



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**EFFECTO DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO EN EL MÚSCULO  
GASTROCNEMIO: EFECTOS FISIOLÓGICOS E  
HISTOQUÍMICOS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**DIEGO CASTILLO GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY**



Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2017.



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.

## Dedicatoria

A mi madre:

Por su apoyo incondicional brindado en esta gran etapa de mi vida, desde el inicio hasta el final de mi formación profesional.

Asimismo, por su amor inconmensurable, su gran sacrificio, sus consejos, cariño, ánimos, aliento y esfuerzo.

Gracias.

## Agradecimientos

A la Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray por su apoyo, amistad, consejos, confianza y la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

A la Dra. Bertha Alegría Segura por todo su apoyo en la realización de los experimentos, por su confianza, paciencia, amistad y consejos.

Al Dr. Ismael Jiménez Estrada por brindarme su apoyo y paciencia, así como sus observaciones en este trabajo.

A los Dres. Guillermo Ávila Acevedo y Maximiliano Ibarra Barajas por sus atinados comentarios en la escritura de este trabajo.

A mi *alma mater*, la UNAM.

A mis compañeros de laboratorio del CINVESTAV, por brindarme su apoyo y todas las facilidades para la realización de este trabajo.

A mis amigos que han llegado para quedarse: Ariel, Emilio y Miguel Ángel, quienes me han acompañado a lo largo de esta gran aventura.

A Daniela por todo su apoyo brindado, cariño y amistad a lo largo de mi formación profesional.

A mis amigos biólogos, con los cuales adquirí nuevas experiencias de la vida: Alfonso, Carlos, Enrique, Eduardo, Yoel, Rogelio y Chávez.

A mis compañeros de laboratorio de la FES: César, Belén, Alam, Víctor y Neto por su amistad, conocimiento y ratos de esparcimiento.

# Índice

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	2
Sistema Nervioso	2
Músculo esquelético	4
Sinapsis y transmisión sináptica	5
Enfermedad de Huntington	11
Modelo farmacológico de la EH	14
Antioxidantes	16
<b>Hipótesis</b>	20
<b>Objetivos</b>	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
<b>Metodología</b>	21
Material biológico	21
Grupos experimentales	21
Medidas morfométricas	21
Registro mecánico	22
Técnicas histoquímicas y procedimiento de tinción	23
<b>Resultados</b>	25
Medidas morfométricas	25
Valoración Histoquímica	26
Registro mecánico	34
Tiempo de contracción	36
Tiempo medio de relajación	37
Fatiga muscular	37
<b>Discusión</b>	38
Efecto del 3-NP y el ACG en el peso corporal	38
Actividad enzimática	39
Evaluación del registro mecánico	43
<b>Conclusiones</b>	45
<b>Literatura citada</b>	46

## Abreviaturas:

3-NP: Ácido 3 nitropropionico	ME: Músculo esquelético
ACG: Ácido clorogénico	MyHC Cadena pesada de miosina
ACh: Acetilcolina	nAChR: Receptor de tipo nicotínico de ACh
ANOVA: Análisis de varianza	NADH-TR: Nicotinamida adenina dinucleótido reductasa tetrazolio
APP: Polifenoles de manzana	NO: Óxido nítrico
ATP: Adenosín trifosfato	O <sub>2</sub> <sup>-</sup> : Anión superóxido
ATPasam: ATPasa miofibrilar alcalina	PA: Fosfatasa alcalina
BS: Botón sináptico	PBS: Buffer de fosfatos
CAPE: Éster fenilílico del ácido caféico	PM: Placa neuromuscular
COX: Citocromo c oxidasa	PPSE: Potencial postsináptico excitatorio
CPDH: Complejo piruvato deshidrogenasa	PTx: Pretratamiento
CTEM: Cadena transportadora de electrones mitocondrial	RS: Retículo sarcoplásmico
EH: Enfermedad de Huntington	SDH: Succinato deshidrogenasa
ERO: Especie reactiva de oxígeno	SNC: Sistema nervioso central
ERN: Especie reactiva de nitrógeno	SNP: Sistema nervioso periférico
FIH-1 $\alpha$ : factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$	T: Túbulos transversos
GB: Ganglios basales	TC: Tiempo de contracción
GPe: Globo pálido externo	TIC: Tiempo al inicio de la contracción
Htt: Proteína Huntingtina	TPC: Tiempo al pico de la contracción
Htt-m: Forma neurotóxica de la proteína Huntingtina mutada	TR: Tiempo de relajación
ICDH: Isocitrato deshidrogenasa	TMR: Tiempo medio de relajación
	WT: Wild type

## Resumen

Se ha demostrado que las alteraciones en la bioenergética están asociadas con las enfermedades neurodegenerativas, una de ellas es la enfermedad de Huntington (EH). El modelo de la EH producido por el ácido 3-nitropropionico (3-NP) reproduce la degeneración estriatal selectiva y mimetiza los síntomas hipercinéticos análogos a los estadios tempranos de la enfermedad. No obstante, esta alteración energética no solo daña al tejido nervioso, sino a tejidos periféricos incluyendo el músculo esquelético.

Se han reportado antioxidantes que protegen el daño inducido por el 3-NP mostrando un efecto neuroprotector. El ácido clorogénico (ACG) ha mostrado poseer una amplia gama de propiedades en beneficio de la salud humana, sin embargo no se ha evaluado su actividad a nivel muscular, por consiguiente en este trabajo se evaluó fisiológica e histológicamente el efecto del ACG en el músculo gastrocnemio de ratones tratados con la neurotoxina 3-NP.

Los resultados obtenidos muestran que el ACG tiende a mitigar la pérdida de peso provocada por el 3-NP, asimismo, no se observó ninguna diferencia significativa en el peso de los músculos y de la longitud óptima y en reposo. Por otra parte, en la actividad enzimática se observaron diferencias significativas en las histoquímicas de citocromo c oxidasa (COX) y fosfatasa alcalina (PA) en los grupos ACG comparados con control y 3-NP y PTx respectivamente, mientras que en nicotinamida adenina dinucleótido reductasa tetrazolio (NADH-TR), succinato deshidrogenasa (SDH) y ATPasa miofibrilar alcalina (ATPasam) no mostraron cambios considerables. Finalmente el tiempo medio de relajación (TMR) y la fatiga muscular presentaron cambios significativos en el grupo PTx en comparación con el 3-NP y control respectivamente.

La aplicación de ACG tiende a prevenir la pérdida de peso corporal provocada por el 3-NP, asimismo causa un cambio en la actividad enzimática del músculo gastrocnemio modificando la respuesta contráctil muscular produciendo una menor resistencia a la fatiga.

## Introducción

### Sistema Nervioso

El cerebro contiene miles de millones de células nerviosas o neuronas, las cuales reciben e integran las señales del entorno, y a su vez regulan las respuestas del cuerpo (Wu *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista anatómico, el sistema nervioso se divide en sistema nervioso central y sistema nervioso periférico. El sistema nervioso central (SNC), comprende el cerebro (hemisferios cerebrales, diencefalo, cerebelo y tronco cerebral) y a la médula espinal. En tanto que el sistema nervioso periférico (SNP) incluye a las neuronas sensoriales, que enlazan los receptores sensoriales de la superficie corporal o aquellos más profundos, con los circuitos de procesamiento relevantes en el SNC (Fig. 1).

El SNP presenta una porción motora que consiste de dos componentes; las células y axones que inervan las glándulas y los músculos liso y cardiaco, los cuales constituyen la división motora autonómica o visceral; mientras que los axones motores que conectan el cerebro y la médula espinal a los músculos esqueléticos constituyen la división motora somática del SNP, donde los axones periféricos están reunidos en haces que son denominados nervios (revisado en Purves *et al.*, 2004).

Los nervios intervienen en las funciones voluntarias, como es el caso de la contracción del músculo esquelético en la locomoción; estos nervios están mielinizados y constan de una única neurona que conecta el SNC con la fibra del músculo esquelético (Lorenzo *et al.*, 2008). Por otro lado, cada axón motor se ramifica para inervar más de una fibra muscular; un axón motor y todas las fibras

musculares que controla forman una unidad funcional referida como unidad motora. Estas unidades motoras son la conexión crítica entre el cerebro y los músculos.

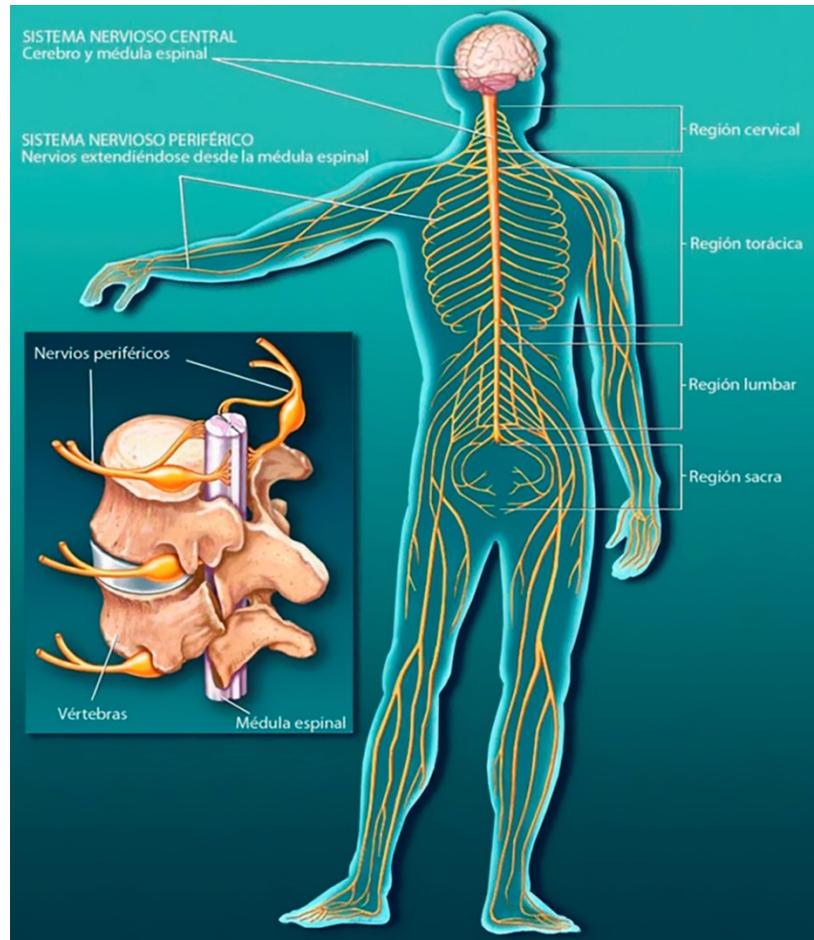


Figura 1. El sistema nervioso dividido en sus dos partes: el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. Tomada de Society for Neuroscience, 2008.

Sin embargo, los movimientos más complejos que ejecutamos incluyendo aquellos voluntarios que requieren una planeación consciente, implican la interacción de muchas otras regiones del cerebro y la médula espinal, incluyendo la corteza motora, los ganglios basales (GB), el tálamo, el cerebelo y un gran número de neuronas localizadas dentro del cerebro medio y el tallo cerebral, donde la disfunción de los GB puede causar serios problemas de movimiento (revisado en Society for Neuroscience, 2008) debido a la función que desempeñan en la coordinación e integración de la actividad motora, suprimiendo los movimientos no

deseados y preparando los circuitos de las neuronas motoras superiores para dar inicio al movimiento fino (Ávila-Luna y Bueno-Nava, 2014). Estas disfunciones dan lugar a trastornos del movimiento particularmente llamativos y característicos de la enfermedad de Parkinson (temblor en reposo, rigidez) y la enfermedad de Huntington (movimientos coreiformes) (revisado en Kandel *et al.*, 2013).

### **Músculo esquelético**

El músculo esquelético (ME) constituye aproximadamente el 40% de la masa corporal, y está formado por haces de fibras musculares contráctiles multinucleadas, resultado de la fusión de los mioblastos (Laumonier y Menetrey, 2016).

Aunque histológicamente el ME parece uniforme, estos haces de fibras están compuestos de miofibras heterogéneas especializadas que permiten al cuerpo mantener la postura y realizar un amplio rango de movimientos. Su heterogeneidad depende de su tamaño, metabolismo y función contráctil. Esta diversidad de miofibras posibilita a los diferentes grupos de músculos cumplir una variedad de funciones (Bassel-Duby y Olson, 2006). La variabilidad en las propiedades fisiológicas de las miofibras depende fuertemente en la isoforma de la cadena pesada de miosina que expresan (MyHC).

Basado en la expresión de las isoformas predominantes de MyHC, las miofibras son clasificadas principalmente como fibras de tipo I, tipo IIa, IIx/d, y de tipo IIb (Fig.2); donde las fibras de tipo I exhiben un metabolismo oxidativo, las tipo IIa presenta características intermedias, mostrando un metabolismo mixto; mientras los tipos IIx/d y IIb un metabolismo primariamente glicolítico. A su vez, un excelente suministro de sangre proporciona una red de capilares sanguíneos entre las fibras individuales (Ferraro *et al.*, 2014).

Se han utilizado distintos métodos para clasificar las fibras de acuerdo a su metabolismo, entre ellos se encuentran las técnicas histoquímicas. La histoquímica de NADH-TR, SDH y COX clasifica las fibras de acuerdo a su metabolismo específico a nivel de los complejos I, II y IV de la cadena respiratoria

respectivamente (López-García *et al.*, 2016; Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011; Roth *et al.*, 2009) proporcionando información para deducir su metabolismo.

Otra de las técnicas que apoya en su clasificación respecto a su velocidad de acortamiento es la ATPasa miofibrilar, la cual nos indica el acoplamiento mecánico-químico en la contracción muscular dependiente de las interacciones de las cabezas de miosina con los filamentos de actina (Candau *et al.*, 2003).

También son utilizadas para mostrar la estructura vascular que envuelve a las fibras, en este caso la fosfatasa alcalina (PA) ha mostrado una gran utilidad como marcador del endotelio capilar (Wagatsuma *et al.*, 2005).

A su vez, las diferencias en la fatigabilidad entre los músculos está relacionada a la variabilidad en su composición de tipo de fibras, con capacidades oxidativas y/o glicolíticas (Ruiz-Rosado *et al.*, 2013), por lo cual las mediciones de carácter mecánico son un procedimiento útil para conocer el tipo predominante de fibras en el músculo.

Recordemos que los axones motores o motoneuronas transmiten la información desde el SNC a sus partes efectoras, en este caso los músculos; la transferencia de información se lleva a cabo en la placa neuromuscular (PM), en una zona especializada anatómica y fisiológicamente denominada sinapsis.

### **Sinapsis y transmisión sináptica**

Las sinapsis son caracterizadas en dos grupos: eléctricas y químicas.

En las sinapsis eléctricas, la terminal presináptica y la célula postsináptica se encuentran muy cercanas en regiones denominadas “gap junctions”. La corriente iónica generada por el potencial de acción en la neurona presináptica pasa directamente en la célula postsináptica a través de canales especializados llamados “gap junctions channels”, los cuales conectan físicamente el citoplasma de las células presináptica y postsináptica.

MyHC tipo	Metabolismo	Densidad mitocondrial	Citrato sintasa	SDH	Velocidad de Contracción	Resistencia a la fatiga	Color Mioglobina	CSA	Producción de fuerza
		Tiempo al pico de tensión	Eficiencia energética	Capacidad de resistencia					
Tipo I	Oxidativo	Alta	Baja	Contracción lenta	Resistente	Roja Alta	Pequeña	Débil	
Tipo IIa	Oxidativo Glicolítico	Intermedio	Intermedio	Contracción rápida	Resistente	Roja tenue Intermedio	Grande	Intermedio	
Tipo IIx/d	Glicolítico	Bajo	Alta	Contracción rápida	Fatigable	Blanca Baja	Grande	Fuerte	
Tipo IIb	Glicolítico	Bajo	Alta	Contracción rápida	Fatigable	Blanca Baja	Grande	Fuerte	

Figura 2. Tipos de fibras musculares en el músculo esquelético de mamíferos. SDH: succinato deshidrogenasa; LDH: lactato deshidrogenasa; CSA: área de la sección transversal. Modificado de: Ferraro *et al.*, 2014. *Antioxid Redox Sign* 21: 154-176.

Por otra parte, en las sinapsis químicas un espacio llamado hendidura sináptica separa a las dos células, estas no se comunican a través de gap junctions, sino que un potencial de acción en la célula presináptica conduce a la liberación de un neurotransmisor químico desde la terminal nerviosa. El neurotransmisor difunde a través de la hendidura sináptica y se une a moléculas receptoras en la membrana postsináptica, los receptores pueden estar asociados a un canal iónico y regulan la actividad a través de la activación e inhibición de canales iónicos en la célula postsináptica. Esto conduce a cambios en el potencial de membrana de la neurona postsináptica que pueden excitar o inhibir el disparo de un potencial de acción (Fig. 3) (revisado en Kandel *et al.*, 2013).

En el músculo, ocurren sinapsis de tipo químico, donde los axones motores hacen contacto sináptico innervando una región especializada de la membrana muscular

llamada placa neuromuscular (PM), aquí el axón motor pierde su vaina de mielina y se divide en finas ramificaciones.

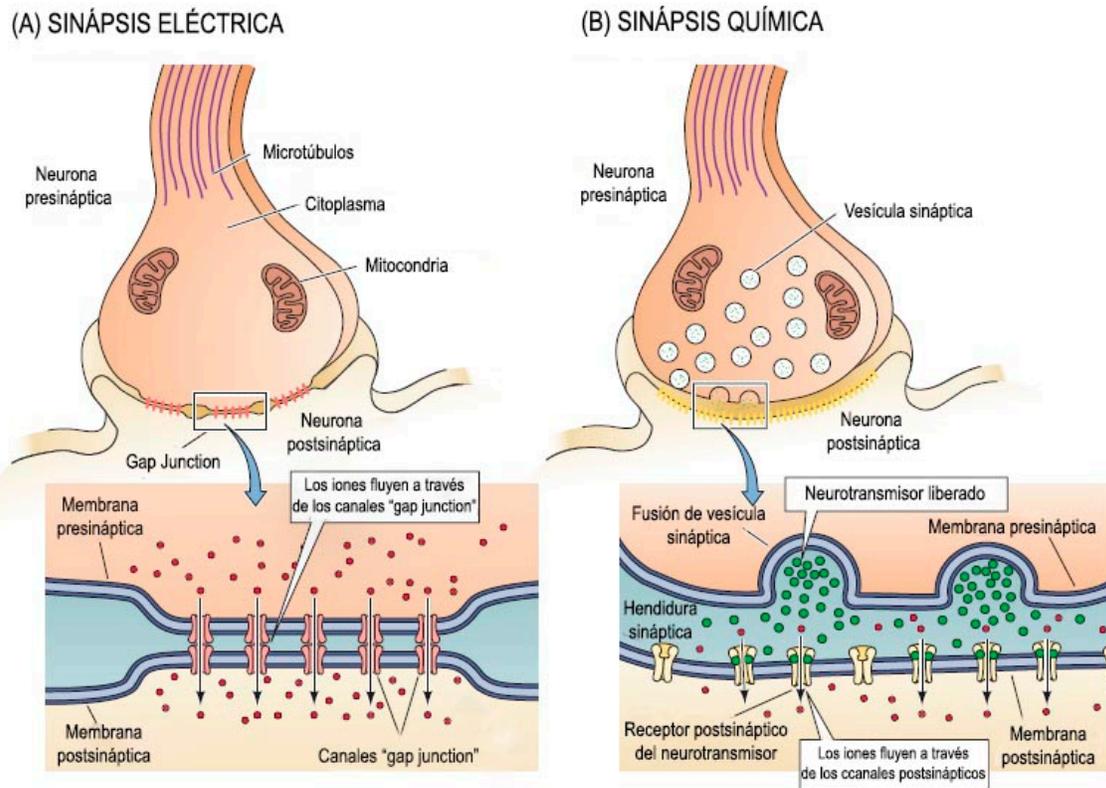


Figura 3. Sinapsis eléctrica y química. A) En la sinapsis eléctrica, las uniones gap entre las membranas permiten el flujo de iones pasivamente provocando así, un cambio en el potencial de membrana dando inicio o inhibiendo la generación de potenciales de acción. B) En la sinapsis química no existe comunicación intercelular, sino que hay una hendidura sináptica en la cual los neurotransmisores son liberados, estos se unirán a sus moléculas receptoras abriendo o cerrando canales iónicos. Modificado de Purves *et al.*, 2004.

Los extremos de las ramificaciones forman múltiples expansiones, llamadas botones sinápticos (BS), de los cuales la moto neurona libera su neurotransmisor. Cada BS está posicionado sobre la membrana muscular que comprende profundas depresiones, o pliegues de unión, que contiene los receptores del neurotransmisor. El neurotransmisor liberado por la termina del axón motor es la acetilcolina (ACh) y el receptor en la membrana muscular es el receptor de tipo nicotínico de ACh (nAChR) (revisado en Kandel *et al.*, 2013).

La ACh es degradada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en acetato y colina. La AChE reside en la hendidura sináptica, rompiendo la ACh para que no

permanezca unida a sus receptores ni en el espacio sináptico, lo cual podría causar una contracción muscular extendida no deseada (OpenStax College, 2013) (Fig. 4).

La liberación del neurotransmisor de la terminal del axón motor activa los canales activados por ligando de ACh en la membrana muscular en la PM, lo que resulta en un potencial postsináptico excitatorio (PPSE); la estimulación de una célula motora produce un potencial sináptico de aproximadamente 70 mV. Este cambio en el potencial de la membrana generalmente es suficientemente grande para activar rápidamente los canales de sodio dependientes de voltaje en los pliegues de unión, convirtiendo el PPSE en un potencial de acción, el cual se propaga a lo largo de la fibra muscular (revisado en Kandel *et al.*, 2013).

El impulso generado en una célula muscular se propaga al interior de la célula por los túbulos transversos (T). Los túbulos T terminan muy cerca de un sistema de membranas citoplasmáticas que conforman el retículo sarcoplásmico (RS), donde cerca del 80% de las proteínas integrales de la membrana del RS forman la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , llamada ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ , cuya función es transportar el calcio desde el citosol hacia la luz del RS, donde este se almacena para usarse en el proceso de excitación-contracción.

La llegada de un potencial de acción a través de los túbulos T, despolariza los canales de calcio de la membrana del RS, los abre y permite que el calcio salga del compartimiento de RS y viaje hasta las miofibrillas, donde se une a la troponina, lo que causa un cambio conformacional que ocasionará la contracción muscular.

Una vez que la estimulación de la fibra nerviosa motora cesa, los canales de calcio de la membrana del RS se cierran y las bombas de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  retiran el exceso de calcio del citosol (Fig. 5) (revisado en Karp, 2008).

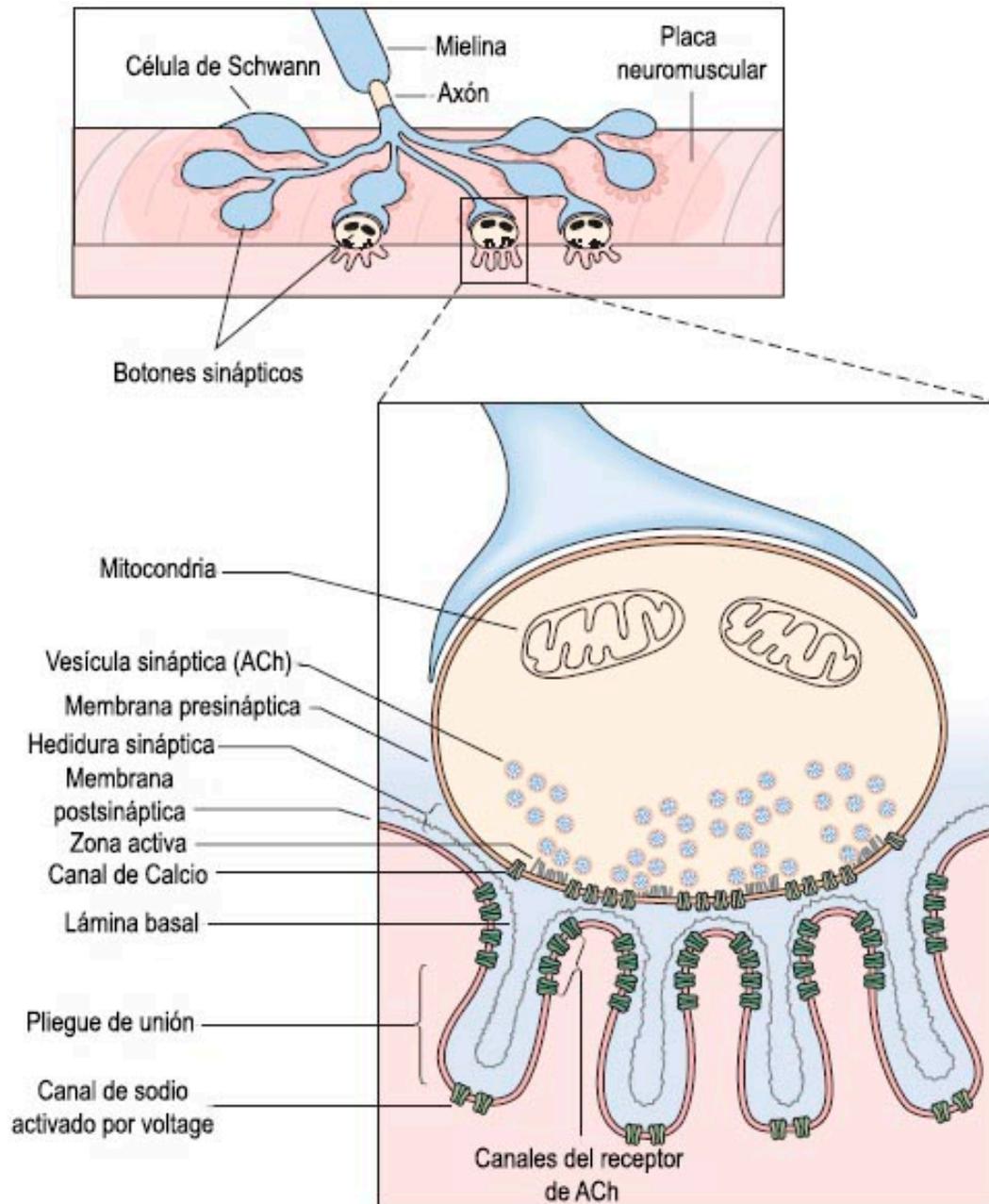


Figura 4. Placa neuromuscular. El axón motor se divide en ramificaciones finas llamadas botones sinápticos (BS). Los BS contienen vesículas sinápticas agrupadas y listas para la liberación de ACh. Inmediatamente bajo cada BS de la PM se encuentran los pliegues de unión, donde la cresta de los mismos contiene una alta densidad de receptores de ACh. En cambio en la base, encontramos los canales de sodio dependientes de voltaje. Entre la fibra muscular y el nervio terminal se encuentra una lámina basal constituida de colágeno y glicoproteínas. En esta región es donde encontramos a la AChE, la cual se encarga de degradar a la ACh en acetato y colina. Tomado de Purves et al., 2004. ACh: Acetilcolina, PM: placa neuromuscular, AChE: acetilcolina esterasa.

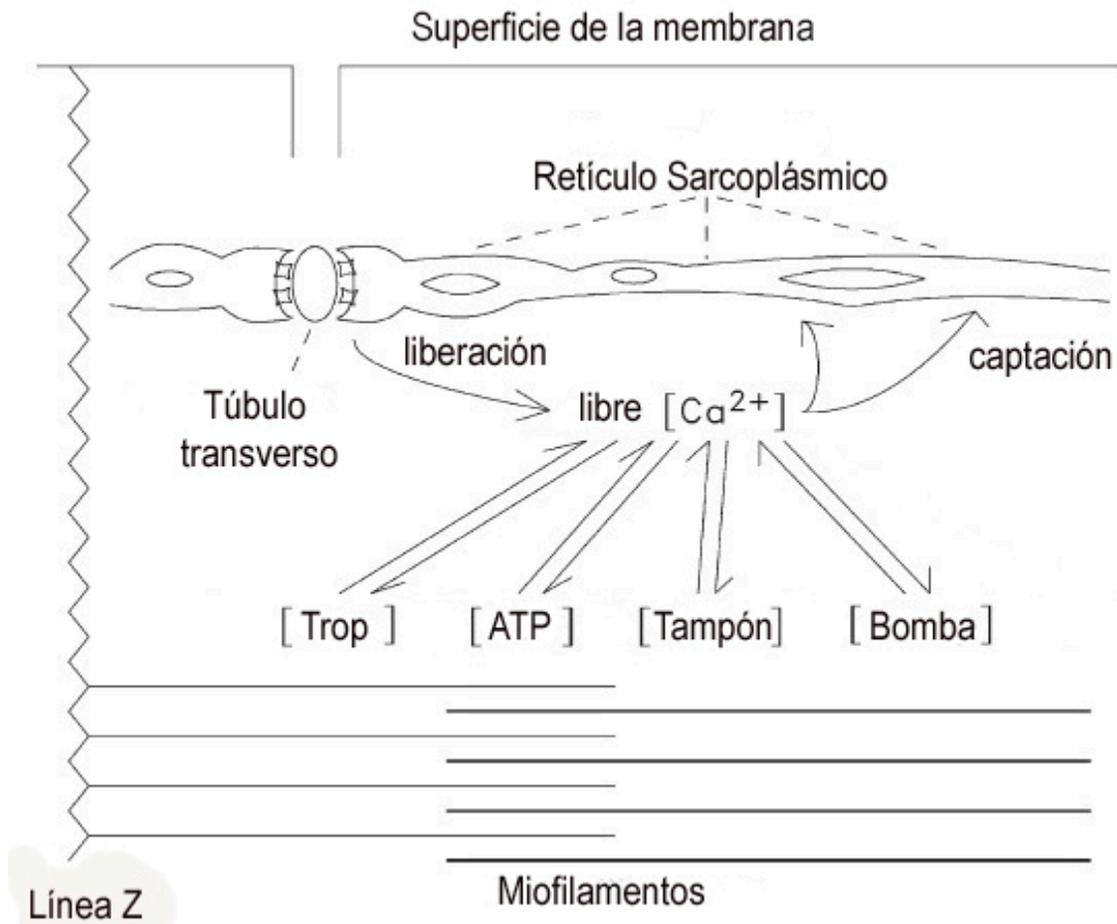


Figura 5. Esquema representativo del acople de la excitación-contracción del músculo. La despolarización de los túbulos T inicia la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS, donde el aumento de Ca<sup>2+</sup> libre se une a sus moléculas blancas, en este caso la troponina [Trop], ATP y Tampón como tampones móviles para Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y la bomba, la cual secuestra Ca<sup>2+</sup> dentro del RS. Modificado de Baylor y Hollingworth, 2012.

En resumen, la activación de los receptores de ACh permite el paso de cationes a través del poro del receptor, lo cual conduce a la generación del potencial de acción de la célula muscular que produce la contracción muscular (Hughes *et al.*, 2006).

El músculo como un tejido extenso y fácilmente accesible puede, por lo tanto, proporcionar pistas sobre los mecanismos del desarrollo de enfermedades, entre ellas las neurodegenerativas, debido a las alteraciones en la coordinación motora

que presentan, tales como, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Hering *et al.*, 2016; Purves *et al.*, 2004).

### **Enfermedad de Huntington**

La Enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento neurodegenerativo provocado por una mutación que cambia al amino terminal 5' del gen que codifica para la proteína Huntingtina (Htt) presente en el cromosoma 4 (4p16.3), lo cual conduce a la producción de la forma neurotóxica de la proteína mutada (Htt-m). La causa es una expansión anormal de repeticiones de nucleótidos de CAG en el exón 1 del gen de la Huntingtina, lo que ocasiona una poliglutaminación anormalmente larga de la proteína que se transcribe (Grupo de investigación colaborativa de la enfermedad de Huntington, 1993). Aunque la mutación genética causante del Huntington ha sido identificada, el mecanismo fundamental de la patología es desconocido (Ribchester *et al.*, 2004).

Típicamente, la enfermedad es caracterizada por una neurodegeneración progresiva de los núcleos putamen y caudado y el globo pálido externo (GPe) (Harris *et al.*, 1992), y se manifiesta con alteraciones cognitivas, trastornos de comportamiento e incoordinación de movimientos (Lun *et al.*, 2011). En estadios tempranos de la enfermedad, las neuronas que co-expresan encefalina y que proyectan al GPe a través de la vía indirecta son preferentemente vulnerables; la muerte de estas neuronas causa una marcada hipercinesia y los movimientos coreiformes típicos de la enfermedad (Pérez-De la Cruz, 2008).

La diagnosis clínica y el inicio de la enfermedad están generalmente basados en el inicio del trastorno del movimiento denominado corea de Huntington (Waldvogel *et al.*, 2014). La progresión en estas alteraciones motoras, inician con movimientos involuntarios acompañados por temblor; progresivamente, los pacientes pierden la coordinación del cuerpo debido a la presencia de movimientos involuntarios abruptos (coréicos), incluyendo los músculos de las extremidades, cabeza y tronco.

En esta fase de la enfermedad, existe un decremento cognoscitivo y una pérdida de la masa corporal (Harper, 1992).

Los cambios patológicos en el cerebro de pacientes con Huntington han sido bien descritos, por muchos años se ha enfocado la atención en los mecanismos patológicos subyacentes en estas regiones, sin embargo, con la clonación del gen se llegó al descubrimiento de que la expresión del gen de la EH y su proteína producto no está restringida al cerebro. En realidad, la expresión de la Htt incluso no es neurona específica, ya que es encontrada en muchos tejidos incluyendo el corazón y el músculo esquelético.

El papel de la Htt en esos tejidos es desconocido, muchos pacientes exhiben signos de patologías motoras periféricas, incluyendo movimiento anormal de ojos, dificultad para tragar, anormalidad en la manera de andar, disartria y debilidad del músculo esquelético (revisado en Bates *et al.*, 2002).

Incluso, se han documentado distintos daños a nivel músculo esquelético, dentro de los cuales se reporta el caso de un corredor semi profesional que desarrolló signos de una miopatía progresiva lenta con niveles altos de creatina cinasa muchos años antes de los primeros signos de corea; la biopsia reveló una miopatía leve con patología mitocondrial incluyendo una deficiencia en el complejo IV (Kosinski *et al.*, 2007). A su vez, se ha demostrado una disminución en la fuerza muscular de las extremidades inferiores en pacientes con Huntington en comparación con personas sanas (Busse *et al.*, 2008).

En pacientes con EH, se realizó una biopsia para evaluar las enzimas de la cadena respiratoria en el músculo, se encontró un defecto marcado en el complejo I en un paciente y defectos leves del mismo complejo en dos pacientes más (Arenas *et al.*, 1998).

En cultivos celulares de músculo revelaron que las células de pacientes con EH producen más lactato, y que esto puede ser indicativo de un nivel alto de glucólisis (Ciammola *et al.*, 2011). Asimismo, se observó una disminución en el tamaño del diámetro de las fibras musculares en ratones transgénicos que desarrollan la

enfermedad, los R6/2 comparados con ratones silvestres o wild type (WT), así como la conversión de fibras de tipo II a tipo I durante el proceso de atrofia muscular. A pesar de que la atrofia ocurrió en ambos tipos de fibras, la proporción de fibras estuvo alterada, donde el  $51 \pm 2\%$  de fibras fueron tipo I en WT, mientras que en los R6/2 fue de  $81 \pm 2.1\%$  (Ribchester *et al.*, 2004).

En modelos farmacológicos que imitan la sintomatología de la enfermedad se ha observado a nivel ultraestructural una atrofia mitocondrial, desorganización de las sarcómeras y de núcleos (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011) asimismo defectos mitocondriales, tales como edema y elongación anormales (Ciammola *et al.*, 2011).

Ribchester y cols. (2004) estudiando la transmisión sináptica neuromuscular encontraron que los músculos de ratones R6/2 desarrollaron anomalías, tal como una denervación dependiente con la edad, incluyendo reducción del área de placa terminal motora, hipersensibilidad a la ACh y disminución del potencial de reposo de la membrana de las fibras musculares.

Estas afectaciones a largo plazo, provocan que los músculos experimenten afectaciones fisiológicas y morfológicas visibles, tales como disminución en su peso, en sus longitudes y una severa atrofia. En conjunto, estas observaciones sugieren cambios en la masa del músculo esquelético originando debilidad en las extremidades (Vazqu ez-Mendonza *et al.*, 2017; Zielonka *et al.*, 2014).

Por lo tanto, es probable que la patología periférica de la EH, tal como pérdida de peso y una severa atrofia del músculo esquelético, pueda tener una contribución significativa para la progresión de la enfermedad (Zielonka *et al.*, 2014).

Por otra parte, existen teorías convincentes que involucran un metabolismo energético anormal, incluyendo disfunción mitocondrial o excitotoxicidad (Beal, 2000; Arredondo *et al.*, 2012; Pérez-De la Cruz *et al.*, 2010). Estudios bioquímicos en tejidos postmortem de pacientes con EH han revelado una disfunción selectiva de componentes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la cadena transportadora de electrones mitocondrial (CTEM) en las regiones afectadas del cerebro, particularmente los complejos II y IV.

La actividad del complejo II (Succinato ubiquinol oxidorreductasa) de la cadena respiratoria disminuye severamente en regiones del cerebro (caudato y putamen) de pacientes sintomáticos de EH; de la misma manera se ha observado déficit en el metabolismo oxidativo mitocondrial en el músculo esquelético de pacientes con Huntington y en modelos animales, lo cual puede apoyar el rol de la disfunción mitocondrial como un factor clave involucrado en la patogénesis del músculo relacionada con la EH (Reddy, 2014; Lodi *et al.*, 2000; Hernández, 2013).

No obstante, se han desarrollado nuevas estrategias, tanto genéticas como farmacológicas, para poder esclarecer los mecanismos fundamentales en la fisiopatología de esta enfermedad, las cuales brindan información valiosa que contribuye a una mejor comprensión del padecimiento, desde sus etapas tempranas hasta las más avanzadas.

### **Modelo farmacológico de la EH**

Una de las estrategias empleada en el estudio de esta afección es la utilización del ácido 3-nitropropionico (3-NP), el cual actúa mediante la inhibición irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que forma parte del complejo II de la CTEM (Fig. 6). Esta enzima es responsable de la oxidación de succinato a fumarato y su inhibición conduce a una disfunción mitocondrial, reduciendo la síntesis de ATP y generando así un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN) (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2010; Deshpande *et al.*, 2006).

De igual modo, el 3-NP produce lesiones selectivas en el estriado e induce cambios en las dendritas de las neuronas espinosas, resultando en degeneración neuronal en los GB y disfunción en el movimiento como se observa en pacientes con Huntington (Túnez *et al.*, 2010; Puneet *et al.*, 2007).

En roedores, la administración sistémica de 3-NP reproduce la degeneración estriatal selectiva; asimismo mimetiza los síntomas hipercinéticos análogos a los estadios tempranos de la EH (Pérez-De la Cruz *et al.*, 2010). De la misma manera se ha observado que en ratas Wistar, el 3-NP produce posturas distónicas del

tronco, degeneración axonal, incremento en las vesículas sinápticas excitatorias y concentraciones extracelulares incrementadas de aminoácidos excitadores en la región del caudato y putamen (Huan-Guang *et al.*, 2013).

También exhiben anomalías motoras al momento de permitirles trepar una cuerda, las ratas intoxicadas treparon utilizando únicamente sus extremidades anteriores, mientras que las posteriores colgaban al aire. Asimismo, se realizaron registros de electromiografía, las intoxicadas mostraron ondas de frecuencia baja con amplitudes bajas, mientras que los controles presentaron ondas de alta frecuencia con baja amplitud (Deshpande *et al.*, 2006).

En evaluaciones de la actividad enzimática mitocondrial mediante técnicas histoquímicas, así como el suministro vascular en ratones C57/BL6 intoxicados con dosis bajas de 3-NP, mostraron cambios en la fosfatasa alcalina, SDH y citocromo C oxidasa en los músculos gracilis y gastrocnemio. Igualmente, a nivel bioquímico el óxido nítrico (NO) y la peroxidación lipídica cambiaron en los ratones intoxicados con 3-NP, lo cual sugiere alteraciones metabólicas debido al estrés oxidativo (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011).

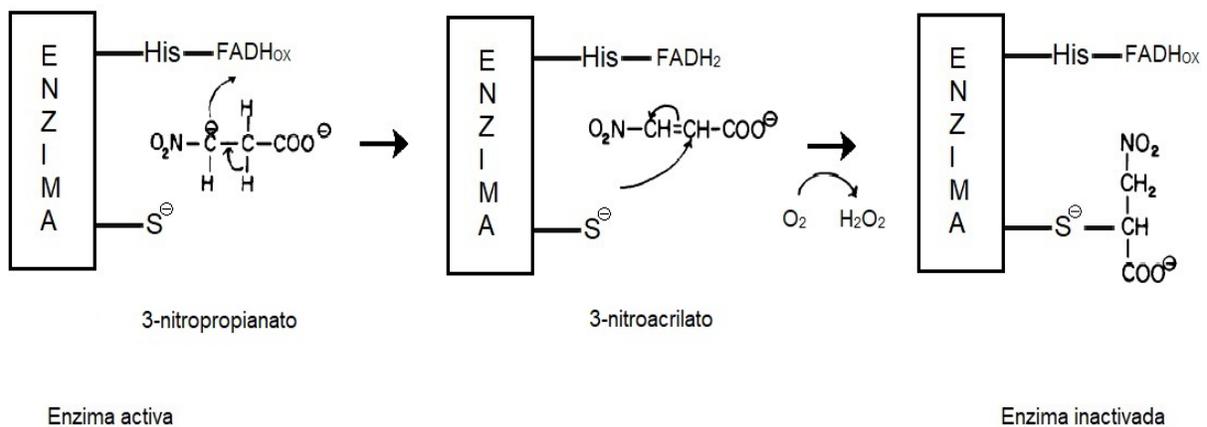


Figura 6. Mecanismo postulado para la inactivación de la SDH por el 3-NP. El 3-NP es metabolizado en 3-nitropropanato para después oxidarse a 3-nitroacrilato debido a la transferencia de 2 electrones a la flavina. Posteriormente hay una adición nucleófila de un grupo tiol al doble enlace del 3-nitroacrilato mientras la flavina reducida es oxidada de nuevo. Modificado de Coles *et al.*, 1979.

Por consiguiente, este modelo es ampliamente aceptado como una representación fiel de un metabolismo energético alterado, que ocurre en la EH (Brouillet *et al.*, 1998).

Sin embargo, hoy dos décadas después del descubrimiento de la genética del padecimiento, la patogénesis no ha sido bien entendida y el tratamiento adecuado no ha sido descubierto (Killoran y Biglan, 2014). Actualmente el asesoramiento genético, la terapia y los cuidados paliativos se consideran entre los tratamientos no farmacológicos de la EH (Phillips *et al.*, 2008).

No obstante, desde la antigüedad, los nutracéuticos ricos en flavonoides y no flavonoides han sido utilizados como suplementos, mejorando la función cognitiva y en la prevención de enfermedades neurodegenerativas en humanos (Spencer, 2007).

Estudios recientes han indicado que extractos de plantas, fracciones, compuestos aislados y formulaciones herbales tienen efectos en modelos neurotóxicos y transgénicos de la EH (Dey y Nath, 2015).

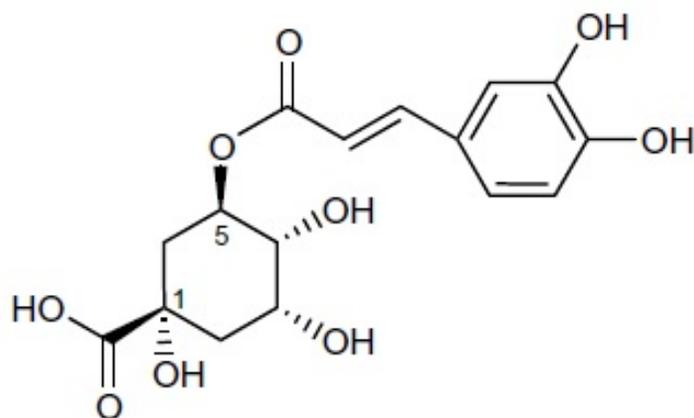
### **Antioxidantes**

El término antioxidante es ampliamente usado pero, asombrosamente es difícil de definirlo claramente. Sin embargo se ha propuesto una definición amplia de antioxidante, la cual es cualquier sustancia que, retarda, previene o remueve el daño oxidativo de una molécula blanco (revisado en Halliwell y Gutteridge, 2015).

Entre los antioxidantes más estudiados se encuentra el ácido clorogénico (ACG). Como fenol con una amplia distribución en la dieta humana, el ACG está ganando mayor atención en la investigación, debido a su extensa gama de propiedades en beneficio de la salud humana (Heitman y Ingram, 2014; Xiang y Ning, 2008).

El ACG es un éster del ácido caféico y ácido quínico que es abundante en el café y frutas (Fig. 7). El café representa la fuente dietética más rica de ACG y de ácidos cinámicos (ácido caféico). Se ha mostrado que el contenido de ACG de una taza de café de 200 mL va desde 70 hasta 350 mg, los cuales proveerían alrededor de 35 a 175 mg de ácido caféico (Higdon y Frei, 2006). Estudios en pacientes con colostomía indicaron que aproximadamente el 33% de ACG ingerido y el 95 % de ácido caféico se absorben intestinalmente (Olthof *et al.*, 2003).

Como se hizo mención, el ACG goza de abundantes propiedades, entre ellas ser un potente antioxidante, y participa en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, mejorando la defensa celular y coadyuvando en la prevención de daños a los componentes celulares (Sato *et al.*, 2011), a su vez presenta efectos antiinflamatorios, anticancerígenos (Mikami y Yamazawa, 2015), así como protector de la función endotelial, inhibidor de la hipoxia (Jian *et al.*, 2015; Qun-Yi *et al.*, 2015) y modulador del metabolismo de la glucosa (Farah *et al.*, 2008).



Ácido clorogénico

Figura 7. Estructura química del ACG. Tomado de Shimoda *et al.*, 2005. BMC Complem Altern M. 6:9.

Actualmente se sabe que varios antioxidantes pueden proteger con éxito el daño celular inducido por el 3-NP teniendo un efecto neuroprotector, además de contrarrestar el estrés oxidativo provocado por la neurotoxina (Courtes *et al.*, 2015; Pérez-De la Cruz *et al.*, 2010; Shivasharan *et al.*, 2013, Yan *et al.*, 2015; Solanki *et al.*, 2015).

Por citar algunos ejemplos, encontramos a la curcumina, la cual mostró un incremento en la actividad de los complejos mitocondriales, así como la restauración de los niveles de glutatión y la actividad de la superoxido dismutasa. A su vez, los animales tratados con curcumina exhibieron una mejora en la coordinación neuromotora comparados con aquellos tratados con 3-NP (Sandhir *et al.*, 2014).

También encontramos a la hesperidina, la cual mejoró la actividad locomotora y actuó como un agente antioxidante y antiinflamatorio en ratas tratadas con 3-NP (Menze *et al.*, 2012).

El Kaempferol, siendo administrado intraperitonealmente a dosis de 7, 14 y 21 mg/kg por cinco días, mostró atenuar el déficit motor, retrasar la mortalidad y evitó las lesiones estriatales en ratas tratadas con 3-NP (Lagoa *et al.*, 2009).

Igualmente, la quercetina administrada vía oral (25mg/kg) por 21 días mostró restablecer los niveles de ATP, atenuar el estrés oxidativo en términos de peroxidación lipídica y evitar la hinchazón mitocondrial y los déficits motores asociados a la administración sub crónica de 3-NP por 17 días (Sandhir y Mehrotra, 2012).

EL éster fenilico del ácido caféico (CAPE) también mostró un fuerte efecto de barrido de radicales y proporcionó protección contra la muerte celular inducida por el 3-NP en cultivos celulares. En modelos *in vivo*, sobre ratones C57B/L6 redujo la mortalidad en un 29%, disminuyó el daño estriatal y los déficits motores en la prueba del rotarod (Jia *et al.*, 2015).

Asimismo, se evaluó el efecto antitóxico y antigenotóxico del ACG en el daño producido por el 3-NP en un modelo *in vivo*. El ACG administrado como co-tratamiento junto al 3-NP redujo la toxicidad en un 32.76 %, como pre-tratamiento inhibió la toxicidad un 24.04 % y como pre-tratamiento más co-tratamiento evitó cualquier efecto tóxico y genotóxico, además mostró no tener ningún efecto tóxico *per se* (Alarcón-Herrera *et al.*, 2017).

No obstante, se han realizado evaluaciones de compuestos antioxidantes sobre el sistema músculo esquelético, en las cuales se han encontrado atractivos resultados.

Entre estos compuestos se ha evaluado al resveratrol, que fue administrado a una dosis de 100mg/kg/día por seis semanas a ratones *mdx*, el cual incrementó la expresión de MyHC lentas y mostró una conversión de fibras de tipo rápidas a más lentas. Además elevó la biogénesis mitocondrial y la activación de las proteínas SIRT1 y PGC-1 $\alpha$  (Ljubici *et al.*, 2014).

De la misma manera, Mizoyuna y cols. (2015) mostraron que una dieta a base de polifenoles de manzana (APP, 5% p/p) durante ocho semanas, reguló al alza dos características relacionadas al tipo de fibra: la tasa de MyHC de tipo IIx/IIb y la expresión de la proteína mioglobina en el musculo plantar de ratas Fischer F344. Sin embargo, la resistencia a la fatiga fue menor después de ocho semanas de una dieta de 0.5% de APP que después de una de 5%, apoyando una dependencia de la dosis de APP en el cambio de la composición de las fibras (Mizunoya *et al.*, 2015).

Tsuda y cols. (2012) encontraron que el ácido caféico incrementó la fosforilación de AMPK $\alpha$  Thr<sup>172</sup>, un paso esencial para la activación de la cinasa y la acetil coA carboxilasa Ser<sup>79</sup>, un blanco río abajo de AMPK en una manera dosis y tiempo dependiente; también revelaron que la actividad de la isoforma específica de AMPK $\alpha$ 2 incrementó significativamente. La activación de esta enzima fue asociada con la reducción del contenido de fosfocreatina (que tiene como función almacenar energía en el músculo) y un incremento en la actividad de los transportadores de glucosa. Todo esto fue realizado en los músculos epitrocleares de ratas Sprague-Dawley, los cuales fueron extraídos para después efectuarles las técnicas pertinentes.

No obstante, el ACG ha demostrado poseer efectos a nivel muscular, por ejemplo, Prabhakar y cols. (2009) demostraron que el ACG aplicado en cultivo celular de miotubos multinucleados L6 estimuló el transportador de glucosa mediante el incremento de la expresión del transcripto de GLUT4 y PPAR- $\gamma$ .

También, el ACG fue evaluado en el músculo sóleo aislado de ratones *db/db* y en células del músculo esquelético L6, donde el ACG estimuló y mejoró tanto los transportes de 2-deoxiglucosa basales como los mediados por insulina en el sóleo, mientras que a nivel celular causó un incremento dosis y tiempo dependiente en el transporte de glucosa. Se encontró que hay una activación de Akt por parte del ACG, donde estas activaciones paralelas a su vez estimulan la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática (Ong *et al.*, 2012).

Sin embargo, actualmente no se tienen estudios reportados acerca del posible efecto protector del ACG a nivel sistema nervioso periférico, específicamente en su

fisiología, la actividad contráctil y su repercusión en el músculo esquelético en el modelo farmacológico de la EH mediante la aplicación de 3-NP.

En el laboratorio se ha descrito que el ACG protege del daño tóxico y genotóxico producido en el modelo de 3-NP. (Alarcón-Herrera *et al.*, 2017), por lo tanto, en este trabajo se analiza el efecto de este antioxidante en el ME.

## **Hipótesis**

El ACG por sus múltiples beneficios ya descritos al ser aplicado en ratones tratados con 3-NP, mostrará un efecto benéfico en la fisiología del músculo gastrocnemio.

## **Objetivos**

### Objetivo general

Evaluar si el ACG produce un efecto protector en el músculo gastrocnemio de ratones C57/BL6 tratados con 3-NP.

### Objetivos particulares

Obtener los parámetros morfométricos de los grupos experimentales.

Valorar los cambios en el metabolismo a nivel muscular mediante técnicas histoquímicas (NADH-TR, SDH, COX, ATPasa miofibrilar y PA).

Evaluar mediante un protocolo de fatiga la respuesta contráctil muscular de los grupos experimentales.

## **Metodología**

### *Material biológico*

Se utilizaron ratones machos juveniles de la cepa C57/BL6 de 3 a 4 semanas de vida aproximadamente; los cuales tuvieron un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con libre acceso a alimento y agua.

### *Grupos experimentales*

Los tratamientos iniciaron alrededor de los 35 días de edad post natal de los ratones, los organismos fueron distribuidos al azar en cuatro grupos como a continuación se describe:

- 1) Grupo control: fue tratado durante cinco días con la solución vehículo (PBS) (Buffer de fosfatos 0.1 M, 7.4 pH)
- 2) Grupo intoxicación con 3-NP: tratado por cinco días con 3-NP (15 mg/kg i.p., 7.4 pH)
- 3) Grupo de pretratamiento: se les aplicó un pretratamiento de ACG (100 mg/kg i.p.) durante cinco días y posterior a éste se le administró el tratamiento de intoxicación por 3-NP durante cinco días y;
- 4) Grupo de ACG (100mg/kg i.p.) empleando el tratamiento de ACG durante cinco días.

Tres días después de la última administración del tratamiento, los animales fueron anestesiados profundamente con Ketamina (100 mg/kg i.p) para realizarles la disección del músculo gastrocnemio de ambas patas.

### *Medidas morfométricas*

Se tomaron las medidas de longitud de reposo, longitud óptima así como el peso de ambos músculo antes de que fueran desechados.

### *Registro mecánico*

El músculo izquierdo fue aislado y transferido a una cámara de registro, la cual contenía solución Krebs (128 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 21 mM NaHCO<sub>3</sub> and 30 mM glucosa; pH 7.4) con flujo constante de oxígeno. La región proximal del músculo fue sujeta a un lado de la cámara mientras que el tendón distal fue atado a un gancho de acero inoxidable conectado a un miógrafo isométrico conectado a un amplificador Grass (modelo 79 D) y a una computadora en la que se almacenaron los datos para su posterior análisis.

Las respuestas contráctiles de los músculos fueron evocadas mediante: a) pulsos únicos (0.5 Hz; 0.5 ms duración) para lo cual se utilizó un estimulador controlado por un programa de computadora. Los pulsos fueron aplicados a través de un par de electrodos de plata localizados a ambos lados de la cámara. El músculo fue estirado antes de iniciar el registro, con el objetivo de establecer la longitud óptima. Además fueron aplicados trenes de estímulos (20 Hz; 1s duración) para evocar una respuesta tetánica que se utilizó como punto de referencia, para comprobar la recuperación mecánica del músculo, luego de ser estimulado con el protocolo de fatiga.

La fatiga muscular se indujo con la aplicación de trenes de estímulos sucesivos de alta frecuencia (75 Hz; 2s duración del tren, 3s de descanso) hasta lograr que la tensión cayera al 20% de la inicial.

Por otro lado, el músculo derecho fue utilizado para la realización de histoquímica, para lo cual fue congelado inmediatamente en 2-metil-butano después de haber sido disecado y colocado en refrigeración a -70°C hasta su utilización. Se hicieron cortes transversales de 14 µm en un criostato, donde las rebanadas del músculo fueron colocadas en portaobjetos previamente gelatinizados para entonces efectuar las pruebas de nicotinamida adenina dinucleótido reductasa tetrazolio (NADH-TR), succinato deshidrogenasa (SDH), citocromo c oxidasa (COX), ATPasa miofibrilar alcalina (ATPasam; pH 9.4) y fosfatasa alcalina (PA).

### *Técnicas histoquímicas y procedimiento de tinción*

NADH-TR: Se mezclaron 10 mL de solución NADH (80 mg/50 mL buffer Tris) y 10 mL de solución NTB (200mg/100 mL buffer Tris) en un coplin de vidrio y se incubaron las rebanadas del músculo por 60 minutos a 37° C. Posteriormente se hicieron tres lavados con agua destilada y se dejaron secar al aire libre.

SDH: las rebanadas de músculo se colocaron en una superficie plana fría, donde se dejaron incubar durante 15 minutos protegiéndolas de la luz, en una solución que contuvo polivinil alcohol (7.5 g), PBS 0.2 M pH 7.5 (50 mL), agua destilada (dH<sub>2</sub>O; 50 mL), succinato de sodio (1.35 g) y azida de sodio (0.065 g), a la cual se le agregó instantes antes de ser utilizada una solución de NBT (NTB 0.08 g, dH<sub>2</sub>O 4 mL, dimetil formamida 4 mL) y una solución de PMS (Fenacin metosulfato 0.05 g, dH<sub>2</sub>O 5 mL).

COX: se colocaron los cortes del músculo en un coplin de vidrio durante 60 minutos a 37° C en una solución de incubación, la cual contuvo 20 mg de diaminobencidina (DAB), 20 mg de citocromo C, disuelto en 20 mL de PBS 0.2 M, pH 7.5. Después del tiempo de incubación fueron lavados por triplicado con dH<sub>2</sub>O.

ATPasam (pH 9.4): los cortes musculares fueron inmersos en la solución de preincubación por 15 minutos (Tris base 10mM y 18mM CaCl<sub>2</sub>, pH 10.3), después fueron lavados tres veces con dH<sub>2</sub>O e incubados 1 h a 37°C en 1.5% (p/v) de ATP en una solución de incubación (pH 9.4). Posteriormente se enjuagaron con 200 mM de CaCl<sub>2</sub> por tres minutos y transferidas por tres minutos a una solución al 2% (p/v) de CoCl<sub>2</sub>. Inmediatamente después, se colocaron en 10% (v/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante tres minutos. Finalmente los cortes fueron lavados y dejados secar al aire libre.

PA: las muestras fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente se lavó por duplicado con PBS 0.1 M, pH 7.5 por cinco minutos. Se realizó la histoquímica utilizando el kit Blue Alkaline Phosphatase Substrate kit III SK-5300 de Vector siguiendo las instrucciones del kit. En seguida se dejaron incubando durante 25 minutos protegidas de la luz; una vez

transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron con buffer Tris HCl 100 mM, pH 8.5 por cinco minutos y se enjuagan con agua del grifo para luego dejarlas secar al aire libre.

*Análisis de técnicas histoquímicas:* se tomaron fotomicrografías usando una cámara digital (Nikon DS-Ri1) acoplada a un microscopio de luz (Eclipse E600, Olympus) con un objetivo de 10x de varias regiones de los músculos en estudio para cada una de las tinciones efectuadas. Posteriormente se reconstruyó la sección transversal de cada músculo con el programa Adobe Photoshop CC 2015 y cada corte fue analizado mediante un software elaborado exprofeso, donde el número total de fibras glicolíticas y oxidativas (NADH, SDH y COX) fueron expresadas como el porcentaje total de cada músculo; para la tinción de ATP también fueron expresadas en porcentaje el número total de fibras (lentas, intermedias y rápidas). Para la PA únicamente se contabilizaron los puntos azules para cada músculo y se expresaron en número total de capilares por sección.

*Análisis estadístico:* los datos obtenidos de las medidas morfométricas, de los registros mecánicos (fatiga muscular) y de las técnicas histoquímicas fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA) o por análisis de varianza en rangos de Kruskal-Wallis dependiendo de la distribución de los mismos. Todos los datos están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar para aquellos que mostraron una distribución normal. El análisis estadístico fue realizado utilizando el software SigmaStat (Systat Software, Inc.), donde  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo; mientras que las gráficas fueron elaboradas con el software OriginPro 9.1 (Origin Lab).

## Resultados

### Medidas morfométricas

Dentro de nuestras condiciones experimentales no se observó un cambio estadísticamente significativo en el peso corporal de los grupos ( $p < 0.061$ ), sin embargo, se muestra cierta tendencia a la pérdida de peso corporal en el grupo tratado con 3-NP respecto a los otros tres conjuntos experimentales. Asimismo, se contempla una tendencia en el grupo PTx a mitigar la pérdida de peso provocada por la neurotoxina (Fig. 8).

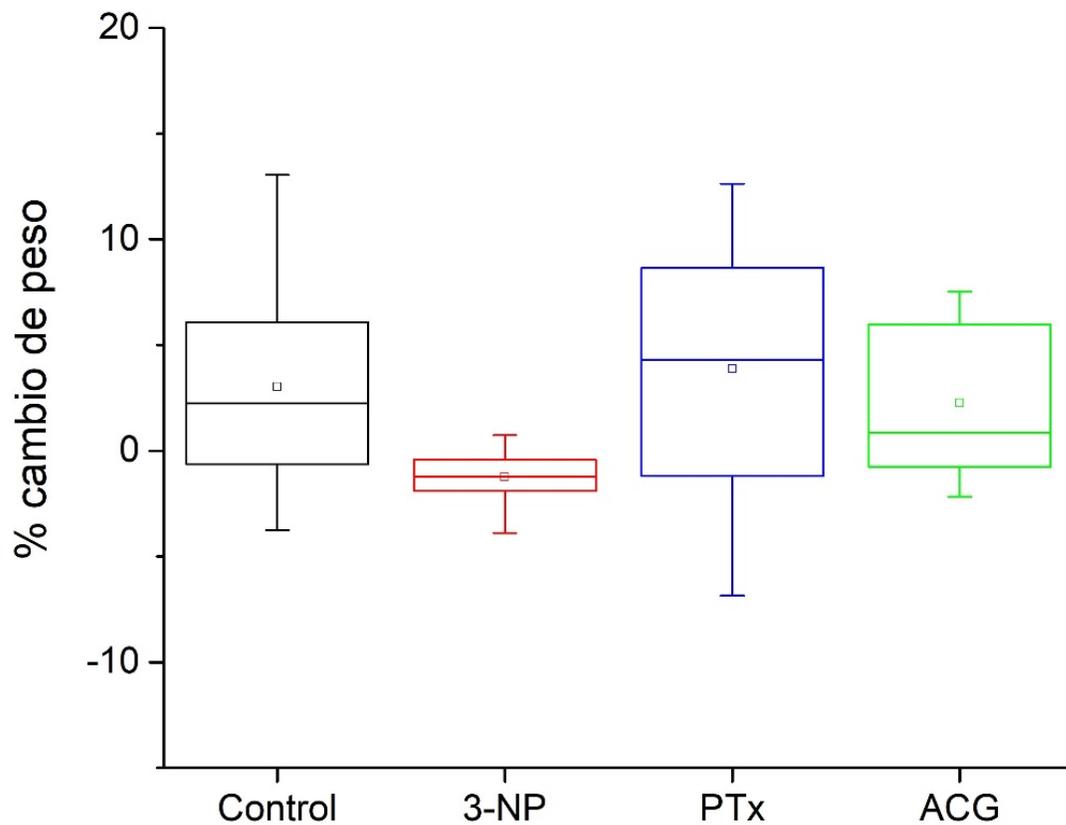


Figura 8. La administración del ACG tiende a mitigar la pérdida de peso provocada por el 3-NP. Se muestra que el grupo de PTx contrarrestó el efecto provocado por la neurotoxina al favorecer la ganancia de peso en comparación con el 3-NP. El % de cambio de peso fue calculado de la siguiente manera:  $\text{Peso final} - \text{peso inicial} / \text{peso inicial} \times 100$ . Control n= 11; 3-NP n= 10; PTx n= 8; ACG n= 10.

Grupo experimental	Peso (g) MD	Peso MI (g)	Longitud en reposo MD (mm)	Longitud en reposo MI (mm)	Longitud óptima MI (mm)
<b>Control</b>	0.110 ± 0.018	0.116 ± 0.031	12.052 ± 0.98	12.151 ± 0.96	12.661 ± 0.82
<b>3-NP</b>	0.113 ± 0.022	0.118 ± 0.022	12.360 ± 0.98	12.005 ± 0.54	12.307 ± 0.74
<b>PTx</b>	0.123 ± 0.011	0.129 ± 0.016	12.140 ± 0.76	12.184 ± 0.76	12.655 ± 0.62
<b>ACG</b>	0.118 ± 0.017	0.111 ± 0.021	11.864 ± 0.87	11.820 ± 0.49	12.216 ± 0.91

Tabla 1. Los datos muestran la media ± la desviación estándar. No se observa ningún cambio en las medidas obtenidas para todos los grupos experimentales. MD: músculo derecho, MI: músculo izquierdo. Control n= 11; 3-NP n= 8; PTx n= 8; ACG n= 7.

También, no se observó ninguna diferencia significativa en el peso de los músculos ( $p < 0.383$  derecho,  $p < 0.535$  izquierdo), la longitud en reposo ( $p < 0.765$  derecho,  $p < 0.766$  izquierdo) y la longitud óptima ( $p < 0.553$  izquierdo) (Tabla 1).

### *Valoración Histoquímica*

La histoquímica, o más precisamente, la histoenzimología de los músculos esqueléticos ha sido utilizada con éxito en la diferenciación de grupos de fibras. Está basada en la capacidad que tienen algunas enzimas del tejido de mantener funcional su centro activo tras el proceso de fijación. Estas enzimas de tipo oxidorreductasas en tejidos musculares son claves en la participación de la CTEM, tales como la NADH-TR, SDH y COX.

*NADH-TR*: mediante esta técnica, se pudo evaluar la actividad enzimática del primer complejo mitocondrial, permitiendo así la diferenciación de los tipos de fibras, esto se puede observar en la figura 9, la cual ilustra la tinción realizada a cada uno de los grupos experimentales. De acuerdo al análisis estadístico, no se encontraron cambios significativos en el porcentaje total de fibras glicolíticas ( $p < 0.347$ ), ni oxidativas ( $p < 0.347$ ) en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 10).

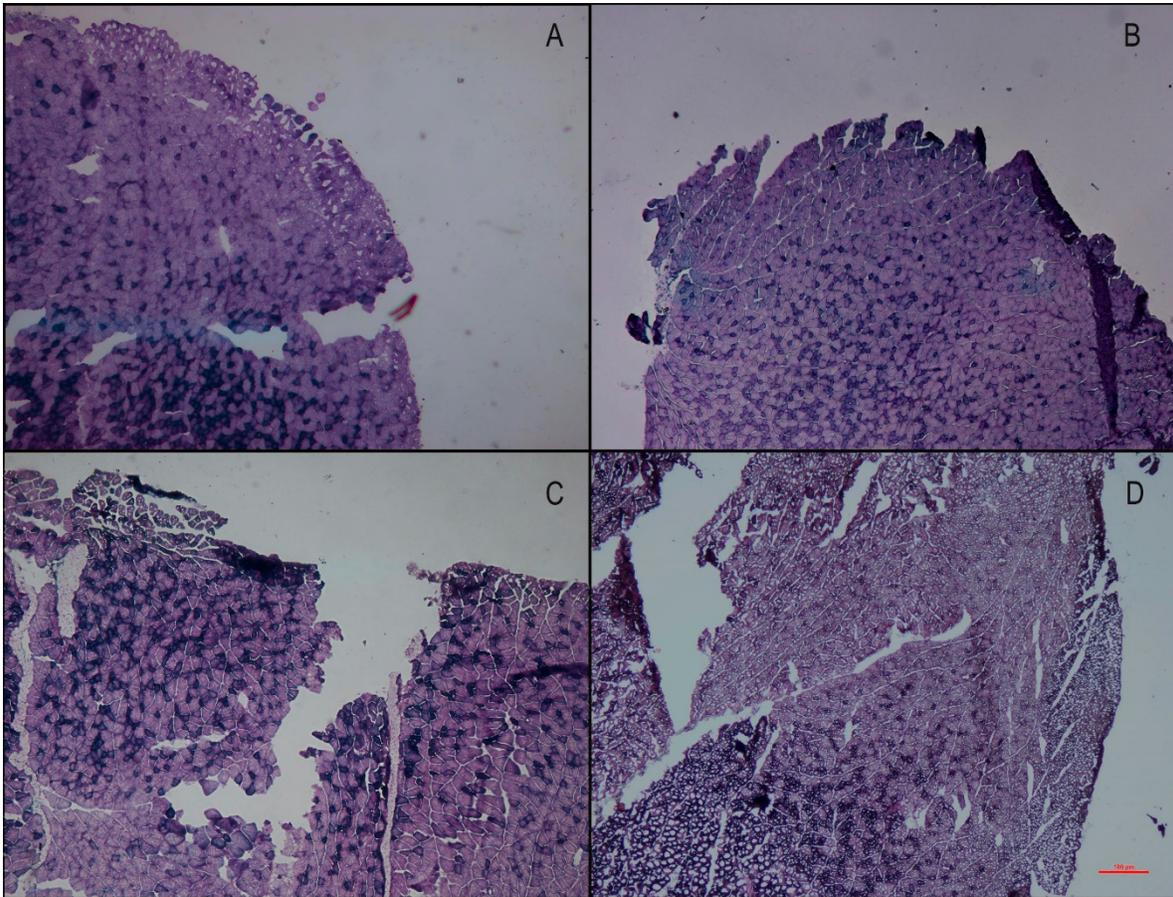


Figura 9. Fotomicrografía de cortes transversales del gastrocnemio con la técnica de *NADH-TR*. Se muestran las fibras de tipo glicolítico (claras) y de tipo oxidativo (oscuras). A) Control, B) 3-NP, C) PTx y D) ACG. Escala de la barra de medición 100  $\mu\text{m}$ .

Sin embargo se observó una tendencia en los grupos control, PTx y ACG hacia una predominancia de fibras tipo glicolíticas; además el 3-NP mostró una inclinación hacia el aumento en el porcentaje de fibras oxidativas comparado con los demás tratamientos.

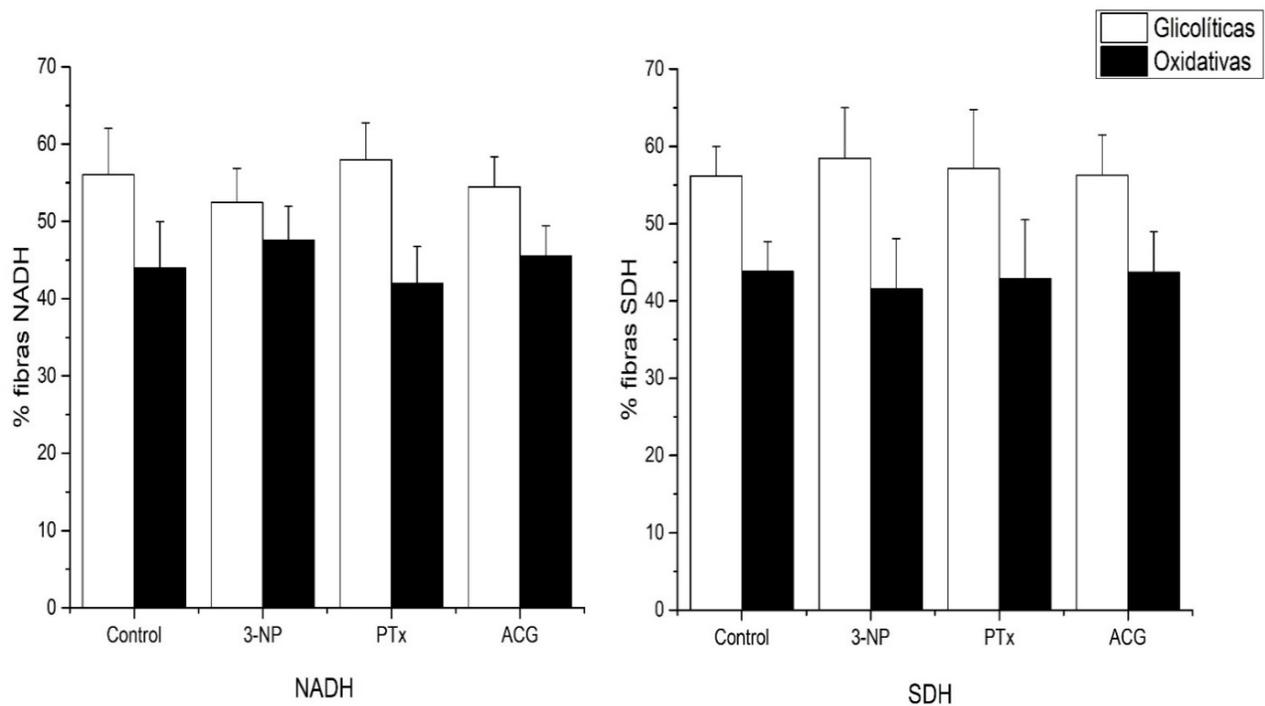


Figura 10. Porcentaje total de fibras glicolíticas y oxidativas para NADH y SDH. Los músculos del control, PTx y ACG tienen porcentajes más altos de fibras glicolíticas que el grupo 3-NP para la tinción de NADH, no así para SDH, donde todos los grupos experimentales tuvieron porcentajes similares en la predominancia de fibras glicolíticas. NADH y SDH n=5 por grupo.

*SDH*: la SDH es una enzima de la cadena respiratoria y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y es usada para identificar subtipos de fibras musculares oxidativas. Su detección por histoquímica es un indicativo del funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Como muestra la figura 10, el porcentaje de fibras glicolíticas y oxidativas de los cuatro grupos experimentales no difieren estadísticamente entre ellos ( $p < 0.922$ , para ambos tipos). También se muestra una fotomicrografía de la tinción SDH para los 4 grupos experimentales (Fig. 11).

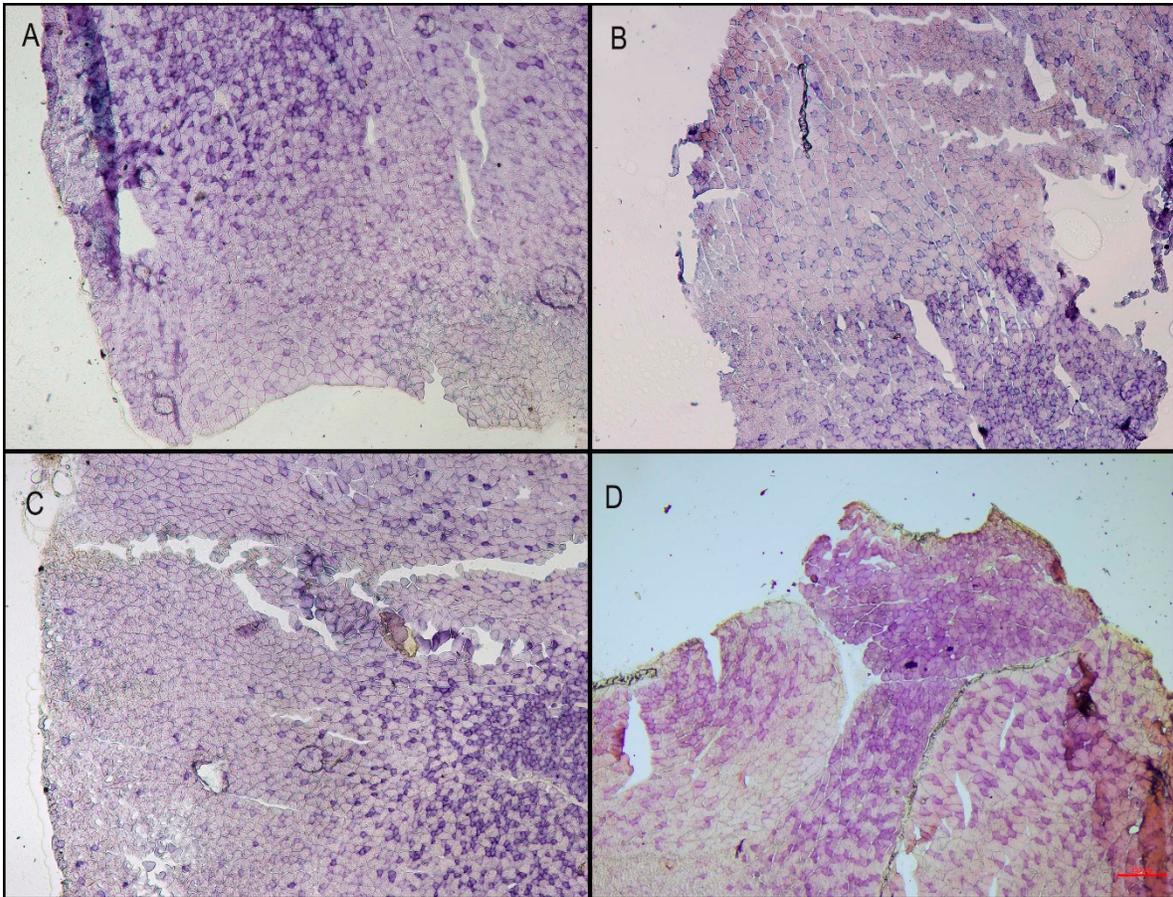


Figura 11. Tinción histoquímica SDH de cortes transversales del gastrocnemio. Fibras glicolíticas (claras) y oxidativas (obscuras) pueden apreciarse en todas las condiciones. A) Control, B) 3-NP, C) PTx y D) ACG. Escala de la barra 100  $\mu\text{m}$ .

COX: el uso de la técnica nos permite hacer una diferenciación entre el tipo de fibras con acumulación mitocondrial anormal y carencia o deficiencia en la actividad enzimática.

En el análisis de la expresión histoquímica de COX (Fig. 12), se encontraron diferencias entre el grupo control vs ACG ( $p < 0.031$ ) para ambos tipos de fibras. En la figura 13 se puede observar que el ACG provoca un decremento en el número de fibras con metabolismo glicolítico, mientras que existe un aumento en las fibras oxidativas. No se observaron cambios entre los otros grupos experimentales.

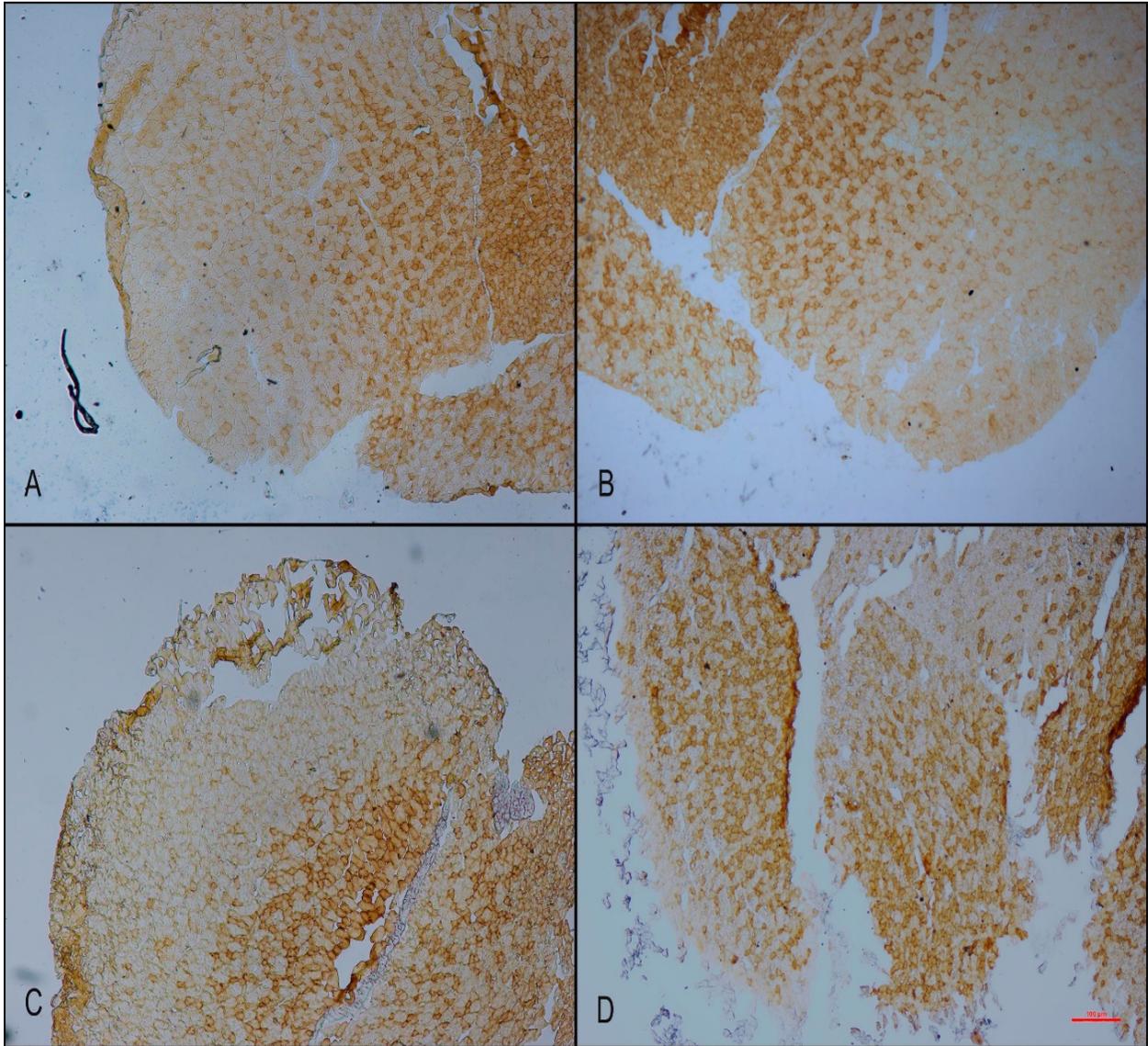


Figura 12. Técnica histoquímica COX en cortes transversales del músculo gastrocnemio. Las fibras claras o sin coloración fueron clasificadas como glicolíticas y las oscuras como oxidativas. El número de fibras oxidativas aumentaron en el tratamiento con ACG (D) en comparación con el control (A). Los grupos 3-NP (B) y PTx (C) no mostraron cambios. Escala de la barra 100  $\mu$ m.

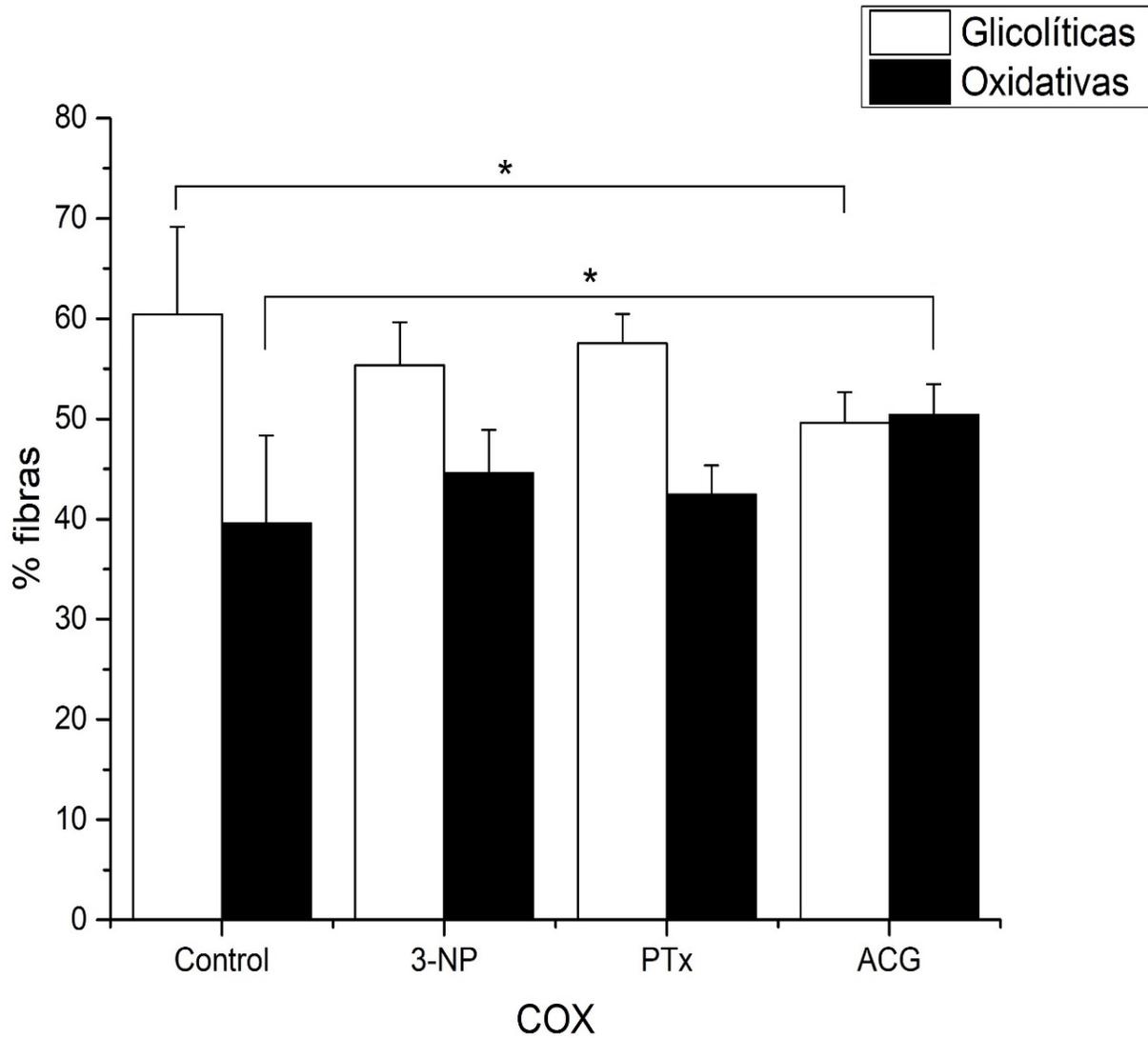


Figura 13. Porcentaje de fibras para la histoquímica COX. Existe una diferencia entre las medias del grupo control vs ACG (\*,  $p < 0.031$ ) de fibras oxidativas y glicolíticas. Se puede percibir una reducción del número de fibras de tipo glicolíticas y por ende, un aumento de las fibras oxidativas. Para el resto de los grupos no hubo una diferencia significativa, pero se observa que el grupo PTx tiende a igualar los niveles de ambos tipos de fibras respecto al grupo control. COX n= 5 por grupo. Test post-hoc: Holm-Sidak.

ATPasa: la técnica de ATPasa alcalina reveló que el músculo gastrocnemio está compuesto por diferentes proporciones de fibras de tipo lenta, intermedias y rápidas (Fig. 14).

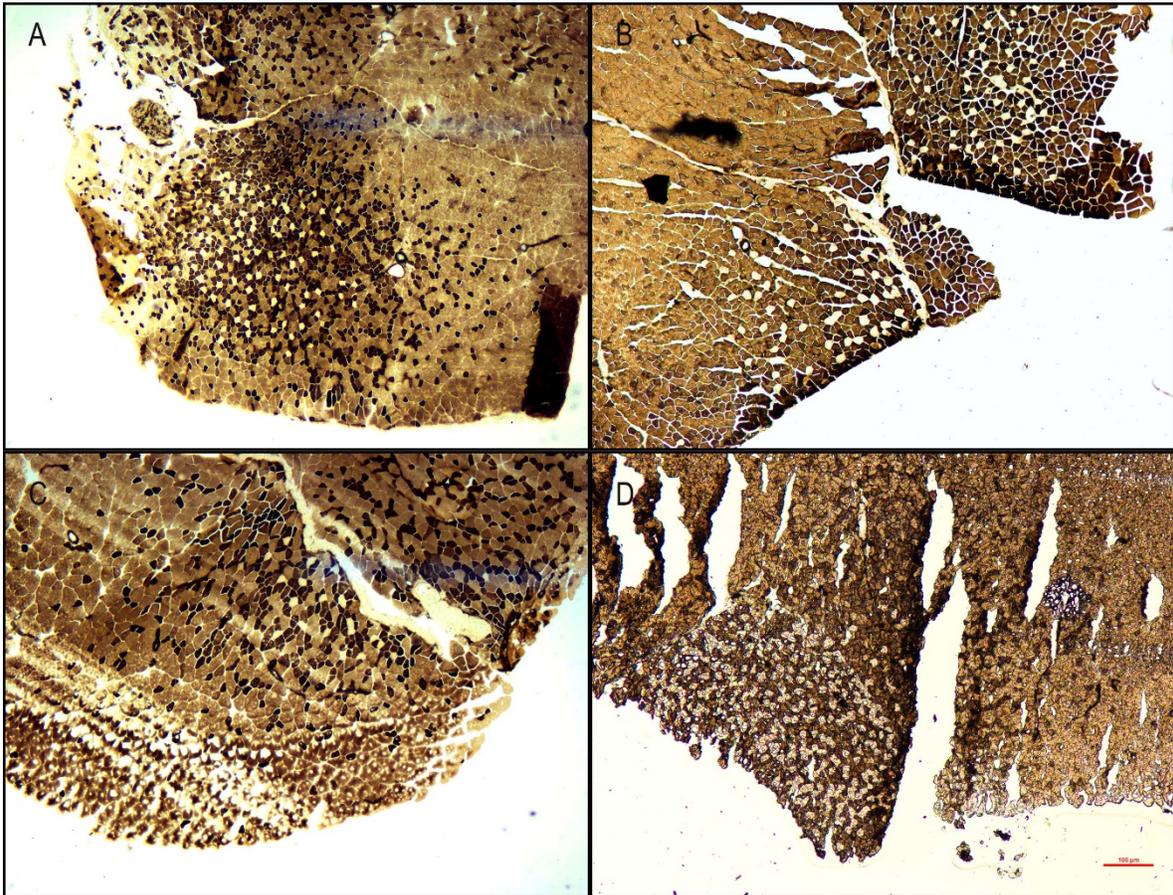


Figura 14. ATPasa miofibrilar de cortes transversales del músculo gastrocnemio. La tinción nos muestra la diferente composición de fibras presente en el gastrocnemio, identificando a las fibras de acuerdo a su intensidad como rápidas (oscurecidas), intermedias (claras) y lentas (blancas). Escala de la barra de medición 100 µm.

No se observó cambios significativos en el porcentaje de las fibras rápidas ( $p < 0.508$ ), intermedias ( $p < 0.363$ ) y lentas ( $p < 0.828$ ) en ninguno de los grupos, sin embargo, se mostró una tendencia a aumentar la cantidad de fibras tipo rápidas para el grupo PTx en comparación con los otros tres grupos y a la vez, una disminución de las fibras tipo intermedias y un ligero aumento de las lentas (Fig. 15).

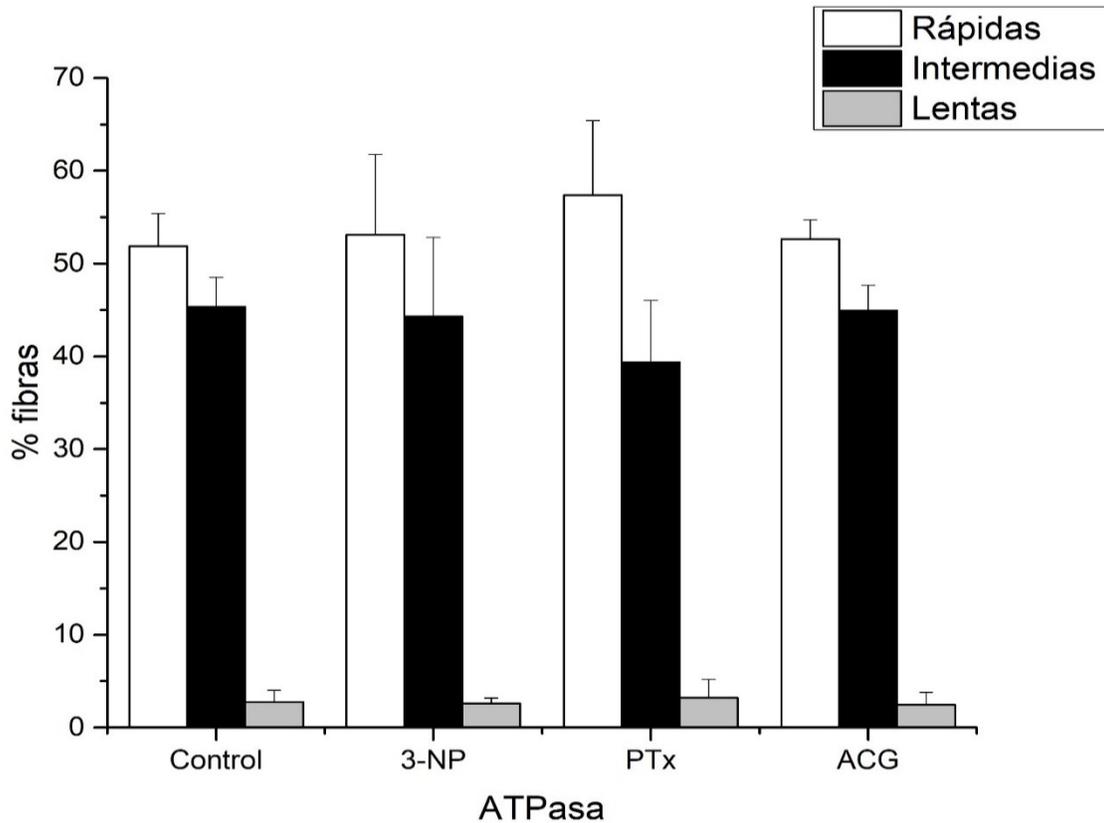


Figura 15. Porcentaje de fibras para la tinción histoquímica de ATPasa alcalina. No se encontró una diferencia significativa entre los porcentajes de los diferentes tipos de fibras; pero se presentó una tendencia al incremento en las fibras rápidas del grupo PTx, una disminución de las oxidativas y un ligero aumento en las lentas en comparación con los demás grupos. ATPasa n= 5 por grupo.

PA: para evaluar el suministro vascular en el músculo se usó la PA (Fig. 16). El número de capilares totales no difirió estadísticamente entre el grupo control y los animales tratados con 3-NP, no obstante, sí hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos 3-NP vs ACG ( $p < 0.003$ ) y PTx y ACG ( $p < 0.003$ ). El ACG mostró una clara inclinación por descender el número de capilares respecto al 3-NP y más allá de los valores que tuvo el control (Fig. 17).

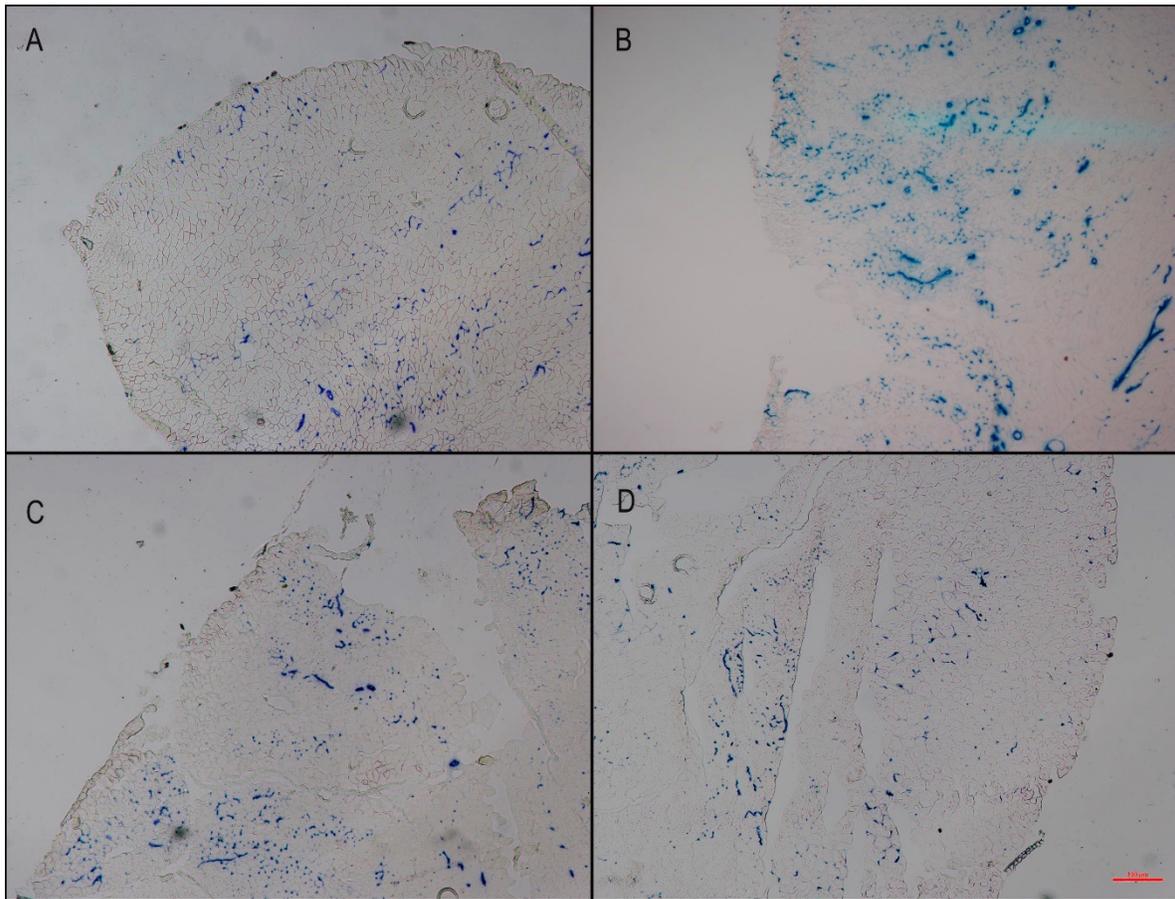


Figura 16. Fotomicrografía de la histoquímica de fosfatasa alcalina. Se observa que la técnica tiñe de color azul los capilares y venas por los cuales circula la sangre, el oxígeno y nutrientes necesarios que irrigan al tejido muscular. A: control, B: 3-NP, C: PTx, D: ACG. Escala de la barra 100  $\mu$ m.

### *Registro mecánico*

Mediante la aplicación del estímulo eléctrico único (0.5 Hz; 0.5 ms duración) se obtuvieron los datos del tiempo de duración de la contracción y el tiempo medio de relajación del músculo gastrocnemio.

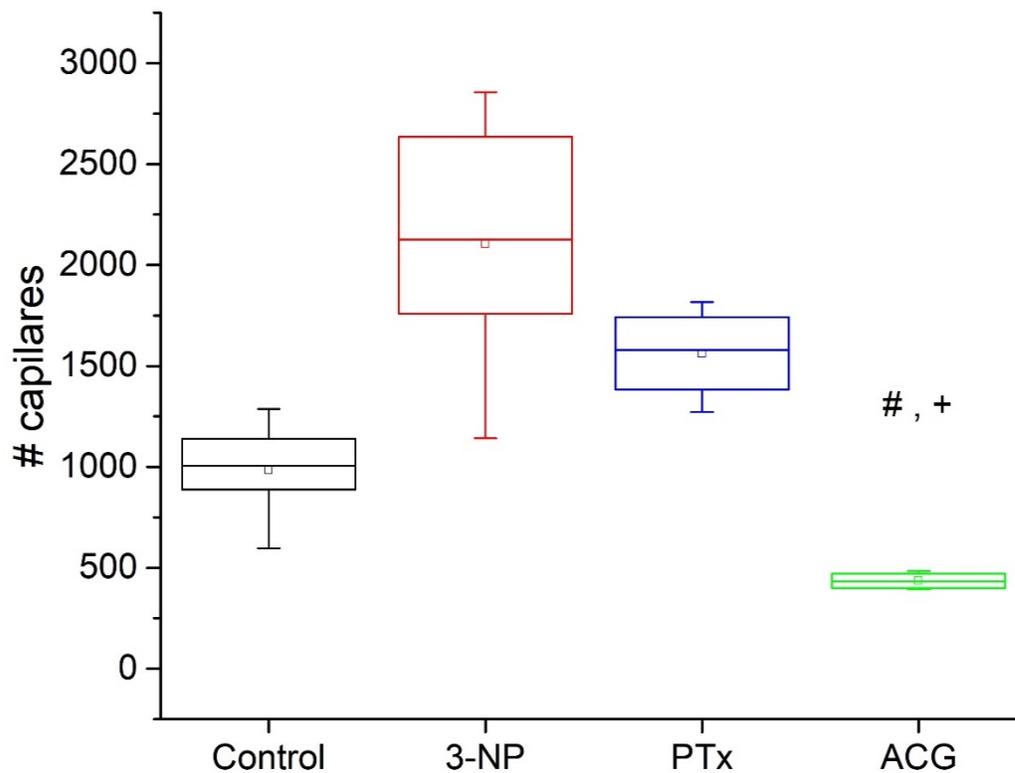


Figura 17. El ACG disminuye el número de capilares en comparación con el 3-NP y el PTx. Se contempla que el 3-NP tiende a aumentar el número de capilares en comparación con el control, mientras que el PTx mostró tendencia a disminuir ese incremento. Sin embargo, el ACG exhibió una reducción significativa del número de capilares en comparación con el 3-NP (#) y el PTx (+), e incluso más abajo que el grupo control sin mostrar diferencias significativas. Control y 3-NP n= 5; PTx y ACG n= 4. Test *post-hoc*: método de Dunn.

Para el tiempo de contracción (TC) se tomó el tiempo de inició de la contracción (TIC) y el tiempo en el que alcanzó el pico máximo (TPC), posteriormente se hizo una resta entre ambos para obtener el dato:  $TPC - TIC = TC$ .

Para el tiempo medio de relajación, a partir del pico máximo se midió la amplitud máxima obtenida y se le calculó el 50% de su valor, así se obtuvo el tiempo en el cual se llega al 50% de la relajación (TR) y al restar este valor al TC se obtuvo así el tiempo medio de relajación (TMR), quedando la fórmula de la siguiente manera:  $TR - TC = TMR$ .

### Tiempo de contracción

En esta serie de experimentos, no se observó diferencia estadística entre sí en los distintos grupos experimentales ( $p < 0.167$ ). Sin embargo, el grupo PTx tuvo un tiempo de contracción menor ( $0.061 \pm 0.027$  s) comparado con el control ( $0.089 \pm 0.038$  s), 3-NP ( $0.074 \pm 0.018$  s) y PTx ( $0.075 \pm 0.026$  s), no obstante, el 3-NP y el ACG presentan datos similares entre sí (Fig. 18).

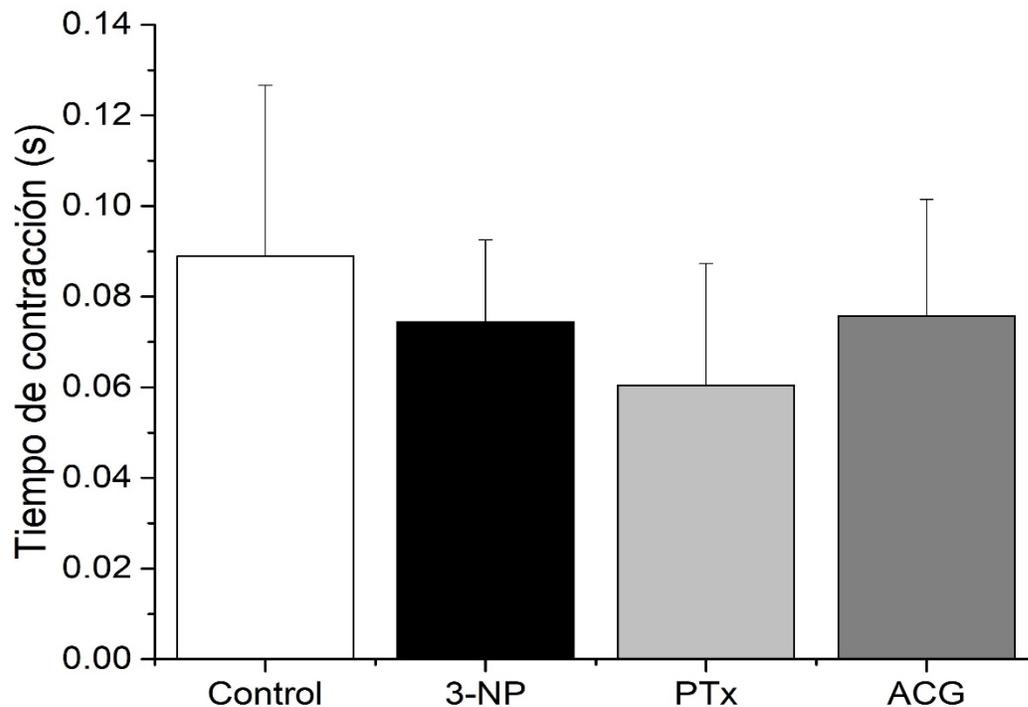


Figura 18. Tiempo de contracción de los grupos experimentales. No se observó diferencia alguna entre las medias de los grupos, sin embargo se percibe una tendencia a disminuir el tiempo de contracción del grupo PTx en comparación con los demás, mientras el 3-NP y ACG parecen ser bastante similares entre sí. Control n= 11; 3-NP n= 9; PTx n= 11; ACG n= 7.

### Tiempo medio de relajación

Los análisis estadísticos mostraron que existe únicamente diferencia significativa entre los grupos 3-NP y PTx ( $p < 0.023$ ), indicándonos que el PTx redujo el TMR entre ambos; mientras que los promedios del control (0.130) y el ACG (0.120) fueron similares entre sí. No se encontraron diferencias entre el control y el 3-NP (Fig. 19).

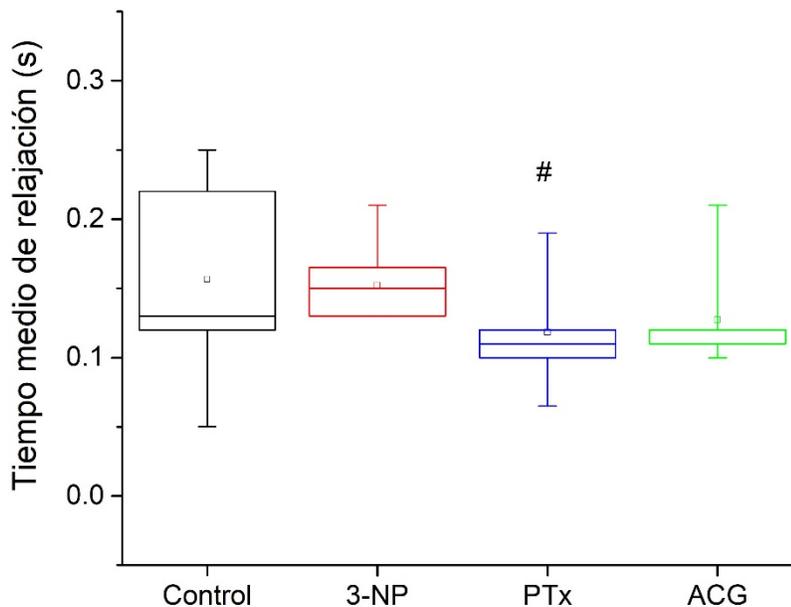


Figura 19. La aplicación del ACG anterior a la intoxicación por 3-NP provoca una disminución en el TMR. Se muestra que el PTx disminuye significativamente el TMR en comparación con el 3-NP, mientras que el control y ACG no mostraron diferencia alguna. # Significativamente diferente del 3-NP. Control n= 11; 3-NP n= 9; PTx n= 11; ACG n= 7.

### Fatiga muscular

Se analizaron los datos del tiempo para producir la fatiga en el músculo gastrocnemio izquierdo de los grupos experimentales. Las respuestas contráctiles producidas por el protocolo de estimulación intermitente mostraron una caída progresiva hasta alcanzar el 20% de la amplitud inicial, lo cual nos indicó que se había alcanzado la fatiga en el músculo.

El tiempo para la generación de la fatiga fue significativamente más corto en el grupo PTx en comparación con el control ( $44.786 \pm 11.886$  vs  $63.462 \pm 15.922$ ;  $p < 0.034$ ), asimismo, el grupo del ACG mostró cierta tendencia en disminuir el tiempo de fatiga en comparación con el control y el 3-NP ( $53.990 \pm 7.651$  vs  $63.462 \pm 15.922$ ;  $61.298 \pm 16.919$  control y 3-NP respectivamente). Por otra parte se observaron tiempos similares entre el control y el 3-NP (Fig. 20).

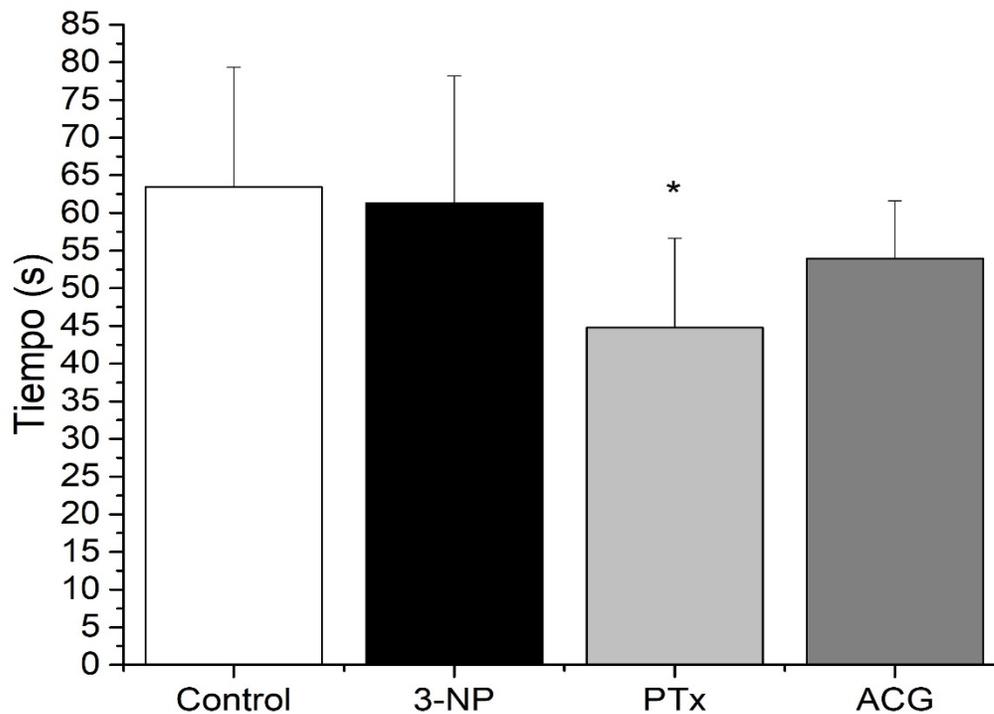


Figura 20. Tiempos de generación de fatiga. Los análisis estadísticos mostraron una diferencia significativa entre el grupo control y el PTx. A su vez, se evidencia que el ACG tiende a disminuir el tiempo para alcanzar la fatiga comparado con el control y el 3-NP. Control, 3-NP y PTx n= 8; ACG n= 7.

## Discusión

### *Efecto del 3-NP y el ACG en el peso corporal*

Es ampliamente sabido que los pacientes con Huntington presentan una pérdida gradual de peso a pesar de la ingesta normal de alimentos. El decremento de peso

en el modelo del 3-NP puede ser considerado como un indicador de la disminución del metabolismo energético (Saydoff *et al.*, 2003).

Ha sido demostrado que el 3-NP produce un cambio en el peso corporal de animales tratados con este compuesto, disminuyendo su peso a lo largo de su administración (Kumar y Kumar 2009; Kumar *et al.*, 2011), sin embargo al ser administrado el ACG como pretratamiento se observó una tendencia en la prevención de la pérdida del peso corporal. De la misma forma, el grupo solo de ACG no mostró afectar el cambio de peso en los ratones.

Varios estudios han mostrado que la aplicación de los antioxidantes puede mitigar la pérdida de peso causada por la toxicidad del 3-NP (Binawade y Japtag, 2013; Yan *et al.*, 2015; Lagoa *et al.*, 2009; Shivasharan *et al.*, 2013), así como una recuperación y preservación de la masa muscular (Jackson *et al.*, 2010; Bennett *et al.*, 2013) sugiriendo así su posible potencial terapéutico.

### *Actividad enzimática*

La NADH deshidrogenasa o complejo I es esencial para la fosforilación oxidativa, ya que acopla la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona con translocación de protones a través de la membrana interna, proporcionando electrones para la respiración y la conducción de la síntesis de ATP (Vinothkumar *et al.*, 2014). En este estudio se evaluó la actividad de la NADH a nivel muscular, debido a que nos da inferencia del metabolismo utilizado por las fibras musculares.

Como se describió anteriormente, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de fibras glicolíticas y oxidativas entre los grupos experimentales. Sin embargo, se observó una tendencia al aumento en el porcentaje de las fibras oxidativas en el grupo 3-NP, lo cual nos sugiere que hay un incremento en la actividad del complejo I, esto a consecuencia del bloqueo que el 3-NP está efectuando sobre el complejo II; por tanto, el músculo busca compensar esa pérdida

de electrones aumentando el suministro de electrones provenientes tanto de la glucólisis como de los pasos previos al bloqueo del 3-NP en el ciclo de Krebs.

Varios estudios han mostrado que existe un aumento en la actividad enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa (CPDH), isocitrato deshidrogenasa (ICDH),  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa en ratones Q175. A su vez también se ha observado un aumento en el transcripto del RNA mensajero (RNAm) de CPDH e ICDH (Nasari *et al.*, 2015; Nasari *et al.*, 2016), lo cual nos indica que hay un aumento en la actividad de estas enzimas que participan en la glucólisis.

Además, el grupo PTx mostró una tendencia a reducir el aumento observado en el complejo I mediante la disminución del porcentaje de fibras oxidativas en comparación con el 3-NP, llevándolo a niveles similares a los del grupo control. Estudios previos han mostrado que el 3-NP provoca la formación de ERO's (Liot *et al.*, 2009), tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el cual es producido usando electrones derivados de los sustratos del complejo mitocondrial I (Bacsi *et al.*, 2006; Kudin *et al.*, 2005), esto nos sugiere que el pre-tratamiento con ACG tiende a disminuir esta producción de  $O_2^-$  mediante su actividad antioxidante referida anteriormente (Sato *et al.*, 2011).

Para el complejo de la SDH, previamente se mostró que el 3-NP causa un aumento en el porcentaje de fibras que utilizan metabolismo oxidativo, lo cual indica que hay un incremento en la actividad de este complejo, esto a consecuencia del probable aumento endógeno de la SDH como parte para contrarrestar la inhibición del complejo por el 3-NP (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio, se observó una tendencia a disminuir las fibras oxidativas en el grupo 3-NP; si bien, se ha demostrado que el 3-NP ocasiona un bloqueo y una reducción de la actividad de la enzima (Hernández-López *et al.*, 2013; Bacsi *et al.*, 2006; Saydoff *et al.*, 2003), no existe un bloqueo total del complejo, debido a que se sabe que las proteínas que conforman el complejo mitocondrial II se recambian cada 12 horas, por lo cual posee el tiempo suficiente para la síntesis de nuevas proteínas (Schulz *et al.* 1995).

Por otra parte, se observó una tendencia al aumento en la actividad metabólica de tipo glicolítico en el grupo 3-NP. Debido a la obstrucción del paso de electrones por el 3-NP, la fuente de energía empleada por las fibras fue modificada, lo cual benefició a la glucólisis; de esta forma, se explica por qué el aumento en las fibras glicolíticas. Esto es congruente con investigaciones realizadas, donde se observó un incremento en la cantidad de RNAm de la enzima GAPDH después de la administración de 3-NP (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011) y de forma similar un aumento en el transcripto de CPDH en pacientes con EH (Nasari *et al.*, 2016). Asimismo, es bien sabido que en el músculo la proporción de los tipos de fibras no son estáticas, sin embargo, el cambio de tipo de fibra es frecuente y puede ser visto como una respuesta fisiológica natural a las condiciones ambientales impuestas (Gransee *et al.*, 2012; Ohlendieck, 2011).

No obstante, el grupo de PTx mostró una leve tendencia a aumentar el porcentaje de fibras oxidativas disminuido a causa del 3-NP. Como se ha comentado, este ligero aumento puede ser debido a la actividad antioxidante presente en este compuesto, sugiriendo su alta actividad para eliminar ERO's. La literatura muestra que algunos compuestos polifenólicos provocan incremento de fibras con metabolismo oxidativo, así como el aumento de proteínas con actividad antioxidante, todo lo anterior ha sido evaluado en diversos grupos musculares (Jackson *et al.*, 2010; Ljubicic *et al.* 2014; Bennett *et al.*, 2013; Lagouge *et al.*, 2006), lo cual concuerda con los datos obtenidos en este estudio.

El complejo COX es un componente multienzimático que representa el final de la CTEM, por consiguiente evaluamos su actividad; donde encontramos diferencias significativas en el grupo ACG en comparación con el control incrementando las fibras oxidativas y por ende, disminuyendo las glicolíticas. Esto es indicativo que el ACG incrementa la actividad de la cadena respiratoria (Casas *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2016), lo que se traduce en una mayor cantidad de mitocondrias, mayor eficiencia energética y mayor capacidad de resistencia (Ferraro *et al.*, 2014), inclusive un aumento en la producción de ATP (Srinivasan y Avadhani, 2012). Sin

embargo, en la respuesta contráctil, no se observó una mayor capacidad de resistencia a la fatiga como se esperaba.

Por otra parte, se ha observado que la deficiencia en la COX acelera la apoptosis mitocondrial y que puede provocar fibras rojas irregulares conduciendo a miopatía (Schüll *et al.*, 2015; Rak *et al.*, 2016), lo cual podría sugerir que el ACG presenta una actividad anti-apoptótica y coadyuva a la generación de fibras íntegras.

Respecto a las características estructurales de los músculos, se sabe que están constituidos de diversos tipos de fibras. En particular, el músculo gastrocnemio ha sido descrito como un músculo de composición mixta (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011); lo cual fue constatado nuevamente mediante la técnica de ATPasa miofibrilar.

De igual manera, pudimos clasificar a las fibras a través de la actividad de la ATPasa, ya que determina la velocidad de deslizamiento entre la actina y la miosina, por lo tanto, la velocidad de acortamiento de la fibra (Ferraro *et al.*, 2014). Se encontró una tendencia a aumentar el número de fibras de contracción rápida en el PTx, y una disminución de las intermedias, a consecuencia de la actividad que ejerció el ACG, posiblemente aumentando el ingreso de glucosa para su utilización como fuente principal de energía, así evitando utilizar la oxidación que fue bloqueada por el compuesto tóxico y no sufrir un desequilibrio tan fuerte.

En cuanto a las fibras intermedias que disminuyeron, quizá se deba a que las fibras de tipo intermedio pueden realizar un transición entre el metabolismo glicolítico y el oxidativo, pensando en esto, se cree que cierto número de fibras cambiaron su metabolismo oxidativo hacia un metabolismo glicolítico (Ferraro *et al.*, 2014).

La evaluación del suministro vascular se realizó mediante la fosfatasa alcalina (PA), y nos muestra cómo se encuentra el abasto sanguíneo, que a su vez es indicativo del suministro de nutrientes y oxígeno. La cantidad de capilares teñidos tendió a aumentar en el grupo del 3-NP en comparación con los demás grupos experimentales, posiblemente debido a un incremento en la liberación de factores

de crecimiento angiogénicos, provocando una angiogénesis mediada por la hipoxia generada por el 3-NP (Hernández-Echeagaray *et al.*, 2011).

En cambio, el PTx mostró reducir este aumento intentando normalizar el número de capilares sin llegar a ser significativo. No obstante, el grupo ACG logró mitigar los efectos provocados por el 3-NP, reduciendo drásticamente el número de capilares en comparación con el 3-NP y el PTx. Como lo indican varios estudios, la suplementación con antioxidantes pueden mejorar o prevenir la hipoxia, entre ellos destaca el ACG, donde se ha observado su capacidad para disminuir la hipoxia en distintos cultivos celulares, principalmente mediante dos mecanismos: 1) disminuye a nivel proteico y reprime la actividad transcripcional del factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$  (FIH-1 $\alpha$ ) bajo condiciones de hipoxia, conduciendo a un decremento en la expresión de su blanco río abajo, el factor de crecimiento vascular endotelial (Kim *et al.*, 2010; Qun-Yi *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2017) y; 2) la asociación del incremento de la estabilidad de la óxido nítrico sintasa endotelial y la producción de óxido nítrico (Jiang *et al.*, 2015; Onakpoya *et al.*, 2015). Lo anterior, sugiere una forma mediante la cual el ACG logró disminuir la cantidad de capilares en el músculo de los ratones.

#### *Evaluación del registro mecánico*

Tanto el TC y el TMR de las respuestas evocadas en los grupos 3-NP y ACG tendieron a una reducción en comparación con el control, el PTx mostró un decremento significativo en el TMR comparado con el control.

La fatiga reveló una tendencia a disminuir los tiempos en los grupos 3-NP y ACG comparados con el control, sin embargo se observó un decremento estadísticamente significativo del PTx con el control. Esto se cree está ligado al ligero aumento en las fibras de contracción rápida en la tinción de ATPasam, lo cual disminuiría la resistencia a la fatiga. Dado que el ACG ha mostrado incrementar la eliminación de ERO's, supusimos que los ratones tratados con este compuesto mostrarían una mejora en el TC, TMR y la resistencia a la fatiga, a través de la estimulación del cambio metabólico en las fibras musculares, exhibiendo

características más oxidativas, por ende, una contracción más lenta y más resistentes al agotamiento.

Se ha observado una reducción en la resistencia a la fatiga en distintos grupos musculares a consecuencia de la administración de compuestos antioxidantes. Se cree es debido a un aumento en la cantidad de fibras de tipo IIa y IIb (Bennett *et al.*, 2013) o a través del potencial antioxidante del compuesto, mediante el retraso del estrés oxidativo y el daño celular evitando la atrofia o la pérdida de las fibras de tipo II (Jackson *et al.*, 2010). Una posible explicación a este fenómeno causado por el ACG es que se ha visto que estimula al transportador de glucosa GLUT-4, aumentando el acarreo de glucosa mediante la activación de Akt que provoca la translocación de GLUT-4 hacia la membrana plasmática (Prabhakar y Doble, 2009; Ong *et al.*, 2012), así favoreciendo la entrada de glucosa a las células musculares.

Por el contrario, se ha observado que los antioxidantes tienden a aumentar la resistencia a la fatiga (Ljubicic *et al.*, 2014; Mizunoya *et al.*, 2015), aunque el mecanismo por el cual el ACG en conjunto con 3-NP provoca esa disminución en la fatiga no está esclarecido aún, será necesario realizar investigaciones posteriores acerca de sus efectos en la fatiga muscular.

Si recordamos, las fibras glicolíticas utilizan como fuente de energía la glucosa, presentan una contracción rápida y son fatigables, características que han mostrado las fibras en los registros mecánicos al llevar un pretratamiento. Aunque no mostró significancia estadística, el grupo ACG tiende a mostrar características similares al PTx.

Si bien, no sé sabe el verdadero efecto de los antioxidantes sobre el organismo, se tiene conocimiento acerca de cómo estos pueden afectar la función cerebral, entre los que incluye efectos sobre el sistema periférico, que a su vez influyen en el funcionamiento del SNC. Recordemos que la regulación de la función e integridad del cerebro no debe considerarse aisladamente, sino que depende en gran medida de la información de retroalimentación de la periferia del cuerpo.

## **Conclusiones**

El ACG tiende a mitigar la pérdida de peso provocada por el 3-NP.

La aplicación de ACG provoca un cambio en la actividad enzimática de la citocromo c oxidasa (COX) del músculo gastrocnemio.

El ACG administrado como pretratamiento e individualmente disminuye el aumento de capilares generado por el 3-NP.

Se observó una menor resistencia a la fatiga y un menor TMR con la aplicación del ACG en el grupo PTx y una tendencia a disminuir en el grupo ACG, sugiriendo que la respuesta contráctil muscular puede ser alterada por la administración del ACG.

## Literatura citada

- Alarcón-Herrera N. Flores-Maya S. Bellido B. García-Bores A.M. Mendoza E. Ávila-Acevedo G. y Hernández-Echeagaray E. 2017. Protective effects of chlorogenic acid in 3-Nitropropionic acid induced toxicity and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*: doi: 10.1016/j.fct.2017.04.048.
- Arenas J. Campos Y. Ribacoba R. Martín M.A. Rubio J.C. Ablanado P. y Caballero A. 1998. Complex I defect muscle from patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 43:397-400.
- Arrasate M. y Finkbeiner S. 2012. Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol*. 238(1): 1-11.
- Arredondo F.A. Venet G.C. Román O.G. y Ramírez E.Y.D. 2012. Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. *MEDISAN* 16(5): 790-805.
- Ávila-Luna A. y Bueno-Nava A. Los ganglios basales: la participación dopaminérgica striatal. *Investigación en Discapacidad*. 3(1): 19-24.
- Bacsi A. Woodberry M. Widger W. Papaconstantinou J. Mitra S. Peterson W.J. y Boldogh I. 2006. Localization of superoxide anion production to mitochondrial electron transport chain in 3-NPA-treated cells. *Mitochondrion* 6: 235-244.
- Bassel-Duby R. y Olson N.E. 2006. Signaling pathway in skeletal muscle remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 19-37.
- Bates G. Harper P.S. y Jones L. 2002. Huntington's disease (3<sup>o</sup> edición), GB. Oxford University Press.
- Baylor M.S. y Hollingworth S. 2012. Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 139(4): 261-272.
- Beal F. 2000. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 23: 298-304.
- Bennett T.B. Mohamed S.J. y Alway E.S. 2013. Effects of resveratrol on the recovery of muscle mass following disuses in the plantaris muscle of aged rats. *PLoS ONE* 8(12): e83518.

- Binawade Y. y Jagtap A. 2013. Neuroprotective effect of lutein against 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like symptoms: possible behavioral, biochemical and cellular alterations. *J Med Food* 16(10): 934-943.
- Brouillet E. Guyot M.C. Mittoux V. Altairac S. Conde F. Palfi S. y Hantraye P. 1998. Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70: 194-805.
- Busse E.M. Hughes G. Wiles M.C. y Rosser E.A. 2008. Use of hand-held dynamometry in the evaluation of lower limb muscle strength in people with Huntington's disease. *J Nurol* 255: 1534-1540.
- Candau R. Lorga B. Travers F. Barman T. y Lionne C. 2003. At physiological temperatures the ATPase rates of shortening soleus and psoas myofibrils are similar. *Biophys J.* 85: 3132-3141.
- Casas F. Pessemesse L. Grandemange S. Seyer P. Gueguen N. Baris O. Lepourry L. Cabello G. y Wrutniak-Cabello C. 2008. Overexpression of the mitochondrial T3 receptor p43 induces shift in skeletal muscle fiber types. *PLoS ONE* 3(6): e2501. doi:10.1371/journal.pone.0002501.
- Ciammola A. Sassone J. Sciacco M. Mencacci N.E. Ripolone M. Bizzi C. Colciago C. Moggio C. M. Parati G. Silani V. y Malfatto G. 2011. Low anaerobic threshold and increased skeletal muscle lactate production in subjects with Huntington's disease. *Movement Disord* 26: 130-137.
- Coles J.C. Edmondson E.D. y Singer P.T. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 254(12): 5161-5167.
- Courtes A.A. Arantes P.L. Barcelos P.R. Kich da Silva I. Boligon A.A. Athayde L.M. Puntel L.R. y Antunes S.F.A. 2015. Protective effects of aqueous extract of *Luehea divaricate* against behavioral and oxidative changes induced by 3-nitropropionic acid in rats. *Evid-Based Compl Alt* Volume 2015 Article ID 723431.
- Deshpande B.S. Hida H. Takei-lo N. Masuda T. Baba H. y Nishino H. 2006. Involvement of nitric oxide in 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity in rats. *Brain Res* 1108:205-215.

- Dey A. y Nath .D.J. 2015. Neuroprotective therapeutics from botanicals and phytochemicals against Huntington's disease and related neurodegenerative disorders. *J Herb Med* 5: 1-19.
- Farah A. Monteiro M. Donangelo M.C. y Lafay S. 2008. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *The Journal of Nutrition* doi:10.3945/jn.108.095554.
- Ferraro E. Giammarioli, A.M. Chiandotto, S. Spoletini, I. y Rosano, G. 2014. Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: Redox signaling and role of autophagy. *Antioxidants and Redox Signaling* 21: 154-175.
- Gransee M.H. Mantilla B.C. y Sieck C.G. 2012. Respiratory muscle plasticity. *Compr Physiol* 2: 1441-1462.
- Grupo de investigación colaborativa de la enfermedad de Huntington, 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 971–983.
- Halliwell B. y Gutteridge C.J.M. 2015. Free radicals in Biology and Medicine (5ª edición), GB. Oxford University Press.
- Harper S.P. 1992. Huntington's Disease., E.U.A. W.B. Saunders
- Harris G.J. Pearlson G.D. Peyser C.E. Aylward E.H. Roberts J. Barta P.E. Chase G.A. Folstein S.E. 1992. Putamen volumen reduction on magnetic-resonance-imaging exceeds caudate changes in mild Huntington's disease. *Ann. Neurol.* 31(1): 69-75.
- Heitman E. y Ingram K.D. 2014. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutr Neurosci* 0: 1-8.
- Hering T. Braubach P. Landwehrmeyer B.G. Lindenberg S.K. y Melzer W. 2016. Fast-to-slow transition of skeletal muscle contractile function and corresponding changes in myosin heavy and light chain formation in the R6/2 mouse model of Huntington's Disease. *PLoS ONE* 11(11): e0166106.
- Hernández-López. R 2013. Descripción del funcionamiento mitocondrial del músculo gastrocnemio en un modelo animal de neurodegeneración. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

- Hernández-Echeagaray E. González N. Ruelas A. Mendoza E. Rodríguez-Martínez E. y Antuna-Bizarro R. 2011. Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. *Neurol Sci* 32: 241-254.
- Higdon V.J. y Frei B. 2006. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci* 46(2): 101-123.
- Huan-Guang L. Yu M. Da-Wei M. An-Chao Y. y Jian-Guo Z. 2013. A rat model of hemidistonia induced by 3-nitropropionic acid. *PLoS ONE* 8(10): e79199.
- Hughes W.B. Kusner L.L. y Kaminski J.H. 2006. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 33: 445-461.
- Jackson R.J. Ryan J.M. Hao Y. y Always E.S. 2010. Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscle of young and old rats. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol* 229: R1572-R1581.
- Jia B. Hee J.K. Seong Y.K. y Yun-Sik C. 2015. Neuroprotective effect of caffeic acid phenethyl ester in 3-nitropropionic acid-induced striatal damage. *Korean J Physiol Pharmacol* 20(3): 279-286.
- Jian R. Hodgson M.J. Mas E. Croft D.K. y Ward C.N. 2015. Chlorogenic acid improves *ex vivo* vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *J Nutr Biochem* 27: 53-60.
- Jin J.P. Su J.H. Ji-Hyeon P. y Hyo-Jong L. 2015. Chlorogenic acid inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of the HIF-1 $\alpha$ /AKT pathway. *Cell Oncol* 38: 111-118.
- Kandel R.E. Schwartz H.J. Jessell M.T. Siegelbaum A.S. y Hudspeth J.A. 2013. *Principle of Neural Science* (5<sup>a</sup> edición), E.U.A. Mc Graw-Hill Medical.
- Karp G. 2008. *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos* (5<sup>a</sup> edición), México. McGraw Hill.
- Killoran A. y Biglan K.M. 2014. Current therapeutic options for Huntington's disease: good clinical practice versus evidence-based approaches? *Movement Disord* 29: 1404-1413.

- Kim C. Yu G.H. y Sohn J. 2010. The anti-angiogenic effect of chlorogenic acid on choroidal neovascularization. *Korean J Ophtalmol* 24(3): 163-168.
- Kosinski M.C. Schlangen C. Gellerich F.N. Gizatullina Z. Deschauer M. Schiefer J. Young A.B. Landwehrmeyer G.B. Toyka K.V. Sellhaus B. Lindenberg K.S. 2007. Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a marathon runner. *Movement Disord* 22(11): 1637-1640.
- Kudin P.A. Debska-Vielhaber G. y Kunz S.W. 2005. Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother* 59: 163-168.
- Kumar P. y Kumar A. 2009. Possible role of sertraline against 3-nitropropionic acid induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunction in rat brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (33): 100-108.
- Kumar P. Kalonia H. y Kumar A. 2011. Role of LOX/COX pathways in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's Disease-like symptoms in rats: protective effect of licofelone. *Brit J Pharmacol* 164: 644-654.
- Lagoa R. Lopez-Sanchez C. Samhan-Arias A.K. Gañan C.M. Garcia-Martinez V. y Gutierrez-Merino C. 2009. Kaempferol protects against rat striatal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 111(2): 473-487.
- Lagouge M. Argmann C. Gerhart-Hines Z. Meziane H. Lerin C. Daussin F. Messadeq N. Milne J. Lambert P. Elliott P. Geny B. Laakso M. Puigserver P. y Auwerx J. 2006. Resveratorl improve mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127: 1109-1122.
- Lanciego L.J. Luquin N. y Obeso A.J. 2012. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a009621.
- Laumonier T. y Mentrey J. 2016. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics* 3:15.
- Lin S. Hu J. Zhou X. y Cheug C.K.P. 2017. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by chlorogenic acid *via* targeting the

vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated signaling pathway. *J Funct Foods* 32: 285-295.

- Liot G. Bossy B. Lubitz S. Kushnareva Y. Sejbuk N. y Bossy Wetzel E. 2009. Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA-and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* 16: 899-909.
- Ljubicic V. Burt M. Lunde J.A. y Jasmin B.J. 2014. Resveratrol induces expression of the slow, oxidative phenotype in *mdx* mouse muscle together with enhanced activity of the SIRT1-PGC-1 $\alpha$  axis. *Am J Physiol Cell Physiol* 307: C66-C82.
- Lodi R. Schapira A.H.V. Manners D. Styles P. Wood N.W. Taylor D.J. y Warner T.T. 2000. Abnormal *in vivo* skeletal muscle energy metabolism in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. *Ann Neurol* 48: 72-76.
- López-García K. Mariscal-Tovar S. Serrano-Meneses M.A. Castelán F. Martínez-Gómez M. y Jiménez-Estrada I. 2016. Fiber type composition of pubococcygeus and bulbospongiosus striated muscles is modified by multiparity in the rabbit. *Neurorol Urodynam* 9999: 1-8.
- Lorenzo F.P. Moreno G.A. Lizasoain H.I. Leza C.J.C. Moro S.M.A. y Portolés P.A. 2008. Farmacología básica y clínica. 18<sup>o</sup> edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Lun C.K. Sun N.L. Mal M. Goh W.C. Cheong A.C. Browne R.E. y Chan Y.C.E. 2011. Metabolic profiling of 3-nitropropionic acid early-stage Huntington's disease rat model using gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 10: 2079-2087.
- Menze T.E. Tadros G.M. Abdel-Tawab M.A. y Khalifa E.A. 2012. Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology* 33: 1265-1275.
- Mikami Y. y Yamazawa T. 2015. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci* 139: 69-74.

- Mizunoya W. Miyahara H. Okamoto S. Akahoshi M. Suzuki T. Mai-Khoi Q.D. Ohtsubo H. Komiya Y. Lan M. Waga T. Iwata A. Nakazato K. Ikeuchi Y. Anderson E.J. y Tatsumi R. 2015. Improvement of endurance based on muscle fiber-type composition by treatment with dietary apple polyphenols in rats. *PLoS ONE* 10(7): e0134303.
- Naseri N.N. Xu H. Bonica J. Vonsattel G.J.P. Cortes P.E. Park C.L. Arjomand J. y Gibson E.G. 2015. Abnormalities in the tricarboxylic acid cycle in Huntington disease and in Huntington disease mouse model. *J Neuropathol Exp Neurol* 74(6): 527-537.
- Naseri N.N. Bonica J. Xu H. Park C.L. Arjomand J. Chen Z. y Gibson E.G. 2016. Novel metabolic abnormalities in the tricarboxylic acid cycle in peripheral cells from Huntington's disease patients. *PLoS ONE* 11(9): e0160384.
- Ohlendieck K. 2011. Proteomic profiling of skeletal muscle plasticity. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal* 1(4): 119-126.
- Olthof M.R. Hollman P.C. y Katan M.B. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr* 131: 66-71.
- Oknapoya I.J. Spencer E.A. Thompson M.J. y Heneghan C.J. 2015. The effect of chlorogenic acid on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Hum Hypertens* 29: 77-81.
- Ong W.K. Hsu A. y Tan H.B.K. 2012. Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effect of coffee on Diabetes. *PLoS ONE* 7(3): e32718.
- OpenStax College. 2013. Biology, E.U.A. Rice University.
- Pérez-De la Cruz V. 2008. Caracterización de los patrones de déficit energético y estrés oxidativo/nitrosativo inducidos por el peroxinitrito en modelos experimentales de la enfermedad de Huntington. Tesis de Doctorado. UAM Iztapalapa, México, D.F.
- Pérez-De la Cruz V. Carrillo-Mora P. y Santamaría A. 2010. Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental models. *J Bioenerg Biomembr* 42: 207-215.

- Phillips W. Shannon K.M. y Barker R.A. 2008. The current clinical management of Huntington's disease. *Mov Disord* 23: 1491-1504.
- Prabhakar K.P. y Doble M. 2009. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine* 16: 1119-1126.
- Puneet K. Padi S.S.V. Naudi P.S. y Kumar A. 2007. 3-Nitropropionic acid induced neurotoxicity: an animal model of Huntington's disease. *J Cell Tissue Res.* 7:853-860.
- Purves D. Augustine J.G. Fitzpatrick D. Hall C.W. LaMantia S.A. McNamara O.J. y Williams M.S. 2004. *Neuroscience* (3° edición), E.U.A. Sinauer Associates Inc.
- Qun-Yi L. Ying-Feng Z. Meng Z, Li C. Zhen Z. Yong-Li D. Guo-Qiang R. Jian-Min T. Ming-Kang Z. y Xiao-Jin S. 2015. Chlorogenic acid inhibits hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cells proliferation *via* c-Src and Shc/Grb2/ERK2 signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* 751: 81-88.
- Rak M. Bénit P. Chrétien D. Bouchereau J. Schiff M. El-Khoury R. Tzagoloff A. y Rustin P. 2016. Mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency. *Clin Sci* 130: 393–407.
- Reddy P.H. 2014. Increased mitochondrial fission and neuronal dysfunction in Huntington's disease: implications for molecular and neuronal inhibitors of excessive mitochondrial fission. *Drug Discov.* 19:951-955.
- Ribchester R.R. Thomson D. Nigel I.W. Hinks T. Gillingwater H.T. Wishart M.T. Court A.F. y Morton J.A. 2004. Progressive abnormalities in skeletal muscle and neuromuscular junctions of transgenic mice expressing the Huntington's disease mutation. *Eur. J. Neurosci.* 20: 3092-3114.
- Roth J.R. Le M.A Zhang L. Kahn M. Samuel T.V. Shulman I.G. y Bennett M.A. 2009. MAPK phosphatase-1 facilitates the loss of oxidative myofibers associated with obesity in mice. *J. Clin. Invest.* 119:3817–3829.
- Ruiz-Rosado A. Cabrera-Fuentes A.H. González-Calixto C. González-López L. Cázares-Raga E.F. Segura-Alegría B. Lochnit G. Hernández-Hernández

- F. Preissner T.K. y Jiménez-Estrada I. 2013. Influence of chronic food deprivation on structure–function relationship of juvenile rat fast muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 34: 357-368.
- Sandhir R. y Mehrotra A. 2012. Quercetin supplementation is effective in improving mitochondrial dysfunctions induced by 3-nitropropionic acid: implications in Huntington's disease. *BBA-Mol Basis Dis.* 1832: 421-430.
  - Sandhir R. Yadav A. Mehrotra A. Sunkaria A. Singh A. y Sharma S. 2014. Curcumin nanoparticles attenuate neurochemical and neurobehavioral deficits in experimental model of Huntington's disease. *Nueromol Med* 16: 106-118.
  - Sato. Y. Itagaki S. Kurokawa T. Ogura J. Kobayashi M. Hirano T, Sugawara M. y Iseki K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 403: 136-138.
  - Saydoff A.J. Liu S.L. Garcia A.G.R. Hu Z. Li D. y W von Borstel R. 2003. Oral uridine pro-drug PN401 decreases neurodegeneration, behavioral impairment, weight loss and mortality in 3-nitropropionic acid mitochondrial toxin model of Huntington's disease *Brain Res* 994: 44-54.
  - Shimoda H. Seki E y Aitani M. 2005. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complem Altern M* 6:9.
  - Shivasharan D.B. Nagakannan P. Shivanandappa T.B. Prabakar V.V. Bansal P. y Unnikrishnan K.M. 2013. Protective effect of *Calendula officinalis* Linn. flowers against 3-nitropropionic acid induced experimental Huntington's disease in rat. *Drug Chem Toxicol.* 36(4): 466-473.
  - Schüll S. Günther S.D. Brodesseer S. Seeger J.M. Tosetti B. Wiegmann K. Pongratz C. Diaz F. Witt A. Andree M. Brinkmann K. Krönke M. Wiesner R.J. y Kashkar H. 2015. Cytochrome c oxidase deficiency accelerates mitochondrial apoptosis by activating ceramide synthase 6. *Cell Death Dis* 6: e1691; doi:10.1038/cddis.2015.62.
  - Schulz J.B. Matthews R.T. Jenkins B.G. Ferrante R.J. Siwek D. Henshaw D.R. Cipolloni P.B. Mecocci P. Kowall N.W. Rosen B.R. y Beal M.F. 1995.

Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity *in vivo*. *J Neurosci* 15: 8419-8429.

- Society for Neuroscience. 2008. Brain Facts. Apuntes sobre el cerebro y el sistema nervioso. México, Universidad Veracruzana.
- Solanki I. Parihar P. Lukman M.M. y Parihar S.M. 2015. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. *Adv. Nutr.* 6: 64-72.
- Spencer J.P.E. 2007. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr* 2: 257-273.
- Srinivasan S. y Avadhani G.N. 2012. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biom Med* 53: 1252-1263.
- Tsuda S. Egawa T. Ma X. Oshima R. Kurogi E. Hayashi T. Coffee polyphenol caffeic acid not chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. *J Nutr Biochem* 23: 1403-1409.
- Túnez I. Tasset I. Pérez-De la Cruz V. y Santamaria A. 2010. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: Past, present and future. *Molecules* 15: 878-916
- Vázquez-Mendoza E. Rodríguez-Torres E.E. López-García K. Hinojosa-Rodríguez C.X. y Jiménez-Estrada I. 2017. Differential effect of chronic undernutrition on the fiber type composition of fascicles in the extensor digitorum longus muscles of the rat. *Acta Histochem* <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.03.005>
- Vinothkumar R.K. Zhu J y Hirts J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515: 80-84.
- Wagatsuma A. Tamaki H. y Ogita F. 2005. Capillary supply and gene expression of angiogenesis-related factors in murine skeletal muscle following denervation. *Exp. Physiol* 90: 403-409.
- Waldvogel J.H. Kim H.E. Tippett J.L. Vonsattel P.J. y Faull R.L. 2015. The neuropathology of Huntington's disease. *Curr Top Behav Neurosci* 22: 33-80.

- Wu H. Xiong W.C. y Mei L. 2010. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137 (7): 1017-1033.
- Xian Z. y Ning Z. 2008. Scavenging and antioxidant properties in compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT* 41: 1189-1203.
- Yan G. Shi-Feng C. Jian-Ping L. Zhang Z. Jia-Qing Y. Zhi-Lin W. Cong-Yuan X. Zheng M. Zhen-Zhen W. Wen-Bin H. Xiao-Feng G. Gui-Ning W. y Nai-Hong C. 2015. Protopanaxtriol protects against 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in a rat model of Huntington's disease. *Acta Pharmacologica Sinica* 36:311-322.
- Zhou Y. Zhou L. Ruan Z. Mi S. Jian M. Li X. Wu X. Deng Z. y Yin Y. 2016. Chlorogenic acid ameliorates intestinal mitochondrial injury by increasing antioxidant effects and activity of respiratory complexes. *Biosci Biotech Bioch* doi: 10.1080/09168451.2015.1127130.
- Zielonka D. Piotrowska I. Marcinkowski T.J. y Mielcarek M. 2014. Skeletal muscle pathology in Huntington's disease. *Frontiers in Physiology* Volume 5, article 380.