



Convergencia de la Ciencia: una Visión Multidisciplinaria

Cristopher Antonio Muñoz Ibáñez
Mariel Alfaro Ponce
Sonia Gayosso Mexia
Coordinadores



CONVERGENCIA DE LA CIENCIA: UNA VISIÓN MULTIDISCIPLINARIA

© D.R. 2018 *Convergencia de la ciencia: una visión multidisciplinaria*

© D.R. 2018, Editorial Colegio de Ciencias y Artes de Tabasco

© Ediciones *CCAT*

1ª edición, 2018

Diseño y diagramación

Departamento de arte *CCAT*

Dirección Editorial a cargo de

Ricardo Avila Alexander

Coordinadores

Cristopher Antonio Muñoz Ibáñez

Mariel Alfaro Ponce

Sonia Gayosso Mexia

Colaboradora de Edición Técnica

Zaira Lizbeth González Gómez

Protegemos los derechos de autor y editor

ISBN: 978-607-98130-2-4

El presente *e-libro* se ha elaborado con el propósito de difundir la ciencia: desde una visión multidisciplinaria, como parte de una labor en pro de la investigación científica impulsada por la Escuela Superior de Tizayuca, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

Ediciones Colegio de Ciencias y Artes de Tabasco

COLEGIO DE CIENCIAS Y ARTES DE TABASCO AC

Número de RENIECYT: 1800872

colegio.ciencias@yahoo.com.mx



CONVERGENCIA DE LA CIENCIA: UNA VISIÓN MULTIDISCIPLINARIA

Coordinadores

Cristopher Antonio Muñoz Ibáñez
Mariel Alfaro Ponce
Sonia Gayosso Mexia



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HDALGO

Escuela Superior de Tizayuca

Comité Científico

Presidente

Dra. Rosa Elena Durán

Presidente Ciencias Económico-Administrativas

Dr. Gilberto Pérez Lechuga

Presidente Ciencias básicas e Ingeniería

Dr. Jorge Isaac Chairez Oria

Presidente Ciencias Sociales y Humanidades

Dr. Guillermo Lizama Carrasco

Presidente Ciencias de la salud

Dra. Sofía González Salinas

Secretario

Dra. Mariel Alfaro Ponce

Miembros

Dr. Cristopher Antonio Muñoz Ibáñez

Dra. Suly Sendy Pérez Castañeda

Dr. Venkata Krishna Karthik Tangirala

Dra. Ma. de Lourdes Elena García Vargas

Dr. Ricardo Ávila Alexander

Mtra. Evangelina Lezama León

Uso de software FIBER y funciones de distribución para discriminar cambios morfofuncionales en un modelo de degeneración.

Diana Isabel Calderón Guevara,¹ · Erika Elizabeth Rodríguez Torres,² · Diego Castillo González,³
Jorge Viveros Rogel,² · Ismael Jiménez Estrada,⁴ y Elizabeth Hernández-Echeagaray³.

¹ Licenciatura en Biología, UAEH.

² Centro de Investigación en Matemáticas, UAEH.

³ Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Laboratorio de Neurofisiología y Neurodegeneración, Unidad de Biomedicina

⁴ Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN.

Resumen: La administración sistémica del compuesto 3-nitropropionico (3-NP) (inhibe la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa e incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno -ERO-) provoca alteraciones semejantes a las de la Enfermedad de Huntington (EH), en donde las neuronas de las regiones cerebrales asociadas a dicha enfermedad presentan daño mitocondrial. En el presente estudio analizamos la acción del ácido clorogénico (compuesto antioxidante que deprime la formación de ERO, mejorando la defensa celular) sobre las alteraciones metabólicas provocadas por el 3-NP en el músculo esquelético. Para evaluar lo anterior, utilizamos ratones machos juveniles C57/BL6, divididos en tres grupos: A) ratones con 3NP B) ratones con solución vehículo y C) ratones con ácido clorogénico (AC) y 3NP. Cinco días después fueron sacrificados y se obtuvieron secciones transversales finas (14 µm) de los músculos gastrocnemios, las cuales fueron teñidas con las técnicas histoquímicas COX, SDH, NADH (las cuales tiñen a las fibras de acuerdo a su metabolismo oxidativo o glucolítico) y con la técnica de la ATPasa básica (tiñe a las fibras según su actividad ATP-ásica). Los cortes de los músculos teñidos fueron fotografiados y se les determinó el número y la proporción de cada tipo de fibra con el software FIBER. Los resultados obtenidos gracias a la metodología desarrollada muestran que los músculos del grupo A (con tratamiento de 3-NP) presentan mayor porcentaje de fibras glucolíticas que los del grupo B, lo cual representa un daño mitocondrial semejante al observado en la EH; mientras que en el grupo C (con AC y 3-NP), se presenta un mayor porcentaje de fibras oxidativas, indicando menor producción de ERO. Nuestras observaciones permiten sugerir que el ácido clorogénico es un compuesto que protege las alteraciones metabólicas provocadas por el 3-NP en el músculo esquelético del ratón.

Palabras claves: Enfermedad de Huntington (EH), ácido clorogénico (AC), ácido 3-nitropropionico (3-NP).

1 Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas están estrechamente relacionadas con las disfunciones mitocondriales, como es el caso del Huntington (HD) (Arredondo et al., 2012), de acuerdo a estudios recientes, se han revelado fallas en la actividad de los complejos mitocondriales II y III y en menor grado del complejo IV, en regiones asociadas a la neurodegeneración (Turner y Schapira, 2010).

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) actúa inhibiendo a la enzima succinato deshidrogenasa, esta enzima realiza la oxidación de succinato a fumarato y su inhibición conduce a la reducción de la síntesis de ATP, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y muerte neuronal (Túnez et al., 2010). Por lo que el complejo II realiza un papel importante en la cadena respiratoria, en el ciclo de los ácido carboxílicos y probablemente en el control de la producción de radicales libres (Benchoua et al., 2006). Por lo que se ha sugerido con algunos estudios, el papel que juega la excitotoxicidad de 3-NP en la fisiología y en la degeneración celular. Se ha observado ya, daño a nivel muscular esquelético en fibras musculares degeneradas, aumento en la cantidad de núcleos, atrofia ocasional de

fibras musculares de tipo I y II, cambio en la transición de contracción de rápida a lenta de fibras en ratones, desorganización de sarcomeras, atrofia mitocondrial, modificaciones morfológicas del músculo y aumento en la producción de lactato en células musculares que podría indicar un alto nivel de glucólisis (Kosinski et al., 2007; Turner et al., 2007; Hernández-Echeagaray et al., 2010; Ciammola et al., 2011).

Algunos antioxidantes pueden proteger en el daño celular inducido por el 3-NP, por lo que se sigue que el daño ocasionado por la toxina es dependiente de la formación de EROs (Pérez-De la Cruz et al., 2010). El ácido clorogénico posee propiedades benéficas para la salud humana (Xiang y Ning, 2008), al ser un antioxidante realiza la eliminación de EROs, mejorando la defensa celular y coadyuvando a la prevención de daños a los componentes celulares (Sato et al., 2011), por lo cual en la presente investigación se pretende evaluar mediante el software FIBER (desarrollado en nuestro laboratorio) los cambios en la estructura del músculo gastrocnemio y la administración del ácido clorogénico como un posible protector en un modelo de reproducción fiel de la enfermedad de Huntington inducido por el 3-NP en ratones C57/BL6.

Para observar los cambios se analizaron los cambios en las proporciones de las fibras del músculo gastrocnemio

CONVERGENCIA DE LA CIENCIA: una Visión Multidisciplinaria

con la administración del ácido clorogénico como un posible protector en un modelo de reproducción de la enfermedad de Huntington inducido por el 3-NP en ratones C57/BL6, mediante la aplicación de pruebas histoquímicas NADH, SDH, COX y ATPasa.

2 Metodología

Se utilizaron 15 ratones machos juveniles C57/BL6, con un ciclo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad con libre acceso al alimento y al agua. Cinco ratones tratados durante cinco días con 3-NP (15 mg/kg i.p., 7.4 pH), cinco ratones tratados con la solución vehículo como grupo control (Buffer de fosfato, 7.4 pH) y a cinco ratones se les administro un pretratamiento de ácido clorogénico (100 mg/kg i.p.) durante cinco días y posterior a este se le aplicó el tratamiento de 3NP por cinco días. Tres días después de la última administración del tratamiento los animales fueron anestesiados con Ketamina (100 mg/kg i.p) y se les realizó la disección del músculo gastrocnemio de ambas patas.

2.1 Análisis histoquímicos

Se tomaron secciones transversales frescas y congeladas de la región del vientre medio del músculo, obtenidas con un criostato. Las secciones de tejido se montaron en diferentes portaobjetos de vidrio para efectuar los análisis histoquímicos de COX, SDH, y NADH (Figura 1.) que clasifican las fibras según su metabolismo en tono oscuro correspondientes a fibras con metabolismo oxidativo y en tono claro correspondientes a fibras glucolíticas; ATPasa básica (pH 9.4) que permite identificar a las fibras en tres tipos: Rápidas (tono gris), Intermedias (tono oscuro) y Lentas (tono claro).

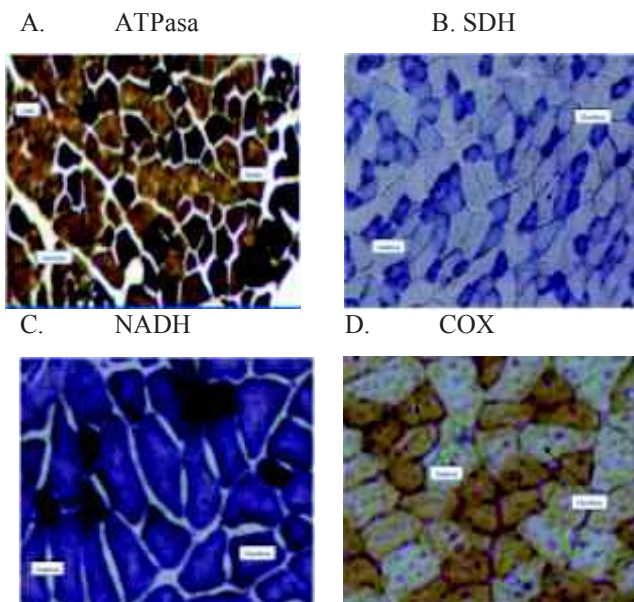


Figura 1: Tinciones histoquímicas del músculo gastrocnemio. **A.** ATPasa, **B.** SDH, **C.** NaDH y **D.** COX

2.2 Análisis de imágenes

Posteriormente se analizaron las fibras con el software FIBER para la Clasificación de Fibras Musculares en Imágenes Histológicas, con el cual se identificaron, contaron y se estableció su posición dentro del músculo.

El software permite indicar manualmente los valores de referencia de cada fibra, seleccionando 10 datos por tipo de fibra para calcular los valores de referencia de los clústeres y poder realizar la segmentación de imágenes y así generar subimágenes en las cuales se realizó el conteo de cada tipo de fibra. En cada una de las imágenes segmentadas se realizó el conteo de fibras siguiendo el supuesto que cada cúmulo de píxeles del color seleccionado corresponde a una fibra del tipo requerido. (Chávez, 2017).

Se reconstruyeron los cortes histológicos a partir de las coordenadas de las fibras musculares con las funciones de distribución. (ver secciones **A**, **B** y **C** de figuras 2, 3, 4 y 5) El problema exacto abordado es ajustar una función de distribución a un conjunto finito de puntos en el plano. Por función de distribución se entenderá una suavización de un histograma de datos centrados, construida sobre una malla de $N \times N$. Siendo N un parámetro a determinar por el usuario. Las funciones de distribución son una superposición lineal de funciones Gaussianas de núcleo, básicamente una función de núcleo para cada uno de los cuadros de la malla. Las funciones Gaussianas de núcleo son un tipo de función de base radial, las cuales son utilizadas en problemas de aproximación e interpolación. (Chávez, 2017 y Viveros-Rogel, 2018).

2.3 Análisis estadístico

Se transformaron los números de fibras contados en cada tinción a log natural debido a que estaban sesgados. Positivamente. Una vez realizada la transformación, se compararon las medias de las fibras lentas, intermedias y rápidas para la prueba histoquímica de ATPasas y de las fibras oxidativas y glucolíticas para las pruebas histoquímicas SDH, NADH y Cox. Por medio de ANOVAS de una vía, sin encontrar diferencias significativas entre ellas.

3 Resultados

Observando los cambios en la proporción de fibras de cada pruebas histológica. (Figuras 2, 3, 4 y 5). En las cuales se observan los grupos **A.** Control **B.** 3NP **C.** Pretratamiento y **D.** Número de fibras. Observando diferencias significativas solamente en la tinción para SDH.

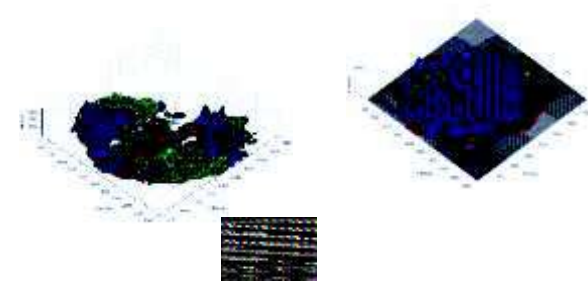
La figura 2A muestra la distribución de fibras lentas en verde que se encuentran en todo el perímetro, fibras intermedias en rojo que se encuentran en el centro y fibras rápidas en azul se pueden localizar en los extremos. Después de la condición 3NP, fig. 2B, se observa un incremento en fibras rápidas en azul, así como intermedias en rojo y una reducción de fibras lentas en verde.

En la última condición de Pretratamiento no se ven muchos cambios, sin embargo los centroides de todos los tipos de fibras se ven más distantes que en dos primeras condiciones. En la figura 2D se muestra el número de fibras por condición en el control hay 567 fibras lentas, 744 fibras intermedias y 1034 fibras rápidas. Para la condición 3NP hay 354, 2107 y 1470 fibras lentas, intermedias y rápidas respectivamente. En la última condición de pretratamiento hay 216 fibras lentas, 2168 fibras intermedias y 1448 fibras rápidas.

**CONVERGENCIA DE LA CIENCIA:
una Visión Multidisciplinaria**

ATPasa
A Control

B 3NP



C Pretratamiento

D Número de fibras

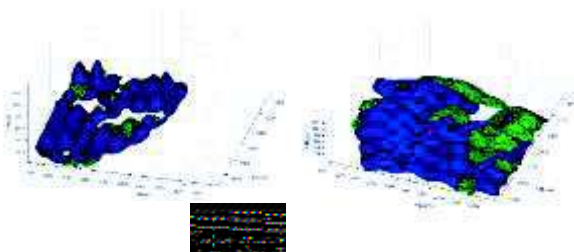


Figura 2: Reconstrucción con funciones de distribución de cortes histológicos para la tinción histoquímica ATPasa del musculo gastrocnemio. Fibras lentas (verdes), intermedias (rosas) y amarillas (rápidas).

SDH

A Control

B 3NP



C Pretratamiento

D Número de fibras

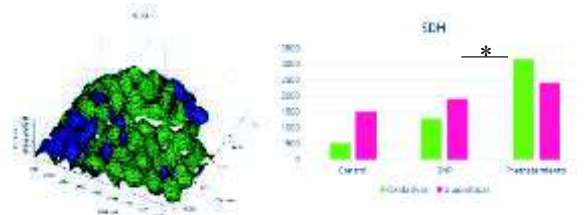


Figura 3. Reconstrucción con funciones de distribución de cortes histológicos para la tinción histoquímica SDH del musculo gastrocnemio. Fibras glucolíticas (azules) y oxidativas (verdes).

En la condición control, fig. 3A, se ven muy pocas fibras oxidativas. Esto puede ser debido a que el corte histológico no es muy homogéneo. En la condición 3NP, fig. 3B, hay más fibras oxidativas en la condición control. Para el pretratamiento, fig. 3C, se puede observar claramente un incremento en fibras oxidativas.

En la figura 3D se muestra la tinción SDH donde se encontraron diferencias significativas con una $p= 0.028$

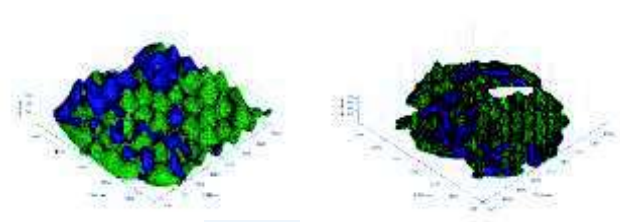
entre el número de fibras del grupo de los ratones tratados con 3NP y a los que se les administro ácido clorogénico.

Así mismo se observa una mayor presencia de fibras oxidativas al grupo con la aplicación de ácido clorogénico como antioxidante, lo cual indica una menor producción de ERO's. Para el control hay 517 fibras oxidativas y 1498 fibras glucolíticas. En la condición 3NP, fueron 1290 y 1915 y para el pretratamiento 3148 y 2430 fibras oxidativas y glucolíticas respectivamente.

NADH

A. Control

B. 3NP



C. Pretratamiento

D. Número de Fibras

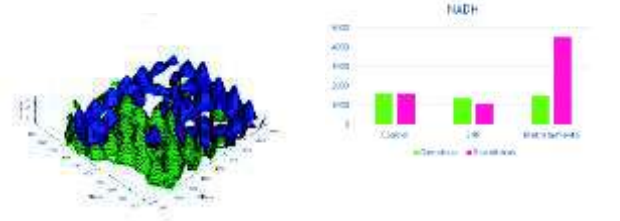


Figura 4: Reconstrucción con funciones de distribución de cortes histológicos para la tinción histoquímica NADH del musculo gastrocnemio. Fibras glucolíticas (azules) y oxidativas (verdes).

Las funciones de distribución para la tinción histoquímica NADH del musculo gastrocnemio en la condición control, fig. 4A, se muestran las fibras glucolíticas un poco más lateralizadas. En la condición 3NP, fig. 4B, se siguen observando mayormente oxidativas. Y en el pretratamiento, fig. 4C, se muestran un poco más separadas ambos tipos de fibras con un incremento en glucolíticas. En la figura 4D, en la condición control se contaron 1570 y 1627, en 3NP fueron 1345 y 1087 y para el pretratamiento 1474 y 4513 fibras oxidativas y glucolíticas respectivamente.

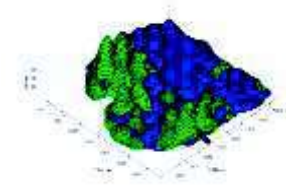
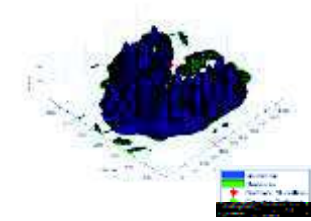
La figura 5A, presenta muy pocas fibras oxidativas de color verde. En la condición 3NP, fig.5B, se observa un incremento en fibras oxidativas y un menor número de fibras glucolíticas. En la condición de pretratamiento se observa la presencia de un mayor número de fibras glucolíticas dada por la altura de las funciones de distribución, fig. 5C.

El número de fibras se observa en la figura 5D, en donde se contaron 618 fibras oxidativas y 2259 fibras glucolíticas en la condición control. Para el 3NP fueron 921 y 1772, en la última condición 1324 y 3664 fibras oxidativas y fibras glucolíticas, respectivamente.

COX

A. Control

B. 3NP



C. Pretratamiento

D. Número de Fibras



Figura 5 Reconstrucción con funciones de distribución de cortes histológicos para la tinción histoquímica COX del musculo gastrocnemio. Fibras glucolíticas (azules) y oxidativas (verdes).

4 Discusión

A partir de la evidencia experimental obtenida se pudo constatar la eficacia del Software FIBER para la identificación, conteo y localización de fibras de distintos tipos, según su metabolismo o actividad enzimática, en músculos esqueléticos sujetos a distintas condiciones, tanto control como experimentales. Los resultados obtenidos indican que en el grupo de animales a los que se les aplicó el tratamiento de 3-NP, se presenta una distribución de fibras particular la cual se modifica según el procedimiento experimental empleado. Esto último se expresa en mayor proporción en la tinción para SDH, en donde se presenta un mayor número de fibras glucolíticas, lo cual representa un daño mitocondrial similar al que ocurre con la enfermedad de Huntington, por la mayor producción de ERO's.

Mientras que en el grupo con la aplicación del pretratamiento de ácido clorogénico y posteriormente el 3-NP para inducir los daños causados por el HD, se observó una mayor presencia de fibras oxidativas en todos los complejos, principalmente el segundo (SDH) que indica una menor producción de ERO's, y en consecuencia menor daño mitocondrial y que a su vez demuestra la eficacia de la aplicación del ácido clorogénico como antioxidante.

5 Conclusiones

Gracias al uso del software FIBER fue factible establecer el incremento en la proporción de fibras oxidativas en la segunda cadena (SDH) ante la aplicación del ácido clorogénico, lo cual corrobora su acción positiva como antioxidante. Por lo que su uso puede ser benéfico para prevenir o reducir los daños provocados por la enfermedad de Huntington en las primeras etapas de la misma.

6 Referencias

Arredondo, F.A., G.C. Venet, O.G. Román y E.Y.D. Ramírez; 2012. Bases moleculares de las enfermedades mitocondriales. MEDISAN, 16(5), pp.790-805.

Benchoua, A., Y. Trioulier, D. Zala, M.C. Gaillard, N. Lefort, N. Dufour, F. Saudou, J.M. Elalouf, E. Hirsch, P. Hantraye, N. Deglón y E. Brouillet; 2006. Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated Huntingtin. Mol Biol Cell 17, pp. 1652-1663.

Castillo, G. D. 2017. Efecto del ácido clorogénico en el músculo gastrocnemio: efectos fisiológicos e histoquímicos. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.

Chávez, F., G.A; 2017. Software para la Clasificación de fibras musculares en imágenes histológicas (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.

Hernández-Echeagaray, E., N. González, A. Ruelas, E. Mendoza, E. Rodríguez-Martínez y R. Antuna-Bizarro; 2010. Low doses of 3-nitropropionic acid in vivo induce damage in mouse skeletal muscle. Neurol Sci 32, pp. 241-254.

Ciammola, A., J. Sassone, M. Sciacco, N.E. Mencacci, M. Ripolone, C. Bizzi, C. Colciago, M. Moggio, G. Parati, V. Silani y G. Malfatto; 2011. Low anaerobic threshold and increased skeletal muscle lactate production in subjects with Huntington's disease. Movement Disord 26, pp. 130-137.

Kosinski, M.C., C. Schlangen, F.N. Gellerich, Z. Gizatullina, M. Deschauer, J. Schiefer, A.B. Young, G.B. Landwehrmeyer, K.V. Toyka, B. Sellhaus, K.S. Lindenberg; 2007. Myopathy as a first symptom of Huntington's disease in a marathon runner. Movement Disord 22(11), pp. 1637-1640.

Pérez-De la Cruz, V., P. Carrillo-Mora y A. Santamaría; 2010. Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental models. J Bioenerg Biomembr 42, pp. 207-215.

Sato Y., S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara y K. Iseki; 2011. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int J Pharm 403, pp. 136-138.

Túnez I., I. Tasset, V. Pérez-De la Cruz y A. Santamaría; 2010. 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: Past, present and future. Molecules 15, pp. 878-916.

Turner C., J.M. Cooper y A.H.V. Schapira; 2007. Clinical correlates of mitochondrial function in Huntington's disease muscle. Movement Disord 22(12), pp.1715-1721.

**CONVERGENCIA DE LA CIENCIA:
una Visión Multidisciplinaria**

Turner C y A.H.V. Schapira; 2010. Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr* 42, pp.193-198.

Viveros-Rogel J., Lopez-Garcia K., Chavez-Fragoso G., Lopez-Ortega, Salvador Quiroz-Gonzalez, Jimenez-Estrada I. and Rodriguez Torres E E. 2018. A Display Method that Discloses the fractal Organization of Fiber Types in Muscles and Quantifies the Effectiveness of the Developed Software: The Effect of Chronic Undernutrition. Preprint.

Xiang Z y Z. Ning; 2008. Scavenging and antioxidant properties of compound from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT-Food Sci Technol* 41, pp. 1889-120

**CONVERGENCIA DE LA CIENCIA:
una Visión Multidisciplinaria**

**El libro “*Convergencia de la ciencia:
una visión multidisciplinaria*”, fue
editado y publicado por ECCT, en
formato electrónico. Tabasco, México.
Septiembre, 2018.**

colegio.ciencias@yahoo.com.mx

