



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS I Y II DE LA CADENA DE TRANSPORTE DE
ELECTRONES EN CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ANAYELI GARCÍA SERAFÍN



CIUDAD DE MÉXICO, 2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **J. ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS**

VOCAL: **Profesor:** **JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ**

SECRETARIO: **Profesor:** **MARISOL OROZCO IBARRA**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **LAURA CARMONA SALAZAR**

2° SUPLENTE: **Profesor:** **CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Marisol Orozco Ibarra

SUSTENTANTE:

Anayeli García Serafín

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Resumen	II
1. ANTECEDENTES	1
1.1. Células Gliales.....	1
1.2. Astrocitos.....	2
Historia.....	2
Identificación.....	4
Funciones.....	5
Metabolismo energético.....	6
1.3. Mitocondria.....	8
Cadena de transporte de electrones.....	9
1.4. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones.....	12
1.5. Astrocitos en enfermedades neurodegenerativas.....	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1. Materiales.....	18
5.2. Animales.....	18
5.3. Cultivo primario.....	19
5.4. Metodología y tratamiento de los subcultivos.....	19
Determinación de la pureza de los cultivos.....	20
Ensayo de reducción de MTT.....	21
Tinción Hematoxilina y Eosina.....	22
Medición de complejo I y II.....	23
Determinación del nivel de proteína por Western blot.....	25
5.5. Análisis estadístico.....	25
6. RESULTADOS	26
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIÓN	41
9. PERSPECTIVAS	41
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

Abreviaturas:

3-NP	Ácido-3-nitropropiónico
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
Cit c	Citocromo c
CTE	Cadena transportadora de electrones
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
EH	Enfermedad de huntington
EP	Enfermedad de parkinson
FADH₂	Flavina adenina dinucleótido
FBS	Suero fetal bovino
FMN	Mononucleótido flavina no covalente
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H&E	Hematoxilina y eosina
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDA	N-metil-D-aspartato
ON	Óxido nítrico
OX42	Anticuerpo para detectar integrina α M
PDL	Poli-D-lisina
Q	Ubiquinona
QH₂	Ubiquinol
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central

RESUMEN

Introducción: Los astrocitos son células gliales que desempeñan funciones esenciales para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central. Existe evidencia de que los astrocitos juegan un papel importante ante el daño inducido por agentes tóxicos en el SNC al participar en el mantenimiento de la homeostasis. La mitocondria provee a los astrocitos de sustratos metabólicos y de la energía –ATP- necesaria para llevar a cabo sus funciones. Diferentes inhibidores de la cadena de transporte de electrones como la rotenona, la 6-hidroxidopamina, el ácido-3-nitropropiónico y el malonato producen efectos neurotóxicos que se han caracterizado principalmente por la muerte neuronal que generan. Sin embargo, se desconoce el efecto que estos compuestos ejercen sobre la función mitocondrial de los astrocitos aislados de diferentes regiones cerebrales. Esta información es relevante para el conocimiento de la bioenergética de los astrocitos y el entendimiento de las diferencias metabólicas que les hacen menos susceptibles al daño ante agentes tóxicos.

Objetivo general. Estudiar la respuesta de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en cultivos primarios de astrocitos tratados con rotenona, la 6-hidroxidopamina, el ácido 3-nitropropiónico y el malonato.

Objetivos particulares. A) Determinar la pureza de los cultivos. B) Evaluar la reducción de MTT y la morfología en astrocitos tratados con inhibidores de la CTE. C) Evaluar la actividad del complejo I de la CTE en astrocitos tratados con rotenona o 6-OHDA. D) Evaluar la actividad del complejo II de la CTE en astrocitos tratados con ácido 3-nitropropiónico y malonato. D) Determinar la presencia de una subunidad de cada complejo de la CTE (complejo I: NDUFB8 de 20 kD, complejo II: SDHB de 30 kD, complejo III: Core protein 2 de 48 kD, complejo IV: MTCO1 de 40 kD, y complejo V: ATPASA de 55 kD).

Metodología. Se prepararon cultivos primarios de astrocitos aislados de corteza, hipocampo y estriado de ratas Wistar recién nacidas (P0). Para verificar la pureza de los cultivos, se estableció la identidad de las células mediante inmunocitoquímica e inmunofluorescencia de las proteínas GFAP, O4 y OX42, marcadores de glía, oligodendrocitos y microglía, respectivamente. Los cultivos se trataron con inhibidores del complejo I (rotenona y 6-hidroxidopamina) y del complejo II (ácido 3-nitropropiónico y malonato).

Se determinó la reducción de MTT y se observó la morfología mediante la técnica de hematoxilina y eosina. La actividad de complejo I y del complejo II se determinó mediante ensayos espectrofotométricos. La determinación de una proteína de cada complejo mitocondrial se realizó mediante inmunodetección por western blot.

Resultados. Se demostró la pureza mediante inmunodetección con la cual se detectó la expresión de la proteína GFAP, indicando la predominancia de astrocitos y también demostrando la ausencia de otras células gliales.

Con inhibidores de complejo I, la rotenona aumentó la reducción de MTT de 36.6% en estriado y 47.9% en hipocampo a una concentración de 100 μ M, sin embargo, se notó la disminución del número de células al aumentar la concentración de estos compuestos. Al evaluar la actividad de complejo I de la CTE se observó un aumento de alrededor de 43% al ser tratadas con 6-OHDA en estriado, con rotenona no se observaron diferencias en la actividad.

El tratamiento de los astrocitos con 3-NP no afectó la reducción de MTT, mientras que el tratamiento de los astrocitos aislados de estriado con malonato (10 mM) disminuyó la reducción de MTT en 27.7%. En cuanto a la morfología, el tratamiento con ambos compuestos no generó cambios considerables en los astrocitos. Sin embargo, no se detectó la actividad de complejo II en las condiciones estudiadas.

Por medio del western blot se determinó la presencia de una proteína de cada complejo mitocondrial. A los 10 minutos de exposición se observaron bandas tenues correspondientes a complejo I y complejo II en lisados de astrocitos, a los 60 minutos de exposición, se observaron bandas claras correspondientes a los complejos I, II, III y V. A pesar de prolongar el tiempo de exposición por 24 h no fue posible localizar la banda correspondiente al complejo IV (subunidad MTCO1 de 40 kDa).

Conclusión. Los astrocitos de las regiones cerebrales estudiadas presentaron prácticamente la misma respuesta en los parámetros medidos.

Dado que la 6-OHDA y la rotenona inhiben el complejo I en varios tipos celulares, esperamos que también inhibieran la actividad de este complejo en astrocitos, conduciendo a muerte celular. Sin embargo, nos encontramos que ante la presencia de 6-OHDA y rotenona sí se presenta muerte celular y alteraciones metabólicas, pero no encontramos disminuida la actividad del complejo I.

Dado que el 3-NP y el malonato inhiben el complejo II, esperamos el mismo efecto en astrocitos. Sin embargo, el 3-NP no afectó la reducción de MTT en las regiones en estudio, mientras que el malonato sólo modificó la reducción de MTT en estriado. Al medir la actividad de complejo II, esta no se detectó en las condiciones estudiadas. A pesar de esto, se detectó por western blot una subunidad de este complejo, lo cual indica que esta enzima sí se encuentra presente en astrocitos.

1. ANTECEDENTES

1.1. Células Gliales

En el sistema nervioso (SN) hay una población de células morfológica y funcionalmente diferentes a las neuronas, que conservan su capacidad de proliferar y que en conjunto se conocen como células gliales. Son células que durante muchos años se pensaba que sólo proporcionaban soporte, protección, nutrición y facilitaban la conducción de las neuronas que rodeaban. A medida que se avanza en la investigación se establece que son elementos indispensables para mantener el microambiente para un correcto funcionamiento del SN, en los últimos 20 años se les ha atribuido una gran variedad de funciones específicas (Ndubaku and de Bellard, 2008). Por ejemplo, guían la migración de las neuronas para formar la arquitectura neuronal y participan en la transmisión sináptica como reguladores de la liberación de neurotransmisores, entre otras funciones.

Las células gliales se clasifican según su morfología, función y localización en el SN; en la Figura 1 se encuentra una clasificación de las células gliales. Con base en esta clasificación podemos identificar los principales tipos de células gliales: i) los astrocitos proveen energía y sustratos para mantener la homeostasis cerebral, ii) los oligodendrocitos producen mielina, una lipoproteína que envuelve a los axones de las neuronas y hace más eficiente la comunicación neuronal, iii) NG2 se refiere a células identificadas como precursoras de los oligodendrocitos, iv) la microglía se encarga de conservar la integridad del cerebro al reaccionar de manera inmediata ante cualquier daño que se produzca, v) las células de Schwann forman capas de mielina alrededor de los axones de las neuronas (Guillamon-Vivancos et al., 2015), y vi) las células satélite rodean a los axones de las neuronas en los ganglios para proporcionar aislamiento eléctrico y regular el entorno químico de las neuronas.

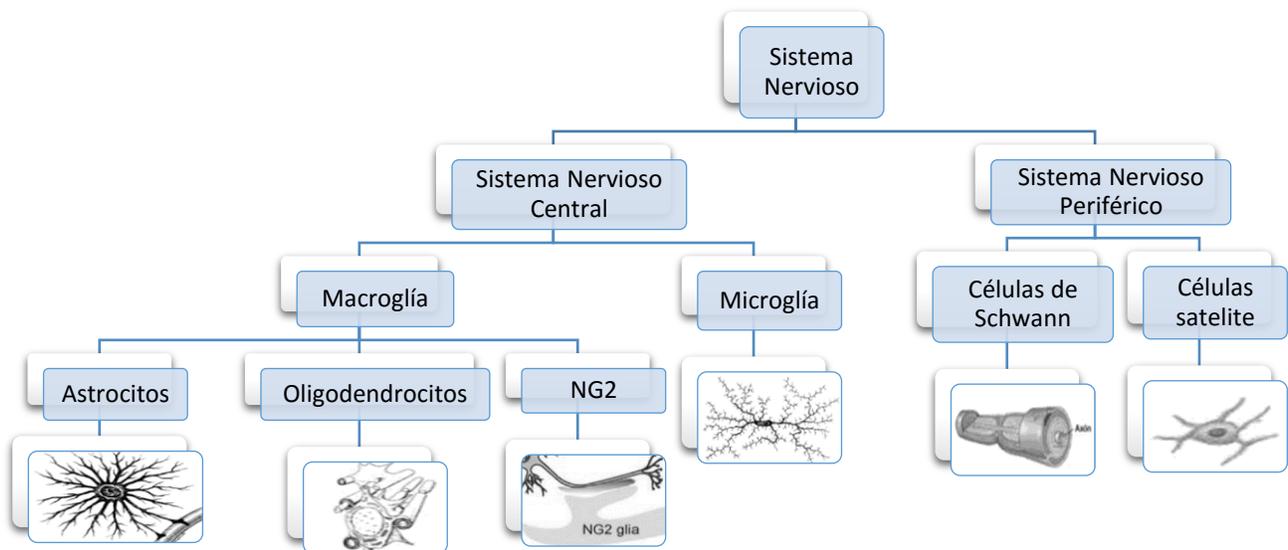


Figura 1. Clasificación de las células gliales según su localización en el SN. Se muestra una imagen representativa de la morfología de cada tipo de célula.

1.2. Astrocitos

Historia

Fue el médico alemán Rudolf Virchow quien acuñó el término “neuroglía” en 1858, refiriéndose al “pegamento del cerebro” ya que relacionaba este término como material conectivo que mantendría unidas a las neuronas en el SN. Después de algunos años se dieron a conocer los primeros dibujos de las células gliales en forma de estrella, realizados en 1865 por Otto Deiters. Camilo Golgi en 1871 demostró la existencia de una población diferente a las células nerviosas y describió que las células gliales enviaban procesos a los vasos sanguíneos (Figura 2). Michael von Lenhossek fue quien acuñó el término “astrocito” en 1891, lo que significa “célula en forma de estrella”, y se basa en su morfología. Tiempo después se observan diferencias morfológicas entre los astrocitos, y éstos son clasificados en protoplasmáticos y fibrosos por Rudolf Albert Von Kölliker y William Lloyd Andriezen en 1893 respectivamente (Kettenmann and Verkhratsky, 2008).

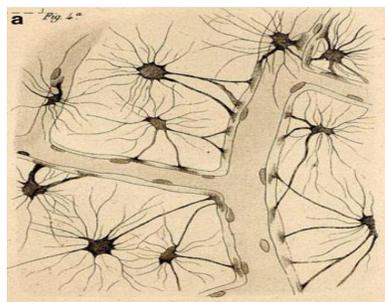


Figura 2. Representación gráfica de células gliales de elaborada en 1903. Se puede observar cómo los astrocitos establecen contactos mediante su pie terminal con los tubos capilares.

A principios del siglo XX Santiago Ramón y Cajal desarrolló el método de tinción de cloruro de oro sublimado para observar astrocitos, sentando las bases para que más tarde se descubrieran sus propiedades. Sin embargo, en la década de los '50 los estudios realizados con astrocitos todavía eran escasos, y fue hasta los años '60 que se realizaron más investigaciones sobre la función de estas células en el SN. Estos estudios se centraron en su morfología, en su fisiología, e incluso mejoraron los métodos desarrollados por Cajal para su identificación. A partir de la década de '70 y hasta los '90 se comenzó a investigar su metabolismo energético y sus funciones en diferentes regiones del cerebro, además se desarrollaron métodos de detección más precisos para su identificación. Sin embargo, la investigación respecto de los astrocitos comenzó a ser más abundante hacia alrededor de 1990 y desde entonces hasta la fecha, se ha encontrado que se trata de células diversas, heterogéneas y que son indispensables para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), ya que tienen una relación directa con las neuronas proporcionando a éstas sustratos metabólicos para llevar a cabo sus funciones. También se ha descrito que son elementos centrales en algunas patologías del SN.

A pesar de esto, el estudio con astrocitos todavía es escaso (13,302 publicaciones), comparado con la cantidad de estudios reportados en la literatura respecto a las neuronas (111,693 publicaciones). En la Figura 3 se encuentra una gráfica en donde se puede observar esta diferencia.

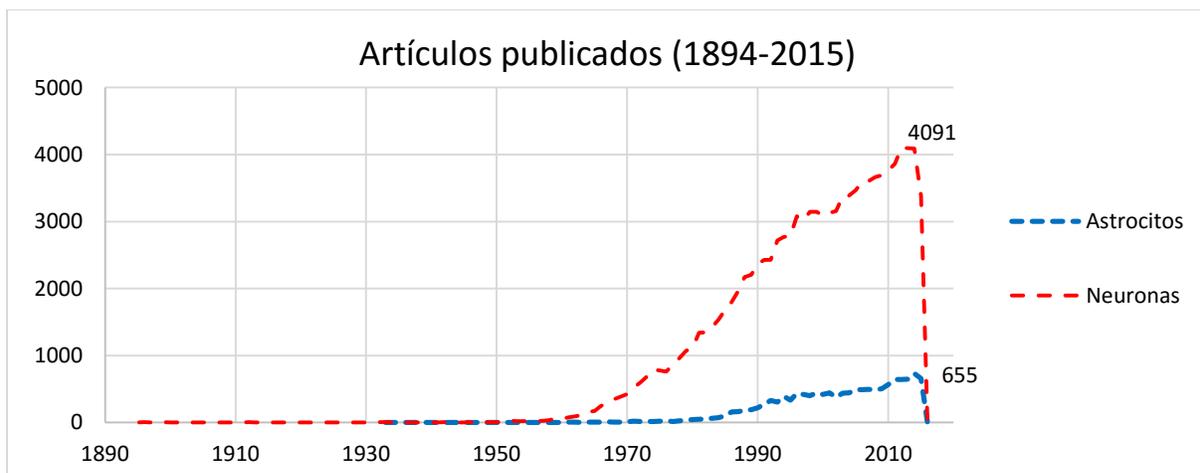


Figura 3. Artículos registrados en Scopus en cuyo título se encontró la palabra neurona o astrocito. Los números mostrados corresponden a las publicaciones registradas en 2015.

Identificación

Para ser clasificadas como astrocitos, se ha propuesto que las células cumplan con los ocho criterios siguientes (Kimelberg et al., 2007; Kimelberg, 2010):

1. Ausencia de excitabilidad eléctrica (los astrocitos no generan un potencial de acción).
2. Potencial de membrana muy negativo (-80 a -90 mV), debido a una prevalencia de permeabilidad de iones K^+ en la membrana plasmática.
3. Expresión de transportadores funcionales para GABA y glutamato que permite la homeostasis de estos neurotransmisores.
4. Un gran número de filamentos intermedios, los cuales son sitios específicos 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. Contacto con otros astrocitos mediante uniones gap formadas por conexina 43 y/o 30.

La identificación de los astrocitos se realizó inicialmente mediante procedimientos histológicos y más recientemente, por la inmunolocalización de algunas proteínas. Entre éstas, se encuentran GFAP y vimentina, las cuales forman parte de los filamentos intermedios de los astrocitos.

De igual forma, se ha utilizado la detección de S100 β (proteína de unión al calcio), que sólo se expresa en astrocitos perivasculares y tiene como desventaja que se expresa en células NG2; o bien, la detección de glutamato sintasa (enzima citosólica que produce glutamina a partir de glutamato), la cual también se expresa en oligodendrocitos. Otros marcadores muy utilizados son los transportadores de glutamato (GLT1) y acuaporina. Sin embargo, la detección de GFAP es el método más empleado durante los últimos años como marcador específico de astrocitos (Gupta et al., 2015b; Wachter et al., 2010; Wang et al., 2013).

Funciones

Tras las investigaciones realizadas con astrocitos, se ha encontrado que son parte esencial del SNC. Estudios recientes *in vitro* e *in vivo* han demostrado que tienen diferentes funciones, como resume en la Tabla I.

Tabla I. Funciones de los astrocitos			
	Función	Modelo	Referencia
Desarrollo del SNC	Participan en el control de la sinaptogénesis del SNC, a través de reguladores positivos y negativos como las proteínas Hevin y SPARC.	co-cultivo neuronas-astrocitos	Kucukdereli et al., 2011
Barrera Hematoencefálica	Participan en la modulación de la barrera hematoencefálica, a través de la liberación de factores como TGFβ1.	cultivo astrocitos	Hawkins et al., 2015
Metabolismo de lípidos	Regulan el metabolismo del colesterol a través de transportadores ABCA que se expresan diferencialmente en neuronas y astrocitos.	cultivo neuronas y astrocitos	Chen et al., 2013
Homeostasis	Regulan el pH extracelular, mediado por concentraciones de K ⁺ y Na ⁺ .	cultivo astrocitos	Hansen et al., 2015
Soporte metabólico	Se ha encontrado evidencia <i>in vivo</i> de que existe un gradiente de lactato del astrocito a las neuronas.	In vivo, ratón	Philipp et al., 2015
Transmisión sináptica	Participan en la regulación de la sinapsis, mediante la secreción de un factor soluble que modula la presencia de la subunidad GluN2B en el receptor NMDA.	co-cultivo neuronas-astrocitos	Hahn et al., 2015
Regulación del flujo sanguíneo	Regulan el flujo sanguíneo al liberar agentes vasodilatadores como prostaglandinas y COX-1.	In vivo	Takano et al., 2006
Defensa antioxidante	Liberan GSH al espacio extracelular, que es captado por las neuronas para proporcionar protección contra el estrés oxidativo.	cultivo neuronas y astrocitos	Ye et al., 2015

SPARC: proteína secretada ácida y rica en cisteína, **TGFβ1:** factor de crecimiento transformante beta 1, **NMDA:** N-metil-D-aspartato, **COX-1:** ciclooxigenasa-1, **GSH:** glutatión.

Metabolismo energético

En la Figura 4 se esquematiza la morfología que presentan los astrocitos, así como la presencia de gránulos de glucógeno y diferentes organelos celulares como mitocondrias, núcleo y aparato de golgi.

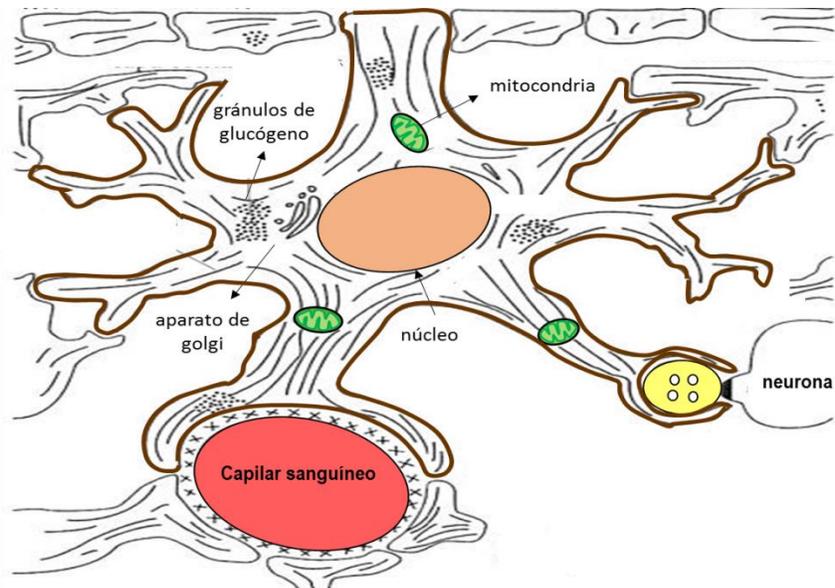


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de un astrocito. Esquema tomado y modificado de Cuenca, 2006.

Los astrocitos captan la glucosa a través de transportadores GLUT1 (Prebil et al., 2011), y la metabolizan por las siguientes vías:

- a) **Glucolisis**; se obtienen dos moléculas de piruvato, coenzimas reducidas (NADH y $FADH_2$ nicotinamida adenina dinucleótido y flavina adenina dinucleótido respectivamente) y ATP (adenosintrifosfato). El piruvato puede entrar a la mitocondria donde es metabolizado a través del ciclo de Krebs y posteriormente a la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP (Brekke et al., 2015). De otro modo el piruvato se puede reducir a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH). El lactato puede ser liberado al espacio extracelular por medio de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), y luego ser transferido a las terminales sinápticas para ser utilizado por las neuronas. En éstas, el lactato se convierte en piruvato para entrar al ciclo de Krebs y producir ATP, y así para sostener su alta demanda energética (Finsterwald et al., 2015).

- b) **Pentosas fosfato**; se produce NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y pentosas. Entre otras funciones, el NADPH es usado para regenerar el glutati3n (GSH) oxidado a partir de glutati3n reducido (GSSG). El GSH es el antioxidante end3geno m3s importante, cuando es liberado de los astrocitos previene el estr3s oxidante extracelular o es capturado por las neuronas (Ye et al., 2015).
- c) **Glucog3nesis**; la glucosa se fosforila y se transforma en UDP-Glucosa para dar inicio a la glucog3nesis, v3a en la que participan enzimas como la fosfoglucomutasa y la UDP-glucosa pirofosforilasa y gluc3geno sintasa. El gluc3geno es la principal reserva de energ3a del cerebro y se ha encontrado casi exclusivamente en astrocitos (Belanger et al., 2011). La degradaci3n del gluc3geno resulta en la producci3n de lactato, el cual es liberado al espacio extracelular para suplir las necesidades energ3ticas de las neuronas.

Tambi3n en astrocitos se lleva a cabo la s3ntesis de glutamato de la siguiente manera:

- 1) **Captaci3n de glutamato (Glu)**; el Glu es un neurotransmisor liberado por las neuronas durante la transmisi3n sin3ptica, y es capturado por los astrocitos a trav3s de transportadores de glutamato (GLT1 y GLAST) (Belanger et al., 2011); una fracci3n del Glu es convertido enzim3ticamente a glutamina (Gln) mediante la glutamina sintasa que est3 ausente en neuronas. Despu3s, la GL se libera en la hendidura sin3ptica y es capturada por las neuronas (Stephen et al., 2014), para resintetizar glutamato.
- 2) **Producci3n de novo de glutamato**; la glucosa se metaboliza hasta acetil CoA y entra al ciclo de Krebs para formar α -cetoglutarato, 3ste se convierte a glutamato por transaminaci3n y queda disponible para formar glutamina, que puede ser liberada en la hendidura sin3ptica.

Aunque el metabolismo energ3tico de los astrocitos no se conoce en su totalidad, algunos estudios sugieren que su principal fuente de energ3a es la gluc3lisis (Perreten Lambert et al., 2014) y que los astrocitos requieren menos energ3a en comparaci3n con las neuronas (Belanger et al., 2011). Adem3s se consideran muy importantes para proporcionar sustratos metab3licos a las neuronas y as3 preservar la funci3n neuronal, por lo que las alteraciones en las v3as metab3licas antes descritas podr3an estar relacionadas con el comienzo de algunas patolog3as. Sin embargo, es necesario profundizar el estudio de las caracter3sticas metab3licas de los astrocitos, ya que al considerar la gluc3lisis como su principal fuente de ATP, no se ha estudiado a fondo la producci3n de ATP en la mitocondria.

En este trabajo se dispuso a investigar la respuesta de los astrocitos al ser tratados con inhibidores de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones (CTE). Por lo tanto, a continuación se describen algunas características de la mitocondria y la CTE.

1.3. Mitocondria

Generalidades

La mitocondria (del griego: *mitos*, filamento + *chondros*, gránulo) es el organelo que se encarga de suministrar energía a las células, tiene una forma típica de elipsoide, su tamaño va alrededor de $\sim 0.5 \mu\text{m}$ de diámetro y $1 \mu\text{m}$ de largo. El tamaño y la forma de las mitocondrias varían en grado considerable, en función de su origen y su estado metabólico (Voet, 2007).

La mitocondria está limitada por una membrana externa (ME) y contiene otra membrana interna (MI) invaginada como se observa en la figura 5. La ME es una bicapa lipídica que contiene porinas y proteínas que permiten la difusión libre de moléculas de más de 10 KDa. La MI es permeable solo para O_2 , CO_2 , H_2O y contiene, además de las proteínas de la CTE, numerosas proteínas de transporte que controlan la entrada y salida de metabolitos como ATP, ADP (adenosín difosfato), piruvato, Ca^{2+} y fosfato. La MI divide a la mitocondria en dos compartimentos, el espacio intermembrana y la matriz. El espacio intermembrana se localiza entre las dos membranas, y posee una alta concentración de protones debido al bombeo de los complejos enzimáticos de la CTE. En este espacio se encuentran diversas enzimas que intervienen en la transferencia de ATP. En la matriz mitocondrial se encuentran enzimas que llevan a cabo diversas rutas metabólicas esenciales tales como el ciclo de Krebs y la β -oxidación de ácidos grasos, entre otras (Voet, 2007).

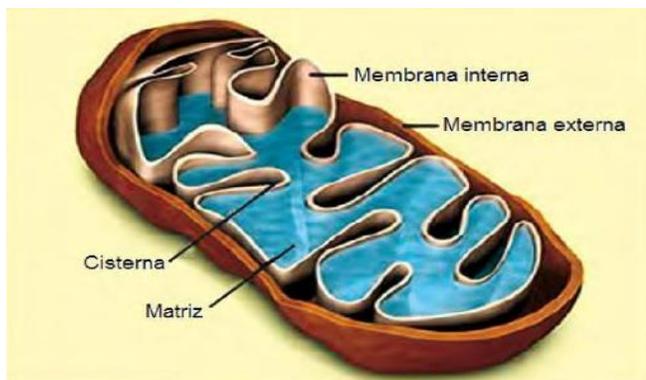


Figura 5. Imagen de la mitocondria. Tomado de Vasudevan y Sreekumari, 2011.

La función principal de la mitocondria es suministrar la energía necesaria para que las células lleven a cabo su actividad celular; muchas de las reacciones que se llevan a cabo en este organelo contribuyen a impulsar la CTE y en consecuencia, el bombeo de protones de la matriz hacia el espacio intermembrana, generando un potencial transmembranal que es aprovechado para la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa.

Cadena transportadora de electrones

La cadena de transporte de electrones (CTE) está conformada por cuatro complejos multiproteicos (complejo I-IV), éstos se encuentran embebidos en la MI como se observa en la Figura 6. El NADH y FADH₂ se oxidan en los complejos I y II, respectivamente; los electrones obtenidos son transportados por medio de la ubiquinona (Q) al complejo III. A partir de ahí los electrones se transfieren al citocromo c (cit c) y son entregados a complejo IV para reducir el O₂ hasta H₂O.

Se utiliza la energía liberada durante el transporte de electrones para trasladar protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal. Esto crea un gradiente de protones trans-MI, asociado con un potencial eléctrico negativo en el interior. La ATP sintasa cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) utilizando este gradiente de protones trans-MI. En la siguiente sección se resumen algunas de las características de cada complejo de la CTE y de la ATP sintasa.

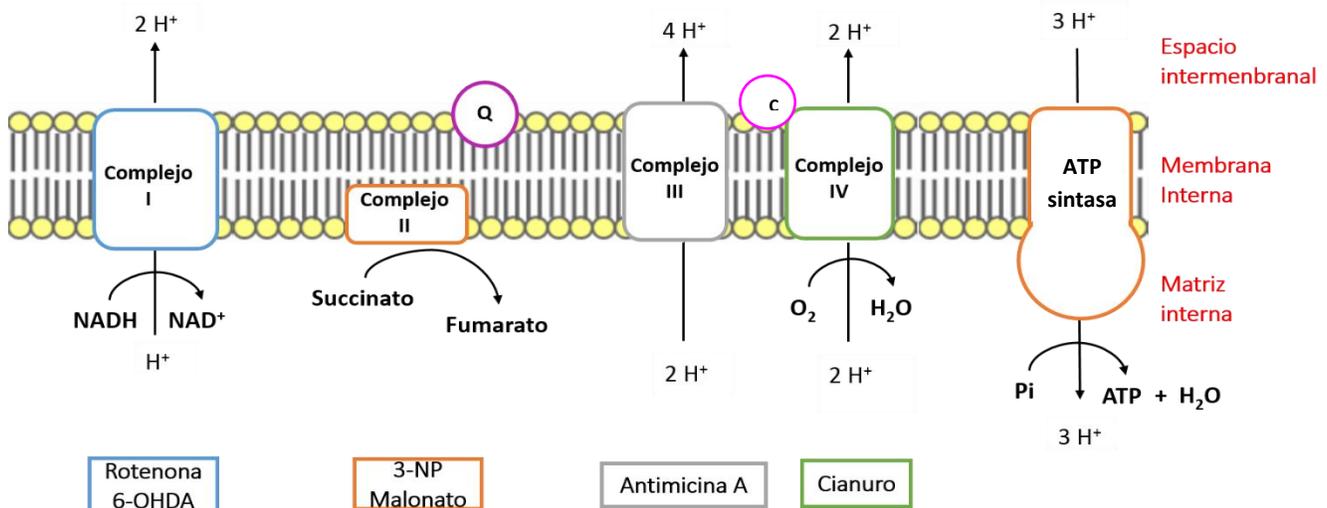


Figura 6. Cadena de transporte de electrones. Los compuestos en los recuadros funcionan como inhibidores de cada complejo. Q: ubiquinona, c: citocromo c.

Complejo I (NADH *deshidrogenasa* o NADH-Coenzima Q Oxidorreductasa)

El complejo I está formado por 46 cadenas polipeptídicas, 39 de ellas codificadas por ADN nuclear y el resto por ADN mitocondrial con una masa total de ~900 KDa. Tiene forma de L, con un brazo horizontal anclado en la membrana y un brazo vertical que se proyecta en la matriz (Chen et al., 2004; Hirst et al., 2003). Contiene una subunidad de unión al NADH y un centro activo de la enzima, que está constituido por flavina y 9 centros hierro-azufre (Fe-S) (Hinchliffe and Sazanov, 2005).

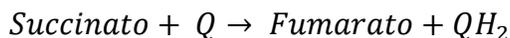
En este complejo la oxidación de NADH dona electrones que son aceptados a través de un mononucleotido flavina no covalente (FMN) y acarreados a través de una serie de grupos Fe-S, después los electrones son transferidos a la Q. Durante este proceso cuatro protones son translocados a través de la MI, desde la matriz hacia el espacio intermembrana. La reacción global es la siguiente:



Complejo II (Succinato *deshidrogenasa* o Succinato-coenzima Q oxidorreductasa)

El complejo II, se compone de 4 polipéptidos, codificados en el ADN nuclear. Contiene las siguientes subunidades: SDHA, la subunidad flavoproteína, su masa molecular es de 70 KDa; SDHB, la subunidad Fe-S que contiene una cadena de tres grupos Fe-S, su masa molecular es de 30 KDa; SDHC y SDHD su masa molecular es de ~15 KDa y ~17 KDa respectivamente, esta enzima tiene una masa total de 140 KDa.

Durante la oxidación de succinato a fumarato, dos electrones y dos protones son transferidos al FAD, el FADH₂ formado transfiere los electrones para reducir la Q a ubiquinol (QH₂) a través de los centros Fe-S del complejo II (Sun et al., 2005).

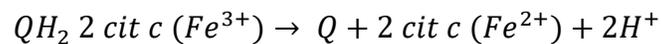


Complejo III (Ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa, Coenzima Q-citocromo c oxidorreductasa o complejo citocromo bc₁)

El complejo III tiene una estructura dimérica, cada monómero está constituido por 11 subunidades proteicas diferentes insertadas o unidas a la MI.

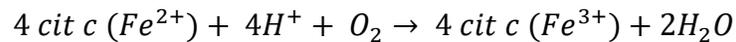
Tres de estas subunidades, un centro Fe-S, y citocromos c_1 y b, contienen centros rédox que participan en la transferencia de electrones, todos los elementos del complejo III están codificados por el ADN nuclear excepto el citocromo b que esta codificado por ADN mitocondrial.

En este complejo el QH_2 cede dos electrones al citocromo c oxidado, permitiendo el bombeo de protones al citosol (Xia et al., 2013). La ecuación neta para el paso de electrones en este complejo es:



Complejo IV (Citocromo c oxidasa o COX IV)

El complejo IV se compone de 13 subunidades, tres de ellas codificadas por ADN mitocondrial y el resto por ADN nuclear. Este complejo se encarga de la reducción de oxígeno a agua al mismo tiempo que bombea protones a la matriz (Kadenbach and Huettemann, 2015). Su ecuación neta es la siguiente:



ATP-sintasa (F1-F0-ATPasa o complejo V)

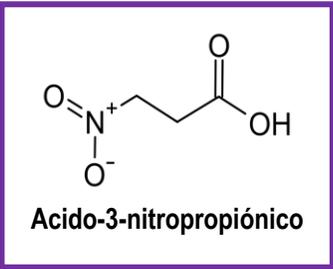
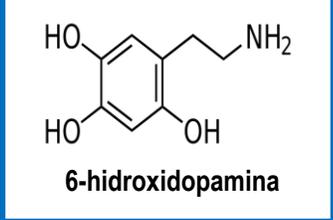
Es un complejo multiproteico con una estructura “en forma de hongo”, formado por dos dominios funcionales: a) F1, constituido por 5 subunidades (α , β , γ , δ y ϵ), y b) F0, constituido por 11 subunidades (a, b, c, d, e, f, g, h, i/j, k, y 8) además de tres subunidades codificadas por ADN mitocondrial (ATPasa6, ATPasa8 y ATPasa9) (Ruehle and Leister, 2015). Dos componentes F0 atraviesan la MI y funcionan como un poro de protones, transfiriendo la energía liberada por el flujo de protones hacia el componente soluble F1; que genera o hidroliza el ATP a través de la acción de un mecanismo de rotación. Funciona por la diferencia de potencial eléctrico entre los dos lados de la membrana en la que se encuentra. La CTE genera un gradiente de protones (Cohen, 2010) en una dirección y la ATP sintasa los devuelve al interior del compartimento celular, de esta manera se mantiene el equilibrio y se obtiene energía en forma de ATP.

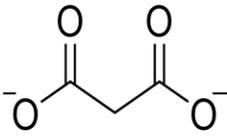
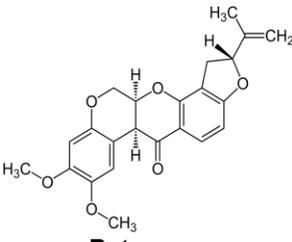
Para el estudio de la CTE se han utilizado compuestos que inhiben alguno de los complejos descritos, y a continuación se mencionan algunas de las características de los inhibidores de la CTE usados en este trabajo.

1.4. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones

Toxinas mitocondriales como la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) o rotenona y el ácido-3-nitropropiónico (3-NP) o malonato; son usados por su funcionamiento como inhibidores del complejo I y II de la CTE. Desencadenan el desarrollo de diferentes eventos en la célula, como el agotamiento en la producción de ATP (Greenamyre et al., 2003), alteran el potencial de membrana a través de la MI, cambios en la concentración de Ca^{2+} , afectan el almacenamiento en el amortiguador de calcio intracelular, conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno. Todos estos eventos conducen a la disfunción mitocondrial (Sandhir and Mehrotra, 2013) y apoptosis. En la Tabla II se muestran algunas de las características de estos compuestos.

Tabla II. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones

Toxina	Generalidades	Sitio de acción
 <p>Acido-3-nitropropiónico</p>	<p>Es una toxina natural sintetizada por hongos de los géneros <i>Aspergillus</i>, <i>Astrágalus</i>, <i>Arthrimum</i> y plantas del genero <i>Indigofera</i>. Es un compuesto neurotóxico que daña preferencialmente el tejido estriatal cuando se administra en roedores en forma sistémica, sin embargo se ha observado que la ingesta accidental produce la degeneración preferencial del putamen, núcleo caudado, corteza cerebral e hipocampo, lo cual se relaciona con la presencia de movimientos anormales y deterioro cognitivo en humanos y reproduce los síntomas de la enfermedad de Huntington (EH). Se ha utilizado ampliamente para generar un modelo experimental para el estudio de la EH.</p>	<p>Inhibe en forma irreversible la succinato deshidrogenasa, la cual participa en el ciclo de Krebs y forma parte del complejo II de la CTE.</p>
 <p>6-hidroxi-dopamina</p>	<p>Compuesto de origen sintético. Se ha utilizado para generar un modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Parkinson (Betarbet et al., 2000; Lev et al., 2013).</p>	<p>Inhibidor del complejo I.</p>

 <p style="text-align: center;">Malonato</p>	<p>Es una toxina natural, se encuentra en los tallos y raíces de 18 especies de leguminosas del género <i>Medicago</i>, <i>Phaseolus</i>, <i>Vicia</i>, <i>Astragalus</i>, <i>Trifolium</i>, <i>Luhinus</i>, <i>Anthyllis</i>, <i>Lotus</i>, <i>Melilotus</i>, <i>Ononis</i>, <i>Colutea</i>, <i>Sophora</i>, <i>Thermopsis</i> y <i>Trigonella</i> (Bentley, 1952). Se ha utilizado para generar un modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Huntington.</p>	<p>Inhibidor selectivo de la succinato deshidrogenasa.</p>
 <p style="text-align: center;">Rotenona</p>	<p>Es un Isoflavonoide de origen natural producido en las hojas, raíces y rizomas de las leguminosas tropicales de los géneros <i>Derris</i>, <i>Lonchocarpus</i>, y <i>Tephrosia</i> (Cabezas et al., 2012). Es una molécula hidrofóbica, que atraviesa la membrana celular con efecto neurotóxico que causa la degeneración selectiva del sistema dopaminérgico (incluyendo las fibras del cuerpo estriado y neuronas) en roedores cuando se administra por vía sistémica. Se ha utilizado para generar un modelo experimental para el estudio de la enfermedad de Parkinson (Betarbet et al., 2000; Hoglinger et al., 2005; Liu et al., 2003).</p>	<p>Inhibidor no competitivo del complejo I</p>

Estos inhibidores de la CTE se han utilizado para investigar la respuesta de células del SN en cultivo. Algunos de los resultados reportados se resumen en la tabla III.

Tabla III. Efecto de inhibidores de la CTE sobre células del SN

Toxina/Sitio de acción	Efecto	Modelo	Concentración	Referencia
6-OHDA (Complejo I)	Causa la muerte de neuronas dopaminérgicas en cuerpo estriado.	In vivo	4 g	Lev et al., 2013 Wang et al., 2013 Gupta et al., 2015a
	Causa la muerte neuronal en comparación con astrocitos corticales que son más resistentes a este compuesto, ya que liberan moléculas de neuroprotección tras el daño como Nrf2.	In vitro neuronas y astrocitos	0-50 µM	
	Provoca la liberación de moléculas proinflamatorias; ON, COX-2, PGE y GSK-3β en astrocitos corticales que pueden contribuir con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.	In vitro astrocitos	0-200 µM	
	Provoca cambios en la morfología de las células, aumenta la muerte celular, disminuye la actividad de la SDH, aumenta la producción de especies reactivas y daña el ADN.	In vitro astrocitos	0-500 µM	

Rotenona (Complejo I)	Altera la morfología nuclear, causa daños en el ADN, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, disminuye la supervivencia celular a causa de estos daños.	In vitro astrocitos	0-10 μ M	Swarnkar et al., 2012
	Daña a neuronas dopaminérgicas provocando su muerte celular, además afecta la expresión y desorganización del centrosoma en ambas células.	In vitro neuronas y células gliales	0-50 nM	Diaz-Corrales et al., 2005
	Daño a neuronas dopaminérgicas, provoca cambios en su morfología y su muerte celular, las células gliales son más resistentes a este compuesto.	In vitro neuronas y células gliales	0-20 nM	Radad et al., 2008
3-NP (Complejo II)	Daña a neuronas de hipocampo, provoca su muerte a bajas concentraciones, son células más vulnerables comparadas con astrocitos corticales.	In vitro neuronas y astrocitos	0-10 mM	Abe and Saito, 1998
	Daña a las neuronas estriatales y corticales, daña el núcleo de estas células e inhibe a la SDH.	In vitro neuronas	0-200 μ M	Galas et al., 2004
	Induce cambios en la morfología mitocondrial, disminuye los niveles de ATP y aumenta la producción de especies reactiva de oxígeno.	In vitro neuronas	0-10 mM	Liot et al., 2009
	Induce a la muerte celular y apoptosis.	In vitro neuronas	0-5 mM	Nasr et al., 2009
	Astrocitos estriatales mostraron mayor vulnerabilidad comparado con astrocitos de corteza y de mesencéfalo. También se observó una sobre regulación de niveles de ATP intracelulares y un aumento en la producción de peróxido, mecanismos que provocan muerte y daño celular.	In vitro astrocitos	0-10 mM	Misiak et al., 2010
Malonato (Complejo II)	Induce a la muerte celular de neuronas de cerebelo, por el aumento de especies reactivas de oxígeno y la disminución de los niveles de GSH en las células.	In vitro neuronas	0-50 mM	Fernandez-Gomez et al., 2005
	Provoca la muerte celular de neuronas a causa de excitotoxicidad generada por este compuesto.	In vivo	0-4 μ M	Zeevalk et al., 1997
Nrf2: factor de transcripción, ON: óxido nítrico, COX-2: ciclooxigenasa-2, PGE: prostaglandina, TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa, GSK-3β: glicógeno sintasa quinasa 3-beta, GSH: glutatión.				

Encontramos que la información del efecto ejercido por estos inhibidores de la CTE es mayoritariamente estudiada en neuronas, por lo que la información respecto a su efecto sobre astrocitos es escasa.

1.6. Astrocitos en enfermedades neurodegenerativas

Durante varios años se han usado modelos experimentales para estudiar los mecanismos implicados en las enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el malonato y el 3-NP se utilizan para generar modelos experimentales de la EH. En éstos, se produce muerte celular en la que participan mecanismos de excitotoxicidad, alteración en el metabolismo mitocondrial y estrés oxidante. En la EH ocurre la muerte selectiva de las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado, y se caracteriza por disfunción motora, cognoscitiva, psiquiátrica y deterioro intelectual. Sin embargo, también los astrocitos se han visto involucrados en el desarrollo de esta enfermedad; en estudios recientes en modelos in vivo se encontró alterada la homeostasis de K^+ en astrocitos debido a la pérdida de la expresión del canal Kir4.1, lo que conduce a la inhibición de la captación de potasio y glutamato (Tong et al., 2014). También se ha observado en astrocitos de ratones transgénicos y pacientes con EH un aumento en la activación de NF- κ B-p65, un mediador de la transcripción de la respuesta inflamatoria, por lo cual una regulación anormal de NF- κ B podría estar asociada con el desarrollo de la enfermedad (Hsiao et al., 2013).

Otro ejemplo es el uso de la 6-OHDA y la rotenona que se utilizan para generar modelos experimentales de la EP. En éstos, se produce muerte celular en la que participan mecanismos de excitotoxicidad y deterioro de la función mitocondrial. En la EP se da la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, y se caracteriza por alteraciones en el movimiento como la bradicinesia y la rigidez. Se ha demostrado que los agregados de α -sinucleína en astrocitos protoplasmáticos están involucrados en el inicio de la EP (Halliday and Stevens, 2011), ya que la pérdida de función de la α -sinucleína en astrocitos activa la participación de los receptores tipo toll 4, que inducen respuestas inflamatorias asociadas con el desarrollo de esta enfermedad (Rannikko et al., 2015) aunque los mecanismos siguen desconocidos.

Durante mucho tiempo los estudios realizados en estas enfermedades neurodegenerativas se han centrado en alteraciones observadas en neuronas, pero cada vez es más evidente que los astrocitos también están involucrados en su desarrollo y queda pendiente profundizar la investigación en este campo.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante las últimas décadas se ha incrementado el estudio de los astrocitos, encontrándose que estas células llevan a cabo diversas funciones que ayudan a mantener la homeostasis en el SNC. Sin embargo, haciendo una comparación entre neuronas y astrocitos, éstos últimos han sido mucho menos estudiados. Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la vía principal para la obtención de ATP es la glucólisis, acoplada a la producción de lactato. Sin embargo, los astrocitos sí tienen mitocondrias y no se ha profundizado en el estudio acerca de la fosforilación oxidativa en estas células. Así, no es claro cómo funciona la cadena de transporte de electrones en astrocitos y si existen diferencias en las vías de producción de energía.

Para comenzar el estudio en la mitocondria se van a utilizar compuestos que se reconocen por inhibir un complejo de la cadena de transporte de electrones: la 6-OHDA y la rotenona (inhiben complejo I) y el 3-NP y malonato (inhiben complejo II). Estos compuestos desencadenan diversos eventos en la célula, como el agotamiento en la producción de ATP, afectan el almacenamiento en el amortiguador de calcio intracelular y conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno. Estos eventos conducen a la disfunción mitocondrial y apoptosis. El efecto ejercido por estos compuestos ha sido más estudiado en neuronas, en astrocitos la información es todavía escasa. Por lo tanto, estudiaremos el efecto que estos compuestos ejercen sobre la actividad de complejo I y II de la CTE y sobre la viabilidad celular. También identificaremos una subunidad de cada complejo de la CTE en astrocitos aislados de corteza, hipocampo y estriado.

3. HIPÓTESIS

Dado que la 6-OHDA, la rotenona, el 3-NP y el malonato inhiben la actividad de la cadena de transporte de electrones en varios tipos celulares, esperamos que también inhiban la actividad de complejo I (6-OHDA y rotenona) y II (3-NP y malonato) en astrocitos, conduciendo a muerte celular.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la respuesta de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones (CTE) en cultivos primarios de astrocitos tratados con inhibidores específicos: rotenona y 6-OHDA para complejo I y 3-NP y malonato para complejo II.

Objetivos particulares

- Determinar la pureza de los cultivos.
- Evaluar la reducción de MTT y la morfología en astrocitos tratados con inhibidores de la CTE.
- Evaluar la actividad del complejo I de la CTE en astrocitos tratados con rotenona o 6-OHDA.
- Evaluar la actividad del complejo II de la CTE en astrocitos tratados con 3-NP y malonato.
- Determinar la presencia de las proteínas de la CTE en astrocitos en cultivo (complejo I: NDUFB8 de 20 kD, complejo II: SDHB de 30 kD, complejo III: Core protein 2 de 48 kD, complejo IV: MTCO1 de 40 kD, y ATP sintasa: ATPSA de 55 kD).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

El medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM), la penicilina/estreptomicina, el suero fetal bovino (FBS) se adquirieron de Life Technologies (Carlsbad, California, USA). El ácido malónico, el 3-NP, la 6-OHDA, la rotenona, la poli-D-lisina (PDL), la tripsina, el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), la antimicina y el NADH se adquirieron de Sigma Aldrich C. (St. Louis, Missouri, USA). La decilubiquinona se adquirió en Enzo (Farmingdale, NY, USA). El anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano, el anticuerpo para detectar integrina α M (OX42) y el estuche comercial ImmunoCruz™ mouse ABC Staining System se adquirieron a Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, Texas, USA). El coctel de anticuerpos MitoProfile® Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail se adquirió en Abcam (Cambridge, Inglaterra, Reino unido). El anticuerpo monoclonal Anti-GFAP y el anticuerpo anti- α O4 se adquirieron en Millipore (Billerica, Massachusetts, USA). El anticuerpo Alexa Flúor-488 y el kit para quimioluminiscencia Norvex® ECL se compraron en Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Los demás reactivos utilizados son grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente.

Equipo. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO₂ HERAcell® y se purificaron con ayuda de un agitador MAX Q Mini y una centrifuga Heraeus Megafuge (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Todas las determinaciones de absorbancia se llevaron a cabo en un lector de placas multimodal Sinergy HT que se adquirió a Biotek (Winooski, VT, Estados Unidos).

5.2. Animales

Se utilizaron ratas neonatas de la cepa Wistar recién nacidas (P0), las cuales fueron obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, “Manuel Velasco Suárez”. Todos los procedimientos se apegaron a la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, así como a la NOM-087-ECOL-1995 para la disposición de residuos biológicos. La manipulación de los animales se realizó siempre procurando minimizar el sufrimiento animal.

5.3. Cultivo primario

Los cultivos primarios se prepararon a partir de ratas Wistar P0 como se ha descrito antes (Vallejo-Illarramendi et al., 2005). Para ello, el cerebro se colocó en solución Hank's y se realizó la disección de estriado, hipocampo y corteza sobre hielo. Después, el tejido se disgregó mecánicamente con agujas calibre 21G en medio Hank's, se incubó durante 15 min a 37°C y se centrifugó a 2000 rpm a 37°C por 5 min. Las células se suspendieron en DMEM suplementado con FBS 10% y penicilina/estreptomicina 1% y se sembraron en frascos de poliestireno de 75 cm² previamente tratados con PDL. Las células se incubaron a 37°C bajo una atmosfera 5% CO₂/95% aire. El medio se cambió después de 24 h y posteriormente dos veces por semana. Entre 15 y 20 días después se preparó un subcultivo. Para esto, la microglía y otras células gliales se eliminaron por agitación a 180 rpm por 20 h. Después, los astrocitos se removieron de los frascos con una solución de tripsina al 0.5% agitando por 5 min a 37°C. El número de células se estimó por exclusión de azul tripano y se sembraron en placas para ser tratadas como se observa en la Tabla IV.

Tabla IV. Preparación de subcultivo de astrocitos.		
Tipo de placa	Tipo de	Determinación
24 pozos		Reducción de MTT
12 pozos (con cubreobjetos de vidrio)	Células fijadas	Tinción H&E
		Inmunodetección
6 pozos	Lisados celulares	Actividad de Complejos I y II
		WB

5.4. Metodología y tratamiento de los subcultivos

Después de realizar el subcultivo de cada región, se dejaron pasar 5 días hasta alcanzar confluencia. Después, los astrocitos se expusieron a los inhibidores de la CTE como se describe en la Figura 7.

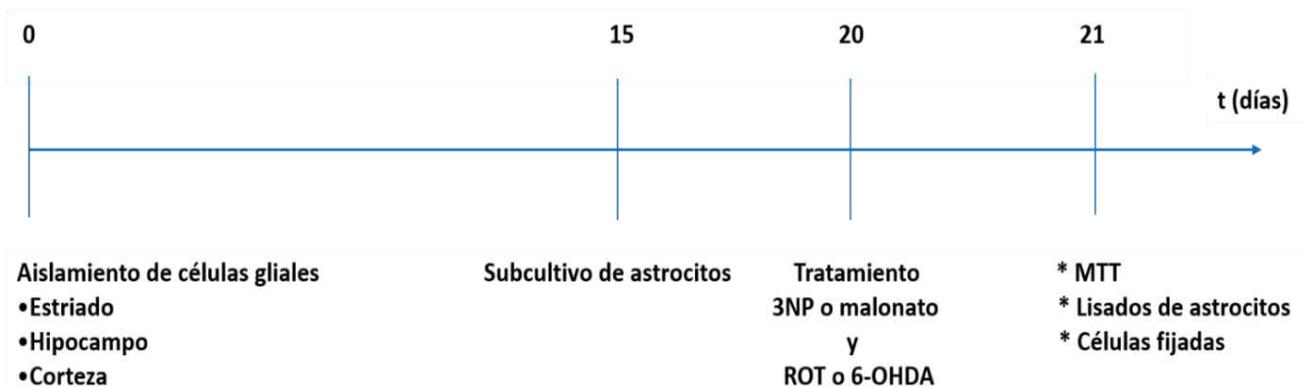


Figura 7. Tratamiento de los cultivos con los inhibidores de la CTE. Las células se expusieron a 3-NP y malonato (0-10 mM) o 6-OHDA y rotenona (0-100 μ M) en medio de cultivo durante 24 h de incubación, pasado el tiempo se obtuvieron las muestras para realizar las mediciones correspondientes. Los astrocitos se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂ durante el tiempo establecido.

➤ **Determinación de la pureza de los cultivos primarios**

Para verificar que las células aisladas eran astrocitos, se realizó la inmunodetección de GFAP, tanto por inmunocitoquímica como por inmunofluorescencia. La presencia de antígenos en las células se detecta mediante un proceso de dos etapas: 1) la unión del anticuerpo primario a un epítipo específico, y la posterior 2) detección de esta unión por una reacción colorimétrica.

Las placas se trataron de acuerdo al Esquema 1. En las cuales se colocaron muestras control de cada región en estudio.

	Estriado	Hipocampo	Corteza
	1	2	3
A	GFAP		
B	OX42		
C	O4		
D			

Esquema 1. A-D: Filas, 1-6: Columnas. La fila A se usó para realizar la inmunofluorescencia, y las filas restantes se utilizaron para la inmunocitoquímica.

Después, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente con agitación constante, una vez fijadas, las células se permeabilizaron con tritón 0.01% y se bloquearon durante 1 h con ASB 2%. Posteriormente se incubó durante 12 h a 4°C con anticuerpo monoclonal anti-GFAP (1:200), anticuerpo anti-OX42 (1:200) o anticuerpo anti- α O4 (1:200), todos hechos en ratón. Pasado el tiempo, se lavó el anticuerpo primario, y después se realizaron las técnicas de inmunocitoquímica o inmunofluorescencia como se describe a continuación:

Inmunocitoquímica: Se usó el estuche comercial ImmunoCruz™ mouse ABC Staining System de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con este sistema de detección, la señal de amplificación se consigue mediante la unión de múltiples unidades de anticuerpo secundario a cada molécula de anticuerpo primario, seguido por la unión de múltiples conjugados de enzima-estreptavidina que se unen al anticuerpo secundario anti-ratón marcado con biotina (1:200), y finalmente la conversión enzimática del sustrato, revelado con diaminobenzidina. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos usando medio de montaje.

Inmunofluorescencia: Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo Alexa Flúor-488 anti-ratón (1:200). Después, se realizaron lavados con PBS, y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos usando vectashield con DAPI como medio de montaje. Se usó un microscopio de la marca Nikon Eclipse E200 para obtener las imágenes, mediante el software Q-Capture Pro 7, 2010 Q Imaging.

➤ Ensayo de reducción de MTT

Este método se ha usado ampliamente para la evaluación de la viabilidad celular (Maria Reyes-Fermin et al., 2012; Mosmann, 1983; Stockert et al., 2012), se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por deshidrogenasas y agentes reductores presentes en las células metabólicamente activas, con lo que se obtiene un compuesto de color azul-violeta (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad de las células tratadas. Se ha reportado ampliamente que la absorbancia es directamente proporcional al número de células activas.

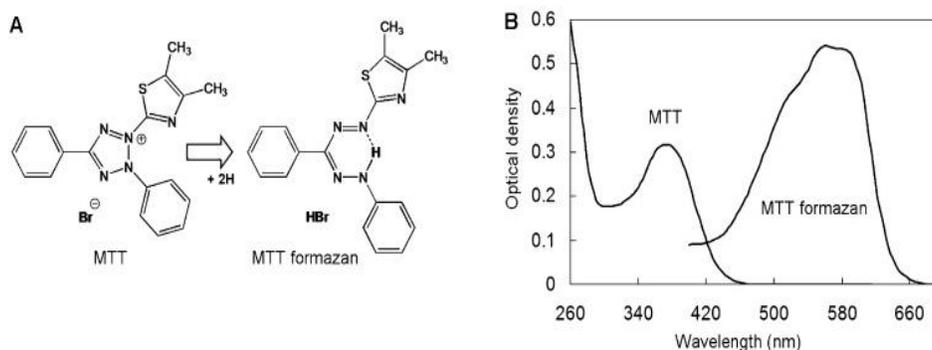


Figura 8. A) Estructura química de MTT y su producto de formazán reducido; B) Los espectros de absorción de MTT en agua destilada y formazán en aceite de girasol en la misma concentración (0.016 mg/ ml). Fuente: (Stockert et al., 2012).

Se realizaron los tratamientos como se muestran en el Esquema 2. En cada experimento, cada concentración se probó por triplicado, usando un par de placas para cada región en estudio.

	3-NP			malonato				6-OHDA			rotenona		
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
A	0 mM			0 mM			A	0 μ M			0 μ M		
B	1 mM			1 mM			B	1 μ M			1 μ M		
C	5 mM			5 mM			C	10 μ M			10 μ M		
D	10 mM			10 mM			D	100 μ M			100 μ M		

Esquema 2. A-D: Filas, 1-6: Columnas.

Posteriormente, se añadieron 250 μ l de MTT (1 mg/ml) a cada pozo y se incubó durante 1.5 h a 37°C. Después de la incubación, se eliminó el medio de cultivo y los cristales de formazán resultantes se disolvieron en isopropanol para medir la absorbancia a 570 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de la reducción de MTT con respecto a los pozos de control.

➤ Tinción Hematoxilina y Eosina

Para observar la morfología de los astrocitos después del tratamiento con los inhibidores de la CTE, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina (H&E). La hematoxilina tiene un color azul-púrpura que se une a las cargas negativas (aniones) de los ácidos nucleicos, por lo que los núcleos se tiñen de color azul. Por su parte, la eosina es de color rosa, y se une a compuestos con cargas positivas, como el citoplasma, por lo que éste se tiñe de color rosa. Los tratamientos se realizaron como se muestra en el Esquema 3.

	3-NP	malonato	6-OHDA	Rotenona
	1	2	3	4
A	0 mM		0 μ M	
B	1 mM		1 μ M	
C	5 mM		10 μ M	
D	10 mM		100 μ M	

Esquema 3. A-D: Filas, 1-4: Columnas.

Después, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min en refrigeración con agitación constante. Para realizar la tinción, las células fijadas se colocaron en etanol 80% durante 5 min, se lavaron y se incubaron en hematoxilina durante 1 h. Posteriormente, se lavó con agua amoniacal, y se incubó por 20 min con eosina, se hizo un último lavado y se montó en portaobjetos. Se usó un microscopio de la marca Nikon Eclipse E200 para obtener las imágenes, mediante el software Q-Capture Pro 7, 2010 Q Imaging.

➤ **Medición de complejo I y II**

Complejo I

Para medir la actividad del complejo I, se usó el método descrito por Long et al. (2009) que se basa en la reducción del 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), un aceptor artificial de electrones (Figura 9).

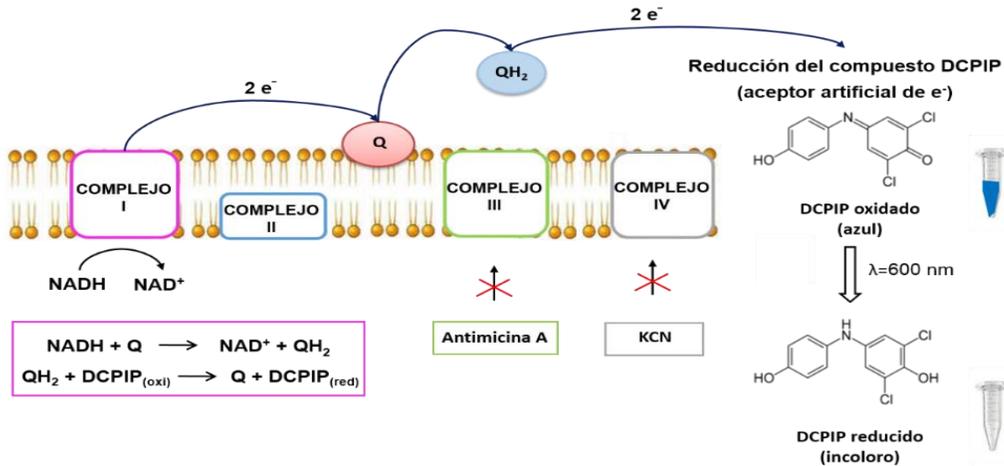


Figura 9. Medición de la actividad de Complejo I. Cuando el NADH se oxida a NAD⁺, dona dos electrones (2e⁻) que pasan por el CI y son recibidos por la decilubiquinona, la cual se oxida a ubiquinol. Éste pasa los 2e⁻ al DCPIP, el cual se reduce pasando de azul a incolore. Para inhibir la actividad de los complejos III y IV se utilizó antimicina A y KCN, respectivamente.

Para cada región cerebral, se realizaron los tratamientos como se muestra en el siguiente esquema.

6-OHDA				rotenona			
1	2	3	4	1	2	3	4
0 μM	1 μM	10 μM	100 μM	0 μM	1 μM	10 μM	100 μM

Las células se lisaron con amortiguador de fosfatos de potasio pH=7.5 con inhibidores de proteasas y tritón 1%. Los lisados se almacenaron a -70 °C hasta su análisis. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry. Este método se basa en la reactividad del nitrógeno y los aminoácidos con los iones Cu²⁺ en condiciones alcalinas y en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (fosfomolibdato y fosfotungsteno) a heteropolimolibdeno por la oxidación catalizada por cobre de los aminoácidos aromáticos tirosina y triptófano. El Folin reducido es de color azul y detectable en el rango de 500-750 nm.

El ensayo se llevó a cabo utilizando una dilución 1:8 de la muestra, los valores obtenidos de absorbancia se extrapolaron a una curva estándar de ASB, se midieron a 660 nm, el resultado se expresó en mg proteína/ml.

El ensayo para determinar la actividad del complejo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía BSA 3 mg/ml, NADH 60 μ M, KCN 2 mM, antimicina A 2 μ M, decilubiquinona 60 μ M y DCPIP 5 mM en amortiguador de fosfatos de potasio 10 mM, pH 7.4. La reacción se inició al colocar 95 μ l de la mezcla de reacción y aprox. 2.5-4 μ g de proteína; la reducción del DCPIP se monitoreó a 600 nm por 5 minutos, el resultado se expresó en nmol/min/mg proteína.

Complejo II

Para medir la actividad del complejo II, se utilizó el método descrito por Kirby et al. (2007), que se basa en la reducción del DCPIP (Figura 10).

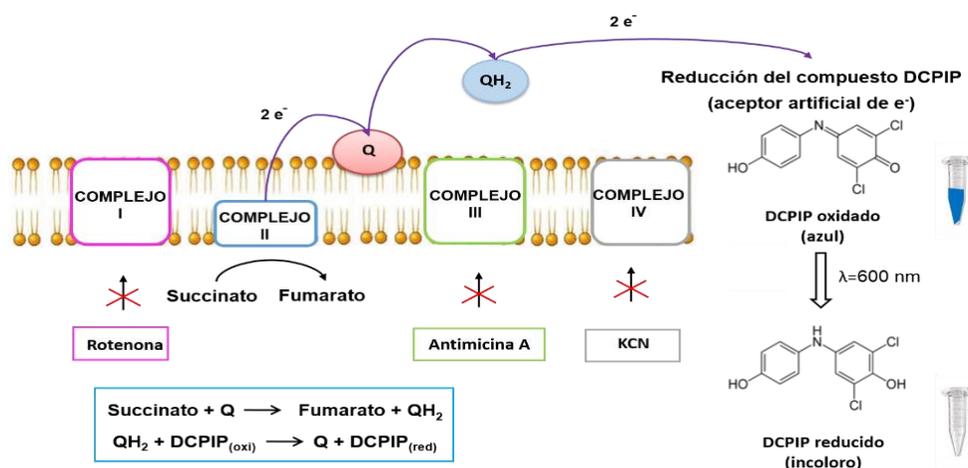


Figura 10. Medición de la actividad de Complejo II. Cuando el succinato se oxida a fumarato, dona dos electrones ($2e^-$) que pasan por el CII hasta la decilubiquinona, la cual se oxida a ubiquinol y luego pasa los $2e^-$ al DCPIP y éste se reduce pasando de azul a incoloro. Para inhibir la actividad de los complejos I, III y IV se utilizó rotenona, antimicina A y KCN, respectivamente.

Se utilizaron células sin tratamiento de cada región cerebral estudiada. Las células se lisaron con amortiguador de fosfatos de potasio pH=7.5 con inhibidores de proteasas y tritón 1%. Los lisados se almacenaron a -70°C hasta su análisis. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry.

El ensayo para la determinación de la actividad del complejo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía antimicina A 2 μ M, rotenona 2 μ g/ml, KCN 2 mM y DCPIP 5 mM en amortiguador de fosfatos de potasio 10 mM, pH 7.4.

Se mezclaron 95 μ l de mezcla de reacción y distintas cantidades de proteína (5, 10, 15, 20 y 25 μ g). La reacción se inició al colocar decilubiquinona y la reducción del DCPIP se monitoreó a 600 nm por 5 minutos, el resultado se expresó nmol/min/mg proteína.

➤ **Determinación del nivel de proteína por Western Blot**

El nivel de proteína se evaluó mediante inmunodetección por western blot (Orozco-Ibarra et al., 2009). Se usó un coctel de anticuerpos MitoProfile® Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail hecho en ratón (Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino unido), que detecta la presencia de cinco proteínas, una subunidad de cada complejo mitocondrial: subunidad del complejo I (NDUFB8, 20 kD), complejo II (SDHB, 30 kD), complejo III (Core protein 2, 48 kD), complejo IV (MTCO1, 40 kD) y complejo V (ATPSA, 55 kD). Para esto, se utilizaron 25 μ g de proteína por muestra, se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles de gradiente (12%, 15% y 20%), y se transfirieron a una membrana de PVDF.

Ésta se bloqueó durante 2 h con leche descremada 5% en solución TBS-T (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, Tween 20 0.05%), posteriormente se incubó durante 12 h a 4°C con una dilución 1:30,000 del coctel de anticuerpos, con agitación suave. Después se lavó y se incubó durante 1.5 h con anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (1:20,000). Las bandas reactivas se visualizaron mediante un sistema de detección quimioluminiscente.

5.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el programa Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, California, USA), mediante ANOVA de dos vías seguida de la prueba de Bonferroni. Los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM). Se consideraron diferencias significativas a $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

A. Pureza de cultivos primarios

Para demostrar que las células aisladas eran astrocitos, se utilizó la técnica de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia (Figura 11), utilizando un anticuerpo primario para detectar GFAP que es un marcador de astrocitos. En la Figura 11 se muestran imágenes representativas de los cultivos primarios preparados a partir de ratas P0. En ambas técnicas (inmunocitoquímica, panel A e inmunofluorescencia, panel B) se observa la expresión de la proteína GFAP, indicando que las células en cultivo fueron predominantemente astrocitos. La morfología de las células es similar en todas las regiones estudiadas.

Por medio de la inmunocitoquímica (panel A) se comprobó la ausencia de otras células gliales en el cultivo, ya que se usaron anticuerpos anti-OX42 y anti-O4, ambos marcadores de microglía y oligodendrocitos, encontrándose un resultado negativo (no se muestran las imágenes). Estos resultados nos confirman la ausencia de otras células gliales en los cultivos y asegurar que los experimentos realizados en este estudio fueron con astrocitos.

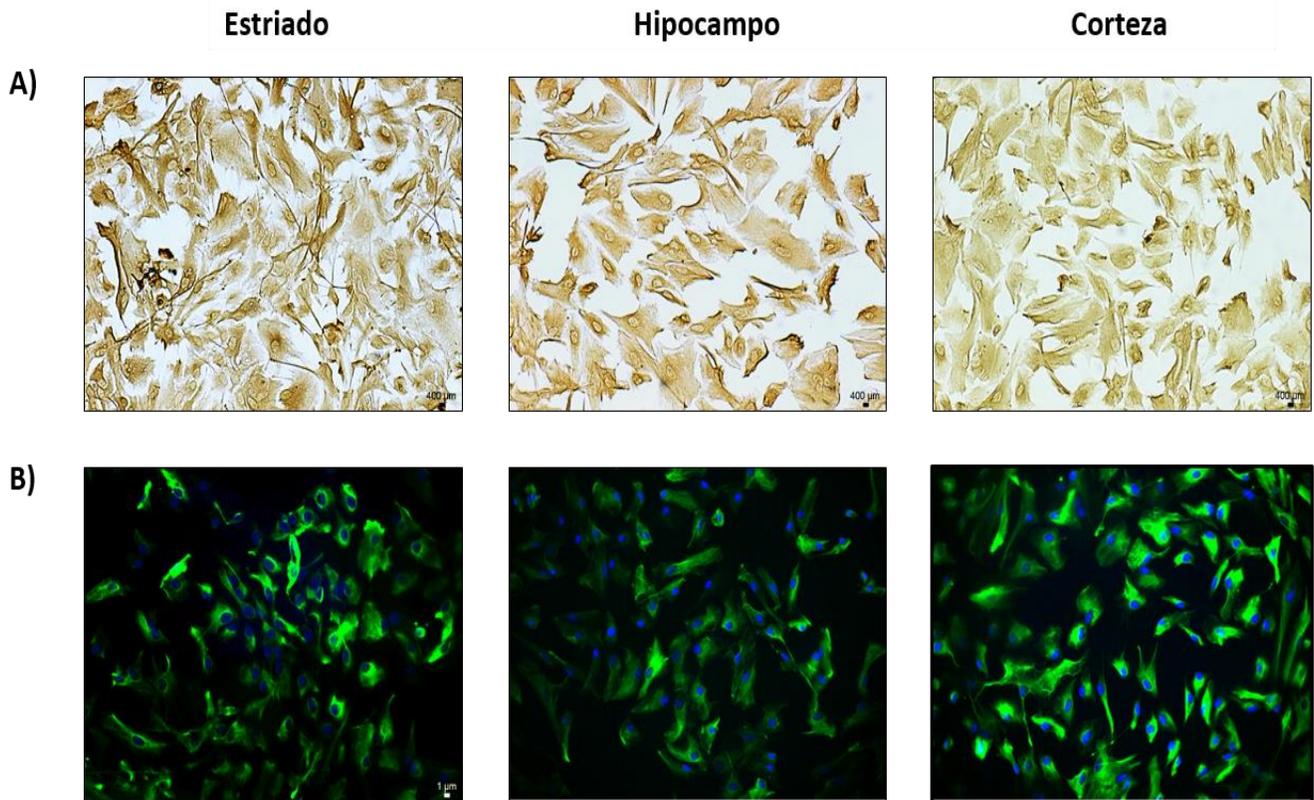


Figura 11. Imágenes representativas de astrocitos en cultivo primario. A) Inmunocitoquímica y B) Inmunofluorescencia, GFAP: verde y DAPI: azul.

B. Efecto de los inhibidores de complejo I en astrocitos en cultivo

➤ Reducción de MTT

En la Figura 12 se puede observar que la 6-OHDA (panel A) no afecta la reducción de MTT en las regiones en estudio a concentraciones de 0-100 μM . En el caso de la rotenona (panel B), se encontró un aumento en la reducción de MTT de 36.6% en estriado y de 47.9% en hipocampo a una concentración de 100 μM , mientras que en corteza no se encontró diferencia significativa.

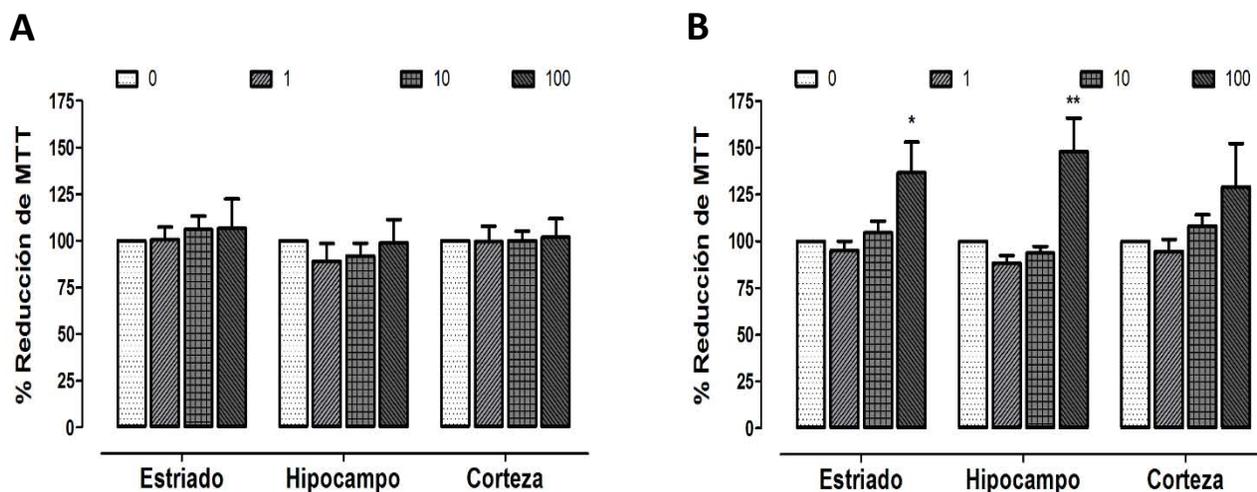


Figura 12. Efecto de los inhibidores de complejo I sobre la reducción de MTT. A) Tratamiento con 6-OHDA y B) Tratamiento con rotenona. Se midió a las 24 h de incubación con el inhibidor correspondiente. ANOVA de dos vías seguida por Bonferroni. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de cuatro a cinco experimentos independientes. Las barras que se muestran arriba de cada gráfica son las concentraciones (μM) usadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs 0 μM .

➤ Tinción con Hematoxilina y Eosina

A pesar de los resultados de la reducción de MTT, al observar al microscopio las células tratadas con 6-OHDA o rotenona se observó que el tratamiento disminuía la cantidad de células en las concentraciones más altas. Para evidenciar este efecto y observar la morfología se empleó la técnica de H&E. En la Figura 13 y 14, se muestran imágenes representativas de astrocitos después del tratamiento, en estas imágenes se observa que las células sin tratamiento tienen el núcleo bien delimitado y se encuentran confluentes. Al ser tratadas con 6-OHDA (Figura 13), desde la concentración más baja, las células presentan cambios morfológicos como cambio en el tamaño de la célula (retracción celular) y pérdida de confluencia. En concentraciones de 10 y 100 μM los núcleos pierden la apariencia que presentan las células sin tratamiento hay una disminución notable del número células en todas las regiones.

Además, conforme los astrocitos se trataron con una mayor concentración de 6-OHDA, fueron perdiendo la afinidad por los colorantes usados en la técnica de H&E, especialmente los aislados de hipocampo perdieron la afinidad por la eosina.

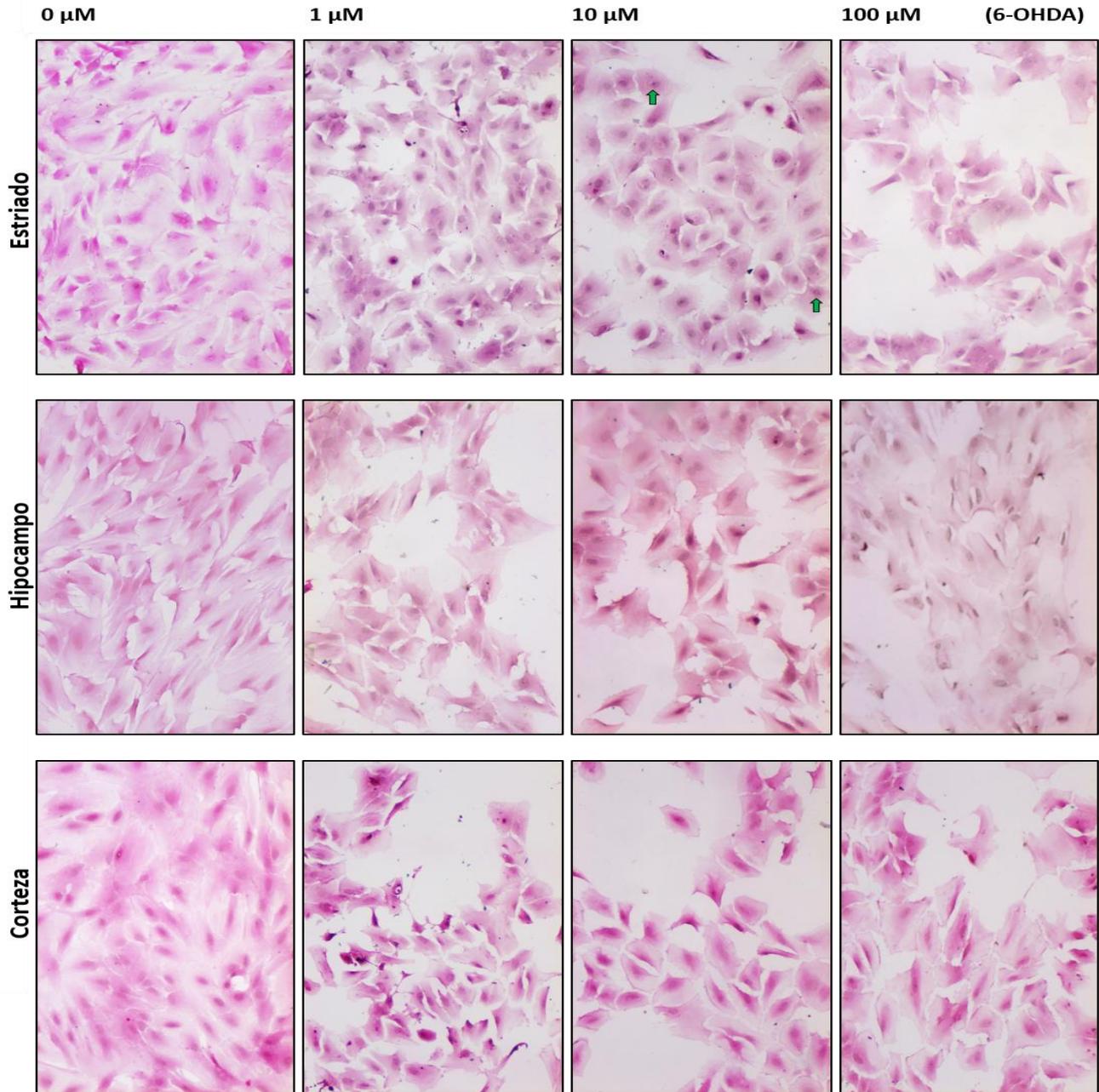


Figura 13. Imágenes representativas del efecto del tratamiento con 6-OHDA. Se determinó después de 24 h de incubación con el inhibidor. Se obtuvo una n=1, sin embargo estos cambios se observaron a lo largo de los experimentos realizados para su estudio.

En el caso de la rotenona (Figura 14) se encontraron resultados similares, el tratamiento de los astrocitos desde la concentración 1 μM también ocasionó la pérdida de la confluencia, cambios en la morfología y el tamaño de las células (retracción celular).

En concentraciones de 10-100 μM los núcleos perdieron su apariencia normal y hubo una disminución del número de células en todas las regiones en estudio. En corteza y estriado se pudo observar en la concentración de 10 μM células con cambios marcados en la afinidad por la hematoxilina (señaladas con una flecha en verde). Las células de hipocampo perdieron la afinidad por la eosina.

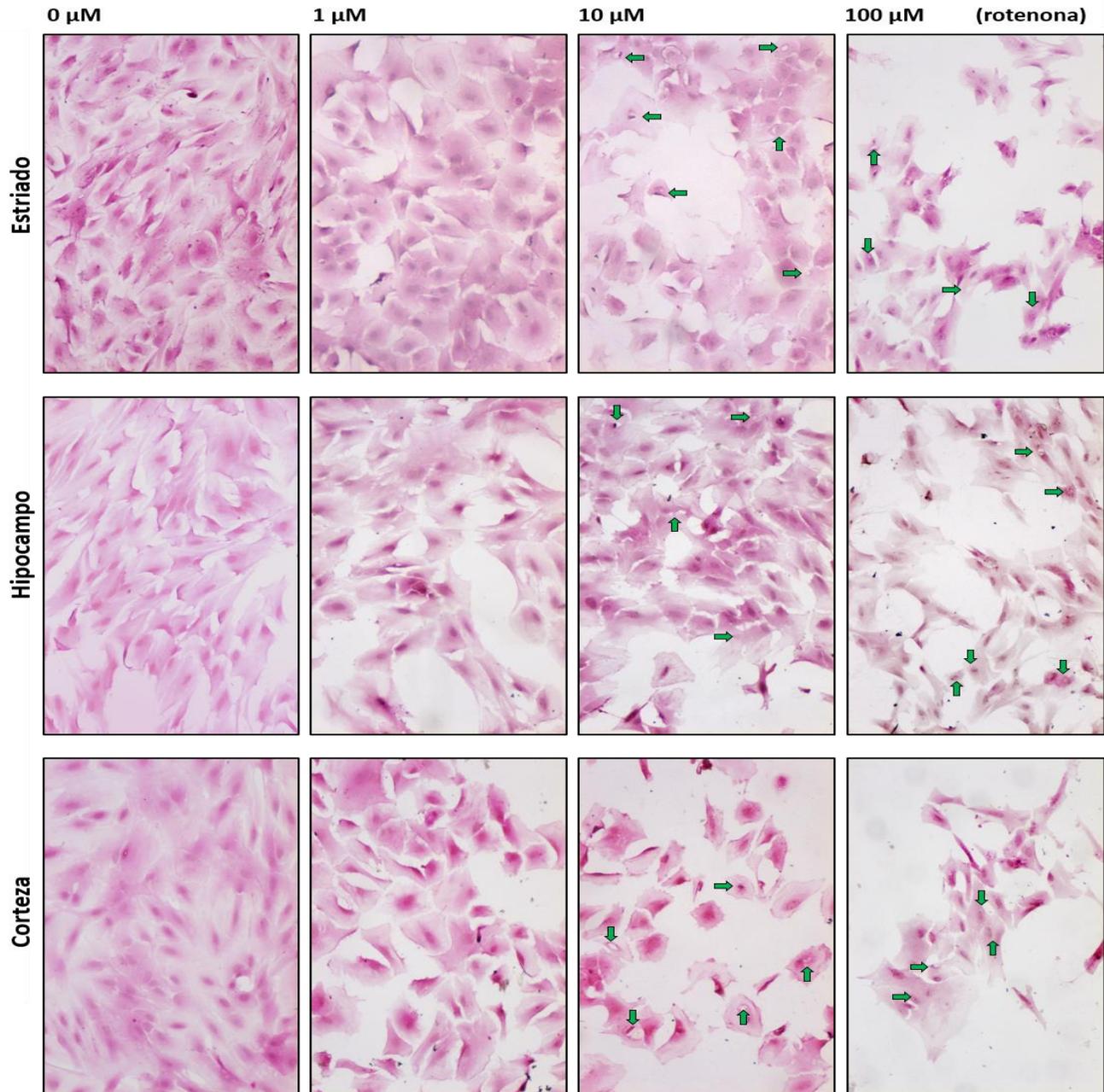


Figura 14. Imágenes representativas del efecto del tratamiento con rotenona. Se determinó después de 24 h de incubación con el inhibidor. $n=1$, sin embargo estos cambios se observaron a lo largo de los experimentos realizados para su estudio.

➤ Actividad de complejo I

En la Figura 15 se puede observar que la 6-OHDA (panel A) aumenta la actividad de complejo I en estriado en alrededor de 43% a la concentración de 100 μM . Aunque en hipocampo y corteza también se observa una mayor actividad del complejo en las concentraciones más altas de 6-OHDA, no se encontró diferencia significativa.

En el caso de la rotenona (panel B), el tratamiento no modificó la actividad del complejo en ninguna de las regiones estudiadas.

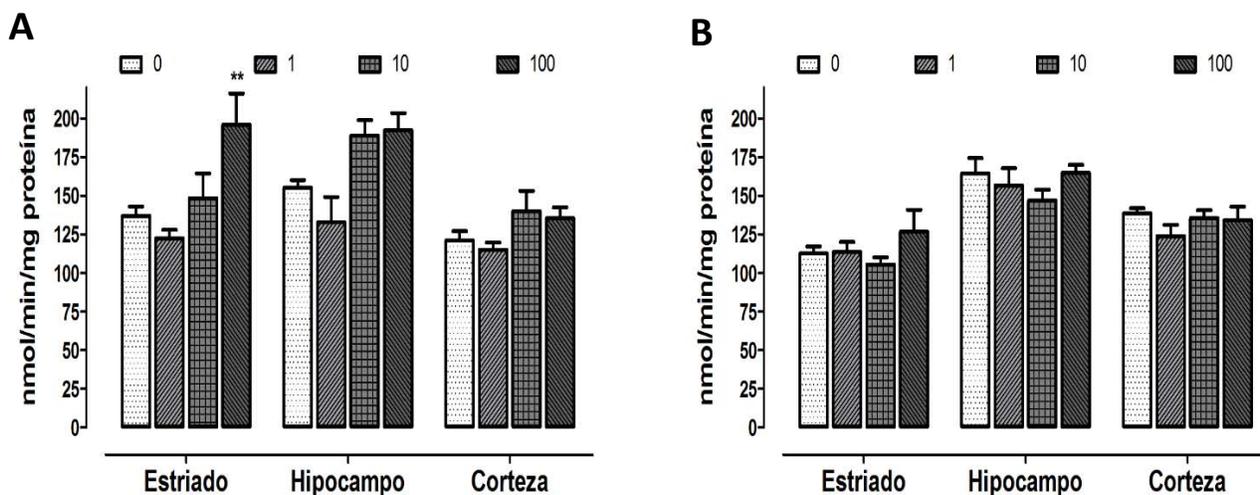


Figura 15. Actividad del complejo I de la CTE. Tratamiento con A) 6-OHDA y B) rotenona. Se determinó después de 24 h de incubación con cada compuesto. Para medir la actividad del complejo I se utilizaron 2.5 μg de proteína. ANOVA de dos vías seguida por Bonferroni. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de tres a cuatro experimentos independientes. Las barras que se muestran arriba de cada gráfica muestran las concentraciones (μM) usadas. ** $p < 0.01$ vs 0 μM .

C. Efecto de los inhibidores de complejo II en astrocitos

➤ Reducción de MTT

En la Figura 16 se puede observar que el 3-NP (panel A) no afecta la reducción de MTT en las regiones en estudio a concentraciones de 0-10 mM. En el caso de el malonato (panel B), se encontró en estriado una disminución en la reducción de MTT de 27.7% en a una concentración de 10 mM, mientras que en hipocampo y corteza no se encontró diferencia significativa.

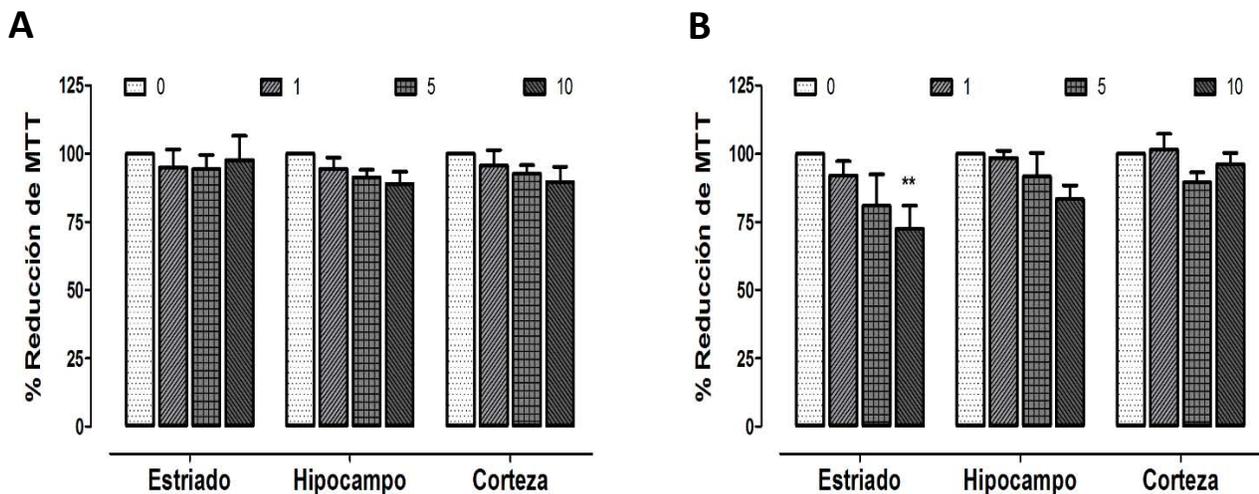


Figura 16. Efecto de los inhibidores de complejo II sobre la reducción de MTT. A) Tratamiento con 3-NP y B) Tratamiento con malonato. Se midió a las 24 h de incubación con el inhibidor correspondiente. ANOVA de dos vías seguida por Bonferroni. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM de tres a cuatro experimentos independientes. Las barras que se muestran arriba de cada gráfica son las concentraciones (μ M) usadas. ** $p < 0.01$ vs 0 μ M.

➤ Tinción con Hematoxilina y Eosina

Para observar la morfología y la cantidad de células después de los tratamientos, se empleó la técnica de H&E. En la Figura 17 y 18, se muestran imágenes representativas, en las cuales se observa que las células sin tratamiento tienen el núcleo bien delimitado y se encuentran confluentes. Al ser tratadas con concentraciones crecientes de 3-NP (Figura 17) o malonato (Figura 18), se observaron cambios notables en cuanto a la afinidad de las células por los colorantes usados en la técnica de H&E, especialmente los aislados de hipocampo, en que a 10 mM la tinción fue muy tenue. Sin embargo, no se encontró disminuido el número de células en el cultivo.

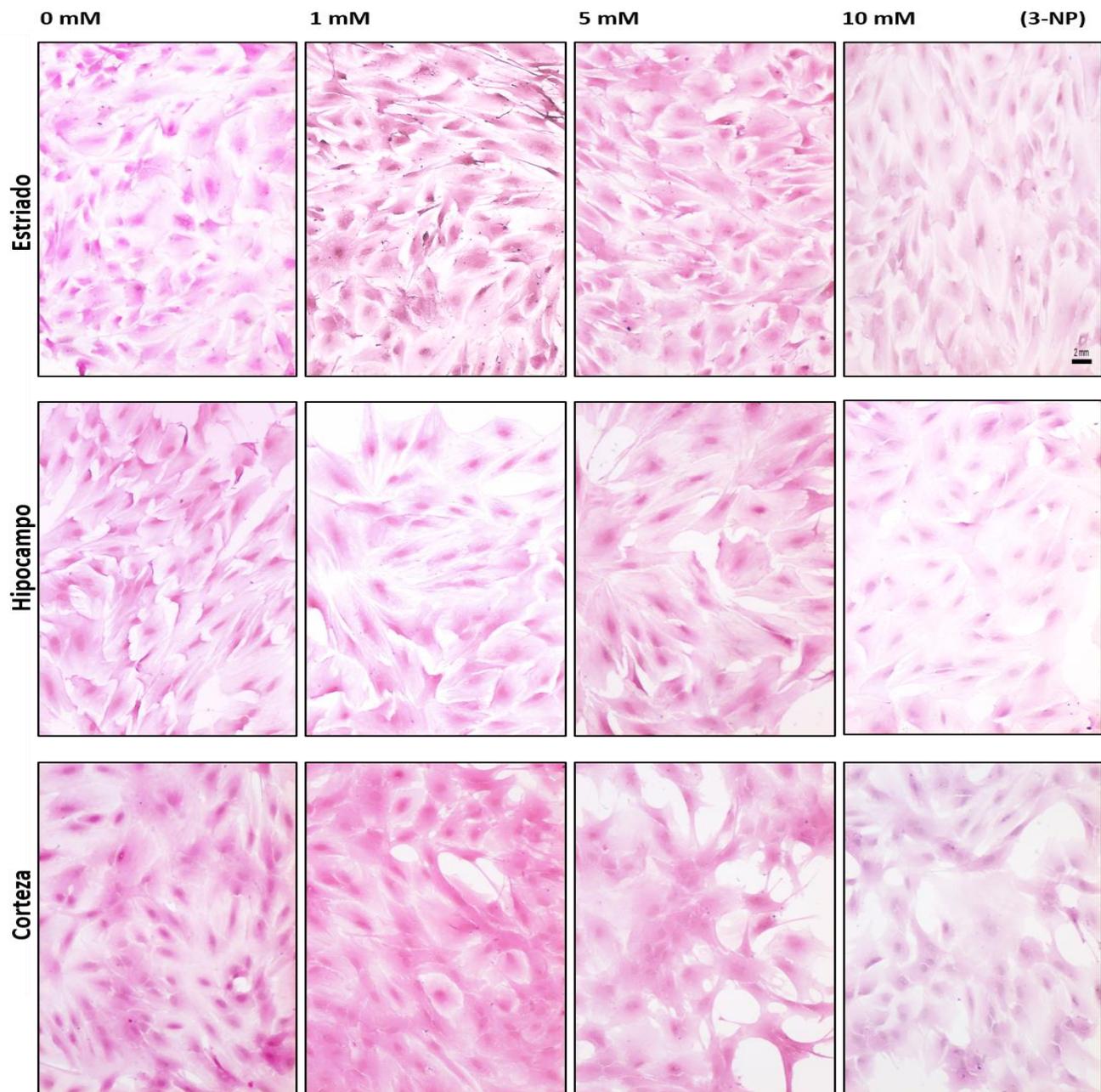


Figura 17. Imágenes representativas del efecto del tratamiento con 3-NP. Se determinó después de 24 h de incubación con el inhibidor. n=1, sin embargo estos cambios se observaron a lo largo de los experimentos realizados para su estudio.

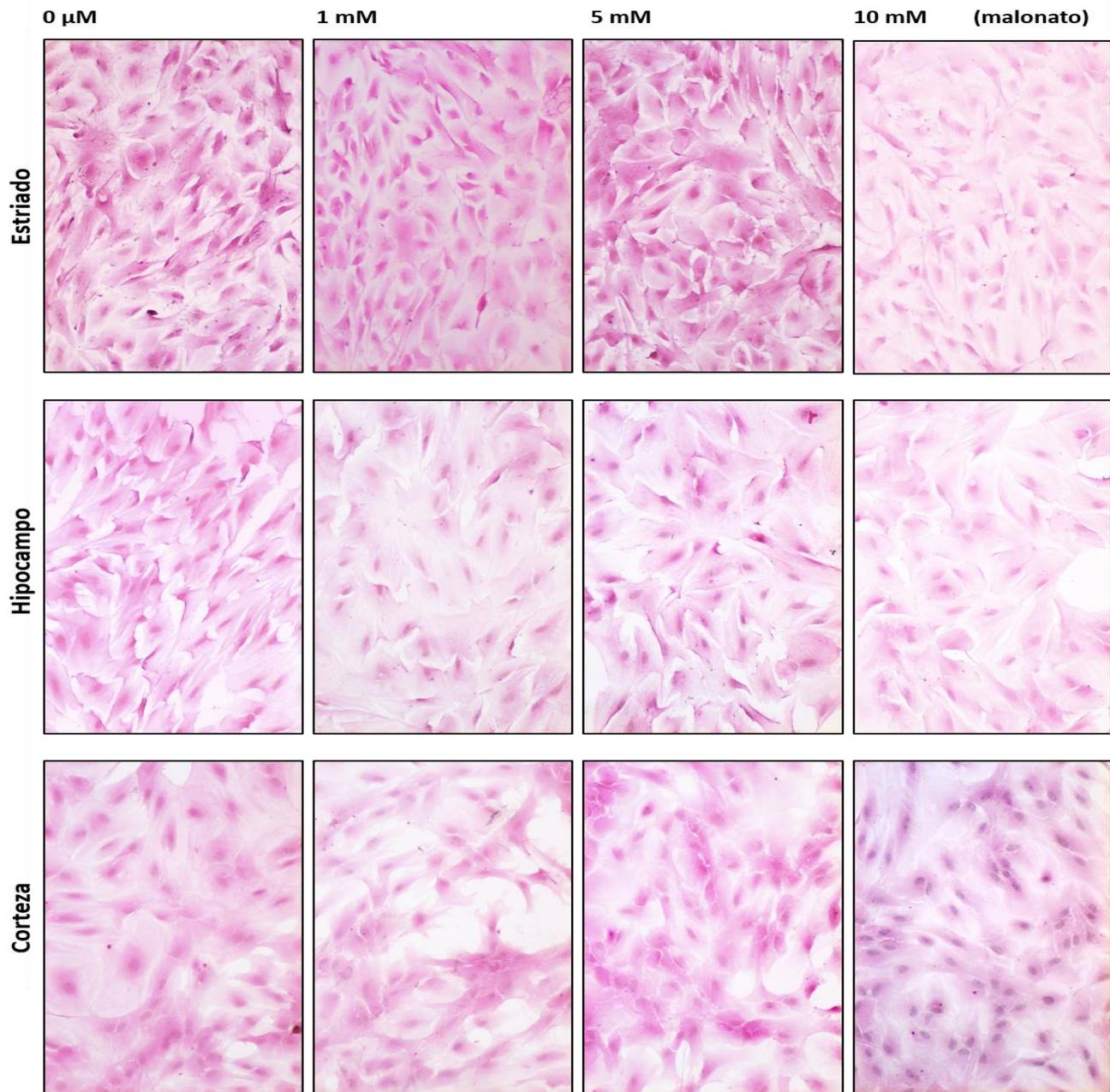


Figura 18. Imágenes representativas del efecto del tratamiento con malonato. Se determinó después de 24 h de incubación con el inhibidor. n=1, sin embargo estos cambios se observaron a lo largo de los experimentos realizados para su estudio.

➤ Actividad de complejo II

Al tratar de determinar la actividad del complejo II en astrocitos aislados de estriado, corteza e hipocampo, iniciamos usando 2.5 μ g de proteína. Sin embargo, no se detectó actividad con esa cantidad de proteína ni aun cuando se aumentó hasta 25 μ g de proteína.

En cambio, con la misma mezcla de reacción sí se detectó la actividad de complejo II a partir de mitocondrias aisladas de corazón, como se reporta en la tabla V.

Tabla V. Actividad de complejo II

Muestras	Control (+)	Astrocitos estriado	Astrocitos hipocampo	Astrocitos corteza	Actividad de complejo II en mitocondrias de corazón
Cantidad de proteína (µg)	Actividad nmol/min	Actividad nmol/min	Actividad nmol/min	Actividad nmol/min	
5	9.5	Nd	Nd	Nd	
10	7.1	Nd	Nd	Nd	
15	8.5	Nd	Nd	Nd	
20	7.3	Nd	Nd	Nd	
25	6.2	Nd	Nd	Nd	

Como control positivo se utilizó tejido de corazón de la cual se aislaron las mitocondrias. Para medir la actividad de complejo II en astrocitos se usaron diferentes cantidades de lisados de astrocitos de estriado, hipocampo y corteza, n=4. nd: no detectada. En la gráfica se observa la actividad de complejo II de mitocondrias, con diferentes cantidades de proteína. Los valores se expresaron como el promedio \pm EEM. n=2.

D. Detección de proteínas de la CTE

La determinación de una proteína de cada complejo mitocondrial, se realizó por western blot y los resultados se muestran en la Figura 19, así como la imagen esperada según la hoja técnica del fabricante (panel A). Se utilizaron lisados de astrocitos de estriado, hipocampo y corteza, y como control positivo: a) mitocondrias aisladas de corazón y b) lisado de neuronas granulares de cerebelo. A los 5 minutos de exposición (panel B), se detectó claramente la presencia de todas las proteínas de la CTE buscadas en el carril correspondiente a mitocondrias aisladas de corazón; mientras que en neuronas se detectó claramente complejo III y complejo V y bandas tenues correspondientes a los complejos I y II. Sin embargo, en astrocitos sólo se encontraron bandas tenues de complejo V. A los 10 minutos de exposición (panel C) se observaron bandas tenues correspondientes a complejo I y complejo II en los carriles correspondientes a lisados de astrocitos. A los 60 minutos de exposición (panel D), se observaron claramente todas las bandas esperadas en la muestra de neuronas granulares de cerebelo, y bandas claras correspondientes a los complejos I, II, III y V en astrocitos.

A pesar de prolongar el tiempo de exposición por 24 h (panel E) no fue posible localizar una banda correspondiente a complejo IV (subunidad MTCO1 de 40kD) en astrocitos.

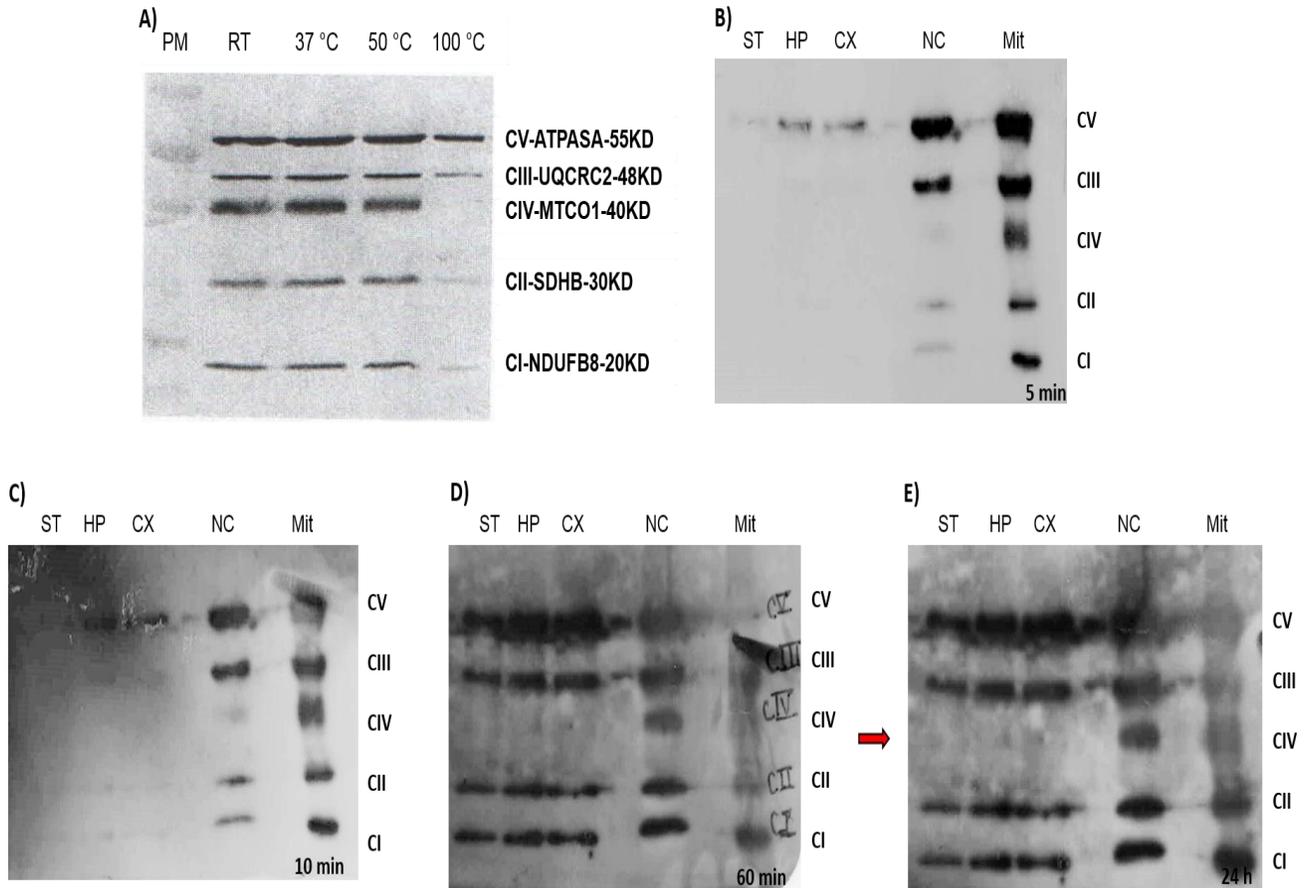


Figura 19. Presencia de proteínas de la CTE. Se colocaron muestras de astrocitos control sin inhibidores de la CTE, de diferentes regiones. ST: Estriado, HP: Hipocampo, CX: Corteza, NC: neuronas de cerebelo y Mit: Mitocondrias aisladas de corazón. Se utilizaron 25 µg de proteína. El panel A) es la representación de la hoja técnica del coctel de anticuerpos, Complejo I subunidad NDUFB8 de 20kD, complejo II subunidad SDHB de 30 kD, complejo III subunidad Core protein 2 de 48 kD, complejo IV subunidad MTCO1 de 40kD, y complejo V subunidad ATPSA de 55 kD. Muestras a diferentes tiempo de exposición B) 5 min, C) 10 min, D) 60 min y E) 24 h.

7. DISCUSIÓN

Los astrocitos tienen un papel importante en el SNC, son células esenciales para mantener la homeostasis en el cerebro (Verkhratsky et al., 2015). Su metabolismo energético está estrechamente regulado mediante la producción de ATP a través de la glucólisis. Sin embargo, no se está muy claro cuál es la participación de la CTE en estas células, ya que se ha demostrado que contienen una gran cantidad de mitocondrias localizadas en su estructura celular (Derouiche et al., 2015).

Para la realización de este estudio utilizamos como herramienta cultivos primarios de astrocitos aislados de corteza, hipocampo y estriado. En éstos, se detectó la presencia de la proteína GFAP, presente en los filamentos intermedios de estas células y utilizado actualmente como un marcador para su detección (Sukhorukova et al., 2015). Su detección se realizó mediante la técnica de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia, por medio de estas técnicas se obtuvieron imágenes representativas de los cultivos primarios, en los cuales se observó la expresión de la proteína GFAP indicando la predominancia de astrocitos en los cultivos y permitiendo observar su morfología. Por medio de la inmunocitoquímica se comprobó la ausencia de otras células gliales en el cultivo, ya que se usaron anticuerpos anti-OX42 y anti-O4, marcadores de microglía y oligodendrocitos, respectivamente. Mediante la determinación de la pureza de los cultivos primarios aseguramos que la respuesta obtenida seguida del tratamiento con estos compuestos es primordialmente de astrocitos.

Las regiones cerebrales de las cuales se aislaron los astrocitos usados en este estudio se eligieron por su relevancia en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Una de las características de la Enfermedad de Parkinson es la pérdida de neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia nigra, estas se proyectan al estriado y por consiguiente hay pérdida de axones y agotamiento de la dopamina en esta región. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza la presencia de placas extracelulares de péptido β -amiloide que afectan las regiones del cerebro implicadas en el aprendizaje y la memoria, en particular el hipocampo y la corteza. En la Enfermedad de Huntington se ha visto que la región más susceptible es el estriado, donde ocurre la muerte selectiva de neuronas espinosas medianas, aunque a largo plazo se pueden ver afectadas otras regiones como el globo pálido, el tálamo y el núcleo subtalámico (Kubik and Philbert, 2015; Pinto et al., 2012).

En este trabajo, encontramos una respuesta muy parecida de los astrocitos aislados de las diferentes regiones que estudiamos. Sin embargo, no podemos descartar que haya diferente susceptibilidad en astrocitos aislados de diferentes regiones.

El objetivo de utilizar el ensayo de reducción de MTT fue en un inicio evaluar la viabilidad celular, ya que se ha reportado que la cantidad de formazán producido al reducirse el MTT es directamente proporcional al número de células vivas (van Meerloo et al., 2011). Este método se ha usado para evaluar citotoxicidad, proliferación celular e incluso función mitocondrial (Bernas and Dobrucki, 2000; Stockert et al., 2012). Sin embargo, aún no es muy claro cuál es el sitio celular donde se lleva a cabo la reducción de MTT.

En este trabajo, no se detectaron cambios en el porcentaje de reducción de MTT, aunque la observación al microscopio de las células tratadas con 6-OHDA o rotenona reveló una disminución del número de células en las concentraciones más altas. Para evidenciar este efecto y observar la morfología celular se empleó la técnica de H&E, donde encontramos cambios morfológicos y pérdida de la confluencia en los cultivos, así como una disminución notable del número de células en todas las regiones. Esto es, una menor cantidad de células resultó en la misma o mayor cantidad de formazán comparadas con el control. Por lo tanto, indirectamente el resultado de la reducción de MTT indica que hay cambios metabólicos en las células, pero no lo podemos utilizar como ensayo de viabilidad celular. Encontramos que astrocitos tratados con rotenona mostraban una tendencia a incrementar la cantidad de formazán a altas concentraciones, a pesar de observar la disminución del número de células.

Para explicar estos resultados hay que recordar que los astrocitos metabolizan la glucosa por las vías citosólicas: glucólisis o la vía de las pentosas fosfato. Se ha reportado que algunas enzimas de estas vías, como la acetaldéhidó deshidrogenasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa reducen el MTT (Vistica et al., 1991). Por lo tanto, la activación del metabolismo de la glucosa podría causar un aumento en la reducción de MTT. También se ha reportado que el MTT es reducido por agentes reductores y enzimas localizadas en la mitocondria (la isocitrato deshidrogenasa, la alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa), en retículo endoplásmico y en la membrana plasmática (Bernas and Dobrucki, 2000). Sin embargo, se requiere comprobar y medir la actividad de estas enzimas para comprobar si el tratamiento con rotenona aumenta su actividad.

La 6-OHDA y la rotenona son compuestos conocidos por su capacidad de inhibir la actividad de complejo I de la CTE y se utilizan para generar modelos experimentales de la EP en roedores (Betarbet et al., 2000; Kupsch et al., 2014; Winklhofer and Haass, 2010). Se ha reportado la disminución de la actividad de complejo I en mitocondrias aisladas del estriado de ratas tratadas con 6-OHDA (Kumar et al., 2012; Tobon-Velasco et al., 2013). También se ha informado que la rotenona disminuye la actividad del complejo I en cultivos primarios de neuronas y en mitocondrias aisladas de cuerpo estriado (Scola et al., 2014). Sin embargo, no se ha estudiado el efecto que ejercen estos compuestos sobre los astrocitos. Por los datos de la literatura, esperábamos encontrar inhibido el complejo I en astrocitos al ser tratados con 6-OHDA o rotenona.

Sorprendentemente, la actividad de complejo I no disminuyó con el tratamiento de 6-OHDA ni de rotenona en estas células. Incluso ante la exposición de 6-OHDA, se detectó la tendencia a aumentar la actividad de complejo I en estriado e hipocampo.

No se sabe con exactitud cuál es el sitio de unión de la rotenona al complejo I, pero se ha sugerido que podría estar localizado en alguno de los nueve centros hierro-azufre, o en la flavina mononucleótido que conforma a este complejo e incluso en el sitio de unión de semi-ubiquinona (Berndt et al., 2013). Por lo cual se podría pensar que existen diferencias en los sitios de unión presentes en astrocitos con respecto al de otras células. Como los estudios con 6-OHDA y rotenona se han realizado con modelos in vivo, no se discrimina si estos compuestos tienen efectos diferentes en los diferentes tipos de células del estriado. Estos resultados nos dan un punto de partida para profundizar el estudio del complejo I en astrocitos y estudiar el mecanismo por el cual la 6-OHDA y la rotenona provocan muerte celular sin inhibir la actividad de complejo I de astrocitos.

Para el estudio de complejo II de la CTE se utilizaron 3-NP y malonato, compuestos conocidos por su capacidad de inhibir la actividad de complejo II de la CTE y que a partir de ello generan modelos experimentales de la EH (Hariharan et al., 2014; Tunez et al., 2010). Se ha reportado que el 3-NP inhibe la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en diferentes regiones cerebrales tales como el hipocampo, el cuerpo calloso, la corteza cerebral, siendo el cuerpo estriado la región más vulnerable (Brouillet et al., 1998).

También se ha informado que el malonato disminuye la actividad de complejo II en mitocondrias aisladas de cuerpo estriado (Kalonja et al., 2010). Por lo tanto, se esperaba que el tratamiento con 3-NP o malonato disminuyera la actividad de la SDH en astrocitos.

Muchos autores fundamentan el uso de la técnica de reducción de MTT como marcador de actividad mitocondrial en que la SDH -localizada en mitocondria- es la enzima que reduce este compuesto. Por lo tanto, se esperaba que al exponer los astrocitos a 3-NP o malonato se encontrara una menor reducción de MTT. Sin embargo, como ya se mencionó antes, la reducción de MTT no es exclusiva de mitocondria, hay otros compartimentos celulares que participan en la reducción del MTT.

El 3-NP no afectó la reducción de MTT de los astrocitos provenientes de ninguna de las regiones cerebrales en estudio. En el caso del malonato, sólo se encontró una disminución de la reducción de MTT en estriado. No se encontró disminución del número de células en los cultivos, es decir, la exposición a 3-NP o malonato no es tóxica para los astrocitos. Sin embargo, no descartamos cambios metabólicos en respuesta a la incubación con estos compuestos.

Para medir la actividad de complejo II usamos un método que se ha utilizado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular para realizar varios trabajos previos (García, 2014; Luis, 2014) que se basa en reportes de la literatura (Kirby et al., 2007). Inesperadamente, no se detectó la actividad del complejo II en astrocitos de ninguna de las regiones en estudio. Sí se detectó actividad en mitocondrias de corazón y en neuronas granulares de cerebelo. Este es un resultado muy interesante porque nos lleva a que no conocemos como puede estar funcionando este complejo en astrocitos. Para esto proponemos que es necesario profundizar el estudio del mismo y verificar que efectivamente no hay actividad de este complejo. Buscando otros métodos por los cuales se pueda medir la actividad de complejo II que funcione con estas muestras.

En la última parte de este trabajo se buscó por Western blot una proteína de cada complejo de la CTE usando un coctel de anticuerpos disponibles comercialmente. Las subunidades a detectar se eligieron por su alta sensibilidad a afectarse cuando el complejo a que pertenecen sufre daño (según la hoja técnica del fabricante Abcam, No. de catálogo ab110413).

Se detectaron las proteínas buscadas en mitocondrias de corazón y en neuronas granulares de cerebelo. En astrocitos, se detectó la subunidad correspondiente al complejo I, II, III y V, pero no se detectó la subunidad del CIV. Sí se encontró una subunidad del II, indicando que la SDH sí se encuentra en astrocitos. Inesperadamente, no se localizó la subunidad correspondiente a complejo IV. Este resultado es interesante porque este complejo se encarga de la reducción de oxígeno, así que su presencia es fundamental para el metabolismo oxidativo. El complejo IV se conforma de 13 subunidades, por lo que él no encontrar una de ellas no significa que el complejo no esté presente en astrocitos.

Es probable que la subunidad MTCO1 (ab14705) que buscamos sea diferente en astrocitos. Revisando la literatura y la base de datos sobre esta proteína, se encontró que el anticuerpo que usamos ha sido usado para identificar al complejo IV en tejido cerebral, encontrándose predominante en áreas donde se marcaron neuronas (Gruenewald et al., 2014). Para profundizar el estudio del complejo IV en astrocitos habría que elegir otros anticuerpos para detectar su presencia ya sea mediante western blot o inmunofluorescencia.

El estudio fue enfocado en comenzar a evaluar la función mitocondrial utilizando inhibidores de complejo I y II de la CTE. No obstante, queda pendiente estudiar qué cambios metabólicos sufren los astrocitos ante la presencia de los compuestos utilizados en este estudio. Dando paso a investigar las diferencias en el metabolismo oxidativo de astrocitos y neuronas.

8. CONCLUSIÓN

- Los astrocitos de las regiones cerebrales estudiadas presentaron prácticamente la misma respuesta en los parámetros medidos.
- Dado que la 6-OHDA y la rotenona inhiben el complejo I en varios tipos celulares, esperamos que también inhibieran la actividad de este complejo en astrocitos, conduciendo a muerte celular. Sin embargo, nos encontramos que ante la presencia de 6-OHDA y rotenona sí se presenta muerte celular y alteraciones metabólicas, pero no encontramos disminuida la actividad del complejo I.
- Dado que el 3-NP y el malonato inhiben el complejo II, esperamos el mismo efecto en astrocitos. Sin embargo, el 3-NP no afectó la reducción de MTT en las regiones en estudio, mientras que el malonato sólo modificó la reducción de MTT en estriado. Al medir la actividad de complejo II, esta no se detectó en las condiciones estudiadas. A pesar de esto, se detectó por western blot una subunidad de este complejo, lo cual indica que esta enzima sí se encuentra presente en astrocitos.

9. PERSPECTIVAS

- Es relevante profundizar el estudio de la actividad mitocondrial y verificar qué cambios metabólicos podrían estar sufriendo los astrocitos ante la presencia de los compuestos utilizados en este estudio.
- Se propone investigar si existen diferentes respuestas haciendo una comparación entre astrocitos y neuronas ante la presencia de 6-OHDA, rotenona, 3-NP y malonato.
- Investigar la expresión de los complejos respiratorios *in vivo*.

10.REFERENCIAS

1. Abe K, and Saito H, 1998, Amyloid beta protein inhibits cellular MTT reduction not by suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase but by acceleration of MTT formazan exocytosis in cultured rat cortical astrocytes. *Neurosci Res.* 31:295-305.
2. Belanger M, Allaman I, and Magistretti PJ, 2011, Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism.* 14:724-738.
3. Bentley LE, 1952, Occurrence of malonic acid in plants. *Nature.* 170:847-8.
4. Bernas T, and Dobrucki JW, 2000, The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Arch Biochem Biophys.* 380:108-16.
5. Berndt N, Holzhtutter HG, and Bulik S, 2013, Implications of enzyme deficiencies on mitochondrial energy metabolism and reactive oxygen species formation of neurons involved in rotenone-induced Parkinson's disease: a model-based analysis. *FEBS J.* 280:5080-5093.
6. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, and Greenamyre JT, 2000, Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 3:1301-6.
7. Brekke E, Morken TS, and Sonnewald U, 2015, Glucose metabolism and astrocyte-neuron interactions in the neonatal brain. *Neurochem Int.* 82:33-41.
8. Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Conde F, Palfi S, and Hantraye P, 1998, Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem.* 70:794-805.
9. Cabezas R., El-Bacha RS, Gonzalez J, and Barreto GE, 2012, Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neurosci Res.* 74:80-90.
10. Chen J, Zhang X, Kusumo H, Costa LG, and Guizzetti M, 2013, Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1831:263-275.
11. Chen R, Fearnley IM, Peak-Chew SY, and Walker JE, 2004, The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem.* 279:26036-45.
12. Cohen BH, 2010, Pharmacologic effects on mitochondrial function. *Dev Disabil Res Rev.* 16:189-199.
13. Cuenca EM, 2006, Fundamentos de la fisiología. Editorial Thomson.
14. Derouiche A, Haseleu J, and Korf HW, 2015, Fine Astrocyte Processes Contain Very Small Mitochondria: Glial Oxidative Capability May Fuel Transmitter Metabolism. *Neurochem Res.* 40:2402-2413.
15. Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, and Ogawa N, 2005, Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: Relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neurosci.* 133:117-135.
16. Fernandez-Gomez FJ, Gomez-Lazaro M, Pastor D, Calvo S, Aguirre N, Galindo MF, and Jordan J, 2005, Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death. *Neurobiol Dis.* 20:384-391.
17. Finsterwald C, Magistretti PJ, and Lengacher S, 2015, Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Curr Pharm Des.* 21:3570-3581.
18. Galas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schiffmann SN, and Blum D, 2004, Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis.* 15, p. 152-9.
19. García MJ, 2014, Efecto de los acidos grasos omega 3 sobre la disfuncion mitocondrial inducida por el acido 3-nitropropionico. Tesis, Facultad de quimica UNAM.
20. Greenamyre JT, Betarbet R, and Sherer TB, 2003, The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism Relat Disord.* 9:S59-64.
21. Gruenewald A, Lax NZ, Rocha MC, Reeve AK, Hepplewhite PD, Rygiel KA, Taylor RW, and Turnbull D M, 2014, Quantitative quadruple-label immunofluorescence of mitochondrial and cytoplasmic proteins in single neurons from human midbrain tissue. *J Neurosci Methods.* 232:143-149.
22. Guillamon-Vivancos T, Gomez-Pinedo U, and Matias-Guiu J, 2015, Astrocytes in neurodegenerative diseases (i): Function and molecular description. *Neurologia.* 30:119-129.
23. Gupta S, Goswami P, Biswas J, Joshi N, Sharma S, Nath C, and Singh S, 2015, 6-Hydroxydopamine and lipopolysaccharides induced DNA damage in astrocytes: Involvement of nitric oxide and mitochondria. *Mutat Res.* 778:22-36.
24. Hahn J, Wang X, and Margeta M, 2015, Astrocytes increase the activity of synaptic GluN2B NMDA receptors. *Front Cell Neurosci.* 9.
25. Halliday GM, and Stevens CH, 2011, Glia: Initiators and Progressors of Pathology in Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 26:6-17.
26. Hansen DB, Garrido-Comas N, Salter M, and Fern R, 2015, HCO₃⁻-independent pH Regulation in Astrocytes in Situ Is Dominated by V-ATPase. *J Biol Chem.* 290:8039-8047.
27. Hariharan A, Shetty S, Shirole T, and Jagtap AG, 2014, Potential of protease inhibitor in 3-nitropropionic acid induced Huntington's disease like symptoms: Mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Neurotoxicology.* 45:139-148.
28. Hawkins BT, Grego S, and Sellgren KL, 2015, Three-dimensional culture conditions differentially affect astrocyte modulation of brain endothelial barrier function in response to transforming growth factor beta 1. *Brain Res.* 1608:167-176. Hinchliffe P, and Sazanov LA, 2005, Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science.* 309:771-774.

29. Hirst J, Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, and Walker JE, 2003, The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1604:135-50.
30. Hoglinger GU, Lannuzel A, Khondiker ME, Michel PP, Duyckaerts C, Feger J, Champy P, Prigent A, Medja F, Lombes A, Oertel WH, Ruberg M, and Hirsch EC, 2005, The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *J Neurochem*. 95:930-939.
31. Hsiao, H.-Y., Y.-C. Chen, H.-M. Chen, P.-H. Tu, and Y. Chern, 2013, A critical role of astrocyte-mediated nuclear factor-kappa B-dependent inflammation in Huntington's disease: *Human Molecular Genetics*, v. 22, p. 1826-1842.
32. Ishihara T, Ban-Ishihara R, Maeda M, Matsunaga Y, Ichimura A, Kyogoku S, Aoki H, S. Katada, K. Nakada, M. Nomura, N. Mizushima, Mihara K, and Ishihara N, 2015, Dynamics of Mitochondrial DNA Nucleoids Regulated by Mitochondrial Fission Is Essential for Maintenance of Homogeneously Active Mitochondria during Neonatal Heart Development. *Mol Cell Biol*. 35:211-223.
33. Kadenbach B, and Huettemann M, 2015, The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase: *Mitochondrion*. 24:64-76.
34. Kalonia H, Kumar P, Kumar A, and Nehru B, 2010, protective effect of montelukast against quinolinic acid/malonic acid induced neurotoxicity: possible behavioral, biochemical, mitochondrial and tumor necrosis factor-alpha level alterations in rats *Neuroscience*. 171:284-299.
35. Kettenmann H, and Verkhratsky A, 2008, Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci*. 31:653-659.
36. Kimelberg H, Zhou M, and Schools G, 2007, Identity of astrocytes; heterogeneity or homogeneity and implications for functions. *Neuron Glia Biology*. 2: S141-S142.
37. Kimelberg HK, 2010, Functions of Mature Mammalian Astrocytes: A Current View. *Neuroscientist*. 16:79-106.
38. Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, and Taylor RW, 2007, Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Mitochondria*. 80:93-119.
39. Kubik LL, and Philbert MA, 2015, The Role of Astrocyte Mitochondria in Differential Regional Susceptibility to Environmental Neurotoxicants: Tools for Understanding Neurodegeneration. *Toxicol Sci*. 144:7-16.
40. Kucukdereli H, Allen NJ, Lee AT, Feng A, Ozlu MI, Conatser LM, Chakraborty C, Workman G, Weaver M, Sage EH, Barres BA, and Eroglu C, 2011, Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:E440-E449.
41. Kumar A, Sharma N, Gupta A, Kalonia H, and Mishra J, 2012, Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. *Brain Res*. 1471:13-22.
42. Kupsch A, Schmidt W, Gizatullina Z, Debska-Vielhaber G, Voges J, Striggow F, Panther P, Schwegler H, Heinze HJ, Vielhaber S, and Gellerich FN, 2014, 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: respirometric, histological, and behavioral analyses. *J Neural Transm*. 121:1245-1257.
43. Lev N, Barhum Y, Ben-Zur T, Melamed E, Steiner I, and Offen D, 2013, Knocking Out DJ-1 Attenuates Astrocytes Neuroprotection Against 6-Hydroxydopamine Toxicity. *J Mol Neurosci*. 50:542-550.
44. Liot G, Bossy B, Lubitz S, Kushnareva Y, Sejbuk N, and Bossy-Wetzel E, 2009, Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ*. 16:899-909.
45. Liu B, Gao HM, and Hong JS, 2003, Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. *Environ Health Perspec*. 111:1065-73.
46. Luis GE, 2014, Efecto del tratamiento antioxidante sobre alteraciones mitocondriales inducidas por el daño neurotóxico en ratas. Tesis, Facultad de ciencias UNAM.
47. Maria Reyes-Fermin L, Gonzalez-Reyes S, Gabriela Tarco-Alvarez N, Hernandez-Nava M, Orozco-Ibarra M, and Pedraza-Chaverri J, 2012, Neuroprotective effect of alpha-mangostin and curcumin against iodoacetate-induced cell death. *J Mol Neurosci*. 15:34-41.
48. Misiak M, Singh S, Drewlo S, Beyer C, and Arnold S, 2010, Brain region-specific vulnerability of astrocytes in response to 3-nitropropionic acid is mediated by cytochrome c oxidase isoform expression. *Cell Tissue Res*. 341:83-93.
49. Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65:55-63.
50. Nasr P, Carbery T, and Geddes WJ, 2009, N-Methyl-d-aspartate Receptor Antagonists Have Variable Affect in 3-Nitropropionic Acid Toxicity *Neurochem Res*. 34:490-498.
51. Ndbaku U and de Bellard ME, 2008, Glial cells: Old cells with new twists. *Acta Histochem*. 110:182-195.
52. Orozco-Ibarra M, Estrada-Sanchez AM, Massieu L, and Pedraza-Chaverri J, 2009, Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: Role of CO and bilirubin. *Int Journal Biochem Cell Biol*. 41:1304-1314.
53. Perreten Lambert H, Zenger M, Azarias G, Chatton JY, Magistretti PJ, and Lengacher S, 2014, Control of mitochondrial pH by uncoupling protein 4 in astrocytes promotes neuronal survival. *J Biol Chem*. 289:31014-28.
54. Pinto M, Pickrell AM, and Moraes CT, 2012, Regional susceptibilities to mitochondrial dysfunctions in the CNS. *J Biol Chem*. 393:275-281.
55. Prebil M, Chowdhury HH, Zorec R, and Kreft M, 2011, Changes in cytosolic glucose level in ATP stimulated live astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 405:308-313.

56. Radad K, Gille G, and Rausch WD, 2008, Dopaminergic neurons are preferentially sensitive to long-term rotenone toxicity in primary cell culture. *Toxicol In Vitro*. 22:68-74.
57. Rannikko EH, Weber SS, and Kahle PJ, 2015, Exogenous alpha-synuclein induces toll-like receptor 4 dependent inflammatory responses in astrocytes. *BMC Neuroscience*. 16.
58. Ruehle T, and Leister D, 2015, Assembly of F1F0-ATP synthases. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*. 1847:849-860.
59. Sandhir R, and Mehrotra A, 2013, Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: Implications in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta-Molecular Basis of Disease*. 1832:421-430.
60. Scola G, Kim HK, Young LT, Salvador M, and Andreatza AC, 2014, Lithium reduces the effects of rotenone-induced complex I dysfunction on DNA methylation and hydroxymethylation in rat cortical primary neurons. *Psychopharmacology*. 231:4189-4198.
61. Stephen TL, Gupta-Agarwal S, and Kittler JT, 2014, Mitochondrial dynamics in astrocytes. *Biochem Soc Trans*. 42:1302-1310.
62. Stockert JC, Blazquez-Castro A, Canete M, Horobin RW, and Villanueva A, 2012, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. 114:785-796.
63. Sukhorukova EG, Korzhevskii DE, and Alekseeva OS, 2015, Glial fibrillary acidic protein: The component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. *J Evol Biochem Physiol*. 51:1-10.
64. Sun F, Huo X, Zhai YJ, Wang AJ, Xu JX, Su D, Bartlam M, and Rao ZH, 2005, Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*. 12:1043-1057.
65. Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, and Nath C, 2012, Astrocyte Activation: A Key Step in Rotenone Induced Cytotoxicity and DNA Damage. *Neurochem Res*. 37:2178-2189.
66. Takano TG, Tian F, Peng WG, Lou NH, Libionka W, Han XN, and Nedergaard M, 2006, Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature*. 9:260-267.
67. Tobon-Velasco JC, Limon-Pacheco JH, Orozco-Ibarra M, Macias-Silva M, Vazquez-Victorio G, Cuevas E, Ali SF, Cuadrado A, Pedraza-Chaverri J, and Santamaria A, 2013, 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF-kappa B factors. *Toxicology*. 304:109-119.
68. Tong X, Ao Y, Faas GC, Nwaobi SE, Xu J, Haustein MD, Anderson MA, Mody I, Olsen ML, Sofroniew MV, and Khakh BS, 2014, Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nature*. 17:694.
69. Tunes I, Tasset I, Perez-De la Cruz V, and Santamaria A, 2010, 3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington's Disease: Past, Present and Future. *Molecules*. 15:878-916.
70. Vallejo-Illarramendi A, Torres-Ramos M, Melone M, Conti F, and Matute C, 2005, Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia*. 50:276-279.
71. Van Meerloo J, Kaspers GJL, and Cloos J, 2011, Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay: *Cancer Cell Culture. Methods and Protocols*, Second Edition. 731:237-245.
72. Verkhatsky A, Nedergaard M, and Hertz L, 2015, Why are Astrocytes Important?. *Neurochem Res*. 40:389-401.
73. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, and Boyd MR, 1991, Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 51:2515-20.
74. Voet, D, Voet J, 2007. *Fundamentos de Bioquímica Segunda ed.*, Editorial Médica Panamericana.
75. Wachter B, Schuerger S, Rolinger J, Von Ameln-Mayerhofer A, Berg D, Wagner HJ, and Kueppers E, 2010, Effect of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on proliferation of glial cells in the rat cortex and striatum: evidence for de-differentiation of resident astrocytes. *Cell and Tissue Res*. 342:147-160.
76. Wang HM, Zhang T, Li Q, Huang JK, Chen RF, and Sun XJ, 2013, Inhibition of glycogen synthase kinase-3 beta by lithium chloride suppresses 6-hydroxydopamine-induced inflammatory response in primary cultured astrocytes. *Neurochem Int*. 63:345-353.
77. Winklhofer KF, and Haass C, 2010, Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta-Molecular Basis of Disease*. 1802:29-44.
78. Xia D, Esser L, Tang WK, Zhou F and Yu CA, 2013, Structural analysis of cytochrome bc(1) complexes: Implications to the mechanism of function. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics*. 1827:1278-1294.
79. Ye B, Shen H, Zhang J, Zhu YG, and Ye ZC, 2015, Dual Pathways Mediate beta-Amyloid Stimulated Glutathione Release from Astrocytes. *Glia*. 63:2208-2219.
80. Zeevalk GD, Manzino L, Hoppe J, and Sonsalla P, 1997, In vivo vulnerability of dopamine neurons to inhibition of energy metabolism. *Eur J pharmacol*. 320:111-9.