



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la rotenona sobre la
expresión de la glutamina
sintetasa en cultivos primarios
de astrocitos de rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA TOVAR GONZÁLEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DOCTORA MARISOL OROZCO IBARRA**

Ciudad Universitaria, CDMX, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Tovar
González
María Fernanda
5545487889
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
311236554
2. Datos del tutor
Dra.
Marisol
Orozco
Ibarra
3. Datos del sinodal 1
Dr.
José
Pedraza
Chaverri
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Félix
Morales
Flores
5. Datos del sinodal 3
Dr.
César
Valdovinos
Flores
6. Datos del sinodal 4
Biól.
Claudia
Peña
Segura
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la rotenona sobre la expresión
de la glutamina sintetasa en cultivos
primarios de astrocitos de rata
37 p
2020

Instituto Nacional de Neurología “Manuel Velasco Suárez”

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), bajo la tutoría de la Dra. Marisol Orozco Ibarra. 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**, el cual fue evaluado y aprobado tanto por el Comité Científico como por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los animales de laboratorio (CICUAL) del INNN.

Agradecimientos

Quisiera agradecer principalmente a mi familia, porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible. Gracias a ranita, por estar en mis noches de desvelo en la carrera, por prepararme comida y café. Por ser la mejor hermana del mundo, por siempre escucharme, contarme tus cosas y dejar que yo te contara las mías, por siempre creer en mí y ser mi cómplice de travesuras.

Gracias a mi mamá, por apoyarme en todas mis locuras, por siempre creer que era la mejor e impulsarme. Eres la persona que me escucha con más fascinación cuando te hablo de cosas científicas y siempre me preguntas al respecto con mucho interés. Gracias a mi abuelita Goyita, por acompañarme a todas partes siempre, por preocuparte por mí y procurarme, por despertarme en las mañanas para que no se me hiciera tarde, porque nunca dejaste que me fuera sin desayunar y me mandabas comida para que no me faltara en el día.

Gracias a mi Golita, que, aunque ya no pudiste acompañarme físicamente en mi examen profesional, sé que me estás viendo desde el cielo, espero hacerte sentir orgullosa, porque mis logros son por ti y para ti. Gracias por enseñarme a hablar, a caminar, por cuidarnos a mi hermana y a mí, por ser la más cariñosa, inteligente y divertida del mundo. Te extraño profundamente, pero tus enseñanzas me han impulsado hasta donde estoy. Seguirás por siempre viva en mi corazón, un abrazo enorme hasta el cielo.

Gracias a mi abuelito, por siempre expresar que estás orgulloso de mí, por felicitarme en mis logros, por ayudarme a conseguir mis libros en el centro, por llevarme en las mañanas al metro, por dejarme acompañarte a ver el fútbol en tu cuarto cuando estaba cansada o simplemente porque quería disfrutar de tu compañía. Gracias a mi tío Raulito, por preguntarme cómo me iba, por hacerme creer que yo podía, siempre me impulsaste y creíste en mí para ser una mujer de bien. Creo que ya te lo he dicho, pero te lo reitero: te admiro muchísimo. Gracias a mi tío Chuchu por ser el más consentidor, por apoyarme y querernos tanto. Los amo con todo mi corazón, familia.

También gracias a Juan José Salazar Cortés, por aparecer en mi vida y cambiarla de la manera más bonita posible. Gracias por las pláticas en la madrugada, por impulsarme a ser mejor, por ser un ejemplo para mí. No pude encontrar un mejor compañero de vida. Contigo puedo hablar de ciencia, de cosas cotidianas, de cómo nos fue en el día, etc. Y aunque a veces no nos veamos mucho o nos veamos sólo unos instantes, eso alegra automáticamente mi día. Gracias por nunca dejarme caer, por estar en los momentos más difíciles, por compartir mi alegría en los momentos felices, por estar en esta etapa tan importante de mi vida. Gracias por ser el más flojo conmigo. Gracias por ser tú. Te amo.

Gracias también a la familia de Juan, por siempre hacerme sentir parte de ustedes, por quererme tanto, por alegrarse por mis logros y acompañarme y apoyarme en situaciones difíciles. Los quiero con todo mi corazón. Gracias a mis amigos de toda la vida, a Luis Daniel, a Jorge, a Rosa, Fany, etc. Los quiero mucho.

Gracias también a mis amigos de la prepa: Maya, porque al principio estuvimos unidas por coincidencias, pero después por decisión. Gracias por estos casi 10 años de amistad, por quererme tanto y alegrarte siempre por mí, estoy segura de que serás la mejor odontóloga del mundo, te amito. Gracias a Charly, por ser el más loquito y alegrar mis días con tus tonterías, por el bullying porque sé que lo hacías para forjar mi carácter jaja te amo, amigo. Gracias a Vickie, por ser amigo incondicional, a pesar de no vernos, cuando nos vemos es como si el tiempo no tuviera efecto sobre nuestra amistad, te amito, minoi. Gracias también a mis amigas Lucy (que sé que también me cuidas y me escuchas desde el cielo), Pao, Lore, Vianey, Beca, Karen, que nuestra amistad siga trascendiendo, las quiero muchísimo.

Gracias a mis amigos de la carrera, principalmente a círculo de la amistad: Maruri, Gaby, Cin, Fridish, Bris, Alfi, Yayo, JJ, Cabral y Dani. Gracias a Ale Maruri, por ser la mejor amiga del mundo, por convertirte en una hermana para mí, te puedo contar literalmente todo sin temor a ser juzgada. Siempre tienes las palabras correctas y siempre sabes qué aconsejarme. Gracias por nunca dejarme sola, por acompañarme en todo momento, por llorar mis tristezas y vivir mis alegrías como si fueran tuyas. Gracias por esas noches de desvelos, por el apoyo durante la carrera, definitivamente no hubiera sido lo mismo sin ti. Espero que nuestra amistad perdure por siempre a pesar de todo, te amo mucho, amiga.

Gracias a Gaby, por ser el mejor equipo que pude tener en las materias, porque siempre que estudiamos juntas rifamos un buen. Gracias por dejarme ser tu amiga, por acompañarme en los peores y en los mejores momentos, por confiar y creer en mí. Gracias a Cin, por tus locuras, por las veces que me has escuchado, por ser una de las personas más nobles y divertidas que conozco, nunca te rindas, amiga.

Gracias a Fridish, por ser un cupido para Juan y para mí jajaja, gracias por ser mi amiga, por confiarme tus cosas, sabes que siempre querré lo mejor para ti. Gracias a Bris, por ser el ejemplo claro de que cuando se quiere, se puede. Por ser una gran amiga, te admiro mucho, eres súper emprendedora. Gracias a Alfi, por dejarme compartir momentos desde el primer semestre de la carrera. Gracias por aconsejarme que no debo dejar que mi felicidad dependa de mi situación académica jaja (eso me lo dijiste en primer semestre cuando entraba en depresión por las materias), gracias por ser un ejemplo de fortaleza, liderazgo e inteligencia, te admiro bastante.

Gracias a ti también, Yayo, por estar desde el primer semestre y seguir hasta ahora como un gran amigo. Eres un amigo muy lindo, me has acompañado y apoyado, también me alegras muchísimo con tus ocurrencias. Gracias a JJ, porque me has demostrado la gran persona que eres, por fuera puedes parecer rudo, pero eres una persona muy tierna e incondicional. Nunca olvidaré esos días de fiesta, pero sobre todo, no olvidaré esa vez que me acompañaste cuando tuve un incidente en la cafetería, me diste mucho valor. Gracias por confiarme tus cosas y ser el más divertido.

Gracias a Cabral, por aconsejarme y contarme cosas que me ayudaron a tomar mejores decisiones. Gracias por impulsarme y creer en mí. Gracias a Dani, por ser elocuente conmigo, por confiarme tus problemas y dejarme ayudarte. Eres una gran persona, a veces no te das cuenta de lo valioso que eres, pero aquí estamos tus amigos para recordártelo. Círculo de la amistad, espero que siempre siga esta gran familia que hemos forjado, gracias por ser un lugar donde puedo ser yo misma y sentirme en confianza, los amo con todo mi corazón.

Gracias a mis demás amigos de la carrera, que estuvieron para alentarme, apoyarme ¿y por qué no? Para divertirse conmigo. Gracias a María Proo, Ana Karen Mendoza, Mariana Tejeda, Manuela, Zyanya, Costy, Erika Chamorro, Dani Ortiz, Miguel Benítez, Edson Moncada, Ita, Coral, Lizzie, Erika Fernández, Aurora, Levh, Alejandra, Yair Rodríguez, Jorge Valencia, Diego Nb, Dani Reyes, Christian, Mariel, Bruno López, David Ramírez, Ale Luna, etc. Gracias a todos por formar parte de mi vida académica y personal, ¡sé que serán los mejores biólogos!

A mis profesores de la carrera, por transmitirme sus conocimientos y dejar una huella imborrable en mi camino hacia la ciencia. A las Dras. Susana Esparza, Edith Ponce, a la Bióloga Margarita Reyes, a la M. en C. Mónica Elías, a la Dra. Sandra Cabrera, al M. en C. Enrique Hernández, a la Dra. Carolina Barriga, a los Doctores Saúl Gómez Manzo, Jaime Marcial, Félix Morales, César Valdovinos, Gerardo Rivas, Rogelio Aguilar, a los M. en C. Aquiles Bernal y Juan Carlos Campuzano, al Dr. Víctor Valdés, a la Dra. Viviana Escobar, al Dr. Pedro García, al Biólogo Luis Chávez, a los Doctores Héctor Mayani, Carlos Ochoa, a la Dra. Lorena Caballero, al Dr. Luis Felipe Jiménez, a las Doctoras. Ma. de Lourdes Segura, Mónica Torres y al Biólogo Alfonso Velázquez.

Gracias a mis amigos del taller: Joss, Pablo C, Pablo T jaja, Iván, Karen, Marycruz, y Aleida. Sin duda el taller fue un espacio divertido y memorable gracias a su compañía. Por supuesto también quiero agradecer a mis amigos del laboratorio: Omar, gracias por ser el mejor compañero de experimentos, por llegar a ser mi amigo, gracias por las risas, eres de las personas más risueñas que conozco. Gracias por estar ahí para mí cuando te necesitaba, por confiar en mí, te quiero mucho, amigo. A Quique, por ser un gran compañero, porque te has convertido en mi amigo, formas parte de esta tormentosa, pero

enriquecedora experiencia llamada tesis. Gracias por chismear conmigo, ayudarme e impulsarme, te quiero mucho.

Gracias Ana, ser mi acompañante al ir por cassava's, por tu compañía, tus ocurrencias y tu amistad. Gracias a Toño, por convertirte en un ejemplo a seguir, eres una persona que admiro muchísimo, eres muy inteligente y estoy segura de que llegarás muy lejos, te quiero mucho. Natalie, gracias por compartir tu conocimiento, por resolver siempre nuestras dudas y ayudarnos en todo. Gracias a Nancy, por escucharme y apoyarme en momentos en que realmente requería tu ayuda jaja por cierto, ¡eres la mejor fotógrafa que conozco! Gracias también a Gaby, Mine, Aldo, Fabi, Maggie, Vladimir, Jesús, Rubio entre otros integrantes del laboratorio y del Instituto que estuvieron conmigo en este camino.

Por supuesto también quisiera agradecer a la Dra. Norma Serrano, por ser una madre postiza para los chicos que llegamos al laboratorio, por compartir tus enseñanzas, no sólo de ciencia, sino de la vida en general. Gracias por hacer las tardes de trabajo más amenas, por tus aportaciones y consejos. Sin dudarlo, fuiste parte elemental en el desarrollo de esta tesis, te quiero mucho.

Gracias a mi tutora, la Dra. Marisol Orozco, por dirigir mi tesis, por darme siempre las mejores retroalimentaciones. Más allá del ámbito académico la considero una persona muy importante en mi vida, a la cual le puedo confiar mis asuntos. Gracias por sus pláticas y sus consejos, siempre es muy enriquecedor escuchar lo que tiene para contarme. Gracias por ayudarme a desarrollar mis virtudes e impulsarme a crecer personal y académicamente. Hizo que el LNMyC se convirtiera en un segundo hogar para mí, la quiero muchísimo.

Gracias a mis sinodales, por su apoyo, las correcciones y las ideas que me dieron para poder concluir mi tesis.

Al Dr. José Pedraza Chaverri, por permitirnos tomar algunas de las fotos de esta tesis en su laboratorio.

Gracias a todas y cada una de las personas que han estado conmigo durante esta etapa, es un logro compartido. Me falta mencionar muchas personas que también transitaron conmigo este camino, pero a todos absolutas gracias.

A hombros de gigantes...

“Dulce es el fruto de la adversidad, que como el sapo feo y venenoso, lleva en la cabeza una preciosa joya.”

(William Shakespeare)

Tabla de abreviaturas

SNC	Sistema nervioso central
Glu	Glutamato
GS	Glutamina sintetasa
Gln	Glutamina
CTE	Cadena transportadora de electrones
ATP	Adenosín trifosfato
CI	Complejo I
VDAC1	Canal selectivo de aniones 1 dependiente de voltaje
GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
EEM	Error estándar de la media
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido

Contenido

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Sistema nervioso.....	2
1.2 Células gliales.....	2
1.3 Astrocitos.....	3
1.4 Los astrocitos y sus vías metabólicas.....	5
1.5 Glucólisis.....	6
1.6 Mitocondria.....	6
1.7 Ciclo de Krebs.....	7
1.8 Cadena transportadora de electrones.....	8
1.9 Complejo I o NADH deshidrogenasa.....	9
1.10 Rotenona.....	10
1.11 Ciclo glutamina-glutamato.....	11
1.11.1 Glutamina sintetasa.....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos particulares.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Materiales.....	17
6.2 Animales.....	17
6.3 Cultivo primario de Astrocitos.....	18
6.4 Subcultivo de astrocitos.....	18
6.5 Tratamiento de células con rotenona.....	18
6.6 Método de viabilidad de Calceína AM.....	19
6.7 Obtención de lisados celulares.....	20
6.8 Western blot.....	20
6.9 Medición de actividad del CI mitocondrial.....	20
6.10 Inmunofluorescencia.....	20
6.11 Análisis estadístico.....	21
7. RESULTADOS.....	22
7.1 Toxicidad de rotenona en cultivos de Astrocitos.....	22
7.1.1 Imágenes de campo claro.....	22

7.1.2 Fluorescencia de Calceína.....	23
7.2 El tratamiento con rotenona disminuye la actividad del CI sólo en tiempos cortos	24
7.3 La rotenona disminuye la expresión de diversas proteínas.....	24
7.3.1 Inmunofluorescencia.....	25
7.3.2 Western blot.....	28
8. DISCUSIÓN.....	30
9. CONCLUSIONES.....	33
10. PERSPECTIVAS.....	33
11. REFERENCIAS.....	34

RESUMEN

Introducción: En el sistema nervioso central (SNC) se encuentran diferentes tipos celulares, tales como las neuronas y las células de la glía. Todas estas células participan, directa o indirectamente, en el proceso de sinapsis. Este proyecto se centra en el estudio de los astrocitos. **Los astrocitos** son células de la glía que tienen funciones importantes en la sinapsis, como captar neurotransmisores para reciclarlos. Uno de estos neurotransmisores es el glutamato (Glu). Los astrocitos captan el Glu y, gracias a la enzima glutamina sintetasa (GS), lo convierten en glutamina (Gln) para liberarla al espacio extracelular y así sea captada por las neuronas. Este proceso se conoce **como el ciclo glutamina-glutamato**, y está íntimamente ligado a vías metabólicas como la cadena transportadora de electrones (CTE). La **CTE** se trata de la principal vía por la que se genera energía en forma de adenosin trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés), y tiene lugar en la mitocondria. La rotenona es un inhibidor del complejo I (CI) de la CTE, así que se utiliza ampliamente para estudiar el daño mitocondrial.

Objetivo: Determinar los cambios que se presenten en la expresión de la GS en cultivos de astrocitos de rata tratados con rotenona.

Metodología: Se obtuvieron cultivos primarios de astrocitos a partir de cerebelo de ratas Wistar de 7-9 días. Los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de rotenona. Posteriormente se realizaron ensayos de viabilidad (Calceína AM), se midió la expresión de las enzimas GS por el método de western blot e inmunofluorescencia. De igual manera se midió la actividad del CI a los 30 minutos, 1 hora y 24 horas, para verificar la inhibición con rotenona. Con el fin de verificar la pureza y daño de los cultivos, se realizó la detección fluorescente de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés) para localización de los astrocitos.

Resultados: El tratamiento con rotenona disminuyó la viabilidad celular y la expresión de las proteínas GS y tubulina. La actividad del CI sólo disminuye en el tratamiento de 30 minutos y después de pierde el efecto (1 y 24 h).

Conclusión: La rotenona disminuyó significativamente la expresión de GS y al verse afectada podría perturbar la homeostasis de Glu y Glu.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso es uno de los sistemas más complejos e interesantes que existen en el reino animal, tiene características muy específicas que lo hacen único. En ciertos animales el sistema nervioso es muy simple, pues consta de células y fibras en un tejido. Pero en la mayoría de los animales el sistema nervioso es más complejo y organizado¹. En el caso de los humanos, el sistema nervioso es el sistema de mayor control. Es responsable de la sincronización de las partes del cuerpo, la integración de la actividad fisiológica, la interpretación de estímulos y la actividad intelectual, incluyendo la memoria y el razonamiento abstracto². Anatómicamente se divide en sistema nervioso central (SNC), el cual consta del cerebro y de la médula espinal; y sistema nervioso periférico, que consiste en nervios craneales y nervios espinales. Funcionalmente, se divide en Sistema Nervioso Somático y Sistema Nervioso Autónomo³. Debido a que el presente estudio se centró en células del SNC, se hará énfasis en esta información. En el SNC se encuentran diferentes tipos celulares, tales como las neuronas y las células de la glía (astrocitos, microglía, oligodendrocitos). Todas estas células participan directa o indirectamente en el proceso de sinapsis, es decir, la comunicación entre dos neuronas¹.

1.2 Células gliales

Las células de la glía son células no neuronales del SNC, que son esenciales para el buen funcionamiento del sistema nervioso. Las neuronas y la glía, están en constante comunicación, tanto en condiciones normales, como en condiciones patológicas⁴. Se consideran células gliales a: astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células positivas a NG2⁵. En primera instancia, se creía que las células gliales sólo eran células de soporte, sin embargo, se ha demostrado que tienen importantes funciones en el SNC: participan en el desarrollo y migración de las neuronas, algunas células gliales secretan factores tróficos y de crecimiento, que son importantes para la plasticidad neuronal; los oligodendrocitos producen vainas de mielina que recubren a los axones de las neuronas; la microglía se encarga de

remover partículas después de una lesión y tiene funciones asociadas a la respuesta inmune, mientras que los astrocitos se encargan de mantener la homeostasis y el microambiente³. Este proyecto se centra en el estudio de los astrocitos, por lo que a continuación se presentará información acerca de ellos.

1.3 Astrocitos

Los astrocitos son células de la glía del SNC que morfológicamente, tienen una forma estrellada y se comunican con las sinapsis y con vasos sanguíneos^{6,7}. Forman una red de células dentro del SNC y se comunican con las neuronas para sustentar y modular muchas de sus actividades⁸. Entre las funciones de los astrocitos destacan: la liberación de sustancias como adenosín trifosfato (ATP) y precursores de glutamato (Glu), participan en el desarrollo del sistema nervioso, participan en la sinaptogénesis, no sólo durante el desarrollo, sino también después de alguna lesión del SNC, aumentan la actividad sináptica hasta 100 veces, comparando a un ambiente falto de astrocitos, regulan el flujo de sangre, juegan un papel importante en la barrera hematoencefálica, entre otras funciones⁹. En general, existen dos tipos de astrocitos: fibrosos y protoplásmicos^{3,7}, se esquematizan en la Figura 1 y sus características se resumen en la Tabla I:

	Astrocitos protoplásmicos	Astrocitos fibrosos
Localización	Sustancia gris del SNC	Sustancia blanca del SNC
Diámetro del cuerpo celular	15-25 µm	10-12 µm
Características generales	Prolongaciones relativamente cortas y muy ramificadas, que están en contacto con los somas y las prolongaciones neuronales. Numerosas mitocondrias en el citoplasma. Los microtúbulos y filamentos intermedios están distribuidos de forma laxa. Fibrillas compuestas por GFAP.	Prolongaciones finas y largas, que pueden estar en contacto con vasos sanguíneos y con la superficie del SNC. Fibrillas compuestas por GFAP.

Tabla I. Realizada a partir de información de Welsch et al., (2014)⁷. Comparación de astrocitos fibrosos y astrocitos protoplásmicos. Proteína ácida glial fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés); sistema nervioso central (SNC).

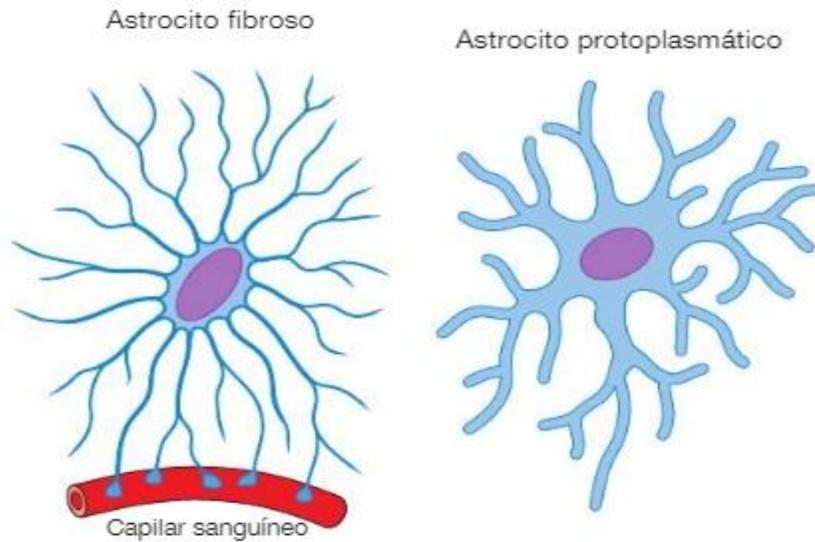


Figura 1. Tipos de astrocitos. Imagen tomada y modificada de Welsch et al. (2014).

Se puede decir que éstas son las categorías clásicas en las que se encasillan a los astrocitos, sin embargo, la morfología y funciones de los astrocitos difieren entre las diferentes regiones del cerebro.

En esta investigación, se estudiaron astrocitos de una región en particular: el cerebelo. De acuerdo con Palay y Chan-Palay (1974)¹⁰ hay tres tipos de astrocitos en el cerebelo:

1. Astrocitos protoplásmicos denominados “velate”: astrocitos con forma estrellada, se encuentran generalmente en la capa granular.
2. Astrocitos protoplásmicos lisos: menos comunes, se encuentran en la capa granular y en la capa celular. Se caracterizan por tener procesos largos y radiados, sin apéndices laminares.
3. Glía de Bergmann: astrocitos unipolares localizados alrededor de los somas de las células de Purkinje.

Si bien existen diferentes tipos de astrocitos, todos tienen algo en común: su metabolismo.

1.4 Los astrocitos y sus vías metabólicas

Como se mencionó anteriormente, el intercambio de metabolitos entre los astrocitos y las neuronas es importante para que el cerebro mantenga su homeostasis, pues los astrocitos aportan nutrientes, ATP y precursores de neurotransmisores. Tal es el caso del Glu, el cual es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC. El Glu parece desempeñar una función importante en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, el Glu también puede ser una potente excitotoxina neuronal en una amplia gama de condiciones, induciendo la muerte neuronal rápida o progresiva¹¹. La vía principal en la producción *de novo* del Glu es a partir de la glucosa y a partir de la transaminación de un intermediario del ciclo de

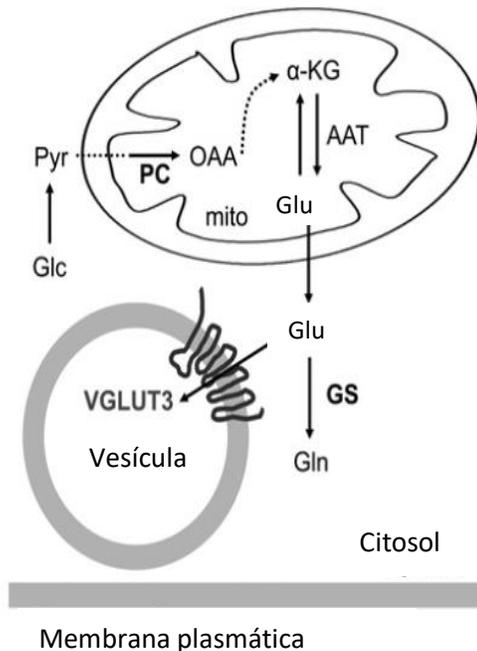


Figura 2. Vías metabólicas de los astrocitos. Imagen tomada y modificada de Rose (2013). Glucosa (Glc), piruvato (Pyr), piruvato carboxilasa (PC), oxaloacetato (OAA), mitocondria (mito) α -cetoglutarato (α -KG), alanina aminotransferasa (AAT), glutamato (Glu), glutamina (Gln), glutamina sintetasa (GS).

los ácidos tricarbóxicos, el α -cetoglutarato. El reciclaje del Glu se da gracias a la acción de la enzima glutamina sintetasa (GS). La síntesis *de novo* del Glu se da gracias a una enzima llamada alanina aminotransferasa, la cual se expresa en astrocitos, pero no en neuronas (Figura 2)¹²⁻¹⁴. Para entender cómo es que funciona el reciclaje de metabolitos, como el Glu, es necesario tener un contexto acerca de cómo es el metabolismo de las células en general, es por ello por lo que a continuación se presentará información de algunas vías metabólicas.

1.5 Glucólisis

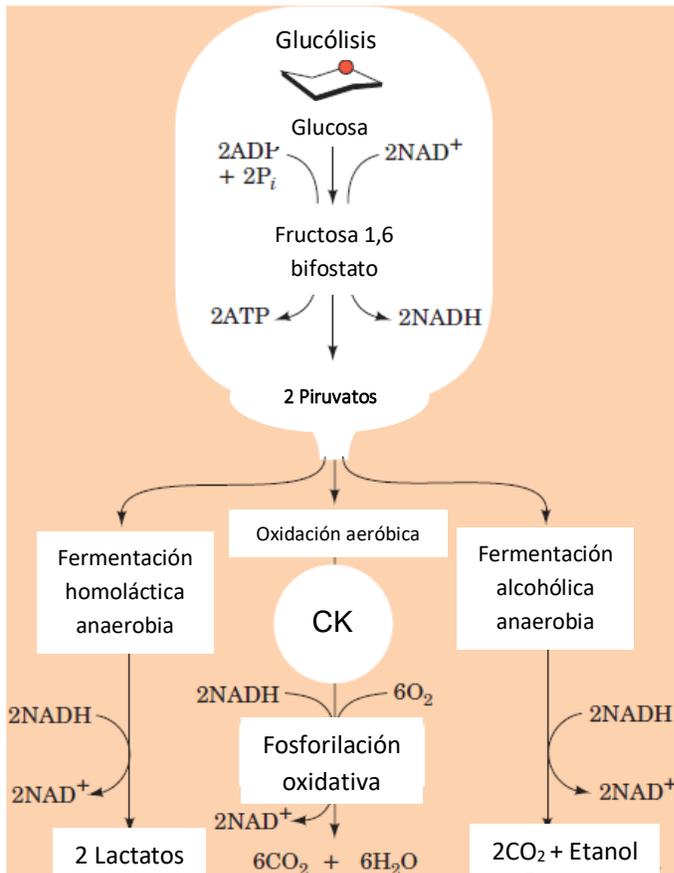


Figura 3. Esquema de la glucólisis y las vías anaerobias y aerobias. Tomada de Voet & Voet (2011). Ciclo de Krebs (CK).

En la glucólisis, se convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato. En este proceso se generan 2 moléculas de ATP. En condiciones anaeróbicas ocurre la fermentación alcohólica en levaduras, mientras que en el músculo se da la fermentación láctica. En condiciones aeróbicas, el piruvato es oxidado a H_2O y CO_2 por medio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa (Figura 3)¹⁵. La glucólisis precede el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, dos vías metabólicas que tienen lugar en la mitocondria.

1.6 Mitocondria

La producción de energía en las células eucariontes, mediante un metabolismo aeróbico, está a cargo de la mitocondria, en ella se llevan a cabo la mayor parte de las reacciones oxidativas en la célula, se obtiene ATP a partir de aminoácidos, glucosa y ácidos grasos. El metabolismo de ácidos grasos, glucosa y glucógeno comienzan en el citosol, y posteriormente continúan su oxidación en la mitocondria, por lo que el buen funcionamiento de este organelo es indispensable para que se lleven a cabo estas funciones. Las mitocondrias se encuentran en movimiento y están repartidas de modo uniforme. Su tamaño es variable, pero se estima que mide 0.5 micrómetros de diámetro y 10 micrómetros de largo cuya forma es elipsoidal.

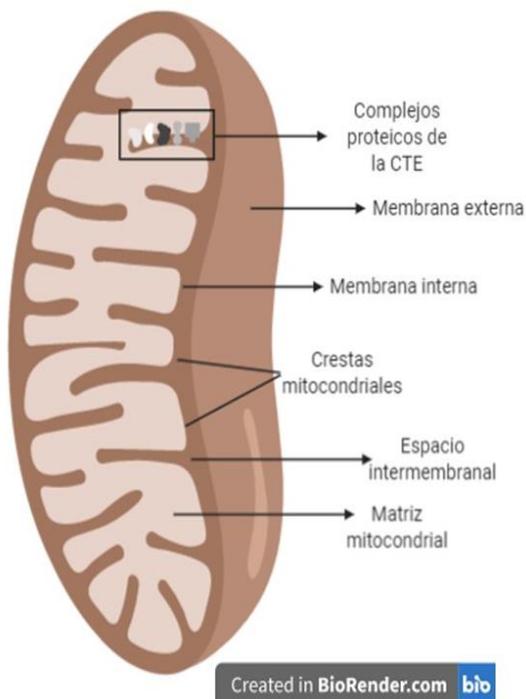


Figura 4. Mitocondria y sus funciones.
Imagen creada en Biorender.com.

la que ocurren reacciones del metabolismo oxidativo, ya que se encuentran iones inorgánicos, sustratos y cofactores (Figura 4).

El número de mitocondrias puede variar en cada tejido u órgano, dependiendo de su metabolismo. Las mitocondrias presentan una doble membrana, la externa y la interna, y ésta última presenta crestas mitocondriales en las que se llevan a cabo reacciones de la cadena transportadora de electrones (CTE) y de la fosforilación oxidativa. El espacio entre la membrana externa y la membrana interna se denomina espacio intermembranal. En el espacio intermembranal se genera un gradiente electroquímico, el cual permite la síntesis de ATP. Por otra parte, el espacio delimitado por la membrana interna se ha designado como matriz mitocondrial, en

1.7 Ciclo de Krebs

También recibe el nombre de ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Este ciclo consta de pasos catalizados por las enzimas: citrato sintasa, aconitasa, isocitrato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, succinil-CoA sintetasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa y malato deshidrogenasa. Las reacciones comienzan a partir de una molécula de piruvato, la cual es metabolizada a acetil-CoA por la enzima piruvato deshidrogenasa, de esta manera se incorpora al ciclo. En este ciclo una secuencia de oxidaciones y reducciones transfieren la energía potencial en la forma de electrones a coenzimas portadoras de electrones, sobre todo al NAD^+ . El ciclo de Krebs, en su conjunto se puede apreciar que por cada dos moléculas de

acetil-CoA que ingresan en él, se liberan cuatro moléculas de CO_2 mediante la descarboxilación, se producen seis moléculas de NADH y dos moléculas de FADH_2 mediante reacciones de oxidación y reducción y se generan dos moléculas de ATP mediante la fosforilación a nivel de sustrato. Muchos de los productos del Ciclo de Krebs son utilizados en otras vías metabólicas, por ejemplo, en la biosíntesis de aminoácidos¹⁶. Como se mencionó anteriormente, el α -cetoglutarato, intermediario del ciclo de Krebs, es convertido en Glu a partir de una reacción de transaminación. La glucólisis y el ciclo de Krebs son pasos predecesores a la fosforilación oxidativa, proceso mediante el cual, las células generan energía en forma de ATP. Este proceso se lleva a cabo en la mitocondria. Los astrocitos requieren una alta cantidad de ATP, por lo cual la fosforilación oxidativa es fundamental para las funciones de estas células del cerebro.

1.8 Cadena transportadora de electrones

La energía necesaria para generar ATP se obtiene de la oxidación de NADH y FADH_2 a través de la CTE, la cual consta de una serie de complejos proteicos por donde pasan los electrones de menor a mayor potencial de reducción¹⁵. Los complejos proteicos que conforman la CTE son: el complejo I (CI) o NADH deshidrogenasa, complejo II o Succinato Deshidrogenasa, complejo III o Coenzima Q-Citocromo Oxidorreductasa, complejo IV o Citocromo C-Oxidasa y la ATP sintasa, la cual algunos autores la consideran como complejo V.

Consiste en una secuencia de moléculas transportadoras capaces de provocar reacciones de oxidación y reducción. A medida que los electrones viajan a lo largo de la CTE se produce una liberación gradual de energía que se utiliza para la generación quimiosmótica de ATP (Figura 5)^{16,17}.

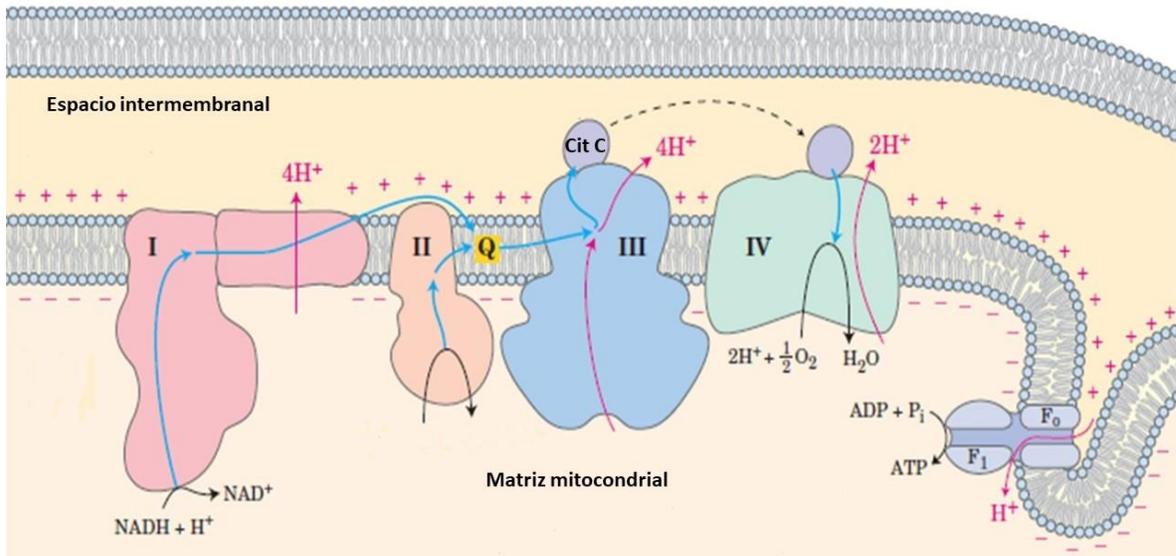


Figura 5. Esquema de la CTE. Imagen tomada y modificada de Nelson & Cox (2017).

Como la mitocondria es la fuente de ATP, y los astrocitos requieren de alta cantidad de ATP, esto da una explicación de por qué la hipoglicemia y los inhibidores de la CTE causan muerte en estas células¹⁸.

Además de la glucólisis y el ciclo de Krebs, existe una vía por la cual el Glu se puede reciclar: el ciclo glutamina-glutamato. En este estudio, se pretende observar la deficiencia de la mitocondria y su implicación en procesos metabólicos, como el ciclo glutamina-glutamato, al inhibir el CI de la CTE al añadir rotenona, por lo que se explicarán detalles del CI y de la rotenona.

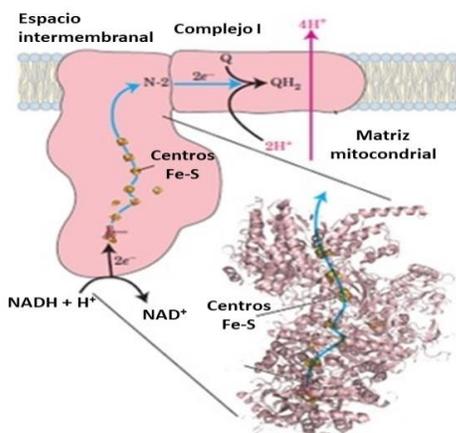


Figura 6. Complejo I o NADPH deshidrogenasa. Imagen tomada de Nelson & Cox (2017).

1.9 Complejo I o NADH deshidrogenasa

Se trata de un complejo proteico, de aproximadamente 980 kDa compuesto de 42 cadenas polipeptídicas diferentes en mamíferos¹⁷. Contiene como grupo prostético una molécula de flavin mononucleótido (FMN). Dentro de su estructura también se pueden encontrar conjuntos de hierro-azufre, éstos tienen actividad redox y participan en el

transporte de electrones (Figura 6). Su función, en general, es pasar electrones de NADH a la Coenzima Q¹⁵.

1.10 Rotenona

La rotenona (Figura 7) es una toxina extraída de plantas de los géneros *Lonchocarpus* y *Derris*, la cual es utilizada por ciertos grupos étnicos para envenenar peces, además de emplearse en la agricultura como plaguicida, el cual se ha descrito que ejerce efectos tóxicos a nivel celular, pues tiene la cualidad de inhibir el CI de la CTE. El mecanismo de acción de la rotenona consiste en bloquear la transferencia de electrones de los centros hierro-azufre del CI a la ubiquinona, generando un bloqueo en la fosforilación oxidativa, con una consecuente disminución en la producción de ATP^{15,19}. Además de afectar la función de la mitocondria, la rotenona también afecta a otros procesos celulares, tales como la estabilidad de los microtúbulos, la homeostasis del calcio, genera estrés oxidante, altera los mecanismos de respuesta al daño de DNA, la función proteosómica, altera la respuesta inflamatoria, induce apoptosis y afecta el ciclo celular²⁰.

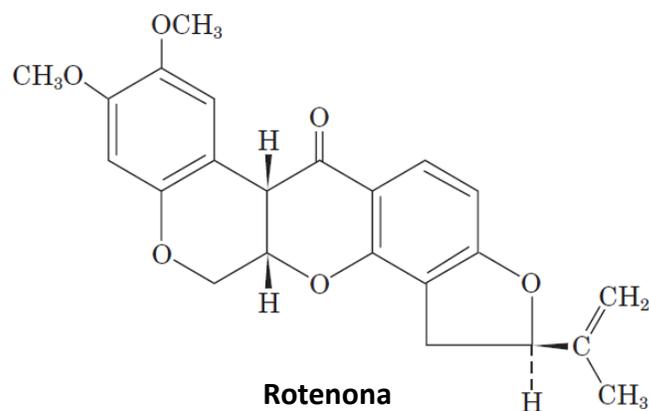


Figura 7. Estructura química de la rotenona. Imagen tomada de Voet & Voet (2011).

1.11 Ciclo glutamina-glutamato

A partir de una molécula de glucosa, se obtienen dos moléculas de piruvato, las cuales entran al ciclo de Krebs. El α -cetoglutarato es un intermediario del ciclo de Krebs, a partir del cual, se puede obtener Glu, el cual es metabolizado a glutamina (Gln) gracias a la acción enzimática de la GS, que se encuentra exclusivamente en astrocitos. La Gln sale del astrocito para ser captada por las neuronas, donde se puede volver a convertir en Glu gracias a la enzima glutaminasa, que se expresa mayormente en neuronas²¹. El Glu sale de las neuronas y así, se vuelve a internalizar en los astrocitos, es por ello que se denomina ciclo Gln-Glu (Figura 8). El Glu también es precursor de GABA (ácido gamma-aminobutírico)²², un neurotransmisor inhibitorio.

Los niveles intracelulares de Glu y Gln dependen de la actividad de numerosos

procesos enzimáticos

como: producción

citosólica de la Gln a partir del Glu gracias a la **GS**;

producción de Glu a partir de la Gln gracias a la enzima glutaminasa;

conversión mitocondrial del Glu a α -cetoglutarato en

reacciones de desaminación oxidativa y transaminación. La Gln y el

Glu se encuentran en cantidades micromolares en el sistema circulatorio

(~30–500 μ M), mientras que en otras regiones celulares como el citosol y

la matriz mitocondrial se

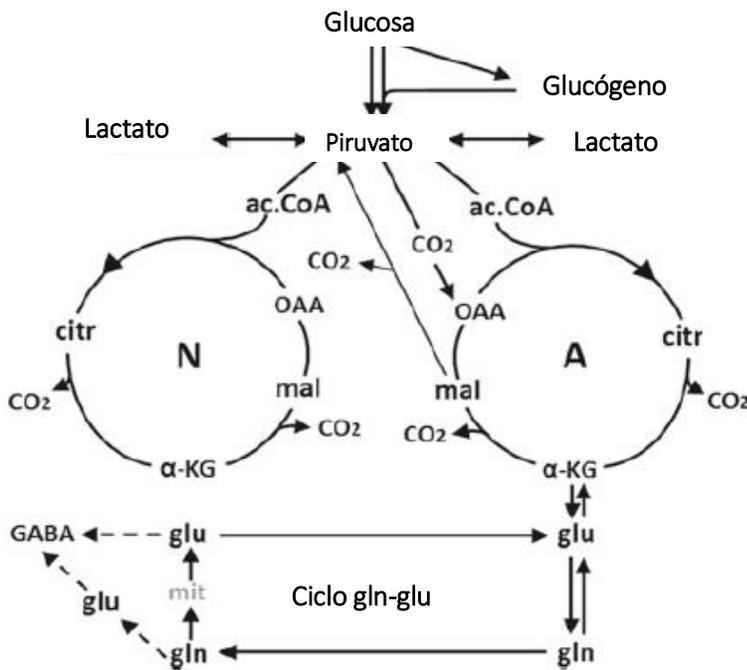


Figura 8. Vías metabólicas relacionadas con el ciclo glutamina-glutamato. Tomada de Schousboe & Sonnewald (2016). Acetil Coenzima A (ac. CoA), oxaloacetato (OAA), citrato (citr), malato (mal), α -cetoglutarato (α -KG), glutamato (glu), glutamina (gln).

encuentran en cantidades milimolares²¹. Existen en equilibrio porque son consumidos y producidos en numerosas reacciones bioquímicas interrelacionadas. El estudio del Glu es importante, pues se trata del principal neurotransmisor excitatorio en el SNC. Alrededor del 80-90% del Glu liberado en la sinapsis, se recicla por medio de la GS²³. Además, una remoción inadecuada de glutamato puede desencadenar procesos de muerte neuronal. Este proceso es conocido como excitotoxicidad y se ve implicado en diversas enfermedades neurológicas²⁴.

1.11.1 Glutamina sintetasa

Se trata de una enzima citosólica de astrocitos (aunque no exclusiva, se expresa mayormente en estas células), cuya reacción depende de ATP. Como ya se mencionó, su función es la de formar Gln a partir de Glu (Figura 9).

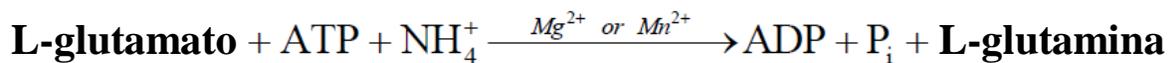


Figura 9. Reacción de la enzima GS. Imagen tomada de Kazmiruk (2017).

Durante la sinapsis, alrededor del 80% del Glu es reciclado gracias a la GS²¹. En los astrocitos es una enzima muy importante para el metabolismo del Glu, de GABA y del amoníaco²⁵. El amoníaco es un metabolito que se produce principalmente en el sistema gastrointestinal mediante la degradación de proteínas y la desaminación de aminoácidos¹⁴. Éste tiene la capacidad de cruzar las membranas plasmáticas a través de difusión, canales y transportadores²⁶, por ello podría trascender al cerebro. Este órgano es susceptible al aumento de amoníaco, de manera que la GS previene la toxicidad y disfunción neurológica¹⁴.

2. ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, los astrocitos regulan la homeostasis del Glu, que a la vez es precursor de GABA, de manera que la participación de los astrocitos es fundamental para mantener la neurotransmisión del cerebro. El Glu debe ser removido del espacio extracelular y a la vez debe haber un reabastecimiento de éste dentro de la terminal presináptica¹⁴. El ciclo glutamina-glutamato es el proceso mediante el cual los astrocitos logran remover el Glu del espacio extracelular y reabastecer a las neuronas con Gln, mediante la conversión de Glu a Gln a través de la enzima GS. Dicho esto, la GS se convierte en una parte importante para mantener el equilibrio de la neurotransmisión, es por ello por lo que la disfunción de la enzima puede estar involucrada en desórdenes neurológicos.

La GS se ha asociado en diversas enfermedades y desórdenes neurodegenerativos tales como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia, encefalopatía hepática, hipoxia, depresión, epilepsia y retinopatía diabética (Figura 10)¹⁴.

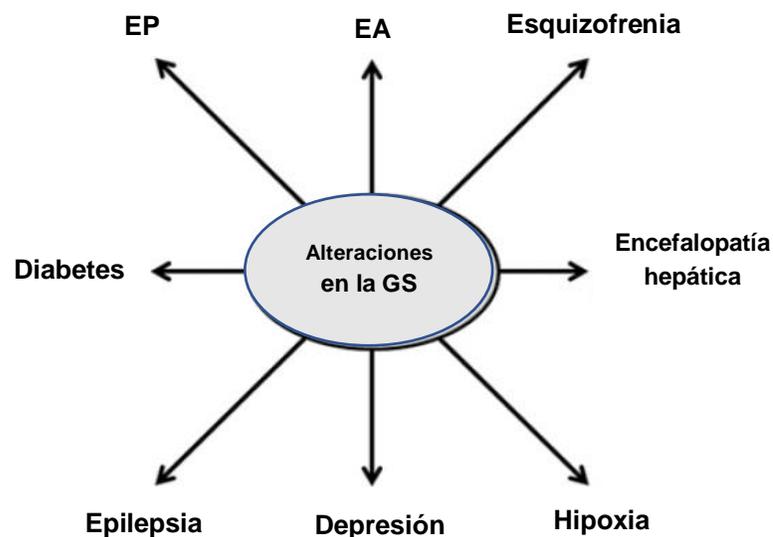


Figura 10. Trastornos asociados con la GS. Tomada de Rose (2013). Enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Alzheimer (EA).

En un modelo de Parkinson generado a través de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en ratas Sprague-Dawley²⁷, se midió el nivel de expresión de GS en el estriado mediante inmunohistoquímica y se observó que había una disminución de la

expresión de la proteína aunado a un aumento en los niveles de Glu. Se menciona que existe una excitación neuronal inducida por el aumento del Glu y que ello puede contribuir a los temblores presentados en su modelo de Parkinson, lo cual está estrechamente relacionado con la actividad de la GS.

La actividad de la GS en tejido post-mortem de pacientes diagnosticados con posible Alzheimer²⁸ era menor a comparación del tejido post-mortem de personas sin la enfermedad en aproximadamente un 27%. Los autores discuten que la disfunción de la GS puede potenciar la citotoxicidad de las placas amiloides mediante excitotoxicidad por Glu. Esto va de la mano con los resultados encontrados por Olabarria y colaboradores²⁹, donde encuentran que una disminución de la expresión de GS se asocia con la presencia de placas de β -amiloide en un modelo triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer en ratones.

Los niveles de expresión proteica de GS medida a través de western blot, se encontró baja en tejido post-mortem de pacientes diagnosticados con esquizofrenia³⁰. En la discusión los autores señalan que la actividad o expresión de la enzima tiene notables efectos en la transmisión glutamatérgica, así que un decremento en la enzima puede ocasionar una menor capacidad de reciclaje del Glu.

Gracias a que la GS está involucrada en la desintoxicación de amoníaco en el cerebro y este metabolito es regulado por el ciclo de la urea en el hígado, se ha ligado con una enfermedad conocida como encefalopatía hepática, la cual surge cuando el hígado no es capaz de eliminar las toxinas de la sangre¹⁴. Además, se ha demostrado que un incremento en los niveles de amoníaco en el cerebro provoca una mayor actividad en la GS³¹.

Los cerebros de lechones a los cuales se les indujo hipoxia, presentaron una disminución en la tinción de GS en regiones susceptibles a esta condición³². Los autores discuten que esto podría exacerbar la toxicidad del Glu y del amoníaco. No obstante, la respuesta de la enzima ante la hipoxia parece depender del órgano o tejido en el que se encuentre, pues en músculo e hígado de ratas Wistar sometidas a estrés hipóxico se encontró una mayor actividad de la GS³³.

En cerebros post-mortem de personas con depresión se observó que disminuyó el nivel de mRNA del gen GLUL (el cual codifica para la proteína GS)³⁴. Los autores proponen que, además del sistema serotoninérgico, otros sistemas de neurotransmisión como el glutamatérgico y el GABAérgico, pueden estar alterados en la depresión.

En el estudio de Eid y colaboradores³⁵ se encontró que en tejido de pacientes con epilepsia existía una disminución de la GS. Los autores mencionan que la acumulación del Glu extracelular podría desencadenar las convulsiones en la epilepsia del lóbulo temporal medial y que la deficiencia de la GS puede ser la base molecular de la acumulación del Glu.

En ratas Sprague Dawley con diabetes inducida por estreptozotocina se observó una disminución en la actividad y expresión de mRNA de la GS³⁶. La GS se expresa también en la glia de Muller en la retina, así que un desbalance en la actividad de la enzima puede llevar al daño en la retina.

De acuerdo con lo anterior, se ha observado que la GS está afectada en diversos desórdenes y enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, aún no se sabe qué es lo que ocasiona los cambios en la enzima. Un indicio podría recaer en la mitocondria, pues la actividad de la GS depende de ATP y este organelo es el principal productor de este nucleótido. De esta manera, si existiera algún daño en la mitocondria, la actividad de la GS es posible que se vea perjudicada.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que la expresión y actividad de la GS se encuentran disminuidas en enfermedades y desórdenes neurodegenerativos, pero no se ha descrito qué es lo que ocasiona esta disminución, por lo tanto, es importante conocer las vías que pueden alterar el funcionamiento de la GS y así ayudar al entendimiento de la fisiopatología de estas enfermedades y/o desórdenes. Además, el papel de los astrocitos ante un daño causado por rotenona no está del todo esclarecido, pues la mayoría de las investigaciones con este inhibidor se realizan con neuronas o células similares a neuronas (PC12, SH- SY5Y, RGC- 5) por tanto, resulta un buen campo de investigación, pues esto podría ayudar a entender los mecanismos moleculares de daño causado por rotenona en células astrocíticas.

4. HIPÓTESIS

Debido a que la rotenona es un inhibidor del CI de la CTE, utilizado para estudiar daño mitocondrial, si se les adiciona este compuesto a los cultivos de astrocitos, entonces habrá un cambio en la enzima GS, pues el ciclo glutamina-glutamato (en el cual participa la GS) está estrechamente relacionado con las vías metabólicas de la mitocondria.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar los cambios que se presenten en la expresión de la GS en cultivos de astrocitos de rata tratados con rotenona.

5.2 Objetivos particulares

- Estudiar la toxicidad de la rotenona en cultivos primarios de astrocitos de rata
- Medir la expresión de la enzima GS en cultivos primarios de astrocitos de rata tratados con diferentes concentraciones de rotenona.
- Medir la actividad del CI de la CTE, para evaluar el efecto de la rotenona.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

La poli-D-lisina, la gentamicina, la DNasa y la rotenona se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). El suero fetal bovino, el medio de cultivo DMEM, y el antibiótico-antimicótico, se adquirieron de Gibco (Waltham, MA, EUA). La calceína AM, se obtuvo de Life Technologies (Eugene, OR, EUA). La leche descremada (Skim Milk 232100) se obtuvo de Difco (NY, EUA). Los anticuerpos anti-glutamina sintetasa (ab80779), anti-PCNA (ab18197), anti-VDAC1 (ab15895), anti-tubulina (ab80779) y el secundario policlonal de cabra anti-ratón se obtuvieron de Abcam (Inglaterra, Reino Unido). El sistema de detección quimioluminiscente Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate se adquirió de Millipore (Burlington, Massachusetts, EUA). Las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés Polyvinylidene difluoride) se consiguieron de BioRad (CA, EUA) y el inhibidor de proteasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-Free, 87785) se obtuvo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). El dimetilsulfóxido se obtuvo de Productos Químicos del Sur S.A. de C.V. (CDMX, México)

6.2 Animales

Para todos los experimentos, se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 7 a 9 días de edad, las cuales fueron proporcionadas por el 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, así como a la NOM-062-ZOO-1999 para la disposición de residuos biológicos. Número de aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL): 19/17. Se siguió el método experimental mostrado en la Figura 11.



Figura 11. Diseño experimental del proyecto.

6.3 Cultivo primario de Astrocitos

El método utilizado fue de acuerdo con García Serafín & Orozco Ibarra (2016)³⁷. Brevemente, se decapitó rápidamente a la rata y se extrajo el cerebro, el cual se colocó en solución Tyrode con rojo fenol y se realizó la disección de cerebelo. Después el tejido se disgregó mecánicamente con agujas calibre 21 y 27G en medio Tyrode, se incubó durante 15 minutos a 37°C y se centrifugó a 550 g durante 5 minutos. Las células se suspendieron en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina 1% y se sembraron en frascos de poliestireno de 75 cm² previamente tratados con poli-D-lisina. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂/95% aire. El medio se cambió 24 horas después y posteriormente dos veces por semana.

6.4 Subcultivo de astrocitos

Método basado en (García Serafín & Orozco Ibarra, 2016). Entre 15 y 20 días después de preparar el cultivo primario se preparó un subcultivo. Con el fin de eliminar células de la glía, se agitaron los frascos a 180 rpm durante 24 horas. Posteriormente, los astrocitos se retiraron con una solución de tripsina al 0.5% agitando por 5 minutos a 37°C. El número de células se estimó por exclusión de azul tripano y se sembraron en placas de 24 pozos y en cajas de 60 mm², con una densidad de 1.6x10⁴ células/cm². Las imágenes de campo claro se obtuvieron con un microscopio invertido (CKX41, Olympus).

6.5 Tratamiento de células con rotenona

Para el tratamiento con rotenona se utilizó el subcultivo, en un período máximo de 3 días de haberlo preparado. Se utilizó una solución concentrada de rotenona disuelta en dimetilsulfóxido con una concentración de 100 mM, del cual se tomaron 5 µL y se disolvieron en 5 mL de medio de cultivo para formar una solución con una concentración de 100 µM de rotenona. Después se hicieron diluciones seriadas con el medio de cultivo para obtener concentraciones de 50, 10, 1 y 0.1 µM. Para poner el tratamiento, se retiró el medio de cultivo de las células y se les agregó el medio de cultivo con las diferentes concentraciones de rotenona. Las células se expusieron a rotenona por un período de 30 minutos, 1 hora o 24 horas. Sin embargo, la evaluación de viabilidad celular por calceína, los niveles de expresión de proteínas

por western blot y las fluorescencias sólo se realizaron después del tratamiento de 24 horas. La actividad del CI se midió después de 30 minutos, 1 hora o 24 horas después de la exposición con rotenona.

6.6 Método de viabilidad de Calceína AM

La Calceína AM es un compuesto hidrofóbico no fluorescente que es permeable para membranas de células vivas intactas. La hidrólisis de la Calceína AM por la acción de enzimas intracelulares denominadas esterasas, produce Calceína, un compuesto hidrofílico y fluorescente que se retiene en el citoplasma de las células (Figura 12)³⁸.

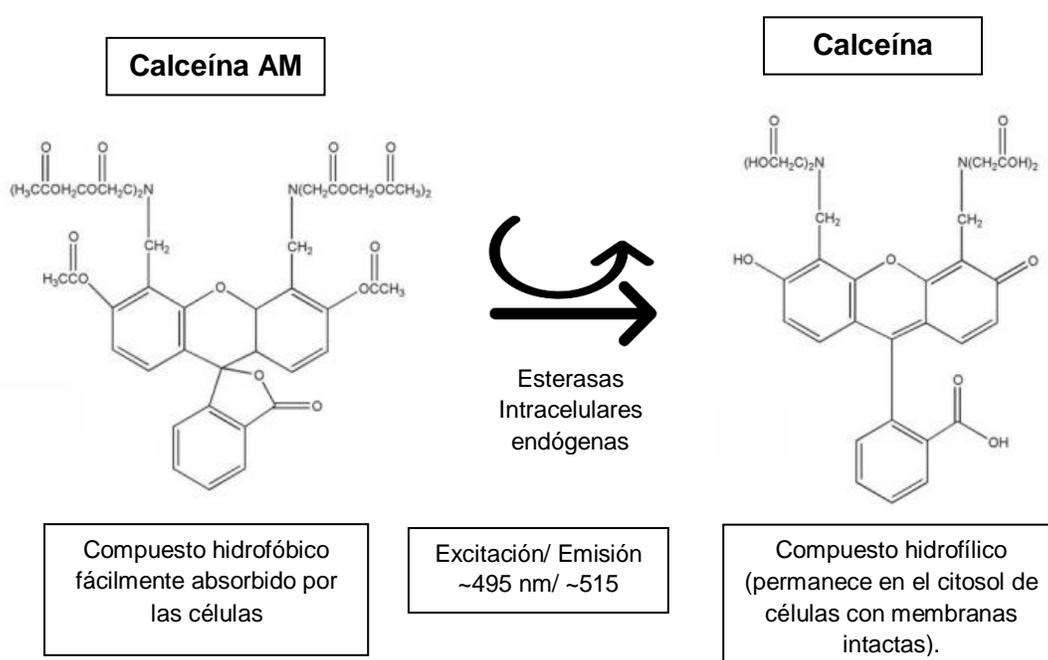


Figura 12. Esquematización de la acción de las enzimas esterasas. Tomado y modificado de Inc., R. D. S. Calcein AM (2007). Cell Viability Assay.

Después de las 24 horas del tratamiento, se quitó el medio con rotenona, se hicieron lavados con solución Tyrode y se adicionó una solución de calceína AM, se incubó a 37°C por media hora y la fluorescencia se leyó con ayuda de un lector de placas multimodal (Sinergy HT, Biotek, Winooski, VT, EUA).

6.7 Obtención de lisados celulares

Al terminar el tratamiento con rotenona, las células sembradas en cajas de 60 mm² se utilizaron para la obtención de lisados celulares, para ello se decantó el medio de las cajas Petri, se hicieron 3 lavados con solución salina, se agregaron 50 µL de solución amortiguadora RIPA con inhibidor de proteasas. Se incubó en hielo durante 5 minutos. Se retiró el amortiguador con ayuda de un raspador, para recuperar el lisado y se almacenaron las muestras a -80°C hasta su uso.

6.8 Western blot

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Lowry ³⁹. Las proteínas se separaron por un gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis, por sus siglas en inglés) al 10% para transferirse a una membrana de PVDF. Después de bloquearse por 2 h en leche descremada al 5%, la membrana se incubó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-glutamina sintetasa (GS, 1:5000) a 4°C durante una noche. Después de lavados con PBS-T, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-ratón (1:5000) por 1 h y se volvieron a realizar lavados con PBS-T. Se utilizó un sistema de detección quimioluminiscente y las bandas se visualizaron en el equipo Fusion FX (Vilber, Collégien, Francia). Se realizó un análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ (National Institute of Health, MD, EUA).

6.9 Medición de actividad del CI mitocondrial

Para la medición del CI, se utilizaron lisados celulares. Previo al procedimiento, se preparó una mezcla de reacción que consiste en albúmina sérica bovina, decilubiquinona, NADH, 2,6 diclorofenolindofenol, antimicina A, cianuro de potasio y amortiguador de fosfatos.

Se utilizó una placa de 96 pozos; en cada pozo se colocaron 5 µL de la muestra de lisado celular, después se añadió la mezcla de reacción y se leyó a 600 nm con ayuda de un lector de placas multimodal (Sinergy HT, Biotek).

6.10 Inmunofluorescencia

Las muestras en cubreobjetos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo Alexa Flúor 488 anti-ratón, dilución 1:200. Se realizaron lavados con

PBS y posteriormente se añadió Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para montar los cubreobjetos sobre portaobjetos con resina de montaje. Las imágenes de GFAP se tomaron con un microscopio de epifluorescencia (Eclipse E200, Nikon). Las imágenes de GS, VDAC1 y tubulina se obtuvieron con un Lector Multi-Modal con Captura de Imágenes Celulares (Cytation 5, Biotek).

6.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se ocupó un análisis de varianzas (ANOVA) seguido de una prueba *post-hoc* Dunnet y se consideraron diferencias significativas a los valores iguales o menores a $p < 0.05$. Todos los valores se muestran como promedio \pm error estándar de la media (EEM). Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 Toxicidad de rotenona en cultivos de Astrocitos

7.1.1 Imágenes de campo claro

Para observar el efecto de la rotenona sobre la morfología de las células se tomaron imágenes de campo claro, las cuales se muestran en la Figura 13. Se pueden observar imágenes representativas de campo claro de astrocitos tratados con diferentes concentraciones de rotenona. Los astrocitos sin tratamiento revelan una morfología estrellada y prolongaciones fuertes y largas, extendiéndose por todo el campo visual (Figura 13 a). En las concentraciones de 0.1 μM y 1 μM (Figura 13 b y 13 c respectivamente), los astrocitos parecen estar relativamente normales, sin embargo, a partir de 10 μM de rotenona (Figura 13 d), los astrocitos comienzan a encoger sus prolongaciones (Figura 13 d y 13 e) hasta perder su forma, como se puede observar en la Figura 13 f. Además, se observan menos células, pues a medida que mueren se despegan de la superficie y flotan en el medio (Figura 13 d, 13 e, 13 f).

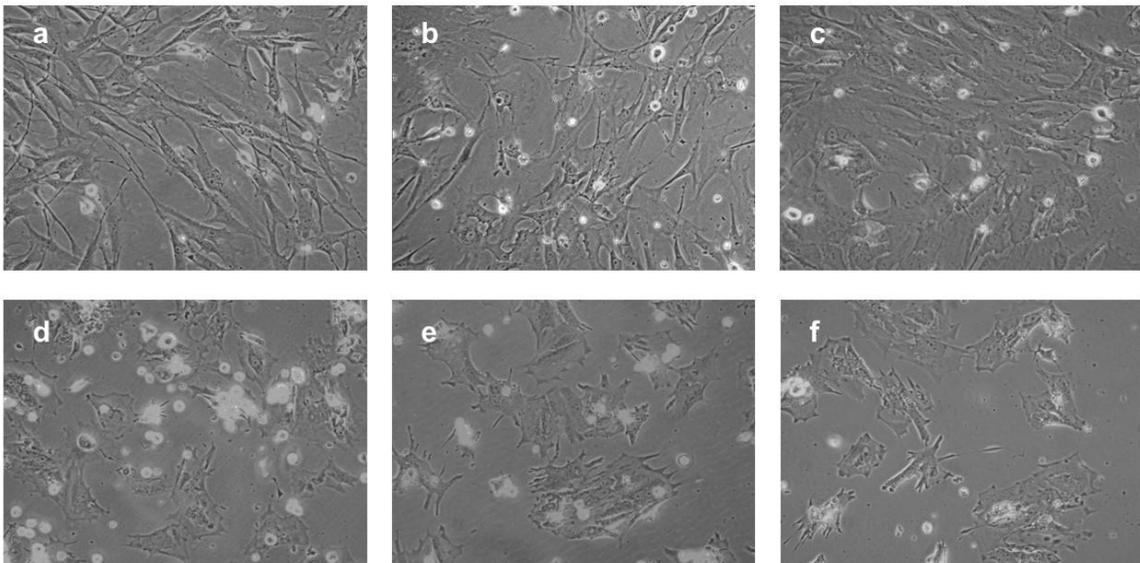


Figura 13. La rotenona afecta la morfología de los astrocitos. Imágenes de campo claro, aumento 10x. Astrocitos tratados con rotenona por 24 h.
a) 0 μM b) 0.1 μM c) 1 μM d) 10 μM e) 50 μM f) 100 μM .

7.1.2 Fluorescencia de Calceína

Para determinar la viabilidad de las células ante el tratamiento se utilizó un método bioquímico (ensayo de calceína AM), cuyos resultados se muestran en la Figura 14. En las concentraciones 0.1 y 1 μM de rotenona no se observa un cambio con respecto al control, pero a medida que va aumentando la concentración de rotenona se puede apreciar una la disminución de fluorescencia de calceína, la cual es estadísticamente significativa con respecto al control. Estos resultados concuerdan con lo observado en las imágenes de campo claro, donde en las primeras dos concentraciones probadas no se observa un cambio morfológico en las células, sino hasta las concentraciones más altas de rotenona.

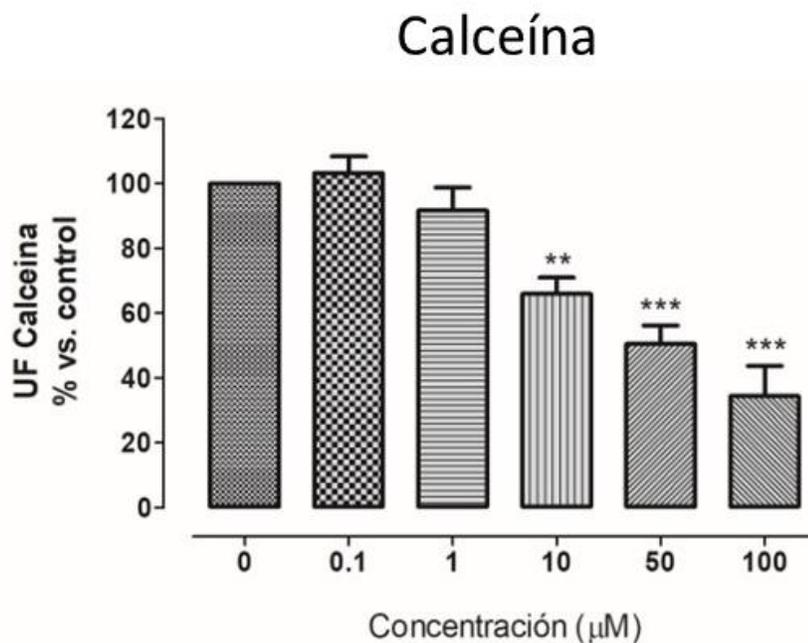


Figura 14. El tratamiento con rotenona reduce la viabilidad de los astrocitos a las 24 h en forma dependiente de la concentración.

Media \pm EEM, n=6. **p<0.01 y ***p<0.001 vs. control.

7.2 El tratamiento con rotenona disminuye la actividad del CI sólo en tiempos cortos

Dado que la rotenona es el inhibidor por excelencia del CI, se midió la actividad enzimática de éste a través de un método bioquímico para observar el efecto de la toxina. Las células se incubaron 30 minutos, 1 hora y 24 horas con diferentes concentraciones de rotenona, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos. El efecto inhibitor sólo se registró en tiempos cortos (30 minutos), y después se perdió; sólo hubo diferencia significativa en la concentración de 100 μM con respecto al control. En los tratamientos de 1 y 24 h, aparentemente la actividad del CI disminuye, pero no se encontró diferencia significativa (Figura 15).

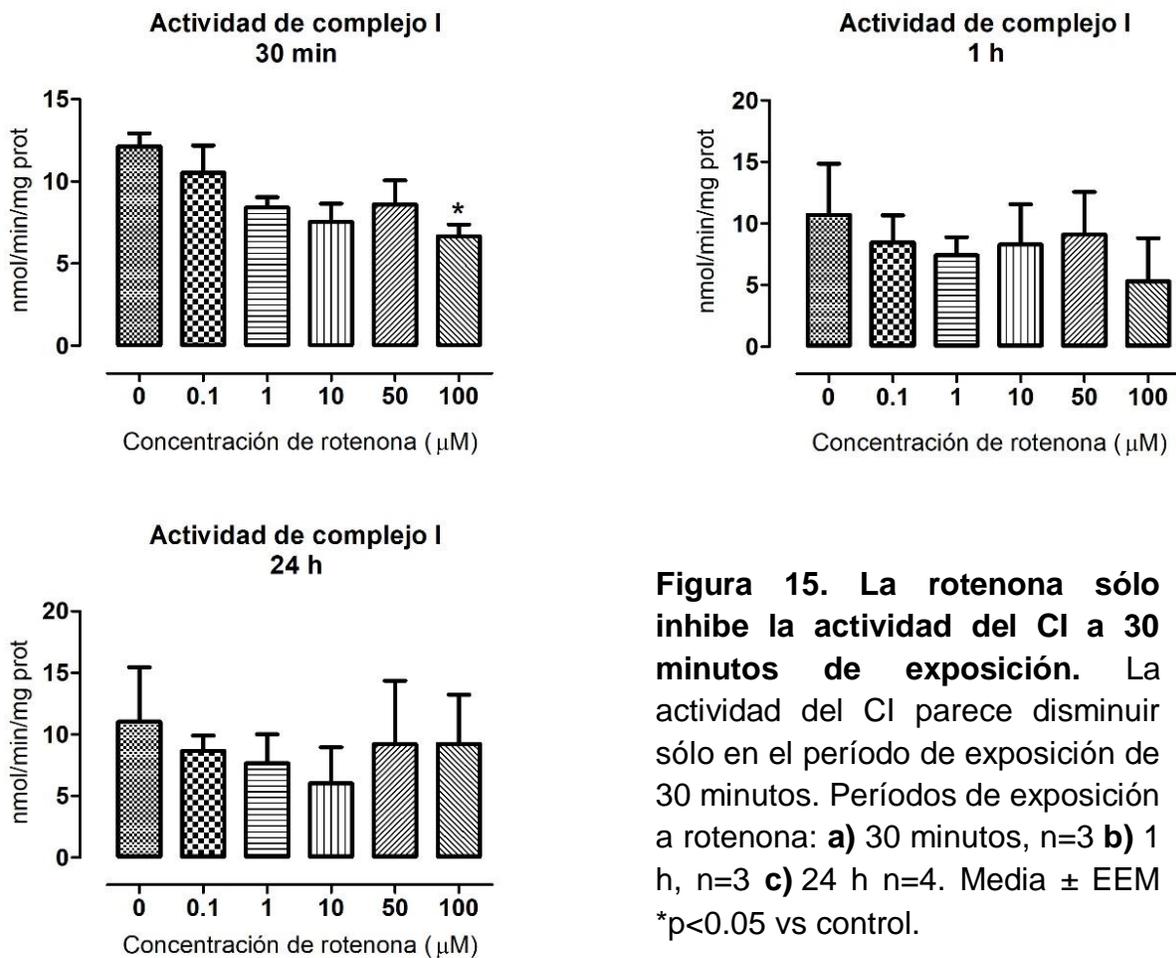


Figura 15. La rotenona sólo inhibe la actividad del CI a 30 minutos de exposición. La actividad del CI parece disminuir sólo en el período de exposición de 30 minutos. Períodos de exposición a rotenona: **a)** 30 minutos, $n=3$ **b)** 1 h, $n=3$ **c)** 24 h $n=4$. Media \pm EEM * $p<0.05$ vs control.

7.3 La rotenona disminuye la expresión de diversas proteínas

7.3.1 Inmunofluorescencia

El efecto de la rotenona sobre proteínas de citoesqueleto, citosólicas y de la mitocondria se observó mediante la técnica de inmunofluorescencia. Se muestran imágenes representativas de fluorescencia de las proteínas GS, tubulina, GFAP, VDAC1 y DAPI -para marcar núcleos celulares-, en astrocitos tratados con las diferentes concentraciones de rotenona. En la Figura 16 se puede observar la marca del anticuerpo GFAP, el cual es específico para astrocitos. En la Figura 16 a se encuentran astrocitos sin tratamiento y se puede observar una marca clara para GFAP y DAPI. Los astrocitos muestran morfología estrellada, característica de este tipo celular y también se pueden observar prolongaciones fuertes. En la Figura 16 b y 16 c todavía se pueden ver prolongaciones fuertes y los astrocitos aún conservan su forma, sin embargo a partir de la Figura 16 c, se puede apreciar que se va perdiendo la marca para GFAP. En la Figura 16 d y 16 e se comienza a ver una deformación en la forma de los astrocitos y también parecen encogerse. En la Figura 16 f se puede observar que se va perdiendo la marca para GFAP, aunque todavía se puede apreciar al fondo.

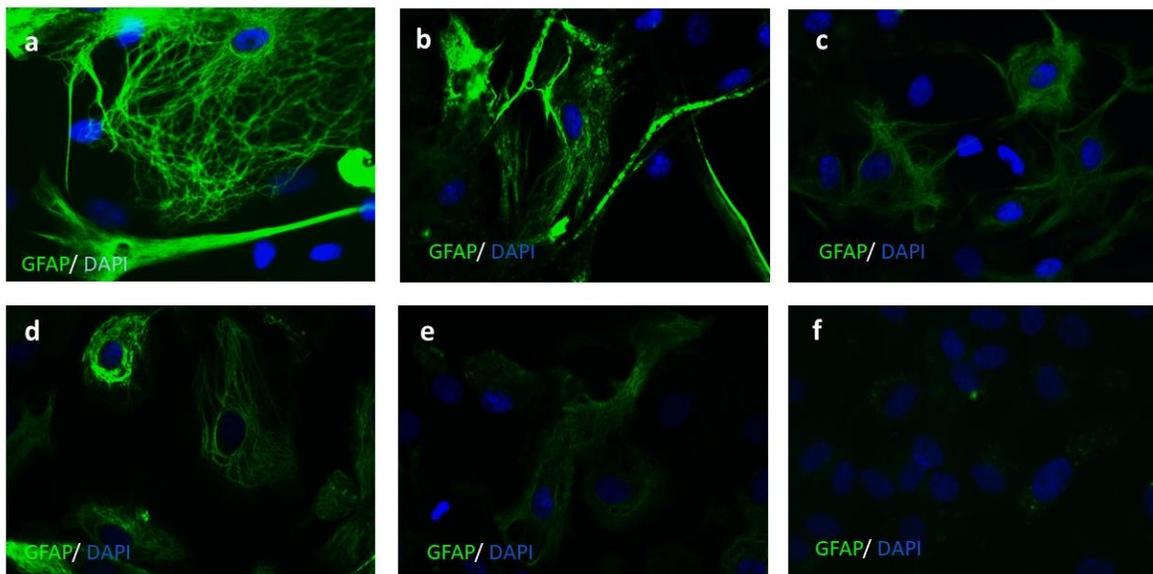


Figura 16. La rotenona disminuye la fluorescencia de GFAP. Imágenes de fluorescencia aumento 40x. Astrocitos, tratamiento con rotenona por 24 h. a) 0 μM b) 0.1 μM c) 1 μM d) 10 μM e) 50 μM f) 100 μM .

La Figura 17 representa imágenes de inmunofluorescencia de la proteína tubulina. En la Figura 17 a se puede apreciar la forma alargada de los astrocitos, con prolongaciones largas y una marca fuerte de la proteína. El tratamiento con rotenona parece disminuir la expresión de la proteína, ya que entre mayor concentración, menos intensa es la marca fluorescente. Desde la concentración 0.1 μM (Figura 17 b) se puede apreciar una menor tinción, también se puede observar la pérdida de prolongaciones y pareciera que los astrocitos se retraen, lo cual también se puede observar en la concentración de 1 μM y de 10 μM (Figura 17 c y 17 d, respectivamente). En ésta última concentración, la marca de la tubulina se localiza principalmente alrededor del núcleo. En la concentración 50 μM (Figura 17 e) la marca de tubulina es casi imperceptible, mientras que en la concentración 100 μM (Figura 17 f) la tinción se pierde casi por completo.

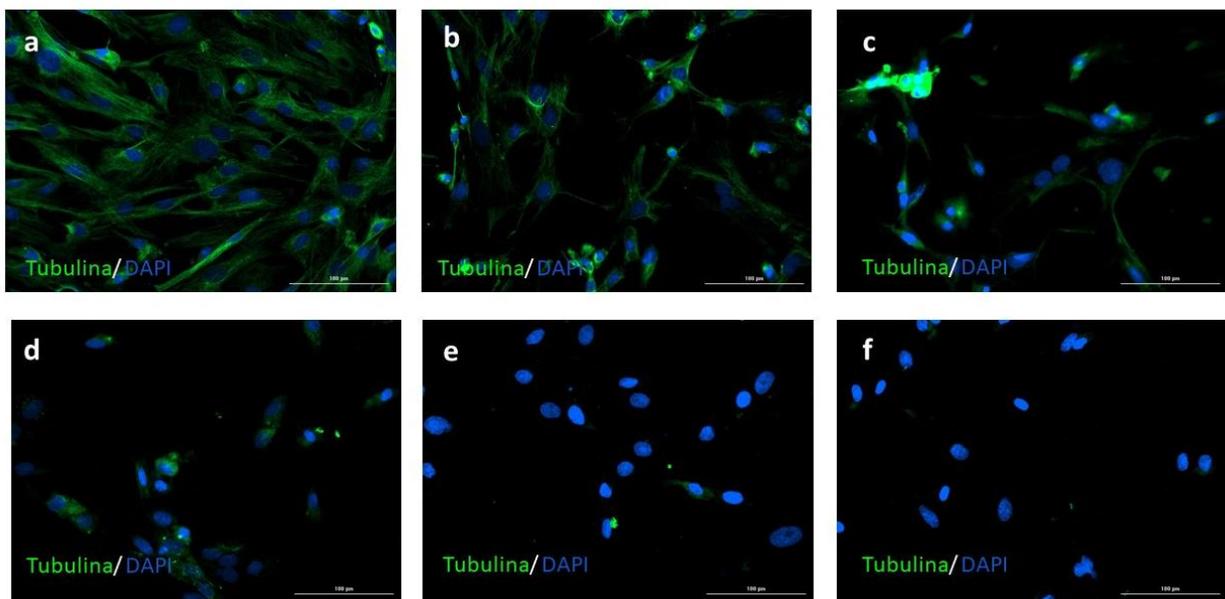


Figura 17. La rotenona disminuye la fluorescencia de tubulina. Imágenes de inmunofluorescencia aumento 40x. Astrocitos, tratamiento con rotenona por 24 h. a) 0 μM b) 0.1 μM c) 1 μM d) 10 μM e) 50 μM f) 100 μM . Barra de escala =100 μm .

En la Figura 18 se muestran imágenes de inmunofluorescencia de la proteína GS. La expresión de la proteína no parece disminuir de manera significativa conforme aumenta la concentración de rotenona, sólo es posible observarlo en las concentraciones de 50 y 100 μM (Figura 18 e y 18 f, respectivamente). También se puede observar marca de la proteína en el núcleo, aunque principalmente se observa alrededor de éste, ya que es una proteína citosólica.

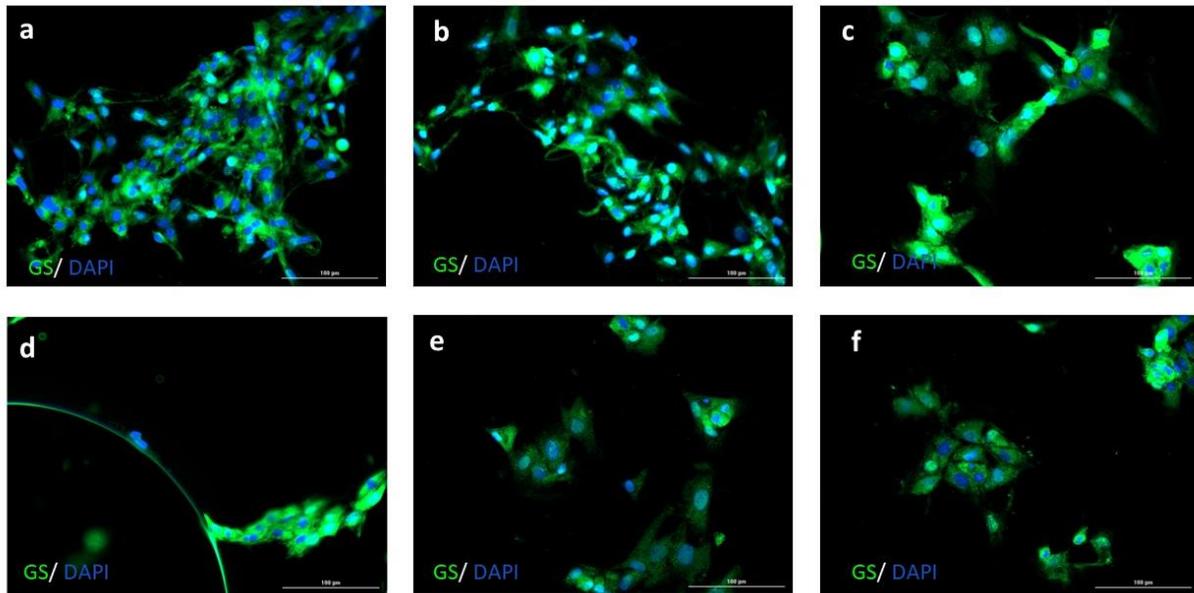


Figura 18. La rotenona parece no disminuir la fluorescencia de GS. Imágenes de fluorescencia aumento 40x. Astrocitos, tratamiento con rotenona por 24 h. a) 0 μM b) 0.1 μM c) 1 μM d) 10 μM e) 50 μM f) 100 μM . Barra de escala = 100 μm .

Las imágenes de fluorescencia de la proteína VDAC1 se muestran en la Figura 19. En el control (Figura 19 a) y en la primera concentración de rotenona (Figura 19 b) se puede observar la marca para la proteína a lo largo de la célula, sin embargo, a partir de la concentración 1 μM (Figura 19 c) la marca está alrededor del núcleo. La expresión de la proteína no parece disminuir conforme aumenta la concentración de la rotenona, incluso pareciera aumentar en la concentración 1 μM (Figura 19 c), pero en las concentraciones de 0.1, 10, 50 y 100 μM (Figura 19 b, 19 d, 19 e y 19 f, respectivamente), no se ve una disminución significativa en la fluorescencia.

Cabe recalcar que la marca fluorescente de DAPI no parece disminuir en intensidad conforme aumenta la concentración de rotenona. La forma de los núcleos tampoco parece cambiar con el tratamiento, lo cual indicaría que la rotenona no afecta núcleos celulares.

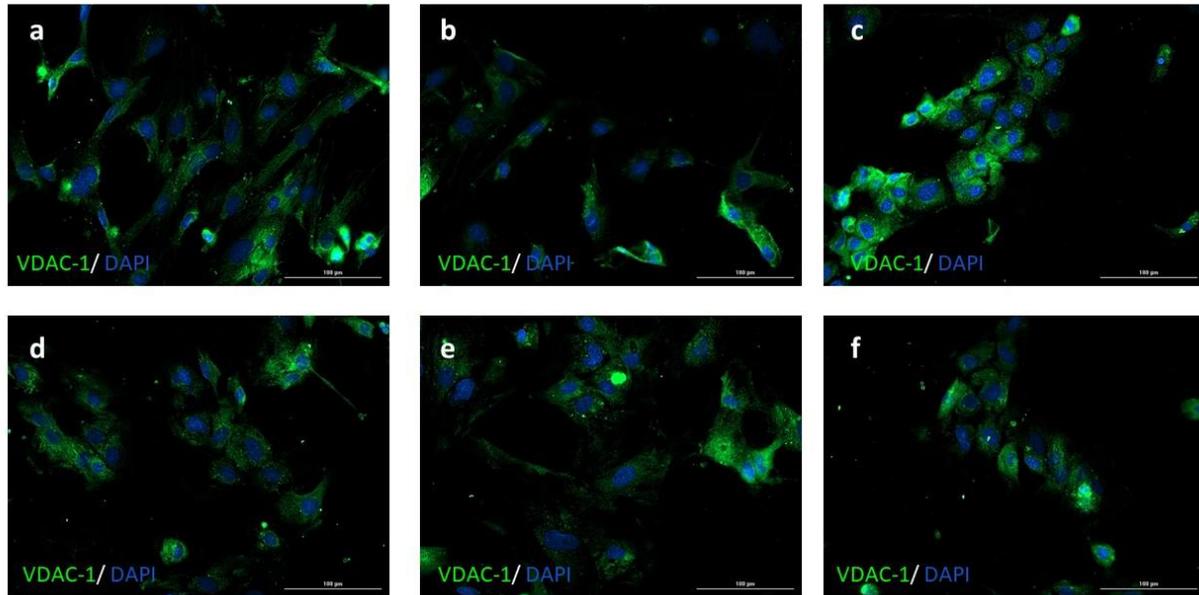


Figura 19. La rotenona parece no disminuir la fluorescencia de VDAC1.

Aumento 40x. Astrocitos, tratamiento con rotenona por 24 h. a) 0 μ M b) 0.1 μ M c) 1 μ M d) 10 μ M e) 50 μ M f) 100 μ M. Barra de escala = 100 μ m.

7.3.2 Western blot

Una vez que observamos las proteínas en células fijadas, se usó el método de western blot para cuantificar. Se muestra una imagen representativa de la detección de las proteínas GS, tubulina, GFAP y VDAC1 por western blot. En la Figura 20 se observa que la expresión de algunas de estas proteínas va disminuyendo conforme aumenta la concentración de rotenona. Como control positivo se utilizó homogenado de riñón y como control de carga la proteína nuclear PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación). Se observó que todas las proteínas tienen una tendencia a disminuir al aumentar la concentración de rotenona, pero la disminución sólo fue significativa estadísticamente para GS y tubulina. La excepción es la concentración de 1 μ M para GFAP y VDAC1, donde la expresión parece aumentar con respecto al control. La GS mostró una disminución con diferencia significativa en todas las concentraciones, excepto en 1 μ M. La tubulina sólo presentó

diferencias significativas con respecto al control en la concentración más alta de rotenona. Tanto GFAP como VDAC1 no mostraron diferencias significativas con respecto al control.

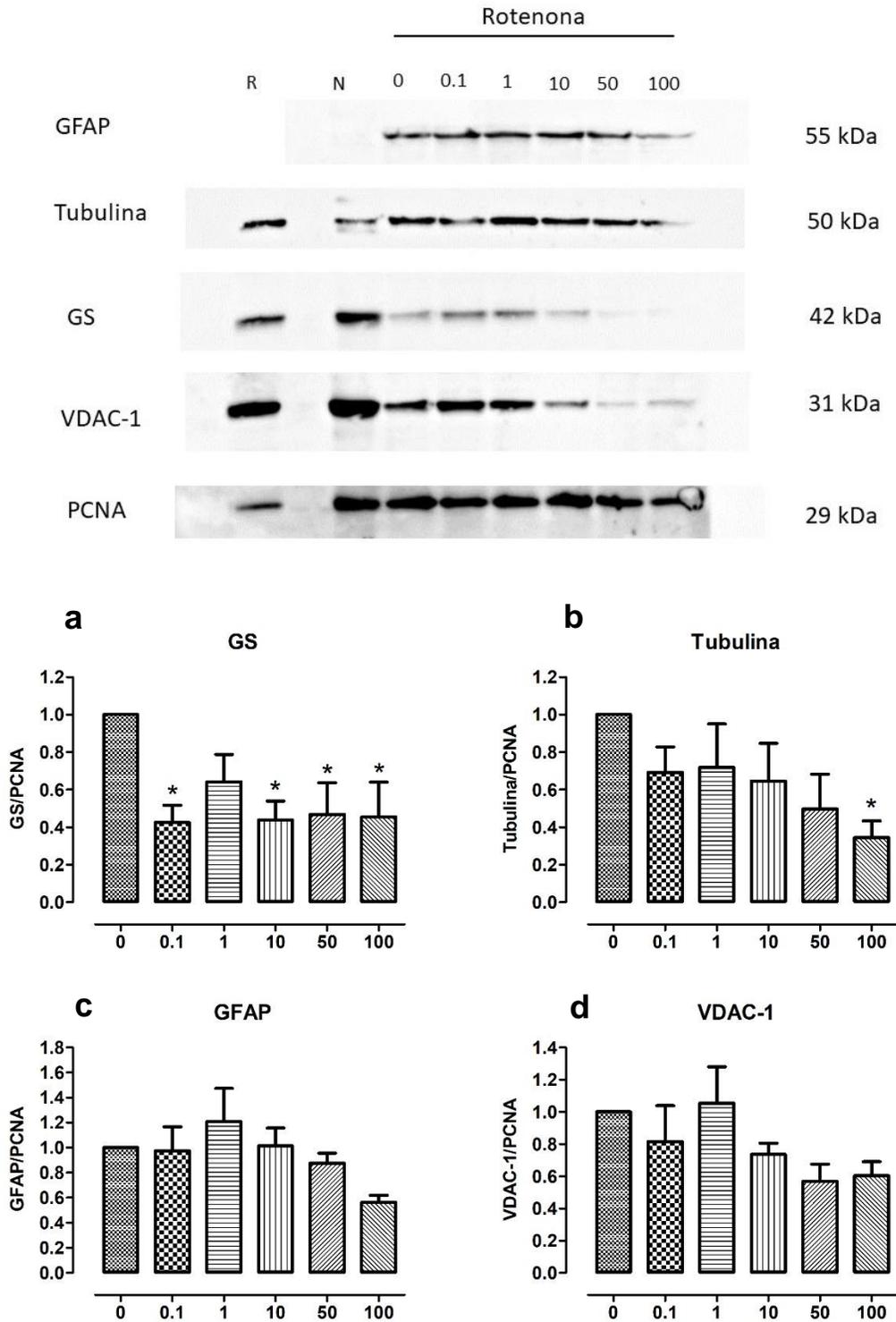


Figura 20. Imágenes representativas de western blot y su respectiva densitometría. Media \pm EEM, n=6. *p<0.05 vs control.

8. DISCUSIÓN

El daño en la mitocondria se ha asociado a enfermedades neurodegenerativas⁴⁰, es por ello por lo que en este trabajo se utilizó la rotenona, pues es un inhibidor del CI mitocondrial. Sin embargo, de manera sorprendente, no se encontró una gran inhibición del CI en astrocitos al ser tratados con rotenona, pero sí se observó una desestabilización en el citoesqueleto, disminución en los niveles de expresión de proteína GS, y al parecer reduce, aunque no de manera significativa, la cantidad de mitocondrias (indicado por la disminución en los niveles de expresión de VDAC1).

El daño observado en el citoesqueleto concuerda con el trabajo de Chernivec et. al.⁴¹, ya que demostraron que la rotenona desestabiliza el citoesqueleto en células de la ameba *Dictyostelium discoideum*, despolimerizando tanto microtúbulos como filamentos de actina. En las neuronas los axones poseen grandes cantidades de microtúbulos y Feng⁴² propuso que la despolimerización de éstos causa más daño en los procesos que en el soma debido a que la síntesis de tubulina puede restablecer rápidamente la formación de microtúbulos en el cuerpo celular, pero no en los procesos más alejados. Un mecanismo similar podría ocurrir en los astrocitos, ya que la tubulina también se distribuye a lo largo de sus prolongaciones; de esta manera también se explicaría el acortamiento de las células ante el tratamiento de rotenona en este estudio. Además, el cambio en la morfología de las células puede ser debido a que la rotenona se une a la tubulina y causa inhibición de la formación de microtúbulos⁴³.

Otra explicación de cómo la rotenona afecta la tubulina, es mediante la inhibición del CI: los procesos de plegamiento de la tubulina requieren ATP y GTP, y debido a que la inhibición del CI mitocondrial reduce la producción de ATP, eso puede generar un mal plegamiento de la proteína⁴². No obstante, es necesario medir la cantidad de ATP en los cultivos de astrocitos para poder asegurar que existe un mal plegamiento debido a una menor producción de ATP.

La despolimerización de microtúbulos también interrumpe el transporte vesicular y se ha demostrado que los defectos en el transporte mediante microtúbulos juegan

un papel importante en enfermedades neurodegenerativas⁴⁴. El transporte de Glu y Gln se genera vía vesicular, de modo que el ciclo glutamina-glutamato también podría verse afectado en este modelo de daño con rotenona.

En este trabajo se observó que la viabilidad de los astrocitos disminuyó significativamente a partir de la concentración de 10 μ M. Se ha descrito que la rotenona disminuye la viabilidad en células tales como PC12⁴⁵, la línea celular RGC- 5⁴⁶, la línea celular de neuroblastoma SH- SY5Y⁴⁷ y otros tipos celulares, sin embargo, se han realizado muy pocos estudios con rotenona en astrocitos, la mayor parte se enfocan en células neuronales o líneas celulares derivadas de neuronas. El presente estudio pretende indagar la respuesta de los astrocitos ante la rotenona, un inhibidor de la CTE, el cual afecta a las neuronas dopaminérgicas⁴⁸, pero muy poco se sabe de la participación de los astrocitos en estos casos.

El proceso predominante de muerte celular causada por rotenona en astrocitos podría ser la apoptosis, ya que en las imágenes de campo claro se observan características como retracción de prolongaciones y acortamiento de la célula, así como pérdida de unión celular^{49,50}. Esto concuerda con el trabajo de Li *et. al.*⁵¹, quienes demostraron que en la línea celular HL-60 la rotenona causa apoptosis por un aumento de las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, para poder afirmar que la rotenona causa muerte por apoptosis en astrocitos, se necesitarían hacer ensayos como medición de actividad o expresión de caspasas, fragmentación de DNA, medición del potencial de membrana y ensayo de TUNEL, entre otros. La rotenona causa muerte celular en diferentes tipos de células^{45-47,52,53}, a pesar de ello, el mecanismo de muerte depende del tipo celular⁵¹.

Como se mencionó anteriormente, la inhibición del CI en astrocitos no fue tan severa, pues sólo se registró diferencia significativa en el tratamiento de 30 minutos en la concentración 100 μ M con alrededor de un 30% de inhibición. Esto es contrario a lo esperado, pues la rotenona es el inhibidor por excelencia del CI. Además, en estudios como el de Barrientos & Moraes⁴⁰ sí se registró una menor actividad del CI en células human xenomitochondrial cybrids (HXC) expuestas a rotenona, pero cabe recalcar que la actividad se midió en mitocondrias aisladas. Es posible que, en astrocitos, el CI no sea el único blanco de la rotenona, sino que a nivel celular afecta

también al citoesqueleto y otras zonas de la célula además de la mitocondria. También resulta interesante que el efecto inhibitorio sólo se registre en periodos cortos -en este caso en 30 minutos- y que se pierda conforme pasa el tiempo -como se observó en los tratamientos de 1 y 24 h-. Una explicación de la pérdida del efecto puede ser la degradación de la rotenona, ya que este compuesto es fotosensible y termosensible⁴⁸ y durante los experimentos la rotenona estuvo parcialmente expuesta a la luz y se incubó a 37°C, y la rotenona comienza a degradarse a partir de los 35°C⁵⁴ por lo que pudo ser un factor para que se degradara y se dejara de observar el efecto inhibitorio.

A diferencia de lo que indican estudios previos, en los que la línea celular glioma de rata (C6) el tratamiento durante 4 h con rotenona incrementó la expresión de GFAP⁵⁵, en el presente trabajo se encontró que la expresión de esta proteína tiende a disminuir, aunque sin diferencia significativa, ante la exposición al inhibidor. Esto podría ser congruente con el hecho de que la rotenona desestabiliza el citoesqueleto, pues también es notable la disminución de la expresión de la tubulina. En las imágenes de fluorescencia es posible apreciar que la expresión de la GS no disminuyó tan drásticamente como la de las proteínas mencionadas anteriormente, sin embargo, la distribución de la proteína cambia con el tratamiento, pues en el control se localiza a lo largo del citoplasma, mientras que, en los tratamientos con rotenona, su distribución parece ser más perinuclear. De manera interesante, los niveles de expresión de proteína de GS medidos por western blot, sí disminuyeron significativamente en casi todas las concentraciones de rotenona.

El tratamiento con rotenona también podría afectar la cantidad de mitocondrias, pues en el western blot se observó una tendencia a disminuir en la expresión de la proteína VDAC1 (aunque no es estadísticamente significativo), sin embargo, para poder afirmar esto se tendrían que hacer pruebas como MitoTracker o detección de ATP sintasa por métodos como inmunofluorescencia o western blot. A pesar de que en los resultados de western blot se observa que VDAC1 tiende a disminuir, en las imágenes de fluorescencia, la marca de esta proteína parece que no se reduce, por ello sería adecuado utilizar los métodos anteriormente mencionados.

Por otra parte, la marca para DAPI no parece disminuir en las imágenes de fluorescencia, tampoco se observó un cambio notable en la morfología nuclear. Además, en el western blot de PCNA no se observó tampoco una gran disminución de la expresión de la proteína, estos resultados confirman que la rotenona no afecta el núcleo de las células, al menos en un tratamiento de 24 h.

9. CONCLUSIONES

El tratamiento con rotenona afectó a los astrocitos de diversas maneras: cambió su morfología, disminuyó la viabilidad con un efecto dependiente de la concentración; disminuyó la expresión de las proteínas GS y tubulina.

Al verse afectada la GS en los astrocitos, podría desencadenar la desregulación de la homeostasis del Glu y la Gln, lo cual a su vez podría afectar la neurotransmisión y ser una posible causa de la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas. La disminución de las proteínas GFAP y tubulina se puede interpretar como un daño en el citoesqueleto de los astrocitos.

El efecto de la rotenona como inhibidor del CI en astrocitos sólo fue observable en un corto tiempo de 30 minutos, mientras que en tratamientos más largos (1 y 24 h) el efecto se perdió. Posiblemente la rotenona tenga otros blancos en estas células antes de llegar a la mitocondria, sin embargo, hace falta investigación al respecto. La rotenona parece no afectar los núcleos de los astrocitos, así que proteínas nucleares podrían ser buenos controles de carga o marcadores de estas células en tratamientos con esta toxina.

10. PERSPECTIVAS

- Utilizar un rango más amplio de concentraciones de rotenona.
- Medir la cantidad de ATP producida en la CTE de los astrocitos con las diferentes concentraciones de rotenona.
- Medir la actividad de la GS con las diferentes concentraciones de rotenona.
- Medir la expresión de los transportadores de Glu.

- Comparar los mismos parámetros en cultivos de neuronas y/o co-cultivos de neuronas y astrocitos para tener un panorama más amplio del ciclo glutamina-glutamato.
- Medir los niveles de Glu y Gln, tanto intra como extracelulares.
- Realizar ensayos de apoptosis como como medición de actividad o expresión de caspasas, fragmentación de DNA, medición del potencial de membrana, ensayo de TUNEL.
- Medir cantidad de mitocondrias mediante métodos como MitoTracker o a través de la detección de proteínas específicas, tal como la ATP sintasa.

11. REFERENCIAS

- 1 Zuleta, E. B. *El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano* . Primera edn, (2007).
- 2 Fidaleo, M., Cavallucci, V. & Pani, G. Nutrients, neurogenesis and brain ageing: From disease mechanisms to therapeutic opportunities. *Biochemical Pharmacology* **141**, 63-76, doi:10.1016/j.bcp.2017.05.016 (2017).
- 3 Strominger, N. L., Demarest, R. J. & Laemle, L. B. *Noback's human nervous system : structure and function*. (Totowa, NJ : Humana Press, 2012 Seventh edition, 2012).
- 4 Jha, M. K. *et al.* Review: The secretome signature of reactive glial cells and its pathological implications. *BBA - Proteins and Proteomics* **1834**, 2418-2428, doi:10.1016/j.bbapap.2012.12.006 (2013).
- 5 Takahashi, N. & Sakurai, T. Review: Roles of glial cells in schizophrenia: Possible targets for therapeutic approaches. *Neurobiology of Disease* **53**, 49-60, doi:10.1016/j.nbd.2012.11.001 (2013).
- 6 Jackson, J. G. & Robinson, M. B. Regulation of mitochondrial dynamics in astrocytes: Mechanisms, consequences, and unknowns. *Glia*, doi:10.1002/glia.23252 (2017).
- 7 Welsch, U., Deller, T. & Negrete, J. H. *Sobotta, histología*. (Buenos Aires : Editorial Médica Panamericana, 2014, 3a. edición, 2014).
- 8 Ross, M. (ed Pawlina Wojciech) 992 (Lippincott Williams & Wilkins, EEUU, 2006).
- 9 Guillamón-Vivancos, T. (2012).
- 10 Palay, S. L. & Chan-Palay, V. *Cerebellar Cortex* Springer-Verlag. *Berlin, Heiderberg, New York* (1974).
- 11 Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M. & Brown, G. C. Neuronal cell death. *Physiological reviews* **98**, 813-880 (2018).
- 12 Beatriz, e., Laura, e. & Jorgina, e. De novo synthesis of glial glutamate and glutamine in young mice requires aspartate provided by the neuronal mitochondrial aspartate-

- glutamate carrier Aralar/AGC1. *Frontiers in Endocrinology*, Vol 4 (2013), doi:10.3389/fendo.2013.00149/full 10.3389/fendo.2013.00149 (2013).
- 13 Schatzberg, A. F. & Nemeroff, C. B. *Tratado de psicofarmacología*. (Masson Barcelona, 2006).
- 14 Rose, C. F., Verkhatsky, A. & Parpura, V. Astrocyte glutamine synthetase: pivotal in health and disease. *Biochemical Society Transactions* **41**, 1518-1524, doi:10.1042/BST20130237 (2013).
- 15 Voet, D. & Voet, J. G. *Biochemistry*, 4-Th Edition. New York: John Wiley & Sons Inc, 492-496 (2011).
- 16 Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. *Microbiology : an introduction*. (Boston : Pearson, [2016] Twelfth edition, 2016).
- 17 Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger : principles of biochemistry*. (New York : W.H. Freeman, [2017] Seventh edition, 2017).
- 18 Emerit, J., Edeas, M. & Bricaire, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* **58**, 39-46 (2004).
- 19 Heinz, S. *et al.* Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Scientific Reports* **7**, 45465-45465, doi:10.1038/srep45465 (2017).
- 20 Schiestl, R. H. & Cabeza-Arvelaiz, Y. (Public Library of Science, 2012).
- 21 Mongin, A. A., Hyzinski-García, M. C., Vincent, M. Y. & Keller Jr, R. W. A simple method for measuring intracellular activities of glutamine synthetase and glutaminase in glial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **301**, C814-C822 (2011).
- 22 Schousboe, A. & Sonnewald, U. *The glutamate/gaba-glutamine cycle : amino acid neurotransmitter homeostasis*. (Cham : Springer, [2016], 2016).
- 23 Kanamori, K., Ross, B. D. & Kondrat, R. W. Glial uptake of neurotransmitter glutamate from the extracellular fluid studied in vivo by microdialysis and ¹³C NMR. *Journal of neurochemistry* **83**, 682-695 (2002).
- 24 Lazo Gómez, R. E. & Tapia Ibargüengoytia, R. *Las sirtuinas como mecanismo protector en modelos de neurodegeneración espinal por excitotoxicidad in vivo*. (2019).
- 25 Kazmiruk, N. V., Boronovskiy, S. E. & Ya, R. N. A stochastic modeling of isotope exchange reactions in glutamine synthetase. *Journal of Physics: Conference Series* **917**, 1 (2017).
- 26 Bosoi, C. R. & Rose, C. F. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metabolic brain disease* **24**, 95-102 (2009).
- 27 Yu, X. *et al.* Assessment of the treatment effect of baicalein on a model of Parkinsonian tremor and elucidation of the mechanism. *Life sciences* **91**, 5-13 (2012).
- 28 Hensley, K. *et al.* Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of neurochemistry* **65**, 2146-2156 (1995).
- 29 Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhatsky, A. & Rodríguez, J. J. Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Molecular neurodegeneration* **6**, 55 (2011).
- 30 Steffek, A. E., McCullumsmith, R. E., Haroutunian, V. & Meador-Woodruff, J. H. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophrenia research* **103**, 71-82 (2008).

- 31 Cudalbu, C. *et al.* Cerebral glutamine metabolism under hyperammonemia determined in vivo by localized ¹H and ¹⁵N NMR spectroscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **32**, 696-708 (2012).
- 32 Lee, A. *et al.* Rapid loss of glutamine synthetase from astrocytes in response to hypoxia: implications for excitotoxicity. *Journal Of Chemical Neuroanatomy* **39**, 211-220, doi:10.1016/j.jchemneu.2009.12.002 (2010).
- 33 Vats, P. *et al.* Changes in the activity levels of glutamine synthetase, glutaminase and glycogen synthetase in rats subjected to hypoxic stress. *International journal of biometeorology* **42**, 205-209 (1999).
- 34 Sequeira, A. *et al.* Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PloS one* **4**, e6585 (2009).
- 35 Eid, T. *et al.* Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *The Lancet* **363**, 28-37 (2004).
- 36 Xu-hui, Y. *et al.* Time-dependent reduction of glutamine synthetase in retina of diabetic rats. *Experimental eye research* **89**, 967-971 (2009).
- 37 García Serafín, A. & Orozco Ibarra, M. *Estudio de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en cultivos primarios de astrocitos.* (2016).
- 38 Inc., R. D. S. *Calcein AM Cell Viability Assay*, <https://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/RSD_4892010K.20080828.pdf> (2007).
- 39 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal Of Biological Chemistry* **193**, 265-275 (1951).
- 40 Barrientos, A. & Moraes, C. T. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 16188-16197 (1999).
- 41 Chernivec, E., Cooper, J. & Naylor, K. Exploring the Effect of Rotenone—A Known Inducer of Parkinson’s Disease—On Mitochondrial Dynamics in Dictyostelium discoideum. *Cells* **7**, 201 (2018).
- 42 Feng, J. Microtubule: a common target for parkin and Parkinson’s disease toxins. *The Neuroscientist* **12**, 469-476 (2006).
- 43 Marshall, L. E. & Himes, R. H. Rotenone inhibition of tubulin self-assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **543**, 590-594 (1978).
- 44 Jiang, Q., Yan, Z. & Feng, J. Neurotrophic factors stabilize microtubules and protect against rotenone toxicity on dopaminergic neurons. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 29391-29400 (2006).
- 45 Tai, K. K., McCrossan, Z. A. & Abbott, G. W. Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels increases cell viability against rotenone-induced cell death. *Journal of neurochemistry* **84**, 1193-1200 (2003).
- 46 Liu, S., Chen, S., Ren, J., Li, B. & Qin, B. Ghrelin protects retinal ganglion cells against rotenone via inhibiting apoptosis, restoring mitochondrial function, and activating AKT-mTOR signaling. *Neuropeptides* **67**, 63-70 (2018).
- 47 Kocki, T., Urbańska, E. M., Kocki, J., Wielosz, M. & Turski, W. A. Effect of chronically administrated carbamazepine and gabapentin on kynurenic acid in rats. *Pharmacological Reports* **61**, 356 (2009).
- 48 Catteau, L. *et al.* Degradation of rotenone in yam bean seeds (*Pachyrhizus* sp.) through food processing. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**, 11173-11179 (2013).

- 49 Connect, E. *Muerte celular: apoptosis, necrosis y autofagia*, <<https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/bioquimica-muerte-celular-apoptosis-necrosis-y-autofagia>> (2019).
- 50 Moreno, E. A., Cuéllar, C. G. & González, A. D. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* **46**, 275-280 (2000).
- 51 Li, N. *et al.* Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8516-8525 (2003).
- 52 Isenberg, J. S. & Klaunig, J. E. Role of the mitochondrial membrane permeability transition (MPT) in rotenone-induced apoptosis in liver cells. *Toxicological Sciences* **53**, 340-351 (2000).
- 53 Chauvin, C. *et al.* Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 41394-41398 (2001).
- 54 Zubairi, S. I., Sarmidi, M. R. & Aziz, R. A. A thermal degradation (thermolysis) study of rotenone extracted from *Derris elliptica* roots using reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Sains Malaysiana* **44**, 121-126 (2015).
- 55 Swarnkar, S. *et al.* Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochemical research* **37**, 2178-2189 (2012).