



UNIVERSIDAD MICHOCACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

“Participación de las proteínas Rho y Rac en la modulación de la actividad mitocondrial en cerebro de rata”

Tesis que presenta

Biól. Claudia Isabel García Berumen

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Asesor: Doctor en Ciencias en Biología: Salvador Manzo Avalos

**Co-asesora: Doctora en Ciencias Biomédicas: Esperanza
Meléndez Herrera**

Índice

Resumen	1
1.- Introducción	2
1.1 Sistema nervioso	2
1.2 El cerebro	2
1.3 Tipos de células en el sistema nervioso	4
1.3.1 Células glía	4
1.3.2 La neurona	4
1.4 Mitocondria	5
1.4.1 Cadena transportadora de electrones	7
I. NADH-Ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)	8
II. Succinato-Ubiquinona Oxidorreductasa (complejo II)	9
III. Ubiquinol-Citocromo c Oxidasa (Complejo III)	9
IV. Citocromo c Oxidasa (complejo IV)	9
V. ATP sintasa	10
VI. Ubiquinona	10
VII. Citocromo c	10
1.5 Proteínas G	11
1.5.1 Proteínas G Heterotriméricas	11
1.5.2 Proteínas G Monoméricas	12
1.5.2.1 Rho GTPasas	12
1.5.2.2 Inhibidores de las proteínas Rho	13
2.- Antecedentes	15
2.1 Proteínas Rho en el cerebro	15
2.2 Las proteínas Rho y la mitocondria	15
2.3 Relación entre las proteínas Rho y los niveles de ATP	16
3.- Justificación	18
4.- Hipótesis	18
5.- Objetivos	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos Específicos	19
6.- Materiales y Métodos	20
6.1 Material biológico	20
6.2 Inmunofluorescencia	20
6.3 Purificación de las mitocondrias de cerebro de rata	21
6.4 Determinación de la concentración de proteína	22

6.5 Determinación del consumo de oxígeno	22
6.6 Determinación de la fosforilación oxidativa	23
6.7 Actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones	23
6.8 Actividad de ATPasa	23
6.9 Determinación del potencial de membrana mitocondrial en el cerebro de rata	24
6.10 Análisis estadístico	24
7.- Resultados	25
7.1 Colocalización de las proteínas Rho A y Rho B en mitocondrias	25
7.2 Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre el consumo de oxígeno	28
7.3 Efecto de la inhibición de las proteínas Rho y Rac1 en la síntesis de ATP	31
7.4 Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de los complejos respiratorios de la cadena transportadora de electrones	32
7.5 Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de la F ₀ F ₁ ATPasa mitocondrial	33
7.6 Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre el potencial de membrana mitocondrial	34
8.- Discusión	35
9.- Conclusión	39
10.- Perspectivas	39
11.- Referencias	40

Resumen

El cerebro es el órgano que mayor cantidad de energía requiere, debido a que se encarga de controlar todos los sistemas en un organismo, siendo esta energía proporcionada principalmente por la mitocondria. Se sabe que las proteínas Rho y Rac, además de participar en el proceso de la sinapsis, modulan varias funciones entre las que se incluyen a la neuritogénesis, el crecimiento del cono neuronal y la plasticidad neural. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares activando diversas rutas de transducción de señales en las células eucariontes. La localización y función de estas proteínas está bien documentada en distintos tipos celulares, donde se ha descrito que se localizan predominantemente en el citoplasma. Sin embargo, antecedentes directos de nuestro grupo de investigación, indican la presencia de las proteínas Rho A, Rho B y Rac1 en la membrana interna de las mitocondrias de cerebro de rata. Siendo este, el primer reporte de la presencia de las proteínas Rho y Rac en las diferentes fracciones mitocondriales, dato que resulta novedoso e interesante. Por ello es que se decide corroborar este resultado empleando otra técnica como la inmunofluorescencia en cortes de cerebelo de rata. Al ser comprobado el resultado entonces nos planteamos la siguiente pregunta: ¿qué procesos dentro de la mitocondria podrían ser modulados por las proteínas Rho y Rac? Para responder esta pregunta nos planteamos diversos experimentos que nos indicaran la participación de estas proteínas en los parámetros relacionados con la producción de energía, empleando inhibidores específicos para cada una de las proteínas: la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* para Rho y el compuesto NSC23766 para Rac. Los resultados muestran, que ambas proteínas influyen en el en la producción de ATP, debido a los cambios significativos observados en el estado 3 del consumo de oxígeno, en la síntesis de ATP y en la actividad de la ATPasa. En el caso del potencial de membrana y los complejos de la cadena transportadora de electrones no se observaron diferencias significativas. Los resultados obtenidos nos sugieren que las proteínas Rho y Rac modulan la actividad de la ATPasa y por lo tanto la síntesis de ATP.

1.- Introducción

1.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) controla y coordina las funciones de todo el cuerpo y responde a los estímulos internos y externos. Es el rector y coordinador de todas las actividades conscientes e inconscientes del organismo, junto con el sistema endocrino. El SN se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está formado por el encéfalo (hemisferios cerebrales, diencéfalo, cerebelo y tallo cerebral) y la médula espinal; está constituido por unos 100 billones de neuronas rodeadas por células gliales y 100 trillones de conexiones entre ellas. El cerebro constituye la parte anterior y superior del encéfalo; éste puede almacenar información, generar pensamientos y determinar las reacciones que el cuerpo experimenta como respuesta a las sensaciones. Después, se transmiten las señales adecuadas a través de la parte motora del sistema nervioso periférico (SNP) para dar respuesta al estímulo captado (Guyton, 1992; West, 1993; Swanson, 2000).

1.2 El cerebro

El cerebro es el componente principal del SNC. Es una estructura simétrica bilateral dividida en dos mitades denominadas hemisferio derecho y hemisferio izquierdo, los cuales se comunican entre sí por el cuerpo calloso. A su vez, los hemisferios cerebrales están divididos en cuatro lóbulos: frontal, occipital, temporal y parietal. El cerebelo es la parte más grande del cerebro posterior y se ubica por detrás del cuarto ventrículo, consiste de dos hemisferios cerebelosos unidos por un vermis mediano estrecho. Este órgano en humanos tiene un peso aproximado de 1.3 kg, constituyendo el 92% del SNC. Sus diferentes estructuras rigen la sensibilidad, los movimientos, la inteligencia y el funcionamiento de los órganos. Su capa más externa, la corteza cerebral, procesa la información recibida, la coteja con la información almacenada y la transforma en material utilizable, real y consciente (Kandel, 2000).

La actividad metabólica del cerebro es notablemente constante a lo largo del tiempo. En condiciones de reposo, el cerebro requiere de alrededor del 15% del metabolismo energético total del cuerpo, aún cuando la masa del cerebro es sólo un 2% de la masa corporal total. En estas condiciones, el metabolismo del cerebro es 7 veces el metabolismo promedio del resto del cuerpo. Esta actividad metabólica en curso consiste en gran parte de la oxidación de la glucosa en dióxido de carbono y agua, lo que da como resultado una gran producción de energía en forma de ATP cada minuto, por lo que este órgano es vulnerable a las interrupciones de suplemento de glucosa o de O₂. Debido al metabolismo elevado que tienen las neuronas, se requiere mucha más energía que la necesaria para las demás células del organismo (Smith y col., 2002). Del consumo energético del cerebro, aproximadamente el 60% es necesario para la propagación de los potenciales de acción y para la restauración del flujo de iones después de que los receptores postsinápticos han sido estimulados por el neurotransmisor (Guyton, 1992; Attwell y Laughlin, 2001).

En condiciones normales, el 90% de la energía necesaria para conservar los gradientes iónicos a través de las membranas celulares y transmitir los impulsos eléctricos, proviene de la glucosa, la cual entra al cerebro mediante un transportador que está en los capilares cerebrales. La glucosa es oxidada por la vía de la glucólisis y el ciclo de Krebs. Durante un ayuno prolongado, el cerebro utiliza cuerpos cetónicos como fuente de energía. El cerebro necesita alrededor de 4×10^{21} moléculas de ATP cada minuto, por lo que este órgano es vulnerable a las interrupciones del suplemento de glucosa o de O₂ (Ganong, 1992; Halliwell, 2006).

El oxígeno es esencial para la función normal de los organismos eucariotas. Su papel en la supervivencia está relacionado a su alto potencial redox, convirtiéndolo en un excelente agente oxidante capaz de aceptar electrones fácilmente a partir de sustratos reducidos. Los tejidos tienen diferentes demandas de oxígeno en función de sus necesidades metabólicas. El encéfalo humano consume 3.5 moles de O₂/100 g de tejido cerebral/min, lo cual representa el 20% del consumo total de oxígeno bajo condiciones de reposo. Una neurona utiliza una considerable

cantidad de oxígeno para la síntesis de ATP, necesario para mantener el gradiente iónico (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) (Halliwell, 2006).

1.3 Tipos de células en el sistema nervioso

En el sistema nervioso hay dos grandes clases de células: las neuronas que constituyen la llamada sustancia gris, y las células gliales que en su conjunto forman la denominada glía o neuroglia (Alcaraz, 2001).

1.3.1 Células gliales

Las células gliales son más numerosas que las neuronas, ya que hay entre 10 y 50 veces más glía que neuronas en el sistema nervioso central de vertebrados. Rodean a los cuerpos celulares, axones, y dendritas de las neuronas. Las células glía no están directamente involucradas en procesar información, pero en conjunto realizan otras actividades vitales como: dar soporte a las neuronas, producción de mielina, como removedores de residuos celulares, etc. En el sistema nervioso de vertebrados se divide en dos clases: *microglia* (fagocitos) y *macroglia* (oligodendrocitos, células de Schwann y astrocitos) (Purves y col., 2004).

1.3.2 La neurona

La neurona es la unidad estructural y funcional del sistema nervioso. Son células especializadas en transmitir los impulsos nerviosos. Poseen cuatro regiones definidas: cuerpo celular, dendritas, axón y terminales presinápticas. Cada región tiene un papel distinto en la generación de señales y la comunicación entre las células nerviosas. El cuerpo celular (soma) es el centro metabólico que contiene el núcleo, que almacena los genes de la célula, además del retículo endoplasmático liso y rugoso, ribosomas, etc. El cuerpo celular normalmente es el origen de dos clases de prolongaciones: varias dendritas cortas y un único axón largo tubular. Las dendritas se ramifican como un árbol y son el aparato principal de recepción de señales procedentes de otras neuronas. Por el contrario, el axón sale del cuerpo celular y es la principal unidad de conducción de señales a otras neuronas (Kandel y col., 2000).

El suministro de energía neuronal se controla por los mecanismos moleculares que regulan la dinámica mitocondrial (López-Doménech y col., 2012). Específicamente, las mitocondrias son de gran importancia para el desarrollo sináptico y plasticidad neuronal, 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 (Parihr y Brewer, 2007).

1.4 Mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos intracelulares presentes en todas las células eucariotas. Son las encargadas de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, sintetizan ATP a expensas de la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos por medio de la fosforilación oxidativa. Poseen un tamaño variable entre $0.1\mu\text{m}$ y $0.5\mu\text{m}$ de diámetro y pueden alcanzar una longitud máxima de $7\mu\text{m}$, dependiendo de la actividad de la célula (Alberts y col., 2002). 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 promedio hay 2000 mitocondrias por célula, pero dependerá de la actividad metabólica de la célula (Lehninger y col., 2002).

La estructura típica de las mitocondrias consiste de dos membranas, una externa, que es lisa y otra interna que presenta numerosas invaginaciones conocidas como crestas, con lo que se forman dos compartimentos, uno externo que corresponde a un espacio limitado por dos membranas, denominado espacio intermembranal, y otro espacio interno, limitado solamente por la membrana interna llamado matriz mitocondrial (figura 1) (Medina, 1995).

La membrana mitocondrial externa está compuesta por alrededor del 30-40% de lípidos y del 60-70% de proteínas y ahí se encuentran las enzimas de la oxidación de los aminoácidos, de la biosíntesis de los ácidos grasos y de los fosfolípidos de

la membrana, entre otras (Mathews y Van Holde, 1996; Devlin, 2002). Su principal componente es el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC por las siglas en inglés de *voltage-dependent anionic channel*) o porina, cuya función es formar un canal acuoso para el movimiento de metabolitos de naturaleza aniónica (fosfato, ADP, ATP, piruvato) hacia adentro y afuera de la mitocondria (Grimm y Brdiczka, 2007). Otro componente importante de la membrana externa lo constituye la translocasa de la membrana externa (TOM por la siglas en inglés de *Translocase of outer membrane*), cuya función es el reconocimiento y la translocación de las proteínas importadas por la mitocondria desde el citosol (Meisinger y col., 2001).

La membrana interna está formada por aproximadamente el 80% de proteínas y es rica en ácidos grasos insaturados. Es impermeable a la mayoría de los iones y moléculas, a excepción del O₂, CO₂ y H₂O. Esto permite el establecimiento del potencial transmembranal ($\Delta\Psi$) y evita pérdidas en el mismo, debido a la tendencia termodinámica de los iones a igualar las cargas eléctricas y su concentración en ambos lados de la membrana. Esta membrana contiene a las proteínas de la cadena respiratoria y proteínas transportadoras (Lehninger y col., 2002).

En la matriz mitocondrial se encuentran las enzimas solubles del metabolismo, como son las del ciclo de Krebs y la oxidación de los ácidos grasos. Además se encuentran sustratos, iones inorgánicos y cofactores, así como el ADN, ARN mitocondrial y ribosomas (Voet y col., 2002).

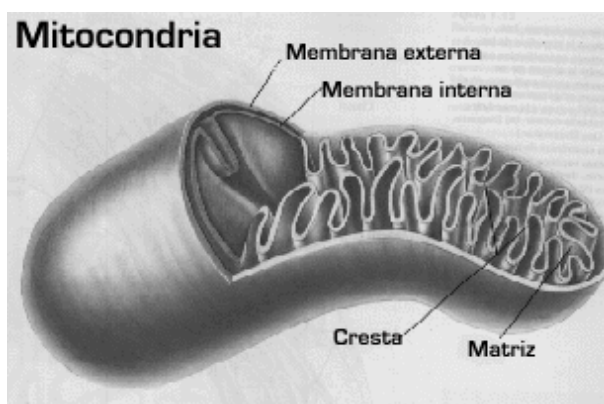


Figura1. Estructura de la mitocondria. Modelo típico de la mitocondria (Rawn, 1989).

1.4.1 Cadena transportadora de electrones

La cadena respiratoria es un ensamble de más de 20 proteínas captadoras de electrones capaces de experimentar cambios reversibles en su estado redox. Se encuentran principalmente asociados, ya sea de manera covalente o no covalente, a estructuras proteicas oligoméricas que forman grandes complejos enzimáticos embebidos de manera parcial en la membrana interna de la mitocondria. Tres de esos complejos (I, III y IV) funcionan como bombas redox que acoplan el transporte de electrones a la translocación vectorial de protones, a través de la membrana interna (Nicholls y Ferguson, 2002). Algunos de esos acarreadores de electrones (ubiquinona y citocromo c) tienen una estructura más sencilla y sirven para conectar eléctricamente a los complejos respiratorios. La estructura de la membrana interna mitocondrial permite fijar los componentes de la cadena respiratoria en un ordenamiento secuencial que facilita la transferencia de electrones entre ellos, lo que determina una alta velocidad y eficiencia del sistema (Álvarez y col., 1994). Durante las reacciones enzimáticas involucradas en la glucólisis, en la oxidación de ácidos grasos y en el ciclo de Krebs, los equivalentes reductores [nicotinamida adenindinucleótido reducido ($\text{NADH}+\text{H}^+$) y dinucleótido de flavina y adenina reducido (FADH_2)], generados por la oxidación de moléculas en dichas vías metabólicas, inician la fosforilación oxidativa. La cadena respiratoria transfiere los electrones del $\text{NADH}+\text{H}^+$ o FADH_2 , generados por la oxidación de nutrientes, hasta el O_2 . La energía liberada por las reacciones redox que se llevan a cabo en los complejos es almacenada en forma de un gradiente electroquímico de protones que es responsable de la generación del $\Delta\Psi$, el cual es usado por la ATP sintasa para la formación de ATP a partir de ADP y P_i (figura 2) (Lehninger y col., 2000). El $\Delta\Psi$ es necesario también para el transporte iónico y de proteínas.

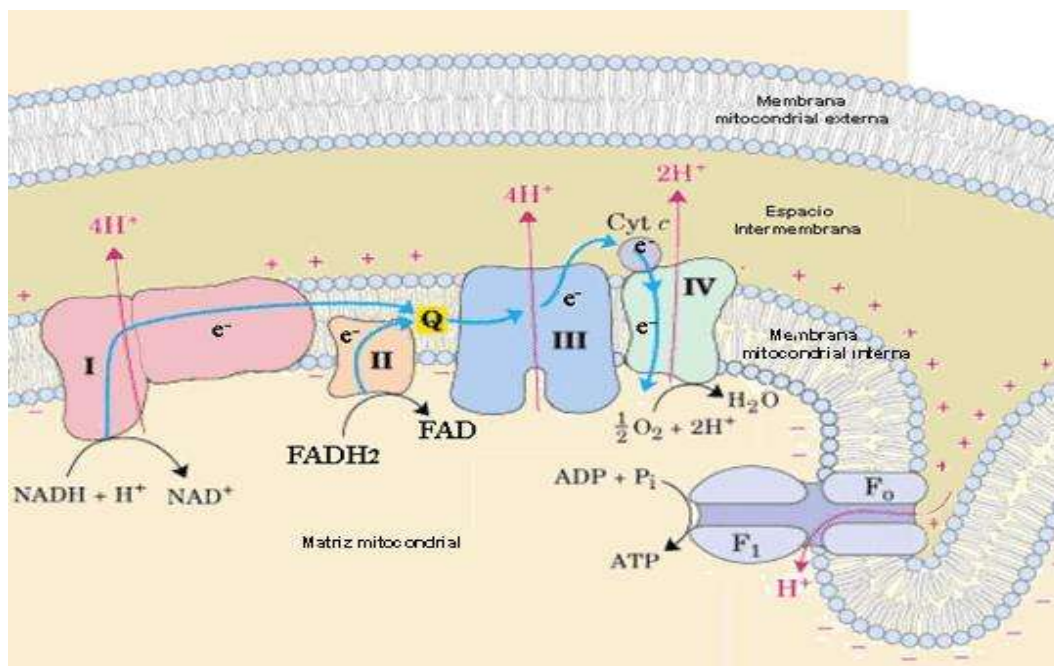


Figura 2. Esquema de los componentes de la membrana interna mitocondrial involucrados en la fosforilación oxidativa. NADH-deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinol-citocromo c oxidoreductasa (complejo III), citocromo oxidasa (complejo IV) y ATP sintasa. Tomado y modificado de Lehninger y col., 2000.

La cadena transportadora de electrones consta de los siguientes componentes:

I. NADH-Ubiquinona oxidoreductasa (complejo I). Este complejo acopla la transferencia de los electrones del $NADH+H^+$ hacia la ubiquinona con el bombeo de cuatro protones hacia el espacio intermembranal. El complejo I consta de 46 subunidades, de las cuales 39 están codificadas en el ADN nuclear y siete por el ADN mitocondrial (Antonicka y col., 2003). La estructura tridimensional a 22 Å del complejo I tiene una forma de L que consta de un dominio membranaral intrínseco y otro dominio globular orientado hacia la matriz y unido a la membrana por un delgado tallo. El dominio globular contiene el sitio de unión del NADPH, mientras que el dominio membranaral contiene el sitio de unión a la ubiquinona y la región del tallo constituye, en parte, la vía de transferencia de los electrones entre dichos dominios (Grigorieff, 1998).

El complejo I se inhibe con rotenona, piericidina A, amital, y otros complejos naturales y sintéticos que tienen como característica común una estructura con la

cabeza cíclica, que corresponde al anillo de la ubiquinona, y una cola hidrofóbica que corresponde a las subunidades del isopreno (Grigorieff, 1998).

II. Succinato-Ubiquinona Oxidorreductasa (complejo II). El complejo II es una enzima que participa en la cadena respiratoria y en el ciclo de Krebs. Pertenece a una familia de enzimas de membrana que cataliza la oxidación del succinato a fumarato, acoplada a la reducción de la ubiquinona en la membrana. La reacción de oxidorreducción no está acoplada con la translocación de protones a través de la membrana. Esta enzima contiene un dominio periférico, expuesto a la matriz mitocondrial, formado por dos subunidades en donde se localiza como grupo prostético una molécula de dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y varios centros hierro-azufre, los cuales participan en la transferencia de electrones. El malonato y el oxaloacetato son potentes inhibidores que compiten con el sustrato dicarboxílico por la unión del sitio activo de este complejo (Pardo y col., 2001).

III. Ubiquinol-Citocromo c Oxidasa (Complejo III). El complejo III o complejo *bc₁*, es un complejo proteico oligomérico de membrana que transfiere dos electrones desde un quinol de relativamente bajo potencial redox a un citocromo c y bombea cuatro protones al lado electropositivo de la membrana por cada par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo c (Trumpower, 1990). Para la función catalítica del complejo III, únicamente son necesarias tres de sus subunidades, las cuales contienen los grupos prostéticos de la enzima: el citocromo b, la proteína Fe-S de Rieske y el citocromo *c₁* (Kessl y col., 2003).

IV. Citocromo c Oxidasa (complejo IV). Es el último de los complejos que participan en la cadena transportadora de electrones y cataliza la transferencia de cuatro electrones provenientes de cuatro moléculas de citocromo c reducido hacia una molécula de oxígeno, produciendo dos moléculas de agua y consumiendo cuatro protones. La energía libre disponible de esta reacción está acoplada a la translocación de cuatro protones adicionales (Michel, 1998). Este complejo está formado por 13 subunidades, en donde la unidad catalítica mínima de esta enzima está formada por las subunidades I y II, las cuales contienen los centros redox que participan en la oxidación del citocromo c y la reducción del oxígeno (Nyquist y

col., 2003).

V. ATP sintasa. También conocida como F₀F₁ ATPasa, es una proteína transmembranal. Esta enzima funciona en forma reversible: puede sintetizar ATP usando la fuerza protomotriz generada por el $\Delta\Psi$ a través de la membrana y puede hidrolizar ATP para bombear protones contra un gradiente electroquímico. La ATP sintasa está compuesta por dos subunidades funcionales, la F₀ y la F₁. La F₀ es un canal transmembranal de protones que contiene al menos ocho diferentes tipos de subunidades; la F₁ es una proteína membranal periférica compuesta por cinco subunidades (Voet y col., 2002).

VI. Ubiquinona. La ubiquinona (2,3-dimetoxi-5-metil-6-multiprenil-1,4-benzoquinona), o coenzima Q, es un compuesto soluble en lípidos, constituido por un núcleo quinoide que sufre cambios redox y una cadena lateral hidrofóbica que consta de varias unidades isoprenoides monoinsaturadas (Frei y col., 1990).

La principal función biológica de la ubiquinona es el transporte de electrones entre sistemas transmembranales, como la cadena transportadora de electrones, donde funciona como acarreador de electrones desde los complejos I y II hacia el complejo III, reduciéndose y obteniendo como producto ubiquinol. Además de esta función, la ubiquinona en su estado reducido ha sido reconocida como un potente antioxidante (Mellors y Tappel, 1966), protegiendo a los fosfolípidos, a las proteínas de membrana y al ADN mitocondrial del estrés oxidativo (Forsmark-André y Ernster, 1994).

VII. Citocromo c. El citocromo c es una pequeña proteína globular hidrofílica con un peso molecular de 13000 Da. Contiene un grupo hemo localizado a la mitad de la proteína, rodeado por residuos hidrófobos y unidos de manera covalente por dos residuos conservados de cisteína. El Fe³⁺ en el anillo de porfirina está coordinado al nitrógeno de una histidina y a un átomo de azufre de una metionina, previniendo de este modo la interacción del hemo con el oxígeno (Guérin, 1989). La función de esta proteína es mediar el transporte de electrones entre el complejo III y el complejo IV, sufriendo cambios redox en un electrón durante el proceso. El

citocromo c es aparentemente capaz de moverse a lo largo de la membrana para hacer colisiones efectivas entre estos dos complejos, gracias a que se une débilmente a la cara externa de la membrana interna mitocondrial por fuerzas electrostáticas (Beattie, 2002). Otra función importante que tiene es su participación en el proceso de apoptosis.

1.5 Proteínas G

Son proteínas que unen nucleótidos de guanina; por sus diferencias en cuanto a su peso y estructura molecular, se dividen en: heterotriméricas que constan de tres subunidades (α , β y γ) y monoméricas de una sola unidad (Milligan y Kostenis, 2006). Las proteínas G funcionan mediante un mecanismo altamente conservado: ciclan entre un estado activo (unido a GTP) e inactivo (unido a GDP), para pasar de un estado inactivo (GDP) a un activo (GTP) participa el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), posteriormente una proteína activadora de la actividad de GTPasa hidrolizará al GTP pasándolo a GDP e inactivando nuevamente a la proteína G.

1.5.1 Proteínas G Heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas constan de tres subunidades α , β y γ , cada una con una composición diferente de aminoácidos. Representan a una familia de proteínas altamente conservadas evolutivamente (Milligan y Kostenis, 2006). Se han identificado 20 subunidades α , 6 subunidades β y 12 subunidades γ , con pesos moleculares de 39 a 49 kDa, 35 a 39 kDa y 8 kDa respectivamente. Las proteínas G heterotriméricas originalmente se postularon en la señalización transmembranal por el requerimiento de GTP para la activación hormonal de la adenilato ciclasa (AC). Estas proteínas se encuentran acopladas a receptores transmembranales, denominados así por que contienen 7 dominios de aminoácidos hidrofóbicos que atraviesan la membrana citoplasmática (Wettschureck y Offermanns, 2005). En el estado inactivo, la subunidad G_α tiene unido GDP y las tres 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).

1.5.2 Proteínas G Monoméricas

Las pequeñas GTPasas están incluidas en la superfamilia de Ras, la cual 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 en base a su secuencia y similitudes funcionales: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran, las cuales poseen pesos moleculares semejantes (20-40kDa), diferenciándose así del resto de las proteínas con actividad GTPasa, como las proteínas G heterotriméricas (Takai, 2001).

1.5.2.1 Rho GTPasas

La familia de las Rho GTPasas son interruptores moleculares que regulan cascadas de señalización involucradas en la organización del citoesqueleto, expresión de genes, progresión del ciclo celular, motilidad celular (Etienne-Manneville y Hall, 2002). De los 14 miembros de la familia Rho encontrados en mamíferos, RhoA y RhoB así como Rac y Cdc42 son los mejor caracterizados. Las proteínas Rho fueron primeramente sugeridas en la regulación del citoesqueleto, las fibras de estrés y adhesiones focales en fibroblastos y la regulación de Ca^{2+} para la contracción del músculo liso. Adicionalmente, las proteínas Rho/Rac/Cdc42 están involucradas en diversos eventos celulares tales como el crecimiento celular y el tráfico de membranas. En las neuronas se ha visto la participación de las proteínas Rho como reguladores críticos de la morfogénesis del axón (Meyer y Feldman, 2002).

1.5.2.2 Inhibidores de las proteínas Rho

Exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*

Las mono-ADP-ribosiltransferasas (mADPRTs) modifican la función de muchas proteínas, transfiriendo un monómero de ADP-ribosa a partir del NAD^+ , a un aminoácido crucial en la función de la proteína blanco, liberando la nicotinamida (figura 3). El aceptor de la ADP-ribosa en las proteínas puede ser arginina y cisteína principalmente y en algunos casos asparagina e histidina. Existen dos subclases de las mADPRTs: 1) las exoenzimas, muchas de ellas modifican de forma irreversible a sus proteínas (toxinas bacterianas) y 2) enzimas intracelulares, que actúan regulando de forma reversible algunos procesos celulares endógenos tales como la actividad de algunas enzimas metabólicas y la transducción de señales (Ziegler, 2000; Corda y Di Girolamo, 2003).

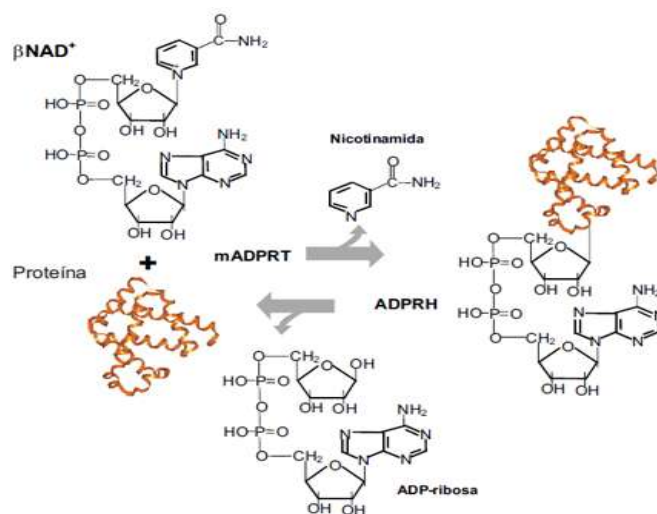


Figura 3. Reacción de mono-ADP-ribosilación. Las mono-ADP-ribosiltransferasas (mADPRTs) usan βNAD^+ para transferir una molécula de ADP-ribosa a una proteína blanco, liberando nicotinamida. En algunos casos, esta reacción puede ser reversible por la actividad de ADP-ribosilhidrolasas (ADPRH), liberando la ADP-ribosa de la proteína (Corda y Di Girolamo, 2003).

Existen 2 clases de toxinas 1) las que poseen los componentes A-B (B componente de unión al receptor de la célula blanco, necesario para la translocación del fragmento A por la membrana de la célula. 2) Estas carecen del dominio B como la exoenzima C3, estas son inyectadas por la bacteria directamente al citoplasma de las células blanco, aún se desconoce el mecanismo

por el cual entran a la célula (Ludden, 1994). Antecedentes indican que las proteínas Rho A, B y C son modificadas selectivamente, debido a que la exoenzima C3 se une a Arg 41 causando un cambio conformacional, impidiendo que se active la proteína Rho al no unirse el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF). Esto ha sido aplicado como una herramienta farmacológica para elucidar la función celular de las Rho GTPasas (Aktories y Barbieri, 2005).

NSC23766

Es un pequeño compuesto químico identificado en la base de datos del National Cancer Institute. Este compuesto es capaz de discriminar a Rac1 de Cdc42 y RhoA, específicamente inhibiendo la activación de Rac1 por GEF. La mayor unión entre NSC23766 y Rac1 es de naturaleza hidrofóbica, los átomos de nitrógeno del NSC23766 forman tres enlaces de hidrógeno con los residuos de Rac1, y el efecto del apilamiento del anillo medio de pirimidina de NSC23766 con Trp 56 del anillo indol esto puede contribuir significativamente a la interacción (figura 4), impidiendo así la unión de GEF con la proteína Rac1 (Gao y col., 2004).

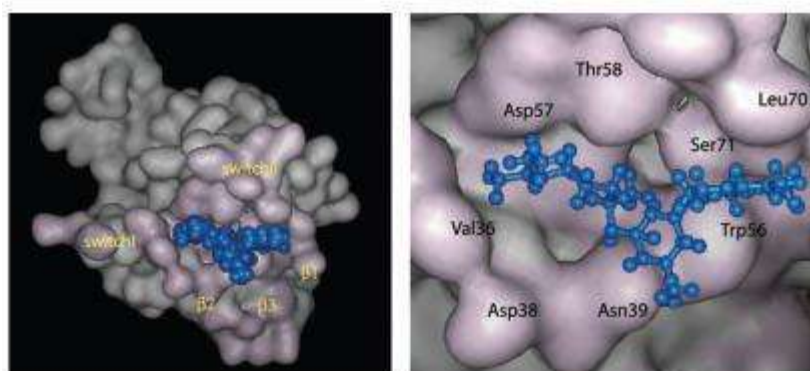


Figura 4. Modelo de acoplamiento simulado de NSC23766 en la superficie de Rac1. El modelo de acoplamiento se ha generado con el programa de FLEXX y se visualizó con ViewerPro. (Izquierda) Localización del sitio de unión de NSC23766 a Rac1. (Derecho) contactos estructurales de NSC23766 con Rac1 (Gao y col., 2004).

2.- Antecedentes

2.1 Proteínas Rho en el cerebro

Entre los integrantes de la familia de Rho GTPasas, las proteínas Rho, Rac1 y Cdc42, se han visto ampliamente distribuidas en el cerebro (O'Kane y col., 2003) además de estar involucradas en procesos como plasticidad y migración neuronal, guía del cono de crecimiento y en la sinapsis (Olenik y col., 1997; Bolis y col., 2003; Georges y col., 2008). Además, se ha visto que tanto Rac1 y Cdc42 actúan de diferente manera sobre el alargamiento de las neuritas. Específicamente, la activación de Rac1 y Cdc42 estimulan la formación de espinas, además de la ramificación de las dendritas, mientras que RhoA ejerce una acción inhibitoria (Tashiro y col., 2000; Van Aelst y Cline, 2004). Los ratones transgénicos con sobreexpresión de la proteína Rac1 de humano, al mantenerse constitutivamente activa en células de Purkinje, muestran aumentos en la densidad de las espinas dendríticas y la aparición de las sinapsis supernumerarias (Luo y col., 1996). También se han descrito efectos antagonistas de RhoA y Rac1 en la elongación axonal. En general, la activación de Rac1 promueve el alargamiento del axón, mientras que RhoA antagoniza el efecto (Fournier y col., 2003; Montenegro-Venegas y col., 2010).

2.2 Las proteínas Rho y la mitocondria

Existe evidencia de la presencia de las proteínas Rho en las mitocondrias y algunas de sus posibles funciones. 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. Recientemente, por ensayos de Western blot se encontró a la proteína Rac1 presente en macrófagos alveolares, sugiriendo tener un papel importante en la fibrosis pulmonar (Osborn-Heaford y col., 2012). Martínez-Alcantar (2012) en su trabajo de tesis de maestría, realiza un subfraccionamiento mitocondrial en donde mediante ensayos de Western blot determina la presencia de las proteínas Rho y Rac1 en la membrana interna

mitocondrial en cerebro de rata (fig. 5).

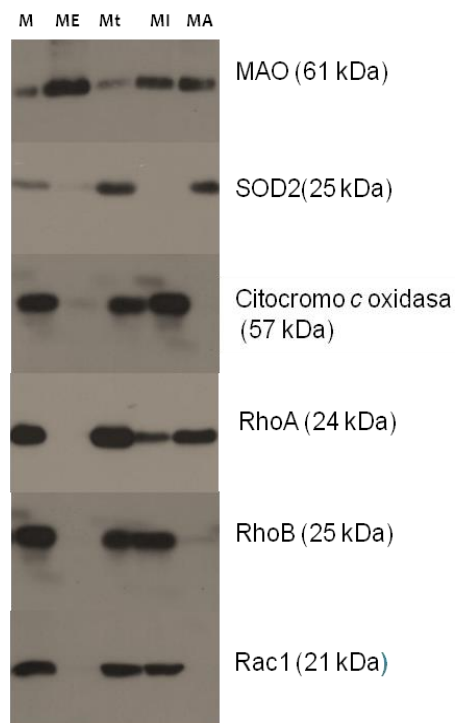


Figura 5. Localización mitocondrial de las proteínas RhoA, RhoB y Rac1. Se cargaron 30 µg de proteína de cada subfracción mitocondrial (membrana externa (ME), mitoplastos (Mt), membrana interna (MI) y matriz mitocondrial (MA) y las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 13%. Las proteínas fueron transferidas 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.

2.3 Relación entre las proteínas Rho y los niveles de ATP

Diversos trabajos han demostrado que existe una relación entre las proteínas Rho y el ATP, tal es el caso del trabajo realizado por Fu-Quan y col. (2012) quienes en células ciliares sensoriales de la cóclea en ratones sugieren que el trauma por ruido conduce a una disfunción en el metabolismo causando el agotamiento de la energía y la activación de las vías de señalización de la GTPasa de la familia Rho (en este caso Rac) en la cóclea. Dicha activación conduce a la formación de ROS a través de la NADPH oxidasa, que a su vez da como resultado la muerte de las células ciliadas. Hallett y col. (2003) observan que durante la isquemia existe una

disminución en los niveles de ATP intracelular y con ello se observa una disminución de los niveles de la proteína RhoA-GTP y a su vez un incremento en la expresión de la proteína Rac1. Finalmente en un estudio realizado por Tanaka y col., en el 2010, encontraron que la inhibición de la actividad de la proteína Rho en miofibrillas de músculo esquelético de rata con la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*, disminuye significativamente el potencial de membrana mitocondrial y a su vez indicando con esto una disminución en la síntesis de ATP.

3.- Justificación

El cerebro es uno de los órganos que demanda gran cantidad de energía, la cual es proporcionada principalmente por la mitocondria. Antecedentes directos muestran la presencia de las proteínas Rho y Rac en la membrana interna de mitocondrias de cerebro de rata, desconociéndose su función en las mismas. Por lo anterior, resulta importante investigar la posible función de las proteínas Rho y Rac en los procesos mitocondriales relacionados con la producción de energía.

4.- Hipótesis

Las proteínas Rho y Rac participan en los procesos mitocondriales relacionados con la producción de energía en las mitocondrias de cerebro de rata.

5.- Objetivos

5.1 Objetivo General

Determinar la participación de las proteínas Rho y Rac en los procesos mitocondriales relacionados con la producción de energía en las mitocondrias de cerebro de rata.

5.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la colocalización de las proteínas Rho A y Rho B en las mitocondrias de cerebro de rata.
2. Evaluar la función de las proteínas Rho y Rac en el consumo de oxígeno y fosforilación oxidativa en las mitocondrias de cerebro de rata.
3. Determinar la influencia de las proteínas Rho y Rac en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias de cerebro de rata.
4. Evaluar la participación de las proteínas Rho y Rac en la actividad de la ATPasa mitocondrial en cerebro de rata.
5. Determinar el papel de las proteínas Rho y Rac en el potencial de membrana de las mitocondrias de cerebro de rata.

6.- Materiales y Métodos

6.1 *Material biológico*

Se emplearon ratas Wistar macho de 3 meses de edad (peso entre 250-300g) obtenidas de la Unidad de Biomédicas de la Facultad de Estudios Superiores, Campus Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, México. Fueron mantenidas bajo condiciones de bioterio con la temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Fueron alimentadas con una dieta especial para roedores y agua *ad libitum* en el Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana. Para el manejo de los animales se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales expedida por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

6.2 *Inmunofluorescencia*

Cinco ratas fueron profundamente anestesiadas con pentobarbital sódico (45mg/kg de peso corporal) y fijadas mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído amortiguado al 4% antecedido por solución salina al 0.9%. Los cerebros de estos animales fueron disecados, postfijados durante 24 horas en la misma solución e incubados en sacarosa al 30% durante 3 días a 4°C. Posteriormente los cerebros fueron congelados en 2-metil-butano previamente enfriado a -75°C y seccionados sagitalmente a 30µm en criostato. Los cortes resultantes fueron almacenados a -20°C en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% PBS) hasta su uso. Para realizar la inmunofluorescencia únicamente fueron seleccionados cortes contiguos de cerebelo, dado que esta estructura contiene neuronas de gran tamaño que facilitarían la identificación de mitocondrias en su citoplasma. Dichos cortes fueron lavados con 400µl de PBS (3 veces), permeabilizados con PBT (Tritón X-100 al 0.3% en PBS). Posteriormente, las muestras fueron incubadas en buffer de citratos como desenmascarador de antígenos por 90 min a 65°C. Después se incubó con la misma solución a

temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, los cortes fueron lavados nuevamente con PBT e incubados en suero de bloqueo (5% suero de caballo en PBT) durante 60 min. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios anti-Rho A, Rho B (Santa Cruz Biotechnology sc-179 y sc-180 anti-rabbit), y citocromo c oxidasa (Santa cruz Biotechnology sc-58347 anti-mouse) se utilizaron a una dilución 1:100 en suero de bloqueo durante 48 h a 4°C.

Posteriormente los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario IgG conjugados a Alexa fluor 488 (Molecular Probes A 21202 donkey anti-mouse) y Alexa fluor 594 (Molecular Probes A 21207 donkey anti-rabbit) a una dilución 1:250 en suero de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente, protegido de la luz y en agitación constante. Posteriormente, los cortes fueron lavados con PBT e incubados por 2 min con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), después, nuevamente se lavaron con PBT y fueron montados en portaobjetos y fijados con DAKO (solución fotoprotectora). Finalmente se tomaron las microscopias en un microscopio confocal Olympus FV1000. El experimento se repitió por lo menos 4 veces.

6.3 Purificación de las mitocondrias de cerebro de rata

Las mitocondrias fueron aisladas mediante centrifugación diferencial de acuerdo al método descrito por Sims (1990). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, una vez obtenido el cerebro fue removido el cerebelo. El cerebro fue cortado, lavado y homogenizado con un homogenizador manual en medio de aislamiento (sacarosa 70 mM, manitol 210 mM, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) 1 mM, albúmina 0.5%, ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico (MOPS) 1 mM, pH=7.4). El homogenado fue centrifugado a 2180 rpm durante 10 min. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 10,350 rpm por 10min. En seguida se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con Percoll al 15% el cual se depositó sobre un gradiente de Percoll de 40% y 23% previamente preparado, y fue centrifugado a 19,600 rpm por 15 min. Después de la centrifugación se obtuvieron 3 bandas, y se extrajo la fracción 3 con ayuda de una pipeta Pasteur la cual se diluyó (1:4) con medio de aislamiento y se centrifugó a 14,000 rpm por 10

min. Posteriormente se descarta el sobrenadante y la pastilla se resuspende con una pipeta de plástico, se adicionan 500 µl de albúmina (10 mg/ml), 3.0 ml de medio de aislamiento y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. Por último la pastilla es resuspendida en 500 µl de medio de aislamiento.

6.4 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret (Gornall y col., 1949). Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen de acuerdo del experimento a realizar (1 mg/ml, 0.3 mg/ml y 0.1 mg/ml).

6.5 Determinación del consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno se midió empleando un electrodo tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. La cámara del electrodo fue lavada una vez con etanol al 70%, seguido de tres lavados con agua desionizada. Las mitocondrias (0.5mg/ml) fueron incubadas con los inhibidores de Rho (C3: 0.15, 1.5 y 7.5 µg/ml) y Rac (NSC23766: 50, 100 y 200 µM) por 30 minutos, fueron adicionadas a la cámara, la cual previamente contenía el medio de respiración (100 mM KCl, 75 mM manitol, 25 mM sacarosa, 0.05 mM EDTA, pH 7.4). La cámara se dejó equilibrar en agitación constante para permitir la saturación de aire del medio de respiración. Inmediatamente fue inducida la respiración basal (estado 4) el cual es estimulado por la adición de 10 mM de glutamato/malato. Una vez transcurridos 5 min, se adicionó ADP (0.2 mM) para estimular al máximo la respiración (estado 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 consumen las mitocondrias.

El CR fue determinado mediante la siguiente relación:

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

6.6 Determinación de la fosforilación oxidativa

La fosforilación oxidativa fue medida por luminiscencia empleando un Kit comercial A22066 de Molecular Probes. Las mitocondrias purificadas (0.1 mg/ml) e incubadas con los inhibidores de Rho (C3: 0.15, 1.5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$) y Rac (NSC23766: 50, 100 y 200 μM) fueron agregadas en una mezcla de reacción que contenía: 0.5 mM D-luciferina, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ luciferasa de luciérnaga, 25 mM buffer de tricina, pH 7.8, 5 mM MgSO_4 , 100 μM EDTA y 1 mM DTT (ditiotreitól), para iniciar la reacción. Inmediatamente la luminiscencia fue leída en un luminómetro GloMax 20/20 (Promega). Se realizaron 30 lecturas una cada 10 segundos durante 5 minutos (Drew y Leeuwenburgh, 2003).

6.7 Actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones

Para medir los complejos respiratorios se realizaron oximetrías empleando un electrodo tipo Clark como ya se describió anteriormente. En este caso el consumo de oxígeno fue medido únicamente en el estado 3. Las mitocondrias (0.5 mg/ml) fueron incubadas con las concentraciones seleccionadas de los inhibidores específicos de las proteínas Rho (0.15 $\mu\text{g/ml}$ de C3) y Rac (200 μM de NSC23766) durante 30 min. Posteriormente, se emplearon los sustratos e inhibidores para cada uno de los complejos; para el complejo I el sustrato fue glutamato/malato (10 mM) y se inhibió con Rotenona (5 μM), para el complejo II el sustrato fue succinato (10 mM) inhibido con tenoiltrifluoroacetona (TTFA) (0.025 μM), complejo II + III fue inhibido con antimicina A y para el complejo IV el sustrato fue ascorbato (0.025 μM)/N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) (0.5 μM) y se abatió la respiración con KCN (1 mM).

6.8 Actividad de ATPasa

Las mitocondrias se trataron con los inhibidores específicos de las proteínas Rho (0.15 $\mu\text{g/ml}$ de C3) y Rac (200 μM de NSC23766), después del tiempo de incubación se trataron con 2 mM de ATP durante 30 min en un medio de reacción (20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , pH 8.5). La reacción de la ATPasa se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) al 30% para tener un volumen final de 2.5 ml. Posteriormente, se determinó el P inorgánico liberado por el método de Fiske y

Subbarow (1925). A todas las muestras, incluyendo los blancos, se les adicionó una solución de molibdato de amonio y solución ELON (*p*-metil-aminofenol-sulfato). El P inorgánico libre fue determinado midiendo la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro UV/vis Perkin-Elmer Lambda 18 contra un blanco que contiene todos los reactivos menos la proteína.

6.9 Determinación del potencial transmembranal

El $\Delta\Psi$ se determinó mediante espectrofotometría, empleando el indicador safranina O (Colonnas y col., 1973). Las mitocondrias incubadas con los inhibidores específicos de las proteínas Rho (0.15 $\mu\text{g/ml}$ de C3) y Rac (200 μM de NSC23766), se resuspendieron en un medio que contenía 10 mM Hepes, 100 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 y 3 nM MgCl_2 , pH 7.4 durante 30 min. Cambios de la fluorescencia de la safranina se siguieron a una λ_{em} 586 y una λ_{ex} 495 nm en un espectrofluorómetro “Shimadzu RF-5301PC”. Después de 1 min de iniciada la lectura, se agregó 10 mM de glutamato/malato y a los 4 min se añadió 5 μM de CCCP (carbonilcianuro-clorofenilhidrazona) para abatir el potencial de membrana mitocondrial.

6.10 Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas de los datos fueron determinadas con la prueba *t* de Student con el programa Sigma Plot Versión 11.0, considerándose una significancia estadística con una $p < 0.01$ y $p < 0.05$.

7.- Resultados

7.1 Colocalización de las proteínas Rho A y Rho B en mitocondrias

Debido a lo novedoso del resultado obtenido por Martínez-Alcantar (2012), en donde por Western blot se inmunodetectaron las proteínas Rho y Rac principalmente en la membrana interna de las mitocondrias de cerebro de rata. Resulta importante analizar, empleando otra técnica, la presencia de las proteínas Rho en mitocondria. Es por ello que se decidió determinar la colocalización de las proteínas Rho A y Rho B en mitocondrias, empleando una doble marca con la técnica de inmunofluorescencia en cortes de cerebelo de rata.

En los paneles A de las figuras 5 y 6 se observa con fluorescencia en color rojo la localización de las proteínas Rho A y Rho B respectivamente, observándose una distribución en las tres capas de la corteza del cerebelo: corteza granular, células de Purkinje y capa molecular (C.G, C.P y C.M), mostrando una localización en el soma de las células de Purkinje de manera puntiforme, y a lo largo de las neuritas presentes en la capa molecular (C.M), aún cuando en la capa granular (C.G) también se observa su presencia, es complicado determinar su localización por el aglutinamiento de las células. En los paneles B de las figuras antes mencionadas, en color verde se muestra la distribución de la citocromo c oxidasa (marcador mitocondrial), observándose una distribución en las tres capas de la corteza del cerebelo (C.G, C.P y C.M), semejante a la de los paneles A. En los paneles C, en color azul, se muestran los núcleos, observándose un aglutinamiento de los mismos en la capa granular (C.G) y en las otras capas (C.P y C.M) se muestran más dispersos. En los paneles D de ambas figuras (5 y 6), se muestra el empalme de las tres imágenes anteriores, observándose en diferentes tonos de amarillo, representando la mayor intensidad al lugar en donde hay una mayor colocalización de la proteína Rho con el citocromo c oxidasa.

En el panel D de la figura 5 se muestra la mayor intensidad de amarillo rodeando al núcleo de las células de Purkinje (C.P) y en algunos puntos a lo largo de las neuritas (C.M). Corroborando con esto la presencia de la proteína Rho A en las mitocondrias de cerebro de rata.

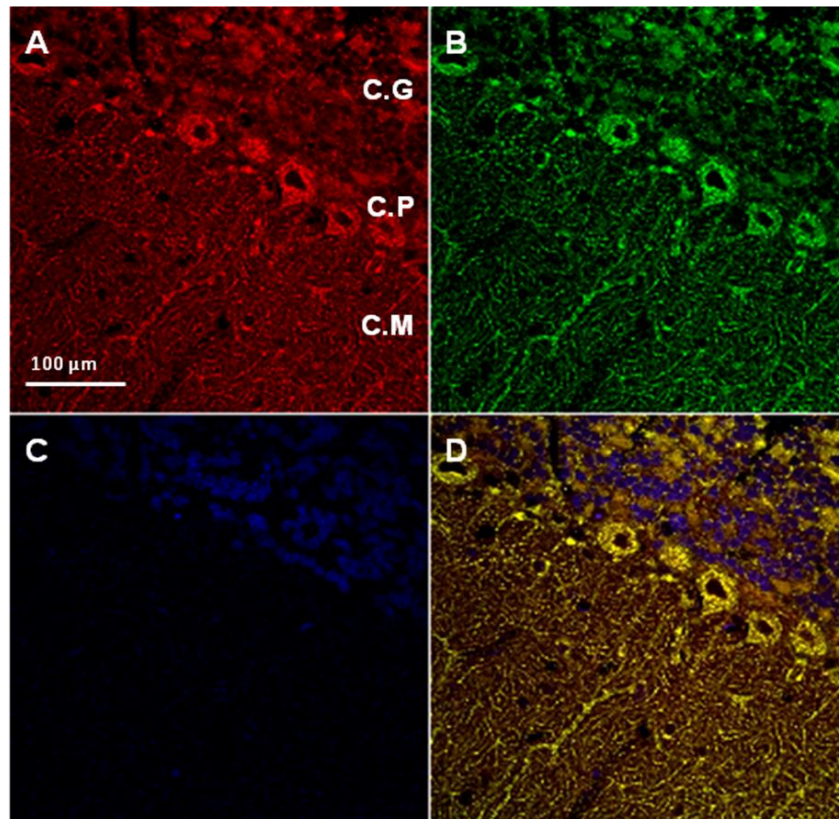


Figura 5. Colocalización de la proteína Rho A en las mitocondrias de cerebelo de rata. Fotografías de microscopía confocal donde se muestra la inmunofluorescencia para la proteína Rho A en rojo (A), para el marcador mitocondrial citocromo c oxidasa en verde (B) y la tinción para el marcador nuclear DAPI en azul (C), así como el empalme de las tres fotografías (D). Imágenes representativas de al menos 4 repeticiones independientes a 60x. Capa granular (C.G), capa de células de Purkinje (C.P) y capa molecular (C.M). Nótese la colocalización de los dos anticuerpos en color amarillo.

En el panel D de la figura 6 se puede apreciar una mayor colocalización de la proteína Rho B con el marcador mitocondrial en todo el soma de las células de Purkinje (C.P), disminuyendo esta marca en la capa molecular (C.M). Al mismo tiempo se aprecia una marca de la proteína Rho B que rodea a las células de Purkinje, sugiriendo su presencia en el montículo neuronal de estas células. Con estos resultados tanto de la proteína Rho A y Rho B entonces podemos decir que ambas proteínas se encuentran distribuidas en las tres capas del cerebelo de rata, además de encontrarse distribuidas de manera diferencial. Con estos resultados entonces se corrobora la presencia de las proteínas Rho A y Rho B en las mitocondrias.

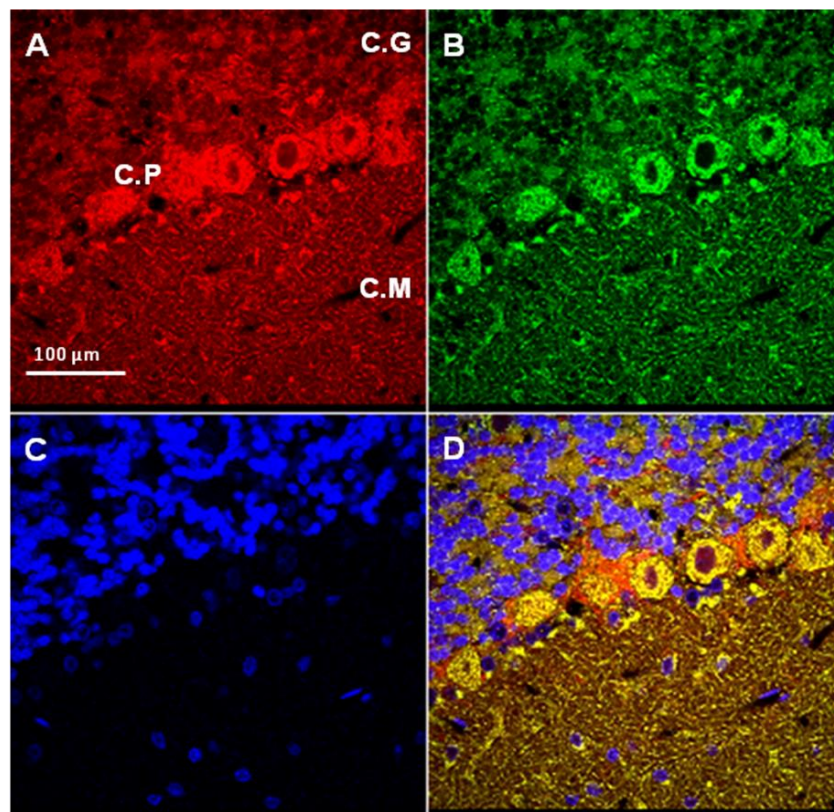


Figura 5. Colocalización de la proteína Rho B en las mitocondrias de cerebelo de rata. Fotografías de microscopía confocal donde se muestra la inmunofluorescencia para la proteína Rho B en rojo (A), para el marcador mitocondrial citocromo c oxidasa en verde (B) y la tinción para el marcador nuclear DAPI en azul (C), así como el empalme de las tres fotografías (D). Imágenes representativas de al menos 4 repeticiones independientes a 60x. Capa granular (C.G), capa de células de Purkinje (C.P) y capa molecular (C.M). Nótese la colocalización de los dos anticuerpos en color amarillo.

7.2 Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre el consumo de oxígeno

Con la finalidad de investigar la posible función de las proteínas Rho y Rac sobre el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa en las mitocondrias de cerebro de rata, se realizaron oximetrías, utilizando los inhibidores específicos de las proteínas Rho (exoenzima C3) y Rac (NSC23766) a diferentes concentraciones. En el panel A de la figura 7 se muestran los resultados del estado 3 del consumo de oxígeno al inhibir a la proteína Rho, a las diferentes concentraciones del inhibidor C3 (0.15, 1.5 y 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Se observa en el control un consumo de oxígeno basal de 0.11 μM de $\text{O}_2/\text{min} \cdot \text{mg}$ el cual se vio disminuido significativamente en un 50, 45 y 35% con las tres concentraciones de C3 (0.15, 1.5 y 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con respecto al control (100%). En el panel B se grafica el estado 4 del consumo de oxígeno, en donde se puede observar que no existen diferencias significativas en el consumo de oxígeno con las diferentes concentraciones del inhibidor C3 (0.15, 1.5 y 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con respecto al control. Al verse una disminución considerable en el estado 3, el acoplamiento mitocondrial (cociente respiratorio) se vio afectado al ser inhibida la proteína Rho por C3 con las diferentes concentraciones, obteniendo una disminución de alrededor de un 50% en todos los tratamientos con respecto al control (100%), lo cual se aprecia en el panel C. Al obtener un efecto sobre el estado 3 del consumo de oxígeno, que es el reflejo de la fosforilación oxidativa, sugiere un efecto directo sobre la síntesis de ATP al inhibir a la proteína Rho.

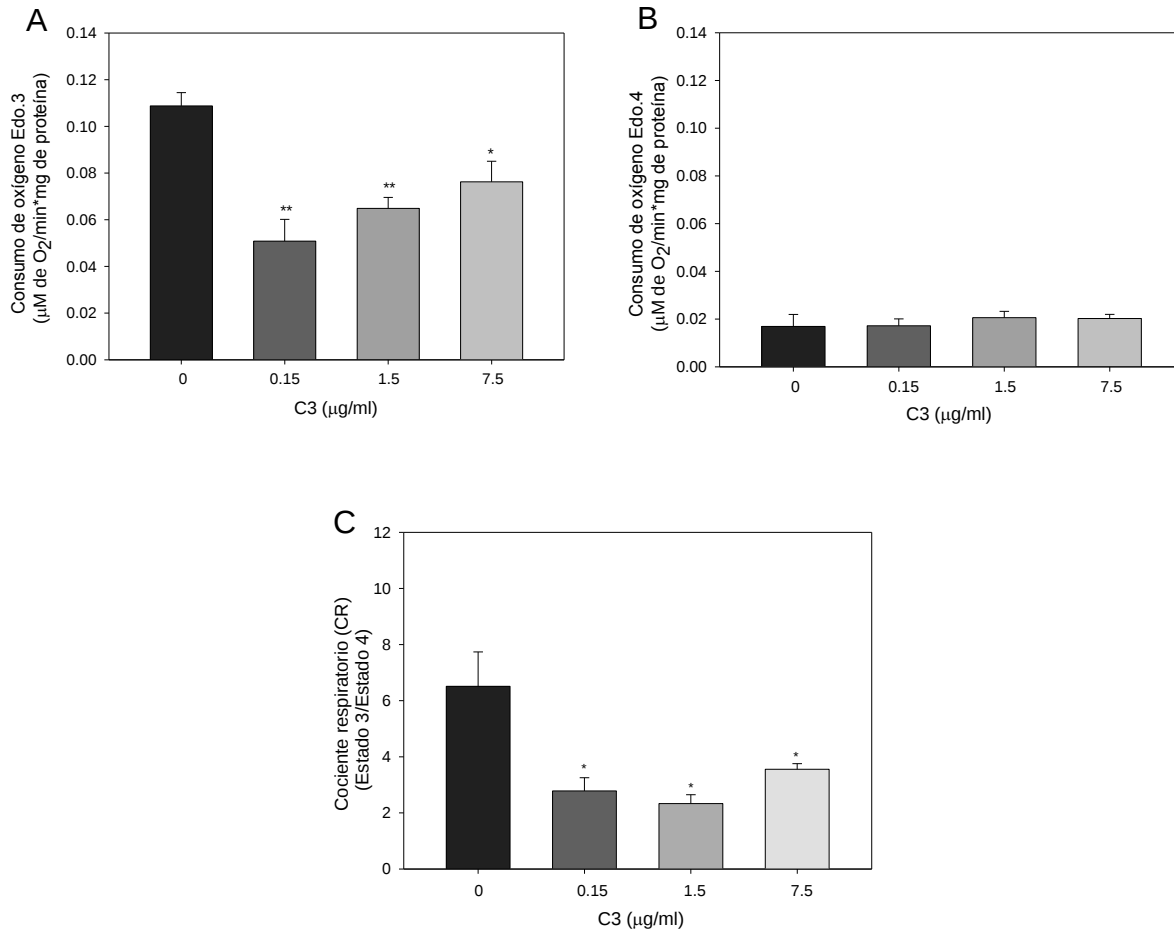


Figura 7. Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias de cerebro de rata. Las mitocondrias purificadas fueron incubadas con el inhibidor específico de la proteína Rho (exoenzima C3) a las concentraciones de 0.15, 1.5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min. Se inició la reacción agregando glutamato/malato (10 mM), posteriormente ADP (0.2 mM) y para cesar el consumo de oxígeno se agregó KCN. En el panel A se representa el estado 3 y en el panel B el estado 4 del consumo de oxígeno. El panel C representa el cociente respiratorio. Estos resultados son el promedio de 4 - 5 experimentos independientes * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$.

De igual manera se emplearon diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Rac, NSC23766 (50, 100 y 200 μM), para evaluar su participación sobre el consumo de oxígeno (figura 8), al analizar los resultados se observó una disminución de alrededor de 35% (con la concentración de 50 μM) y 45% (con las concentraciones de 100 y 200 μM), siendo significativa para las tres concentraciones con respecto al control (100%), en el estado 3 el consumo de oxígeno (panel A). En el estado 4 del consumo de oxígeno al inhibir con NSC23766, no se observaron diferencias significativas con ninguna concentración

con respecto al control (panel B), sugiriendo un posible efecto sobre la fosforilación oxidativa. El panel C representa el cociente respiratorio (CR), el cual no muestra diferencias significativas con respecto al control aun cuando se observa una tendencia a disminuir. Observándose con estos resultados un comportamiento similar al que se obtuvo al inhibir a la proteína Rho (con C3). Estos resultados sugieren que ambas proteínas, Rho y Rac tienen una influencia directa sobre la síntesis del ATP al verse afectado en ambos casos el estado 3 del consumo de oxígeno.

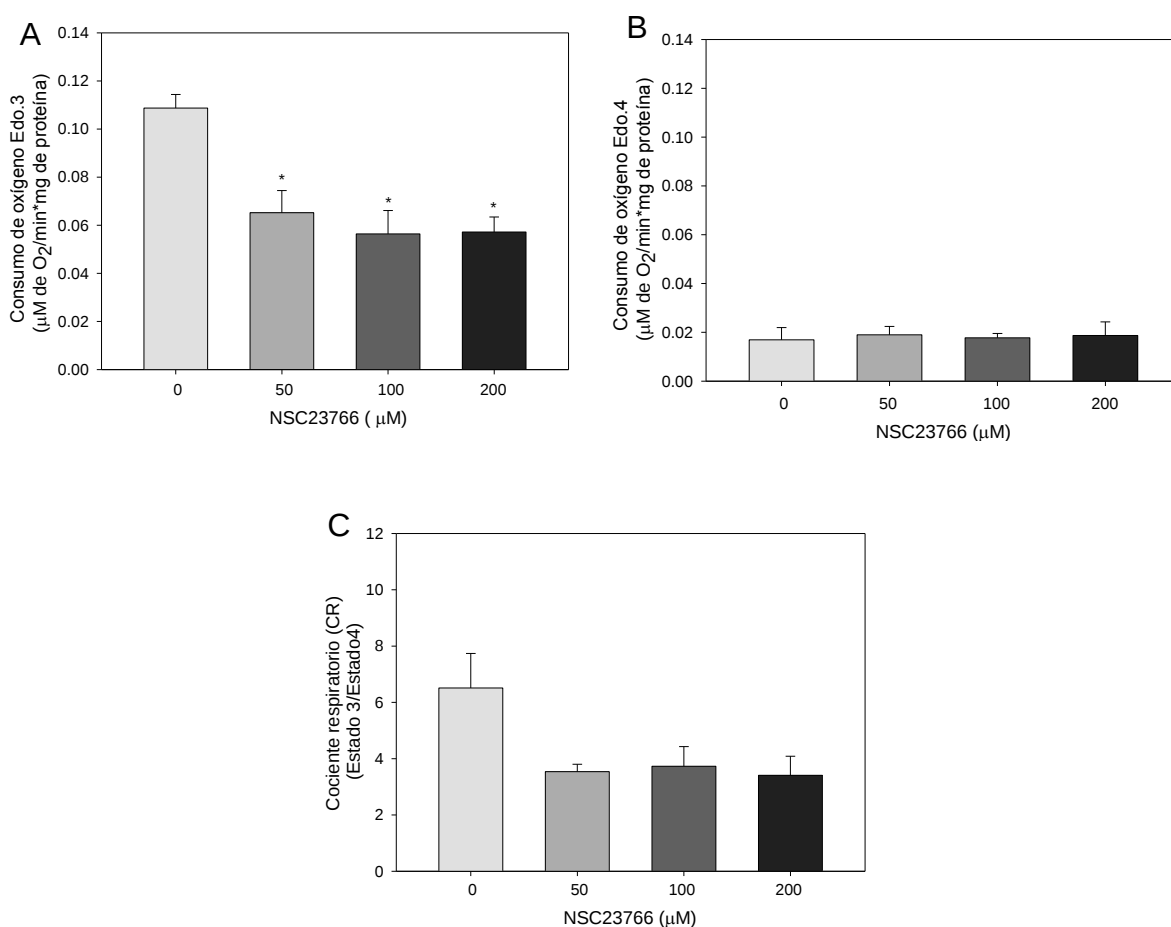


Figura 8. Influencia de la proteína Rac sobre el consumo de oxígeno en las mitocondrias de cerebro de rata. Las mitocondrias purificadas fueron incubadas con el inhibidor específico de la proteína Rac (NSC23766) a las concentraciones de 50, 100 y 200 μM durante 30min. Se inicio la reacción agregando glutamato/malato (10 mM), posterior mente ADP (0.2 mM) y para cesar el consumo de oxígeno se agrego KCN. En el panel A se representa el estado 3 y en el panel B el estado 4 del consumo de oxígeno. El panel C representa el cociente respiratorio. Estos resultados son el promedio de 4-5 experimentos independientes *P < 0.05

7.3 Efecto de la inhibición de las proteínas Rho y Rac1 en la síntesis de ATP

Al observar que existen diferencias significativas en el estado 3 del consumo de oxígeno, se decidió determinar la participación de las proteínas Rho y Rac sobre la síntesis de ATP, la cual fue determinada por luminiscencia (normalizada con el control en %) a las diferentes concentraciones de C3 (0.15, 1.5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$) y NSC23766 (50, 100 y 200 μM). En la figura 9A se muestra el resultado de la inhibición de la proteína Rho a las diferentes concentraciones de C3, en donde se observa una disminución significativa con respecto al control de alrededor del 20%, no existiendo diferencias significativas entre las concentraciones. Al inhibir a la proteína Rac (NSC23766), se puede observar en el panel B, que existe una inhibición de alrededor de un 30% con respecto al control, pero no entre las diferentes concentraciones del inhibidor. Con estos resultados se confirma que las proteínas Rho y Rac están involucradas en la fosforilación oxidativa, como sugirió la inhibición del consumo de oxígeno en el estado 3 del experimento anterior. Los datos anteriores nos sugieren que las proteínas Rho y Rac participan regulando los mecanismos involucrados con la producción de ATP, tales como la cadena transportadora de electrones, la actividad de la F₀F₁ ATPasa y el potencial de membrana.

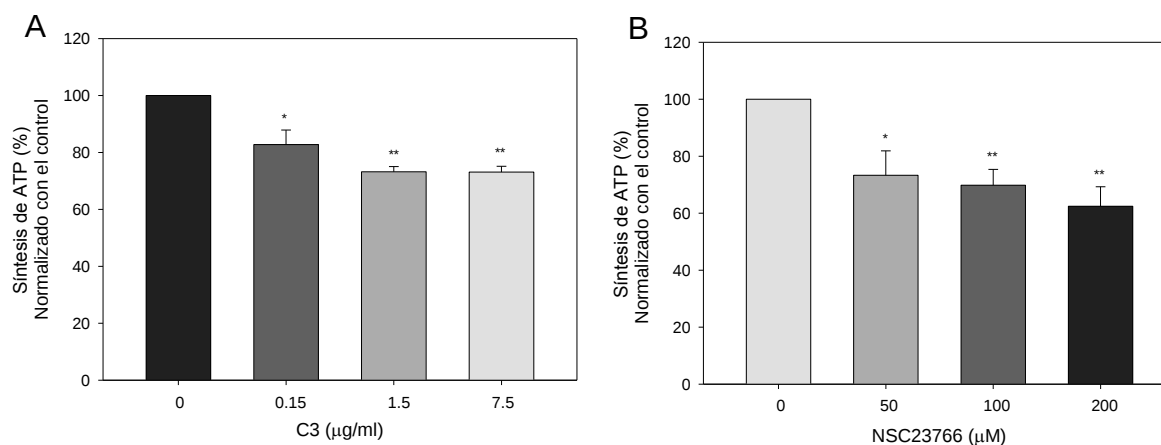


Figura 9. Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la síntesis de ATP en las mitocondrias de cerebro de rata. La síntesis de ATP fue medida mediante la técnica de luminiscencia, empleando como sustrato de la cadena respiratoria glutamato/malato. En el panel A se representa la síntesis de ATP con las diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Rho (C3) y en el panel B las diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Rac (NSC23766). n=4 *P < 0.05 **P < 0.01

7.4 Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de los complejos respiratorios de la cadena transportadora de electrones

Los complejos de la cadena transportadora de electrones fueron medidos con la finalidad de determinar si están involucrados en la disminución de la síntesis de ATP, al verse afectado a su vez el potencial de membrana, que es el que proporcionara la energía a la ATPasa para sintetizar ATP. Los complejos fueron medidos empleando los sustratos e inhibidores para cada uno de los complejos como se explica en materiales y métodos. Además se seleccionó una concentración de cada uno de los inhibidores de las proteínas Rho (0.15 $\mu\text{g/ml}$ de C3) y Rac (200 μM NSC23766). En la figura 10 se muestra la actividad de cada uno de los complejos, observándose que en los complejos II, II + III y IV no hay ningún efecto al inhibir a las proteínas Rho y Rac, pero si en el complejo I observándose una tendencia a disminuir al inhibir a la proteína Rho y existiendo disminución significativa el 53% con respecto al control, al inhibir a la proteína Rac. Los resultados obtenidos indican que las proteínas Rho y Rac no están involucradas en la actividad de la cadena transportadora de electrones y que es probable que la inhibición que se observa en la actividad del complejo I, no sea suficiente para disminuir significativamente la síntesis de ATP.

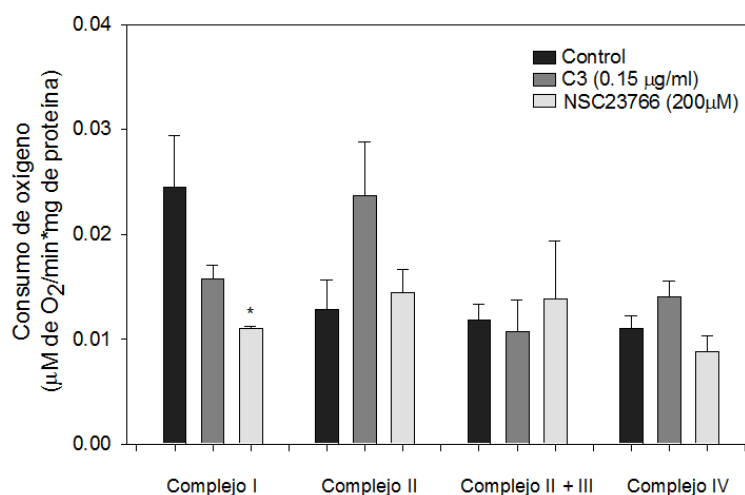


Figura 10. Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones. Oximetrías empleando los sustratos e inhibidores de los complejos de la CTE. Además se emplearon concentraciones representativas de los inhibidores de las proteínas Rho (0.15 $\mu\text{g/ml}$ de C3) y Rac (200 μM NSC23766). En barras negras se representa el control, en barras gris oscuro la concentración del inhibidor de Rho (0.15 $\mu\text{g/ml}$ de C3) y en barras gris claro la concentración del inhibidor de Rac (200 μM NSC23766). $n = 4$ * $P < 0.05$

7.5 Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de la F₀F₁ ATPasa mitocondrial

Al observar que al inhibir a las proteínas Rho y Rac, no tuvieron efecto sobre la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones, entonces se decidió evaluar a la F₀F₁ ATPasa, ya que es el complejo enzimático encargado de sintetizar el ATP, con la finalidad de esclarecer el efecto observado en el estado 3 del consumo de oxígeno. La actividad de la ATPasa fue medida en presencia de los inhibidores de las proteínas Rho (C3) y Rac (NSC23766), además como control, para descartar el P presente en la muestra, se utilizó la oligomicina que es el inhibidor de la ATPasa. En la figura 11 panel A, con las tres concentraciones del inhibidor de la proteína Rho (C3 0.15, 1.5 y 7.5 µg/ml) se observa una disminución alrededor del 20% con respecto al control (100%). En el panel B, de igual manera se observa que al inhibir a la proteína Rac con las tres concentraciones de NSC23766 (50, 100 y 200 µM), hay una disminución significativa de alrededor del 20% con respecto al control (100%). Estos resultados sugieren que las proteínas Rho y Rac están involucradas en la actividad de la F₀F₁ ATPasa y es por ello que se ve afectada la síntesis de ATP.

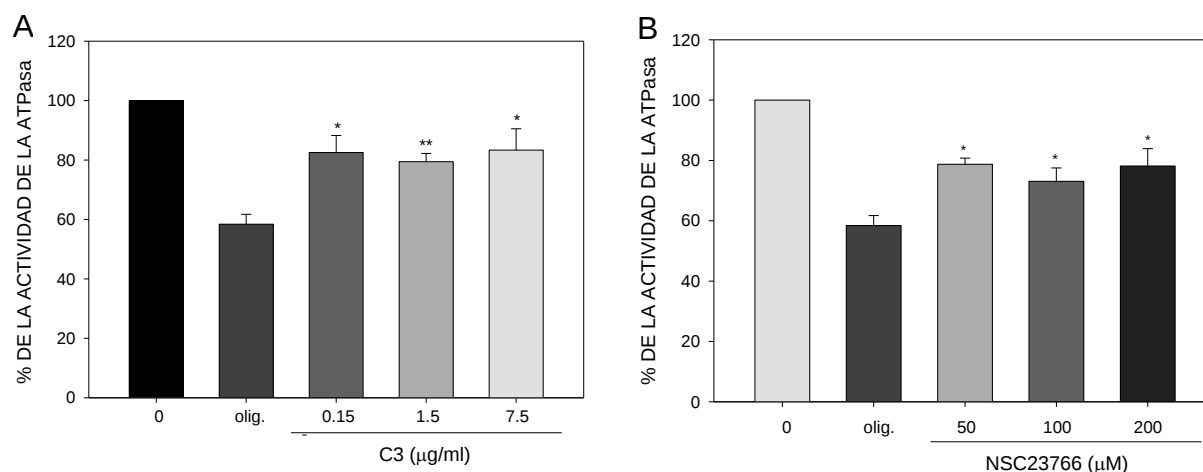


Figura 11. Participación de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de la F₀F₁ ATPasa mitocondrial. La ATPasa fue medida espectrofotométricamente a 660 nm, en el panel A se representa la actividad de la ATPasa en %, inhibiendo a la proteína Rho (exoenzima C3) y en el panel B con el inhibidor de la proteína Rac (NSC23766). Como control se utilizó oligomicina (inhibidor de la ATPasa). n= 5 *P < 0.05 **P < 0.01

7.6 Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre el potencial de membrana mitocondrial

Se sabe que para que se lleve a cabo la síntesis de ATP por la actividad de la ATPasa, es necesario que exista un potencial de membrana. Es por este motivo que se decidió medir este parámetro, con la finalidad de determinar si las proteínas Rho y Rac lo pudieran estar modulando. En la figura 12 se muestran los resultados del potencial de membrana, en donde se puede observar que no existe un efecto significativo de las concentraciones de los inhibidores de ambas proteínas (Rho y Rac) con respecto al control. Indicando con esto que las proteínas Rho y Rac no participan en el potencial de membrana y que la disminución de la síntesis de ATP es solo debida a la disminución en la actividad de la ATPasa por la inhibición de dichas proteínas.

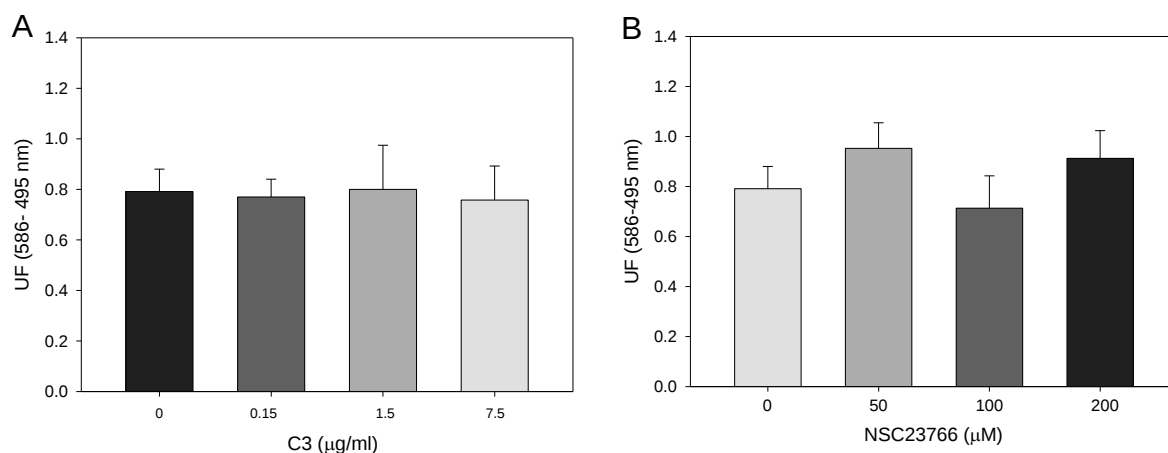


Figura 12. Influencia de las proteínas Rho y Rac sobre el potencial de membrana mitocondrial. En el panel A se representa el potencial de membrana en presencia de las diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Rho (C3 0.15, 1.5 y 7.5 µg/ml), y en el panel B se muestra con las diferentes concentraciones del inhibidor de la proteína Rac (NSC23766 50,100 y 200 µM). n=4.

8.- Discusión

Se sabe que las proteínas Rho se encuentran presentes amplia y diferencialmente distribuidas en todas las células del organismo, modulando procesos como la reorganización del citoesqueleto de actina, la progresión del ciclo celular, supervivencia celular entre otros (Jeff y Hall., 2005). En las neuronas se sabe que participan modulando procesos como la neuritogenesis, el crecimiento del cono neural y la plasticidad neuronal, además de estar involucradas en el proceso de la sinapsis (Auer y col., 2011; Hall y Lalli, 2010). La localización de las proteínas Rho es predominantemente en el citoplasma, sin embargo existen reportes que indican su presencia en la mitocondria como en el trabajo de Martínez-Alcantar (2012) en donde por medio de Western blot detecta a las proteínas Rho y Rac en la membrana interna de las mitocondrias de cerebro de rata, sugiriendo con esto su posible participación en los parámetros relacionados con la producción de energía, ya que es aquí en donde se encuentra la cadena transportadora de electrones y la ATPasa (Lehninger y col., 2002).

Sin embargo, debido a que es un resultado novedoso, se decidió corroborar el mismo empleando una técnica diferente. Por lo tanto se empleo la técnica de inmunofluorescencia en la corteza del cerebelo de rata, observándose que tanto la proteína RhoA como RhoB se encuentran presentes en la mitocondria, siendo este el primer reporte empleando esta técnica, coincidiendo además con los trabajos realizados por Boivin y Béliveau (1996) y Heather y col. (2012) en los que inmunodetectan por Western blot a la proteína Rac1 en la corteza de riñón de rata y en macrófagos de pulmón humano respectivamente, de los cuales solo en el trabajo realizado por Heather y col. (2012) se demuestra que la proteína Rac1 modula directamente la generación de H_2O_2 en las mitocondrias de macrófagos por la interacción con el citocromo c, debido a que la proteína Rac secuestra los electrones que transporta el citocromo c generando con ello H_2O_2 .

Por otro lado también se pudo observar que las proteínas RhoA y RhoB se encuentran distribuidas de manera diferencial entre las capas de la corteza del cerebelo (capa granular, capa de células de Purkinje y capa molecular). Se localizó

a la proteína RhoA en la capa molecular y en las células de Purkinje y a la proteína RhoB en las células de Purkinje y en la capa granular, lo cual coincide con lo reportado por O’Kane y col. (2003) y Martínez- Alcantar (2012) en donde la localización de las proteínas Rho fueron detectadas mediante inmunohistoquímica enzimática en cerebelo de rata.

Una vez corroborada la presencia de las proteínas Rho en las mitocondrias de cerebro de rata, se decidió investigar su posible función en los procesos relacionados con la producción de energía. Por lo tanto, al analizar el consumo de oxígeno se observa una disminución significativa en el estado 3 al inhibir a las proteínas Rho y Rac (fig. 7 y 8) sugiriendo con ello una influencia directa sobre la fosforilación oxidativa, además como consecuencia de la disminución del estado 3, el cociente respiratorio (CR) también se vio disminuido (control 6.5 y con los tratamientos alrededor de 3) indicando un desacoplamiento mitocondrial. Los valores típicos de CR obtenidos en mitocondrias intactas de hígado de rata varían entre 4.5 y 15 (Sims, 1990 y Giulivi y col., 1998). En mitocondrias de cerebro purificadas por gradiente de Percoll, Calderón-Cortés y col. (2008) reporta valores de CR de 4 a 8 en ratas control dependiente de la edad. Lo cual corrobora la integridad y funcionalidad de nuestras mitocondrias al presentar un valor de CR de 6.5 en el control.

Posteriormente, la síntesis de ATP fue medida, observándose una disminución significativa al inhibir la actividad de ambas proteínas (fig. 9), lo cual coincide con lo reportado por Tanaka y col. (2010), en donde se podría sugerir que esta disminución en la síntesis de ATP sea debida a una disminución en el potencial de membrana, como en el caso de las miofibrillas del músculo esquelético. Por otro lado, a nivel celular existen reportes que indican una relación entre la proteína Rac1 y el ATP relacionándolo a su vez con la actividad mitocondrial, un ejemplo de ello es un trabajo realizado en células de cóclea de ratón, en donde se pudo apreciar que el trauma por ruido conlleva a la depleción del ATP celular, indicando con ello un posible daño mitocondrial, además de que se observó un incremento en la expresión de la proteína Rac1 a nivel celular, siendo esta la responsable de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y con esto una disminución

en la síntesis de ATP lo cual conlleva a muerte celular (Hallett y col., 2003; Zhang y col., 2010).

Con lo anterior primeramente se propuso evaluar la influencia de las proteínas Rho y Rac sobre la cadena transportadora de electrones, ya que se sabe que este proceso es el responsable de que se genere el potencial de membrana (Boyer, 1997), además de que se ha reportado que la proteína Rac1 interviene directamente con el citocromo c secuestrando los electrones que pasaran al complejo IV generando un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno en macrófagos de pacientes con fibrosis pulmonar (Heather y col., 2012). Hasta este punto nuestros resultados podrían apuntar en este sentido, sin embargo al analizar la cadena transportadora de electrones no se observaron diferencias significativas en los complejos II, II+III y IV al inhibir ambas proteínas, pero si se obtuvo un efecto en el complejo I, en donde se logró observar una tendencia a disminuir al inhibir a la proteína Rho y una diferencia significativa al inhibir a la proteína Rac (fig. 10), sugiriendo con esto, que la proteína Rac1 está involucrada en la actividad del complejo I.

Al verse afectado el complejo I se esperaría tener una alteración en el potencial de membrana debido a que el complejo I junto con el complejo III y IV bombean a los protones al espacio intermembranal permitiendo que generando así el potencial de membrana. En un estudio realizado por Schägger y Pfeiffer (2000) en células de corazón bovino observaron que al verse afectada la actividad del complejo I de la cadena transportadora de electrones el complejo III mostraba una disminución en su actividad y con ello una disminución en el potencial. Sin embargo esto no pudo ser corroborado debido a que el potencial de membrana fue medido a partir del complejo II, mostrando que no existen diferencias significativas con respecto al control (fig.12). Por lo tanto, el efecto que pudiera tener el complejo I sobre el potencial de membrana no es observado, además de sugerir que el complejo III en este caso no se ve afectado por la disminución en la actividad del complejo I. Sin embargo, con estos resultados se corrobora que los complejos II, III y IV no se ven afectados por la inhibición de las proteínas Rho y Rac en las mitocondrias de cerebro de rata.

Hasta ese momento se sabía que existía una disminución de la síntesis de ATP en las mitocondrias de cerebro de rata, que no era debida a la disminución en la actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones y tampoco al potencial de membrana como lo sugiere Tanaka y col. (2010). Entonces por último se decidió evaluar la actividad de la ATPasa al inhibir a las proteínas Rho y Rac, y se logró observar una disminución significativa en la actividad de la ATPasa con respecto al control en ambos casos. Indicando por lo tanto que la disminución en la síntesis de ATP está dada por la influencia de las proteínas Rho y Rac sobre la actividad de la ATPasa. Esto se puede explicar primeramente, por antecedentes que indican que los complejos de la cadena transportadora de electrones y la ATPasa son modulados por diversos procesos mitocondriales como fosforilaciones (Technikova-Dobrova y col., 2001, Lee y col., 2002). Se sabe que las proteínas Rho regulan diversos procesos mediante la activación de proteínas efectoras, siendo algunas de ellas cinasas, como el caso de la proteína RHOK (activada por la proteína Rho A) que fosforila la cadena ligera de miosina para que se lleve a cabo la vasoconstricción (Pearson y col., 2013). Otro ejemplo es la proteína JNK1 y 2 las cuales son activadas por Rac1 y se desencadenan procesos como proliferación celular, diferenciación, apoptosis etc (Kaempchen y col., 2003). Algunas cinasas como AKT, PKA, PKC, ERK, MERK, JNK se sabe que están presentes en la mitocondria. Antecedentes de algunas de las funciones de las cinasas antes mencionadas indican que PKA fosforila y promueve la actividad del complejo I regulando el proceso de respiración además de antagonizar la muerte celular (Technikova-Dobrova y col., 2001). En el caso de PKC las isoformas α y β han sido detectadas en la membrana interna de la mitocondria, en células de Müller. PKC α fosforila a Bcl reduciendo con ello la apoptosis, incrementando la supervivencia después de un paro cardíaco y produce resistencia a la quimioterapia (Ruvolo y col., 1998, Bai y col., 2002). Por lo tanto con nuestros resultados sugerimos que las proteínas Rho y Rac pueden estar modulando la actividad de la ATPasa por fosforilaciones. Sugiriendo para el caso del complejo I una función similar únicamente de la proteína Rac.

9.- Conclusión

Las proteínas Rho y Rac presentes en mitocondrias de cerebro de rata, están involucradas en la producción de energía por medio de la regulación de la actividad de la F₀F₁ ATPasa.

10.- Perspectivas

- Investigar de que manera están las proteínas Rho y Rac estan afectando la actividad de la F₀F₁ ATPasa.
- Determinar cómo esta regulando la proteína Rac al complejo I de la cadena transportadora de electrones.
- Determinar la influencia de las proteínas Rho y Rac en la actividad de la translocasa mitocondrial.

11. Referencias

Alberts B., Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Omega Eds, España. 2002. pg. 767-769.

Alcaraz Romero V. M. Estructura y función del sistema nervioso, recepción sensorial y estados del organismo. 2^a. ed. Editorial El Manual Moderno. Universidad de Guadalajara, Instituto de Neurociencias, 2001. México D.F. p.p 10.

Alvarez S., Novoa B. M. J., Boveris A. 1994. La mitocondria: estructura, función y especies reactivas de oxígeno. *Antioxidantes y Calidad de vida*. **1**: 26-38.

Aktories K., Barbieri J. T. 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* **3**: 397-410

Antonicka H., Oglivie I., Taivassalo T., Anitori R. P., Haller R. G., Vissing J., Kennaway N. G., Shoubridge E. A. 2003. Identification and characterization of a common set of complex I intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* **278**: 43081-43088.

Attwell D., Laughlin, S. B. 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb. Blood Flow Metab* **21**: 1133-1145.

Auer M., Hausott B., Klimaschewski L. 2011. Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Annals of Anatomy* **193**: 259-266.

Bai X. C., Liu A. L., Deng F., Zou Z. P., Bai J., Ji Q. S., Luo S. Q. 2002. Phospholipase C- γ 1 is required for survival in heat stress: involvement of protein kinase C-dependent Bcl-2 phosphorylation. *J Biochem* **131**: 207-212.

Beattie D. S. 2002. Bioenergetics and oxidative metabolism. *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. 5^a Edition. (Devlin T. M. Ed). USA. Wiley-Liss.**13**: 537-596.

Bereiter H. J. 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int Rev cytol* **122**: 1-163.

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.

Calderón-Cortés E., Clemente-Guerrero M., Sierra Campos E., Cortés-Rojo C., Gaona-Zamudio F. J., Villalobos-Molina R., Saavedra-Molina A. 2006. Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging. *Amino Acids* **30**: 73-80.

Castellano L.E., Martínez C.G., López 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.

Colicelli J. 2004. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.* **250**: 1-53.

Corda D., Di Girolamo M. 2003. Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *EMBO J* **22**: 1953- 1958.

Devlin T. M. 2002. Oxidative metabolism. 5a ed. *Biochemistry*. Edit. Wiley- Liss. U.S.A. Capítulo 13.

Drew B., Leeuwenburgh C. 2003. Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**: 1259–1267.

Etienne-Manneville, S., Hall, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.

Forsmark-Andréé P., Ernster L. 1994. Evidence for a protective effect of endogenous ubiquinol against oxidative damage to mitochondrial protein and DNA during lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* **15**: 73-81.

Frei B., Kim M. C., Ames B. M. 1990. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Pro Natl Acad Sci. USA.* **87**: 4879-4883.

Fu-Quan Chen, Hong-Wei Zheng, Kayla Hill., Su-Hua Sha. 2012. Traumatic Noise Activates Rho-Family GTPases through Transient Cellular Energy Depletion. *J Neurosci* **32**: 12421-12430

Ganong, W.F. 1992. Encéfalo. En: Fisiología Médica. 13ª ed. Edit. Manual Moderno. México. Capítulos 32-33.

Gao Y., Dickerson B., Guo F., Zheng J., Zheng Y. 2004. Rational desing and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Pro Natl Acad Sci* **101**: 7618-7623.

Giulivi C., Poderoso J. J., Boveris A. 1998. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* **273**: 11038-11043.

Gornall A. G, Bardawill C. J., David M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**: 751-66.

Grigorieff N. 1998. Three-dimensional structure of bovine NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J Mol Biol* **277**: 1033-1046.

Grimm S., Brdiczka D. 2007. The permeability transition pore in cell death. Apoptosis. **12**: 841-855.

Guérin B. 1989. Mitochondria. The yeasts. 2^a Edición. (Rose A. H., Harrison J. S. Eds.). USA. Academic Press. **11**: 41-600.

Guyton A.C. 1992. Cerebro. En: Tratado de fisiología médica. 8a ed. Edit. Interamericana McGraw-Hill. España. Capítulos 19 y 61.

Hallett M.A., Dagher P.C., Atkinson S.J. 2003. Rho GTPases show differential sensitivity to nucleotide triphosphate depletion in a model of ischemic cell injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **285**: 129-138.

Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* **97**: 1634–1658.

Kaempchen K., Mielke K., Utermark T., Langmesser S., Hanemann O. C. 2003. Upregulation of the Rac1/JNK signaling pathway in primary human schwannoma cells. *Hum Mol Gen* **12**: 1211-1221.

Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. 2000. Principles of neural science. 4^a edición. Edit. McGraw-Hill. United States of America. Capítulo 2.

Kessl J. J., Lange B. R., Merbitz-Zahradnik T., Zwicker K., Hill P., Meunier B., Pálsdóttir H., Hunte C. Meshnick S., Trumpower B. L. 2003. Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome bc₁ complex. *J Biol Chem* **278**: 31312-31318.

Lee I., Bender E., Kadenbach B. 2002. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol Cell Biochem* **234-235**: 63-70

Lehninger D., Michael N., Cox M. Principles of Biochemistry. Fourth Edition. 2002. pg. 659-670.

Liu Y., Schubert D. R. 2009. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J Biomed Sci* **16**: 98.

Lodish H., Darnell J. Biología celular y molecular. Médica Panamericana 5^{ta}. Eds., Madrid, 2006. pg. 513-634.

López-Doménech G., Serrat R., Mirra S., D'Aniello S., Somorjai I., Abad A., Vitureira N., García-Arumí E., Alonso M. T., Rodríguez-Prados M., Burgaya F., Andreu A. L., García-Sancho J., Trullas R., García-Fernández J., Soriano E. 2012.

The Eutherian *Armcx* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2. *Nat Commun.* **3**: 814.

Luo L., Hensch T. K., Ackerman L., Barbel S., Jan L. Y., Jan Y. N. 1996. Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* **379**: 837–840.

Ludden P. 1994. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol Cell Biochem* **138**: 123- 129.

Mathews C. K., Van Holde K. E. 1996. Biochemistry. 2^a ed. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. New York. Capítulo 15.

Medina J. M. 1995. Oxidación biológica y cadena respiratoria. Elementos de bioquímica. (herrera H. Ed.) México. Interamericana McGraw-Hill. **10**: 253-284.

Mellors A., Tappel A. L. 1996. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinona and ubiquinol. *J Biol Chem* **241**: 4353-4356.

Meyer G., Feldman E. L. 2002. Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system. *J Neurochem* **83**: 490-503.

Meisinger C., Ryan M. T., Hill K., Model K., Lim J. H., Sickmann A., Muller H., Meyer H. E., Wagner R., Pfanner N. 2001. Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small Tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol* **21**: 2337-2348.

Michel H. 1998. The mechanism of proton pumping by cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci. USA* **95**: 12819-12824.

Milligan, Kostenis. (2006). Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147**: 46-55.

Montenegro-Venegas C., Tortosa E., Rosso S., Peretti D., Bollati F., Bisbal M., Jausoro I., Avila J., Cáceres A., Gonzalez-Billault C. 2010. MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol Biol Cell* **21**: 3518–3528.

Nyquist R. M., Heitbrink D., Bolwien C., Gennis R. B., Heberle J. 2003. Direct observation of protonation reactions during the catalytic cycle of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci. USA* **100**: 8715-8720.

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.

Osborn-Heaford H. L., Ryan A. J., Murthy S., Racilia A. M., He C., Sieren J. C., Spitz D. R., Carter A. B. 2012. Mitochondrial Rac1 GTPase important and electron

transfer from cytochrome c are required for pulmonary fibrosis. *J Biol Chem* **287**: 3301-3312.

Pardo J.P., Martínez F., Guerra G., Velázquez I. 2001. El complejo II: la succinato deshidrogenasa de la cadena respiratoria. *BEB*. **20**:103-1113.

Pearson J. T., Jenkins M. J., Edgley A. J., Sonobe T., Joshi M., Waddingham M. T., Fujii Y., Schwenke D. O., Tsuchimochi H., Yoshimoto M., Umetani K., Kelly D. J., Shirai M. 2013. Acute Rho-kinase inhibition improves coronary dysfunction in vivo, in the early diabetic microcirculation. *Cardiovasc Diabetol* **12**: 111. doi: 10.1186/1475-2840-12-111

Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A.S., McNamara J. O., Williams S. M. 2004. Neuroscience. 3ra edición. Sinaver Associates, Inc. 1er capitulo. pp 1-28.

Ruvolo P. P., Deng X., Carr B. K., May W. S. 1998. A functional role for mitochondrial protein kinase C α in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **273**: 25436-25442

Serrano R. A. 1998. Función y propiedades bioquímicas de las proteínas G. *BEB*. **18**: 53-59.

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.

Schägger H., Pfeiffer K. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO Journal* **19**: 1777-1783.

Smith A. J., Blumenfeld H., Behar K. L., Rothman D. L., Shulman R. G., Hyder F. 2002. Cerebral energetics and spiking frequency: The neurophysiological basis of fMRI. *Proc Natl Acad Sci. USA* **99**: 10765-10770.

Starkov A. A., Fiskum G., Chinopoulos C., Lorenzo B. J., Browne S. E., Patel M. S., Beal F. M. 2004. Mitochondrial α Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J. Neurosci.* **36**:7779 –7788.

Swanson, L. (2000). What is the brain? *Trends Neurosci.* **23**: 519–527.

Tashiro A., Minden A., Yuste R. 2000. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* **10**: 927–938.

Technikova-Dodrova Z., Sardanelli A. M., Speranza F., Sacacco A., Signorile V., Lorusso S. P. 2001. Cyclic adenosine monophosphate-dependent phosphorylation

of mammalian mitochondrial proteins: enzyme and substrate characterization and functional role. *Biochem* **40**: 13941-13947.

Terada H. 1990. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Environmental Health Perspectives* **87**: 213-218.

Trumpower B. L. 1990. Cytochrome bc₁ complexes of microorganisms. *Microbiol Rev* **54**: 101-129.

Van A. L., Cline H. T. 2004. Rho GTPases and activity-dependent dendrite development. *Curr Opin Neurobiol* **14**: 297-304.

Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. 2002. Electron Transport and oxidative phosphorylation. Fundamentals of Biochemistry. 2^a Edición. Edit. John Wiley and Sons, Inc. U.S.A. Capítulo **17**: 563-598.

West, J. B. 1993. Encéfalo. Bases fisiológicas de la práctica médica. 12^a ed. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. Capítulos 18 y 62.

Wettschureck N., Offermanns S. 2005. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* **85**: 1159-1204.

Zhang Y., Gong L. H., Zhang H. Q., Du Q., You J. F., Tian X. X., Fang W. G. 2010. Extracellular ATP enhances in vitro invasion of prostate cancer cells by activating Rho GTPase and upregulating MMPs expression. *Cancer Lett* **293**: 189-197.

Ziegler M. 2000. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* **267**: 1550-1564.

