posteriormente una recuperación de la viabilidad celular durante la administración de la concentración más alta. Esto además



de sugerir que la susceptibilidad a este neurotóxico depende de la edad⁶¹, siendo en fetos más susceptible, también podría en el caso de los astrocitos de adulto demostrar que existen mecanismos compensatorios ante la administración de este compuesto en particular; que ocasiona, entre otras cosas, estrés oxidativo por la acumulación de radicales libres debido precisamente al bloqueo de este complejo de la cadena respiratoria⁷¹. Sin embargo, es necesario profundizar en el estudio de estos mecanismos para determinar el porqué de este efecto.

En cuanto a los datos obtenidos posteriores a la administración de 6-OHDA, en donde en ninguna de las regiones evaluadas existe una disminución de la viabilidad celular, dado que es un inhibidor conocido de CI, y según lo reportado en la literatura, en células de astroglioma C6, hubo una disminución de la viabilidad de estas células e inducción de muerte mediada por disfunción mitocondrial⁵³; se esperaba una disminución de la viabilidad celular, sin embargo, su efecto no ha sido evaluado en astrocitos aislados de ratas adultas, por lo que se propone que este efecto podría deberse a la capacidad antioxidante que tienen estas células, principalmente representado por el sistema glutatión⁷². Debido a que en la literatura no existen reportes acerca del efecto de estos inhibidores en cultivos primarios de astrocitos, es necesario el estudio intensivo del efecto de estos compuestos no solo a nivel de viabilidad celular, sino también enfocado a los mecanismos compensatorios que estas células pueden estar ejecutando, lo cual además de generar avances en la comprensión de estos mecanismos, podría proporcionar datos clave en la relación de estos mecanismos y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la disfunción de CI.

Por otra parte, en cuanto a la administración de inhibidores de CII, se observó un descenso en la viabilidad celular con ambos neurotóxicos en los astrocitos corticales y de hipocampo, lo cual sugiere que ante la administración de estas toxinas los astrocitos de adulto de estas dos regiones no son capaces de llevar a cabo algún mecanismo compensatorio que permita mantener su viabilidad estable. Sin embargo, resulta muy interesante determinar por qué al administrar neurotóxicos inhibidores de CII, siendo que en éste no fue detectada la expresión de la proteína ni de su actividad, las células tratadas con este presentan una disminución en su viabilidad en todas las concentraciones empleadas en células corticales (ambos neurotóxicos), en hipocampo a las concentraciones de 1 y 10 mM, y para cuerpo estriado únicamente a la dosis de 10mM. Además, estos neurotóxicos han destacado por su efecto negativo en células estriatales (principalmente en neuronas), y bajo nuestras condiciones no fue posible determinar este daño a esta población celular en particular. Por lo que se propone, el estudio de estas condiciones no solo in vitro, sino también in vivo, para determinar su efecto en presencia de las otras células constituyentes del tejido, en donde su interacción puede tener un papel importante en la sobrevivencia de estas células en el tejido adulto.



CONCLUSIONES

Se logró diseñar un método para aislar astrocitos del cerebro de ratas adultas con rendimiento suficiente para realizar estudios de viabilidad celular y western blot. Contar con este método puede contribuir al estudio de las funciones fisiológicas y patológicas de los astrocitos.

La identidad de las células aisladas (astrocitos) se confirmó mediante la identificación de su morfología y el marcaje de la proteína GFAP.

Ni la expresión de proteína ni la actividad de complejo II se lograron detectar en astrocitos de ratas adultas en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas, lo que hace necesario evaluar la presencia y función de este complejo en un modelo *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Strominger, N., Demarest, R. & Laemle, L. *Noback's Human Nervous System*. (Humana Press, 2012).
2. Aggarwal, S., Yurlova, L. & Simons, M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* **21**, 585-93 (2011).
3. Allen, N. J. & Barres, B. A. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* **457**, 675-7 (2009).
4. Sofroniew, M. V & Vinters, H. V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7-35 (2010).
5. Souza, D. G., Bellaver, B., Souza, D. O. & Quincozes-Santos, A. Characterization of adult rat astrocyte cultures. *PLoS One* **8** (2013).
6. Parpura, V. *et al.* Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* **121**, 4-27 (2012).
7. Liu, Y. & Rao, M. S. Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol. Cell* **96**, 279-90 (2004).
8. Freeman, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* **330**, 774-8 (2010).
9. Molofsky, A. V *et al.* Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* **26**, 891-907 (2012).
10. Kimelberg, H. en *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System* (eds. Parpura, V. & Haydon, P.) 1-25 (Springer, 2009).
11. Kimelberg, H. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* **16**, 79-106 (2010).
12. Booher, J. & Sensenbrenner, M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* **2**, 97-105 (1972).
13. Lindsay, R. M., Barber, P. C., Sherwood, M. R., Zimmer, J. & Raisman, G. Astrocyte cultures from adult rat brain. Derivation, characterization and neurotrophic properties of pure astroglial cells from corpus callosum. *Brain Res.* **243**, 329-43 (1982).
14. Skytt, D. M., Madsen, K. K., Pajęcka, K., Schousboe, A. & Waagepetersen, H. S. Characterization of primary and secondary cultures of astrocytes prepared from mouse cerebral cortex. *Neurochem. Res.* **35**, 2043-52 (2010).
15. Saura, J. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J. Neuroinflammation* **4**, 26 (2007).
16. Diamond, M. C., Johnson, R. E. & Ingham, C. A. Morphological changes in the young, adult and aging rat cerebral cortex, hippocampus, and diencephalon. *Behav. Biol.* **14**, 163-74 (1975).
17. Yoshiura, T. *et al.* Age-related structural changes in the young adult brain shown by magnetic resonance diffusion tensor imaging. *Acad. Radiol.* **12**, 268-75 (2005).
18. Sun, W. *et al.* Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* **339**, 197-200 (2013).
19. Wang, D. D. & Bordey, A. The astrocyte odyssey. *Prog. Neurobiol.* **86**, 342-67 (2008).
20. Dugan, L. L. & Kim-Han, J.-S. Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**, 317-21 (2004).
21. Greenamyre, J. T., Betarbet, R. & Sherer, T. B. The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat. Disord.* **9 Suppl 2**, S59-64 (2003).
22. Finsterwald, C., Magistretti, P. & Lengacher, S. Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 3570-3581 (2015).
23. Voet, D. & Voet, J. *Bioquímica*. (Editorial Médica Panamericana, 2006).



24. Caro, P. Restricción de la metionina y de dieta en relación con el estrés oxidativo en mamíferos de laboratorio. (Universidad Complutense de Madrid, 2009).
25. Schulz, S. *et al.* A protocol for the parallel isolation of intact mitochondria from rat liver, kidney, heart, and brain. *Methods Mol. Biol.* **1295**, 75-86 (2015).
26. Müller-Esterl, W. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida.* (Reverte, 2008). en <<https://books.google.com/books?id=X2YVG6Fzp1UC&pgis=1>>
27. Assunção Guimarães, C. & Linden, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1638-50 (2004).
28. Scorrano, L. Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 886-93 (2013).
29. CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* **17**, 65-134 (1956).
30. Green, D. E. & Vande Zande, H. On the enzymic mechanism of oxidative phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 1064-8 (1982).
31. Hinchliffe, P. & Sazanov, L. A. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science* **309**, 771-4 (2005).
32. Sazanov, L. A. & Hinchliffe, P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* **311**, 1430-6 (2006).
33. Yagi, T. & Matsuno-Yagi, A. The Proton-Translocating NADH-Quinone Oxidoreductase in the Respiratory Chain: The Secret Unlocked †. *Biochemistry* **42**, 2266-2274 (2003).
34. Cecchini, G., Maklashina, E., Yankovskaya, V., Iverson, T. M. & Iwata, S. Variation in proton donor/acceptor pathways in succinate:quinone oxidoreductases. *FEBS Lett.* **545**, 31-8 (2003).
35. Zara, G. *et al.* Oxygen is required to restore flor strain viability and lipid biosynthesis under fermentative conditions. *FEMS Yeast Res.* **9**, 217-25 (2009).
36. Trumpower, B. L. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 11409-12 (1990).
37. Rotsaert, F. A. J., Ding, M. G. & Trumpower, B. L. Differential efficacy of inhibition of mitochondrial and bacterial cytochrome bc1 complexes by center N inhibitors antimycin, ilicicolin H and funiculosin. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 211-9 (2008).
38. Zhang, Z. *et al.* Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* **392**, 677-84 (1998).
39. Ernster, L. & Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta* **1271**, 195-204 (1995).
40. Forquer, I., Covian, R., Bowman, M. K., Trumpower, B. L. & Kramer, D. M. Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 38459-65 (2006).
41. Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R. & Walker, J. E. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-8 (1994).
42. Stock, D., Leslie, A. G. & Walker, J. E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-5 (1999).
43. Betarbet, R. *et al.* Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* **3**, 1301-6 (2000).
44. Dick, F. D. Parkinson's disease and pesticide exposures. *Br. Med. Bull.* **79-80**, 219-31 (2006).
45. Isman, M. B. BOTANICAL INSECTICIDES, DETERRENTS, AND REPELLENTS IN MODERN AGRICULTURE AND AN INCREASINGLY REGULATED WORLD. *Annu. Rev. Entomol.* **51**, 45-66 (2006).



46. Patel, F. Pesticidal suicide: adult fatal rotenone poisoning. *J. Forensic Leg. Med.* **18**, 340-2 (2011).
47. Greenamyre, J. T., Cannon, J. R., Drolet, R. & Mastroberardino, P.-G. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 141-2; author reply 142-3 (2010).
48. Hoglinger, G. U. *et al.* The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J. Neurochem.* **95**, 930-939 (2005).
49. Liu, B., Gao, H.-M. & Hong, J.-S. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1065-73 (2003).
50. Ogawa, N., Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F. J. & Miyoshi, K. L-DOPA treatment from the viewpoint of neuroprotection. Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **252 Suppl** , IV23-IV31 (2005).
51. Goswami, P., Gupta, S., Joshi, N., Sharma, S. & Singh, S. Astrocyte activation and neurotoxicity: A study in different rat brain regions and in rat C6 astroglial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **40**, 122-39 (2015).
52. Alarcón, A., Santamaría, A. & Königsberg, M. MODELOS NEUROTÓXICOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL. *REB* **29**, 92-100 (2010).
53. Gupta, S. *et al.* 6-Hydroxydopamine and lipopolysaccharides induced DNA damage in astrocytes: involvement of nitric oxide and mitochondria. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **778**, 22-36 (2015).
54. Túnez, I., Tasset, I., Pérez-De La Cruz, V. & Santamaría, A. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules* **15**, 878-916 (2010).
55. Kumar, P., Kalonia, H. & Kumar, A. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol. Rep.* **62**, 1-14 (2015).
56. García, J. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre la disfunción mitocondrial inducida por el ácido 3-nitropropiónico. (Facultad de Química, UNAM, 2014).
57. Dimou, L. & Gallo, V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* **63**, 1429-51 (2015).
58. Alghamdi, B. & Fern, R. Phenotype overlap in glial cell populations: astroglia, oligodendroglia and NG-2(+) cells. *Front. Neuroanat.* **9**, 49 (2015).
59. Cahoy, J. D. *et al.* A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* **28**, 264-78 (2008).
60. Doyle, J. P. *et al.* Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* **135**, 749-62 (2008).
61. Foo, L. C. *et al.* Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron* **71**, 799-811 (2011).
62. Kumamaru, H. *et al.* Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. *J. Neuroinflammation* **9**, 116 (2012).
63. MT-CO1 - mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I. (2015). en <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-CO1>>
64. De Sury, R., Martinez, P., Procaccio, V., Lunardi, J. & Issartel, J.-P. Genomic structure of the human NDUFS8 gene coding for the iron-sulfur TYKY subunit of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Gene* **215**, 1-10 (1998).
65. Tamura, Y. *et al.* Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **307**, R931-43 (2014).



66. Tagliaferri, C. *et al.* Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *Eur. J. Nutr.* **54**, 1139-49 (2015).
67. Mulligan, C. M., Le, C. H., deMooy, A. B., Nelson, C. B. & Chicco, A. J. Inhibition of delta-6 desaturase reverses cardiolipin remodeling and prevents contractile dysfunction in the aged mouse heart without altering mitochondrial respiratory function. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **69**, 799-809 (2014).
68. Goswami, P., Gupta, S., Biswas, J., Sharma, S. & Singh, S. Endoplasmic Reticulum Stress Instigates the Rotenone Induced Oxidative Apoptotic Neuronal Death: a Study in Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* (2015). doi:10.1007/s12035-015-9463-0
69. Satish Bollimpelli, V. & Kondapi, A. K. Differential sensitivity of immature and mature ventral mesencephalic neurons to rotenone induced neurotoxicity in vitro. *Toxicol. In Vitro* (2015). doi:10.1016/j.tiv.2015.09.006
70. Rathinam, M. L. *et al.* Astrocyte mediated protection of fetal cerebral cortical neurons from rotenone and paraquat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **33**, 353-60 (2012).
71. Cabezas, R., El-Bachá, R. S., González, J. & Barreto, G. E. Mitochondrial functions in astrocytes: neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci. Res.* **74**, 80-90 (2012).
72. Pérez, K. Respuesta de las células gliales al daño neuronal In Vitro. (Universitat de Barcelona, 2006).
73. Campbell, N. A. & Reece, J. B. *Biología.* (Ed. Médica Panamericana, 2007).



Anexo I

Reactivos y equipo

La Poli-D-Lisina, la tripsina, la papaína, la DNasa, la rotenona, la 6 hidroxidopamina, el 3-NP y el malonato fueron adquiridos de Sigma Aldrich C. (St Louis, MO, EEUU). El medio de cultivo DMEM, el suero fetal bovino (SFB) y la calceína AM se adquirieron de Life Technologies (Waltham, MA USA). La ASB, el HEPES y la D-glucosa fueron adquiridos de AMRESCO (Cochran, Ohio, EEUU). El rojo de fenol, el kit para inmunocitoquímica ABC STAINING SYSTEM y el anticuerpo secundario para WB (anti-ratón) acoplado a peroxidasa de rábano fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EEUU). El coctel de anticuerpos Total OXPHOS Rodent WB antibody Cocktail, fue adquirido de ABCAM (Cambridge, UK). El quimioluminiscente acoplado a peroxidasa de rábano NOVEX ECL, fue adquirido de Invitrogen (Waltham, MA, USA). El medio de montaje para las preparaciones celulares fue adquirido de BIOCARE MEDICAL (Concord, CA, EEUU). El resto de los reactivos es grado analítico y están disponibles comercialmente.

La detección de fluorescencia para el método de viabilidad celular y la actividad enzimática de los complejos mitocondriales se realizó haciendo uso de un lector de placas multimodal Synergy HT obtenido de BioTek (Winooski, VT, EEUU).