



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES IZTACALA**

**Evaluación de los cambios estructurales en el  
Sistema Nervioso Periférico (SNP), en un  
modelo farmacológico de la Enfermedad de  
Huntington (HD).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**B I O L O G A**

**P R E S E N T A :**

**GONZÁLEZ AGUILAR NANCY**

**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. ALICIA ELIZABETH HERNANDEZ ECHEAGARAY**

**2007**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTE TRABAJO FUE APOYADO CON LOS  
PROYECTOS DE CONACYT 42598-03.

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres y hermanos ya que sin ellos yo no habría llegado hasta aquí.

MAMÁ

porque tú siempre me cuidaste, te preocupabas porque no pasara hambres, y durmiera mis horas completas, y cuando no fue así tú te desvelabas conmigo, además tú tenías todo listo para que yo solo me preocupara por estudiar.

PAPÁ

porque gracias a tí nunca me faltó nada y siempre te encargaste de darme todo cuanto yo necesite para poder realizar mis estudios lo mejor posible, tú siempre te esforzaste el doble para que yo no padeciera.

DANIEL

porque con tus consejos me ayudaste a tomar las mejores decisiones en los momentos más difíciles.

OCTAVIO

porque al igual que DANIEL tu me aconsejaste para que yo pudiera tomar la mejor decisión en aquellos momentos en los que todo se tornaba difícil.

También quiero agradecer a todos mis amigos y compañeros que siempre estuvieron conmigo en todo momento no solo a la hora de estudiar sino también cuando había la necesidad y el tiempo para relajarnos y tomar fuerzas para seguir.

Especialmente te doy las gracias a tí mi GABY's porque siempre estuviste conmigo, porque tu me ayudaste a cargar aquellas cargas que en ocasiones eran pesadas y

difíciles de llevar. Además tú siempre estuviste conmigo desde el primer día en esta escuela hasta el final. GRACIAS AMIGA.

Y gracias a todas aquellas personas que no menciono pero que saben que las llevo en mí mente porque todos ustedes me sirvieron de mucha ayuda para llegar a este momento.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización de este trabajo.

Dr. A. Elizabeth Hernández Echeagaray  
mi asesora por su apoyo en la realización de este trabajo.

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospino  
quien me ayudo y enseño las técnicas utilizadas en este trabajo.

Laboratorio de microscopía óptica  
quienes me proporcionaron los instrumentos necesarios para obtener las imágenes mostradas en el trabajo y así facilitar el análisis de resultados.

A mi comité de sinodales Dr. María Rosa Avila, Dr. Laura Colín, M. en C. Jorge Gersenowies, M. en C. Mario Cardenas, quienes se tomaron el tiempo para revisar mi trabajo escrito y corrigiendo mis errores para que presentara un trabajo impecable.

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres PEDRO Y HORTENCIA quienes siempre me han apoyado en todo lo que hago, y que sin ellos yo no podría haber salido adelante.

A mis hermanos DANIEL Y OCTAVIO porque siempre están dispuestos a apoyarme incondicionalmente, haciendo me notar mis errores y ayudándome a corregirlos de la mejor manera.

También le dedico este trabajo a mi mejor amiga GABY quien siempre estuvo conmigo, apoyándome, aconsejándome y ayudándome en aquellos momentos difíciles. Quien sufrió conmigo los problemas que se presentaban, e igualmente disfruto conmigo aquellos momentos en los que había felicidad.

## **INDICE**

**Tabla de Abreviaturas-----3**

**Agradecimiento-----4**

**Dedicatoria-----6**

**Resumen-----7**

### **Introducción**

**Sistema Nervioso-----9**

**Enfermedades neurodegenerativas-----14**

**Enfermedad de Huntington (HD)-----15**

**Ácido 3-Nitro Propiónico-----17**

**Justificación-----23**

**Hipótesis-----24**

### **Objetivos**

**Objetivo general-----24**

**Objetivos particulares-----24**

### **Material y Métodos**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Animales y tratamiento con 3-NP-----</b>      | <b>25</b> |
| <b>Procedimiento de histoquímicas-----</b>       | <b>25</b> |
| <b>Pruebas histoquímicas-----</b>                | <b>27</b> |
| <b>Observaciones y análisis morfológico-----</b> | <b>28</b> |
| <br>   |           |
| <b>Resultados-----</b>                           | <b>29</b> |
| <br>   |           |
| <b>Discusión-----</b>                            | <b>44</b> |
| <br>   |           |
| <b>Conclusiones-----</b>                         | <b>48</b> |
| <br>   |           |
| <b>Bibliografía-----</b>                         | <b>49</b> |



## RESUMEN

El sistema nervioso (SN) se ve afectado por una serie de lesiones que son ocasionadas por fallas metabólicas, tóxicas, inmunológicas, etc., que pueden resultar en desórdenes neurológicos, como el Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica y Huntington. La Enfermedad de Huntington (HD), es una enfermedad neurodegenerativa, autosomal, dominante, caracterizada por movimientos incesantes y rápidos (corea), acompañados de desórdenes cognitivos y emocionales. En la HD como en otros desórdenes neurodegenerativos no solo se ve afectado el Sistema Nervioso Central (SNC), también hay alteraciones en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), las cuales pueden ser observadas como atrofia muscular, y falta de coordinación en los movimientos voluntarios, entre otros. Para el estudio de la HD se utilizan modelos farmacológicos como la administración de ácido 3-Nitropropiónico en roedores, ya que la administración crónica del 3-NP en ratones y primates no humanos produce lesiones que presentan características histológicas y neuroquímicas parecidas a la HD. Si bien se conocen las características patológicas de la HD, poco se sabe de las alteraciones periféricas asociadas a dicha enfermedad. En este estudio se evaluó si hay alteraciones metabólicas presentes en un modelo farmacológico de la HD. Para tal efecto se hizo la medición de diferentes enzimas que permiten observar el metabolismo mitocondrial así como el aporte sanguíneo y la regulación de la placa neuromuscular (Deshidrogenasa succínica, Citocromo oxidasa, Fosfatasa alcalina y Acetilcolinesterasa) en el músculo esquelético. La expresión de la AChE no mostró cambios significativos en el número de placa neuromuscular presente en el músculo gracilis y gastrocnemius de animales experimentales. En el caso de la APasa se observó que hay un aumento significativo en el número de capilares presentes en el músculo gracilis y gastrocnemius de animales experimentales. La expresión de las enzimas mitocondriales COX y DHS se observó que

hay un incremento significativo de fibras positivas a dichas enzimas en el músculo de animales tratados con 3-NP. Por lo que podemos concluir que la administración subcrónica de 3-NP en ratones si ocasiona alteraciones en el metabolismo muscular, lo que llevaría a pensar que dichas alteraciones están presentes en las primeras etapas de la enfermedad HD, así mismo, es recomendable realizar más estudios en los cuales sea posible comparar las condiciones presentes en el modelo farmacológico con las presentes en un modelo transgénico de la enfermedad HD.

# INTRODUCCIÓN

## Sistema Nervioso (SN)

El sistema nervioso (SN) está formado por un conjunto de estructuras constituidas por tejido nervioso que controla las funciones del organismo. Es capaz de recibir e integrar innumerables datos procedentes de los distintos órganos para lograr una respuesta del cuerpo y es el responsable de las funciones cognitivas. Su constitución anatómica es muy compleja, por lo que con fines anatómicos, funcionales, descriptivos, etc., el SN se ha dividido en dos partes:

- ✓ Sistema Nervioso Central (SNC), compuesto por el encéfalo y la médula espinal.
- ✓ Sistema Nervios Periférico (SNP), formado por ganglios y nervios periféricos situados en el exterior de la médula espinal y del encéfalo [Kandel et al, 1998] (Fig. 1).

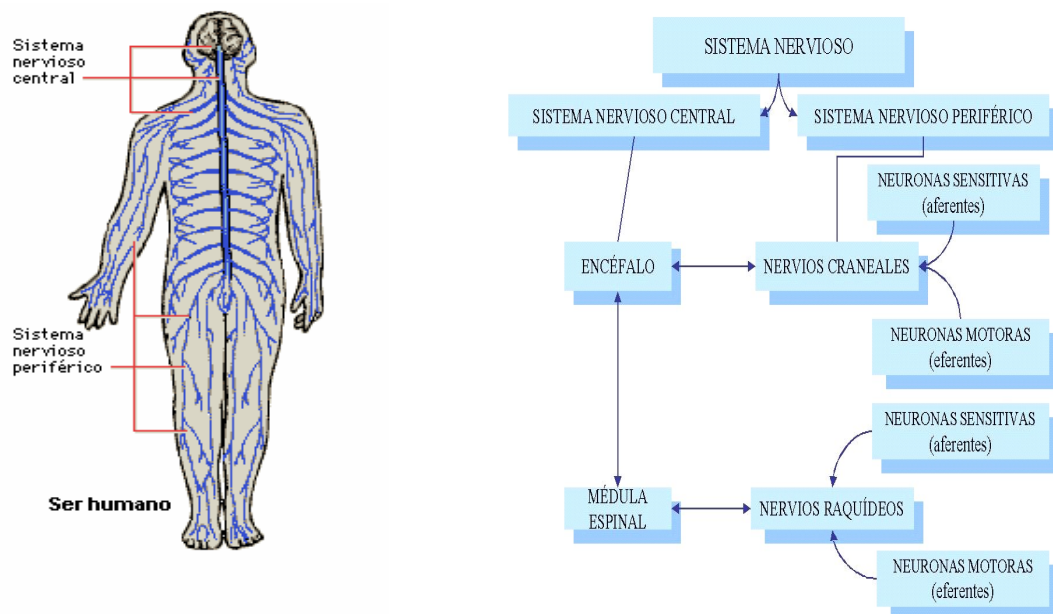


Figura 1. Composición del Sistema Nervioso.

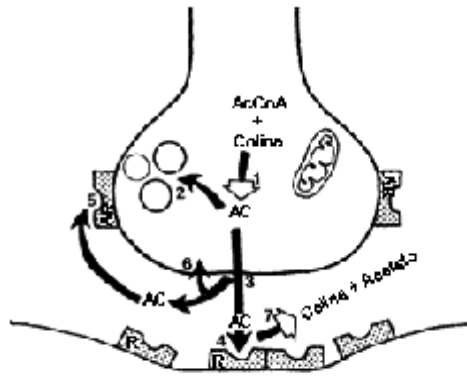
Al mismo tiempo el SNP está dividido en somático y autónomo. La subdivisión somática del SNP proporciona al SNC información sensorial acerca del estado muscular, de la posición de las extremidades y del medio ambiente externo al organismo. Esta subdivisión incluye a las neuronas sensoriales que inervan las articulaciones, piel y músculo [Kandel et al, 1998]. El músculo esquelético constituye la masa muscular asociada a la pared corporal, las extremidades y la cara, además permite los movimientos voluntarios y controla la postura del cuerpo [Estrada y Uribe, 2002].

Las células musculares que componen el músculo esquelético son cilíndricas, muy largas y gruesas, están dispuestas en haces (fibras) que se asocian para formar el músculo [Estrada y Uribe, 2002]. Existen tres diferentes tipos de fibras musculares:

- 1) **Fibras rojas:** que se distinguen por ser de diámetro pequeño y tienen una gran cantidad de mioglobina y numerosas mitocondrias. Los músculos con este tipo de fibras se contraen más lentamente por lo que se sabe que son de metabolismo oxidativo.
- 2) **Fibras blancas:** poseen un diámetro mayor presentando menor cantidad de mioglobina y menor cantidad de mitocondrias. Los músculos con este tipo de fibras son de contracción rápida. Sin embargo dentro de este tipo de fibras hay dos tipos de metabolismo: Metabolismo glucolítico y Metabolismo oxidativo-glucolítico.
- 3) **Fibras intermedias:** este tipo de fibras presentan características intermedias entre las dos variedades de fibras [<http://escuela.med.puc>].

Dichas fibras musculares reciben el aporte trófico y sanguíneo mediante la red microvascular que rodea a las fibras que forman el músculo. En diversos estudios se ha utilizado a la enzima Fosfatasa Alcalina (APasa) como marcador del endotelio capilar porque se une al endotelio de los vasos [Beal, 1992]. Estudios previos han demostrado que la atrofia muscular puede afectar la densidad de los capilares musculares que rodean las fibras musculares [Kano et al, 2000].

Por otro lado el SNC recibe información sobre el estado muscular por medio de la interacción entre nervio-músculo, esta interacción (sinapsis) (Fig. 2), está mediada por sustancias químicas conocidas como neurotransmisores, los cuales son liberados por neuronas [Kandel et al 1998]. Esta comunicación sináptica es conocida como placa neuromuscular, en donde el neurotransmisor en vertebrados es la Acetilcolina (ACh). La ACh es degradada por la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), que es una enzima hidrolítica concentrada en la hendidura sináptica. La distribución de esta enzima correlaciona con el grado de inervación y el desarrollo en el SN. La AChE tiene una actividad catalítica muy alta e hidroliza a la ACh en acetato y colina [Siegel et al, 1999]. La síntesis de la AChE es iniciada por las fibras nerviosas que se encuentran inervando. Estudios previos han demostrado que con la denervación muscular hay un decremento en la actividad de AChE [Karczmar, 1987, Siegel et al, 1999, Rotundo et al, 2005].



Célula postsináptica

Figura 2. Esquema de sinapsis muscular.  
Tomado de Kandel et al, 1998.

En diversas ocasiones las lesiones presentes en el SN son ocasionadas por fallas metabólicas, tóxicas, infecciosas, inmunológicas, etc. Dichas lesiones pueden resultar en desórdenes neurológicos. En diversos estudios se ha demostrado que la disfunción mitocondrial puede conducir a dichos desórdenes neurológicos, por ser las mitocondrias un componente esencial de las células eucariontes, las deficiencias en el funcionamiento de éstas no solo producen una disminución en la producción de ATP, además, se altera el amortiguamiento del calcio intracelular y se produce la generación de especies reactivas de oxígeno que lleva a presentar síntomas variados en los diferente tejidos del organismo esto dependiendo del requerimiento metabólico [Lindal, 2002, Krasnianski et al, 2005, Dimauro et al, 2002, Vielhaber et al, 2005].

Las alteraciones presentes en diferentes tejidos como el músculo esquelético causadas por las deficiencias en el funcionamiento mitocondrial, están asociadas con mutaciones en el DNAm. Una porción de estas mutaciones tiene como consecuencia la deficiencia en la actividad de la enzima Citocromo c oxidasa (COX) [Barron et al, 2005]. La COX es una enzima mitocondrial presente en el complejo III de la cadena respiratoria, participa en el transporte de electrones desde el Citocromo c reducido hasta el Oxígeno (Fig. 3) [Vázquez et al, 2002].

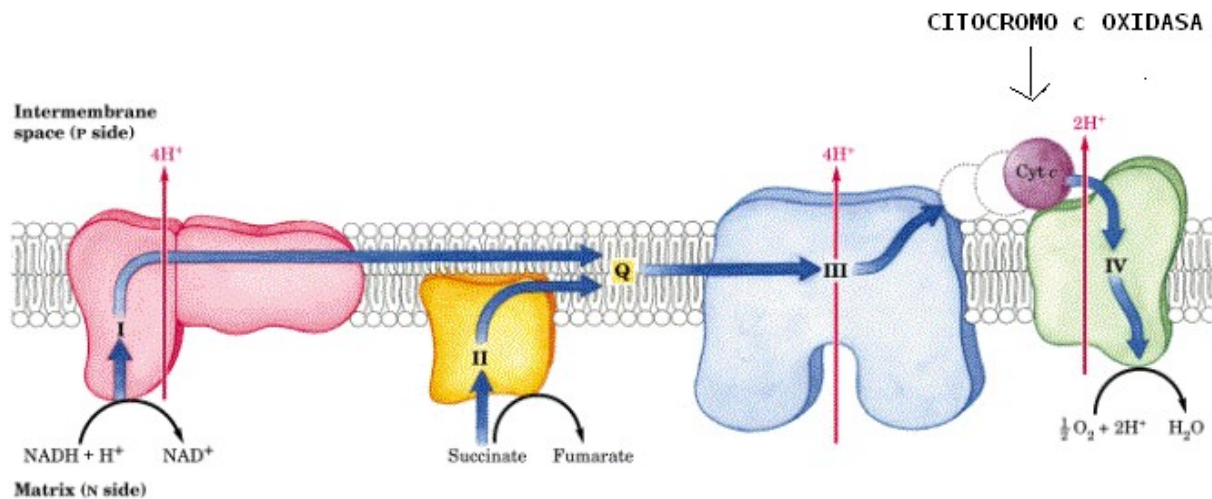


Figura 3. Complejo II y III de la cadena respiratoria. Participación de la Citocromo c Oxidasa en el complejo III.

Además de las mutaciones mitocondriales existen anomalías morfológicas en las mitocondrias asociadas con desórdenes neuromusculares asociados a enfermedades neurodegenerativas [Vielhaber et al, 2005]. Otros estudios han demostrado que dichas deficiencias mitocondriales observadas en el músculo esquelético reducen la actividad de la COX [Krasnianski et al, 2005].

### Enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de desórdenes neurológicos caracterizados por el deterioro progresivo e incapacitante de las funciones cognitivas, motoras y afectivas. En las enfermedades neurodegenerativas más comunes (Alzheimer, Parkinson, Huntington y Esclerosis lateral Amiotrófica) sobresalen dos características: por un lado la muerte celular en regiones específicas del cerebro y por otro la agregación citoplasmática y/o nuclear de proteínas [Hernández-Echeagaray, 2004].

Uno de los sistemas que se ve afectado con mayor frecuencia en la Enfermedad de Parkinson y en la enfermedad de Huntington son los ganglios basales, particularmente el núcleo estriado, el cual

recibe información proveniente de la corteza cerebral y participa en el control del movimiento voluntario y de algunas funciones relacionadas con procesos cognitivos.

- ✓ La enfermedad de Parkinson, está caracterizada por la presencia de temblor en reposo, enlentecimiento del movimiento voluntario (bradicinesia), movimientos pausados (acinesia), rigidez muscular y alteraciones posturales, la causa principal de esta enfermedad es la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la Sustancia negra compacta (SNc).
  
- ✓ La enfermedad de Huntington, se caracteriza por la presencia de movimientos incesantes y rápidos (corea) y demencia.

### **Enfermedad de Huntington (HD).**

La enfermedad de Huntington (HD) fue descrita por primera vez por George Huntington en 1872, durante mucho tiempo fue conocida como el mal de "San Vito" [Hernández-Echeagaray, 2004]. La HD afecta a 5 de cada 100 000 personas y sus síntomas generalmente se presentan en la edad adulta (entre los 40 y 50 años) [Qin y Gu, 2004]. Sin embargo, pueden presentarse casos juveniles en los que el paciente tiene una esperanza de vida de varios años con una media de 15-20 años, los pacientes juveniles pueden exhibir características ligadas al Parkinson [Qin y Gu, 2004].

La HD es una enfermedad neurodegenerativa autosomal dominante con un repetido de poliglutamina en la proteína huntingtina, dicha anomalía en la proteína huntingtina resulta en la formación de inclusiones intracelulares neuronales en el estriado y la corteza cerebral [Saydoff et al, 2006], dicha enfermedad está



caracterizada por movimientos incesantes y rápidos (corea) acompañados de desórdenes cognitivos y emocionales [Sathasivam et al, 1999] como depresión y demencia. La magnitud de la degeneración neural conduce a la muerte del paciente. En la HD la presencia de una expansión inestable del llamado gen de Huntington "Hd" (o IT15 "interesting transcript 15") es necesario para que la enfermedad se desarrolle completamente. En condiciones normales el gen Hd transcribe para una proteína citoplasmática llamada huntingtina (htt) de la cual se desconoce su función [Hernández-Echeagaray, 2004], pero se ha propuesto que juega un papel importante en la neurogénesis, apoptosis y transporte vesicular [Sathasivam et al, 1999].

Los primeros signos típicos de anomalías motoras son los movimientos anormales de los ojos, seguidos de una discinesia progresiva orofocal, involucrando discinesia en la cabeza, cuello, tronco y brazos, y finalmente la corea. La corea es definida por la World Federation of Neurology como un "estado de movimientos espontáneos excesivos, en tiempos irregulares y abruptos. La severidad de estos daños pueden variar de una inquietud moderada a una intermitente exagerada de estos movimientos y expresiones de agitación continua, movimientos de manos inestables", resultando de la corea, una falta de destreza general en las tareas que requieren el uso de manos y brazos [Brouillet et al, 1999]. En relación con la discinesia, la notable intensidad y amplitud de estos movimientos anormales gradualmente empeoran la habilidad de los pacientes para competir con la vida día a día. Como la enfermedad es progresiva los movimientos coreiformes pueden reducirse en intensidad y frecuencia, inicialmente se presenta el síndrome de hipercinesia, el cual es reemplazado por un síndrome más hipocinético en el cual la bradicinesia, rigidez y distonia predominan [Koller y Timble, 1985].

Los pacientes de HD tienen un alto requerimiento calorífico, la pérdida de la masa muscular está muy marcada en la enfermedad. En ratones transgénicos la atrofia muscular empieza después de semanas. El decremento en la masa muscular fue encontrado como causa de una disminución de todos los tipos de fibras musculares [Qin y Gu, 2004].

Además de las alteraciones motoras, es importante mencionar que uno de los primeros síntomas que presentan los pacientes con la HD es la pérdida de peso. Lo cual podría referir una alteración en el metabolismo celular o en el trofismo neuromuscular [Hernández-Echeagaray, 2004].

Para el estudio de la HD se han utilizado diferentes modelos como lo es el modelo transgénico de de la HD el cual se obtiene introduciendo un gen mutado en el genoma del hospedero (ratón). Los síntomas motores y conductuales, las inclusiones o agregados intranucleares, la pérdida neuronal y la atrofia cerebral depende del número de repetidos de CAG y de si se introdujo el cDNA completo o solamente el exón 1 del gen Huntington (Hd) [Brouillet et al, 1999].

Los desordenes en el movimiento incluyen irregularidades al caminar, sacudidas rápidas (similares a las vistas en los perros) una tendencia a apretar las extremidades, además de las alteraciones en el movimiento presente en los ratones transgénicos es posible observar una pérdida progresiva de peso [Sathasivam et al, 1999].

Además se ha utilizado el modelo farmacológico utilizando el ácido 3-nitropropiónico para expresar la patología asociada a la HD.

### Ácido 3-Nitropropiónico (3-NP).

Para el estudio de la enfermedad de Huntington se utilizan algunos modelos, tanto genéticos como farmacológicos, entre los farmacológicos se encuentra el uso del ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) administrado en roedores.

El ácido 3-Nitropropiónico ha sido propuesto como un modelo alternativo el cual expresa la patología asociada con la HD. El 3-NP es conocido por producir atrofia estriatal con inhibición mitocondrial irreversible y principalmente del ciclo del ácido cítrico disminuyendo los niveles de ATP y elevando la concentración de lactato [Borlongan et al, 1994].

El ácido 3-NP fue identificado inicialmente como un metabolito del 3-nitropropanol, agente tóxico responsable del envenenamiento del ganado en la zona occidental de Estados Unidos. Los animales intoxicados con plantas de leguminosas (*Indigofera* o *Astragalus*) presentan anomalías motoras, que consisten en debilidad general [Rodríguez-Martínez, 2001].

El ácido 3-NP y otros glucósidos están ampliamente distribuidos en plantas tóxicas (Fig. 4) [Coles et al, 1978].

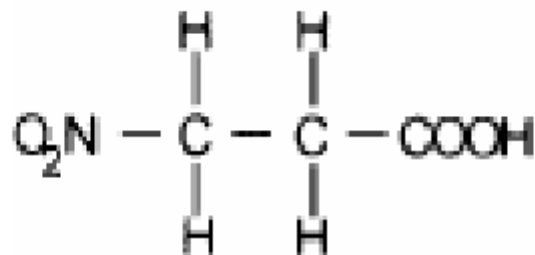


Fig. 4. Estructura química del ácido 3-Nitropropiónico (3-NP). Tomado de Brouillet et al, 1999.

El 3-NP es una toxina mitocondrial que se une al complejo II de la cadena respiratoria y del ácido tricarbóxico [Brouillet et al, 1999]. Estudios bioquímicos han establecido que el ácido 3-NP es un inhibidor de la enzima Deshidrogenasa succínica (DHS), la cual es la enzima responsable de la oxidación del succinato a fumarato. La DHS es una enzima mitocondrial que participa en el complejo II de la cadena respiratoria y del ciclo del ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) [Brouillet et al, 1999, Vázquez et al, 2002].

El mecanismo preciso de la inactivación de la DHS no es claro, sin embargo, Alston et al, 1977, sugiere que el dianión formado por el 3-NP es la forma inhibitoria de la molécula y ésta forma el carbanión que puede reaccionar con el grupo flavín de la DHS como un aductor covalente. Coles et al. 1979, cambia esta hipótesis y demuestra que el carbanión del dianión forma la unión en el sitio del sustrato para ser oxidado a 3-nitroacrilato, que puede reaccionar un grupo tiol del mismo sitio, formando un aductor covalente (Fig. 5) [Alston et al, 1977, Coles et al, 1978].

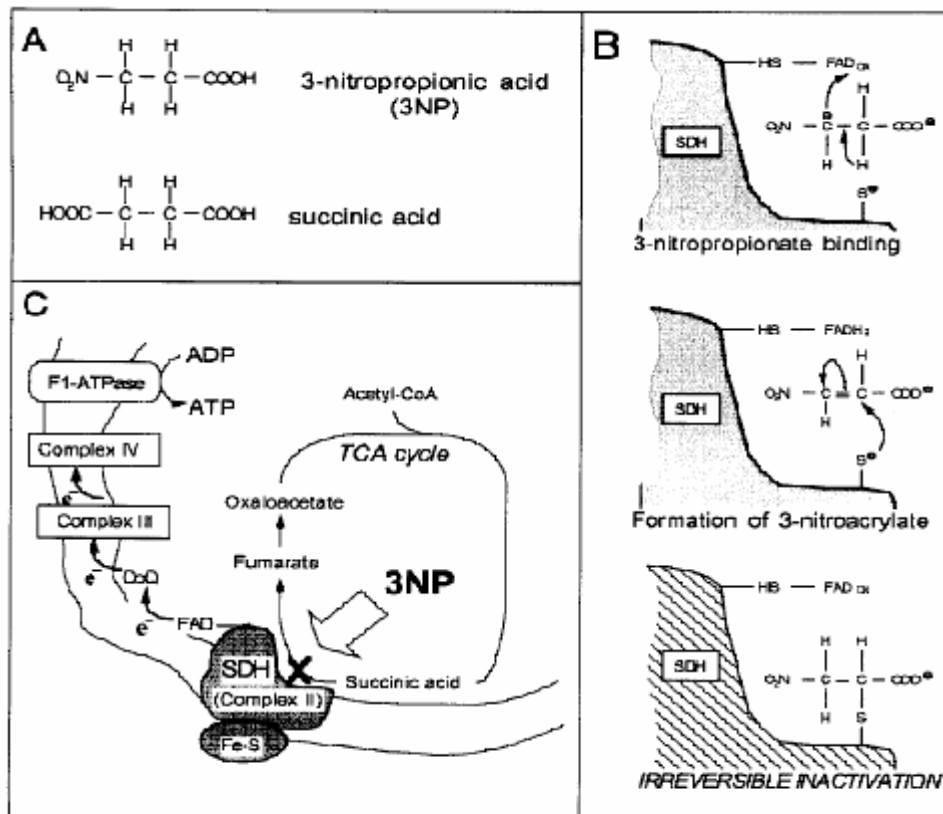


Fig. 5. 3-NP como inhibidor irreversible de la DHS. A) Estructura química del 3-NP, esta estrechamente relacionada con el ácido succínico. B) Representación esquemática del mecanismo de la inactivación irreversible de la DHS. En la parte superior, el dianion del 3-NP unido a la DHS, para formar el nitroacrilato. Parte media, el nitroacrilato reacciona con un grupo tiol de la DHS, quedando una enzima covalente. Parte inferior, bloqueo de acceso de la enzima succinato. Tomado de Brouillet y cols., 1999.

El 3-NP al inhibir a la DHS, produce una disminución en la síntesis de ATP que a su vez provoca una despolarización de la membrana con la subsiguiente activación de receptores de tipo NMDA sensibles a voltaje y excitotoxicidad neural secundaria [Novelli et al, 1988].

Entre 1972 y 1989, se reportaron cerca de 900 casos de intoxicación en animales: el 10% de ellos murieron y muchos otros presentaron pérdida de habilidades motoras de forma irreversible. Un número sustancial de sujetos desarrollaron daño neurológico persistente caracterizado por distonia, espasmos, gesticulaciones y movimientos bruscos o de sacudidas; se ha señalado la presencia

de lesiones en los ganglios basales, como daño en el putamen y el núcleo caudado [Rodríguez-Martínez, 2001].

Otros estudios han reportado disminuciones en el metabolismo de la glucosa y anomalías en las enzimas transportadoras de electrones en las mitocondrias de cerebros de pacientes con HD [Beal, 1992]. La administración sistémica crónica de 3-NP también produce lesiones que reproducen características histológicas y neuroquímicas parecidas a la HD. Las lesiones ocasionadas producen un decaimiento en ATP. Por las características de las lesiones producidas por el 3-NP, este compuesto es un importante inductor del modelo de la HD para evaluar posibles terapias experimentales [Beal et al, 1993].

El 3-NP ha sido reportado como una neurotoxina estriatal selectiva en roedores. La administración sistémica en dosis bajas de 3-NP resulta predominantemente en atrofia estriatal. Paralelo con la HD, una correlación directa entre la edad de los animales y la muerte neuronal ha sido demostrada en diversos estudios. En animales de 6 semanas de edad la administración sistémica de 3-NP muestra un daño del 25 %, animales de 7-14 semanas de edad demostraron un daño estriatal del 80 % y en animales de 16 semanas de edad el daño es mayor hasta llegar a la muerte [Borlongan et al, 1997].

Los animales tratados con 3-NP muestran anomalías motoras que dependen tanto de la edad de los animales como de la concentración y el periodo de aplicación de la toxina [Borlongan et al, 1995].

Borlongan et al, define 3 estados de patología inducida por la administración de 3-NP:

- 1) Estado I: somnolencia.
- 2) Estado II: incoordinación al caminar con movimientos ondulatorios.
- 3) Estado III: desequilibrio lateral y ventral.

En dicho estudio se demostró que la administración sistémica de 3-NP resulta en lesiones de los ganglios basales con un decremento inicial de la actividad motora seguida de episodios de hiperactividad y/o movimientos anormales (temblores, balanceo de la cabeza, inclinación de la cabeza, rigidez, etc.). Además se observó que la administración sistémica de 3-NP en ratones jóvenes y adultos (6-10 semanas y 14-28 semanas de edad) dispara bradicinesia y parálisis respectivamente [Borlongan et al, 1997].

## **JUSTIFICACIÓN**

A pesar de que se han realizado múltiples estudios para conocer las causas de las enfermedades neurodegenerativas y de esta forma contrarrestar sus efectos, poco se ha estudiado sobre las neuropatías del SNP originadas por el proceso neurodegenerativo del SNC. Como se ha mencionado el SNP también podría resultar afectado como consecuencia de la degeneración y/o por falta del aporte trófico, llevando a la denervación y atrofia muscular, pudiendo, en algunos casos, terminar en la parálisis total. Por este motivo en este estudio se evaluará si dicha atrofia está presente en el SNP en un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington.



## **HIPÓESIS**

Conociendo las alteraciones en el SNC producidas por la intoxicación con 3-NP, es posible que existan alteraciones en el Sistema Nervioso Periférico y en el músculo esquelético en un modelo farmacológico de la Enfermedad de Huntington.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar las posibles alteraciones periféricas, en los músculos gracilis y gastrocnemius de ratón, que ocurren en la enfermedad de Huntington, en un modelo farmacológico de dicha enfermedad.

### **Objetivos particulares**

- ✓ Evaluar el grado de vascularización del músculo esquelético (gracilis y gastrocnemius) mediante la medición histoquímica de la Fosfatasa alcalina (APasa).
- ✓ Evaluar alteraciones en la inervación usando como marcador la expresión histoquímica de Acetilcolinesterasa (AChE).
- ✓ Evaluar cambio en el metabolismo oxidativo en los músculos gracilis y gastrocnemius, mediante la expresión histoquímica de las enzimas mitocondriales Deshidrogenasa succínica (DHS) y Citocromo c oxidasa (COX).

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Animales y tratamiento con 3- NP.**

Un grupo de ratones machos de 30 días de edad de la cepa C57/BL6 (20-26 gr.) (n=20), se utilizaron para obtener un modelo farmacológico de la enfermedad de Huntington. Se les administró un tratamiento vía intraperitoneal con ácido 3-Nitropropiónico (15 mg/kg) durante un periodo de cinco días, dejando reposar dos días, posterior a estos fueron sacrificados, para realizar los análisis correspondientes. Así mismo se formó un grupo de ratones (n=10) utilizados como control a los cuales no se les aplicó ningún tratamiento.

### **Procedimiento de histoquímicas**

Después del tratamiento con 3-NP los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico. Los músculos gracilis y gastrocnemius de las extremidades pélvicas (Fig. 6) fueron disectados y congelados con 2-metil-butano, para su corte posterior se realizaron cortes seriados transversalmente a lo largo del músculo de 14  $\mu\text{m}$  en un criostato, se colectaron y montaron directamente en portaobjetos previamente gelatinizados, para posteriormente realizar los ensayos histoquímicas correspondientes.



Figura 4. Musculatura de la rata, resaltando los músculos gracilis y gastrocnemius utilizados en el estudio. Tomado de Chiasson, 1980.

## Pruebas histoquímicas

- ✓ **Acetil-colinesterasa**, se preparó un buffer de acetato de sodio 50 mM con un pH de 5.0 que contiene: Acetato de sodio, Sulfato cúprico y glicina al que se le agregó antes de usarse acetilcolina iodada y ethopropazina, en dicha solución el tejido se dejó incubando durante 24 horas protegido de la luz a temperatura ambiente, al termino del periodo de incubación el tejido se retiró de la solución y se lavó con agua destilada, posteriormente se utilizó una solución reveladora (Na<sub>2</sub>S<sub>9</sub>H<sub>20</sub> pH 7.5 al 10%) dejando en dicha solución durante 5 minutos, finalmente el tejido se lavó varias veces con agua destilada.
  
- ✓ **Citocromo oxidasa**, el tejido se dejó incubando en una solución que contiene buffer de fosfatos 0.1M pH 7.5, sacarosa, citocromo C, catalasa y DAB (diaminobencidina), protegidos de la luz a 35°C durante 30 minutos transcurrido el periodo de incubación se realizaron varios lavados con agua destilada.
  
- ✓ **Deshidrogenasa succínica**, el tejido se colocó en una superficie plana, protegiéndolos de la luz y dejando incubar durante 15 minutos en una solución que contiene polivinil alcohol, Buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.5, succinato de sodio y azida de sodio a la cual se le agregó instantes antes de ser utilizada NBT (nitro blue tetrazolium) y PMS (phentazin methosulfato), pasado el periodo de incubación el tejido se lavó varias veces con agua destilada.
  
- ✓ **Fosfatasa alcalina** el tejido se fijó durante 2 horas a temperatura ambiente con paraformaldehido al 4%, se realizaron lavados con Buffer de Fosfatos 0.1 M pH 7.5, posteriormente se dejaron incubar durante 25 minutos

protegidos de la luz con el kit: Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III SK-5300, posteriormente se preparó una solución para la reacción en buffer Tris-HCL 100mM con pH 8.5 en la cual se dejaron durante 5 minutos después de incubar con el kit, finalmente se realizaron lavados con agua destilada.

### **Observación y análisis morfológico.**

Para el análisis morfológico se capturaron imágenes seriales de baja (10X) y alta (40X) resolución de cada una de las secciones de músculo teñidas para las diferentes enzimas, se digitalizaron utilizando un microscopio óptico Motic de campo claro adaptado a un sistema de análisis de imágenes (Image J, NIH).

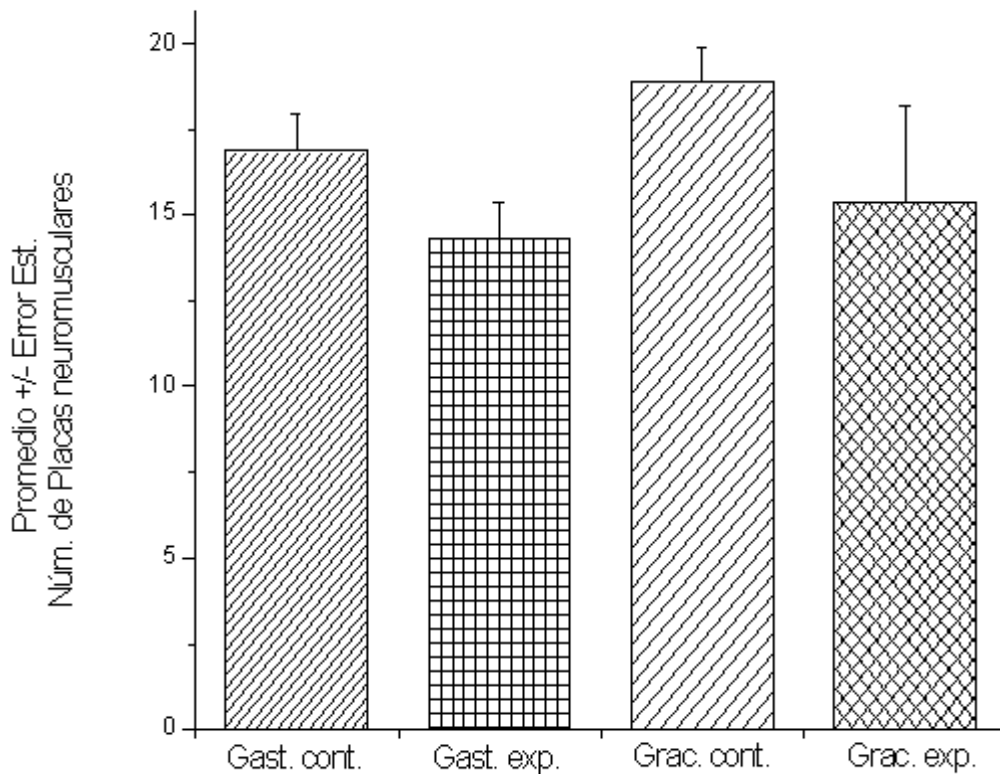
Se obtuvieron imágenes para el músculo gastrocnemius y gracilis, de cada músculo se contabilizó el número de fibras musculares que contenían la marca para las diferentes enzimas en un área de 2000  $\mu\text{m}^2$  por campo (10X). Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando una t de student de dos grupos no correlacionados, el grado de significancia fue evaluado con una  $p < 0.05$ . Del mismo modo se realizó un análisis densitométrico, en fibras marcadas con DHS y COX del músculo gastrocnemius, los datos obtenidos de dicho análisis fueron expresados en píxeles.

## RESULTADOS

La actividad enzimática de la cadena respiratoria fue demostrada por la reacción con DHS y COX. Los vasos sanguíneos fueron observados usando a la APasa como marcador y la inervación del músculo fue observada marcando la expresión de AChE.

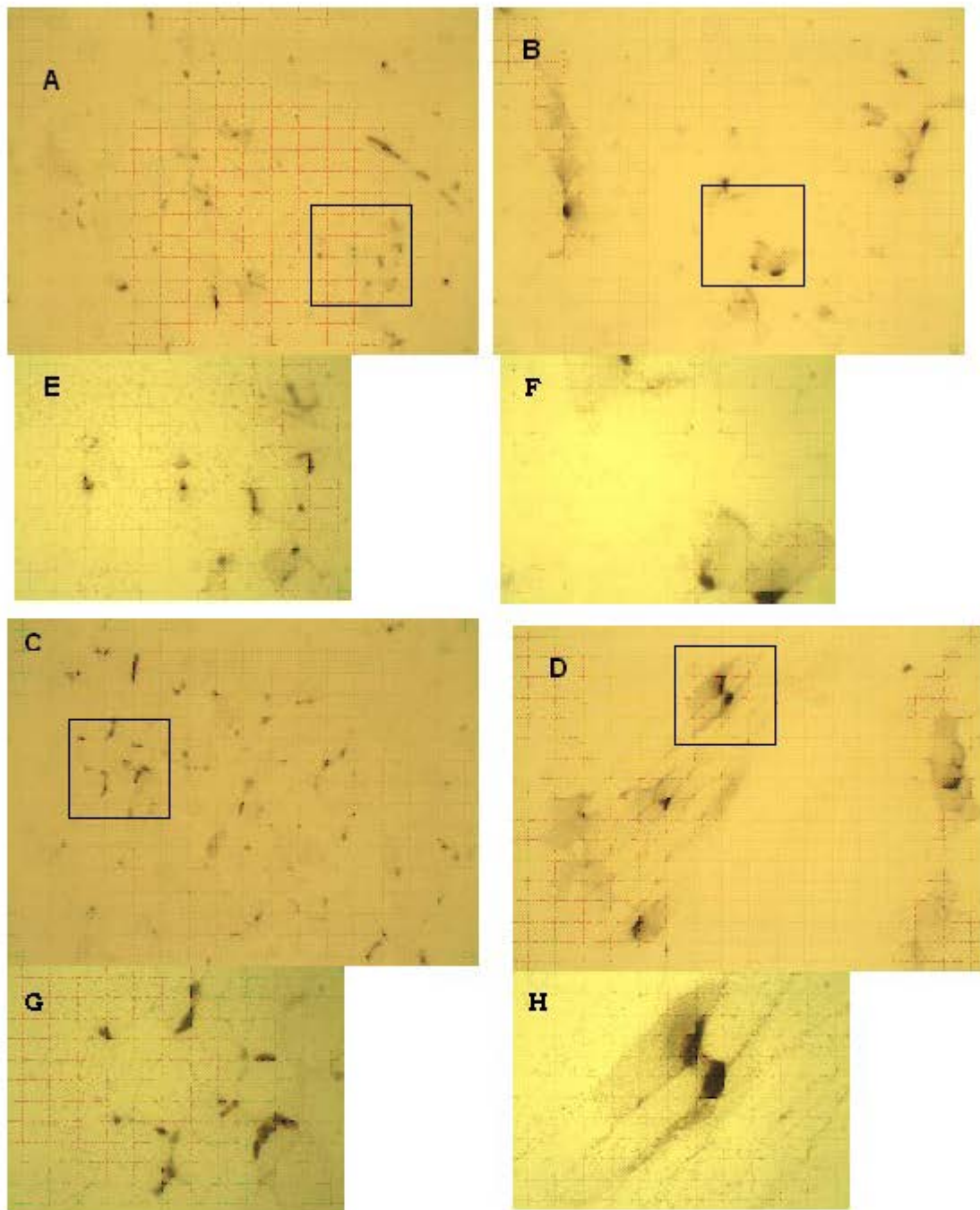
### ACETILCOLINESTERASA (AChE).

Al analizar la histoquímica para la Acetilcolinesterasa, encontramos que en un área de  $2000 \mu\text{m}^2$  por campo (10X) el número promedio de placa neuromuscular en el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP (n=30) fue de  $14.33 \pm 1.01$  y para el músculo proveniente de animales control (n=28) fue de  $16.85 \pm 1.07$ . El músculo gracilis mostró  $15.35 \pm 2.85$  placa neuromuscular marcada para la AChE de animales tratados con 3-NP (n=17) y  $18.86 \pm 1.01$  para animales control (n= 37). El análisis estadístico no muestra cambios significativos en la expresión de la AChE, como se observa en la Gráfica 1, en los músculo gracilis ( $t_{52} = 1.441$  p= 0.156) y gastrocnemius ( $t_{56} = 1.710$ , p= 0.093) con sus respectivos controles, aunque el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP presenta una reducción en el número de placa neuromuscular expresada no hay diferencias significativas en la densidad colinérgica entre los animales tratados con 3-NP y los animales control.



Gráfica 1. Muestra el número de placas neuromuscular marcada con AChE presentes en los músculos gastrocnemius y gracilis) de animales tratados y no tratados con 3-NP.  
 (Gast. cont.=Gastrocnemius control) (Gast. exp.=Gastrocnemius experimental)  
 (Gras. cont.=Gracilis control) (Gras. exp=Gracilis experimental)

En la figura 7 se observa la inmunotinción para AChE, la marca de la placa neuromuscular en el músculo de animales tratados con 3-NP se ve reducida en número en comparación con los músculos de animales utilizados como control, así mismo se observa que hay una diferencia significativa en el tamaño de la placa siendo esta de mayor tamaño para los músculos de animales tratados con 3-NP.



**Figura 7.** Se observa la marca de AChE para la placa neuromuscular en el músculo gastrocnemius y gracilis de animales tratados con 3-MP y control. A gastrocnemius control. B gastrocnemius experimental. C gracilis control. D gracilis experimental. Amplificación 100X. E, F, G, H, muestran la diferencia en cuanto a tamaño de la placa en ambos músculos. Amplificación 400X.



El análisis que determinó el tamaño de la placa neuromuscular nos permite observar que la administración subcrónica del ácido 3-NP no ocasiona cambios en la estructura de la placa neuromuscular, ya que el área promedio de las placas analizadas por campo (40X) para el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP (n=11) es de  $2199 \mu\text{m}^2 \pm 219.64$  y para el músculo de animales control (n=14) es de  $1302.2 \mu\text{m}^2 \pm 140.34$ .

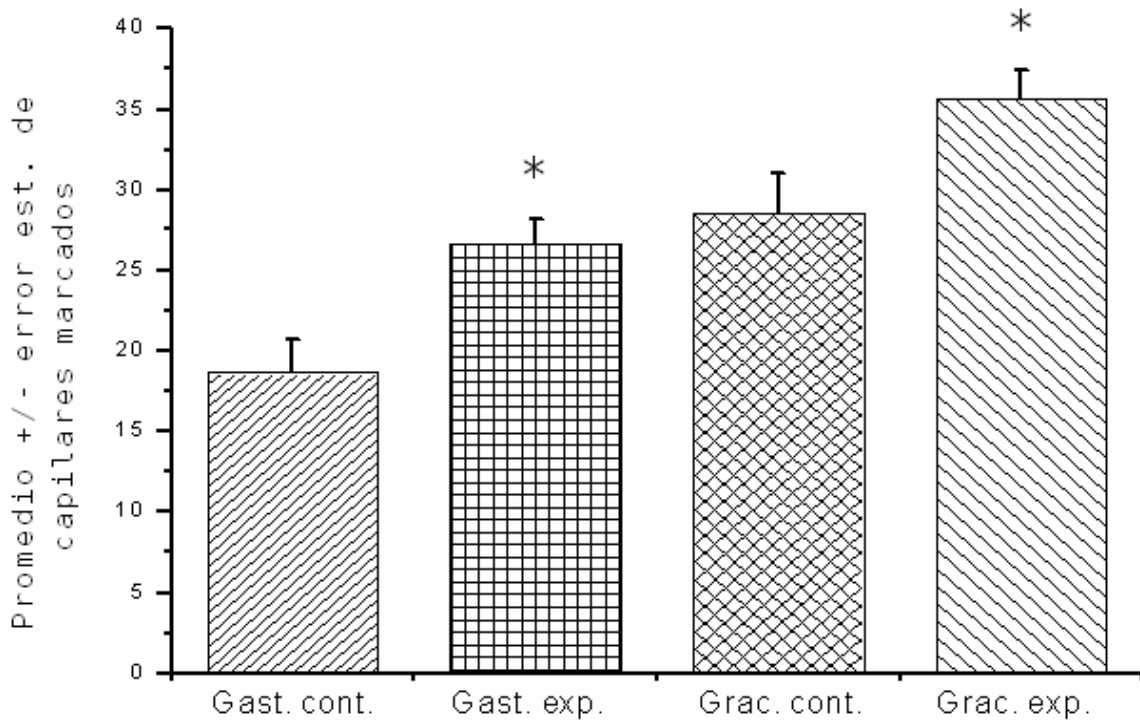
En el caso del músculo gracilis se observaron cambios en la estructura de la placa neuromuscular tanto en el músculo de animales tratados con 3-NP (n=17) ( $1878 \mu\text{m}^2 \pm 103.19$ ) como en el músculo de animales control (n=37) ( $1486.18 \mu\text{m}^2 \pm 118.28$ ). Este análisis también nos proporcionó datos sobre el perímetro que las placas ocupan dentro de la organización del músculo (Tabla 1).

**Tabla 1. Área y perímetro de la placa neuromuscular marcada con AChE.**

| <b>GASTROCNEMIUS</b>            |  |         |   |        |
|---------------------------------|--|---------|---|--------|
| <b>(control n=11 exp n=14)</b>  |  |         |   |        |
|                                 | <b>AREA <math>\mu\text{m}^2</math></b> |         | <b>PERIMETRO <math>\mu\text{m}</math></b> |        |
|                                 | CONTROL                                | EXP.    | CONTROL                                   | EXP.   |
| PROMEDIO                        | 1302.2                                 | 2199.63 | 169.51                                    | 212.21 |
| ERROR EST.                      | 140.34                                 | 219.64  | 10.22                                     | 13.19  |
| <b>GRACILIS</b>                 |  |         |   |        |
| <b>(control n=20, exp n=22)</b> |  |         |   |        |
| PROMEDIO                        | 1486.18                                | 1878    | 169.84                                    | 195.69 |
| ERROR EST.                      | 118.28                                 | 103.19  | 8.30                                      | 7.39   |

## **FOSFATASA ALCALINA (APasa).**

El análisis de la histoquímica para la Fosfatasa alcalina, nos mostró que en un área de  $2000 \mu\text{m}^2$  por campo (10X) el número promedio de capilares marcados con APasa en el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP (n=25) fue de  $26.66 \pm 1.56$  y para el músculo proveniente de animales control (n=6) fue de  $18.66 \pm 2.83$ . El músculo gracilis mostró  $35.65 \pm 1.83$  fibras marcadas para APasa en animales tratados con 3-NP (n=46) y  $28.5 \pm 2.49$  para animales control (n=25). Es posible observar que hay un incremento significativo en el músculo gastrocnemius ( $t_{29} = -2.351$ ,  $p = 0.026$ ) y gracilis ( $t_{67} = -2.254$ ,  $p = 0.027$ ) comparado con sus respectivos controles, de animales tratados con 3-NP. (Graf. 2).



Gráfica 2. Se observa el número de capilares marcados con APasa presentes en los músculos gracilis y gastrocnemius de ratones tratados con 3-NP y animales control.  
 (Gast. cont.=Gastrocnemius control) (Gast. exp.=Gastrocnemius experimental)  
 (Gras. cont.=Gracilis control) (Gras. exp.=Gracilis experimental).  
 \* $p < 0.05$

Como se observa en la Fig. 8 los capilares se encuentran presentes en todo el músculo, y muestran un cambio en el grosor del vaso sanguíneo, no obstante, no se realizó ningún análisis para comprobar dicho cambio.

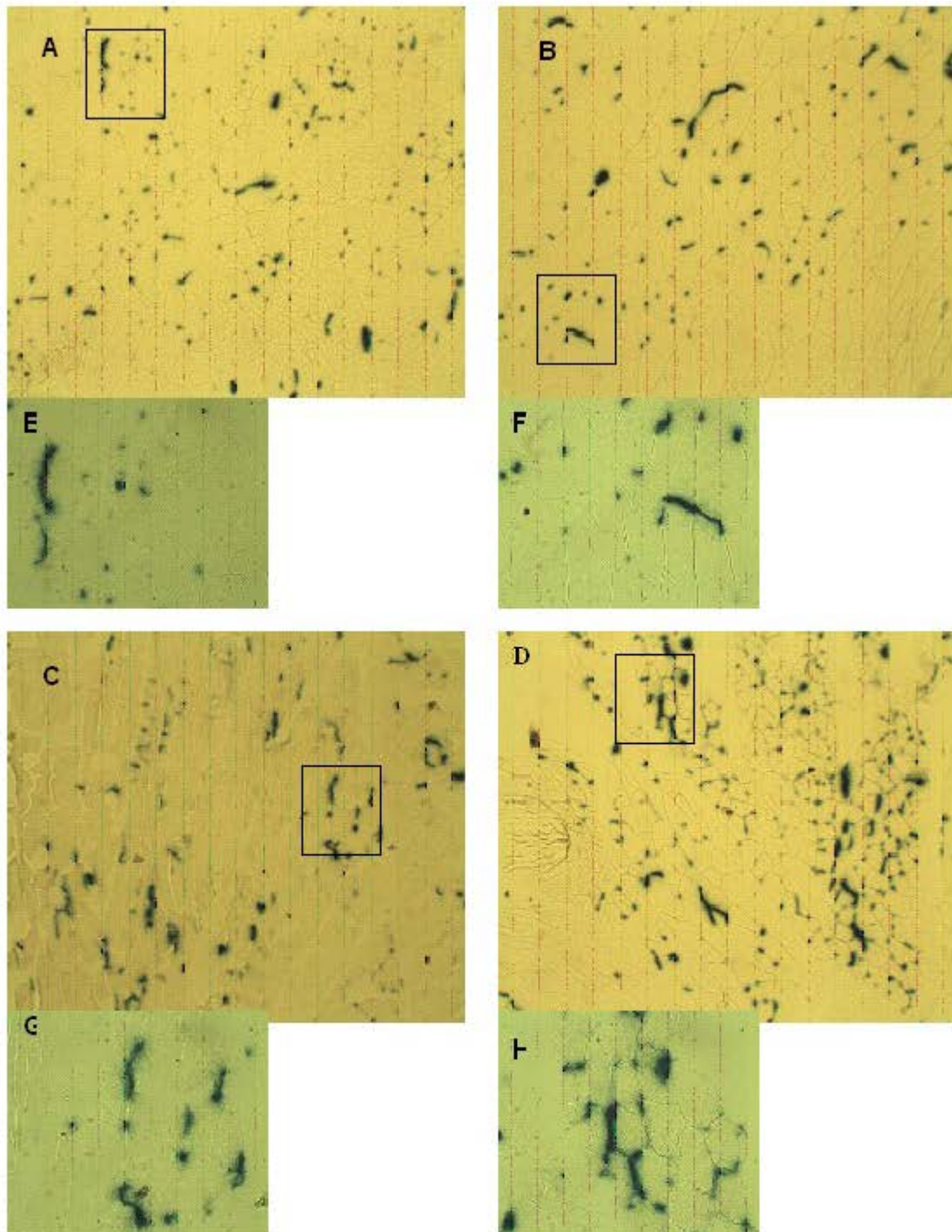
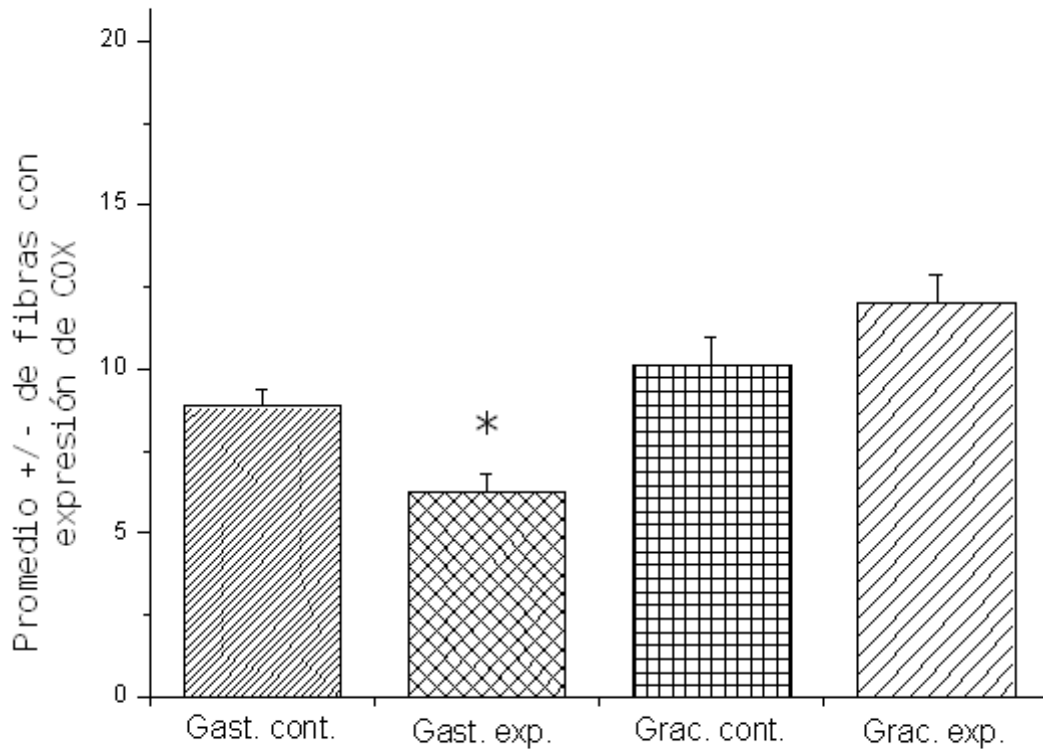


Fig. 6. Muestra la marca para APasa de los capilares presentes en las fibras musculares de los músculos gastrocnemius y gracilis de los grupos control y experimental. A gastrocnemius control. B gastrocnemius experimental. C gracilis control. D gracilis experimental. Amplificación 100X. E, F, G, H, amplificación 400X.

### **CITOCROMO c OXIDASA (COX).**

En la prueba histoquímica para la Citocromo c oxidasa (COX), podemos observar que hay una reducción significativa ( $t_{51} = 2.437$ ,  $p = 0.018$ ) en el músculo gastrocnemius, el número promedio en un área de  $2000 \mu\text{m}^2$  por campo (10X) de fibras positivas para COX en el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP ( $n=37$ ) fue de  $6.29 \pm 0.49$  y para animales control ( $n=16$ ) fue de  $8.87 \pm 0.49$ . Sin embargo el músculo gracilis no presenta cambios significativos ( $t_{61} = -1.552$ ,  $p = 0.126$ ), el número promedio de fibras positivas para COX fue de  $12.01 \pm 0.086$  para animales tratados con 3-NP ( $n=33$ ) y  $10.14 \pm 0.82$  para animales control ( $n=23$ ) (Grafica 3).



Grafica 3. Se observa el promedio de fibras con expresión de COX en los músculos gracilis y gastrocnemius de animales tratados con 3-NP y animales control.  
 (Gast. cont =Gastrocnemius control) (Gast. exp.=Gastrocnemius experimental)  
 (Grac. cont.=Gracilis control) (Grac. exp.=Gracilis experimental)  
 \*=p<0.05

Encontramos que no hay diferencia en el tamaño de las fibras positivas para COX (fibras pequeñas) (Fig. 9) entre los músculos gastrocnemius de animales tratados con 3-NP (n=15) ( $335.62 \mu\text{m} \pm 4.24$ ) vs control (n=8) ( $345.11 \mu\text{m} \pm 6.49$ ).

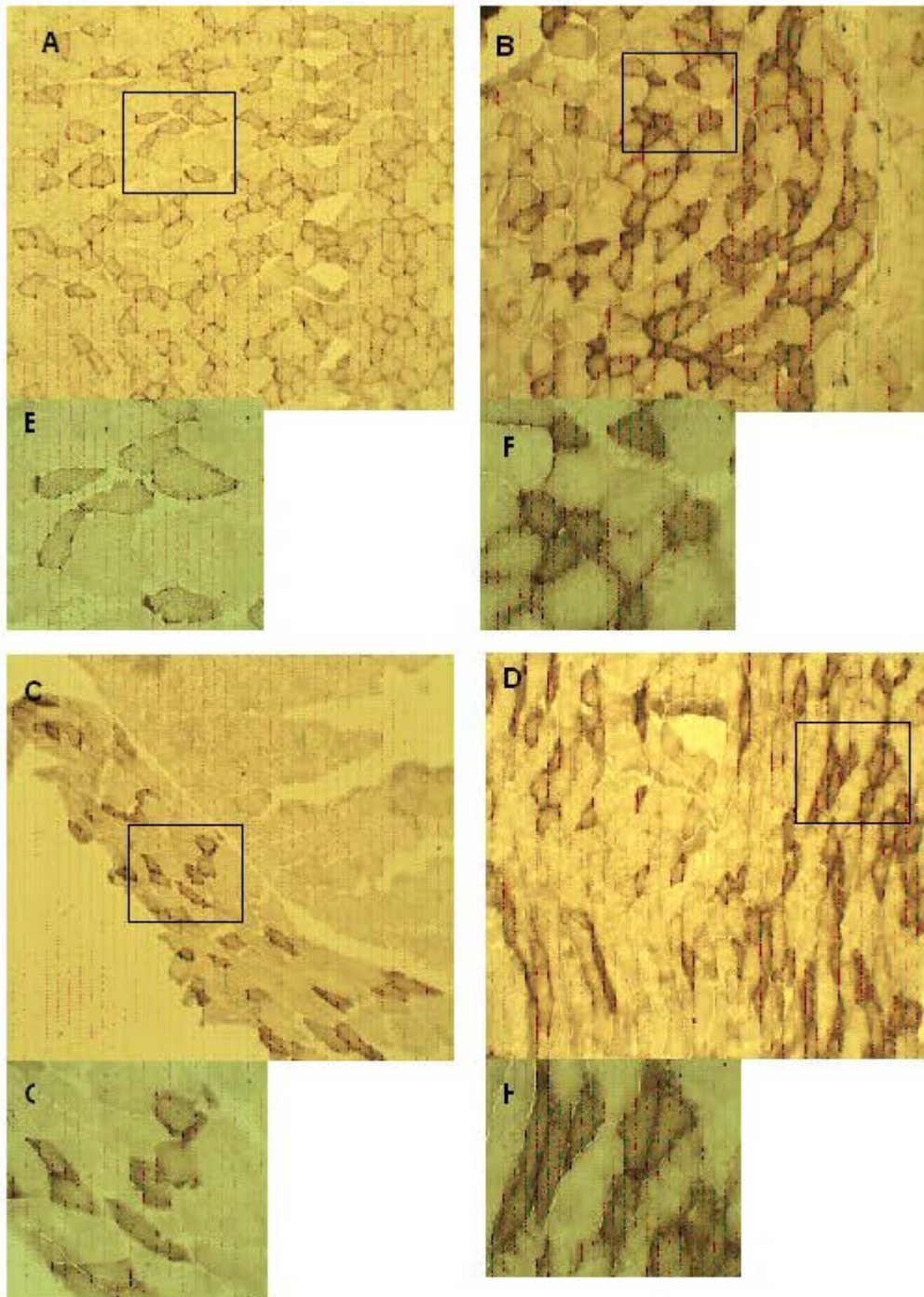


Fig. 9. Se muestra la expresión de la COX en los músculos gastrocnemius y gracilis en ratones tratados con 3-NP y no tratados. Se puede observar que hay un incremento en la expresión de la enzima en las células del músculo gastrocnemius que fue tratado con 3-NP. A gastrocnemius control. B gastrocnemius experimental. C gracilis control. D gracilis experimental. Amplificación 100X. E, F, G, H, amplificación 400X.

No obstante hay diferencia significativas ( $t_{269} = -3.046$ ,  $p = 0.003$ ) en la actividad de COX medida con un análisis densitométrico, el músculo gastrocnemius de los animales tratados con 3-NP mostraron incremento en la actividad para COX ( $812,124.478 \pm 17,656.80$  píxeles) en comparación con el grupo control ( $723,144.21 \pm 24,168.75$  píxeles) (Tabla 2).

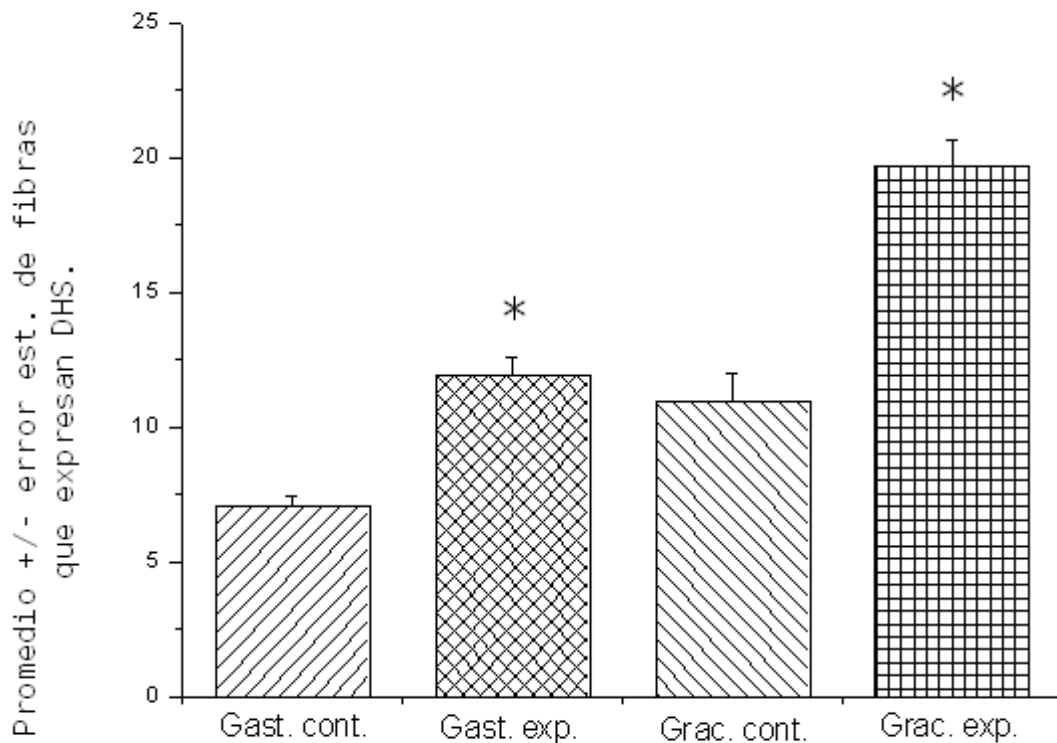
Tabla 2. Análisis densitométrico para fibras positivas a COX en el músculo gastrocnemius. n control = 8, n experimental = 15.

| <b>FIBRAS PEQUEÑAS</b> |                 |             |                  |             |                   |             |
|------------------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|-------------------|-------------|
|                        | <b>AREA</b>     |             | <b>PERIMETRO</b> |             | <b>INT. DENS.</b> |             |
|                        | $\mu\text{m}^2$ |             | $\mu\text{m}$    |             | (píxeles)         |             |
|                        | <b>CONTROL</b>  | <b>EXP.</b> | <b>CONTROL</b>   | <b>EXP.</b> | <b>CONTROL</b>    | <b>EXP.</b> |
| <b>PROMEDIO</b>        | 7713.44         | 7178.31     | 345.11           | 335.62      | 723144.21         | 812124.47   |
| <b>ERROR EST.</b>      | 295.05          | 152.49      | 6.49             | 4.24        | 24168.75          | 17656.80    |
| <b>FIBRAS MEDIANAS</b> |                 |             |                  |             |                   |             |
| <b>PROMEDIO</b>        | 14110.46        | 14690.39    | 469.81           | 484.74      | 1300591.06        | 1444213.7   |
| <b>ERROR EST.</b>      | 327.98          | 311.86      | 5.62             | 5.66        | 36650.42          | 28745.90    |
| <b>FIBRAS GRANDES</b>  |                 |             |                  |             |                   |             |
| <b>PROMEDIO</b>        | 27870.1         | 27506.53    | 659.09           | 670.35      | 2090702.13        | 2179198.42  |
| <b>ERROR EST.</b>      | 668.20          | 601.24      | 8.80             | 8.93        | 61348.49          | 48357.67    |



## **DESHIDROGENASA SUCCINICA (DHS).**

Al analizar la histoquímica para la Deshidrogenasa succínica, encontramos que el número promedio de fibras en un área de 2000  $\mu\text{m}^2$  por campo (10X) en el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP (n=37)  $11.94 \pm 0.64$  y para el músculo proveniente de animales control (n=10)  $7.1 \pm 0.37$ . El músculo gracilis mostró  $19.67 \pm 0.97$  fibras marcadas para la DHS en animales tratados con 3-NP (n=35) y  $10.94 \pm 1.03$  para animales control (n=17). Se observa que hay un incremento significativo en el músculo gastrocnemius ( $t_{45} = -3.845$ ,  $P < 0.001$ ) y gracilis ( $t_{49} = -5.585$ ,  $P < 0.001$ ) con respecto a su respectivo control (Grafica 4).



Grafica 4. Número promedio de fibras que expresan DHS de los músculos gracilis y gastrocnemius de animales tratados con 3-NP y animales control. (Gast. cont.=Gastrocnemius control) (Gast. exp.= Gastrocnemius experimental) (Grac. cont.=Gracilis control) (Grac. exp.=Gracilis experimental) \* $p < 0.05$

Encontramos cambios en el tamaño de las fibras positivas para DHS (fibras pequeñas) del músculo gastrocnemius (Fig. 10) entre los músculos de animales tratados con 3-NP ( $n=25$ ) ( $444.10 \pm 15.04$ ) vs control ( $n=11$ ) ( $353.26 \pm 13.91$ ), sin embargo este cambio no fue significativo.

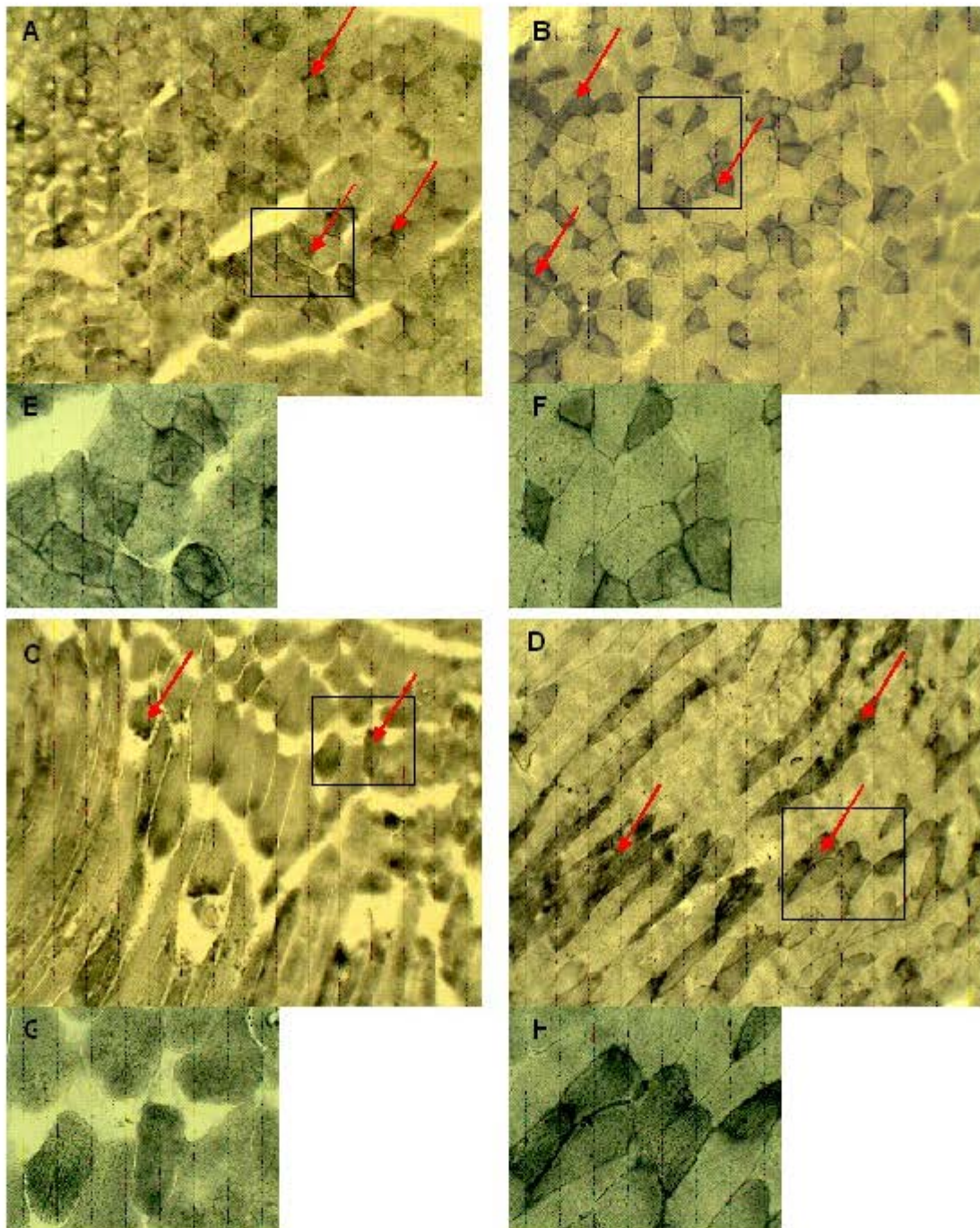


Fig. 10. Expresión de DHS en el músculo gastrocnemius y gracilis de los grupos control y experimental. A gastrocnemius control. B gastrocnemius experimental. C gracilis control. D gracilis experimental. Amplificación 100X. E, F, G, H, amplificación 400X. Además se observa la delimitación del área roja (flechas) y blanca en ambos músculos.

El análisis densitométrico de la actividad de DHS mostró diferencias significativas ( $t_{22}=-3.214$ ,  $p =0.004$ ) en el músculo gastrocnemius de animales tratados con 3-NP ( $1, 547,367 \pm 98,466.86$  píxeles) en comparación con el grupo control ( $1, 091,106.06 \pm 87,111.58$  píxeles) (Tabla 3).

**TABLA 3.** Análisis densitométrico para fibras positivas a DHS en el músculo gastrocnemius. n control = 11, n experimental = 25.

| <b>FIBRAS PEQUEÑAS</b> |                 |                 |                  |               |                   |                   |
|------------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------|-------------------|-------------------|
|                        | <b>AREA</b>     |                 | <b>PERIMETRO</b> |               | <b>INT. DENS.</b> |                   |
|                        | $\mu\text{m}^2$ |                 | $\mu\text{m}$    |               | Píxeles           |                   |
|                        | <b>CONTROL</b>  | <b>EXP.</b>     | <b>CONTROL</b>   | <b>EXP.</b>   | <b>CONTROL</b>    | <b>EXP.</b>       |
| <b>PROMEDIO</b>        | <b>7501.75</b>  | <b>9074</b>     | <b>353.26</b>    | <b>444.10</b> | <b>1091106.06</b> | <b>1547367.88</b> |
| <b>ERROR EST.</b>      | <b>533.48</b>   | <b>344.94</b>   | <b>13.91</b>     | <b>15.04</b>  | <b>87111.58</b>   | <b>98466.86</b>   |
| <b>FIBRAS MEDIANAS</b> |                 |                 |                  |               |                   |                   |
| <b>PROMEDIO</b>        | <b>16296.22</b> | <b>15362.79</b> | <b>532.16</b>    | <b>550.06</b> | <b>2147280.33</b> | <b>2444028.29</b> |
| <b>ERROR EST.</b>      | <b>609.63</b>   | <b>546.78</b>   | <b>13.47</b>     | <b>15.32</b>  | <b>101029.25</b>  | <b>128961.94</b>  |
| <b>FIBRAS GRANDES</b>  |                 |                 |                  |               |                   |                   |
| <b>PROMEDIO</b>        | <b>31415.21</b> | <b>29642.01</b> | <b>730.17</b>    | <b>771.96</b> | <b>3855294.43</b> | <b>4071808.23</b> |
| <b>ERROR EST.</b>      | <b>3177.49</b>  | <b>877.41</b>   | <b>39.87</b>     | <b>14.29</b>  | <b>507508.58</b>  | <b>116714.43</b>  |

Cabe mencionar que el análisis densitométrico no fue realizado en las fibras del músculo gracilis dado que los cortes se realizaron de manera transversal y el músculo gracilis corre ligeramente transversal al gastrocnemius.

## DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que la administración subcrónica en bajas concentraciones de ácido 3-NP (15 mg/kg) en ratones jóvenes afecta los perfiles metabólicos del músculo.

Cabe mencionar que no se realizó ningún estudio para evaluar los cambios conductuales. Solo se comparo el comportamiento de los animales antes, durante y después de la administración del 3-NP. Antes de iniciar el tratamiento los ratones mostraron actividad normal, considerando como normal la agilidad para correr y no permitir ser atrapados con facilidad, durante la aplicación del tratamiento fue posible observar que la actividad de los ratones fue disminuyendo paulatinamente, esto es que dormían más y era más fácil atraparlos, para el termino de la aplicación del tratamiento los animales ya mostraban una actividad casi nula, todo el tiempo dormían y su captura era muy fácil. Dicho comportamiento fue comparado con los cambios que reportan Borlongan et al, 1995, en donde mencionan que la patología del comportamiento inducida por el 3-NP presenta tres estados; el estado 1 con somnolencia, el estado 2 presenta incoordinación al caminar con movimientos ondulantes y el estado 3 con desequilibrio lateral y ventral [Borlongan et al, 1995]. Estudios previos han demostrado que el consumo de 3-NP produce daños no solo a nivel neuronal, también se presentan anomalías motoras que consisten en debilidad general, incoordinación de las extremidades desarrollando parálisis [Brouillet et al, 1999].

Otro estudio ha demostrado que la administración sistémica del 3-NP da como resultado lesiones en los ganglios basales con un decremento inicial en la actividad motora, seguida de episodios ocasionales de hiperactividad y/o movimientos anormales. Además se ha observado que en ratas jóvenes (6-10 semanas de edad) y maduras

(1-28 semanas de edad) la inyección sistémica de 3-NP dispara bradicinesia y parálisis [Borlongan et al, 1997].

En el presente estudio la innervación del músculo esquelético fue observada mediante la medición de la expresión de AChE, no mostrando cambios significativos en los animales tratados con 3-NP en comparación con los no tratados, Podría pensarse que esto es debido a que no existe una denervación del músculo, ya que se sabe que la actividad de la AChE disminuye cuando ocurre una denervación muscular [Karczamar et al, 1987]. Se ha reportado que el daño motor ocasionado por la administración de 3-NP depende de la edad, ya que en animales de 6 semanas de edad la administración sistémica de 3-NP muestra daños del 25 %, en animales de 7-14 semanas de edad el daño estriatal es del 80 % y en el animales de 16 semanas la lesión estriatal es mayor al 80 % hasta que finalmente mueren [Borlongan et al, 1997]. En el presente estudio la administración de 3-NP se realizó en un periodo de 5 días los cuales de acuerdo con lo reportado por Borlongan et al, 1995, en este periodo solo se presentan los síntomas del estado 1 que son somnolencia e hipocinesia [Borlongan et al, 1995].

Recientemente se ha reportado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Huntington [Kumar et al, 2006], al ser el 3-NP una toxina mitocondrial la administración subcrónica de 3-NP genera una disminución en la producción de ATP, lo cual trata de ser compensado con un aumento en la capilaridad del músculo de animales con administración de 3-NP, como se ha reportado en otros estudios se ha utilizado a la APasa como un marcador de los vasos sanguíneos [Hansen-Smith et al, 1992]; cuando un organismo es expuesto a condiciones de hipoxia las fibras musculares disminuyen en su diámetro y a su vez hay un aumento en los capilares que rodean dichas fibras, con la finalidad de compensar la condición de hipoxia y tener un mayor

aporte de oxígeno [Hansen-Smith et al, 1992]. Estos datos comprueban lo reportado en el presente estudio en donde se observa que hay un aumento significativo en la capilaridad de los músculos provenientes de animales tratados con 3-NP.

Como se ha mencionado anteriormente, el 3-NP es una toxina mitocondrial que bloquea el complejo II de la cadena respiratoria alterando el metabolismo mitocondrial, lo que ocasiona un decremento significativo en la actividad mitocondrial [Borlongan et al, 1997].

En diversos estudios se ha demostrado que el 3-NP es un inhibidor competitivo de la DHS [Coles et al, 1979], como se muestra en la figura 10 la actividad de DHS se ve incrementada en el músculo de animales tratados con 3-NP, lo que podría explicarse con lo reportado por Kumar et al, 2006, y por Borlongan et al, 1995, mencionando que la administración subcrónica de 3-NP por periodos cortos (5 días) ocasiona somnolencia e hipocinesia, además de provocar una disminución en la producción de ATP lo que ocasiona que el organismo entre en un estado de estrés oxidativo.

Así mismo con la administración de 3-NP también se producen alteraciones en el complejo III de la cadena respiratoria alterando específicamente el transporte de electrones que se lleva a cabo con la enzima COX. En otros estudios la deficiencia de COX en las fibras musculares esta relacionado con patologías mitocondriales, generalmente esta deficiencias es utilizada para dar un diagnóstico de enfermedad mitocondrial [Barron et al, 2005]. Además se relaciona a COX con la activación de las caspasas responsables de iniciar la apoptosis celular, esto ocurre después de la administración de 3-NP [Antonawich et al, 2002]. Barron y col., sugiere que las alteraciones en la expresión de COX producen una disminución en el número de fibras musculares [Barron et al,



2005].

En el presente estudio el músculo gracilis muestra un aumento en la expresión de la COX debido a que dicho músculo es un músculo de tipo adductor lo que significa que sus fibras son "fibras pálidas" por lo que presentan muy pocas mitocondrias y su metabolismo es glucolítico [<http://escuela.med.puc>], por lo que no se ve afectado directamente por la administración de 3-NP. En el caso del músculo gastrocnemius se sabe que es un músculo de tipo flexor lento refiriendo a esto que sus fibras son "fibras rojas" presentando una gran cantidad de mitocondrias siendo de metabolismo oxidativo, por lo que se ve directamente afectado por el suministro del ácido 3-NP, disminuyendo de esta manera la expresión de la COX.

## CONCLUSIONES

- ✓ El tratamiento con 3-NP no genera cambios en la expresión de AChE debido a que esta enzima solo se ve afectada cuando ocurre una denervación muscular. Sin embargo, dicho tratamiento sí genera cambios en el tamaño de la placa neuromuscular siendo esta de mayor tamaño en los músculos de animales tratados con 3-NP.
- ✓ Existe un aumento en la expresión de la APasa en los grupos experimentales tratados con 3-NP con respecto al control.
- ✓ La aplicación sistémica de 3-NP produce un incremento en la expresión de DHS.
- ✓ Existe una disminución en la expresión de la COX en el músculo gastrocnemius de ratones tratados con 3-NP, no así para el músculo gracilis el cual presenta un aumento en la expresión de COX.
- ✓ Podemos concluir que el estudio de la enfermedad de Huntington a nivel periférico es muy importante, ya que al conocer las alteraciones metabólicas ocurridas a nivel periférico y muscular es posible encontrar posibles terapias de recuperación de la movilidad, además se podría contrarrestar a la enfermedad desde otro nivel no solo el neurológico.

## TABLA DE ABREVIATURAS

| <b>SIGNIFICADO</b>                 | <b>ABREVIATURA</b> |
|------------------------------------|--------------------|
| <b>SISTEMA NERVIOSO</b>            | <b>SN</b>          |
| <b>SISTEMA NERVIOSO CENTRAL</b>    | <b>SNC</b>         |
| <b>SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO</b> | <b>SNP</b>         |
| <b>ENFERMEDAD DE HUNTINGTON</b>    | <b>HD</b>          |
| <b>ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO</b>     | <b>3-NP</b>        |
| <b>ACETIL COLINESTERASA</b>        | <b>AChE</b>        |
| <b>ACETILCOLINA</b>                | <b>ACh</b>         |
| <b>FOSFATASA ALCALINA</b>          | <b>APasa</b>       |
|                                    |                    |
|                                    |                    |

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| <b>CITOCROMO OXIDASA</b>        | <b>COX</b> |
| <b>DESHIDROGENASA SUCCÍNICA</b> | <b>DHS</b> |
| <b>SUSTANCIA NEGRA COMPACTA</b> | <b>SNc</b> |
| <b>HUNTINGTINA</b>              | <b>htt</b> |
| <b>GEN DE HUNTINGTON</b>        | <b>Hd</b>  |

## BIBLIOGRAFIA

- ✓ Alston, t. A., L. Mela and H. J. Bright. 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinata dehidrogenase. Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 74, No. 9, Pp. 3767-3771.
  
- ✓ Antonawich, F. J., S. M. Fiore-Marasa and C. P. Parker. 2002. Modulation of apoptotic regulatory proteins and early activation of cytochrome c following systemic 3-nitropropionic acid administration. Brain Research Bulletin. Vol. 57, No. 5, Pp. 647-649.
  
- ✓ Barron, M. J., P. F. Chennery, D. Howel, E. L. Blakely, A. M. Schaefer. R. W. Taylor, D. M. Turnbull. 2005. Cytochrome c oxidase deficient muscle fibres: Substantial variation in their proportions within skeletal muscles from patients with mitochondrial myopathy. Neuromuscular Disorders. 15, Pp. 768-774.
  
- ✓ Beal, M. F. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? Ann Neurol. 31, Pp. 119-130.
  
- ✓ Beal, M. F., E. Bouillet, B. G. Jenkins, R. J. Ferrante, N. W. Kowall, J. M. Miller, E. Storey, R. Srivastava, B. Ft. Rosen and B. T. Hyman. 1993. Noeurochemical and histological characterization of the striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxins 3-nitropropionic acid. Journal Neurosci. Vol. 13, No. 10, Pp. 1481-1492.

- ✓ Borlongan, C. V., T. S. Randall, D. W. Cahill, P. R. Sanberg. 1995. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. Brain Research. 676, Pp. 231-234.
- ✓ Borlongan, C. V., T. K. Koutouzis and P. R. Sanberg. 1997. 3-Nitropropionic Acid Animal model and Huntington's disease. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. Vol 21. No. 3, Pp. 289-293.
- ✓ Brouillet, E., F. O. Condeelis, M. F. Beals and P. Hantraye. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. Progress in Neurobiology Vol. 59, Pp. 427 to 468.
- ✓ Chiasson, R. B. 1980. Laboratory Anatomy of the Perch. 3<sup>a</sup>. ed. Wm. C. Brown Company. Publishers. EEUU.
- ✓ Coles, C. J., D. E. Edmonton and T. P. Singer. 1978. Inactivation of Succinate Dehydrogenase by 3-Nitropropionate. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 254, No. 12, Pp. 5161-5167.
- ✓ Dimauro, S., K. Tanji, E. Bonilla, F. Pallotti and E. A. Schon. 2002. Mitochondrial abnormalities in muscle and other aging cells: classification, causes, and effects. Muscle & Nerve. 26:597-607.
- ✓ Estrada, F.E., M.C. Uribe, A. 2002. Atlas de histología de vertebrados. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Impreso en México. Pp. 222.

- ✓ Hansen-Smith, F. M., L. H. Blackwell and G. R. Joswiak. 1992. Expression of muscle capillary alkaline phosphatase is affected by hypoxia. American Physiological Society.
- ✓ Hernández-Echeagaray E. 2004. Avances sobre la Neurobiología de la enfermedad de Huntington. En Temas Selectos de Neurociencias III. Ed. Javier Velásquez Moctezuma, Editorial, UAM. ISBN 970-31-0244-1 (p. 33-41).
- ✓ Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell. 1998. Neurociencia y conducta. Ed. Prentice Hall. Pp. 812.
- ✓ Kano, Y., S. Shimegy, H. Takahashi, K. Masuda and S. Katsuta. 2000. Changes in capillary luminal diameter in rat soleus muscle after limb suspension. Acta Physiologica Scand. 169, Pp. 271-276.
- ✓ Karczmar, A. G. 1987. Neurobiology of acetylcholine. Ed. Perlman. New York. Pp. 595.
- ✓ Koller, W. C. and Timble, J. 1985. The gait abnormality of Huntington's disease. Neurology, 35, Pp. 1450-1454.
- ✓ Krasnianski, A., M. Deschauer, S. Neudeker, F. N. Gellerich, T. Müller, B. G. Schoser, M. Krasnianski and S. Zierz. 2005. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies. Brain. 128. Pp. 187-1876.

- ✓ Kumar, P. S. S. Padi, P. S. Naidu, A. Kumar. 2006. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioral changes: possible neuroprotective mechanism. Behv. Pharmacol. 17 (5-6) Pp. 485-92.
- ✓ Lindal, S. 2002. Mitochondrial and Neurodegenerative Diseases-Is There a Link? The role of Mitochondria in the Pathogenesis of Amyotrophic lateral Sclerosis (ALS). Ultrastructural Pathology. 26:1-2.
- ✓ Novelli, A., J. A. Reilly, P. G. Lysko and R. C. Hennebery. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. Brain Res. 451, Pp. 205-212.
- ✓ Qin, Z-h., Z-l. Gu. 2004. Huntingtin processing in pathogenesis of Huntington disease. Acta Pharmacol Sin. 25 (10). 1243-1249.
- ✓ Rodríguez-Martínez, E. 2001. Marcadores de estrés oxidativo en sistema nervioso central de ratas administradas intraestriatalmente con ácido 3-Nitropropiónico, ácido Quinolínico y en ratones transgénicos como modelos experimentales de la corea de Huntington. TESIS de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. Pág. 424.
- ✓ Sathasivam, K., C. Hobbs, L. Mangiarini, A. Mahal, M. Turmaine, P. Doherty, S. W. David and C. P. Bates. 1999. Transgenic models of Huntington's disease. The Royal Society. 354, Pp. 963-969.
- ✓ Saydoff, J. A., R. A. G. Garcia, S. E. Browne, L. Liu, V.



Sheng, D. Brenneman, Z. Hu, S. Cardin, A. González, R. W. von Borstel, J. Gregorio, H. Burr and M. F. Beal. 2006. Oral uridine pro-drug PN401 is neuroprotective in the R6/2 and N171-82Q mouser models of Huntington's disease. Neurobiology of Disease. 24. Pp. 455-465.

- ✓ Siegel, G.J., B.W. Agranoff, R.W. Albers, S.K. Fisher, M.D.Uhler. 1999. Basic Neurochemistry. 6<sup>th</sup> ed. Ed. Lippincott, Williams & Wilkins.
- ✓ Vázquez, M. E. M., M. P. Tuena de Gómez. 2002. Mitocondria. Ed. Prado. Pp. 239.
- ✓ Vielhaber, S., C. Kornblum, H-J. Heinze, C. E. Elger and W. S. Kunz. 2005. Mitochondrial changes in skeletal muscle in amyotrophic lateral sclerosis and other neurogenic atrophies a comment. Brain. 128 E38.

### **Páginas de Internet**

- ✓ <http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/segundo/histologia/HistologiaWeb/paginas/mu31593.html>