



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

**“Función de las proteínas Rho y Rac en
mitocondrias de cerebro de rata”**

Para Obtener el Grado de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Lorena Martínez Alcantar

Asesor: DC. Salvador Manzo Avalos

Co- asesor: DC. Alfredo Saavedra Molina

Comité tutorial: DC. Carlos Cervantes Vega

DC. José López Bucio

DC. Homero Reyes de la Cruz

Morelia Michoacán, Febrero del 2012

1.-INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Sistema nervioso.....	5
1.1.1 Sistema nervioso central	5
1.2 El cerebro	6
1.3 Fisiología cerebral.....	9
1.4 La neurona.....	10
1.5 Mitocondria.....	12
1.6 Transducción de señales a través de proteínas G.....	14
1.7 Proteínas G heterotriméricas	15
1.8 Proteínas G monoméricas	15
1.9 GTPasas Rho.	16
2 ANTECEDENTES.....	17
2.1 Función y localización de las proteínas Rho en el cerebro.....	17
2.2 Las proteínas Rho y la mitocondria	19
2.3 Relación entre las proteínas Rho y los niveles de ATP	20
3.- JUSTIFICACIÓN	21
4.- HIPÓTESIS	21
5.-OBJETIVO GENERAL	22
6.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
7.-MATERIALES Y MÉTODOS	23
7.1 Material biológico.....	23
7.2 Análisis Inmunohistoquímico.	23
7.2.1 Obtención de la muestra.	23

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

Páginas

7.2.2 Tinción con violeta de cresilo.	23
7.2.3 Inmunohistoquímica.....	24
7.3 Aislamiento de las mitocondrias de cerebro de rata.	25
7.4 Subfraccionamiento mitocondrial.....	26
7.5 Determinación de la concentración de proteínas.	27
7.6 Inmunodetección de las proteínas Rho.	27
7.7 Determinación del consumo de oxígeno.	28
7.8 Determinación de los niveles de ATP.....	29
8.- RESULTADOS.	31
8.1 Identificación de las diferentes zonas del cerebro de rata.....	31
8.2 Distribución de las proteínas Rac1, RhoA y RhoB en el hipocampo y cerebelo de rata.	33
8.3 Distribución de la proteína RhoA en el cerebro de rata	37
8.4 Distribución de la proteína RhoB en el cerebro de rata	40
8.5 Distribución de la proteína Rac1 en el cerebro de rata	42
8.6 Determinación de la pureza de las mitocondrias de cerebro de rata.	44
8.7 Inmunodetección de las proteínas Rac1, RhoA y RhoB en las mitocondrias de cerebro de rata.....	47
8.8 Localización mitocondrial de RhoA, RhoB y Rac1	48
8.9 Efecto de la inhibición de las proteína Rho y Rac sobre el consumo de oxígeno mitocondrial.....	50
8.10 Efecto de la inhibición de las proteínas Rho y Rac sobre la síntesis de ATP.	52
9.-DISCUSIÓN	54
10.- CONCLUSIONES.....	61
11.- LITERATURA CITADA.....	62

Resumen

El cerebro es el centro de control para todo el cuerpo, es el más exigente de los órganos y uno de los más activos, por lo que debe generar ATP en grandes cantidades para su funcionamiento. A nivel cerebral las proteínas Rho juegan importantes papeles en el crecimiento de la neurita, la dirección del axón y el desarrollo de las dendritas. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares controlando una amplia variedad de rutas de transducción de señales en todas las células eucariontes. Los papeles de las GTPasas Rho están bien documentadas, pero sólo pocos estudios han dilucidado la distribución celular de las proteínas pertenecientes a esta familia en el cerebro. Usando técnicas de inmunohistoquímica se investigó la distribución de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 en el cerebro de ratas adultas. Los resultados muestran que las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 presentan una distribución diferencial en el cerebro de rata, así como patrones de expresión diferentes en estas células. Los análisis de la fracción mitocondrial de cerebro de rata mostraron la presencia de estas proteínas de forma específica en la membrana interna mitocondrial y la inhibición de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 en mitocondrias de cerebro de ratas no mostró cambios importantes en el consumo oxígeno ni en la síntesis de ATP, indicando que aunque están presentes en la mitocondria no influyen en la síntesis de ATP. La localización diferencial de las GTPasas Rho en las diferentes regiones del cerebro de rata indica que puedan tener una amplia variedad de funciones en este órgano.

1.-Introducción

1.1 Sistema nervioso

Es una red compleja muy organizada de millones de neuronas, así como un número mayor de células gliales. El sistema nervioso se divide principalmente en el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. Como el encéfalo y la médula espinal ocupan una posición central del cuerpo, se conocen en conjunto como sistema nervioso central (SNC). De modo similar, los nervios del cuerpo forman el sistema nervioso periférico (SNP) (Thibodeau y Patton, 2007).

El sistema nervioso está diseñado para detectar las condiciones del medio interno y externo, así como procesar esta información y utilizarla para dirigir la conducta y los procesos corporales. Existen tres procesos básicos que actúan juntos: la percepción, la transferencia y el procesamiento de la información (Briar y Lasserson, 2004).

1.1.1 Sistema nervioso central

El SNC está diseñado para integrar y correlacionar los distintos tipos de información sensorial, es la fuente de pensamientos, emociones y recuerdos. La mayoría de los impulsos nerviosos que estimulan la contracción muscular o las secreciones glandulares se originan en el SNC. Está formado por el encéfalo y la médula espinal. Se encuentra protegido por tres membranas, denominadas meninges. El encéfalo es la parte del sistema nervioso central

que está protegida por el cráneo. Está formado por el cerebro, el cerebelo y el tronco del encéfalo (Netter, 1994).

1.2 El cerebro

El cerebro es el órgano mayor del sistema nervioso central y el centro de control para todo el cuerpo. En conjunto está constituido por dos mitades simétricas, denominadas hemisferios cerebrales derecho e izquierdo, separadas una de otra por una cisura muy profunda sagital y mediana, la cisura interhemisférica. La cara externa de cada hemisferio se divide en cuatro lóbulos: frontal, occipital, temporal y parietal (Quiroz, 1997). La superficie del cerebro, conocida como corteza cerebral, está compuesta por una capa fina de sustancia gris, constituida a su vez por dendritas y cuerpos celulares de neuronas. La sustancia blanca, formada por fascículos de fibras nerviosas, compone la mayor parte del interior del cerebro. Sin embargo, dentro de la sustancia blanca existen unos pocos islotes de sustancia gris, los núcleos cerebrales, cuyo funcionamiento es esencial para la producción de movimientos automáticos y para la postura. En términos generales las funciones cerebrales se pueden resumir en: conciencia, pensamiento, memoria, sensaciones y movimientos voluntarios. Cada área concreta del cerebro desempeña una función muy específica (Thibodeau y Patton, 2007).

Hay cuatro subdivisiones principales del encéfalo, cuyos nombres describen su desarrollo en el embrión a partir del tubo neural. Estas subdivisiones, son las siguientes (Kandel y col., 2001) (fig. 1):

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

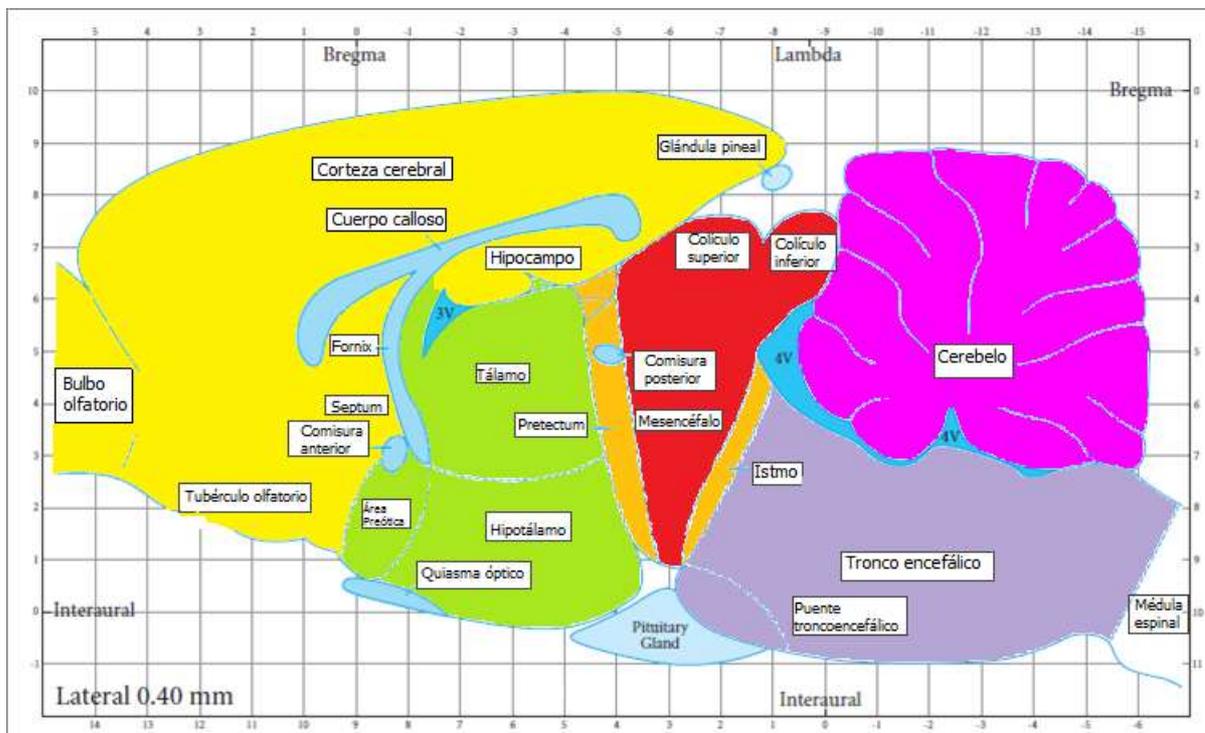


Figura 1. Corte sagital del cerebro de rata. Se muestra las regiones en las que se ha dividido el cerebro para su estudio (amarillo=telencéfalo, verde=diencéfalo, rojo=mesencéfalo, lila=romboencéfalo), así como las estructuras principales pertenecientes a cada una de ellas.

Telencéfalo. Región comprendida por la corteza cerebral. Corresponde a los dos hemisferios cerebrales (derecho e izquierdo), y a una pequeña parte mediana situada en la porción anterior del 3er ventrículo. La corteza cerebral queda dividida en 4 lóbulos, que reciben su nombre del hueso craneal al que están más próximos, son por lo tanto: frontal, parietal, temporal y occipital. En la corteza se pueden distinguir áreas que están relacionadas con el procesamiento tanto de la información sensorial como de las órdenes motoras (Quiroz, 1997).

Diencéfalo. Región anatómica del cerebro que se encuentra entre el tronco encefálico y los hemisferios cerebrales. Se extiende por delante entre el agujero interventricular y la comisura blanca posterior hacia atrás. Está limitado

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

lateralmente por la cápsula interna. En la línea media se encuentra el 3er ventrículo el cual lo separa en dos regiones simétricas. El diencefalo se divide en cuatro zonas bien definidas: el tálamo, el hipotálamo, el subtálamo y el epitálamo. El tálamo procesa y distribuye toda la información sensorial y motora que llega a la corteza cerebral, interviene en regular el nivel de conciencia y los aspectos emocionales de las sensaciones. El hipotálamo tiene como misión regular el sistema nervioso autónomo y la secreción hormonal de la hipófisis. El subtálamo está delante del tálamo y al lado del hipotálamo, su función principal se relaciona con el movimiento corporal. Las vías neuronales que lo atraviesan van hacia el tálamo, el cerebelo y los ganglios basales. El epitálamo se sitúa en la parte posterior del diencefalo, al lado del mesencefalo. Está formado por la glándula pineal y los núcleos de la habénula. Esta glándula actúa como un reloj biológico, emitiendo señales que regulan procesos tanto fisiológicos como de la conducta (Herrera y col., 2008).

Mesencefalo. El cerebro medio o mesencefalo es una corta porción del tronco cerebral que conecta el puente y cerebelo con el tálamo y los hemisferios cerebrales. Está formado por una porción ventrolateral, compuesta de un par de cuerpos cilíndricos, denominados pedúnculos cerebrales y una porción dorsal, formada por cuatro eminencias, denominadas cuerpos cuadrigéminos y una cavidad virtual o túnel denominado acueducto. Participa en el control de los movimientos oculares y el movimiento de los músculos esqueléticos. A su vez es una estación de relevo esencial para las señales auditivas y visuales (Herrera y col., 2008)

Romboencéfalo. El tronco encefálico es un área intermedia entre la médula espinal y el cerebro. Tiene alrededor de unos 8-10 cm de altura. En esta región existe una gran cantidad de núcleos que son muy importantes para la vida, especialmente los relacionados con el área del bulbo raquídeo (regulación de la presión arterial y la respiración) (Puelles y col., 2008).

1.3 Fisiología cerebral

El cerebro consume el 20% del oxígeno corporal y el 60% de la glucosa (Briar y Lasserson, 2004). En condiciones normales, casi toda la energía utilizada por las células del cerebro es suministrada por la glucosa procedente de la sangre. Al igual que el oxígeno, la mayor parte de la glucosa es suministrada continuamente por la sangre capilar, y en un momento dado sólo existe un almacén de glucosa para dos minutos en forma de glucógeno en las neuronas (Guyton y Hall, 1997). Aunque la glucosa es el sustrato energético principal, las células del cerebro metabolizan cetonas durante rápidas reducciones de glucosa en la sangre (Bernard y col., 2007).

El cerebro es el más exigente de los órganos y uno de los más activos. Debe generar ATP en grandes cantidades para mantener los potenciales de membrana que son esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos (Mathews y col., 2002). A pesar de no realizar funciones mecánicas, el tejido cerebral necesita de grandes cantidades de energía para su funcionamiento normal. Esta energía le permite regular las múltiples conexiones sinápticas, los canales iónicos dependientes de voltaje y de agonistas, así como la síntesis,

transporte, almacenamiento y liberación de diversas sustancias, tales como neurotransmisores, péptidos, etc. (Villarejo, 1998).

El metabolismo energético no es exclusivo de las neuronas ya que las células gliales y las células endoteliales vasculares juegan un papel central en el flujo de sustratos energéticos a las neuronas (Pocock y Richards, 2001).

1.4 La neurona

La unidad estructural y funcional básica del sistema nervioso es la neurona. Las neuronas son células excitables que pueden conducir impulsos eléctricos y comunicarse entre ellas a través de uniones especializadas denominadas sinapsis (Briar y Lasserson, 2004). Se localizan en toda la sustancia gris del cerebro y la médula espinal. Tienen un tamaño y una forma variables, y se tiñen intensamente con los colorantes básicos. El cuerpo celular o soma es la parte más ensanchada de la neurona. En él se encuentran el núcleo y la mayoría de los orgánulos celulares. Las neuronas poseen extensas ramificaciones denominadas dendritas que reciben información procedente de otras células y transmiten información a sus objetivos a través de una extensión del cuerpo celular que recibe el nombre de axón (figura 2). El material teñido dentro de los cuerpos celulares recibe el nombre de sustancia de Nissl y contiene una elevada proporción de ARN (fig. 3) Colectivamente, axones y dendritas se conocen como proyecciones celulares (Pocock y Richards, 2001).

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

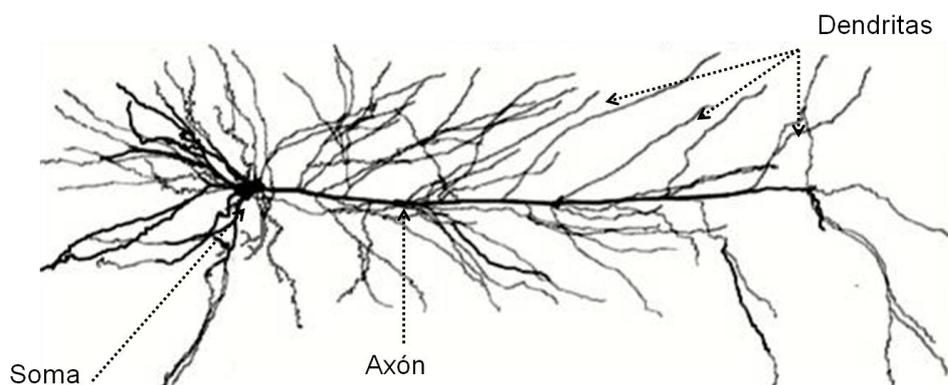


Figura 2. Estructura básica de una neurona del SNC. Todas las neuronas cuentan con las mismas partes: las dendritas, el cuerpo celular o soma y los axones.

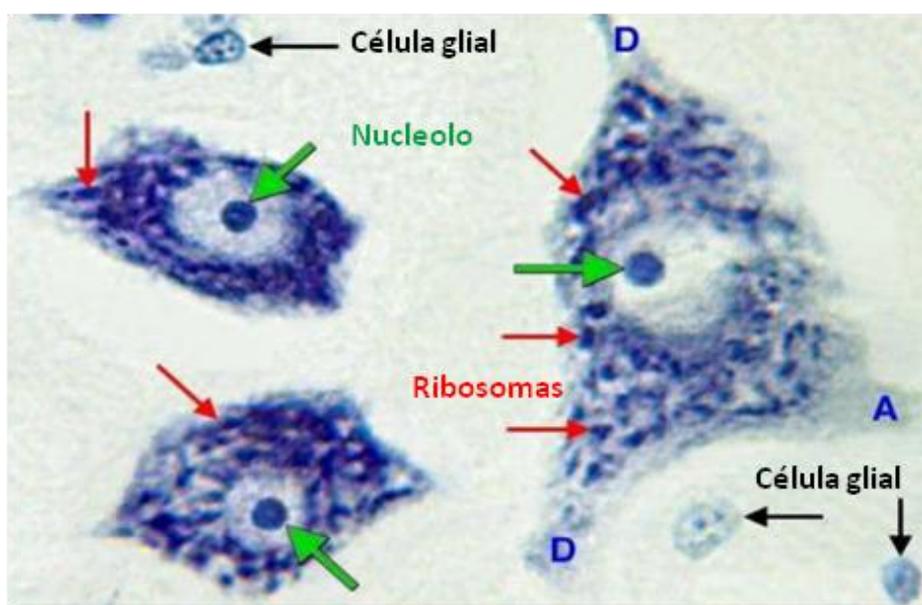


Figura 3. Cuerpos de neuronas teñidas con violeta de cresilo. La tinción con violeta de cresilo se observa en el núcleo, el nucleolo y parte de la cromatina. El citoplasma presenta una elevada cantidad de agregados teñidos de color violeta (cuerpos de Nissl) que representan un gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso, mientras que a los lados de la neurona se observan los núcleos de las células gliales. (A= Axón, D=dendritas)

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

De acuerdo con la función en cada zona, las neuronas pueden organizarse formando: capas (p. ej. en la corteza cerebral y del cerebelo), columnas (p. ej. las neuronas motoras de la médula espinal) o masas (núcleos) (p. ej. los núcleos de los nervios craneales en el tronco del encéfalo) (Briar y Lasserson, 2004).

Las células del cerebro generan la mayoría de la energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena transportadora de electrones. Las neuronas son particularmente vulnerables a la disfunción mitocondrial debido a su dependencia en su alta tasa metabólica y compleja morfología (Bernard y col., 2007).

1.5 Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos de aspecto filiforme, poseen un diámetro comprendido entre 0.5 y 1 μm , con funciones que van desde el abastecimiento energético en forma de ATP a la célula hasta la regulación citoplasmática de los niveles de los segundos mensajeros, como el ión Ca^{2+} y las especies reactivas de oxígeno. Su capacidad de asociación a los microtúbulos las convierte en orgánulos móviles y plásticos, capaces de desplazarse por el citoplasma y adquirir la morfología y localización celular más adecuada, para que el aporte energético sea lo más eficiente posible (Bereiter, 1990). En las células caracterizadas por un alto grado de metabolismo aeróbico, el número de mitocondrias puede ser muy elevado (Bohinski, 1991).

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

Las mitocondrias presentan dos compartimentos bien definidos, la matriz y el espacio intermembranal, delimitados por dos membranas, la interna y la externa, con características estructurales y funcionales muy diferentes. En la matriz se localizan varias copias del genoma circular mitocondrial, los ribosomas y numerosos complejos enzimáticos necesarios tanto para las funciones energéticas como para la expresión y la replicación de genes (Gray y col., 1999). En el espacio intermembranal se localizan las enzimas que median el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y alguno de estos complejos presenta actividad de cinasa. La membrana interna se caracteriza morfológicamente por presentar unas invaginaciones denominadas “crestas” con múltiples complejos multienzimáticos, tales como los componentes de la cadena transportadora de electrones (CTE) y la ATP sintasa, así como componentes que regulan el paso de metabolitos. La membrana mitocondrial interna resulta especialmente impermeable a los iones, debido a su alto contenido en el fosfolípido cardiolipina, característica esencial que le permite soportar un gradiente electroquímico necesario para el desempeño de la función energética. Por el contrario, la membrana externa carece de crestas mitocondriales y, en condiciones fisiológicas, es permeable al paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 Da (DePierre y Ernster, 1977).

En las neuronas, las mitocondrias son necesarias en las sinapsis para mantener los niveles de ATP locales. Específicamente, las mitocondrias son de gran importancia para el desarrollo sináptico y plasticidad, ya que cambios en

la distribución y/o función de las mitocondrias pueden ocasionar la disfunción o pérdida sináptica (Verstreken y col., 2005). Las mitocondrias se localizan dentro de los axones, dendritas y terminales sinápticas para proporcionar el ATP, el poder oxidante (NAD^+) y el amortiguamiento de Ca^{2+} de estos compartimentos (Parihar y Brewer, 2007).

1.6 Transducción de señales a través de proteínas G

Las proteínas G unen nucleótidos de guanina, GDP en su estado inactivo y GTP en su estado activo. Son una clase específica de proteínas reguladoras unidas a la membrana que se activan cuando un receptor se unen a un ligando específico (Pocock y Richards, 2001).

Todas las células tienen la capacidad de responder apropiada y mesuradamente a cambios en el medio ambiente y otros estímulos externos. Las señales del medio extracelular son captadas por receptores de la superficie de las membranas plasmáticas y transmitidas a través de transductores hacia los amplificadores, los cuales sintetizan moléculas de segundos mensajeros que alcanzan sus blancos a través de numerosos pasos adicionales. Los transductores son proteínas que unen nucleótidos de guanina o proteínas G, los cuales regulan la apertura o cierre de las cascadas de señalización (Kaziro y col., 1991). Existen dos clases de proteínas G dependiendo del peso y estructuración molecular: las proteínas G heterotriméricas y las proteínas G monoméricas.

1.7 Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades α , β y γ , cada una con una composición diferente de aminoácidos (Pocock y Richards, 2001). Funcionan como transductores de los receptores de las membranas celulares (Yamamoto y col., 1989). Se han identificado 20 subunidades α , 6 subunidades β y 12 subunidades γ , con pesos moleculares de 39 a 46 kDa, 35 a 39 kDa y 8 kDa respectivamente. Intervienen en la regulación de la percepción de estímulos olfatorios o visuales, hormonas o neurotransmisores, señales quimiotácticas y en el crecimiento celular, entre otros (Knust, 2001). Su actividad es normalmente regulada por receptores de la membrana plasmática que característicamente tienen 7 regiones transmembranales. En el estado inactivo, la subunidad G_{α} tiene unido GDP y las 3 subunidades están unidas. La unión de ligandos al receptor genera el intercambio de GDP por GTP en la subunidad G_{α} , ocasionando su disociación de las subunidades $G_{\beta\gamma}$. Las subunidades G_{α} y/o $G_{\beta\gamma}$ pueden entonces interactuar con sus moléculas efectoras (Serrano, 1998).

1.8 Proteínas G monoméricas

Las proteínas G monoméricas o pequeñas GTPasas son proteínas de masas moleculares de 20 a 40 kDa, que constan de una sola cadena polipeptídica, incluidas en la superfamilia Ras (Takai y col., 2001).

La superfamilia Ras comprende más de 150 miembros en humanos, con ortólogos evolutivamente conservados en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, y algunas especies de plantas (Colicelli, 2004). Esta superfamilia, se divide en cinco familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf, en base a su secuencia y similitudes funcionales. Las proteínas G monoméricas comparten un mismo mecanismo bioquímico y actúan como interruptores moleculares binarios (Vetter y Wittinghofer, 2001) de forma similar a la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas.

1.9 GTPasas Rho.

Las proteínas Rho son GTPasas de bajo peso molecular reguladores clave del citoesqueleto de actina, en las células eucariontes (Goveck y col., 2005). Los miembros de esta familia se incluyen en diferentes subfamilias, entre las que se incluyen: Rho (RhoA, RhoB, RhoC, RhoD, RhoT), Rac (Rac1, Rac2, Rac3), Cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Chp/Wrch2, RhoG, RhoH/TTF y Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE) (Goveck y col., 2005; Jaffe y Hall, 2005; Chardin, 2006).

Las proteínas Rho funcionan como interruptores moleculares, utilizando una estrategia bioquímica simple para regular procesos celulares complejos ya que ciclan entre dos estados conformacionales: uno activo (unido a GTP) y uno inactivo (unido a GDP). El intercambio entre el GTP y el GDP y viceversa, está regulado por proteínas accesorias, tales como los factores intercambiadores de

nucleótidos de guanina (GEFs), proteínas activadoras de la actividad de GTPasa (GAPs) e inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) (Jantsch-Plunger y col., 2000).

Las GTPasas Rho regulan muchas rutas de transducción de señales, principalmente aquellas relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina. Participan además, en la regulación de la polaridad celular, en la transcripción de genes, en la fase G1 del ciclo celular, en la dinámica de los microtúbulos, rutas de transporte vesicular y en diversas actividades enzimáticas, entre las que se incluyen las de la NADPH oxidasa y la glucano sintasa. La lista aparentemente interminable es confusa, pero es consistente con la gran cantidad de proteínas blanco encontradas (Etienne y Hall 2002).

2 Antecedentes

2.1 Función y localización de las proteínas Rho en el cerebro.

Durante el desarrollo embrionario, las neuronas del SNC se polarizan para formar generalmente un solo axón y múltiples dendritas. En ambas estructuras su morfología es determinada por su citoesqueleto, en el cual las proteínas Rho juegan un papel crucial al integrar las señales del medio ambiente que regulan el citoesqueleto tanto de axones como de dendritas (Van Aelst y Cline, 2004). Además, las proteínas Rho desempeñan un papel importante en el crecimiento de las neuritas en la dirección del axón y en la elaboración de las dendritas (Li y col., 2000).

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

Aún cuando las funciones de las GTPasas Rho están bien documentadas en el cerebro mediante estudios *in vitro*, sólo pocos estudios han investigado su distribución celular *in vivo* (Richard y col., 2008).

En un estudio previo se reportó que los RNAm que codifican para las proteínas RhoA, RhoB, Rac1 y Cdc42 están presentes en las neuronas del cerebro de ratas adultas. Se observó que las neuronas contienen los respectivos RNAm en la neocorteza, así como en el hipocampo, tallo cerebral, tálamo y cerebelo (Olenik y col., 1997).

O'Kane y col. (2003) mediante inmunohistoquímica determinaron la presencia de miembros de la familia de proteínas Rho, encontrando que las proteínas RhoA y RhoB están presentes en el área CA1 específicamente a nivel del stratum oriens y stratum radiatum. En contraste, RhoG fue mayor en el stratum pyramidale de la región CA1. La inmunorreactividad de Rac1 y Cdc42 fue mayor en el stratum oriens de la región CA1 y CA3. Como en el hipocampo, a nivel de cerebelo también hubo una distribución diferencial de las GTPasas Rho. RhoA, Cdc42 y Rac1 mostraron una distribución similar, con mayor expresión en las células de Purkinje y en la capa molecular. En contraste, RhoB y RhoG se identificaron en la capa granular y células de Purkinje con una expresión relativamente baja en la capa molecular. Estos resultados, aunque limitados, proporcionaron indicios de que las proteínas Rho tienen una expresión diferencial en el cerebro de rata.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

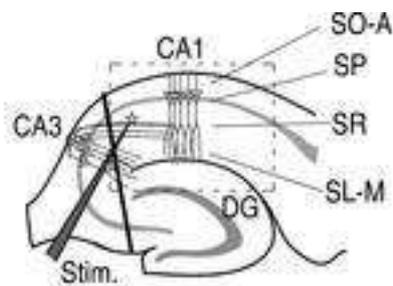


Figura 4. Estructura del hipocampo de cerebro de rata. SO =stratum oriens, SP=stratum piramidale, SR= stratum radiatum. Las capas CA1 y CA3 también son mostradas.

2.2 Las proteínas Rho y la mitocondria

Existen varias evidencias que indican la presencia de las proteínas Rho a nivel mitocondrial. Por inmunocitoquímica se determinó la presencia de RhoB en las mitocondrias de espermatozoides de erizo de mar (Castellano y col., 1997), y mediante ensayos de Western blot, Boivin y Beliveau (2001) localizaron a la proteína Rac1 de forma predominante en las mitocondrias de las células de la corteza de riñón de rata, mientras que Phillips y Thomson (2001) determinaron la presencia de Ran en la fracción mitocondrial de placenta humana. Por otro lado, la proteína Rac1 fue localizada en las mitocondrias de células β del páncreas de rata (Kowluru y col., 2003). Además, Fransson y col. (2003) al realizar un análisis inmunocitoquímico determinaron la presencia de las proteínas Miro-1 y Miro-2, una nueva familia de proteínas Rho con características atípicas como, en las mitocondrias de fibroblastos.

Es probable que las proteínas Rho participen en la regulación de la homeostasis mitocondrial a través de Bcl-2, familia de proteínas que regulan

procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular (Fiorentini y col., 1998). En hipocampo de murino la apoptosis se asocia con un aumento rápido de RhoB (Trapp y col., 2001).

2.3 Relación entre las proteínas Rho y los niveles de ATP

Diversos trabajos han mostrado que existe una relación entre las proteínas Rho y el ATP, tal es el caso de Ledoux y col. (2002) quienes demuestran que las células del músculo liso de la arteria pulmonar de rata expuestas a hipoxia, aumentan significativamente la actividad de la Rho cinasa (ROCK), la cual es una molécula efectora de Rho (Wang y col., 2001), aunado con la reducción del ATP durante la isquemia que ocasiona la inactivación de las proteínas Rho. Se ha demostrado también que la sobreexpresión de la proteína RhoA regula el mecanismo de liberación del ATP en las células renales bajo condiciones de hipoxia (Turcotte y col., 2003). Los experimentos realizados por Blum y col. (2008) determinaron que la familia de GTPasas Rho modulan la liberación del ATP dependiente del Ca^{2+} en astrocitos. Además, se demostró que las rutas de señalización de PI3K y Rho/ROCK están involucradas en la liberación de ATP inducida por hipoxia en las células endoteliales de arterias pulmonares (Woodward y col., 2009). Finalmente, los resultados obtenidos por Tanaka y col. (2010) mostraron que al incubar las miofibrillas del músculo de rata con la exoenzima C3 (inhibidor específico de las proteínas Rho) disminuye los niveles de ATP.

3.- Justificación

Debido a la poca información que existe sobre la distribución de las proteínas Rho y Rac en el cerebro de rata y a la ausencia de antecedentes de la presencia, localización y función de estas proteínas a nivel mitocondrial, es importante investigar la distribución de las proteínas Rho a nivel cerebral y mitocondrial, así como su posible relación con la síntesis de ATP.

4.- Hipótesis

Las proteínas G Rho y Rac están presentes en las diferentes regiones del cerebro, así como en las mitocondrias de cerebro de rata e influyen en la síntesis de ATP.

5.-Objetivo general

Investigar la distribución de las proteínas Rho y Rac a nivel cerebral, su presencia en las mitocondrias de cerebro de rata y su relación con la síntesis de ATP.

6.-Objetivos específicos

- 1.- Determinar la localización de las proteínas Rho y Rac en las diferentes regiones del cerebro de rata.
- 2.- Investigar la presencia y localización de las proteínas Rho y Rac en las mitocondrias del cerebro de rata.
- 3.- Determinar la influencia de las proteínas Rho y Rac sobre la síntesis de ATP.

7.-Materiales y Métodos

7.1 Material biológico

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar en edad adulta (3 meses) con un peso de 300-350 gramos.

7.2 Análisis Inmunohistoquímico.

7.2.1 Obtención de la muestra.

Ratas de la cepa Wistar fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (Pfizer, 1 mg/Kg de peso) y perfundidas transcárdialmente con buffer de fosfatos (PBS) 0.1 M (Na_2HPO_4 0.2 M, NaH_2PO_4 0.2 M, NaCl 1.5 M), pH 7.4 seguida de paraformaldehído (4% en PBS 0.1 M). El cerebro de cada animal fue extraído y post fijado en la misma solución durante 24 h. Posteriormente fueron mantenidos en sacarosa (30% en PBS) durante 72 h y después de congelado se hicieron cortes parasagittales cada 30 μm usando un criostato marca Zeiss serie HYRAX C25. Los cortes fueron colectados serialmente en cajas de cultivo de 12 pozos, de tal manera que cada pozo contenía 6 cortes; cada corte es representativo de la estructura del cerebro cada 360 μm . Finalmente, los cortes fueron almacenados en una solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% PBS) a -20°C hasta su uso.

7.2.2 Tinción con violeta de cresilo.

Antes de comenzar con el procedimiento inmunohistoquímico, todos los cortes pertenecientes a un pozo de la caja de cultivo fueron teñidos con violeta

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

de cresilo (0.1% violeta de cresilo, 600 µl ácido acético glacial, 100 ml de agua desionizada) durante 10 min y posteriormente lavados, deshidratados en series de etanol (95, 75, 50, 40%) y aclarados en xileno (5 min) antes de ser montados en "cytoseal 60" para su posterior observación en microscopio óptico en campo claro. En los cortes ya teñidos se identificaron las diferentes estructuras con la ayuda del atlas de Paxinos (2007).

7.2.3 Inmunohistoquímica.

Todos los cortes de un pozo (6 cortes, cada uno a 360 µm de distancia del siguiente) fueron lavados (3 veces) con 400 µl de PBS, permeabilizados con PBT (Tritón X-100 al 0.3% en PBS) e incubados en H₂O₂ al 3% en PBS, durante 10 min. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con PBT e incubadas en buffer de citratos como desenmascarador de antígenos por 90 min a 60°C. A continuación se incubó con la misma solución 15 min a temperatura ambiente. Después de este periodo, los cortes fueron lavados nuevamente con PBS e incubados en suero de bloqueo (5% suero de caballo en PBT) durante 60 min, después de lo cual fueron incubados con el anticuerpo primario (RhoA 1:100, RhoB 1:150, Rac1 1:1000) diluido en suero de bloqueo, durante 16 h a 4 °C.

Al día siguiente los cortes fueron incubados con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a biotina durante 2 h a temperatura ambiente. Después fueron lavados con PBT e incubados en el complejo amplificador de avidina-biotina (VECTASTAIN Elite ABC Kit) durante 90 min. Nuevamente

fueron lavados con PBT y revelados con DAB (3,3-diaminobenzidina tetraclorhidrato) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente las muestras fueron lavadas con PBS, deshidratadas en series de etanol (95, 75, 50, 40%) y aclaradas con xileno.

7.3 Aislamiento de las mitocondrias de cerebro de rata.

Las mitocondrias de cerebro fueron aisladas mediante centrifugación diferencial de acuerdo al método descrito por Sims (1990). Se sacrificaron las ratas por decapitación y el cerebro fue extraído en un lapso no mayor a un minuto. En el momento de la escisión, el cerebelo fue removido. El tejido fue cortado, lavado y homogenizado en medio de aislamiento (sacarosa 70 mM, manitol 210 mM, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 1mM, albúmina 0.5%, ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico (MOPS) 1mM, pH=7.4) usando un homogenizador manual. El homogenizado fue centrifugado a 400 xg por 10 min. El sobrenadante fue decantado y centrifugado a 8,398 xg por 10 min. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se resuspendió en Percoll al 15%. Posteriormente se depositó sobre la superficie de un gradiente previamente preparado con Percoll al 40% y 23% y se centrifugó a 32,600 xg por 15 min. Se obtuvieron 3 bandas y la fracción tres se extrajo y se diluyó 1:4 con medio de aislamiento. Se centrifugó a 16,135 xg por 10 min. El sobrenadante se desechó y el residuo se resuspendió suavemente con medio de aislamiento. Se adicionaron 500 µl de albúmina de suero bovina (10 mg/ml) y 3 ml de medio de

aislamiento. Finalmente, se centrifugó a 6350 xg durante 10 min. Las mitocondrias se resuspendieron finalmente con 1 ml de medio de aislamiento.

7.4 Subfraccionamiento mitocondrial.

El subfraccionamiento mitocondrial se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Holger y col. (2007). La pastilla mitocondrial (5-10 mg) fue resuspendida en medio de lavado (Manitol 300 mM, TES-KOH 10 mM, pH 7.2), adicionando KCl 2M a una concentración final de KCl 200 mM, y posteriormente, se centrifugó a 20 000 xg por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue removido y descartado. La pastilla se resuspendió en buffer de baja osmolaridad (sacarosa 50 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM, MOPS 10 mM, pH 6.5) y se mantuvo en agitación constante por 15 minutos. Posteriormente, se adicionó 1 ml de sacarosa 2 M y se centrifugó a 20,000 xg por 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, el cual contiene las vesículas de la membrana externa mitocondrial y algunas proteínas del espacio intermembranal. La pastilla (mitoplastos) se resuspendió en 2 ml de KCl 250 mM y se centrifugó a 15,587 rpm 20,000 xg por 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se descartó y la pastilla (mitoplastos) se resuspendió en agua bidestilada. Posteriormente, los mitoplastos se homogenizaron con un homogenizador Dounce por 5 min para ayudar a romper los mitoplastos. El homogenado fue centrifugado a 20,000 xg por 15 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante, el cual contenía la matriz mitocondrial, mientras que la pastilla correspondió a la membrana interna mitocondrial.

7.5 Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó en las muestras del homogenado total y de la fracción mitocondrial de cerebro de rata de acuerdo al método de Lowry y col. (1951). Se agregaron 10 µl de muestra a 190 µl de agua desionizada y después se adicionó 1ml de solución C, la cual consta de la solución A (Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0.4% y $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (tartrato de sodio) al 0.21%) y la solución B (CuSO_4 al 0.5%); se agitó dejando reposar por 10 min. Finalmente, se le añadió 0.1 ml de solución de Folin (1:1), se dejó reposar por 30 minutos, y se leyó la muestra a una absorbancia de 660 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18, usando un blanco para calibrar el aparato. A partir de los datos obtenidos de las lecturas se determinó la concentración de proteína de la muestra empleando una curva de calibración con albúmina de suero bovina (12.5, 25, 50, 75 y 100 µg).

7.6 Inmunodetección de las proteínas Rho.

La inmunodetección se realizó de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970) y Towbin y col. (1979). Se tomaron 30 µg de proteína del homogenado total y de la fracción mitocondrial de cerebro de rata y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE al 13%) a 100 v durante 2 h. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polivinildieno dicloruro) a 100 v por 1 h. Después, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-tween por 5 min. Las membranas ya lavadas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

tubulina, anti-actina, anti-calnexina, anti-citocromo c, anti-citocromo c oxidasa, anti-SOD2, anti-MAO, anti-RhoA, anti-RhoB, anti-RhoG (Santa Cruz) y anti-Rac1 (Millipore) y anti-LAMP2 a una dilución de 1:2000 en 10 ml de TBS-tween leche al 5% por 24 h a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-tween y fueron incubadas con su correspondiente anticuerpo secundario IgG acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:3,000 por 2 h a temperatura ambiente. Después, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-tween por 5 minutos. Finalmente, el revelado se realizó incubando la membrana, utilizando el sustrato fluorescente luminol (Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En un casete de radiografía, se sobrepuso la membrana de PVDF. Posteriormente, se expuso a una placa fotográfica para captar la luz emitida por la reacción y el tiempo de exposición dependió de la intensidad de la banda, posteriormente la placa fotográfica se reveló para su análisis.

7.7 Determinación del consumo de oxígeno.

El consumo de oxígeno se midió polarográficamente empleando un electrodo tipo Clark que se encuentra conectado a un graficador. La cámara del electrodo se lavó una vez con etanol al 70%, seguido de tres lavados con agua desionizada. Las mitocondrias (3 mg/ml) fueron adicionadas a la cámara, la cual previamente contenía el medio de respiración (KCl 100 mM, manitol 75 mM, sacarosa 25 mM, EDTA 0.05 mM, pH 7.4). La cámara se dejó equilibrar en agitación constante para permitir la saturación de aire del medio de respiración.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

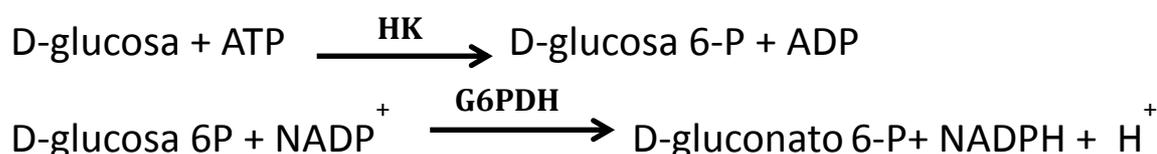
De esta forma la respiración se mide en ausencia de sustratos exógenos. Posteriormente, el estado 4 es medido por la adición de glutamato (10 mM) y malato (2 mM). Una vez transcurridos 3 min, se adicionó ADP (0.2 mM) para estimular al máximo la respiración (estado de respiración 3). A partir de los valores obtenidos en los estados de respiración 4 y 3 se calculó el cociente respiratorio (CR), el cual representa la cantidad de oxígeno que respiran las Mitocondrias en una determinada velocidad.

El CR fue determinado mediante la siguiente relación:

$$CR = \frac{\text{consumo de oxígeno en el estado 3}}{\text{consumo de oxígeno en el estado 4}}$$

7.8 Determinación de los niveles de ATP

La determinación de los niveles de ATP se realizó indirectamente mediante un sistema enzimático acoplado que consiste en cuantificar la reducción del NADP⁺ espectrofotométricamente a una λ de 340 nm (Cairns y col., 1998). En las reacciones siguientes se muestra el fundamento de la técnica:



Donde:

HK= hexocinasa

G6PDH= Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

Las mitocondrias se incubaron en medio de aislamiento adicionado con $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.664 mM, glucosa 50 mM, G6P-DH 0.476 U/ml, hexocinasa 1.8 U/ml, AMP 1.2 mM. Transcurridos 3 min se les agregó el NADP^+ (0.336 mM). Posteriormente, se dejó transcurrir la cinética 2 min. Después se adicionó el ADP (0.4 mM) para estimular la síntesis de ATP. La producción de ATP en la mitocondrias aisladas fue medida en ausencia y en presencia de los inhibidores específicos para las proteínas Rho (exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*) y Rac1 (compuesto NSC23766). Las mitocondrias fueron incubadas previamente (1h a 4°C) con la exoenzima C3 utilizando las concentraciones de 0.05, 0.10, 0.25, 0.5 ng/ μl de C3 de acuerdo a lo reportado por Meyer y col. (2007). Para el caso del compuesto NSC23766 las concentraciones de 4.70, 5.88, 11.77 y 23.5 mM se eligieron en base a lo reportado por Gao y colaboradores (2003).

8.- Resultados.

8.1 Identificación de las diferentes zonas del cerebro de rata.

Con el objetivo de identificar cada una de las estructuras del cerebro según sus características morfológicas se utilizó la tinción con violeta de cresilo, la cual proporciona un panorama general de la distribución, tamaño, grado de compactación y morfología de las neuronas. El violeta de cresilo (fig. 3) es un colorante básico que se une a los grupos fosfato presentes en el ADN y ARN. La identificación de las estructuras se realizó con ayuda del atlas de Paxinos (2007) el cual es un atlas esterotáxico que proporciona ejes de coordenadas para que las estructuras puedan ser identificadas con precisión. La figura 4 muestra los cortes parasagittales representativos de cada 360 μm , donde se pueden observar zonas de color azul que corresponden a las agrupaciones de los somas de las neuronas cuyos patrones de distribución permiten identificar estructuras como: el hipocampo (H), la corteza (CX), el tálamo (Ta), el hipotálamo (Ht), el tronco encefálico (TE), el cerebelo (CE) y el bulbo olfatorio (BO). En los cortes se pudo apreciar cómo las estructuras cambian de forma y tamaño: como ejemplo podemos mencionar el hipocampo, estructura que en los cortes más mediales (5A, 5B y 5C) se observa de tamaño pequeño, mientras que en los cortes más laterales (5D y 5E) se aprecia esta estructura con un mayor tamaño, hasta que se observa una estructura espejular (5F). En estos cortes también se puede apreciar cómo algunas estructuras van adquiriendo una morfología característica que las distingue, por ejemplo, el cuerpo estriado

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

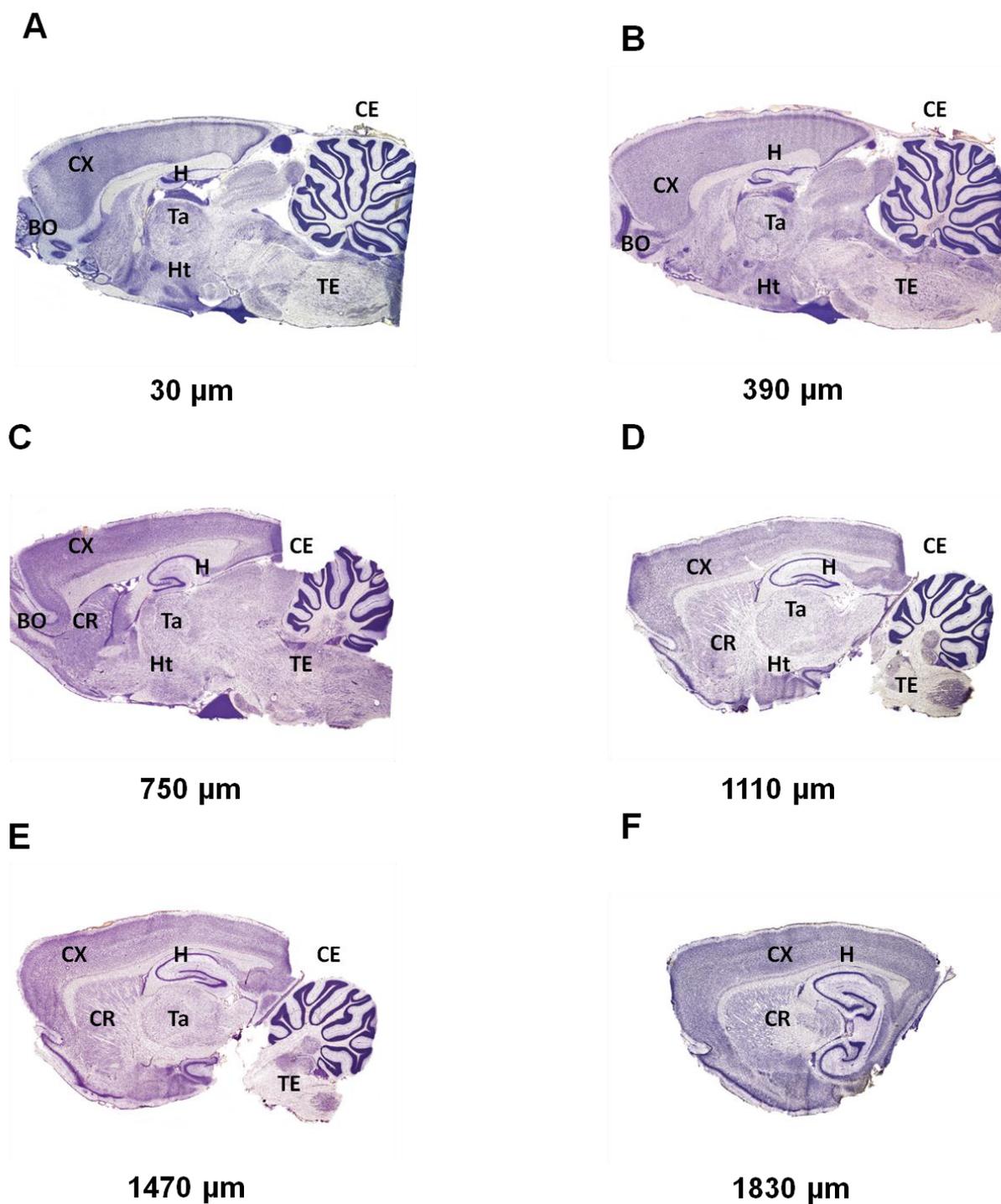


Figura 5. Identificación de las principales estructuras del cerebro de rata. Cortes parasagitales de 30 μm de espesor obtenidos cada 360 μm , teñidos con violeta de cresilo. (CX corteza cerebral, CR cuerpo estriado, H hipocampo, Ta Tálamo, Ht hipotálamo, TE tronco encefálico y CE cerebelo), n=3.

(5C, 5D, 5E y 5F). Además es posible observar estructuras como el tronco encefálico y el bulbo olfatorio, las cuales están presentes en los cortes mediales (5A, 5B y 5C) hasta que en los cortes más laterales desaparecen totalmente (5F). Por su parte la corteza cerebral es una estructura que se pudo apreciar en todos los cortes (fig 5), mientras que las estructuras correspondientes al diencefalo (tálamo e hipotálamo) muestran una estructura y tamaño similar (5A, 5B, 5C y 5D). En conjunto, esta información proporcionó la base para ubicar correctamente y de una forma precisa las diferentes estructuras de las regiones del cerebro.

8.2 Distribución de las proteínas Rac1, RhoA y RhoB en el hipocampo y cerebelo de rata.

Las estructuras más estudiadas a nivel del encéfalo son el hipocampo y el cerebelo, en las cuales ya se ha reportado la presencia de las proteínas Rho por O'Kane y col. (2003), por lo que se retomó su trabajo con el objetivo de verificar los patrones de distribución de estas proteínas mediante inmunohistoquímica.

La tinción específica de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 en hipocampo se muestra en la figura 6, mientras que en la figura 7 se observa la distribución de estas proteínas en el cerebelo de rata, encontrando que la expresión de las tres proteínas es diferencial en ambas estructuras. En el hipocampo, RhoA, RhoB y Rac1 se ubicaron en el giro dentado así como en las tres capas de células que forman parte de esta estructura (CA1, CA2 y CA3) (Fig. 6A, 6B y 6C). En el caso de la proteína RhoA se observa una tinción difusa a nivel de

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

somas neuronales (6A'), mientras que RhoB, presentó una marca de forma punteada en los somas de las neuronas presentes en esta estructura (6B'); la proteína Rac1 mostró una tinción específica intensa en todas las células neuronales que forman parte del hipocampo (6C).

A nivel de cerebelo, la proteína RhoA presentó una marca intensa en la capa correspondiente a las células de Purkinje (7A). Al hacer un acercamiento, se puede ver claramente que la marca corresponde al cuerpo celular de estas células (7A'). La proteína RhoB, de igual forma que en el caso de RhoA, la marca se presentó en la capa de las células de Purkinje (7B), pero al igual que en el hipocampo la marca fue de forma punteada (7B'). En el caso de la proteína Rac1 se observó su presencia en las tres capas pertenecientes a la corteza cerebelar (molecular, de células de Purkinje y granular) (7C). La marca de esta proteína fue intensa, ubicándose a nivel de somas neuronales (7C'). Los resultados mostrados anteriormente concuerdan con lo reportado por O'Kane y col. (2003), lo cual valida que la técnica de inmunohistoquímica utilizada es adecuada.

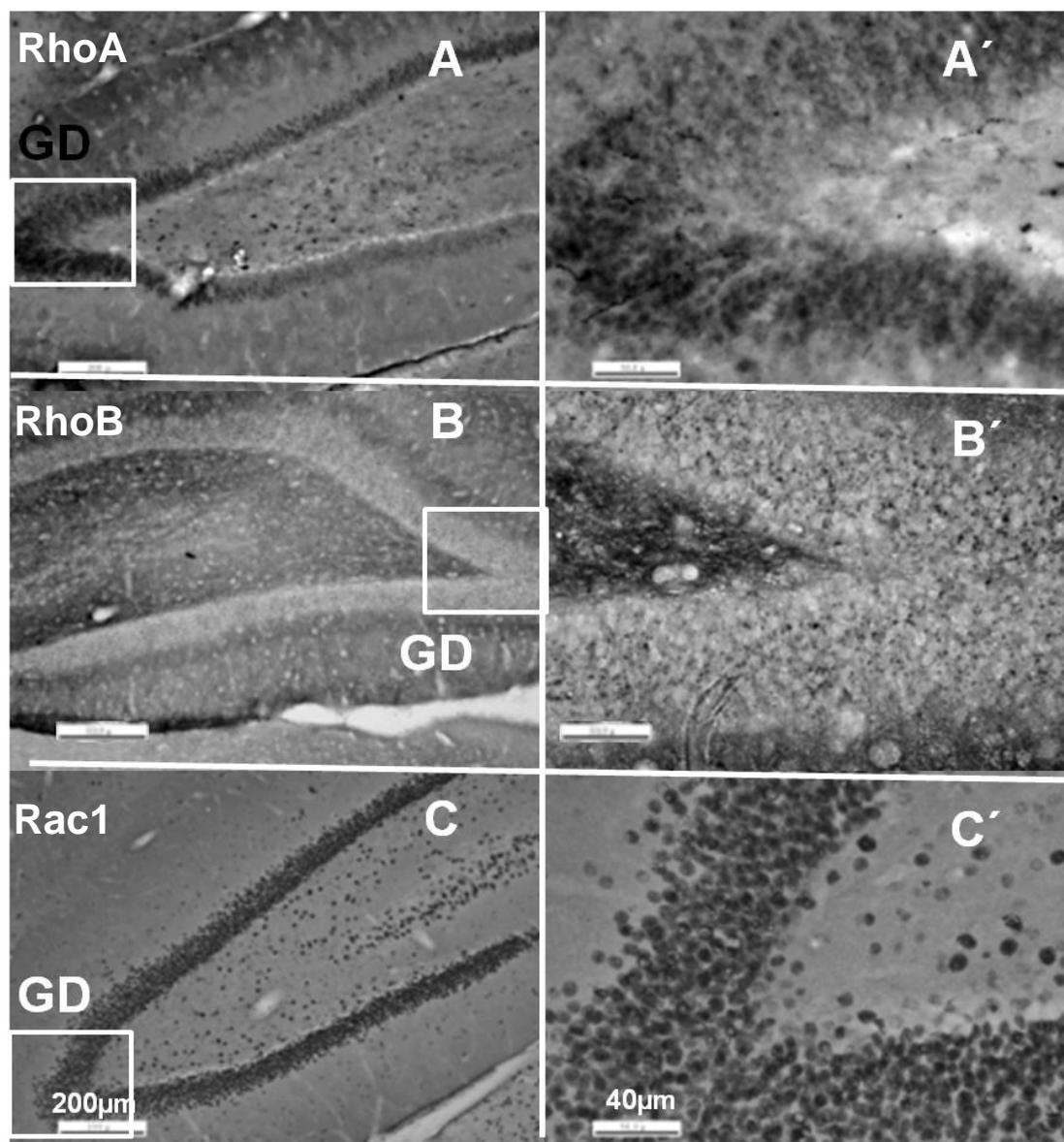


Figura 6. Distribución de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 en el hipocampo de rata. La tinción específica de RhoA (A), RhoB (B) y Rac1 (C) se observa en todo el hipocampo. A', B' y C' son acercamientos empleando el objetivo de 40X en el área correspondiente al giro dentado (GD) donde se aprecian las diferencias en el patrón de expresión de estas proteínas, n=3.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

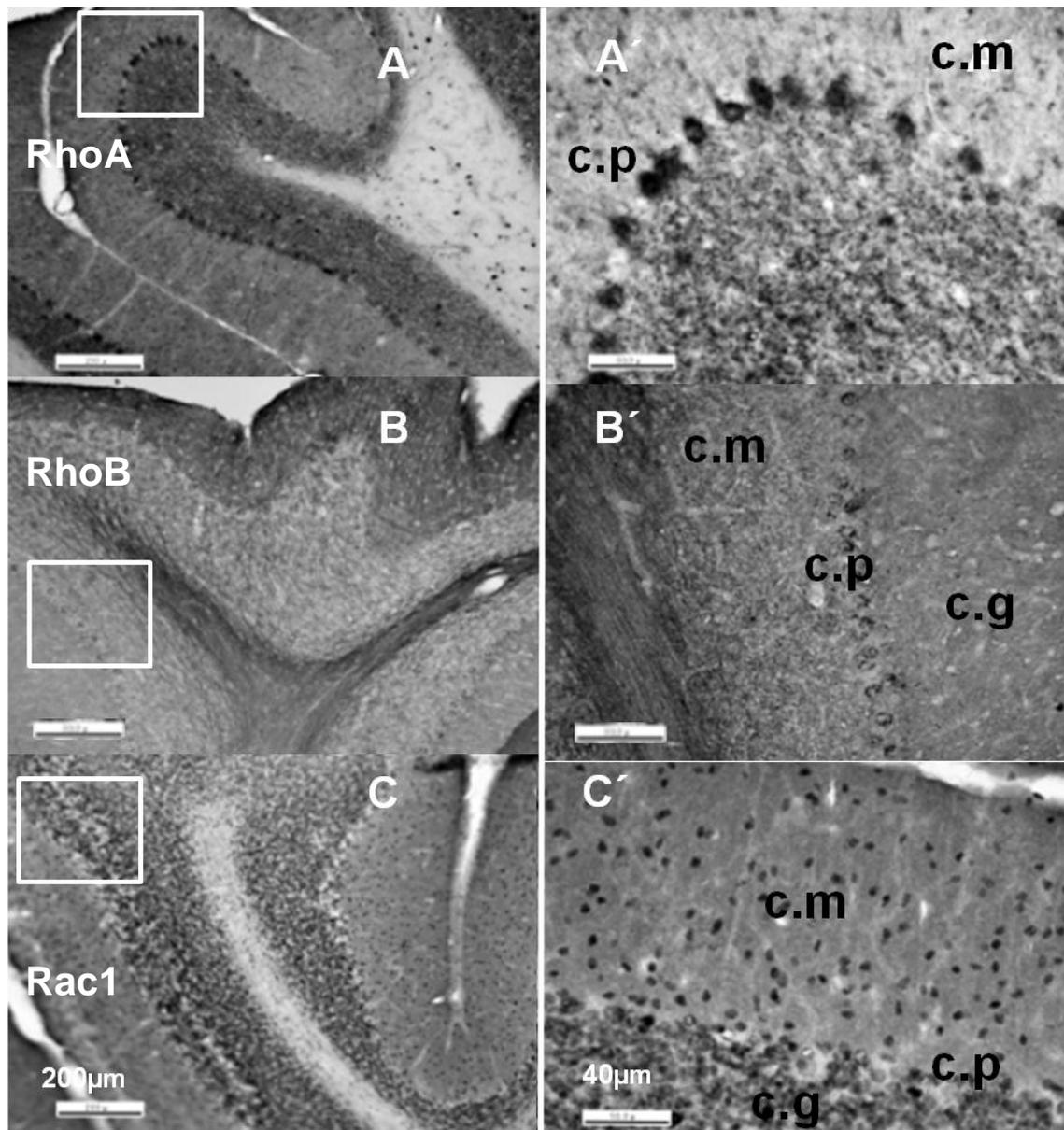


Figura 7. Distribución de RhoA, RhoB y Rac1 en el cerebelo de rata. Tinción específica de la proteína RhoA (A), RhoB (B) y Rac1 en el cerebelo de rata adulta. A, B' y C' muestran imágenes con mayor aumento (40X), donde se pueden apreciar las grandes diferencias en la expresión de estas Rho GTPasas (p.c células de Purkinje, c.m capa molecular, c.g, capa granular, n=3).

8.3 Distribución de la proteína RhoA en el cerebro de rata

La proteína RhoA está presente en el telencéfalo y a diferencia de la proteína Rac1, RhoA se localiza a nivel de somas y dendritas. En la figura 8 se puede observar la presencia de la proteína RhoA en la corteza parietal (A), corteza frontal (B), cuerpo estriado (C), corteza occipital (D) y corteza piriforme (E). Como se puede apreciar, la tinción a nivel de los somas se aprecia de forma difusa, mientras que en el caso de las dendritas la marca se observa de forma punteada. Este patrón de tinción sugiere que la marca está compartimentalizada en algún orgánulo o vesícula.

En el caso del tálamo (fig. 8F), estructura localizada en la región del diencéfalo, se encontraron de nueva cuenta dendritas y somas marcados de forma punteada, mismo patrón que el descrito para las áreas del telencéfalo.

A nivel del hipotálamo, se encontró un grupo de células correspondiente a la región perifornical que mostraron una tinción más intensa (fig. 8G); además, en una región continua denominada región tuberal (fig. 8H), se observó también la tinción de una gran cantidad de dendritas que se encuentran atravesando todo el hipotálamo.

En el mesencéfalo, el colículo superior (fig. 9A) mostró sólo la presencia de RhoA en dendritas. Un grupo de células pertenecientes a la formación reticular mesencefálica presentaron una marca muy intensa en el cuerpo celular de la neurona, sugiriendo que esta intensidad en la marca corresponde a un mayor nivel de expresión de la proteína RhoA en estas células (fig. 9B).

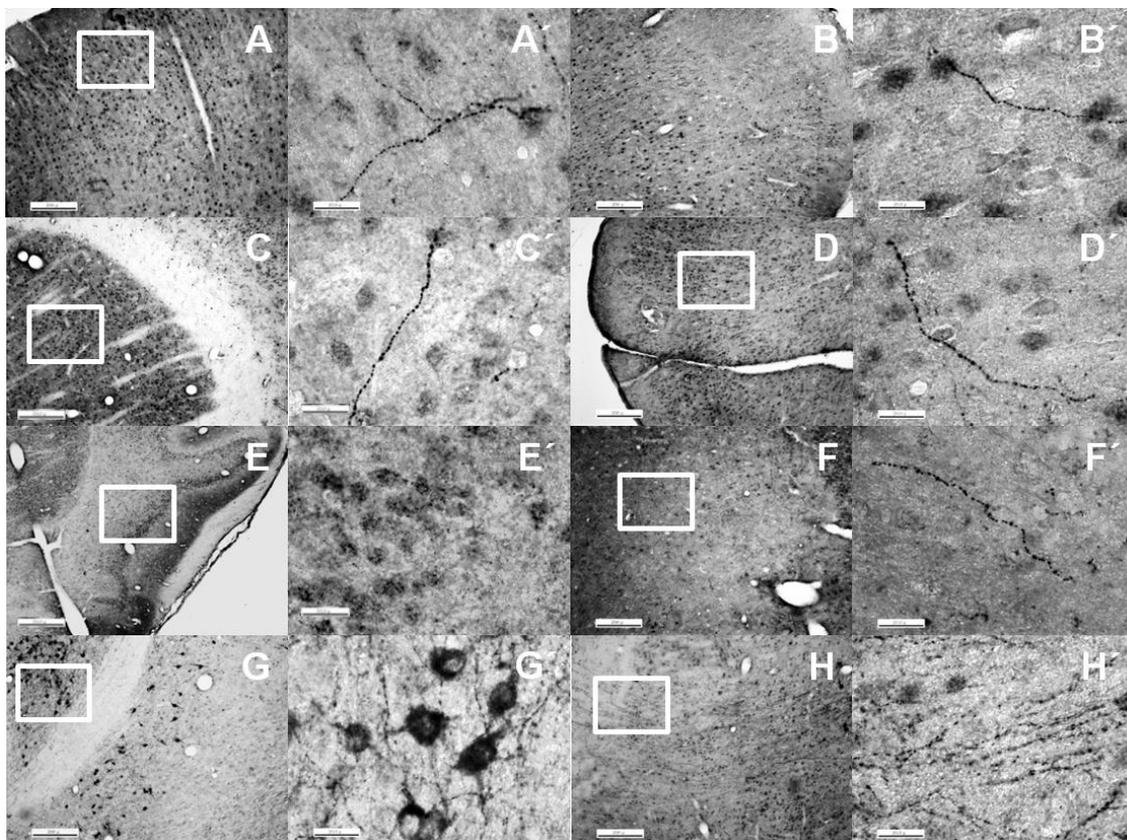


Figura 8. Distribución de la proteína RhoA en cerebro de rata. Cortes parasagiales de 30 μm de espesor se analizaron por medio de inmunohistoquímica. El anticuerpo específico para la proteína RhoA (1:100) fue utilizado. Se muestra la corteza parietal (A,A'), corteza frontal (B,B'), cuerpo estriado (C,C'), corteza occipital (D,D'), corteza piriformel (E, E'), tálamo (F, F'), región perifornical del hipotálamo (G, G'), región tuberal (H,H'). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 10 X (A-H) y 100 X (A'-H'). Las barras representan 200 μm (A-H) y 20 μm (A'-H'), n=3.

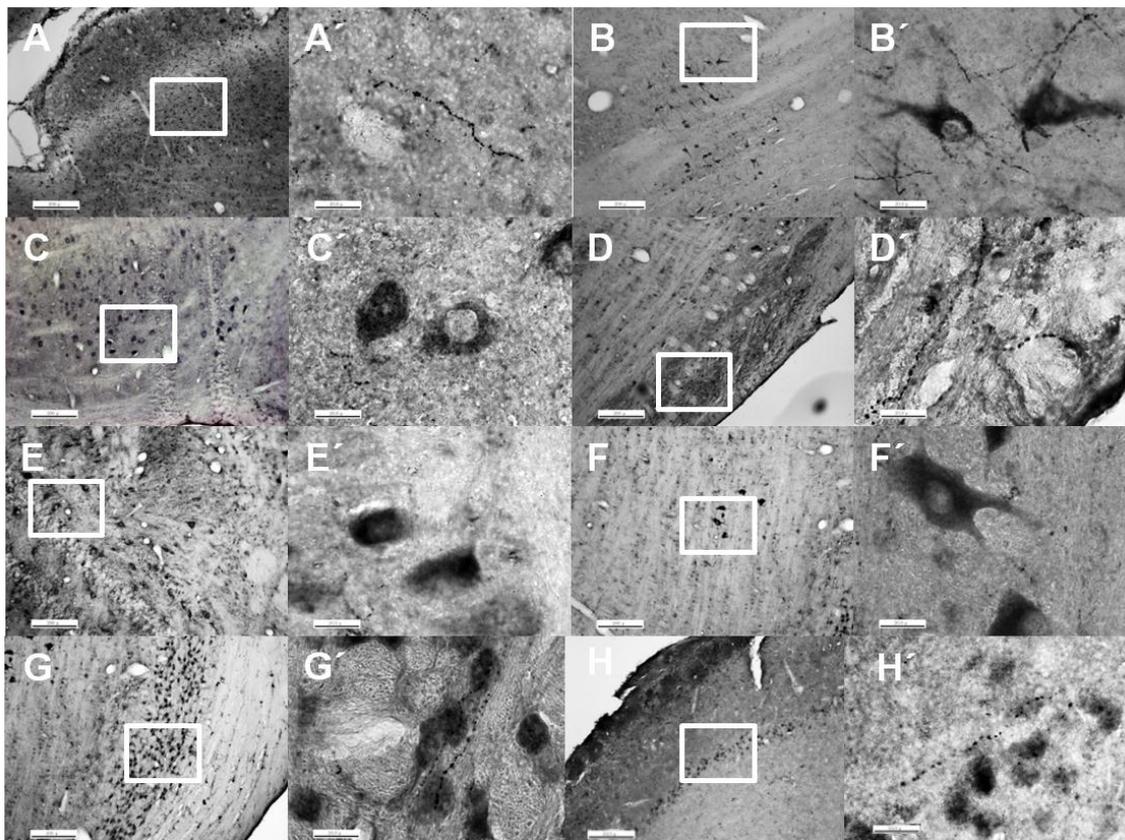


Figura 9 Distribución de la proteína RhoA en cerebro de rata. Cortes parasagitales de 30 μm de espesor se analizaron por inmunohistoquímica empleando el anticuerpo específico para la proteína RhoA (1:100). Se muestra la colículo superior (A,A'), formación reticular mesencefálica (B,B'), núcleo facial (C,C'), núcleo pontino (D,D'), núcleo medial vestibular (E, E'), núcleo paragigantocelular (F, F'), núcleo paraolivari (G, G'), bulbo olfatorio (H,H'). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 10 X (A-H) y 100 X (A'-H'). Las barras representan 200 μm (A-H) y 20 μm (A'-H'), n=3.

Respecto a la localización de la proteína RhoA en el romboencéfalo y en el bulbo olfatorio, se encontró que 4 núcleos pertenecientes al tronco encefálico, tales como el núcleo facial (fig. 9C), núcleo medial vestibular (fig. 9E), núcleo paragigantocelular (fig. 9F) y el núcleo superior paraolivari (fig. 9G), presentaron células de gran tamaño marcadas de forma muy intensa a nivel de su cuerpo celular se observó que la marca es claramente a nivel de soma. Al

observar con el objetivo de 100x se aprecia cómo el núcleo de las células de la región del núcleo paraolivari y el núcleo facial no son teñidos, indicando claramente que la marca es a nivel de citoplasma. También se pudo observar cómo el patrón de marcaje de los somas y las dendritas se mantiene en el núcleo paraolivari (fig. 9G). En el caso del núcleo pontino (fig. 9D), estructura perteneciente al tronco encefálico, se observó que las dendritas presentan un consistente patrón punteado. En el caso del bulbo olfatorio (fig. 9H), RhoA se localizó en los somas, los cuales se marcan de forma difusa, mientras que las dendritas son marcadas de forma punteada.

Con estos resultados podemos concluir que la proteína RhoA está presente en todas las regiones del cerebro (telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo y romboencéfalo) a nivel de somas y dendritas, siendo la marca difusa en el caso de los somas neuronales y punteada en las dendritas, sugiriendo la posible localización de esta proteína en vesículas u orgánulos celulares. Núcleos neuronales de estructuras como el hipotálamo, colículo inferior y tronco encefálico mostraron grupos de células con una mayor expresión de esta proteína.

8.4 Distribución de la proteína RhoB en el cerebro de rata

La expresión de la proteína RhoB se observó de forma más restringida en el cerebro de rata (fig. 10). El patrón de tinción encontrado para la proteína RhoB fue muy diferente al observado para la proteína RhoA. La marca de la proteína RhoB se observa de forma punteada en la periferia de las células

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

neuronales, sugiriendo que la marca de esta proteína podría coincidir con algún orgánulo o vesícula (fig. 10). RhoB se localizó a nivel del telencéfalo en toda la corteza cerebral (corteza parietal (fig. 10A), frontal (fig. 10B), occipital (fig. 10C) y retroplenial (fig. 10E)). Cabe señalar que, a diferencia de RhoA y Rac1, la marca de RhoB sólo se observó en la capa V de la corteza cerebral, la cual corresponde a la capa de células piramidales. En el caso del cuerpo estriado (fig. 10D), RhoB fue localizada en la red de fibras que se encuentra rodeando la materia blanca.

En el caso del romboencéfalo, RhoB se localizó sólo en tres núcleos neuronales pertenecientes al tronco encefálico (núcleo medial vestibular (fig. 10F), núcleo lateral paragigantocelular (fig. 10G) y núcleo pontino (fig. 10H), mostrando un patrón de tinción igual al observado en las células de la corteza, aunque en algunas células la marca se observó polarizada hacia un extremo de la célula (fig. 10G). Con lo descrito anteriormente se concluye que la proteína RhoB sólo se localizó en el telencéfalo y en los núcleos del tronco encefálico.

El patrón de expresión de la proteína RhoB sugiere que se localiza a nivel de membrana plasmática aunque la marca punteada que presentan las células neuronales hace suponer que su localización pudiera ser también a nivel de vesículas y/o orgánulos celulares.

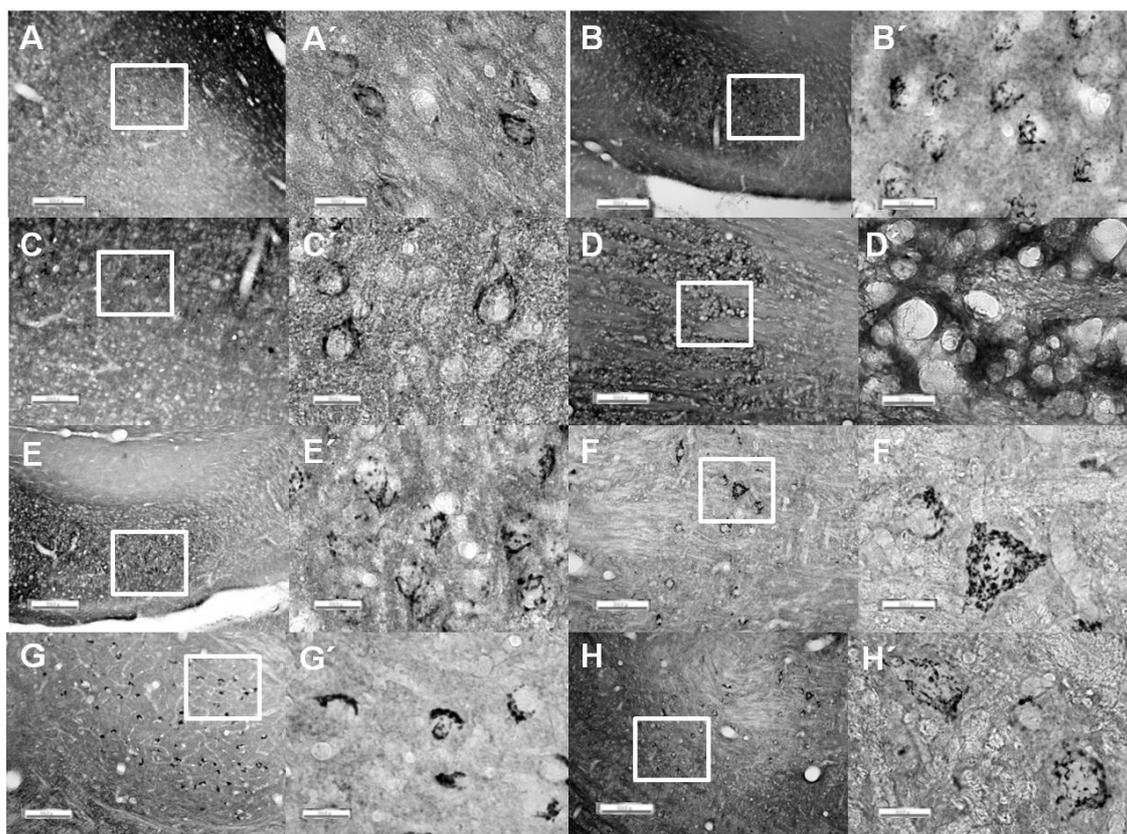


Figura 10. Distribución de la proteína RhoB en cerebro de rata. Cortes parasagitales de 30 μm de espesor se analizaron por medio de inmunohistoquímica empleando el anticuerpo específico para la proteína RhoB (1:100). Se muestra la corteza parietal (A,A'), corteza occipital (B,B'), corteza frontal (C,C'), cuerpo estriado (D,D'), corteza retrosplenial (E, E'), núcleo medial vestibular (F, F'), núcleo lateral paragigantocelular (G, G'), núcleo pontino (H,H'). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 10 X (A-H) y 100 X (A'-H'). Las barras representan 200 μm (A-H) y 20 μm (A'-H'), n=3.

8.5 Distribución de la proteína Rac1 en el cerebro de rata

La proteína Rac1 se localizó en las 6 capas pertenecientes a la corteza cerebral (I. capa molecular, II. capa granular externa, III. capa piramidal externa IV. capa granular interna, V. capa piramidal interna y VI. capa multiforme). Rac1 mostró un patrón de tinción intenso a nivel de cuerpos esféricos correspondientes a los somas neuronales, presentes en el tejido.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

La tinción se observó intensa y homogénea, a través de todo el tejido (fig. 11). La presencia de esta proteína fue localizada en las áreas parietal (fig. 11A), occipital (fig. 11B), frontal (fig. 11C) y retrosplenial pertenecientes a la corteza cerebral. El tálamo (fig. 11D) e hipotálamo (fig. 11E), estructuras correspondientes al diencefalo, mostraron patrones similares de tinción a los anteriores en los somas marcados de la misma forma. A nivel de cerebro medio, esta proteína fue localizada en los colículos superior (fig. 11F) e inferior (fig. 11G). Para la zona correspondiente al romboencéfalo, Rac1, se encontró distribuida en el soma de todas las células que corresponden a los núcleos neuronales presentes en el tallo encefálico. En el caso del bulbo olfatorio los somas de las células mitrales que se encuentran rodeando los glomérulos olfatorios, mostraron también el mismo patrón que en las estructuras anteriores (fig. 11H).

Con estos resultados podemos concluir que la proteína Rac1 se distribuye de forma ubicua en el cerebro de la rata adulta, ya que se encuentra presente en todas las regiones del telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo y romboencéfalo, siendo una marca uniforme e intensa a nivel de todas las células neuronales del cerebro. La marca de la proteína Rac1 estuvo presente únicamente a nivel del cuerpo celular (soma) de las neuronas.

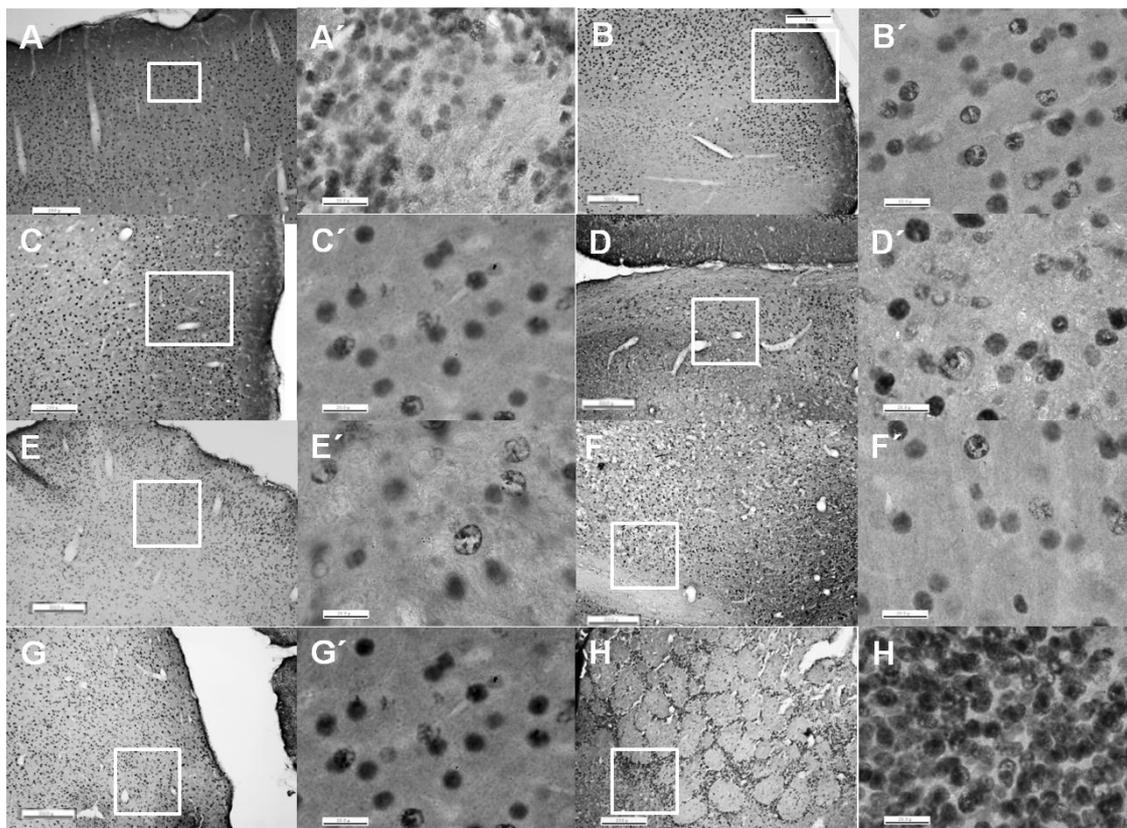


Figura 11. Distribución de la proteína Rac1 en el cerebro de rata. Se analizaron cortes parasagittales de 30 μm de espesor por inmunohistoquímica empleando el anticuerpo específico para la proteína Rac1 (1:1000). Se muestra la tinción específica en la corteza parietal (A,A'), corteza occipital (B,B'), corteza frontal (C,C'), tálamo (D,D'), hipotálamo (E, E'), colículo superior (F,F'), colículo inferior (G, G') y bulbo olfatorio (H, H'). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo de 10 X (A-H) y 100x (A'-H'). Las barras representan 200 μm (A-H) y 20 μm (A'-H'), n=3.

8.6 Determinación de la pureza de las mitocondrias de cerebro de rata.

Debido a que las proteínas Rho se localizan en la membrana plasmática y en el citosol de las células, se consideró investigar el grado de pureza de las mitocondrias aisladas, mediante la técnica de Western blot. Se utilizaron dos marcadores mitocondriales: citocromo c oxidasa y citocromo c, con esto se verificó que las fracciones obtenidas correspondieran a las mitocondrias y que el grado de enriquecimiento de éstas fuera el adecuado. Con el fin de determinar la posible contaminación de las mitocondrias con otros orgánulos se

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

usaron como control los anticuerpos anti-LAMP2 (marcador específico de lisosomas) y anti-calnexina (marcador específico de retículo endoplásmico). Adicionalmente, se analizó el grado de contaminación debida a componentes citosólicos, utilizando dos marcadores específicos para proteínas constitutivas del citosol, como son la actina y la tubulina.

Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la figura 12, en la cual se pueden observar bandas de 57 y 12 kDa correspondientes a las proteínas citocromo *c* oxidasa y al citocromo *c*; respectivamente, apreciándose una mayor intensidad en la fracción mitocondrial en comparación con los homogenados totales (12A y 12B). Estos datos indican que se obtuvieron fracciones mitocondriales enriquecidas. Para el caso de las proteínas calnexina y LAMP2, únicamente fueron detectadas en el homogenado total (12C y 12D), indicando que las mitocondrias aisladas no presentan contaminación significativa por lisosomas y retículo endoplásmico. En el homogenado total se detectó la presencia de bandas correspondientes a actina (43 kDa) y tubulina (56 kDa) (12E y 12F); dichas bandas no se detectaron en la fracción mitocondrial indicando que las mitocondrias obtenidas están libres de contaminantes citosólicos. En conjunto, estos resultados indican que las fracciones mitocondriales obtenidas presentan un alto grado de enriquecimiento y un alto grado de pureza.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

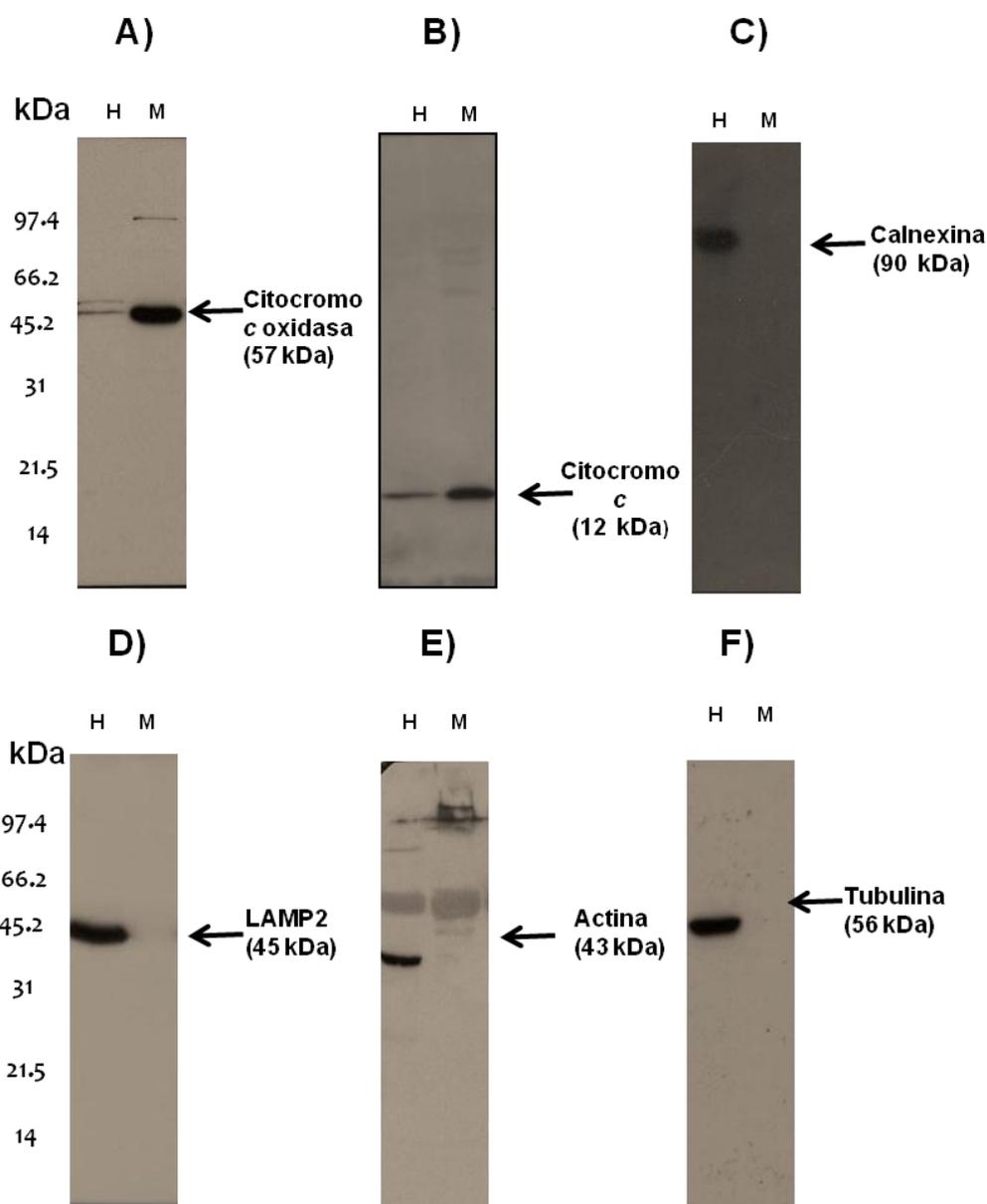


Figura 12. Determinación de la pureza de las mitocondrias aisladas. Se analizaron cantidades iguales de proteína (30 μ g) de los homogenados totales (H) y de la fracción mitocondrial (M) por Western blot. Se utilizaron anticuerpos específicos para citocromo c oxidasa (A), citocromo c (B, marcadores mitocondriales), calnexina (C, marcador de retículo endoplásmico), LAMP2 (D, marcador de lisosomas) actina y tubulina (E y F, marcadores citosólicos), n=3.

8.7 Inmunodetección de las proteínas Rac1, RhoA y RhoB en las mitocondrias de cerebro de rata.

Para determinar la presencia de las proteínas de Rac1, RhoA y RhoB en las mitocondrias de cerebro de rata, se realizaron ensayos de Western blot, empleando los anticuerpos específicos: anti-RhoA, anti-RhoB y anti-Rac1.

Bandas correspondientes a las proteínas RhoA (24 kDa), RhoB (25 kDa) y Rac1 (22kDa), se localizaron tanto en el homogenado total como en la fracción mitocondrial (figura 13).

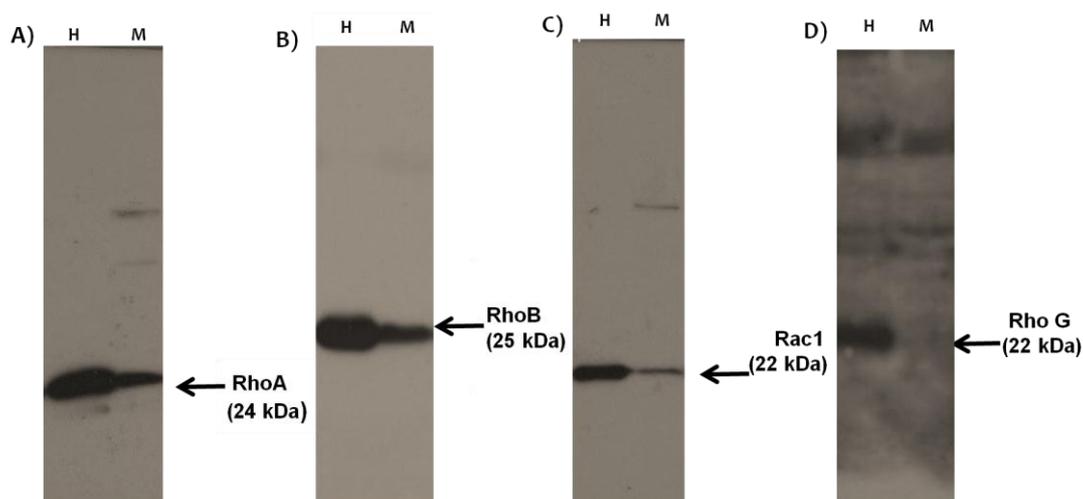


Figura 13. Inmunodetección de las proteínas Rac1, RhoA y RhoB en mitocondrias cerebro de rata. Se cargaron 30 μ g de proteína del homogenado total (H) y de la fracción mitocondrial (M) y se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos específicos para RhoA, RhoB, Rac1 y RhoG (1:2000), n=3.

Este resultado indica que las proteínas Rac1, RhoB y RhoA se encuentran presentes en las mitocondrias de las células de cerebro. Estudios previos determinaron la presencia de RhoG en hipocampo y cerebelo de ratas

adultas (O'Kane y col., 2003). Con la finalidad de determinar la posible presencia de esta proteína a nivel mitocondrial, el anticuerpo específico anti-RhoG fue utilizado en muestras de homogenado total y en las fracciones mitocondriales. En la figura 13D se puede observar la presencia de una banda de aproximadamente 22 kDa, correspondiente al peso molecular de RhoG en el homogenado total, mientras que en la fracción mitocondrial dicha banda está ausente. Este resultado indica que las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 están presentes en las mitocondrias de cerebro de rata de forma específica.

8.8 Localización mitocondrial de RhoA, RhoB y Rac1

Con el propósito de determinar la sub-localización mitocondrial de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1, se realizó un subfraccionamiento mitocondrial de acuerdo al protocolo descrito por Holger y col. (2007). A partir de las mitocondrias aisladas de cerebro se obtuvieron las siguientes subfracciones: membrana externa (ME), mitoplastos (Mt, estructura que contiene la membrana interna y la matriz), membrana interna (MI) y matriz mitocondrial (MA). Las fracciones obtenidas fueron analizadas para determinar la presencia de las proteínas Rho por medio de Western blot. El enriquecimiento de cada subfracción mitocondrial fue evaluada usando marcadores específicos para cada fracción como son la monoamino oxidasa (MAO) para la membrana externa ME, la superóxido dismutasa 2 (SOD2) para la matriz (MA) y la citocromo c oxidasa como marcador de la membrana interna. La contaminación

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

citoplasmática y el enriquecimiento de cada fracción mitocondrial fueron evaluados por medio de tubulina y la citocromo c oxidasa, respectivamente.

Como se muestra en la figura 14, RhoA, RhoB y Rac1 fueron detectadas en la fracción mitocondrial total (M). RhoA, RhoB y Rac1 fueron localizadas en la membrana interna (MI), estando ausentes en la membrana externa (ME). Únicamente en el caso de la proteína RhoA, además de determinar su presencia en la membrana interna, también fue encontrada en la fracción correspondiente a la matriz mitocondrial (MA). Estos resultados indican que las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 están presentes en los compartimentos internos de la mitocondria tales como la MI y la MA y que pueden ser transportadas a través de la membrana externa, siendo su destino final el interior de la mitocondria, sugiriendo que pueden participar en algunas de las funciones de la mitocondria.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

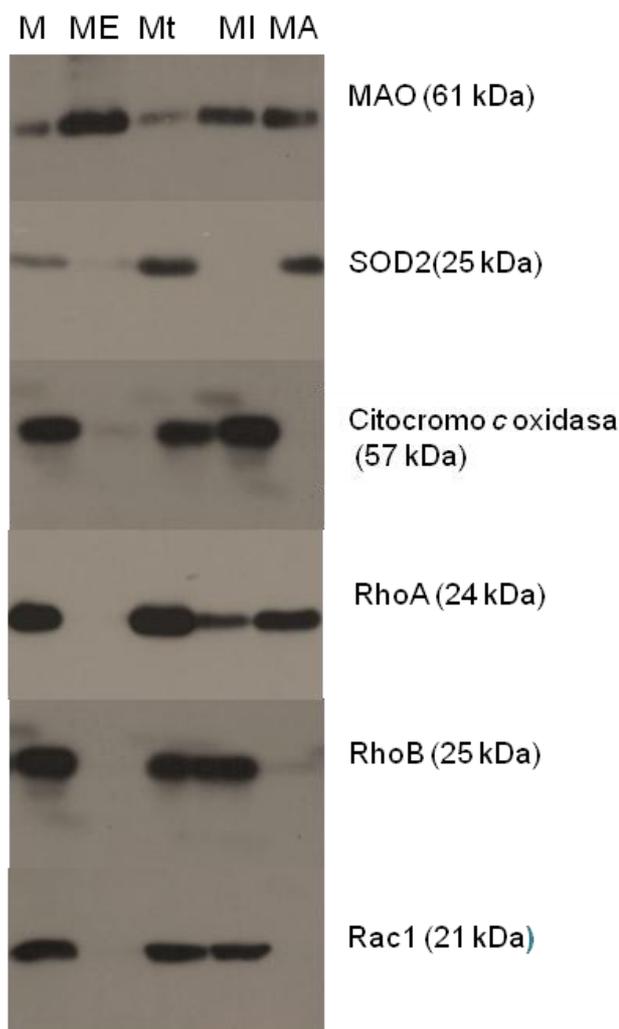


Figura 14. Localización mitocondrial de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1. Se cargaron 30 μ g de proteína de cada subfracción mitocondrial (membrana externa (ME), mitoplastos (Mt), membrana interna (MI) y matriz mitocondrial (MA)) y las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 13%. Las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF e incubadas con los anticuerpos específicos para determinar el enriquecimiento de las fracciones: MAO (monoamino oxidasa) para ME, SOD2 (súperóxido dismutasa 2) para la MA y citocromo c oxidasa para MI. Además se emplearon los anticuerpos contra RhoA, RhoB y Rac1. La interacción antígeno-anticuerpo se determinó mediante quimioluminiscencia, n=3.

8.9 Efecto de la inhibición de la proteína Rho y Rac sobre el consumo de oxígeno mitocondrial

Uno de los métodos más comunes y sencillos para estudiar el funcionamiento la cadena respiratoria mitocondrial y su acoplamiento a la

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

fosforilación oxidativa, es el de cuantificar los cambios en el consumo de oxígeno (cociente respiratorio). Esto se logró usando un electrodo de oxígeno tipo Clark. El uso de diferentes concentraciones (4.70, 5.88, 11.7 y 23.5 mM) del compuesto NSC26763 un inhibidor específico para Rac1, no causó cambios importantes en el CR, con respecto a las mitocondrias control (tabla 1). De igual forma, al inhibir a las proteínas Rho con la exoenzima C3 (0.05, 0.10, 0.25 y 0.5 ng/ μ l), no se presentó ningún cambio en el CR con respecto a las mitocondrias control (tabla 2), sugiriendo que las proteínas Rho y Rac1 no participan regulando el consumo de oxígeno mitocondrial.

Tabla 1. Efecto de la inhibición de Rac sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro de rata

Condición experimental ± NSC23766 (mM)	Cociente respiratorio (nanoátomos O ₂ /mg prot/min)
Control (0.0)	5.6 ± 0.3
4.70	5.6 ± 0.2
5.88	5.7 ± 0.2
11.7	5.0 ± 0.3
23.5	5.4 ± 0.2

El resultado es representativo de tres experimentos individuales.

Tabla 2. Efecto de la inhibición de Rho sobre el consumo de oxígeno en mitocondrias de cerebro de rata.

Condición experimental ± exoenzima C3 (ng/μl)	Cociente respiratorio (nanoátomos O₂/mg prot/min)
Control (0.0)	5.7 ± 0.5
0.05	5.2 ± 0.3
0.10	5.6 ± 0.2
0.25	5.2 ± 0.2
0.5	6.0 ± 0.2

El resultado es representativo de tres experimentos individuales.

8.10 Efecto de la inhibición de las proteínas Rho y Rac sobre la síntesis de ATP.

Con el objetivo de determinar si las proteínas Rho intervienen en la síntesis de ATP, se midieron los niveles de ATP en las mitocondrias de cerebro previamente incubadas en presencia y ausencia de inhibidores específicos de las proteínas Rho. Mediante espectrofotometría se cuantificó la formación de NADPH a una longitud de onda de 360 nm. Los resultados indican que en el caso de la inhibición de la proteína Rac1 con el compuesto NSC26763 utilizado a las concentraciones de 4.70, 5.88, 11.7 y 23.5 mM, no se observó ningún cambio significativo sobre la síntesis de ATP (fig. 15A). De igual forma, al inhibir a las proteínas RhoA y RhoB con diferentes concentraciones de C3 (0.05,

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

0.10, 0.25 y 0.5 ng/ μ l). Los datos obtenidos fueron semejantes al control, indicando que ninguna concentración utilizada generó un cambio importante sobre la síntesis de ATP (fig. 15B). Estos datos nos sugieren que las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 no participan en la síntesis de ATP.

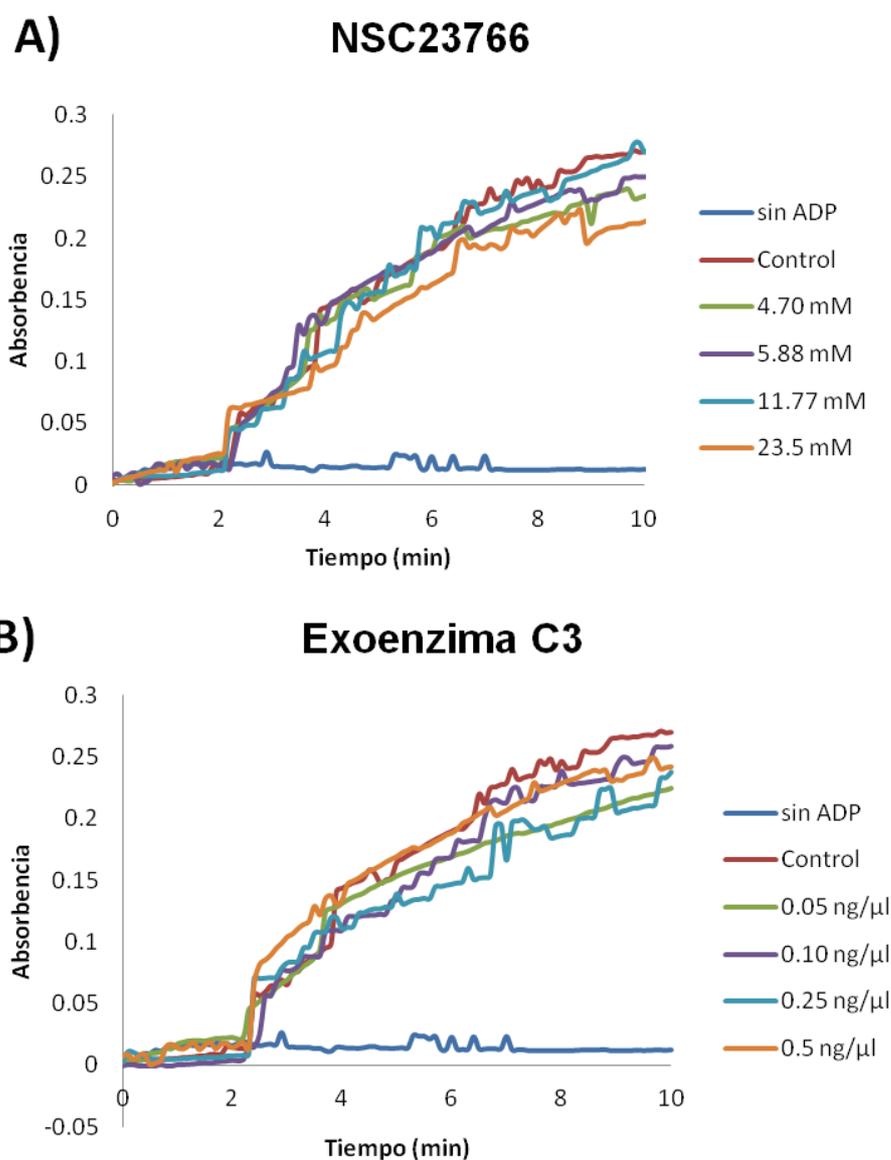


Figura 15. Efecto de la inhibición de las proteínas Rho sobre la síntesis de ATP. Utilizando inhibidores específicos para las proteínas Rac (NSC23766) (A) y Rho (exoenzima C3) (B) se analizó la cantidad de ATP producido por las mitocondrias aisladas de cerebro de rata; n=3.

9.-Discusión

La finalidad de nuestro trabajo fue investigar la presencia y localización de las proteínas Rho y Rac a nivel cerebral y mitocondrial, así como la relación que tienen estas proteínas sobre la síntesis de ATP. Como se mencionó en los antecedentes, la presencia de las proteínas Rho fue estudiada por O'Kane y col. (2003), quienes analizaron la presencia y localización de estas proteínas únicamente a nivel de hipocampo y cerebelo de rata, dejando pendientes todas las demás estructuras que conforman el cerebro. Por lo anterior, el primer paso fue determinar la localización de las proteínas Rho y Rac en las diferentes regiones del cerebro de rata mediante un análisis inmunohistoquímico. Este análisis nos permitió detectar la presencia de las proteínas Rho y Rac en todas las estructuras del cerebro de rata. Los resultados obtenidos claramente muestran que las GTPasas de la familia Rho no son distribuidas de manera idéntica, lo que concuerda con lo descrito por O'Kane y col., (2003), ya que en su trabajo además de la inmunohistoquímica, realizaron ensayos de Western blot determinando que las proteínas RhoA, RhoB, RhoG, Cdc42 y Rac1 se expresan diferencialmente en el hipocampo y cerebelo de rata.

La localización de la proteína RhoA en las dendritas de las neuronas de la mayoría de las regiones del cerebro sugiere que RhoA está asociada con moléculas efectoras, tales como la Rho cinasa, cuya presencia fue reportada en las dendritas de neuronas de cerebro de bovino (Hashimoto y col., 1999).

La localización de la proteína RhoB en las células piramidales puede ser de interés funcional, dado que las dendritas, específicamente las espinas de las

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

dendritas de estas neuronas, son el sitio primario excitatorio de la sinapsis y puede funcionar como la unidad básica de la integración sináptica (Harris y Kater 1994; Yuste y Tank, 1996).

Para el caso de Rac1, en este trabajo se localizó en los somas neuronales y su distribución se determinó en las cuatro regiones del cerebro telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo y romboencéfalo, mostrando una alta expresión. Cabe mencionar que esta expresión fue observada en ratones en edad adulta, contrario a lo observado por Komagome y col. (2000), durante el desarrollo post-natal donde reportaron la expresión de Rac1 a nivel de axones y dendritas, lo que hace suponer que la localización de esta proteína a nivel neuronal varía conforme a la edad.

Con los resultados anteriores podemos mencionar que, desde el punto de vista funcional, las proteínas Rho pueden actuar principalmente en el soma y en las dendritas, más que en los axones, debido a que una de sus principales moléculas efectoras, como la Rho cinasa, se encuentra en mayor cantidad en la materia gris (somas y dendritas), con respecto a la materia blanca (axones) (Hashimoto y col., 1999).

La localización dendrítica de RhoA y RhoB puede reflejar una importante función en la plasticidad sináptica, mientras que la identificación de Rac1 en los cuerpos celulares puede indicar su participación en procesos como la transcripción de genes (Takai y col., 2001; Etienne y Hall, 2002; Wennerberg y col., 2005; Bustelo y col., 2007).

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

La localización subcelular de las proteínas Rho es crítica para su actividad biológica y así asegurar una apropiada respuesta señalizadora a un estímulo extracelular. Esta familia de proteínas están localizadas en la membrana plasmática (RhoA, RhoB, RhoC y Rac1), citosol (RhoA, RhoC y Rac1) o endosomas (RhoB) (Bustelo y col., 2007). Como se mencionó en los antecedentes, hay fuertes evidencias que indican la presencia de este grupo de proteínas a nivel mitocondrial y dado que el cerebro es uno de los órganos que necesita de grandes cantidades de energía, las células que lo forman contienen una gran cantidad de mitocondrias. Por lo cual, la siguiente parte de este trabajo fue determinar la presencia de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1, en las mitocondrias de cerebro de rata. Cabe destacar que en trabajos realizados anteriormente se localizó a la proteína RhoB en las mitocondrias de espermatozoides de erizo de mar (Castellano y col., 1997), Rac1 en mitocondrias de riñón de rata (Boivin y Beliveau, 1995) y en mitocondrias aisladas de páncreas de rata (Kowluru y col., 2003). Con excepción de RhoA, no existen reportes de la presencia de esta proteína en las mitocondrias de cualquier órgano u organismo, por lo que en este trabajo resultó de suma importancia investigar su localización, junto con el resto de las proteínas reportadas como son RhoB y Rac1, pero ahora en mitocondrias de cerebro de rata. Para cumplir con este objetivo, las mitocondrias de cerebro de rata fueron aisladas empleando el protocolo descrito por Sims (1990), el cual nos permitió obtener fracciones mitocondriales con un alto grado de pureza y con propiedades metabólicas adecuadas (fig 10). Posteriormente, utilizando la

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

técnica de Western blot, nos permitió observar que las proteínas RhoA, RhoB y Rac1, están presentes en las mitocondrias de cerebro de rata. La proteína RhoG, de la cual se tienen reportes de su presencia en cerebro de rata (Olenik y col., 1997; O'Kane y col., 2003), también fue analizada, encontrado que esta proteína no está presente en las mitocondrias de cerebro de rata (fig.11). Como resultado de los ensayos realizados en este trabajo, se demostró que las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 se localizan principalmente en la membrana interna, mientras que RhoA también se localiza en la matriz de mitocondrial (fig 12).

Considerando que el DNA mitocondrial codifica para 13 proteínas involucradas en el transporte de electrones y fosforilación oxidativa (Scheffler, 2008) y que las proteínas Rho son codificadas a nivel nuclear (Takai y col., 2001), la localización de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1 en la membrana interna y en la matriz mitocondrial, sugiere que estas proteínas utilizan un sistema de transporte específico que les permite internalizarse en la mitocondria. Existen evidencias de que existen sitios de contacto entre las membranas mitocondriales denominadas "zonas densas" cuyos componentes proteicos son capaces de interactuar y dar lugar a la formación de canales, de los que también forman parte proteínas del citoplasma y de la matriz mitocondrial (Jonhson y col., 1999). Además, las modificaciones postraduccionales, tales como la geranilación y/o farnesilación, que sufren estas proteínas les permiten asociarse con las membranas, por lo que era de esperar encontrarlas asociada a alguna de las membranas mitocondriales. En

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

este caso, las proteínas Rho y Rac se ubicaron en la membrana interna mitocondrial, mientras que las proteínas Miro (subfamilia de proteínas Rho) se localizan a nivel de la membrana externa (Fransson y col., 2003) (fig.12) Aunque la técnica empleada no nos permitió determinar el lado hacia el cual se encuentran ancladas las proteínas Rho, el hecho de que la proteína RhoA se encuentre en la matriz mitocondrial, sugiere que se encuentran ubicadas en la parte interior de la membrana mitocondrial interna.

La localización mitocondrial de las proteínas Rho y Rac sugiere que estas proteínas pueden participar en la regulación de alguna(s) de las funciones de la mitocondria, entre las que se incluyen la respiración y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Existen evidencias de que las proteínas que participan en ambos procesos se localizan también en la membrana interna mitocondrial (Scheffler, 2008) al igual que las proteínas Rho. Por lo anterior, se planteó como objetivo determinar si las GTPasas Rho participan en la síntesis de ATP (tablas 1 y 2). Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de las proteínas Rho y Rac1 no causó cambios significativos en el consumo de oxígeno ni en la síntesis de ATP. Lo anterior sugiere que las proteínas Rho mitocondriales no participan en la función energética de la mitocondria, aunque se requieren estudios más finos para descartar totalmente la no participación de estas proteínas en esta función primordial. Además cabe la posibilidad de que los inhibidores utilizados para determinar la función, no lleguen hasta donde se localizan las proteínas estudiadas.

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

Además de ser el sitio donde se lleva a cabo la producción de ATP, las mitocondrias llevan a cabo una variedad de procesos bioquímicos tales como la síntesis de nucleótidos, aminoácidos, lípidos y vitaminas, importan activamente metabolitos y proteínas del citosol por un complejo conjunto de transportadores y canales de membrana; participan en la regulación citoplasmática de segundos mensajeros como el ion Ca^{2+} y las especies reactivas de oxígeno (Holger y col., 2007; Tornero y col., 2002).

A nivel mitocondrial, las proteínas G han sido implicadas en los procesos de fusión y fisión. En la levadura, la fisión mitocondrial esta mediada por una proteína relacionada con la dinamina o Dnm1p27, mientras que Mgm1p es requerida en los procesos de fisión (Zorzano y col., 2004).

Por otro lado se ha relacionado a la proteína RhoA con la movilidad mitocondrial. Estudios realizados por Minin y col. (2005) han propuesto novedosos mecanismo en los que se involucra a esta proteína y a su efector mDia1/diaphanous. La acción de este efector es altamente específico de la mitocondria ya que no se observa que haya transporte de lisosomas y/o peroxisomas.

Fransson y col. (2003) cuando describen la familia de proteínas Miro proponen que estas Rho GTPasas desempeñan papeles importantes en la homeostasis mitocondrial, así como en la apoptosis. Por su parte Saotome (2008) utilizando cultivos neuronales, concluye que las proteínas Miro participan en la distribución de las mitocondrias en las dendritas en los sitios de

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata

entrada de Ca^{2+} y promueven la propagación de las señales de calcio a la mitocondria. Indicando también que la transferencia del Ca^{2+} por la mitocondria proporciona un aumento significativo en la regulación y estimula las reacciones dependientes de Ca^{2+} en la producción de energía mitocondrial. Es probable que las proteínas Rho mitocondriales participen regulando la liberación de neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} . El calcio, además de iniciar la exocitosis, activa el traslado de las vesículas a los lugares de su liberación con la ayuda de proteínas de membrana plasmática y de la membrana vesicular, como las proteínas Rho. Cuando entra el calcio en la neurona, se activa una enzima llamada calmodulina que es una proteína cinasa, encargada de fosforilar a la sinapsina I, situada en la membrana de las vesículas y que las une a los filamentos de actina. Este conjunto de proteínas forman el complejo SNARE que forma un poro en la membrana plasmática y permite la fusión de ambas membranas y la salida de la sustancia como el contenido vesicular al espacio sináptico (Lu y col., 2010). Por lo tanto es importante tener en cuenta la relación entre el ion Ca^{2+} , la mitocondria y las Rho GTPasa para posteriores estudios. Considerando la versatilidad funcional de este orgánulo existe un amplio campo de estudio sobre la función de estas proteínas a nivel mitocondrial.

10.- Conclusiones

1.-La localización diferencial de las Rho GTPasas en las diferentes regiones del cerebro de rata indica diferentes papeles de estas proteínas dentro de este órgano.

2.-Las GTPasas Rho aunque están presentes en la mitocondria no influyen en la síntesis de ATP.

11.- Literatura citada

1. Baumann C.R y Bassetti C.L. 2008. Hypocretins (Orexins): Clinical Impact of the Discovery of a Neurotransmitter. *Sleep Med Rev.* **9**:253-268.
2. Bereiter H. J. 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev cytol.* **122**: 1-163.
3. Blum A.E., Joseph S.M., Przbylski R.J., Dubyak G.R., 2008. Rho-family GTPases modulate Ca(2+)-dependent ATP release from astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **295**: C231-C241.
4. Bohinski R.1991. Bioquímica. 5a edición. España, Addison-Wesley. p.p 739.
5. Boivin D., Beliveau R. 1995. Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex. *J Cell Biochem.* **269**: 180-189.
6. Briar Ch., Lasserson D. 2004. Lo esencial del sistema nervioso. 2da edición. Madrid, España, Elsevier. p.p 288.
7. Bustelo X., Sauzeau V., Berenjeno I. 2007. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and fuctions in vivo. *BioEssays.* **29**:356-370.
8. Cairns C.B., Walther J., Harken A.H., Banerjee A., 1998. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *Am J Physiol.* **274**: R1376-R1383.
9. Castellano L.E., Martínez C.G., Lopéz G.J., Obregón A., Garcia S.J 1997. Subcellular localization of the GTP-binding protein Rho in the sea urchin sperm. *Eur J Cell Biol.* **74**:329-335
- 10.Challet E., Bernard D.J., Turek F.W., 1998. Lesions of glucose-responsive neurons impair synchronizing effects of calorie restriction in mice. *Brain Res.* **801**:244-250.
- 11.Chardin P. 2006. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 54-62.
- 12.Colicelli J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.* **250**: 1-53.

13. DePierre J.W., Ernster L. 1977. Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu Rev Biochem.* **46**: 201-262.
14. Etienne M. S., Hall A. 2002. Rho GTPases in cell Biology. *Nature.* **420**: 629-235.
15. Fiorentini C., Matarrese P., Straface E., Falzano L., Fabbri A., Donelli G., Cossarizza A., Boquet P., Malorni W., 1998. Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis. *Exp Cell Res.* **242**: 341-350.
16. Fransson A., Ruusala A., Aspenström P., 2003. Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem.* **278**: 6945-6502.
17. Gao Y., Dickerson J.B., Guo F., Zheng J., Zheng Y., 2003. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **101**: 7618-7623.
18. Govek E.E., Newey S.E., Van Aelst L. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* **19**: 1-49.
19. Gray M.W., Burger G., Land B.F. 1999. Mitochondrial evolution. *Science* **283**: 1476-1481.
20. Guyton A.C., Hall J.E. 2006. Tratado de Fisiología Médica. 11a edición. Madrid, España. Elsevier. p.p 1104.
21. Harris K.M., Kater S.B., 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci.* **17**: 341-371.
22. Hashimoto R., Nakamura Y., Kosako H., Amano M., Kaibuchi K., Inagaki M., Takeda M. 1999. Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* **263**: 575-579.
23. Herrera P., Barrientos T., Fuentes R., Rodríguez S., Alva M. 2008 Anatomía Integral. México D.F, Trillas. p.p 1168.
24. Holger E., Heazlwood J.L., Millar A.H., 2007. Isolation and subfractionation of plant mitochondria for proteomic analysis. *Methods Mol Biol.* **355**: 49-62.
25. Jaffe A.B., Hall A., 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **21**: 247-269.

26. Jantsch-Plunger V., Gönczy T., Romano A., Schnabel H. Hamill D., Schnabel R., Hyman A.A., Glotzer M. 2000. CYK-4: A Rho family GTPase activating protein (GAP) required for a central spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol.* **149**:1391-1404.
27. Johnson N., Khan A., Virji S., Ward J.M., Crompton M., 1999. Import and processing of heart mitochondrial cyclophilin D. *Eur J Biochem.* **263**: 353-359.
28. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. 2001. Principios de Neurociencia. 4a edición. Madrid: McGraw-Hill. p.p 1400
29. Kaziro Y., Itoh H., Kozasa T., Nakafuku M., Satoh T. 1991. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem.* **60**: 349-400.
30. Knust E. 2001. G protein signaling and asymmetric cell division. *Cell* **107**: 125-128.
31. Komagome R., Kimura K., Saito M., 2000. Postnatal changes in Rho and Rho-related proteins in the mouse brain. *Jpn J Vet Res.* **47**: 127-133.
32. Kowluru A., Chen H.Q., Tannous M. 2003. Novel roles for the Rho subfamily of GTP-binding proteins in succinate-induced insulin secretion from beta TC3 cells: further evidence in support of the succinate mechanism of insulin release. *Endocr Res.* **29**:363-376.
33. Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
34. Ledoux S., Laouari D., Essiq M., Runembert I., Trugnan G., Michel J.B., Friedlander G., 2002. Lovastatin enhances ecto-5'-nucleotidase activity and cell surface expression in endothelial cells: implication of rho-family GTPases. *Circ Res.* **90**:420-427.
35. Li Z., Van Aelst L., Cline H. T., 2000. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci.* **3**: 217-225.
36. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265-275.

37. Mathews Ch., Ahern K.G., Van Holde K.E. 2002. Bioquímica. 3a edición. Madrid, España, Addison-Wesley. p.p 1368.
38. Meyer G.K., Neetz A., Brandes G., Tsikas D., Butterfield J.H, Just I., Gerhard R., 2007. Clostridium difficile toxins A and B directly stimulate human mast cells. *Infect Immun.* **75**: 3868-3876.
39. Minin A.A., Kulik A.V., Gyoeva F.K., Li Y., Goshima G., Gelfand V.I. 2005. Regulation mitochondria distribution by RhoA and formins. *J Cell Sci.* **119**:659-670
40. Netter F.H. 1994. Sistema Nervioso Anatomía y Fisiología. Barcelona, España, Elsevier. p.p 252
41. O`Kane E. M., Stone T. W., Morris B. J. 2003. Distribution of Rho family GTPases in the adult rat hippocampus and cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res.* **114**: 1-8.
42. Olenik C., Barth H., Just I. Aktories K., Meyer D. K. 1997. Gene expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Rac1 and Cdc42 in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* **52**: 263-269.
43. Parihar M.S., Brewer G. J. 2007. Mitochondrial failure in Alzheimer disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* **292**: C8-C23.
44. Paxinos G., Watson Ch. 2007. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 6 th edition, China, Elsevier. p.p 456
45. Phillips P., Thomson M. 2001. Small GTP-binding proteins in the nuclei of human placenta. *J Cell Biochem.* **84**: 100-107.
46. Pocock G., Richards Ch.D. 2001. Fisiología Humana. Barcelona España, Masson. p.p 636.
47. Puellas L.L., Martínez S., Martínez M. 2008 Neuroanatomía. 24a edición. México D.F, Panamericana. p.p 430.
48. Quiroz G. F. 1997. Tratado de Anatomía Humana. 24a edición. México, D.F, Porrua. p.p 1350
49. Richard V., Dulon D., Hafidi A. 2008. Expression of Rho GTPases Rho-A and Rac1 in the adult and developing gerbil cerebellum. *Int J Dev Neurosci.* **26**: 723-732.

50. Saotome M., Safiulina D., Szabadkai G., Das S., Fransson A., Apesstrom P., Rizzuto R., Hajnóczky G. 2008. Bidirectional Ca^{2+} dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *PNAS*. **105**:20728-20733
51. Scheffler I.E. 2008. Mitochondria. 2nd edition. Hoboken, New Jersey, J. Wiley and Sons, Inc. p.p 462
52. Serrano R.A. 1998. Función y propiedades bioquímicas de las proteínas G. *BEB*. **18**: 53-59.
53. Sims N.R., 1990. Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem*. **55**:698-707.
54. Takai Y., Sasaki T., Matozaki T., 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. **81**: 153:208.
55. Tanaka S., Sakamoto K., Yamamoto M., Mizuno A., Ono T., Waguri S., Kimura J., 2010. Mechanism of statin-induced contractile dysfunction in rat cultured skeletal myofibers. *J Pharmacol Sci*. **114**: 454-463.
56. Thibodeau G.A., Patton K.T. 2007. Structure and function of the body. 13a edición. Estados Unidos, Elsevier. p.p 640.
57. Tobwin H., Staehelin T., Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. **76**:4350-4354.
58. Tornero D., Ceña V., González G.J. 2002 Papel del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial en los procesos neurodegenerativos. *Rev Neurol*. **35**:354-361
59. Trapp T., Oláh L., Hölker I., Besselmann M., Tiesler C., Maeda K., Hossmann K.A., 2001. GTPase RhoB: an early predictor of neuronal death after transient focal ischemia in mice. *Mol Cell Neurosci*. **17**:883-894.
60. Turcotte S., Desrosiers R.R., Béliveau R., 2003. HIF-1 alpha mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci*. **116**: 2247-2260.

61. Van Aersst L., Cline H.T., 2004. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol.* **14**: 297-304.
62. Verstreken P., Ly C.V., Venken K. J., Koh T.W., Zhou Y., Bellen H. J. 2005. Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* **47**: 365-378.
63. Vetter I.R., Wittinghofer A. 2001. The guanine nucleotide binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304.
64. Villarejo D.M. 1998. Programa de actualización continua para anesthesiólogos. Mexico, D.F. Intersistemas. p.p 72
65. Wang Z., Jin., N., Ganguli S., Swartz D.R., Li L., Rhoades R.A., 2001. Rho-kinase activation is involved in hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **25**: 628-635.
66. Wennerberg K., Rossman K.L., Der C.J. 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* **118**: 843-846.
67. Woodward H.N., Anwar A., Riddle S., Taraseviciene-Stewart L., Stenmark K.R, Gerasimovskaya E.V., 2009. PI3K, Rho, and ROCK play a key role in hypoxia-induced ATP release and ATP-stimulated angiogenic responses in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **297**: L954-964.
68. Yamamoto K., Tanimoto T., Kim S., Kikuchi A., Takai Y. 1989. Small molecular weight GTP-binding proteins and signal transduction. *Clin Chim Acta.* **15**: 347-355.
69. Yuste R., Tank D.W., 1996 Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal. *Neuron* **16**: 701-716.
70. Zorzano A., Bach D., Pich S., Palacín M. 2004. Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Rev Med Univ Navarra.* **48**:30-35

Función de las proteínas Rho y Rac en mitocondrias de cerebro de rata