

## Aplicación del análisis de imagen para la cuantificación de la actividad NADPH-DH en axones de la capa molecular de cerebelos de ratas tratadas con AZT

M.T. CORCUERA-PINDADO, F. GÓMEZ-AGUADO, A. PICAZO-TALAVERA, M. ROLDÁN-CONTRERAS Y M.J. ALONSO-MARTÍN.

Servicio de Anatomía Patológica. Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

La zidovudina (AZT) sigue siendo de los antirretrovirales más utilizados en el tratamiento de la infección producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (1). Por estudios necrópsicos se sabe que

pacientes HIV+ presentan lesiones neurológicas en un 90% y algunos autores sugieren la posibilidad de que el AZT produzca neurotoxicidad (2-3), pero esta asociación, aunque no se ha descartado, tampoco ha sido demostrada. Por estos motivos se planteó el estudio de la actividad NADPH-DH en cerebelos en un modelo animal para determinar la acción de este fármaco sobre dicha enzima. La cuantificación se realizó mediante análisis de imagen (4-6).

Se han utilizado 10 ratas Sprague-Dawley divididas en dos grupos: a) Cinco animales a los que se les administró retrovir (zidovudina en cápsulas de 250 mg. Lab. Wellcome), en agua de bebida a una concentración de 2 mg AZT/ml de agua durante 90 días consecutivos. b) Cinco animales formaron el grupo control, no recibieron AZT.

Las secciones de cerebelo de 20  $\mu$  obtenidas con criostato, se incubaron en medios histoquímicos estándar para determinar NADPH-DH y en medios histoquímicos control carentes de sustrato (7). La reacción en el tejido se estudió con un analizador de imagen (IMCO 10, Kontron Byldanalyze) y el programa MIP de Microm España como software. Las imágenes fueron captadas con una cámara Hitachi color Kp-C503, acoplada a un microscopio Nikon visualizadas con objetivo 20X y digitalizadas (fig. 1). Se realizó una segmentación en blanco/negro con una posterior criba (fig. 2). Se cuantificaron un total de 30 campos por sección de tejido, elegidos de forma aleatoria, tanto en los animales tratados con AZT como en los controles. Se midió el área ocupada (en micras cuadradas) por los axones del tercio inferior de la capa molecular. Los resultados se analiza-

Correspondencia: Dra. M<sup>a</sup> José Alonso-Martín. Servicio de Anatomía Patológica. Centro de Investigación Clínica y Medicina Preventiva. Instituto de Salud Carlos III. c/ Sinesio Delgado 10. 28029 Madrid.



Figura 1: Imagen digitalizada de sección cerebelosa procedente de rata que ha ingerido 90 días AZT en el agua de bebida. Reacción histoquímica positiva para NADPH-DH.



Figura 2: Imagen segmentada mediante análisis de imagen.

ron estadísticamente aplicando la comparación de dos muestras calculando el valor de la t-student y la posible significación estadística.

Se ha observado una intensa actividad NADPH-DH en axones en el tercio inferior de la capa molecular, que se orientan paralelamente a la capa de células de Purkinje, así como también en fibras nerviosas y capilares de la capa granular. Actividad NADPH-DH se observó más débil en el resto de la capa molecular. En la observación directa con microscopía óptica no se observan claras diferencias entre las muestras. Las secciones incubadas sin sustrato no presentaban reacción positiva.

De la cuantificación del área aplicando el analizador de imágenes para los grupos estudiados, resultó una media de  $7,27 \mu^2$  para el grupo control con un valor de su desviación estandar de 1,73. El grupo que ha ingerido AZT 90 días tenía una media de  $2,02 \mu^2$  con una desviación estandar de 1,75. El valor de la t-student fue de 11,49 con una  $p < 0,001$ .

## DISCUSION

Diferentes autores (8-10) han validado este modelo experimental demostrando que animales que han ingerido en su dieta este fármaco presentaban alteraciones tanto morfológicas como funcionales a nivel mitocondrial sugiriendo que pueden existir alteraciones de los sistemas de transferencia de iones  $H^+$  y electrones desde coenzimas reducidos. En este sentido nuestros resultados en cerebelos tienen similitudes con los obtenidos por otros autores en tejido muscular y miocardio de animales que han ingerido el AZT ya que demuestran una disminución en la actividad NADPH-DH de los animales tratados con AZT respecto al grupo

control, por lo que sugerimos que a nivel funcional las mitocondrias del sistema nervioso central presentan alteraciones aunque sean mínimas, por lo que sería interesante profundizar en un futuro en este sentido.

Es común que algunos fármacos induzcan miopatías asociadas con neuropatías. Por eso sugerimos que el AZT pueda provocar alteraciones de la actividad de enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs y esta toxicidad podría tener como diana a las mitocondrias de diferentes tejidos incluyendo el sistema nervioso central ya que además el fármaco tiene la propiedad de atravesar la barrera hematoencefálica.

Utilizando una técnica fácil y rápida, como es la histoenzimología, y con el soporte para la valoración, como es el análisis de imagen, se puede proceder a cuantificar reacciones de difícil objetivación en poco tiempo y de forma prácticamente automática.

En la utilización de análisis de imagen, estamos de acuerdo con otros grupos de trabajo en la importancia de procesar secciones con un grosor similar, así como que los planos de tallado de las piezas deben ser similares, y con idénticas condiciones de luminosidad y contraste, por lo que estos criterios se han seguido en la metodología de este estudio.

El análisis de imagen, resulta una técnica de gran ayuda en la cuantificación del área por axones con reacciones histoenzimáticas realizadas en secciones de tejido que presentan una similar coloración, por lo que con la vista humana resultan de difícil valoración, aportando objetivación de los resultados.

## BIBLIOGRAFIA

1. Broder S, Mitsuya H, Yarchoan R, Pavlakis GN. Antiretroviral therapy in AIDS. *An Intern Med* 1990; 115: 604-618.
2. Hagler DN, Frame PT. Azidothymidine neurotoxicity. *Lancet* 1986; 2: 1392-93.
3. Saracchini S, Vacher E, Covezzi E, Tortonici G, Carbone A, Tirelli U. Lethal neurotoxicity associated to azidothymidine therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52: 544-545.
4. Calvet MC, Calvet J. Electrophysiology and analysis of image of the development of purkinje cells in culture and in the intact animal. *Rev Electroencephalogr Neurophysiol Clin* 1987; 17: 437-446.
5. Ong SH, Jin XC, Jayasooriah, Sinniah R. Image analysis of tissue sections. *Comput Biol Med* 1996; 26 (3): 269-279.
6. Hamilton PW, Allen DC. Morphometry in histopathology. *J Pathol* 1995; 175: 369-379.
7. Pearse AGE. *Histochemistry theoretical and applied*, 3rd edn, vol 2. Churchill Livingstone, Edinburgh London 1972; pp: 880-961.
8. Lewis W, González B, Chomy A, Papoian T. Zidovudine induces molecular, biochemical, and ultrastructural changes in rat skeletal muscle mitochondria. *J Clin Invest* 1992; 89: 1354-1360.
9. Lamperth L, Dalakas MC, Dagani et al. Abnormal skeletal and cardiac muscle mitochondria induced by (AZT) in human muscle in vitro and in an animal model. *Lab Invest* 1991; 65: 742-751.
10. Corcuera MT, López-Bravo A, Martínez-Rodríguez R et al. Histochemical and ultrastructural changes induced by zidovudine in mitochondria of rat cardiac muscle. *Europ J Histochem* 1994; 38: 311-319.

