



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y EXPRESIÓN DE LA
SUCCINATO DESHIDROGENASA EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE NEURONAS Y ASTROCITOS DE
RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ENRIQUE MORALES OLIVA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARISOL OROZCO IBARRA

CIUDAD DE MÉXICO, 2019



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.

1. Datos del alumno

Morales

Oliva

Enrique

56147204

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312220105

2. Datos del tutor

Dra.

Marisol

Orozco

Ibarra

3. Datos del sinodal 1

Dra.

María de Lourdes

Massieu

Trigo

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Silvia

Guzmán

Beltrán

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Octavio César

García

González

6. Datos del sinodal 3

Dr.

Félix

Morales

Flores

7. Datos del trabajo escrito

Actividad enzimática y expresión de la succinato deshidrogenasa en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata

35 p

2019

El presente trabajo fue desarrollado bajo la tutoría de la Dra. Marisol Orozco Ibarra en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, este trabajo forma parte del proyecto “Intercambio de metabolitos entre neuronas y células gliales durante la inhibición del transporte de electrones” con número de registro 19/17, que fue evaluado y aprobado por el Comité Científico y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales de laboratorio (CICUAL-INNN) del INNN.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
MITOCONDRIA	7
CADENA RESPIRATORIA	8
SUCCINATO DESHIDROGENASA.....	10
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
DISEÑO EXPERIMENTAL	16
CULTIVOS PRIMARIOS.....	17
NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.....	17
ASTROCITOS.....	17
INMUNOCITOQUÍMICA	18
MARCAJE DE MITOCONDRIAS.....	18
AISLAMIENTO DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL.....	18
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL	19
WESTERN BLOT	19
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA SDH	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
RESULTADOS	21
CULTIVOS PRIMARIOS.....	21
PUREZA DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS.....	21
MARCAJE DE MITOCONDRIAS.....	22
EXPRESIÓN DE LA SDH	23
ACTIVIDAD DE LA SDH	25
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	30
PERSPECTIVAS	30
REFERENCIAS	32

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin trifosfato
CTE	Cadena de transporte de electrones
DCPIP	2,6-Diclorofenolindofenol
DIV	Día <i>in vitro</i>
FAD	Flavina adenina dinucleótido
SFB	Suero fetal bovino
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
GTP	Guanosin trifosfato
MAP2	Proteína 2 asociada a microtúbulos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NGC	Neuronas granulares de cerebelo
OAA	Oxaloacetato
SDH	Succinato deshidrogenasa
SDHA	Succinato deshidrogenasa subunidad A o flavoproteína
SDHB	Succinato deshidrogenasa subunidad B o proteína de hierro azufre
SNC	Sistema nervioso central
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

RESUMEN

Introducción: La enzima succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima que participa tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en la cadena respiratoria; cataliza la oxidación de succinato a fumarato liberando electrones que reducen la ubiquinona a ubiquinol. Algunos autores han propuesto que la SDH se encuentra inhibida en el cerebro en condiciones fisiológicas por oxaloacetato (OAA). Diversos estudios han identificado que la adición de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) promueven la disociación del OAA del sitio activo de la SDH, uno de ellos es el ácido isocítrico el cual se ha incubado en mitocondrias aisladas y se ha observado un incremento en la actividad enzimática de la SDH. Actualmente se desconoce si la actividad enzimática y expresión de la SDH se encuentra disminuida en neuronas y astrocitos y si esta incrementa en presencia de ácido isocítrico.

Objetivo general: Evaluar la actividad enzimática y la expresión del complejo II en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata.

Objetivos particulares: 1) Preparar y caracterizar cultivos primarios de neuronas y astrocitos. 2) Determinar la expresión de las subunidades A (68 kDa) y B (29 kDa) de la SDH en neuronas y astrocitos. 3) Evaluar el efecto de la adición de ácido isocítrico sobre la actividad de la SDH en neuronas y astrocitos.

Métodos: Se prepararon cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata, los cuales se caracterizaron con base en características morfológicas e inmunocitoquímicas usando anticuerpo anti-MAP2 para neuronas y anticuerpo anti-GFAP para astrocitos. Para corroborar que las mitocondrias de los cultivos primarios de neuronas y astrocitos se encontraran activas se marcaron con una sonda fluorescente.

La expresión de la SDH se determinó mediante Western Blot, en donde se detectaron las subunidades SDHA y SDHB en lisados celulares de neuronas, astrocitos y células PC12. Para comparar la expresión, se utilizó la fracción mitocondrial de riñón, corazón, corteza y cerebelo. Mediante una técnica colorimétrica se determinó la actividad enzimática de la SDH en muestras de la fracción mitocondrial y lisados celulares en muestras control (sin ácido isocítrico) y tratados con ácido isocítrico 2 mM. La determinación se llevó a cabo inmediatamente después de la adición de ácido isocítrico o tras 10 min de incubación.

Resultados: El marcaje de mitocondrias indicó que estas se encuentran activas y distribuidas en el citoplasma de neuronas y astrocitos. La expresión de las proteínas SDHA y SDHB en la fracción mitocondrial fue mayor en corazón y riñón en comparación con corteza y cerebelo; así mismo se encontró una mayor expresión de estas proteínas en lisados celulares de células PC12 que en neuronas y astrocitos. La expresión de la proteína SDHA fue mayor en neuronas que en astrocitos.

La SDH se encontró más activa en la fracción mitocondrial de riñón y corazón que en la de corteza y cerebelo. El tratamiento con ácido isocítrico disminuyó la actividad de la SDH en riñón, corazón y corteza, sin embargo, en cerebelo no alteró la actividad. En lisados

celulares se observó una mayor actividad de la SDH en células PC12 en comparación con neuronas y astrocitos. El tratamiento con ácido isocítrico por 10 minutos disminuyó la actividad de la SDH en células PC12. En lisados de neuronas y astrocitos la actividad de la SDH se incrementó inmediatamente después de la adición de ácido isocítrico.

Conclusión: 1) En este trabajo fue posible detectar la actividad enzimática en lisados celulares de cultivos de astrocitos de cerebelo. 2) La actividad y expresión de la enzima SDH es mayor en mitocondrias aisladas de corazón y riñón en comparación que las de las regiones cerebrales (corteza y cerebelo). 3) La actividad de la SDH incrementa posterior al tratamiento con isocitrato en los lisados celulares de neuronas y astrocitos, lo cual podría indicar que esta enzima se encuentra inhibida.

INTRODUCCIÓN

Mitocondria

La mitocondria es un organelo citoplasmático que participa en la síntesis de adenosin trifosfato (ATP), molécula utilizada para suministrar la energía necesaria para llevar a cabo diversas funciones celulares. Sin embargo, la mitocondria también participa en la síntesis de otros compuestos como guanosín trifosfato (GTP), aminoácidos, grupo hemo, centros hierro-azufre y fosfolípidos a partir de intermediarios metabólicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Alberts, Wilson, & Hunt, 2008). La mitocondria también participa en procesos de señalización celular y almacenamiento de Ca^{2+} (Chandel, 2015).

En la Figura 1 se muestra una ilustración de las mitocondrias, las cuales están delimitadas por una membrana externa constituida por una bicapa de fosfolípidos, dentro de este organelo se encuentra plegada la membrana interna que forma invaginaciones denominadas crestas o cisternas que permiten incrementar la superficie (Alberts et al., 2008). Este organelo puede presentar morfología y tamaño variado dependiendo del tipo celular en la que esté presente, puede adoptar desde formas elongadas hasta filamentosas y sus dimensiones ser de 0.5 a 1 μm . Se distribuye en el citoplasma de las células eucariotas lo que permite que esté en contacto directo con otros organelos como el citoesqueleto (Alberts et al., 2008), núcleo (Chang, Shtessel, & Lee, 2015), aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Szabadkai, Simoni, & Rizzuto, 2003).

En la matriz mitocondrial, se encuentra dispuesto DNA mitocondrial, que está constituido por una molécula circular de doble cadena que contiene 37 genes que codifican para dos rRNAs, 22 tRNAs y 13 polipéptidos, de los cuales algunos forman parte de las subunidades de los complejos enzimáticos que participan en la fosforilación oxidativa (Taanman, 1999). En estudios cristalográficos de la membrana interna, se ha podido observar estos complejos enzimáticos, los cuales se conocen como cadena de transporte de electrones (CTE) o cadena respiratoria y es en este sitio en donde se lleva a cabo la síntesis de ATP (Kühlbrandt, 2015) (Figura 2).

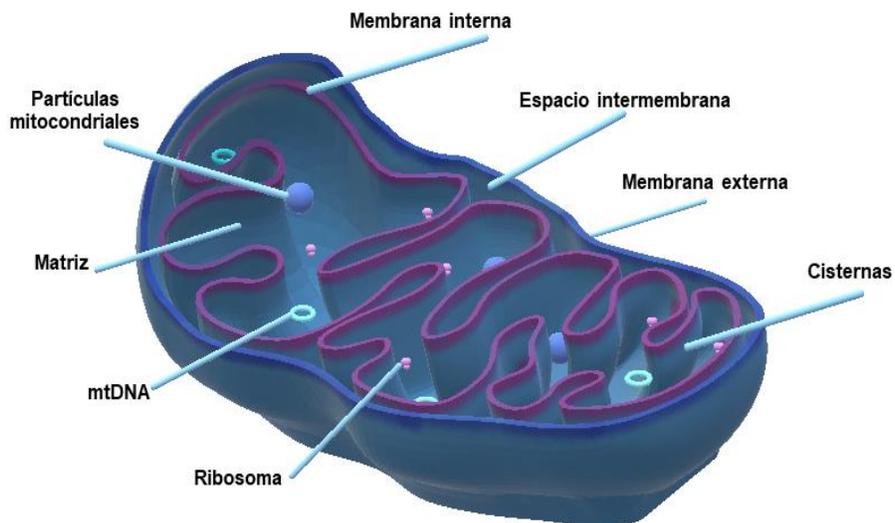


Figura 1. Estructura de la mitocondria

Cadena respiratoria

Complejo I

Este complejo también recibe el nombre de NADPH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa, es un complejo proteico formado por 14 subunidades en bacterias, mientras que en mamíferos está conformado por 18 subunidades compuestas por 46 proteínas (Chen, Fearnley, Peak-Chew, & Walker, 2004). El complejo I es miembro de la familia de las oxidoreductasas, cuya función es la de oxidación de un sustrato y la reducción de hidrógeno mediante transporte activo de protones; para el caso particular de la cadena respiratoria, cataliza la oxidación del NADH lo que eleva las concentraciones de NAD^+ , este proceso permite el bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Wirth, Brandt, Hunte, & Zickermann, 2016). Se ha reportado que el complejo I es la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno, siendo en procesos de disfunción mitocondrial cuando se producen en mayor concentración (Sharma, Lu, & Bai, 2009).

Complejo II

El complejo proteico succinato quinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa (SDH) es una enzima que se encuentra en los organismos aerobios, es la única enzima que participa tanto en TCA como en la CTE. Como parte del TCA cataliza la oxidación de succinato a fumarato, mientras que en CTE reduce ubiquinona a ubiquinol, esta reducción ocurre por la transferencia de electrones del succinato a la ubiquinona por medio del grupo prostético de la flavina adenina dinucleótido (FAD) unido por un enlace covalente al sitio activo (Sun et al., 2005).

La estructura de la SDH es variable dependiendo de los organismos, ya que para el caso de mamíferos se ha reportado que este complejo está conformado por cuatro subunidades codificadas por DNA nuclear, mientras que en bacterias se ha reportado que este complejo está formado por solo tres subunidades (Hagerhall, 1997; Sun et al., 2005).

Complejo III

Ubiquinol citocromo c reductasa o complejo III, es un dímero constituido por once polipéptidos con cuatro grupos prostéticos (citocromo b, grupo hemo, grupo hierro azufre y citocromo c) (Matsuno-Yagi & Hatefi, 2001; Yu et al., 1998). Está anclado a la membrana interna de la mitocondria y cataliza la transferencia de electrones provenientes del NADH y ubiquinol al citocromo c. Esta reacción está acoplada con la translocación de protones de la membrana interna, lo cual genera el potencial de membrana (Yu et al., 1998).

Complejo IV

Este complejo también se conoce como citocromo c oxidasa, tiene un peso de 204 kDa y está formado por trece subunidades, de las cuales diez son codificadas por DNA nuclear y las tres restantes (COX I, II y III) son codificadas por DNA mitocondrial. Sin embargo, la función de las diferentes subunidades que conforman a esta enzima y el mecanismo de

regulación aún no está completamente descrito. Esta enzima cataliza la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular, formando una molécula de agua (Li, Park, Deng, & Bai, 2006). Se ha descrito que esta enzima es de gran importancia para la producción de energía, ya que al encontrarse espacialmente cerca de la ATP sintasa, puede regular el flujo de electrones transferidos, por lo que controla la velocidad de la fosforilación oxidativa y la producción de ATP (Tarasenko et al., 2017).

Complejo V

La ATP sintasa o complejo V presenta un peso molecular de 500 KDa, está constituida por dos dominios funcionales: anclado a la membrana interna se encuentra el dominio F₀ compuesto por ocho subunidades; mientras que en la matriz mitocondrial se encuentra el dominio F₁, conformado por las subunidades α , β , γ , δ , ϵ y anillo c (Watt, Montgomery, Runswick, Leslie, & Walker, 2010).

Esta enzima participa en la síntesis de ATP vía fosforilación oxidativa, ya que sintetiza ATP a partir de la fosforilación de adenosin difosfato (ADP). La fosforilación se lleva a cabo por la fuerza mecánica asociada al flujo de protones a través de la membrana interna, esta fuerza permite que el residuo de glutamato del anillo c quede expuesto, permitiendo que se protone y desprotone propiciado que la ATP sintasa rote (Jonckheere, Smeitink, & Rodenburg, 2012). Cada rotación de 360° produce tres moléculas de ATP, y para esto se requiere de la translocación de un protón (Watt et al., 2010).

Todos los complejos descritos previamente son de gran importancia para las células, sin embargo, debido a las características de este trabajo, sólo se profundizará en el papel de la enzima succinato deshidrogenasa en dos tipos celulares del sistema nervioso central (SNC): neuronas y astrocitos.

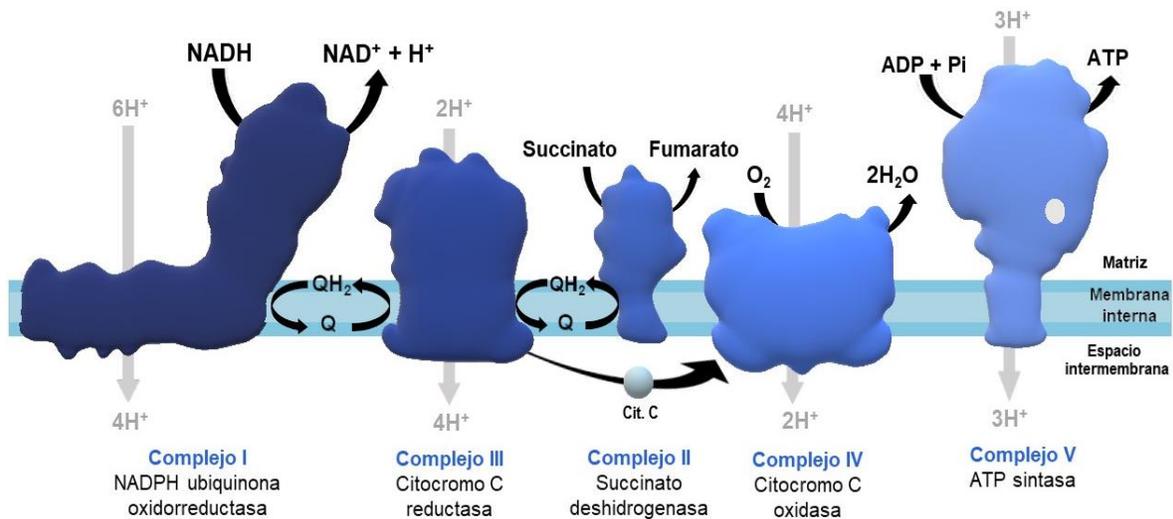


Figura 2. Representación esquemática de la cadena respiratoria. Q: ubiquinona, QH₂: ubiquinol y Cit. C: citocromo c.

Succinato deshidrogenasa

Esta enzima es de gran importancia, ya que es el sitio de convergencia de dos vías metabólicas energéticas, la CTE y el TCA. Diversos estudios han identificado que este complejo está formado de cuatro heterodímeros (Figura 3), anclados a la membrana interna de la mitocondria, dos de ellos son solubles y participan en la reducción de succinato a fumarato; dicha reducción es llevada a cabo por el grupo prostético FAD unido covalentemente a la subunidad SDHA (68 kDa), esta reducción libera electrones que son transferidos mediante los tres grupos de hierro azufre unidos de la subunidad SDHB (29 kDa) hacia las subunidades SDHC y SDHD (15 y 11 kDa respectivamente). Finalmente los electrones son transferidos hacia la ubiquinona que se reduce a ubiquinol (Elena Maklashina & Cecchini, 2010).

En los últimos años, el estudio de la enzima SDH ha tomado mayor relevancia debido a que alteraciones en la estructura y función de esta enzima se ha asociado con la presencia de diversas enfermedades, entre ellas cáncer (Bardella, Pollard, & Tomlinson, 2011; Zhao, Mu, & You, 2017) y enfermedades neurodegenerativas (Hoekstra & Bayley, 2013; Jodeiri Farshbaf & Kiani-Esfahani, 2017). Diversas bases de datos han reportado que bajo condiciones fisiológicas normales, la expresión de las diferentes subunidades que conforman la SDH es heterogénea en los tejidos.

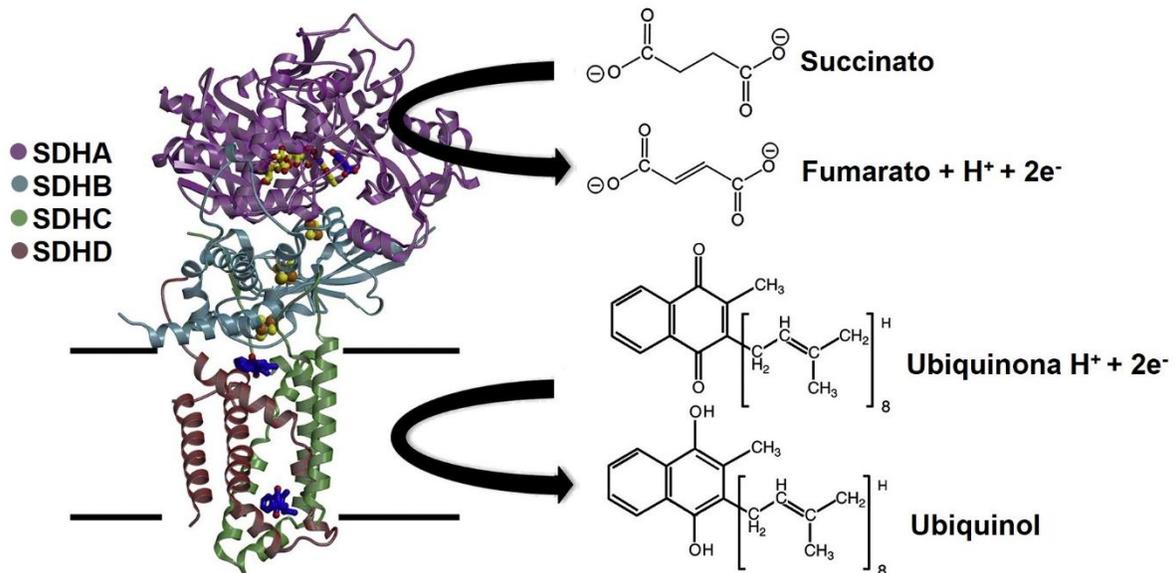


Figura 3. Reconstrucción de la estructura cristalográfica y función de la enzima succinato deshidrogenasa. Modificado de (Iverson, 2013).

Existen diversos reportes en los cuales se menciona que la expresión de la SDH varía dependiendo del tejido. Con base en una escala logarítmica de las partes por millón (ppm), en la Figura 4 se muestra un gráfico con la expresión estimada de las subunidades que conforman a la SDH de aquellos tejidos en donde se ha reportado una alta expresión. Además, se observa que la proteína SDHA es la más expresada, seguido de la proteína SDHB. Por otro lado, se observa una tendencia que indica que la expresión es mayor (al menos de la subunidad A) en corazón, seguido del hígado, riñón y cerebro, estas diferencias podrían asociarse a que los órganos previamente mencionados tienen tasas metabólicas energéticas elevadas (Wang et al., 2010).

Estudios realizados en muestras de cerebro de ratón y en estudios *post mortem* en humanos reportan que la expresión de las subunidades de la enzima SDH presentan una expresión diferencial. En la Figura 5 se observan los patrones de expresión de la proteína SDHB, en el panel A se muestra una reconstrucción realizada a partir de diversos cortes histológicos de cerebro humano (masculino de 57 años, caucásico) en donde se elaboraron inmunohistoquímicas para la detección de la proteína SDHB y se observa que la expresión es mayor en el cuerpo calloso, el lóbulo parietal, el cerebelo y los núcleos asociados con los pares craneales. En el panel B se muestra una fotografía de un corte sagital de ratón (C57BL/6J macho de 56 días) en el que se marca la expresión de la subunidad B, y es posible apreciar que esta es mayor en hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo.

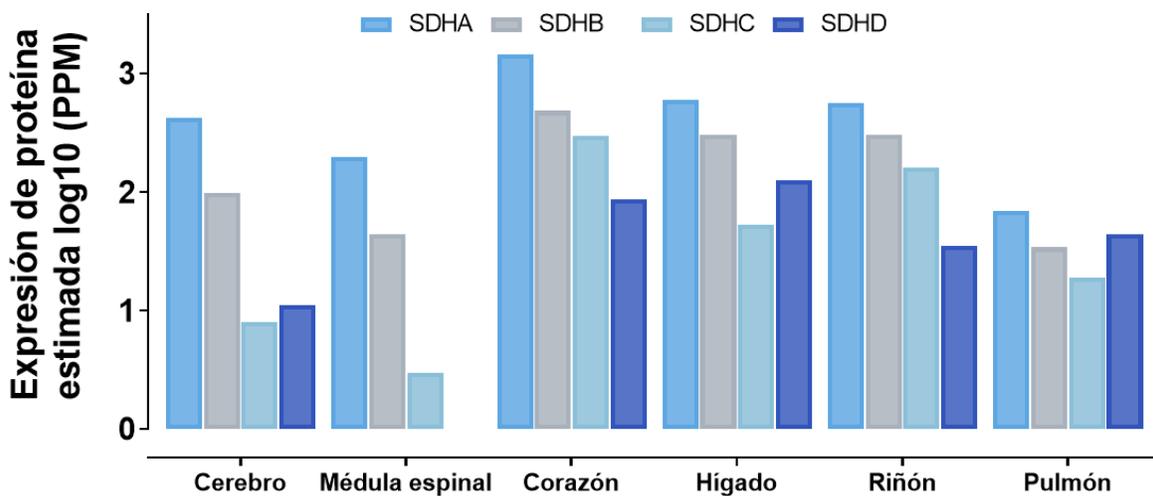


Figura 4. Expresión estimada de las subunidades A, B, C y D de la SDH en diferentes tejidos (The GeneCards human gene database, 2019).

Muchos de los estudios relacionados con la actividad y expresión de la enzima SDH en el cerebro se han realizado principalmente en cortes histológicos y mitocondrias aisladas, no obstante, se ha identificado que este órgano está conformado por diferentes tipos celulares, por lo que con los modelos previamente mencionados aún no se ha descrito que tipo celular presenta mayor actividad y/o expresión.

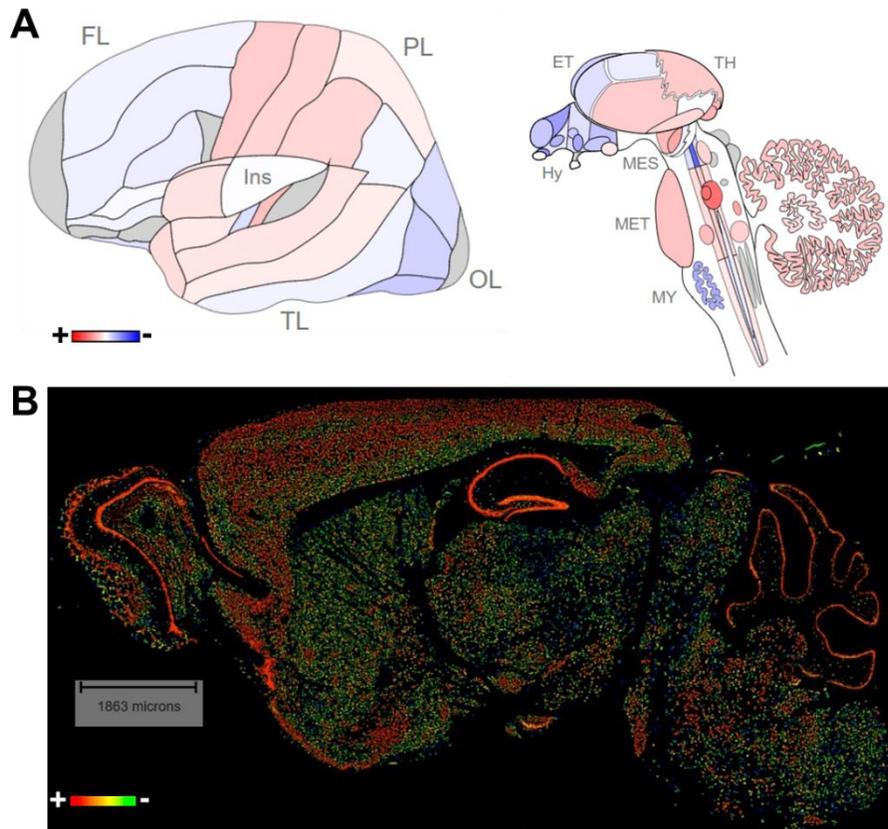


Figura 5. Expresión de la proteína SDHB en cerebro. (A) Patrón de distribución de la proteína SDHB en cerebro humano *post mortem*, donde los tonos rojos representan mayor expresión de la proteína. (B) Inmunofluorescencia de la proteína SDHB de cerebro de ratón, la mayor expresión de esta proteína corresponde al color rojo y conforme esta disminuye se acerca a tonos verdes (Allen Institute for Brain Science, 2018).

El SNC está conformado por diversos tipos celulares, sin embargo, en este trabajo solo se estudiará la expresión y actividad de la SDH en neuronas y astrocitos. Estos dos tipos celulares participan en procesos de gran importancia que ocurren en el SNC, ya que las neuronas reciben señales químicas de las terminales axónicas de otras neuronas y transforman estas estas señales en impulsos eléctricos (Lodish et al., 2000). Por otro lado, los astrocitos conforman aproximadamente el 80% de todas las células gliales (Morigi, 2012) y participan en procesos de protección neuronal, regulan la plasticidad neural, participan en la señalización celular con neuronas mediante la síntesis de precursores de neurotransmisores y gliotransmisores (Scuderi, Stecca, Iacomino, & Steardo, 2013), proveen de sustratos metabólicos para las neuronas, eliminan especies reactivas de oxígeno mediante el metabolismo antioxidante (Tsacopoulos & Magistretti, 1996) y participan en el almacenamiento de iones y de glucógeno (Brown, Baltan Tekkok, & Ransom, 2004)

El estudio del metabolismo de las neuronas y astrocitos se ha desarrollado desde prácticamente el descubrimiento de estas células, con base en estos estudios se ha descrito que estos dos tipos celulares presentan tanto enzimas glucolíticas como oxidativas, sin embargo, se ha identificado que el metabolismo predominante es distinto. Se ha propuesto que las neuronas presentan un metabolismo oxidativo activo, mientras que los astrocitos se caracterizan por presentar un metabolismo más glucolítico (Magistretti & Allaman, 2015). Esta diferencia podría indicar que las neuronas tienen una mayor expresión y actividad de las enzimas oxidativas (incluida la SDH) en comparación con los astrocitos.

La actividad de la SDH en el cerebro se ha determinado mediante diferentes técnicas utilizando distintos modelos experimentales, algunos de estos estudios indican que la actividad de esta enzima es muy baja o en algunos casos imperceptible en muestras de cerebro (principalmente corteza), lo que ha llevado a que se proponga que este complejo se encuentra inhibido (de Gómez-Puyou, Chávez, Freites, & Gómez-Puyou, 1972). Para tratar de explicar esta inhibición, se ha propuesto al oxaloacetato (OAA) como el responsable de la inactividad de la SDH en el cerebro (A. Panov et al., 2009).

El OAA inhibe a la SDH mediante su unión al sitio activo de la enzima (FAD), lo que induce un cambio conformacional que impide que la enzima reduzca al succinato (Kappen, Brodie, & Nicholls, 1973). En muestras de la fracción mitocondrial de ratones se demostró que la corteza cerebral presenta menor actividad enzimática de la SDH en comparación con el corazón, lo cual es atribuido a la inhibición por OAA. Además se identificó que la adición de intermediarios del TCA como el malonato incrementa la actividad de la SDH, ya que este compuesto presenta una alta afinidad por el sitio activo de la SDH lo que provoca que se remueva el OAA del sitio activo permitiendo que la enzima pueda oxidar al succinato (Stepanova, Shurubor, Valsecchi, Manfredi, & Galkin, 2016). Este estudio es consistente con otros que reportan el mismo fenómeno (Ackrell, Kearney, & Mayr, 1974; E. Maklashina, Kotlyar, Karliner, & Cecchini, 2004; A. Panov & Orynbayeva, 2017; A. V. Panov, Vavilin, Lyakhovich, Brooks, & Bonkovsky, 2010). En estudios previos del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, no se logró detectar la actividad de SDH en lisados celulares de cultivos primarios de astrocitos aislados de corteza, hipocampo y cerebelo de rata (García Serafín, 2016).

Hasta el momento no se conoce si la inhibición por OAA de la SDH en células del cerebro es un proceso que ocurra todo el tiempo o solo bajo condiciones patológicas y experimentales como isquemia (Stepanova et al., 2016), aun así se ha observado que las concentraciones de OAA son mayores en el cerebro que las del corazón, hígado, riñón, músculo y sangre (Frohman, Orten, & Smith, 1951; Stepanova et al., 2016).

Otro de los casos en los que se ha reportado la inhibición de la SDH por OAA ocurre en algunas especies de ardillas (*Ictidomys tridecemlineatus*), en las cuales se ha observado que, durante el invierno o periodos de baja temperatura, el metabolismo celular del hígado se altera disminuyendo la respiración celular y por ende el consumo de ATP. Entre los cambios que se han descrito se encuentra la disminución de la actividad de la SDH, dicha disminución se lleva a cabo por acción del OAA que se une al sitio activo impidiendo que se oxide el succinato. Así mismo, se ha observado que el ácido isocitrónico puede evitar que

la SDH se inhiba por acción del OAA (Fedotcheva, Sharyshev, Mironova, & Kondrashova, 1985). Con base en estos estudios, a mitocondrias aisladas de hígado de ardillas durante diferentes periodos de hibernación se les midió la actividad de la SDH con una previa incubación con ácido isocítrico, y se observó que la actividad de la SDH es mayor en aquellas mitocondrias que fueron tratadas con ácido isocítrico que no presentaban ningún tratamiento (Armstrong & Staples, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Gran parte de los estudios sobre la actividad y expresión de la SDH se han realizado en cortes histológicos y en mitocondrias aisladas de diferentes regiones cerebrales, por lo cual aún no se conoce completamente en qué tipos celulares la expresión y actividad se encuentra más elevada. Con base en el estudio metabólico de neuronas y astrocitos se ha identificado que es estos últimos presentan un metabolismo glucolítico más activo en comparación con las neuronas que presentan un metabolismo preferentemente oxidativo. Estos hallazgos podrían indicar que la expresión y actividad de enzimas oxidativas como la SDH se encontrarían incrementadas en neuronas y reducidas en astrocitos.

En la actualidad existe cierta discusión sobre el papel de la SDH en el cerebro, ya que algunos autores proponen que esta enzima se encuentra inhibida por OAA, apoyando esta idea en que las concentraciones de OAA en el SNC son más altas que en otros tejidos.

La mayoría de los estudios sobre la actividad de la SDH y su posible inhibición por OAA se han realizado usando homogenados totales de cerebro de rata y/o ratón o la fracción total de mitocondrias aisladas de cerebro, por lo cual aún no se ha descrito si todos los tipos celulares que se encuentran en el cerebro (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos o microglía) presentan esta inhibición por OAA, tampoco se ha reportado si esta condición está presente la mayor parte del tiempo o solo bajo ciertas condiciones.

HIPÓTESIS

Debido a que existen diferencias metabólicas entre las neuronas y los astrocitos, la actividad y expresión de la SDH será mayor en neuronas que en astrocitos y con el tratamiento de ácido isocítrico la actividad podría incrementar en ambos tipos celulares.

OBJETIVO

Objetivo general:

Evaluar la actividad enzimática y la expresión del complejo II en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de rata.

Objetivos particulares:

- Preparar y caracterizar cultivos primarios de neuronas y astrocitos.
- Determinar la expresión de las subunidades A (68 kDa) y B (29 kDa) de la SDH en neuronas y astrocitos.
- Evaluar el efecto de la adición de isocitrato sobre la actividad de la SDH en neuronas y astrocitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Este trabajo forma parte del proyecto “Intercambio de metabolitos entre neuronas y células gliales durante la inhibición del transporte de electrones (Núm. Reg. 19/17)”, el cual fue evaluado y aprobado por el Comité Científico y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales de laboratorio (CICUAL-INNN) del INNN. El manejo experimental de las ratas se apegó a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999, “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y se siguieron las recomendaciones de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 para la disposición de residuos biológicos. La manipulación de los animales se realizó siempre procurando minimizar el sufrimiento animal.

El diseño experimental utilizado se muestra en la Figura 6, y contempla el aislamiento de cerebelos de ratas de la cepa Wistar de 7 a 9 días de edad (P7-P9) para la preparación de cultivos primarios de neuronas y astrocitos, la verificación de la identidad de estos cultivos mediante inmunocitoquímica de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) y la proteína 2 asociada a microtúbulos (MAP2) y la determinación de la expresión de SDHA y SDHB por Western Blot. Además, se midió la actividad de SDH mediante un método colorimétrico.

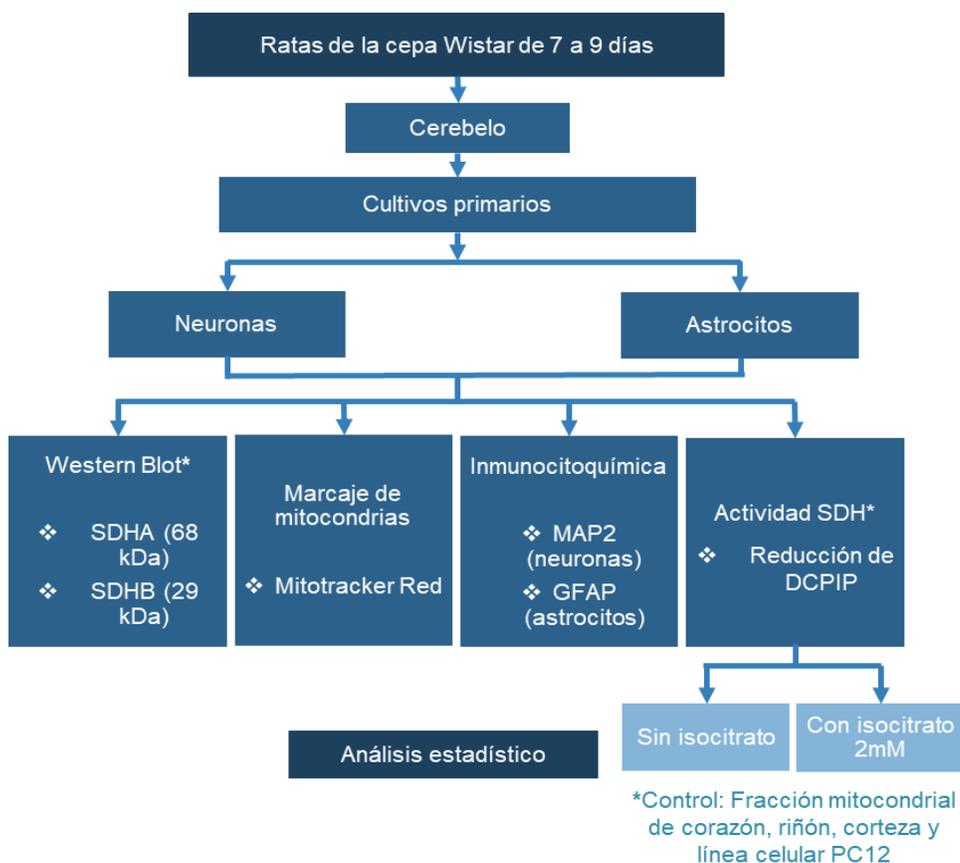


Figura 6. Diseño experimental

Cultivos primarios

Neuronas granulares de cerebelo (NGC)

Se utilizó un protocolo reportado previamente (Marisol Orozco-Ibarra, Estrada-Sánchez, Massieu, & Pedraza-Chaverrí, 2009) que consistió en la utilización de ratas P7-P9, de las cuales se aisló el cerebelo y se retiraron las meninges. Una vez aislado el tejido, éste se cortó en cubos y se incubó por 10 min a 37°C en tripsina 0.25 mg/ml, para detener la reacción de la tripsina se agregó suero fetal bovino (SFB) y posteriormente el tejido se disoció en una solución con 0.08 mg/ml de DNAasa I. Se centrifugó a 556 x g durante 3 min, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en amortiguador Ringer-Krebs con albumina sérica bovina (ASB) 3 mg/ml, MgSO₄ 3.8% y CaCl₂ 1.2%, para después pasarse por una malla de 50 mesh. Finalmente, se volvió a centrifugar a 556 x g por 5 min y el botón se resuspendió en Medio Basal Eagle (Life Technologies Carlsbad, California, USA) suplementado con SFB 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 1% (Life Technologies Carlsbad, California, USA) y KCl 25 mM, se realizó conteo celular, y las células se sembraron a una densidad de 314x10³/cm² en cajas de 60 mm o en cajas de 24 pozos tratadas previamente con Poli-L-lisina, en algunos de los pozos se colocaron cubreobjetos redondos. Las neuronas se mantuvieron a 37°C en una atmosfera con CO₂ 5% y a las 24 h de la siembra se agregó citosina arabinosa 10 µM y a las 96 h se agregó glucosa 5 mM. A los 9 días *in vitro* (DIV), las células fueron utilizadas para la realización de inmunocitoquímicas, marcaje de mitocondrias u obtención de lisados celulares, para este último procedimiento se utilizó buffer RIPA adicionado con inhibidores de proteasas. Los lisados celulares se almacenaron a -70°C hasta su posterior análisis.

Astrocitos

Se siguió el procedimiento reportado por (García Serafín, 2016), en donde se aisló el cerebelo de ratas P7-P9 y se colocó en solución Tyrode, posteriormente se retiraron las meninges. Se realizó una disgregación mecánica haciendo pasar el tejido a través de agujas calibre 21 y 17G y posteriormente se incubó a 37°C durante 15 min. Posterior a la disgregación, las células se centrifugaron por 5 min a 556 x g, el botón se resuspendió en medio DMEM con SFB 10% y penicilina/estreptomicina 1% y las células se sembraron en frascos de poliestireno de 75 cm² previamente tratados con poli-D-lisina y se incubaron a 37°C en una atmosfera con CO₂ 5%. El medio se cambió a las 24 h y posterior a esto dos veces a la semana. Al DIV 15, se realizó un subcultivo, para esto las células se agitaron durante 12 h a 180 rpm, se retiró el medio y se agregó tripsina 0.5% durante 5 min a 37°C. Se realizó un conteo celular y las células se resembraron a una densidad de 15x10³/cm² en cajas de 60 mm o en cubreobjetos redondos colocados en placas de 24 pozos previamente tratados con poli-D-lisina. Al DIV 17, se lisaron las células con buffer RIPA e inhibidores de proteasas y se almacenaron a -70°C hasta su posterior análisis.

Inmunocitoquímica

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas y/o astrocitos sembrados en los cubreobjetos redondos colocados de las placas de 24 pozos, los cuales se fijaron con paraformaldehído al 4%, posterior se llevaron a cabo lavados con PBS y las células se permeabilizaron con tritón 0.01% durante 10 min. Después, se bloquearon con albumina sérica bovina (ASB) 2% por 1 h y se incubaron con anticuerpo primario 1:200 toda la noche en una cámara húmeda a 4°C; para el caso de las neuronas se utilizó anticuerpo anti-MAP2 y para astrocitos anticuerpo anti-GFAP (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 h con anticuerpo secundario biotinilado; posteriormente se incubó durante 1 h con biotina (ImmunoCruz™ mouse ABC Staining System) seguido de 40 min con estreptavidina y se reveló con diaminobencidina (Biogenex, Fremont, California, USA). Se tomaron fotografías representativas en un microscopio Nikon Eclipse E200 con el software Q-Capture Pro 7, 2010 Q Imaging para determinar el porcentaje de neuronas o astrocitos en los cultivos primarios.

Marcaje de mitocondrias

Se utilizaron los cultivos primarios de neuronas (DIV 9) y astrocitos (DIV 20) sembrados en placas de 24 pozos, para esto se retiró el medio y se realizaron lavados con solución salina. Posteriormente se agregó la sonda fluorescente Mitotracker Red (MitoTracker™ Deep Red FM M22426, Thermo Scientific) a una concentración de 200 nM preparada en amortiguador Ringer-Krebs, esta se incubó 20 min a 37°C. Para el marcaje de núcleos, se utilizó la sonda fluorescente Hoechst 33258 (Molecular Probes H1398) bajo las condiciones previamente descritas. Se retiró la sonda y se realizaron lavados con solución salina, las células se mantuvieron en amortiguador Ringer-Krebs, se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (ZOE™ Fluorescent Cell Imager, Bio-Rad Laboratories) y se tomaron fotografías representativas. Las imágenes fueron analizadas en el software Image J.

Aislamiento de la fracción mitocondrial

Se utilizó el protocolo reportado por (Luis-Garcia et al., 2017), en donde se utilizaron ratas P7-P9 a las cuales se les aisló el riñón, corazón, corteza cerebral y cerebelo. Los tejidos aislados se homogenizaron manualmente con un homogeneizador Dounce en 2 ml de amortiguador MSEGTA (manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM), los tejidos homogenizados se centrifugaron a durante 5 min a 500 g. Se recuperó el sobrenadante y este se centrifugó a 14000 g por 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en amortiguador MSEGTA con digitonina al 10% y se volvió a centrifugar a 14000 g por 10 min, posteriormente se realizó un gradiente con Percoll para purificar la fracción mitocondrial, el cual consistió en que el pellet obtenido del paso anterior se resuspendió en Percoll al 12%, este se colocó sobre 1 mL de Percoll al 24% y se centrifugó durante 15 min a 18000 g. En el fondo del tubo se visualizó la fracción mitocondrial purificada, la cual fue recuperada y resuspendida en el amortiguador, se centrifugó a 18000 g por 5 min y el pellet

se resuspendió por inversión con el amortiguador y finalmente se centrifugó a 14000 g por 10 min. El pellet obtenido se resuspendió 100 µL de amortiguador y se almacenó a -70°C.

Cuantificación de proteína total

Se utilizó el método de Lowry para determinar la cantidad de proteína total en la muestra, este método se basa en la reducción del fosfomolibdato (Folin) a fosfotungsteno que obtiene una coloración azul y es detectable a 500-750 nm. La reducción se lleva a cabo por la oxidación de aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano), esta oxidación es catalizada por cobre.

Para este método se utilizó la fracción mitocondrial y los lisados celulares, para los cuales se realizó una dilución 1:100. Los valores de absorbancia se determinaron en un lector de placas (Sinergy HT, Biotek, Winooski, VT, USA) a 600 nm, los cuales fueron extrapolados con una curva estándar de ASB. Los valores fueron reportados como mg proteína/ml.

Western blot

Se utilizaron las muestras de la fracción mitocondrial de riñón, corazón, corteza y cerebelo, así como lisados de células PC12, neuronas y astrocitos. Se realizó una electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) en geles de gradiente de acrilamida al 7.5%, utilizando 0.5 µg de proteína de fracción mitocondrial o bien, 40 µg de lisado celular. Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a membranas de PVDF, las cuales se bloquearon con leche descremada 5% en Tris-amortiguador salino-Tween 20 (TBS-T) durante 2h, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario Complex II WB Antibody Cocktail ab110410 (Abcam, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido), para detectar las subunidades SDHA, SDHB y F0 de la ATP sintasa a una dilución 1:10000 durante toda la noche. Las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron durante 1h con anticuerpo secundario anti-mouse a una dilución 1:15000. Se utilizó un sistema de detección quimioluminiscente y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador (*FUSION Solo S, Vilber Lourmat*). Las imágenes se capturaron mediante el software *Fusioncapt advance solo 4s*. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ para determinar la densidad óptica. Los valores se normalizaron con base en el valor más alto registrado, correspondiente a la ATPasa de fracción la mitocondrial de corazón, al que se le asignó el valor de uno.

Determinación de la actividad enzimática de la SDH

La actividad de la SDH se determinó con base en el protocolo reportado por (M. Orozco-Ibarra, Garcia-Morales, Calvo-Silva, Fernandez-Valverde, & Serrano-Garcia, 2016) que se basa en la reducción del aceptor final de electrones 2,6 diclorofenolindofenol (DCPIP), que cuando se reduce pasa de azul a incoloro. Se utilizó la fracción mitocondrial de muestras de riñón, corazón, corteza y cerebelo que previamente fueron congeladas (nitrógeno líquido) y descongeladas para permeabilizarlas, igualmente se utilizaron los lisados celulares de la línea celular PC12 y de los cultivos primarios de neuronas y astrocitos.

Se formaron tres grupos: Sin tratamiento, isocitrato e incubado 10 min con isocitrato, para el segundo caso a las muestras se les agregó ácido isocítrico 2mM (Sigma Aldrich C. St. Louis, Missouri, USA) y posteriormente se determinó la actividad. Para el último grupo, se agregó ácido isocítrico 2mM, se incubó durante 10 min y se procedió a medir la actividad.

Para medir la determinación de la actividad se agregó la mezcla de reacción (buffer de fosfatos 10 nM, rotenona 2 µg/mL (Sigma Aldrich C. St. Louis, Missouri, USA), antimicina 2 µM, cianuro de potasio 2 mM) a las muestras y ésta se inició con la adición de decilubiquinona (Enzo Farmingdale, NY, USA). La actividad se leyó a 660 nm durante 5 min en el equipo Sinergy HT, Biotek (Winooski, VT, USA). La actividad se reportó como nmol/min/mg de proteína.

Análisis estadístico

Para el análisis de datos se realizó una prueba de ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Bonferroni, las diferencias significativas son aquellas con $p < 0.05$. El análisis de datos se llevó a cabo en el programa Prism6 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTADOS

Cultivos primarios

Como se menciona en el apartado anterior (Materiales y métodos), el protocolo para la preparación de los cultivos primarios parte de una muestra de tejido del cerebelo, a partir del cual se realizan disgregaciones mecánicas y enzimáticas que permiten separar y obtener las células que conforman a este tejido, sin embargo, ya que se parte de una muestra de tejido, es posible que en el cultivo estén presente otros tipos celulares, como microglía.

La morfología celular fue valorada para diferenciar las neuronas de los astrocitos, para esto se tomaron micrografías de campo claro tanto de los cultivos de neuronas como de los astrocitos. En la Figura 7 se observan imágenes representativas de los cultivos en donde se diferencian las neuronas porque son de menor tamaño en comparación de los astrocitos, además de que las neuronas presentan el soma granular y pequeño, con procesos alargados y delgados, mientras que los astrocitos exhiben una morfología aplanada y alargada.

Pureza de los cultivos primarios

Además de la morfología celular, la identidad de los cultivos se corroboró mediante inmunocitoquímica, esta técnica se basa en el inmunomarcaje de proteínas específicas de neuronas y de astrocitos; para el caso particular de las neuronas, se utilizó un anticuerpo que se une a la proteína MAP2, la cual es una proteína del citoesqueleto y como se observa en la Figura 8A, se identifica una marca fuerte tanto en el soma con forma de gota como en los procesos.

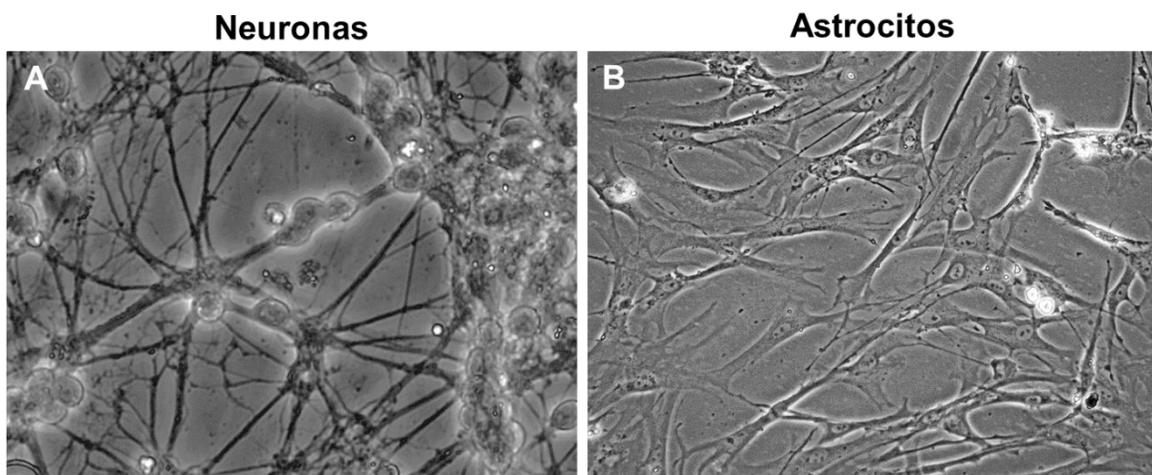


Figura 7. Micrografías de los cultivos primarios. (A) Imágenes de campo claro de cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo de 7 DIV en un aumento de 40x y (B) astrocitos de 15 DIV en aumento de 10x.

Para el inmunomarcaje de los astrocitos se utilizó el anticuerpo anti GFAP que se une a la proteína GFAP que es una proteína presente en los filamentos intermedios de estas células, y al igual que en las neuronas, se observa una marca en el citoplasma de los astrocitos.

Se determinó que el cultivo primario de neuronas está conformado en un 98% de neuronas, para esto se realizó un doble marcaje utilizando los anticuerpos anti MAP2 y anti GFAP, en la Figura 8B se observa una imagen representativa de este doble marcaje, por un lado, las neuronas (MAP2) son aquellas que presentan somas pequeños y granulares mientras que los astrocitos (GFAP) presentan una morfología alargada y son de mayor tamaño.

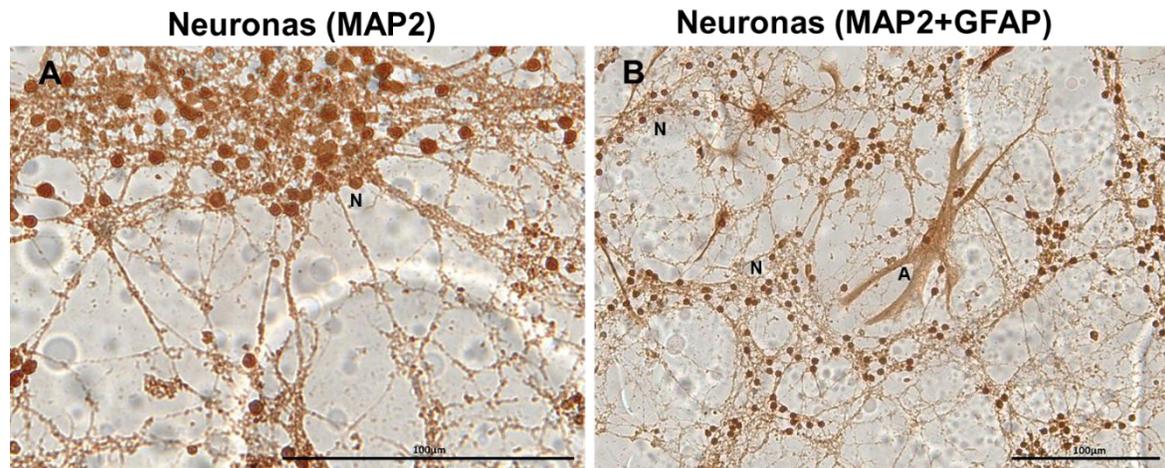


Figura 8. Microfotografías de inmunocitoquímicas de cultivos primarios. A. Imagen de inmunocitoquímica realizada en cultivos primarios de NGC con anticuerpo anti MAP2. B. Doble inmunomarcaje con MAP2 y GFAP. N. Neurona. A. Astrocito. La barra representa 100 µm.

Marcaje de mitocondrias

Para corroborar que las mitocondrias presentes en las células presentaran un potencial de membrana, se utilizó la sonda fluorescente MitoTracker Red, ya que esta sonda es permeable en células que presentan potencial de membrana.

En la Figura 9, se observan fotografías representativas tomadas en un microscopio de fluorescencia (ZOE™ Fluorescent Cell Imager, Bio-Rad Laboratories), en donde las mitocondrias se observan en color rojo y en azul se encuentra marcado el núcleo con la sonda Hoechst 33258; en el panel A se encuentran una microfotografía de fluorescencia de los cultivos primarios de neuronas, en donde se observa que las mitocondrias se distribuyen tanto en el soma como en los procesos. Con un aumento mayor (Figura 9C) se aprecia que el núcleo abarca gran parte del soma y que las mitocondrias se encuentran distribuidas alrededor del núcleo y en los procesos.

En la Figura 9B y C se presentan imágenes representativas del marcaje de las mitocondrias en los cultivos primarios de los astrocitos, en donde se puede apreciar que estos organelos se distribuyen a lo largo de estas células y en panel C se identifica que las mitocondrias se concentran alrededor del núcleo.

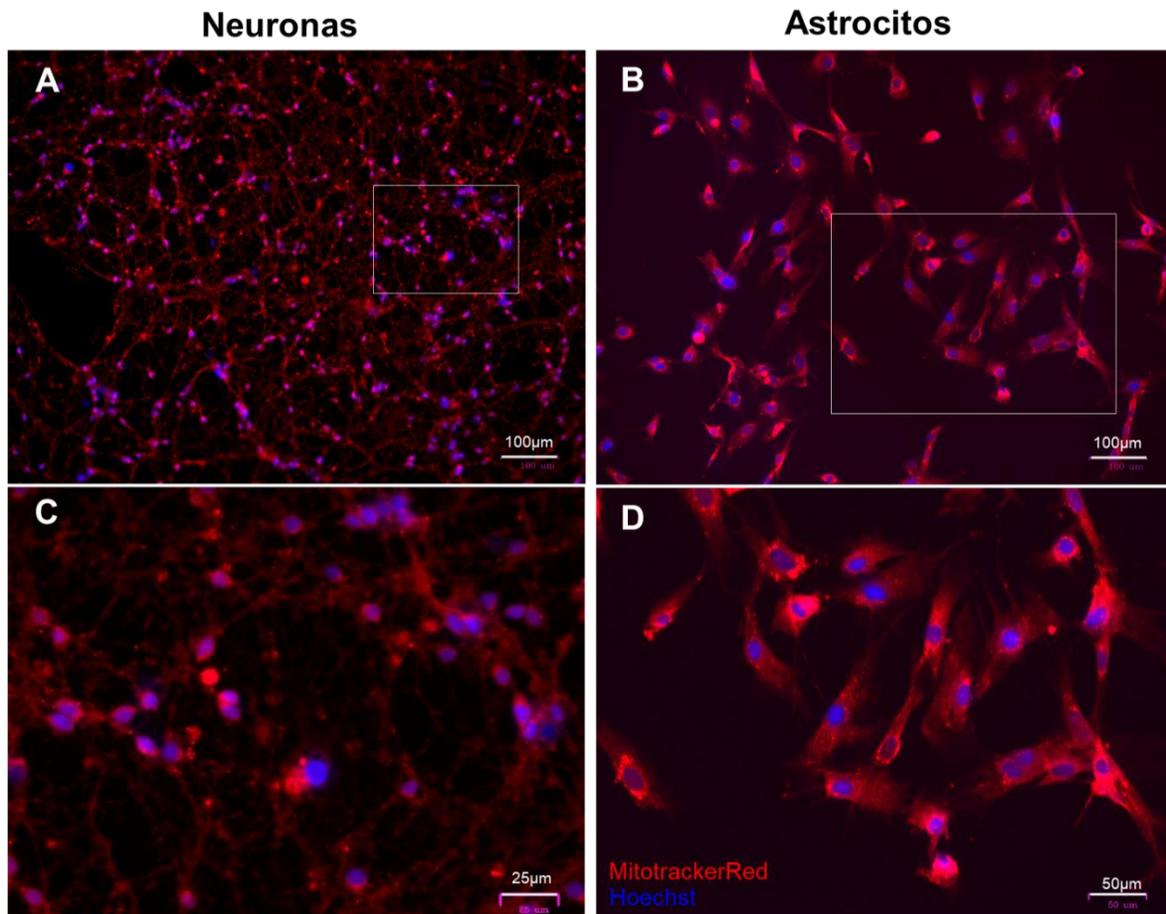


Figura 9. Marcaje de mitocondrias en cultivos primarios. Mitocondrias marcadas con la sonda fluorescente en cultivos primario de NGC (A) y astrocitos (B), las imágenes inferiores (C y D) corresponden al aumento del recuadro blanco superior.

Expresión de la SDH

Para identificar la expresión de las proteínas SDHA Y SDHB, se hizo Western Blot utilizando un el cóctel de anticuerpos Complex II WB Antibody Cocktail (Abcam, ab110410) que marcan ambas proteínas, además de la subunidad F0 de la ATPasa como control de carga interno.

Con fines comparativos, se determinó la expresión de las subunidades A y B de la SDH de la fracción mitocondrial de diferentes tejidos, ya que como se mencionó en la introducción la expresión de esta enzima presenta un patrón diferencial. En la Figura 10A se observa la expresión de las proteínas F₀ de la ATPasa, SDHA y SDHB y es posible apreciar que esta es mayor en la fracción mitocondrial de corazón y riñón, en comparación con la de corteza cerebral, cerebelo y lisados celulares de PC12, neuronas y astrocitos.

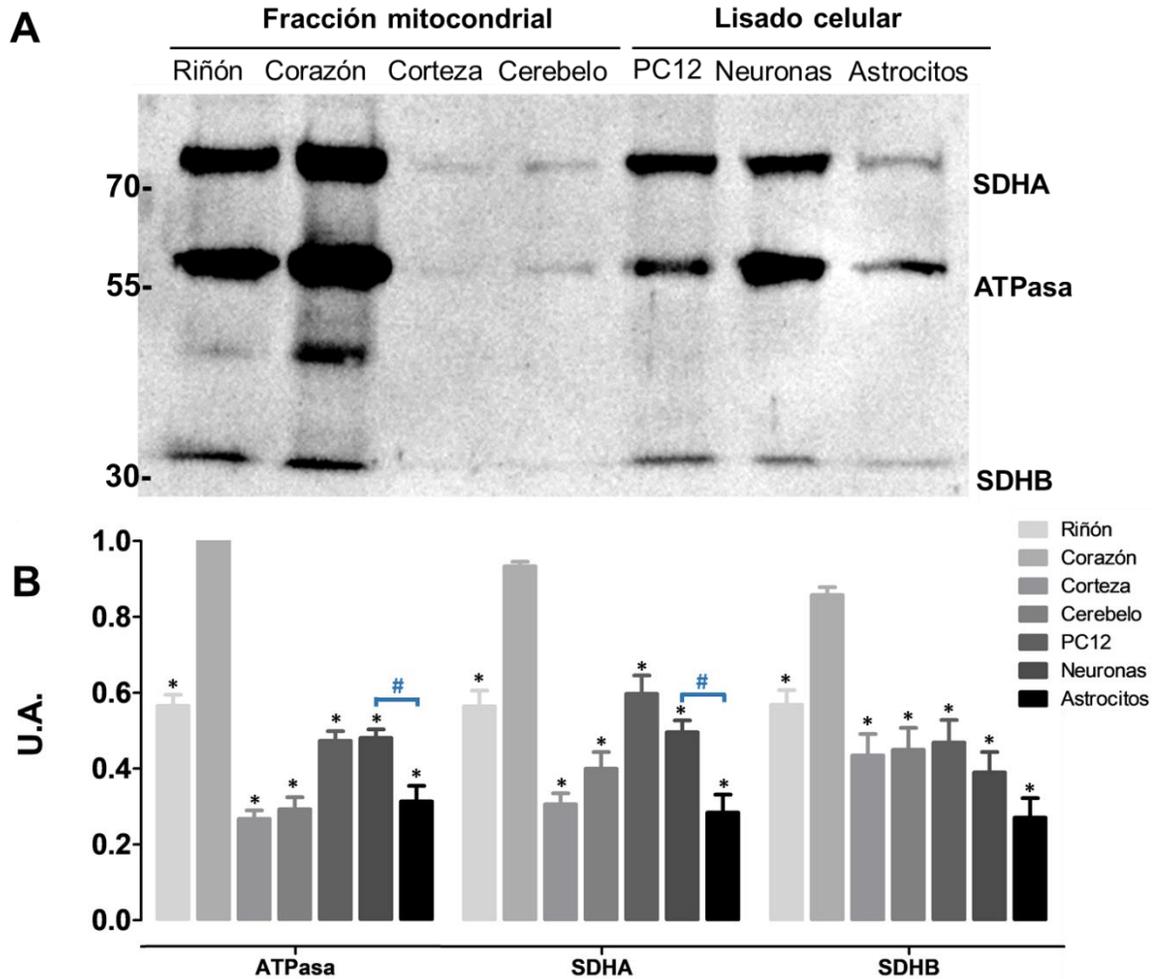


Figura 10. Expresión de la SDH. A. Western Blot representativo de la expresión de la subunidad A y B de la SDH de la fracción mitocondrial de riñón, corazón, corteza y cerebelo, así como de lisados celulares de la línea celular PC12 y de cultivos primarios de NGC y astrocitos. B. Cuantificación de la expresión de las proteínas. Los valores graficados son la media de una n=5 y la diferencia significativa se denota por * # P<0.05.

En la Figura 10B se realizó la cuantificación de la expresión de ATPasa, SDHA y SDHB, en donde la intensidad de las bandas se normalizó con la ATPasa de la fracción mitocondrial de corazón. La expresión de la ATPasa, SDHA y SDHB es mayor en mitocondrias de corazón que en mitocondrias aisladas del resto de los tejidos analizados (P<0.001).

También se determinó que la expresión de la ATPasa y la SDHA en riñón es mayor en comparación con corteza cerebral ($P < 0.001$) y cerebelo (ATPasa $P < 0.001$, SDHA $P < 0.05$). Al comparar la expresión de todas las proteínas, no se identificaron diferencias estadísticas significativas entre corteza cerebral y cerebelo.

Para el caso del análisis de la expresión de proteínas de los lisados celulares, se utilizaron células PC12 como control y cultivos primarios de neuronas y astrocitos. En la Figura 10A se observa que los tres tipos celulares analizados expresan en diferente proporción las proteínas F0 de la ATPasa, SDHA y SDHB. La cuantificación de la expresión de la ATPasa, SDHA y SDHB indica que no existen diferencias estadísticas significativas entre células PC12 y neuronas. Al comparar los astrocitos contra las células PC12, se identificó que estas últimas expresan en mayor proporción la ATPasa ($P < 0.05$), SDHA ($P < 0.001$) y SDHB ($P < 0.01$).

Finalmente, al analizar la expresión de la ATPasa, SDHA y SDHB neuronas y astrocitos se identificó que sólo existen diferencias estadísticas significativas entre la expresión de la proteína SDHA ($P < 0.001$) y ATPasa ($P < 0.05$) (Figura 10B).

Actividad de la SDH

Se utilizaron muestras de fracciones de mitocondria aislada de riñón y corazón como control positivo, ya que estos tejidos presentan una alta expresión de esta proteína, los cuales se compararon con muestras de cerebelo y corteza cerebral.

En la Figura 11 se presenta la actividad de la SDH. Se encontró que la actividad sin tratamiento con ácido isocítrico es mayor ($P < 0.001$) en mitocondrias aisladas de riñón y corazón en comparación con las de corteza y cerebelo. Para el tratamiento con ácido isocítrico, se utilizaron dos tiempos, para el primer caso (barra azul claro) las muestras se les agregó ácido isocítrico 2mM y se determinó la actividad enzimática inmediatamente, mientras que para el de incubado con isocitrato (barra azul oscuro), se incubó durante 10 min con ácido isocítrico y se procedió a medir la actividad.

Como se observa en las barras azul claro (Isocitrato) la actividad no cambia para las muestras de riñón, sin embargo, esto es distinto a las muestras de corazón y corteza cerebral en donde se observa una disminución significativa de la actividad ($P < 0.001$). Mientras que el tratamiento por 10 min con ácido isocítrico se observó una disminución significativa en la actividad de SDH de la fracción mitocondrial de corteza, corazón y riñón, pero esto no se observa en cerebelo, en donde no se identifican cambios estadísticos significativos.

A diferencia de las mitocondrias aisladas, en los lisados celulares de cultivos primarios de neuronas y astrocitos es posible identificar incremento en la actividad de la SDH al adicionar ácido isocítrico (Figura 12). Se utilizó la línea celular PC12 como control, ya que era necesario corroborar que el método nos proporcionara la actividad de células lisadas, y como se observa en la Figura 12 fue posible identificar la actividad.

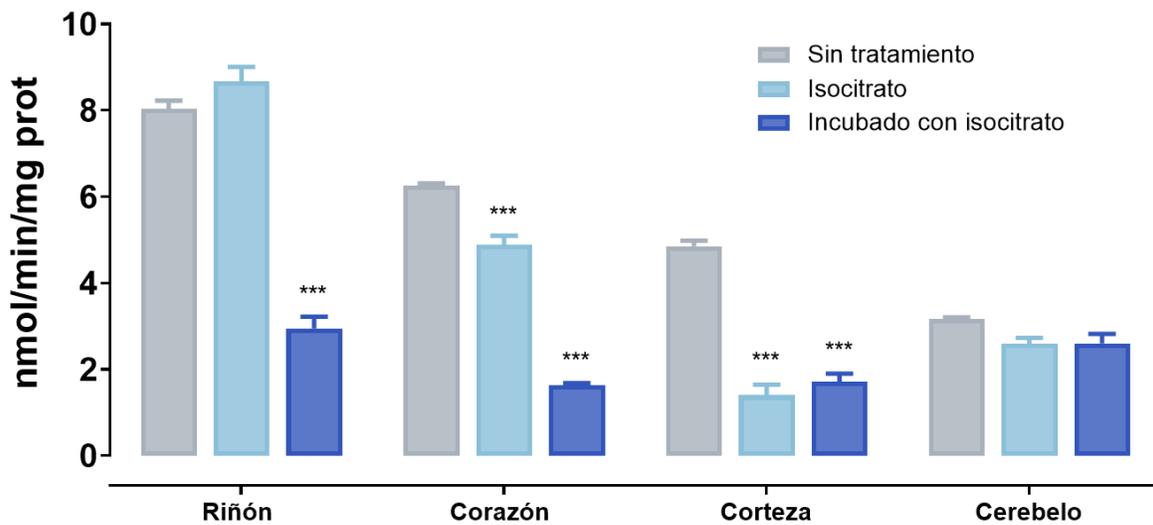


Figura 11. Efecto del isocitrato sobre la actividad de la SDH en mitocondrias aisladas. La actividad de la SDH se midió mediante la reducción de DCPIP de la fracción mitocondrial de riñón, corazón, corteza cerebral y cerebro, de los cuales se les agregó isocitrato 2 mM y se midió la actividad al tiempo 0 y a los 10 min de incubación. Los valores representados son la media de una n=5 y la diferencia significativa se denota por ***P<0.001.

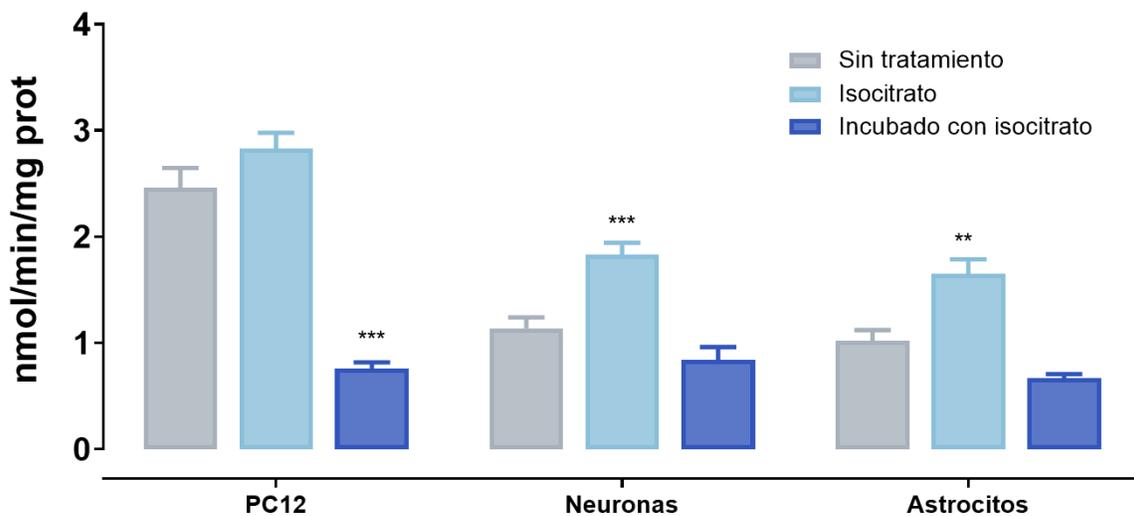


Figura 12. Efecto del isocitrato sobre la actividad de la SDH en células. Se determinó la actividad de la SDH de lisados celulares de PC12 y cultivos primarios de NGC y astrocytos mediante la técnica de DCPIP. Para el caso de los lisados con isocitrato, a estos se agregó isocitrato 2mM y posteriormente se midió la actividad, en el caso de los de 10min, se incubó este compuesto previo a medir la actividad. Los valores representados son la media de una n=6 y la diferencia significativa se denota por ***P<0.001 **P<0.01.

Para el caso de los lisados sin tratamiento no se identificaron diferencias estadísticas significativas entre neuronas y astrocitos, lo cual es contrario a lo esperado, debido a que las neuronas presentan un metabolismo oxidativo activo a diferencia de los astrocitos.

Con el tratamiento de ácido isocítrico, fue posible observar un incremento en la actividad tanto en las neuronas como en los astrocitos al medir la actividad inmediatamente, sin embargo, no se observó este mismo efecto en las células PC12. En los controles de la Figura 12, se identifica un patrón similar con los controles de la Figura 11, en donde posterior a la incubación con ácido isocítrico por 10 min se observa una reducción en la actividad, sin embargo, las neuronas y astrocitos no presentan cambios significativos con respecto a las células sin tratamiento.

DISCUSIÓN

Estudios sobre la SDH han indicado que algunas enfermedades neurodegenerativas se relacionan con alteraciones en la expresión y actividad de las diferentes subunidades que conforman a esta enzima (Jodeiri Farshbaf & Kiani-Esfahani, 2017) por lo que se ha planteado que el estudio de esta enzima podría ser aplicado para desarrollar blancos terapéuticos para diversas patologías. En la actualidad, el papel de la enzima SDH es centro de discusión ya que diversos autores han propuesto que esta enzima se encuentra inhibida en células que conforman al SNC, debido a que se ha reportado que la actividad se encuentra disminuida en muestras cerebrales (fracción mitocondrial y lisados celulares) o en otros casos, no se ha reportado dicha actividad.,

En el presente trabajo se determinó que la expresión de las proteínas SDHA y SDHB difiere entre los diferentes órganos y células analizados lo cual es consistente con la información de diversas bases de datos, por ejemplo, *The Human Protein Atlas* (2018) reporta que para el caso de la expresión de la proteína SDHA, ésta es predominante en tejidos musculares (como corazón, músculo esquelético y liso), riñón, hígado y tejido endócrino, mientras que el cerebro presenta una menor expresión en comparación con los órganos antes mencionados. Uno de los resultados esperados era que la expresión de las proteínas SDHA, SDHB y otras proteínas oxidantes como la ATPasa fueran iguales o incluso mayores en cerebro en comparación con otros tejidos, ya que se ha reportado que el cerebro utiliza el 60% de la glucosa de todo el cuerpo (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002).

Esta misma base de datos muestra que la expresión de la SDHA es similar en diferentes regiones cerebrales analizadas, lo cual coincide con los resultados obtenidos de la cuantificación del Western Blot.

Las diferencias en la expresión de las subunidades de la enzima SDH, se pueden asociar a que los diferentes órganos maduran durante diferentes estadios del desarrollo embrionario, ya que se ha reportado que la expresión de la SDH en tejidos musculares de ratones incrementa conforme el embrión se va desarrollando, y al nacer, las mitocondrias de las fibras musculares presenta una alta expresión y actividad de la SDH (Goldspink, 1969). A diferencia de los tejidos musculares, el cerebro continúa desarrollándose posterior

al nacimiento de los organismos, en este estudio se utilizaron ratas P7-P9, por lo que se observa que la expresión de las proteínas SDHA y SDHB es muy baja (casi imperceptible en el Western Blot), lo cual, también ha sido reportado en análisis histológicos previos de muestras de espina dorsal de rata y humano en diferentes estadios embrionarios, en donde los autores concluyeron que la expresión continúa incrementando hasta las 6 semanas posteriores al nacimiento (Wolf et al., 1975).

Aparentemente, este es el primer reporte en el cual se muestra que la expresión de la SDH es diferente entre neuronas y astrocitos, esta diferencia se asocia con el metabolismo predominante entre estos dos tipos celulares, ya que estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los astrocitos son glucolíticos mientras que las neuronas oxidativas (Hyder et al., 2006). Estudios previos demuestran que la regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo energético en neuronas y astrocitos es distinto, ya que se ha identificado que en astrocitos se lleva a cabo una mayor expresión de genes (y proteínas) que se relacionan con el metabolismo glucolítico, por ejemplo, el gen *Pfkfb3* que codifica para la enzima fructuosa 2,6 bifosfato o la isoforma de 2 de la enzima piruvato cinasa que regula la vía glucolítica (Zhang et al., 2014).

El control de carga permite identificar que la cantidad de proteína utilizada sea uniforme en las diferentes muestras analizadas, sin embargo, se identificó que los controles de carga presentes en el cóctel de anticuerpos (subunidad F0 de la ATPasa) difieren entre los órganos y tipos celulares estudiados a pesar de que la cantidad de proteína utilizada fuera la misma. La expresión diferencial de este control de carga se asocia con las funciones que llevan a cabo las diferentes células, ya que es probable que, al presentar funciones distintas, la expresión de las proteínas varía. Estas diferencias son similares a las identificadas por otros autores, quienes concluyeron que la expresión de las proteínas es variable entre los diferentes órganos, tejidos y células (Pontén et al., 2009); sin embargo, es probable que la expresión de aquellas proteínas con gran abundancia, presenten un patrón similar entre diferentes tipos celulares (Geiger, Wehner, Schaab, Cox, & Mann, 2012), por lo que en estudios comparativos posteriores podrían utilizarse como control de carga las proteínas presentes en histonas, fosfopiruvato hidratasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), tubulina, proteínas de choque térmico o proteínas del ribosoma.

Respecto a la actividad de la enzima SDH, se identificó que ésta es distinta en los diferentes órganos analizados, lo cual es consistente con la expresión de las subunidades A y B, ya que en aquellos órganos que presentaban una mayor expresión, también presentaban una mayor actividad. Previamente, se ha determinado la actividad de esta enzima en muestras de diferentes tejidos, y es posible identificar que en algunos de estos datos la actividad de la SDH es superior en muestras de corazón, riñón, hígado y pulmones en comparación con las muestras de cerebro (corteza) (Lippold, 1982; Madej et al., 2007), igualmente se ha descrito que las mitocondrias de corazón y cerebro (particularmente las de corteza y cerebelo) son más susceptibles a inhibirse por ácido 3-nitropropiónico que las de hígado y riñón (Mirandola, Melo, Saito, & Castilho, 2010).

En lisados celulares se identificó que la actividad enzimática de la SDH incrementa posterior a la incubación con ácido isocítrico, esto es consistente con los artículos mencionados en la introducción en donde se reportó el incremento en la actividad de la SDH posterior al tratamiento con este compuesto (Armstrong & Staples, 2010), sin embargo la actividad no presentó cambios al incubarse con este intermediario, lo cual puede asociarse a que el isocitrato se une de manera rápida al sitio activo de la SDH promoviendo la liberación del OAA, pero este no permanece unido a la enzima por lo cual no se ve un efecto prolongado en la actividad. Hasta el momento no se han encontrado reportes de los efectos que tiene el ácido isocítrico sobre la actividad de la cadena respiratoria o en particular sobre el complejo II (SDH).

El mecanismo por el cual el ácido isocítrico entra a las células aún no ha sido completamente descrito, sin embargo, este intermediario del TCA es estructuralmente muy similar al ácido cítrico, y por esto comparten diferentes transportadores, uno de ellos es el Transportador de Citrato asociado a Sodio que podría facilitar la entrada del ácido isocítrico al citoplasma, este transportador se encuentra altamente expresado en células cerebrales (Inoue, Zhuang, Maddox, Smith, & Ganapathy, 2002).

Una vez que se encuentre en el citoplasma celular, el isocitrato podría ingresar a la mitocondria mediante los transportadores de citrato (Mycielska et al., 2009), y dentro de la mitocondria incrementaría la concentración, favoreciendo que el TCA incremente su actividad, uno de los intermediarios que incrementaría sería el succinato, el cual al estar en mayor concentración podría competir con el OAA removiéndolo del sitio activo de la SDH permitiendo que esta catalice la oxidación de succinato a fumarato.

El presente trabajo corrobora que la actividad enzimática de la SDH se encuentra disminuida en el cerebro en comparación con otros órganos (corazón y riñón), además de que se identificó que esta actividad también se encuentra disminuida en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de cerebelo de rata; se ha propuesto que el OAA es el compuesto que disminuye dicha actividad inhibiendo el sitio activo de la SDH, sin embargo, aún no queda claro el motivo de esta inhibición.

Diversos autores han propuesto al OAA como el regulador del metabolismo oxidativo (Ackrell et al., 1974; Tyler, 1960), ya que puede modificar el consumo de los intermediarios del TCA mientras que en otros trabajos se ha propuesto que la inhibición de la SDH en células cerebrales tiene un carácter de protección hacia las mismas, ya que si la actividad de la SDH es baja, el flujo reverso de electrones del complejo II hacia el I sería muy bajo lo que conllevaría a una menor producción de ROS (A. Panov et al., 2007; A. V. Panov et al., 2011).

La adición de isocitrato es un método indirecto para determinar la inhibición de la SDH, sin embargo, reportes previos demuestran que la adición de otros intermediarios del TCA también incrementan la actividad enzimática de la SDH. Uno de estos es el malonato, el cual se incubó durante 30 min en muestras de la fracción mitocondrial de cerebro y corazón y se observó un incremento en la actividad (Stepanova et al., 2016).

Otro intermediario que presenta el mismo efecto es el D-malato (Kearney, Ackrell, & Mayr, 1972), así mismo, se han utilizado otros compuestos que promueven el incremento de la actividad enzimática de la SDH como ATP, Ubiquinona reducida, Succinil CoA, iones de bromuro y rapamicina (Ackrell et al., 1974; Kearney et al., 1972; Priegnitz, Brzhevskaya, & Wojtczak, 1973; Villa-Cuesta, Holmbeck, & Rand, 2014). Otros estudios han demostrado que la adición de otros intermediarios del TCA como L-malato, fumarato y α -cetoglutarato tienen un efecto directo sobre la concentración y utilización del OAA (Tyler, 1960) por lo que al igual que el ácido isocítrico, podrían promover el incremento de la actividad de la enzima SDH.

CONCLUSIÓN

- En este trabajo fue posible detectar la actividad enzimática en lisados celulares de cultivos de astrocitos de cerebelo.
- La actividad y expresión de la enzima SDH es mayor en mitocondrias aisladas de corazón y riñón en comparación que las de las regiones cerebrales (corteza y cerebelo).
- La actividad de la SDH incrementa posterior al tratamiento con isocitrato en los lisados celulares de neuronas y astrocitos, lo cual podría indicar que esta enzima se encuentra inhibida.

PERSPECTIVAS

- Comparar la actividad de la SDH de diferentes regiones cerebrales y en diferentes etapas del desarrollo.
- Buscar alguna proteína cuya expresión no sea tan variable entre neuronas y astrocitos para ser utilizada como control de carga.
- Identificar si la densidad mitocondrial varía entre neuronas y astrocitos.
- Determinar el efecto de otros intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos sobre la actividad enzimática de la SDH.
- Cuantificar la actividad enzimática de la SDH en modelos *in vivo* e identificar el efecto de la adición de ácido isocítrico.

LIMITACIONES

En el presente trabajo se identificó que la actividad enzimática y expresión de la SDH se encuentra disminuida en las muestras de mitocondrias aisladas de neuronas y astrocitos, sin embargo, esto puede ser resultado de la edad de las ratas de donde se obtuvieron las muestras, ya que como se señaló en la discusión, la expresión y actividad de la enzima cambia a lo largo del desarrollo; por lo cual se requieren de experimentos posteriores con organismos adultos para corroborar esta hipótesis.

Igualmente, se describió que existen diferencias en la expresión de las subunidades A y B de la SDH entre neuronas y astrocitos, lo cual se relaciona con el metabolismo predominante de cada tipo celular, aunque esta diferencia también podría asociarse a que las neuronas presentan mayor número de mitocondrias en comparación de astrocitos, aunque esto aun no ha sido confirmado.

Finalmente, en este estudio se analizó la actividad enzimática en lisados celulares de cultivos primarios de neuronas y astrocitos, por lo que se requiere de estudios posteriores en mitocondrias aisladas de los cultivos primarios para corroborar que la actividad varía entre estos dos tipos celulares.

REFERENCIAS

- Ackrell, B. A., Kearney, E. B., & Mayr, M. (1974). Role of oxalacetate in the regulation of mammalian succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 249(7), 2021-2027.
- Alberts, B., Wilson, J. H., & Hunt, T. (2008). *Molecular biology of the cell 5th ed. : Reference edition*: New York : Garland Science, c2008.
- Armstrong, C., & Staples, J. F. (2010). The role of succinate dehydrogenase and oxaloacetate in metabolic suppression during hibernation and arousal. *J Comp Physiol B*, 180(5), 775-783. doi:10.1007/s00360-010-0444-3
- Bardella, C., Pollard, P. J., & Tomlinson, I. (2011). SDH mutations in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(11), 1432-1443. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272811001629>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.003>
- Barrientos, A., Fontanesi, F., & Diaz, F. (2009). Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 19, Unit19.13. doi:10.1002/0471142905.hg1903s63
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry. [recurso electrónico]*: New York : W. H. Freeman and Co. 2002.
- Brown, A. M., Baltan Tekkok, S., & Ransom, B. R. (2004). Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem Int*, 45(4), 529-536. doi:10.1016/j.neuint.2003.11.005
- Chandel, N. S. (2015). Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles. *Cell Metab*, 22(2), 204-206. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.013
- Chang, H. W., Shtessel, L., & Lee, S. S. (2015). Collaboration between mitochondria and the nucleus is key to long life in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med*, 78, 168-178. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.576
- Chen, R., Fearnley, I. M., Peak-Chew, S. Y., & Walker, J. E. (2004). The Phosphorylation of Subunits of Complex I from Bovine Heart Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26036-26045. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/279/25/26036.abstract>. doi:10.1074/jbc.M402710200
- de Gómez-Puyou, M. T., Chávez, E., Freitas, D., & Gómez-Puyou, A. (1972). On the regulation of succinate dehydrogenase in brain mitochondria. *FEBS Letters*, 22(1), 57-60. Retrieved from <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=11946560>(=es&site=eds-live).
- DiMauro, S., & Schon, E. A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med*, 348(26), 2656-2668. doi:10.1056/NEJMra022567
- Fedotcheva, N. J., Sharyshev, A. A., Mironova, G. D., & Kondrashova, M. N. (1985). Inhibition of succinate oxidation and K⁺ transport in mitochondria during hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 82(1), 191-195. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305049185901518>. doi:[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(85\)90151-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(85)90151-8)
- Frohman, C. E., Orten, J. M., & Smith, A. H. (1951). Chromatographic determination of the acids of the citric acid cycle in tissues. *J Biol Chem*, 193(1), 277-283.
- García Serafin, A. (2016). *Estudio de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en cultivos primarios de astrocitos*. Universidad Nacional Autónoma de México,
- Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J., & Mann, M. (2012). Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 11(3), M111.014050-M014111.014050. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22278370>Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3316730/>. doi:10.1074/mcp.M111.014050
- Goldspink, G. (1969). Succinic dehydrogenase content of individual muscle fibers at different ages and stages of growth. *Life Sci*, 8(16), 791-808.
- Hagerhall, C. (1997). Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*, 1320(2), 107-141.
- Hoekstra, A. S., & Bayley, J. P. (2013). The role of complex II in disease. *Biochim Biophys Acta*, 1827(5), 543-551. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.005

- Hyder, F., Patel, A. B., Gjedde, A., Rothman, D. L., Behar, K. L., & Shulman, R. G. (2006). Neuronal–Glial Glucose Oxidation and Glutamatergic–GABAergic Function. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(7), 865-877. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600263>. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600263
- Inoue, K., Zhuang, L., Maddox, D. M., Smith, S. B., & Ganapathy, V. (2002). Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. *J Biol Chem*, 277(42), 39469-39476. doi:10.1074/jbc.M207072200
- Iverson, T. M. (2013). Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5), 648-657. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272812010316>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.008>
- Jodeiri Farshbaf, M., & Kiani-Esfahani, A. (2017). Succinate dehydrogenase: Prospect for neurodegenerative diseases. *Mitochondrion*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/S1567724916302410>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.12.002>
- Jonckheere, A. I., Smeitink, J. A. M., & Rodenburg, R. J. T. (2012). Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), 211-225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278611/>. doi:10.1007/s10545-011-9382-9
- Kappen, L. S., Brodie, J. D., & Nicholls, P. (1973). Fast and Slow Inhibitors of Ox Heart Succinate Dehydrogenase: Action of Oxaloacetate and its Fluoro Analogues. *Biochemical Society Transactions*, 1(4), 877. Retrieved from <http://www.biochemsoctrans.org/content/1/4/877.abstract>.
- Kearney, E. B., Ackrell, B. A. C., & Mayr, M. (1972). Tightly bound oxalacetate and the activation of succinate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 49(4), 1115-1121. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X72903282>. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(72\)90328-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(72)90328-2)
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13, 89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4625866/>. doi:10.1186/s12915-015-0201-x
- Li, Y., Park, J. S., Deng, J. H., & Bai, Y. (2006). Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex. *J Bioenerg Biomembr*, 38(5-6), 283-291. doi:10.1007/s10863-006-9052-z
- Lippold, H. J. (1982). Succinic dehydrogenase activity in liver, kidney and brain of rat. *Histochemistry*, 75(2), 287-291. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/BF00496018>. doi:10.1007/BF00496018
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition.: W. H. Freeman.
- Luis-Garcia, E. R., Limon-Pacheco, J. H., Serrano-Garcia, N., Hernandez-Perez, A. D., Pedraza-Chaverri, J., & Orozco-Ibarra, M. (2017). Sulforaphane prevents quinolinic acid-induced mitochondrial dysfunction in rat striatum. *J Biochem Mol Toxicol*, 31(2). doi:10.1002/jbt.21837
- Madej, P., Plewka, A., Madej, J. A., Plewka, D., Mroczka, W., Wilk, K., & Dobrosz, Z. (2007). Ozone therapy in induced endotoxemic shock. II. The effect of ozone therapy upon selected histochemical reactions in organs of rats in endotoxemic shock. *Inflammation*, 30(3-4), 69-86. doi:10.1007/s10753-007-9023-5
- Magistretti, P. J., & Allaman, I. (2015). A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. *Neuron*, 86(4), 883-901. doi:10.1016/j.neuron.2015.03.035
- Maklashina, E., & Cecchini, G. (2010). The quinone-binding and catalytic site of complex II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(12), 1877-1882. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272810000691>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.015>
- Maklashina, E., Kotlyar, A. B., Karliner, J. S., & Cecchini, G. (2004). Effect of oxygen on activation state of complex I and lack of oxaloacetate inhibition of complex II in Langendorff perfused rat heart. *FEBS Lett*, 556(1-3), 64-68.

- Matsuno-Yagi, A., & Hatefi, Y. (2001). Ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase (complex III). Effect of inhibitors on cytochrome b reduction in submitochondrial particles and the role of ubiquinone in complex III. *J Biol Chem*, 276(22), 19006-19011. doi:10.1074/jbc.M101446200
- Mirandola, S. R., Melo, D. R., Saito, A., & Castilho, R. F. (2010). 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res*, 88(3), 630-639. doi:10.1002/jnr.22239
- Motori, E. (2012). *Neuroinflammation and the role of glia: relevance for neurodegenerative and neurosupportive roles*. Università di Bologna,
- Mycielska, M. E., Patel, A., Rizaner, N., Mazurek, M. P., Keun, H., Ganapathy, V., & Djamgoz, M. B. (2009). Citrate transport and metabolism in mammalian cells: prostate epithelial cells and prostate cancer. *Bioessays*, 31(1), 10-20. doi:10.1002/bies.080137
- Orozco-Ibarra, M., Estrada-Sánchez, A. M., Massieu, L., & Pedraza-Chaverri, J. (2009). Heme oxygenase-1 induction prevents neuronal damage triggered during mitochondrial inhibition: role of CO and bilirubin. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(6), 1304-1314. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/19063990> Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.11.003>. doi:10.1016/j.biocel.2008.11.003
- Orozco-Ibarra, M., Garcia-Morales, J., Calvo-Silva, F. J., Fernandez-Valverde, F., & Serrano-Garcia, N. (2016). Striatal mitochondria response to 3-nitropropionic acid and fish oil treatment. *Nutr Neurosci*, 21(2), 132-142. doi:10.1080/1028415x.2016.1237074
- Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Hemendinger, R., Greenamyre, J. T., & Rosenfeld, J. (2007). Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(2), C708-718. doi:10.1152/ajpcell.00202.2006
- Panov, A., & Orynbayeva, Z. (2017). Determination of mitochondrial metabolic phenotype through investigation of the intrinsic inhibition of succinate dehydrogenase. *Anal Biochem*. doi:10.1016/j.ab.2017.10.010
- Panov, A., Schonfeld, P., Dikalov, S., Hemendinger, R., Bonkovsky, H. L., & Brooks, B. R. (2009). The neuromediator glutamate, through specific substrate interactions, enhances mitochondrial ATP production and reactive oxygen species generation in nonsynaptic brain mitochondria. *J Biol Chem*, 284(21), 14448-14456. doi:10.1074/jbc.M900985200
- Panov, A. V., Kubalik, N., Zinchenko, N., Ridings, D. M., Radoff, D. A., Hemendinger, R., . . . Bonkovsky, H. L. (2011). Metabolic and functional differences between brain and spinal cord mitochondria underlie different predisposition to pathology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300(4), R844-854. doi:10.1152/ajpregu.00528.2010
- Panov, A. V., Vavilin, V. A., Lyakhovich, V. V., Brooks, B. R., & Bonkovsky, H. L. (2010). Effect of bovine serum albumin on mitochondrial respiration in the brain and liver of mice and rats. *Bull Exp Biol Med*, 149(2), 187-190.
- Pontén, F., Gry, M., Fagerberg, L., Lundberg, E., Asplund, A., Berglund, L., . . . Uhlén, M. (2009). A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Molecular systems biology*, 5, 337-337. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029370> Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2824494/>. doi:10.1038/msb.2009.93
- Priegnitz, A., Brzhevskaya, O. N., & Wojtczak, L. (1973). Tight binding of oxaloacetate to succinate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 51(4), 1034-1041. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X73900314>. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(73\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(73)90031-4)
- Scuderi, C., Stecca, C., Iacomino, A., & Steardo, L. (2013). Role of astrocytes in major neurological disorders: the evidence and implications. *IUBMB Life*, 65(12), 957-961. doi:10.1002/iub.1223
- Sharma, L. K., Lu, J., & Bai, Y. (2009). Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Current medicinal chemistry*, 16(10), 1266-1277. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4706149/>.
- Stepanova, A., Shurubor, Y., Valsecchi, F., Manfredi, G., & Galkin, A. (2016). Differential susceptibility of mitochondrial complex II to inhibition by oxaloacetate in brain and heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1857(9), 1561-1568. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990131/>. doi:10.1016/j.bbabi.2016.06.002

- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., . . . Rao, Z. (2005). Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II. *Cell*, 121(7), 1043-1057. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>. doi:10.1016/j.cell.2005.05.025
- Szabadkai, G., Simoni, A. M., & Rizzuto, R. (2003). Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *The Journal Of Biological Chemistry*, 278(17), 15153-15161. Retrieved from <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cmedm&AN=12586823>(=es&site=eds-live).
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410(2), 103-123.
- Tarasenko, T. N., Pacheco, S. E., Koenig, M. K., Gomez-Rodriguez, J., Kapnick, S. M., Diaz, F., . . . McGuire, P. J. (2017). Cytochrome c Oxidase Activity Is a Metabolic Checkpoint that Regulates Cell Fate Decisions During T Cell Activation and Differentiation. *Cell Metab*, 25(6), 1254-1268.e1257. doi:10.1016/j.cmet.2017.05.007
- Tsacopoulos, M., & Magistretti, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of Neuroscience*, 16(3), 877. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/16/3/877.abstract>.
- Tyler, D. B. (1960). Effect of citric acid-cycle intermediates on oxaloacetate utilization and succinate oxidation. *Biochemical Journal*, 76(2), 293. Retrieved from <http://www.biochemj.org/content/76/2/293.abstract>.
- Villa-Cuesta, E., Holmbeck, M. A., & Rand, D. M. (2014). Rapamycin increases mitochondrial efficiency by mtDNA-dependent reprogramming of mitochondrial metabolism in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 127(10), 2282. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/127/10/2282.abstract>.
- Wang, Z., Ying, Z., Bosy-Westphal, A., Zhang, J., Schautz, B., Later, W., . . . Müller, M. J. (2010). Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *The American journal of clinical nutrition*, 92(6), 1369-1377. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20962155> Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2980962/>. doi:10.3945/ajcn.2010.29885
- Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(39), 16823-16827. doi:10.1073/pnas.1011099107
- Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., & Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1857(7), 902-914. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272816300329>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.013>
- Wolf, P., Hosli, E., Roches, J. C., Zumstein, H. R., Heitz, P., & Hosli, L. (1975). Histochemical investigations on the presence of acetylcholinesterase and succinic dehydrogenase in fetal human spinal cord and brain stem at different stages of development. *Eur Neurol*, 13(1), 31-46. doi:10.1159/000114660
- Yu, C.-A., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., Zhang, L., Kachurin, A. M., & Yu, L. (1998). Structural basis of functions of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1365(1), 151-158. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272898000553>. doi:[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00055-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00055-3)
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., Keeffe, S., . . . Wu, J. Q. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/34/36/11929.abstract>.
- Zhao, T., Mu, X., & You, Q. (2017). Succinate: An initiator in tumorigenesis and progression. *Oncotarget*, 8(32), 53819-53828. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5581152/>. doi:10.18632/oncotarget.17734