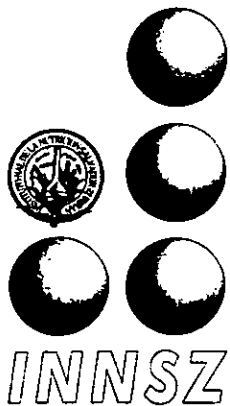


11262  
Ley

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y  
NEUROCIRUGÍA

Manuel Velasco Suarez



---

**EL COBRE Y LAS  
CUPROPROTEINAS EN LA  
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**T E S I S**

QUE PAR OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS  
P R E S E N T A :  
MARIE - CATHERINE BOLL WOHRLEN

MEXICO, D.F.

FEBRERO 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

275987



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.

## ***RECONOCIMIENTOS***

**AL ASESOR DE ESTA TESIS:**

**El Doctor Julio Sotelo M.**

**A MIS MAESTROS:**

**El Dr. Sergio Ponce de León ( Metodología en la Investigación clínica y estadísticas)**

**El Dr. Ruben Lisker ( Genética)**

**La Dra. Rebeca Franco ( Bioquímica)**

**El Dr. Juan Calva ( Seminarios de Investigación)**

**El Dr. Mario Cardiel ( Seminarios de Investigación)**

**El Dr. Camilo Rios (Neuroquímica)**

**El Dr. Martín Rosas ( Estadísticas)**

**El Dr. Juan Valadez ( Neuroanatomía)**

**AL COORDINADOR DE LA MAESTRIA:**

**El Dr. Alfredo Ulloa A**

## INDICE

<b>Introducción</b> .....	2.
<b>Antecedentes</b> .....	4.
1) Enfermedad de Parkinson.	
2) Teorías patogénicas de la enfermedad de Parkinson....	5.
a) Los radicales libres	
b) La inhibición energética	
c) La excitotoxicidad	
3) El cobre y la ceruloplasmina.....	9.
4) Papel de otras cuproproteínas en los mecanismos de defensa antioxidante	
a) Las metalotioneínas.....	13.
b) La superóxido-dismutasa.....	15.
5) Síntesis de la revisión.....	18.
<b>Objetivos</b> .....	19.
<b>Metodos</b> .....	20.
<b>Resultados</b> .....	28.
<b>Discusión</b> .....	47.
<b>Conclusiones</b> .....	50.
<b>Anexos</b> .....	52.
<b>Referencias hemero-bibliográficas</b> .....	66.

**Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Médicas**

**El cobre y las cuproproteínas en la  
enfermedad de Parkinson**

**Autor: Catherine Boll Woehrlen\***  
**Tutor: Julio Sotelo Morales\*\***  
**Cotutor: Camilo Rios Castañeda\*\*\***

**\* Neuróloga, Subdirección de Investigaciones, Instituto  
Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco  
Suarez"**

**\*\* Neurólogo, Director General del INNN "MVS"**

**\*\*\* Jefe del Dpto. de Neuroquímica INNN "MVS"**

## **INTRODUCCION:**

La etiología de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso central permanece desconocida; sin embargo, los recientes avances de la investigación, neuroquímica en particular, ponen en evidencia la falla del mecanismo energético, la excitotoxicidad y el daño oxidativo como causas de la muerte neuronal. Existe una compleja interacción entre estos 3 mecanismos (ver Fig.1). Un deficiente metabolismo energético acompañado de una reducción de las concentraciones del ATP lleva a la depolarización neuronal, y a su vez a la activación de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) por los amino-ácidos excitatorios (principalmente el glutamato), y finalmente al aumento del calcio (Ca) intracelular. La mitocondria, principal amortiguador del Ca intracelular, también puede generar más radicales libres en caso de desequilibrio lo que repercute sobre el DNA mitocondrial y las enzimas de la cadena respiratoria (Beal,1995).

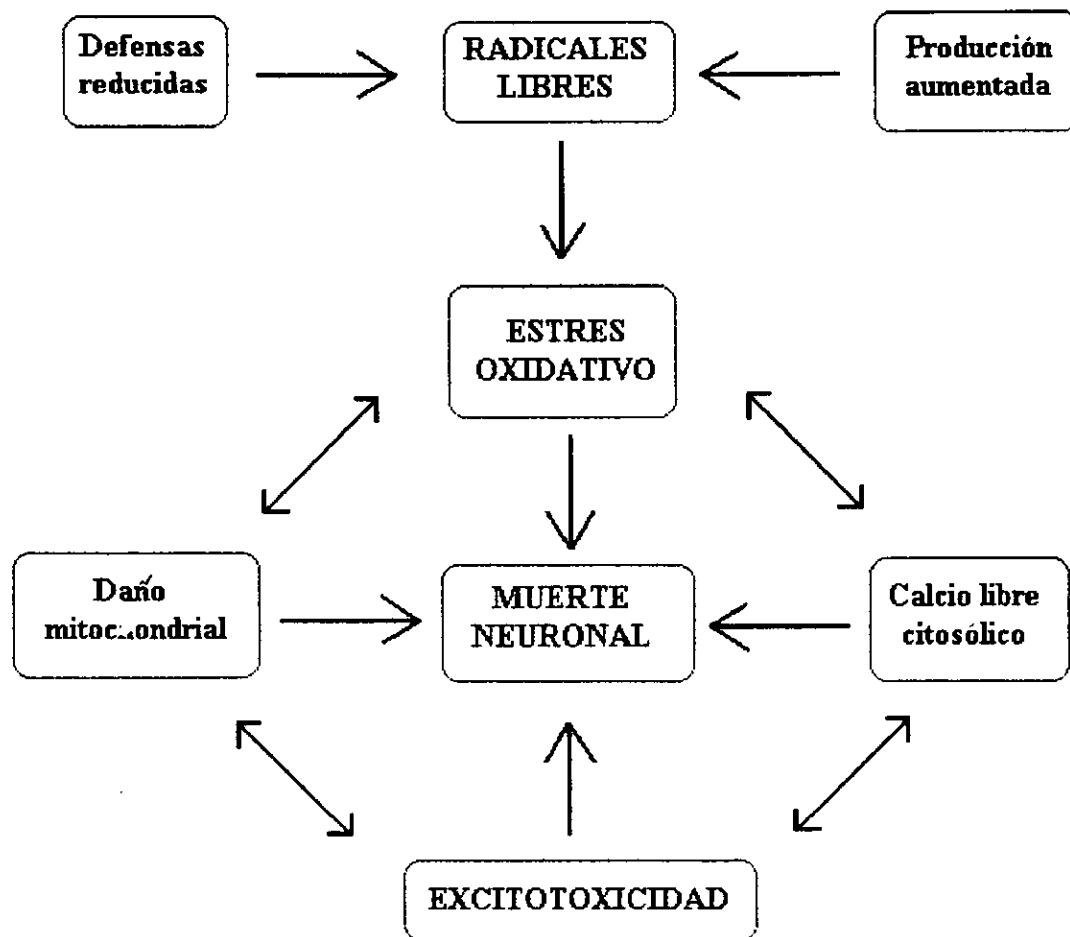
Hay evidencias experimentales del exceso de producción de radicales libres, ó daño oxidante acelerado, en las enfermedades de Huntington, Alzheimer, Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica.

Nuevos abordajes terapéuticos potenciales de dichas enfermedades incluyen a los antagonistas de receptores a aminoácidos excitatorios, al uso de factores tróficos y a los mecanismos protectores antiradicales libres.

En este trabajo nos interesamos por el estrés oxidativo y el papel del cobre, metal de transición ciertamente implicado, como el hierro, en la producción de radicales libres en la enfermedad de Parkinson. La revisión de la literatura nos llevó a estudiar las cuproproteínas que poseen una actividad protectora contra este daño.

La tesis contiene 3 estudios principales:

- El cobre y la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con enfermedad de Parkinson .
- La actividad enzimática de la superóxido-dismutasa en LCR de estos mismos sujetos.
- Las metalotioneínas en el Parkinson idiopático.



**Fig.1: Representación esquemática de los eventos etiológicos que llevan a la degeneración neuronal.**

## **ANTECEDENTES:**

### **1) Enfermedad de Parkinson:**

La sintomatología del Parkinson se define como la presencia simultánea de una hipertonia de un tipo especial, de una acinesia y de un temblor. El cuadro clínico descrito en 1817 por James Parkinson en su "*Ensayo sobre la Parálisis Agitante*" merece el nombre de enfermedad de Parkinson, entidad anatomoclínica caracterizada por su aparición en la segunda mitad de la vida, su evolución lentamente progresiva y el tipo de lesiones anatómicas que van a afectar electivamente al *locus niger* o sustancia negra del mesencéfalo. Se describen síndromes Parkinsónicos de etiologías diversas: degenerativa, infecciosa, tóxica, que generalmente tienen en común con la enfermedad de Parkinson la presencia de una lesión en la sustancia negra. El significado de esta localización lesional común se basa en el papel del sistema dopaminérgico nigro-estriatal en la traducción clínica del Parkinson.

La forma idiopática ó enfermedad de Parkinson es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en México. Su diagnóstico es clínico y su confirmación es anatomopatológica, macroscópicamente con la despigmentación de la sustancia negra y microscópicamente con los depósitos de hierro en dicho núcleo y la presencia de cuerpos de inclusión citoplásmicos, los cuerpos de Lewy.

La causa de la degeneración de las células dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson es todavía desconocida. En el estado actual del conocimiento se pueden mencionar factores ambientales, como los generadores de reacciones oxidativas, que llevan a la muerte neuronal en pacientes con alguna predisposición genética a ser más susceptibles a las neurotoxinas ambientales (Hertzman 1990). Esta hipótesis se sustenta en que, agentes tóxicos, tales como la MPTP y el plaguicida paraquat inducen la producción de radicales libres inestables que interactúan con los lípidos poliinsaturados de las membranas, y llevan a la muerte neuronal específica en la *substantia nigra*, tal como ocurre en el Parkinson idiopático (Jenner *et al.* 1992).



## 2) Teorías patogénicas de la enfermedad de Parkinson:

### a) Los radicales libres.

Dentro de las moléculas, los electrones habitualmente se reúnen en pares. Un doblete electrónico es más estable que un electrón aislado. Un radical libre es una especie química (generalmente de oxígeno) donde la capa periférica contiene un electrón desapareado ó solitario. El número total de electrones de un radical libre es por consecuencia impar. El electrón solitario le confiere al radical libre una inestabilidad tanto en el plano energético como en el cinético. Del punto de vista energético, el radical es reducido si pierde un electrón y sufre una oxidación si gana un electrón. Del punto de vista cinético, el hecho de tener un electrón no apareado sobre su capa periférica favorece considerablemente la aproximación del radical libre con otras moléculas y la rapidez de reacción química determinada por la eficacia de las colisiones (Southorn ,1988). Entre los radicales libres que se han detectado en los sistemas biológicos, se encuentran:

- El anión superóxido.  $\cdot\text{O}_2^-$  Es el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular.
- El peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  , aunque no es un radical libre, puede ser formado por dismutación de anión superóxido ó ser producto de la reducción bivalente de oxígeno. La adición de un segundo electrón forma entonces el “agua oxigenada”.
- Por otra parte, los metales de transición como el hierro, son catalizadores de las reacciones oxidativas (Prohaska 1987, Youdim *et al.*1990, Boll *et al.*1996). Citamos como ejemplo la reacción de Fenton, generadora del radical hidróxilo:  $\cdot\text{OH}$  aparentemente implicado en el daño neuronal ocasionado en la enfermedad de Parkinson:



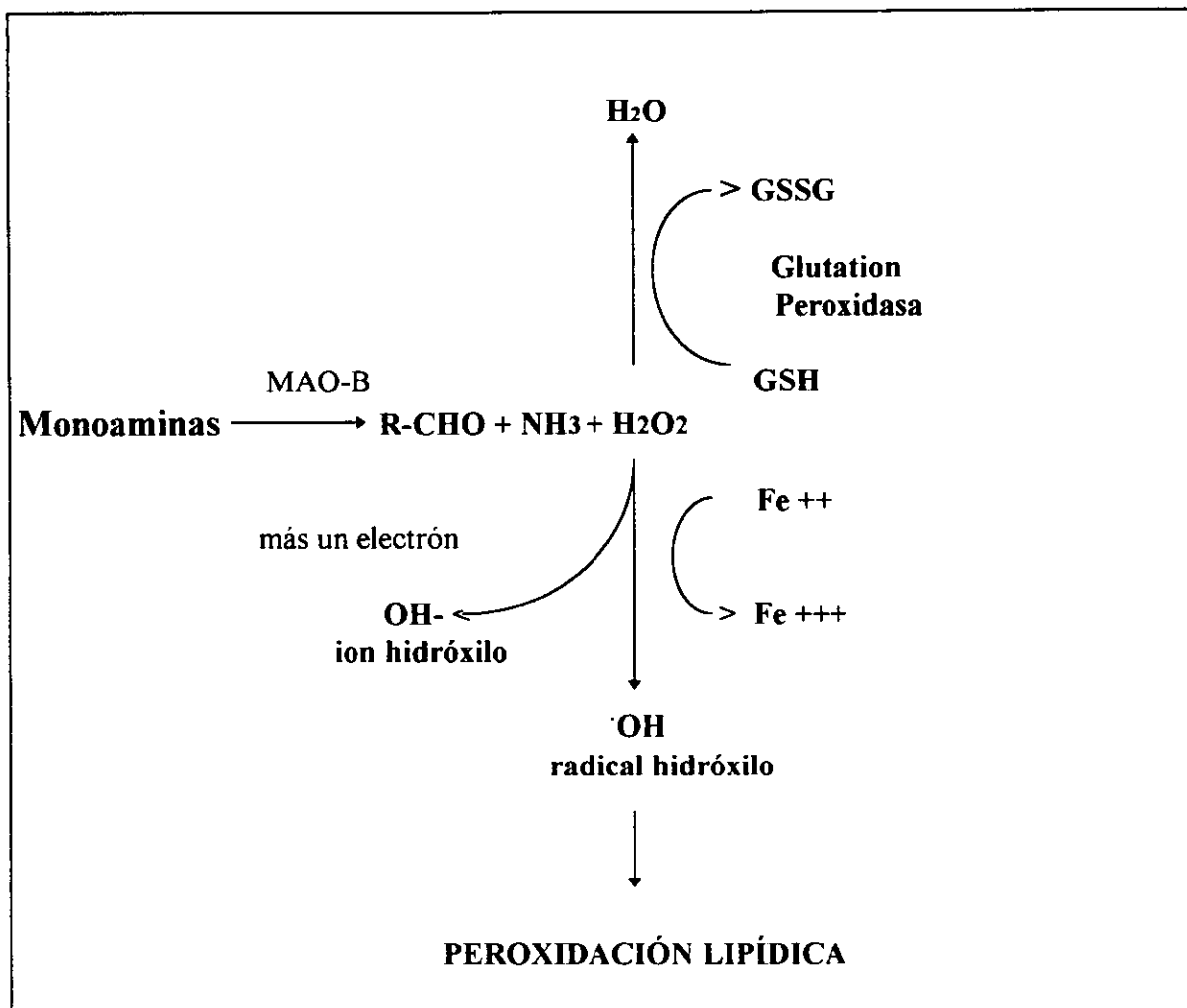
Otro metal de transición, el cobre, interviene asimismo en su forma iónica:



El **estrés oxidativo** corresponde a la formación de un excedente de radicales libres (sobrepasando a los mecanismos de defensa), y a la reacción progresiva del radical libre con la molécula vecina, en búsqueda de un electrón estabilizador. La cadena carbonada insaturada de los fosfolípidos membranales es particularmente vulnerable. Los dobles enlaces se convierten en vías de escape para el electrón desalojado cuya dificultad para recombinarse con un compañero es función de la riqueza en dobles enlaces.

El estrés oxidativo iniciado por el hierro parece jugar un papel primordial como mecanismo de muerte neuronal en el cerebro parkinsonico, lo que se apoya en los hallazgos en los modelos experimentales (Rojas&Rios 1993) . Se sabe que el hierro se acumula en la *substantia nigra* de los pacientes con Parkinson como ha sido demostrado tanto en estudios *post mortem* como in vivo, mediante imagenes de resonancia magnética, aprovechando el efecto paramagnético de estos depósitos (Dexter *et al.* 1991, Boll *et al.* 1996). Otros metales oxidantes, como el manganeso, producen parkinsonismo, por lo que se ha implicado a los diversos metales en la fisiopatogénesis de esta enfermedad, aún cuando se desconoce el papel de otros, como el cobre, en el Parkinson primario.

En la figura 2 observamos como el catabolismo de las monoaminas en presencia de glutatión puede generar agua, mientras en presencia de un metal de transición se forman radicales libres  $\cdot\text{OH}$ .



**Fig.2: Representación esquemática de las reacciones bioquímicas que conducen al estrés oxidativo (según Youdim ,1990)**

El peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido por el catabolismo de las monoaminas puede en presencia de glutacion (GSH) y glutacion peroxidasa generar agua.

En presencia de metales de transición ( Fe aquí) se forman radicales libres de oxígeno.

### **b) La inhibición energética**

El metabolismo energético de la neurona es totalmente dependiente del metabolismo de la glucosa. El producto final de la glucólisis, el piruvato entra por difusión en la mitocondria, produce energía directamente ó por medio de precursores para el ciclo de ácidos tricarboxilos y las fosforilaciones oxidativas. La regulación del metabolismo energético de la neurona se basa en el cambio energético(especialmente la producción de ATP),la necesidad de precursores anabólicos y los requerimientos de glucosa y oxígeno. El mantenimiento del potencial de membrana depende de la función adecuada de las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, altamente dependientes de la producción de ATP, de manera que una falla en dicha producción energética llega a cambiar el potencial de membrana , a liberar el bloqueo del canal de Ca del receptor NMDA (bloqueado por Mg) y ocasiona una activación facilitada del receptor(Rc) por el glutamato endogeno. En el modelo experimental de Parkinson con inyecciones estereotáxicas de  $\text{MPP}^+$ , el metabolito tóxico de la MPTP, existe una inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial que conlleva niveles significativamente reducidos de ATP en los ratones. ( Greene,1996)

### **c) La excitotoxicidad**

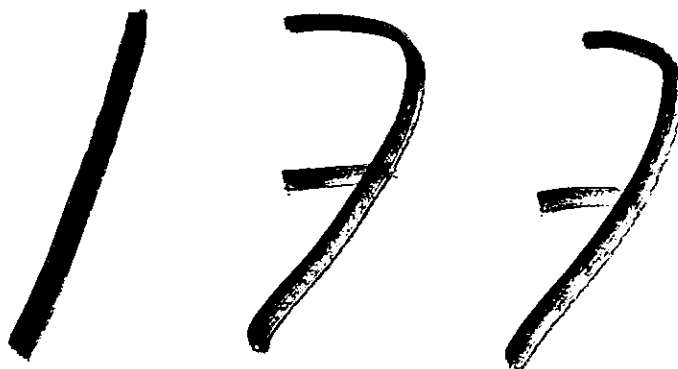
La excitotoxicidad mediada por falla energética consiste en la activación del Rc NMDA y la entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  en la neurona ocasiona su destrucción. La destrucción selectiva de las células dopaminérgicas en este modelo esta disminuida por la inyección simultánea de antagonista NMDA. (Greene, 1996) Por otra parte se ha descubierto recientemente la propiedad antagonista NMDA de un antiparkinsoniano utilizado desde hace décadas de manera empírica, la amantadina.

### 3) El cobre y la ceruloplasmina:

#### a) el cobre en general:

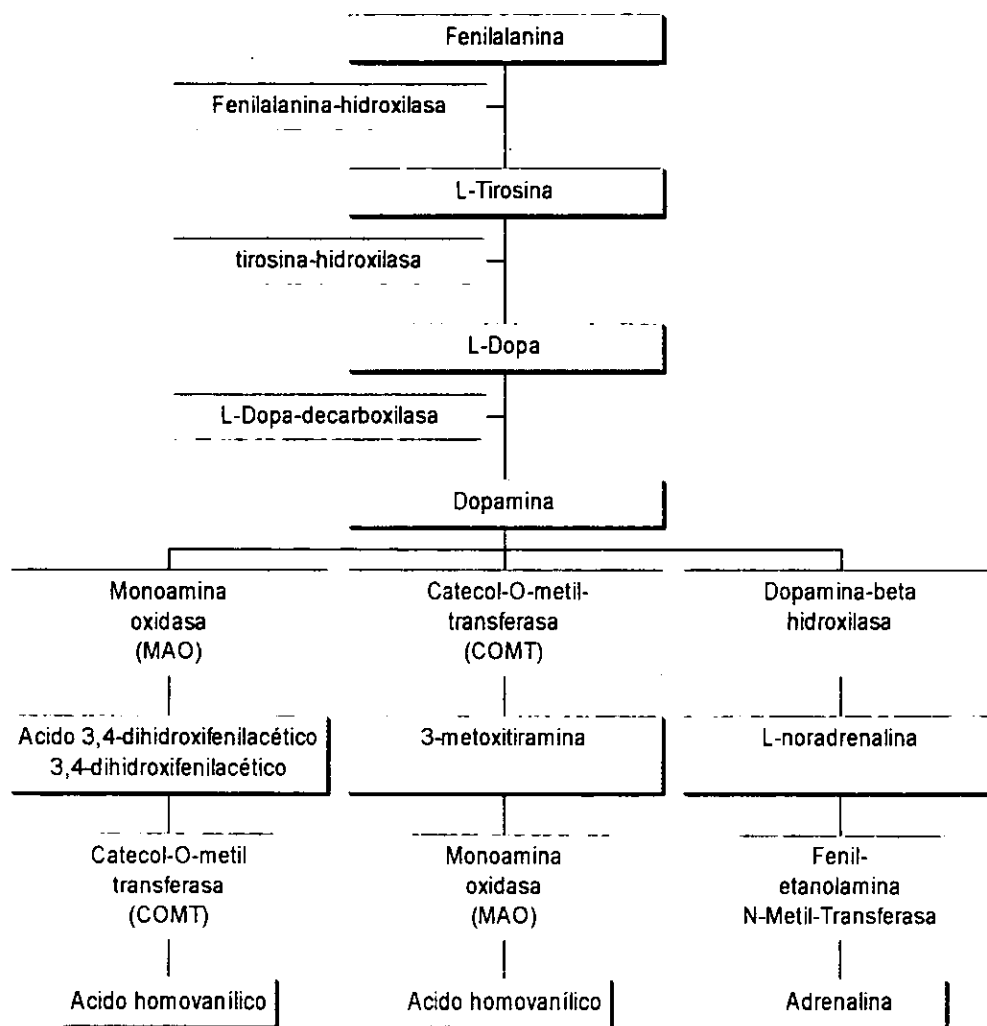
El cobre es un elemento esencial aunque en el estado de traza en el organismo, lo que implica una ingesta obligatoria del orden de 1.6 a 2.6 mg diario en el adulto. Este metal participa en el crecimiento en la niñez, en los mecanismos de defensa

inmu  
coles  
pued  
herej  
(Har  
en e  
cito  
la c  
dop

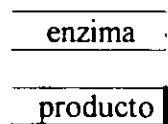


lucosa y del  
encia de Cu  
a alteración  
lo quelantes  
el destacado  
tasa (SOD),  
tirosinasa y  
lismo de la

De  
metalotionemias (MT) en cuanto al transporte y la liberación del metal. Para valorar el estatus de cobre en el organismo se usan generalmente las mediciones de cobre y de CP séricos (concentraciones normales de Cu sérico:  $1140 \mu\text{g/L} \pm 140 \text{ DE}$  equivalente a  $17.9 \mu\text{mol/L}$ ) (Harrison). Recientemente se identificó la medición de la actividad SOD en eritrocitos y de la COX plaquetaria como métodos más sensibles para detectar la deficiencia de Cu (Olivares, 1996). De misma manera se reporta en la deficiencia en cobre una reducción de la actividad de la COX y de la cadena respiratoria en general en el hígado y el cerebro (Linder 1996). Las concentraciones normales del metal en el LCR se han medido por absorción atómica a  $327.4 \text{ nm}$  revelando valores entre  $5$  y  $35 \mu\text{g/L}$ . Esta técnica se emplea en el estudio de la enfermedad de Wilson, desorden hereditario de la incorporación del cobre a nivel hepático que ocasiona un aumento del cobre circulante y de depósitos del metal especialmente en los ganglios basales. (Hartard 1993; Linder 1996).



**Fig.3: Representación esquemática del metabolismo de la dopamina**



La tirosina-hidroxilasa y la dopamina-beta hidroxilasa dependen de Cu  
 La monoaminooxidasa produce radicales ·OH en presencia de metales de transición ( ver Fig. anterior).

#### **b) el cobre en la enfermedad de Parkinson:**

De manera consistente en la literatura científica, se ha reportado una disminución del contenido de cobre en la *substantia nigra* de pacientes con Parkinson (Dexter *et al.* 1991). Del mismo modo, se ha informado recientemente de un déficit de cobre tanto en el mesencéfalo como en el cuerpo estriado de ratones parkinsonizados con MPTP, el mejor modelo experimental de la enfermedad (Rios *et al.* 1995).

Pall reportó en 1987 un aumento de la concentración de cobre total en el LCR, mientras que los niveles séricos tanto de cobre como de ceruloplasmina (CP) no fueron diferentes de los controles (Pall *et al.* 1987, Jimenez *et al.* 1992). Estos resultados pueden ser congruentes con una capacidad reducida de las cuproproteínas cerebrales para retener al cobre, de manera que se liberaría cualquier exceso al espacio extracelular, y de ahí al LCR, en su forma libre.

#### **c) la ceruloplasmina (CP):**

La ceruloplasmina, la principal proteína transportadora de cobre a nivel sérico es una alfa globulina con un peso molecular de 152000 Da cuya producción se ve estimulada por la inflamación sistémica, los estrógenos y el estrés oxidativo al que ayuda a controlar (Prohaska 1987, Milne *et al.* 1993, Solomons 1988). Su concentración sérica obtenida por radioinmuno ensayo (RIA) tiene valores entre 277 y 377 mg/L que corresponde a 1.8 a 2.5  $\mu\text{mol/L}$  (Harrison). Poco se ha estudiado esta proteína en el LCR donde sus concentraciones obtenidas por inmunoelectroforesis se han reportado de 1 mg/L en promedio en 55 casos (Fishmann, 1992). Recientemente se demostró la expresión de la CP en el sistema nervioso central (Klomp *et al.* 1996, Patel 1997) y se argumentó su participación en el control del estrés oxidativo (Miyajima *et al.* 1996, Patel 1997). Se describió también su deficiencia hereditaria en la aceruloplasminemia, entidad que se asocia con la degeneración de los ganglios basales y el acumulo de hierro cerebral (Harris *et al.* 1995, Morita *et al.* 1995). La CP posee una actividad ferroxidasa que transforma al  $\text{Fe}^{++}$  en  $\text{Fe}^{+++}$ . Esta última forma (férica) es movilizada por la transferrina (Linder 1991). Los depósitos excesivos de hierro en los ganglios basales podrían relacionarse con una disminución en la concentración o en la actividad enzimática de la CP.

#### **d) Teoría oxidativa y del daño mitocondrial en la EP.**

Como ya se mencionó, uno de los posibles mecanismos de producción de radicales libres en la EP es la acumulación de hierro libre y reactivo en la *substantia nigra*.

El mismo catabolismo de la dopamina genera radicales hidróxilo de manera indirecta a través del  $H_2O_2$  (Fig.2,3). Se ha demostrado que la peroxidación lipídica inducida por el complejo dopamina-hierro férrico o dopamina-cobre cúprico es fuertemente inhibida por la ceruloplasmina (Sotomatsu *et al.* 1990). La ferritina también participa en el proceso oxidativo y, experimentalmente, usando una concentración adecuada de ácido ascórbico, se forman los complejos catecol- $Fe^{+++}$ . Aún cuando la ferritina se encuentra elevada en los ganglios basales en varias formas de patología degenerativa extrapiramidal (síndromes de "Parkinson plus"), en la enfermedad de Parkinson, por el contrario, está disminuída (Jenner 1992).

Finalmente, se han reportado casos aislados de Parkinson avanzado que presentaron mejoría clínica por un tratamiento con D-penicilamina, sustancia quelante de cobre e inductora de cuproproteínas (Mizuta & Kuno 1993, Scheinberg *et al.* 1987).

Tratando de dilucidar la patogénesis de la enfermedad de Parkinson, varios estudios han reportado deficiencias en los complejos enzimáticos mitocondriales. A nivel de la *substantia nigra* se ha encontrado un déficit del complejo I (NADH CoQ reductasa) tanto en la enfermedad como en el modelo experimental de la misma (con MPTP): esta deficiencia, en el primer complejo enzimático de la cadena respiratoria mitocondrial, también se encontró en el músculo y las plaquetas. Sin embargo, la enfermedad de Parkinson no tiene las características de una encefalopatía mitocondrial, en particular, no se ha encontrado alteración de la relación lactato/piruvato. Jenner supone que un factor tóxico inicia esta inhibición. Otros estudios reportan igualmente deficiencias en otros complejos enzimáticos, en particular la COX (citocromo C oxidasa), una cuproenzima (Schapira *et al.* 1990, Nakagawa H. *et al.* 1992, Dimauro 1993).



#### **4) Papel de otras cuproproteínas en los mecanismos de defensa antioxidante.**

##### **a) Las metalotioneínas (MT).**

Otra proteína ubicua, con actividad antioxidante, "atrapadora" de radicales libres es la metalotioneína cuya síntesis es inducida por diversas sustancias (esteroides, liposacáridos, interferon alfa, entre otros). Tiene un importante papel protector de la célula expuesta a los radicales libres como ha sido demostrado en el caso de la aplicación de radiaciones ionizantes, de la activación de Rc NMDA, de la exposición a factores tóxicos tales como metales pesados y en el atrapamiento y la distribución de metales iónicos como el Zn y el Cu . (Schigara 1993, Sato 1993, Aschner 1996).

Las diferentes metalotioneínas (MT) son proteínas de bajo peso molecular y caracterizadas por su abundante contenido de cisteína, es decir con gran número de grupos sulfhidrilo (SH) SH es un buen reductor.

En el sistema nervioso central se describen 3 isoformas: Las 2 primeras MT-I y MT-II son abundantes en los astrocitos fibrosos y protoplásmicos, en las células endimarias, el plexus coroides, el aracnoide, las células endoteliales vasculares y aparentemente no se expresa en las neuronas ( con excepción de la neurona hipocampal CA3) , en la microglia y en los oligodendrocitos.

La isoforma MT-III de 68 aminoácidos , es principalmente expresada por la neurona y en el epitelio de plexus coroides.

Finalmente la MT-IV , un isomero recientemente descubierto, es expresado en epitelios estratificados (Ashner,1996).

Las características más importantes de las MTs son el alto contenido de metales, la composición de aa ( 20 cisteínas de 61aa y ausencia de aa aromáticos), la afinidad y la dependencia de metales (Cu,Hg> Cd> Zn) y su estabilidad térmica.(Sato & Bremmer 1993). Estos autores en un extenso trabajo de revisión citan 25 referencias de estudios experimentales donde los inductores de las metalotioneínas protegen contra daños oxidativos diversos tales como radiaciones ionizantes o inducidos por drogas citotóxicas generando la formación de radicales libres (ver tabla 1).

<b>Sustancias con actividad protectora</b>	<b>Tipo de daño oxidativo</b>	<b>Referencias</b>
Ceruloplasmina	formación de peroxinitrito endotelial en aterosclerosis	Swain <i>et al.</i> (1994)
7 nitroindazole (inhibidor de la NO-Sintetasa)	Modelo MPTP	Predborski (1996)
Bis 3, 5 - Di_ isopropilsalicitato - Cu ++	radiaciones ionizantes	Sorenson (1984)
S.O.D	Edema e infarto cerebral	Chan (1991)
Dexametasona y Cadmio	Modelo MPTP	Rojas & Rios (1997)
MT MT	Radiaciones ionizantes Exposición al frío	Aschner (1996)
DPenicilamina	Pacientes con Parkinson avanzado	Mizuta (1993)
Penicilamina; 5,aminosalicilato; y paracetamol	formación de peroxinitrito	Whiteman (1996)
IMAO-B (Selegilina y lazabemida)	Parkinson idiopático	Parkinson Study Group (1989) PSG (1993)

**Tabla 1:** Diferentes sustancias con actividad protectora demostrada contra el daño oxidativo.

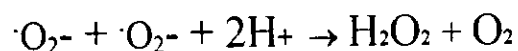
Posteriormente se realizó en nuestro laboratorio un estudio con cadmio y dexametasona como protectores en la intoxicación por MPTP, demostrando una mayor concentración de metalotioneínas estriales por efecto del metal y el esteroide. (Rojas & Rios 1997).

Las hipótesis funcionales sugeridas por los actuales avances en la investigación sobre las metalotioneínas son expuestas y detalladas por Aschner (1996):

- 1.- Las MT sirven para secuestrar y/o liberar iones metálicos esencialmente en la homeostasis del cobre y del Zn
- 2.- Las MT pueden regular la biosíntesis y la actividad de metaloproteínas dependiente de Zn como factores de transcripción
- 3.- Las MT protegen contra los efectos citotóxicos de especies reactivas de oxígeno, radiaciones ionizantes, drogas anticancerosas electrofílicas y mutagénicas y metales. En efecto, los genes de la MT son inducidos a nivel transcripcional por una variedad de fuentes de estrés tales como metales, hormonas glucocorticoides, agentes oxidantes, ejercicio extenuante, exposición al frío e irradiaciones.

#### **b) La superóxido-dismutasa (SOD) en las enfermedades neurodegenerativas.**

Las células eucariotas que incluyen a las neuronas y la glía contienen 2 distintas clases de proteínas que catalizan la depuración de radicales superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) formando peróxido de hidrógeno y oxígeno:



Ambas clases son llamadas superóxido-dismutasas (SOD). Una de ellas es un homodímero de peso molecular 32,000 compuesto de 2 subunidades que contienen una mol de cobre y zinc (CuZn-SOD), anteriormente llamada cerebrocupreína.

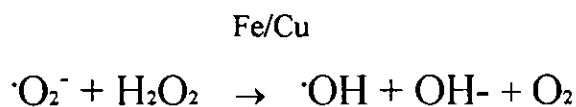
La otra es un tetramero de PM : 80,000 que contiene manganeso (MnSOD) y está localizada en la matriz mitocondrial (forma particulada), mientras que la CuZn-SOD se encuentra principalmente en el citoplasma. También se ha descrito una forma extracelular cuprica de SOD. (Prohaska 1987). Varios estudios recientes sugieren que la ZnCu-SOD tiene un papel de defensa antioxidante en el cerebro.

El radical libre superóxido es poco reactivo por si mismo y no causa daño directo serio. Sin embargo, en presencia del oxido nítrico ( el radical más difundible en el organismo) se produce el peroxinitrito (ONOO.- ) muy dañino a nivel celular. Se demostró que el

7-nitroindazol, un inhibidor de la oxido nitrico sintetasa protege contra la neurotoxicidad de la MPTP.(Przedborski 1996)

En la enfermedad de Alzheimer hay evidencia de que los iones metálicos inducen, vía radicales libres, a la proteína precursor del amiloide (APP) (Multhaup 1997). Los autores de este trabajo lo demuestran a partir de la siguiente secuencia de reacciones bioquímicas:

Reacción de Haber-Weiss:



La reacción de Fenton:



...y su equivalente con el cobre como metal de transición:



( Finalmente el siguiente modelo de ecuaciones para la producción de la APP



La esclerosis lateral amiotrófica es otra enfermedad neurodegenerativa , en este caso de la motoneurona, en el cerebro, el tallo cerebral y en el cuerno anterior de la médula espinal. 10% de los casos se transmiten con herencia dominante ( forma familiar de la enfermedad). De estos casos, el 20% se asocia con una mutación en el gen que codifica para la ZnCu-SOD1, el homodimero de 153 aminoácidos con un canal cargado positivamente. Este sitio activo que contiene el cobre, atrae a los radicales superóxidos para convertirles en peroxido de hidrógeno como lo hacen la catalasa y la glutation-peroxidasa. Existen 2 reportes en la literatura, de una disminución de la

actividad SOD1 en CSF en la esclerosis lateral amiotrófica (Brown 1995). Los posibles mecanismos de muerte neuronal en este padecimiento son:

- una disminución de la afinidad de la proteína mutante para Cu y Zn
- la nitración de la tirosina (  $SO+NO \rightarrow ONOO$  )
- formación de radicales libres hidróxilo ( $\cdot OH$ )
- apoptosis ó muerte celular programada genéticamente.

La actividad de la SOD particulada se encuentra mucho más elevada en la sustancia nigra que en el cerebelo humano (Saggu 1989)

En la sustancia nigra parkinsonica existe una disminución del glutatión, así como una deficiencia esencialmente del complejo I mitocondrial mientras la concentración de MnSOD mitocondrial está aumentada. Se supone también que existe un efecto de la disminución del glutatión sobre la SOD (Seaton 1996).

La administración de esteroides aumenta la actividad de la SOD en tejido cerebral de la rata, mientras en el animal gonadectomizado dicha actividad se reduce significativamente. ( Pajovic 1996) .

En la enfermedad de Parkinson la peroxidación lipídica significativamente elevada en la sustancia nigra sugiere que el tejido nigral está constantemente expuesto a los radicales libres derivados del oxígeno. La SOD citosólica protege contra esta toxicidad catalizando la dismutación de los aniones  $\cdot O_2^-$ . (Ceballos, 1990)

### 5) Síntesis de la revisión:

Con base en los hallazgos de la literatura, podemos suponer que la homeostasis cerebral del cobre y de las cuproproteínas pueda estar alterada en la enfermedad de Parkinson, por las siguientes razones:

- Las cuproenzimas (CP, COX, SOD, MT) regulan las reacciones oxidativas en el cerebro.
- Las cuproproteínas intervienen en varios niveles del metabolismo de la dopamina (Tirosina hidroxilasa, Dopamina beta hidroxilasa)(Prohaska 1987)
- El cobre se encuentra en concentraciones tisulares bajas en ganglios basales de los parkinsonianos post mortem, así como en el modelo experimental de la enfermedad. (Dexter 1991, Rios 1995).
- El cobre se encuentra elevado en el LCR (Pall 1987). (probablemente en forma ionizada, libre).
- Enzimas cuprodependientes como la COX, o indirectamente como la NADH se encuentran deficientes en la enfermedad (Schapira *et al.* 1990, Nakagawa H. *et al.* 1992, Dimauro 1993).
- La ceruloplasmina, principal transportador de Cu permite el paso del metal por la barrera hematoencefálica y por su actividad ferroxidasa, la movilización del hierro cerebral. Su deficiencia a nivel del SNC, donde también se sintetiza (Harris 1995, Patel 1997), podría explicar los elevados depósitos de hierro en la sustancia nigra parkinsoniana, tal como ocurre en los pacientes que sufren de aceruloplasminemia.

## **OBJETIVOS:**

El estudio tiene como objetivo principal el mostrar la participación del cobre, metal esencial y de transición, en una enfermedad caracterizada por la presencia de reacciones oxidativas generalmente dependientes de metales. El cobre tiene un papel en la activación de varias enzimas, algunas como la COX, deficientes en la enfermedad de Parkinson, otras tales como la superóxido dismutasa (SOD) poco estudiadas en dicha enfermedad. Nos interesamos particularmente en la ceruloplasmina (CP), principal transportador de cobre que tiene también una actividad enzimática ferroxidasa. Tratamos de corroborar que el cobre reportado como elevado en el LCR de los pacientes con Parkinson lo está en forma libre (ionizada) lo que coincidiría con una disminución en la actividad de la ceruloplasmina.

En resumen queremos:

- 1) Medir las concentraciones de cobre en LCR
- 2) Presentar evidencia original de que el cobre está aumentado en su forma libre en el LCR del enfermo con Parkinson.
- 3) Buscar una deficiencia en cuproproteínas con significancia estadística y quizás clínica midiendo la actividad ferroxidasa de la CP, la actividad SOD ( que depende de Cu) y las concentraciones de MT.
- 4) Estudiar estas variables en el paciente tratado con levodopa, para saber si son diferentes de las del paciente no tratado, ó si se correlacionan con una mejoría clínica del paciente tratado.
- 5) Finalmente, con nuestros resultados poder diseñar estrategias para promover una actividad neuroprotectora basada en el metabolismo del cobre y de las cuproproteínas.

## **METODOS:**

Se realizó un estudio de casos y controles hospitalarios donde se evaluó el estatus del cobre y cuproproteínas en el LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson y controles del mismo grupo de edad. Es, por lo tanto, un estudio observacional, comparativo, transversal y prolectivo.

### **SELECCION DE CASOS Y CONTROLES:**

Con base en un tamaño de muestra calculado con un error  $\alpha$  de .05, potencia de 80%, rango de cuprorraquia según Pall de 1.8 y diferencia de .30, de 25 casos y 25 controles, se reclutaron durante 18 meses los casos nuevos de enfermedad de Parkinson no tratados con L-DOPA, procedentes de la clínica de Parkinson-discinesias del Instituto Nacional de Neurología M.V.S. Se seleccionó al azar igualmente una muestra de pacientes tratados con levodopa de la misma clínica en busca de posibles alteraciones del cobre y sus cuproproteínas en LCR, atribuibles al fármaco.

La selección de los controles se hizo de manera aleatoria en la consulta externa del I.N.N.N. con pacientes que no presentaban datos de infección, patología tumoral o neurodegenerativa.

### **CRITERIOS DE INCLUSION:**

- Tener enfermedad de Parkinson (Parkinson primario o idiopático)
- Edad de 39 a 79 años.
- Dar su consentimiento informado antes de entrar al estudio.
- Tomografía cerebral y/o IRM normal, con excepción de una eventual atrofia cortico-subcortical leve o moderada (el estudio es solicitado rutinariamente antes de la primera revisión del paciente en consulta externa).
- Examen citoquímico del LCR: acelular con proteinorraquia en rango normal
- Ausencia de síndrome inflamatorio.
- En el grupo no tratado con L-DOPA, únicamente se aceptan tratamientos antidepresivos y / ó biperidene hasta 4 mg/d.



**CRITERIOS DE EXCLUSION:**

- No aceptación del estudio.
- Pacientes sometidos a tratamiento antioxidante, quelantes de metales, esteroides ó quimioterapia anticancerosa.
- Suplementación dietética con oligoelementos o tratamientos multivitamínicos.
- Contraindicaciones para la punción lumbar

**CRITERIOS DE ELIMINACION:**

- Punción lumbar traumática ( con muestras de LCR que contuvieron sangre)
- Infección ó patología intercurrente.

**INTEGRACION DEL GRUPO CONTROL:**

Este grupo se compuso de 29 pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía M.V.S. que cumplen con los mismos criterios de inclusión y exclusión a excepción de tener enfermedad de Parkinson u otra patología neurodegenerativa y tienen P.L. ó mielografía solicitada por parte de la consulta externa.

**CONSIDERACIONES ETICAS:**

Todos los pacientes dieron su consentimiento aclarado para la realización de las manipulaciones y la consulta de neurología como parte del estudio. Los controles debían tener una P.L. ó mielografía solicitada anteriormente y fueron informados de que se les tomaría una muestra suplementaria de 4 cc. Esta última se realizó únicamente si la raquiomanometría fue superior a 12 cm de H<sub>2</sub>O.

**MATERIALES Y REACTIVOS:**

El estudio fue realizado a nivel institucional con el apoyo de la jefatura de la consulta externa, del laboratorio de análisis clínicos para la medición de las muestras y del Departamento de Neuroquímica de la Subdirección de Investigación, en donde se determinaron todos los datos de laboratorio variables en este estudio. En este último Departamento se contó con la infraestructura siguiente para el proyecto:

**Equipo:**

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3110, con horno de grafito P-E modelo HGA-600 y automuestreador AS-60.
- Espectrofotómetro UV-visible Beckman DU-6.
- Equipo básico de laboratorio: balanza analítica, potenciómetro, centrífuga refrigerada, ultra-centrífuga, refrigeradores y congeladores para almacenamiento de muestras.
- 5 ratas adultas de bioterio para punción intracardiaca (5cc cada una), bocal de anestesia c/cloroformo.
- Material de computación pentium IBM con Windows 95, paquetes Excel, y SPSS, con conexión a la red Internet (con Medline, Netscape, mailbox)

**Reactivos:**

- Nitrato de plata, ácido nítrico, ácido perclórico, agua desionizada, antioxidantes (mercaptoetanol, metadisulfito), EDTA, Sulfato ferroso de amonio, tiocianato, metanol de las marcas E.Merck y Mallinckordt.
- Para la fabricación de soluciones amortiguadoras (buffers) : glicina, acetatos, carbonato de sodio ,Tris-HCl, fosfato de potasio de la marca Sigma Chemical CG.
- para curvas de calibración: Estándares de cobre 1000ppm , nitrato de plata, SOD-1 Sigma- sulfato ferrico- Metalotioneina-1 Sigma.

## **A) RECOPIACIÓN DE LOS DATOS:**

### **a) Datos clínicos:**

Todos los pacientes fueron sometidos a un examen neurológico y general. Los datos clínicos se dividieron en datos sociodemográficos, médicos en general y neurológicos. Estos últimos incluyeron la aplicación de las escalas de Hoehn y Yahr y la UPDRS( ver anexos) para cuantificar la sintomatología de la enfermedad de Parkinson y estratificar clínicamente a los pacientes ( Hoehn & Yahr 1967, Fahn 1987).

Todos los pacientes incluidos en la consulta externa de la Institución contaron con análisis de laboratorio de rutina (BH, QS, PH, serología HIV, EGO) solicitados por este servicio.

Las punciones lumbares fueron realizadas por médicos residentes de neurología y neurocirugía con muestras colectadas en tubos de plástico previamente lavados con ácido nítrico (para evitar contaminación externa por metales).

### **b) Análisis de laboratorio:**

La medición del cobre total en el LCR, se efectuó por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3110, con horno de grafito P-E modelo HGA-600 y automuestreador AS-60.

La cuantificación de la CP se hizo por la técnica enzimática (Arnaud *et al.* 1988, Tanabe,1984).

Esta última, consiste en medir la actividad ferroxidasa de la proteína

Fundamento: En presencia de CP se obtiene la transformación del  $Fe^{++}$  en  $Fe^{+++}$ .

**Técnica de medición de la actividad feroxidasa en LCR:**

- En un tubo Eppendorf, a 100  $\mu$ l de LCR se agrega
- 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de acetato (0.3M, pH 6).
- Después de una incubación de 5 minutos a 30° se agregan
- 100  $\mu$ l de solución de sulfato ferroso de amonio (0.01M) preparado en el momento con agua desoxigenada con gas nitrógeno.
- Las muestras se incuban nuevamente a 30° C durante 5 min.
- Se detiene la reacción con 200  $\mu$ l de ácido perclórico 1.25M.
- Se centrifugan las muestras en una microfuga Beckman por 3min a 10000RPM.
- El  $Fe^{+++}$  del sobrenadante (450  $\mu$ l) produce una reacción colorida rojiza con una solución de tiocianato 5M (450  $\mu$ l).
- El complejo se analiza por espectroscopia de luz visible monitoreado a 450nm

La técnica se aplicó a nuestras muestras después de haber analizado varios grupos de 5 repetidos hasta obtener un coeficiente de variación < 7% con LCR de pacientes controles.

### **Técnica de medición de la MT por saturación de plata:**

Basada en la técnica descrita por Scheuhammer *et al.* (1986) para medir MT tisular se realizó lo siguiente con el LCR de nuestros pacientes:

- **Fundamentos:** Se explotan las dos propiedades de la proteína MT:
- **GRAN AFINIDAD PARA LA PLATA (ASI COMO LA HEMOGLOBINA)**
- **TERMOESTABILIDAD (A ALTAS TEMPERATURAS)**

#### **Preparación del hemolizado:**

- Se realiza una punción transcardíaca de sangre de rata , 5 cc en tubo previamente heparinizado al 1%.
- Se agrega solución de KCl al 1.15% y se agita suavemente.
- Se centrifuga a 3000 RPM durante 5 minutos
- Se cambia 2 veces el sobrenadante
- Se resuspende en el mismo volumen de solución de TRIS a 30mM, pH 8
- Se centrifuga a 10 000 RPM durante 10 minutos
- Se pasa el hemolizado (sobrenadante) a otro tubo y se conserva a -70°C

#### **Técnica de saturación de plata propiamente dicha:**

- En diferentes tubos de plástico se agregó 100, 200, 300, 400, 500 y 700µL de LCR para determinar la cantidad necesaria.
- con 200µL de buffer de glicina 0.5M a pH=8.5
- y 250µL de plata ( $Ag^+$ ) a 20 ppm
- Se incuba durante 5 minutos
- Se agrega 200µL de hemolizado y se agita
- Se sumergen durante 2 minutos en agua hirviendo y posteriormente se centrifuga a 5000 RPM durante 10 minutos.
- Se desecha el coagulo y se somete nuevamente el sobrenadante a lo 2 últimos pasos
- El último sobrenadante se analiza en absorción atómica para medir la concentración de plata que corresponde al metal fijado a la MT:
- 7 átomos de Ag por molécula de MT

### **Técnica de medición de la actividad SOD en el LCR**

**Fundamento:** Capacidad de la SOD para inhibir la oxidación espontánea de la adrenalina para producir adrenocromo. ( Misra y Fridovich 1972)

**Mezcla:** 0.3 mM de adrenalina bitartrato acidificada a pH 2 con HCl  
0.1 mM de EDTA  
0.2 M de carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10.2 a 30°C

**Volumen de la mezcla:** 3 ml

**Volumen del preparado:** 300ml

**Solución A:** 50ml con 45mg de adrenalina pH 2  
y 12,44 mg de EDTA

**Solución B:** 250ml con 1.59 gr. de carbonato de Calcio

Añadir 50 µl de LCR puro a la mezcla de 0.5ml de solución A y 2.5ml de solución B

Se le la absorbancia por espectrofotometría de luz visible monitoreada a 480 nm en los tiempos 0, 30 seg, 60seg. Y 90 seg

## **B) ANALISIS ESTADISTICO:**

Los datos numéricos en escala continua se analizaron exploratoriamente para buscar si se cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad, usando métodos analíticos y gráficos (gráfica de caja y diagrama de tallo y hoja).

En caso de tener dos muestras independientes y homogéneas con las variables biológicas, se analizaron los dos grupos para encontrar si hay o no diferencia estadísticamente significativa en las medias con el uso de la prueba t de Student ó la U de Mann-Whitney en el caso de no existir distribución normal. ( Daly 1991)

También se realizó un análisis de varianza ó su equivalente no paramétrico (prueba de K-W) para comparar más de 2 grupos

En el caso de las variables categóricas o susceptibles de categorizarse, se aplicaron pruebas de independencia usando tablas de contingencia.

Se realizó un análisis de regresión logística tomando como variable dependiente el diagnóstico de caso no tratado ó de control. (Feinstein 1996)

Finalmente, también se realizó un análisis de regresión múltiple tomando como variable dependiente el estadio clínico, y como variable independiente los resultados de los análisis de cobre y cuproproteínas. Así como de manera inversa, tomando la variable actividad ferroxidasa en LCR como dependiente y un set de variables clínicas como independientes para buscar su respectivo impacto sobre la variable biológica.

## RESULTADOS:

Se estudió una población de 82 pacientes ambulatorios distribuidos de la siguiente forma:

- 29 controles (35.4%) procedentes de las clínicas de ortopedia, oto-neurología, oftalmología y cefalea esencialmente.
- 36 casos con Parkinson idiopático no tratado con levodopa que representan el 86% de la incidencia bianual de estos casos que acuden a nuestra Institución y el 43.9% de nuestra serie.
- 17 pacientes con Parkinson tratados con más de 399 mg de levodopa por día, durante un mínimo de 6 meses y que representaron el 20.7% de nuestros pacientes.

Se analizaron las diferentes variables clínicas expresadas en escalas dimensionales como la edad en años, el tiempo de evolución clínica de la enfermedad de Parkinson en años, el puntaje total en la Escala Unificada de la Enfermedad de Parkinson UPDRS, el puntaje de la actividad diaria en la UPDRS y el puntaje en la subescala motora (ver anexos); una variable clínica en escala ordinal fue el estadio según Hoehn y Yahr; finalmente 3 variables dicotómicas ó binarias fueron el género, el tabaquismo positivo de más de 5 unidades en paquetes-año y la procedencia rural con uso de agua de pozo. Las variables biológicas continuas como son: la actividad ferroxidasa en LCR, la proteínorraquia total, el cobre total en LCR y la actividad SOD.

Cada variable fue sometida a un análisis exploratorio identificando los indicadores de tendencia central (promedio, moda, mediana) y de dispersión a saber: la desviación estándar, la varianza y el error estándar del promedio, un indicador dependiendo a la vez de la desviación estándar de la población y del tamaño de la muestra. (Glanz,1997).



VARIABLES	CONTROLES	CASOS no tratados	Gr.tratado con L-Dopa	p
	no =29	n1 =36	n2 =17	
Edad	57.96 ( 2.2)	62.7 ( 1.61)	59.7 ( 2.32 )	NS
sexo masculino	48 %	71 %	59 %	NS
tabaquismo	20.7 %	2.8 %	17.6 %	0.06 NS
procedencia rural	21 %	64 % *	47 %	0.0025 *
tiempo de evolución		4.6 años(0.6)	6.6 (1.1)	NS
estadio Hoehn &Yahr	0	2.11	2.29	NS
UPDRS		49.66 (3)	55.4 ( 3.8)°	NS
UPDRS escala motora		28.8 (1.5)	29.2 (1.9)°	NS
UPDRS actividad diaria		17.2 (1.37)	19.0 ( 1.9)°	NS

\* X cuadrada      ° antes de la toma de L-DOPA

**Tabla 2:** VARIABLES CLÍNICAS. Promedios y errores estándar, proporciones así como la significancia de la diferencia entre los tres grupos.

La representación gráfica en diagramas de caja permitió identificar fácilmente los eventuales valores aberrantes y el histograma con curva de distribución proporcionó la kurtosis y el sesgo de la distribución.

La proporción de pacientes por edad y género en los diferentes grupos, no presentó diferencia significativa (tabla 2). En los 3 grupos: control, caso y Parkinson tratado, los promedios de edad fueron respectivamente de 57.96 , 62.7 y 59.7 años y el sexo masculino representó el 48, 71 y 59%. La procedencia rural representó el 21, 64 y 47% con predominancia significativa en los pacientes con Parkinson (grupo 1 y 2). El tabaquismo positivo, por el contrario, fue mayor en el grupo control .En nuestro estudio este resultado no fue estadísticamente significativo ( $X^2 = 1.8$ ;  $p = 0.06$ )

En los dos grupos de pacientes con Parkinson, con y sin tratamiento con L-DOPA, el tiempo de evolución de la enfermedad tuvo un promedio de 4.6 y 6.6 años, respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa.

El grupo de pacientes no tratados con L-DOPA fue estratificado por estadio funcional de Hoehn y Yahr:

- \*9 pacientes presentaron el estadio clínico 1 (con temblor de reposo unilateral)
- \*14 presentaron el estadio 2 ( con temblor bilateral)
- \*13 el estadio 3 ( con pérdida de los reflejos posturales)

En el grupo tratado con L-DOPA también encontramos pacientes en los estadios 1,2 y 3 (2, 8 y 7 casos respectivamente). Los promedios y EE de la escala UPDRS figuran en la tabla 2. La prueba de igualdad de varianzas de Levene con  $p = 0.57$  para la UPDRS,  $p = 0.41$  para la actividad diaria y  $p = 0.69$  para la escala motora, nos permitió comparar los promedios con la prueba paramétrica t de Student. No hubo diferencia significativa para ninguna de las 3 variables. La correlación de Pearson entre estas 3 variables resultó cerca del +1 lo que implica una  $p < 0.0001$ . La correlación de estas variables clínicas con el tiempo de evolución de la enfermedad también fue significativa. Se representan los resultados en la siguiente matriz :

- - Correlation Coefficients - -

	EVOLUCI	DAYLACT	HYYS	MOTORSS	UPDRS
EVOLUCI	1.0000 ( 82) P= .	.7232 ( 82) P= .000	.7342 ( 82) P= .000	.5014 ( 53) P= .000	.5231 ( 53) P= .000
DAYLACT	.7232 ( 82) P= .000	1.0000 ( 82) P= .	.9468 ( 82) P= .000	.8666 ( 53) P= .000	.9188 ( 53) P= .000
HYYS	.7342 ( 82) P= .000	.9468 ( 82) P= .000	1.0000 ( 82) P= .	.8421 ( 53) P= .000	.8252 ( 53) P= .000
MOTORSS	.5014 ( 53) P= .000	.8666 ( 53) P= .000	.8421 ( 53) P= .000	1.0000 ( 53) P= .	.9392 ( 53) P= .000
UPDRS	.5231 ( 53) P= .000	.9188 ( 53) P= .000	.8252 ( 53) P= .000	.9392 ( 53) P= .000	1.0000 ( 53) P= .

(Coefficient / (Cases) / 2-tailed Significance)

Matriz de correlación de Pearson : EVOLUCI: tiempo de evolución del Parkinson, DAYLACT: actividad diaria en la UPDRS, MOTORSS: puntaje en la subescala motora de la UPDRS, HYYS: puntaje en la escala de Hoehn y Yahr,

**a) Análisis del cobre total y de la actividad ferroxidasa de la CP**

La actividad ferro-oxidasa de la ceruloplasmina en el grupo control tuvo un promedio de 0.78 (EE=0.07) lo que corresponde a 0.026 unidades d Fe(III). En el grupo de Parkinson no tratado el promedio fue de 0.45 (EE=0.03) ó 0.015 unidades de Fe(III) (EE=0.002) (Fig.6). En todos los casos, la CP no mostró una distribución normal (Fig 4), por lo que se aplicó una prueba estadística no paramétrica , la U de Mann-Whitney para comparar casos y controles. La diferencia fue significativa con  $p < 0.001$ . El grupo 3 (tratado con LD) no mostró diferencia significativa con los controles (tabla 3). El análisis comparativo de los 3 grupos mediante pruebas no paramétricas a saber de Kruskal-Wallis :

--- Kruskal-Wallis 1-Way Anova

Mean Rank	Cases		Chi-Square	D.F.	Significance
50.98	27	CASO = 0 = Controles			
27.23	35	CASO = 1 = Parkinson no tratado			
44.90	15	CASO = 2 = Parkinson tratado con LD			
	77	TOTAL			
Chi-Square	D.F.	Significance	Chi-Square	D.F.	Significance
18.4775	2	.0001	18.4787	2	.0001

Posteriormente mediante un análisis ROC, se buscó un punto de corte entre las curvas de distribución de la actividad ferroxidasa de la CP encontrándolo a .44 unidades de absorbancia (ó 0.013 unidades de Fe(III)). Efectivamente tomando como variables cerulo  $<0.44=1$  y  $>0.44=0$  y caso(0,1) se realizó una prueba  $X^2$  pareada de McMenar que resultó como el coeficiente de correlación altamente significativa, es decir que las dos variables no son diferentes.:

Chi-Square	D.F.	Significance
15.2105	1	.0001

Encontramos correlaciones significativas entre la variable cerulo y

- el tiempo de evolución del Parkinson (n=77, coeficiente de Spearman = -0.287, p=0.006)
- el estadio Hoehn y Yahr (n=77 coeficiente de Spearman = -0.32, p=0.002)
- la proteinorraquia (n=49 coeficiente de Spearman = 0.28, p=0.033)

El cobre total medido en LCR fue de 4.65  $\mu\text{g/L}$  ( $\pm 2.76$  DS) en los controles, 5.0389 ( $\pm 3.89$ ) en el grupo no tratado y 4.2071 ( $\pm 3.12$ ) en el grupo tratado, lo que no representó diferencia significativa entre los grupos.

Con el fin de establecer una relación entre el Cu total y la actividad ferroxidasa de la CP, se calculó un cociente que refleja de manera indirecta la fracción libre de cobre en el LCR :

Cu total/ ferroxidasa CP. Este cociente de cobre libre se encuentra efectivamente aumentado en el grupo Parkinson no tratado (tabla 3, fig.7) aunque con poca significancia estadística (p=.0561 con prueba de Mann-Whitney).

Finalmente encontramos en este grupo una correlación significativa entre el estadio de Hoehn y Yahr y el cociente de cobre libre ( coeficiente de Spearman = 0.25, p=0.027)

En un análisis de regresión múltiple tomando como variable dependiente LOGCER a saber el logaritmo de la actividad ferroxidasa de la CP y como variables dependientes el set de variables clínicas obtuvimos alta significancia del modelo por alto impacto de las variables tabaquismo y actividad motora sobre la actividad ferroxidasa:

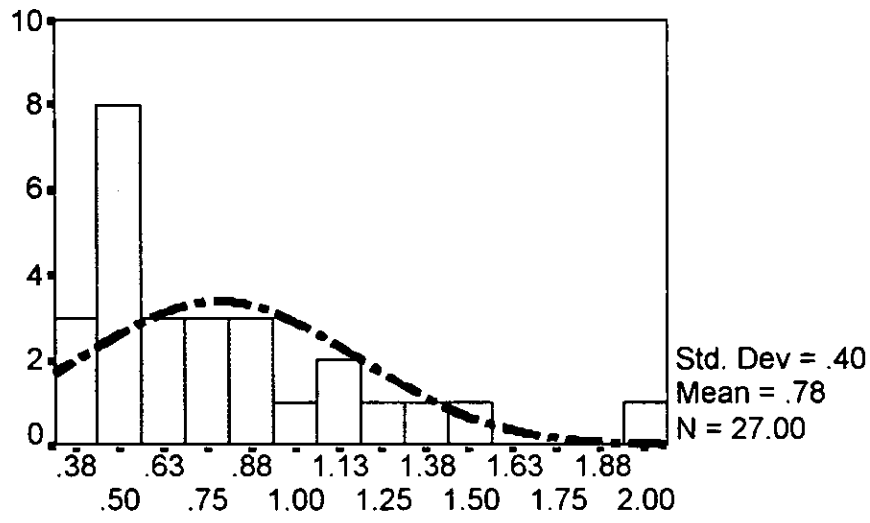
Dependent Variable..		LOGCER			
Block Number	1.	Method: Enter			
TABACRURAL EVOLUCI		HYYS DAYLACT MOTORSS			
Variable(s) Entered on Step Number					
1..	MOTORSS	: subescala motora de la UPDRS			
2..	RURAL				
3..	TABAC				
4..	EVOLUCI				
5..	HYYS				
6..	DAYLACT	: actividad diaria			
Multiple R	.62088				
R Square	.38549				
Adjusted R Square	.29975				
Standard Error	.17091				
Analysis of Variance					
	DF	Sum of Squares	Mean Square		
Regression	6	.78797	.13133		
Residual	43	1.25609	.02921		
F = 4.49583		Signif F = .0013			
----- Variables in the Equation -----					
Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
TABAC	.363744	.091783	.488059	3.963	.0003
RURAL	.001329	.051426	.003245	.026	.9795
EVOLUCI	.007647	.007457	.147748	1.025	.3109
HYYS	.106687	.067560	.399903	1.579	.1216
DAYLACT	.005906	.007146	.221567	.826	.4131
MOTORSS	-.016119	.006241	-.739125	-2.583	.0133
(Constant)	-.260568	.089311		-2.918	.0056

VARIABLES	CONTROLES n=26	CASOS no Tr. n=35	Gr.tratado n=14	p
Cobre total µg/L	4.65 (0.5)	5.04 (0.66)	4.2 (0.8)	NS
Actividad Ferroxidasa de la CP (absorbancia)	.7864 (0.07)	.454 (0.03)*	.73 (0.1)	.0000
Cociente de cobre libre (Cu/FOx)	7.25 (1.0)	11.64 (1.48)*	8.42 (2.6)	.0561

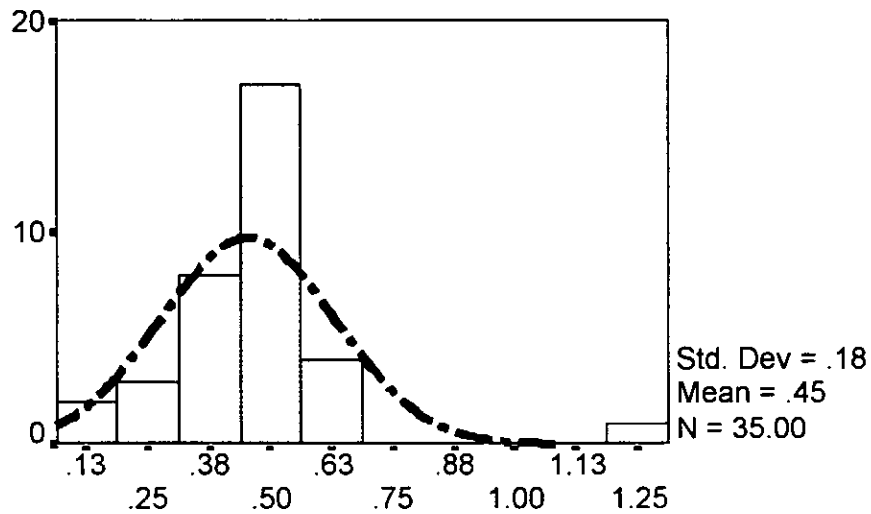
\* Prueba U de Mann Whitney

VARIABLES	CONTROLES	CASOS no tratados	Gr-Tratado con L-Dopa	p (KW-ANOVA)
Proteínas totales	n=18 41.72 (± 4 EE)	n=19 36.6 (2.3)	n=12 44 (5)	NS
actividad SOD	n= 23 25 (5)	n=26 18 (3)	n=14 41(7)	0.039 ***

**Tabla 3:** VARIABLES BIOLÓGICAS. Promedios y errores estándar así como la significancia de la diferencia entre los grupos.

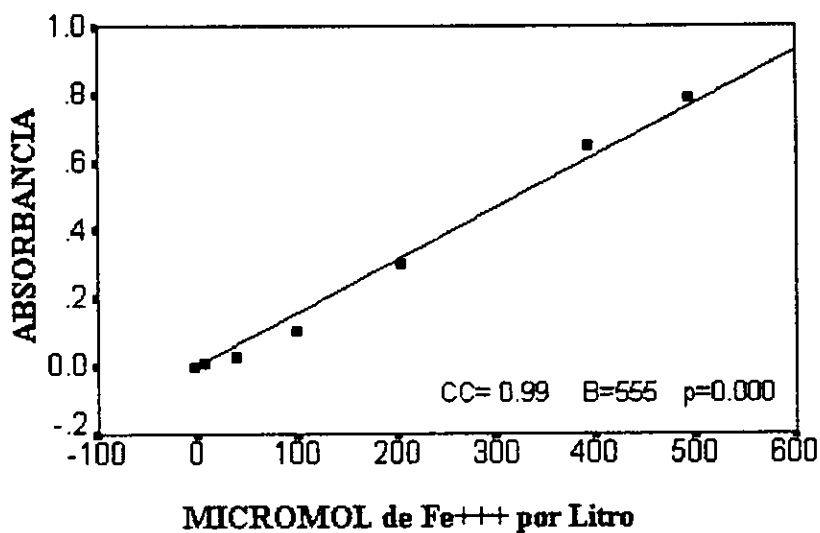


CERCONTR



CERCASO

**Fig.4: Histograma con curva de distribución de la variable actividad enzimática de la ceruloplasmina en controles (CERCONTR) y en Parkinson no tratado (CERCASO)**

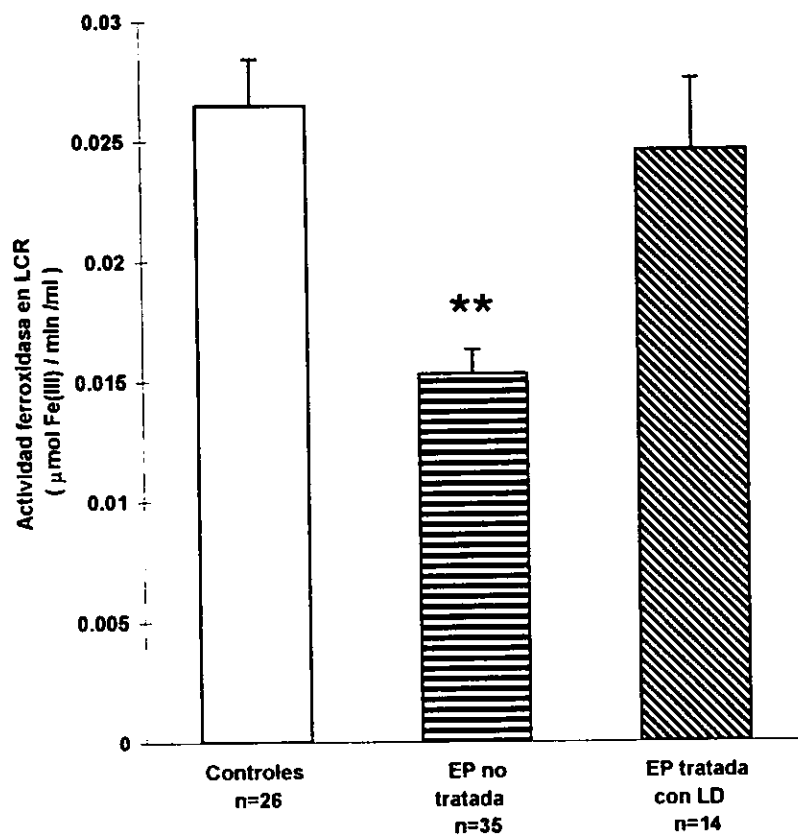


**Fig.5: Curva de unidades de absorbancia en función de la concentración en Fe+++ producida en presencia de CP.**

CC = coeficiente de correlación de Pearson

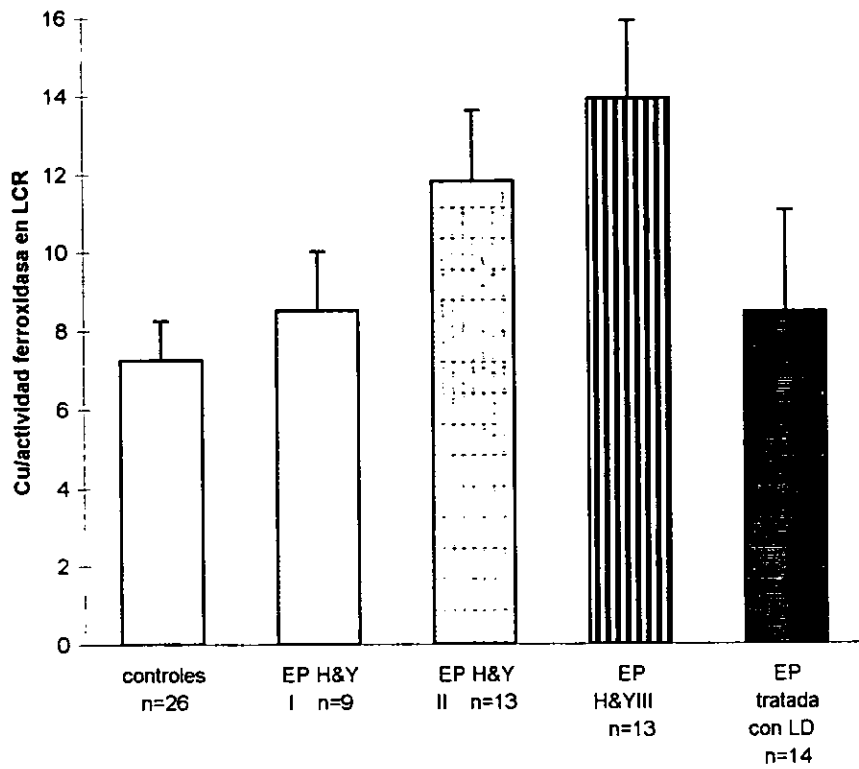
B = la pendiente de  $Y=BX$





**Fig.6: Actividad enzimática de la ceruloplasmina en los 3 grupos de pacientes**

**\*\***  $p < 0.001$  en la prueba de M-W comparativa con los controles.



**Fig.7: Cociente de cobre libre** calculado como la relación entre el cobre total y la actividad ferroxidasa de la CP. En la gráfica se representan los promedios y EE en los grupos: controles, Parkinson no tratado Hoehn y Yahr I, II, y III y el grupo tratado con L-DOPA.

### b) Actividad de la Superoxido-dismutasa en el LCR

Se estandarizó la técnica de medición de la actividad superoxido-dismutasa para LCR según la descripción de Misra y Fridovich (1971) y la aplicamos a los grupos Control, Parkinson idiopático no tratado y Parkinson tratado con LD, esperando encontrar una diferencia significativa entre grupos.

Para la medición de la actividad SOD de los LCR se encontró el problema de que muchos líquidos anteriormente descongelados revelaban una actividad reducida en relación con la actividad SOD de muestras no descongeladas por lo que decidimos estudiar únicamente a los alíquotas que no habían sido previamente manipuladas.

Del grupo control CASO 0, n=29 pacientes se analizaron 23 muestras

del grupo de casos sin levodopa CASO 1, n=36, se analizaron 26 muestras

de los casos tratados con levodopa CASO 2, n=17 se analizaron 14 muestras.

El porcentaje de inhibición (de la autoxidación de la epinefrina) al minuto fue la variable más consistente, ya que después del minuto, la actividad de la enzima se vuelve errática. Presentamos el resultado del análisis de esta variable en los 3 grupos de pacientes en la tabla 3, la figura 7 y finalmente en la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis:

#### \*\*\* ANALYSIS OF VARIANCE \*\*\*

Dependent Variable PCINHIB1 (porcentaje de inhibición al minuto)					
by CASO (0,1,2)					
Value	Label	Mean	Std Dev	Sum of Sq	Cases
0		.24652	.24269	1.29572	23
1		.17615	.19115	.91342	26
2		.40357	.29237	1.11127	14
Within Groups Total		.25238	.23524	3.32041	63
Source	SSquares	d.f.	MSquare	F	Sig.
Between Groups	.4719	2	.2359	4.2635	.0186
Within Groups	3.3204	60	.0553		

Eta = .3527    Eta Squared = .1244

----- Kruskal-Wallis	1-Way Anova
Mean Rank	Cases
31.57	23 CASO = 0
26.90	26 CASO = 1
42.18	14 CASO = 2

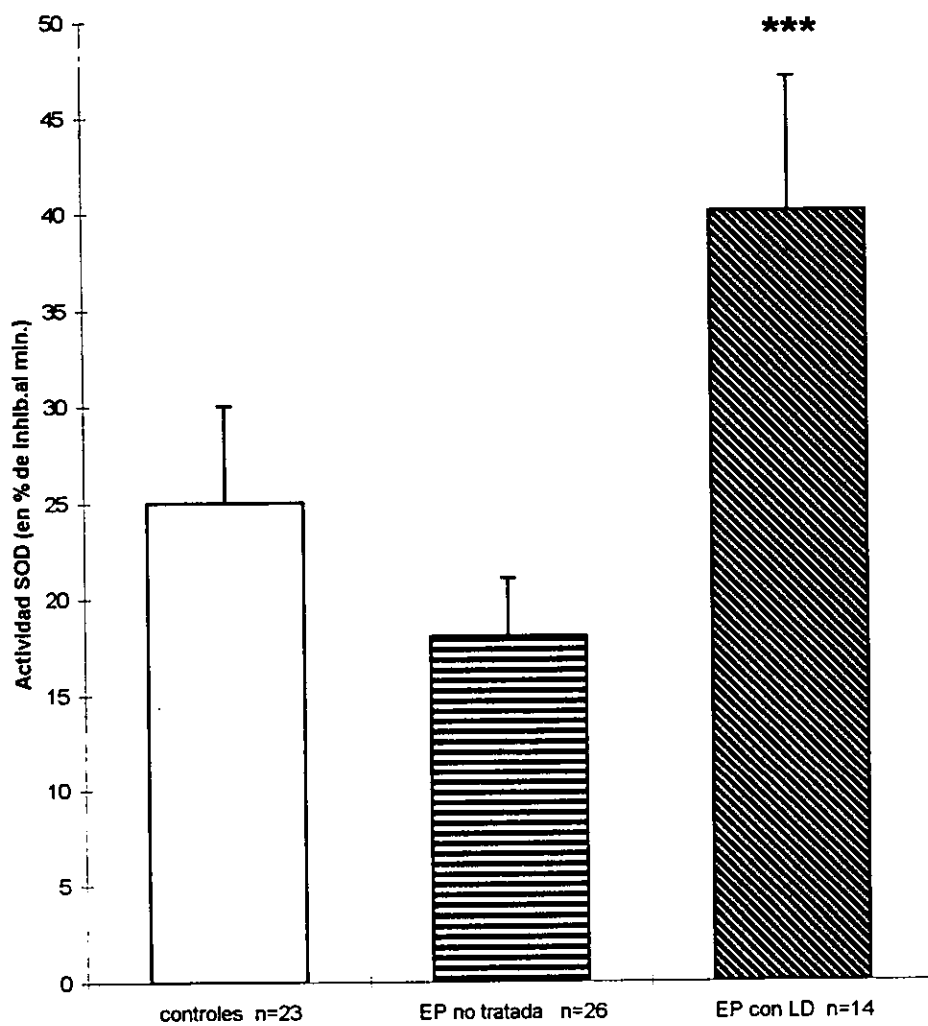
Chi-Square	D.F.	Significance
6.4506	2	.0397

La actividad SOD se encuentra reducida en el LCR en la enfermedad de Parkinson no tratada con levodopa. No encontramos una diferencia significancia en análisis bivariado. (p=0.07)

El análisis de varianza tomando en cuenta también al grupo tratado con levodopa revela una prueba de K-W con p= 0.039.

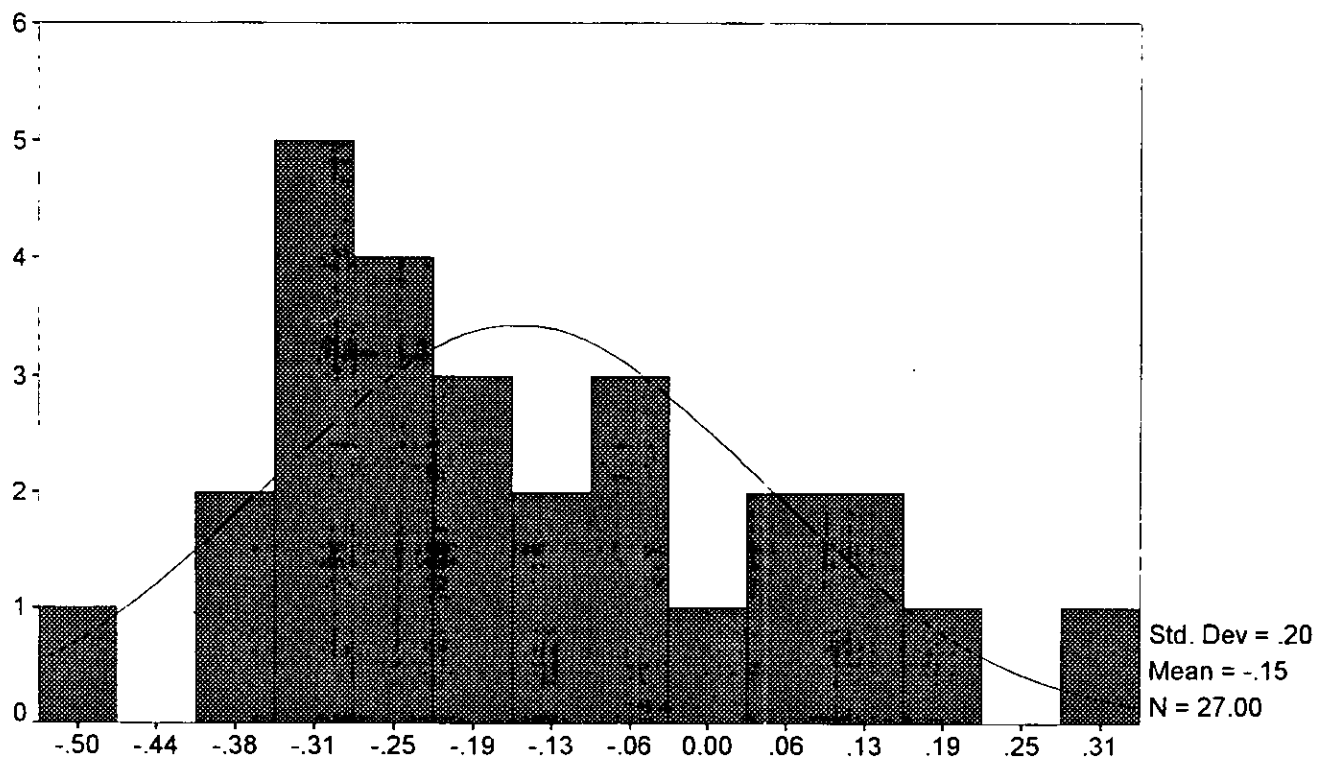
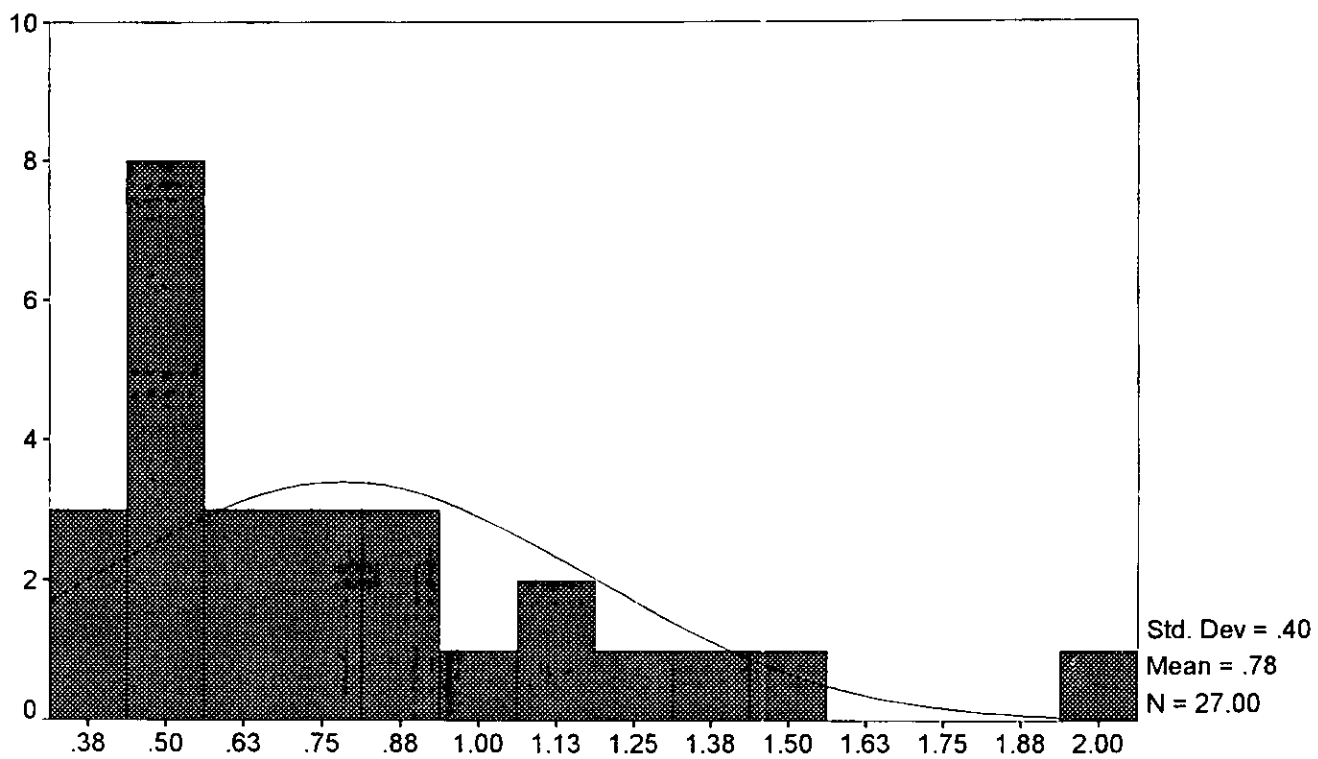
Se encontraron correlaciones clínico-biológicas significativas entre la actividad SOD\* y el puntaje de la subescala motora de la UPDRS en los casos con Parkinson no tratado así como entre la relación actividad SOD/proteinorraquia y la subescala motora en el mismo grupo de pacientes:

PCINHIB1*	-0.5058	PCINHIB1/PROT	-0.4546
	(n=26)		(n=26)
	p= .011		p= .017
	MOTORSS		MOTORSS

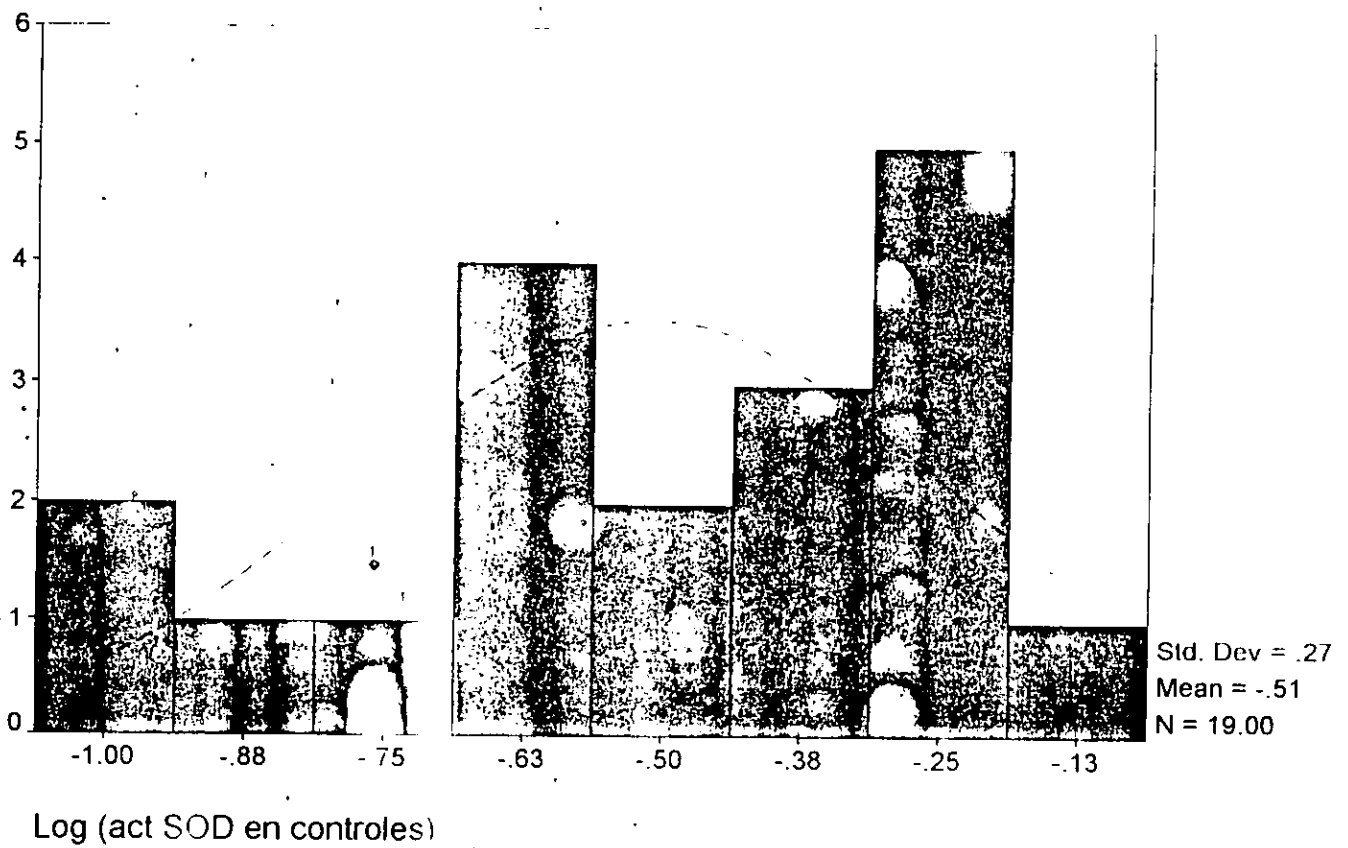
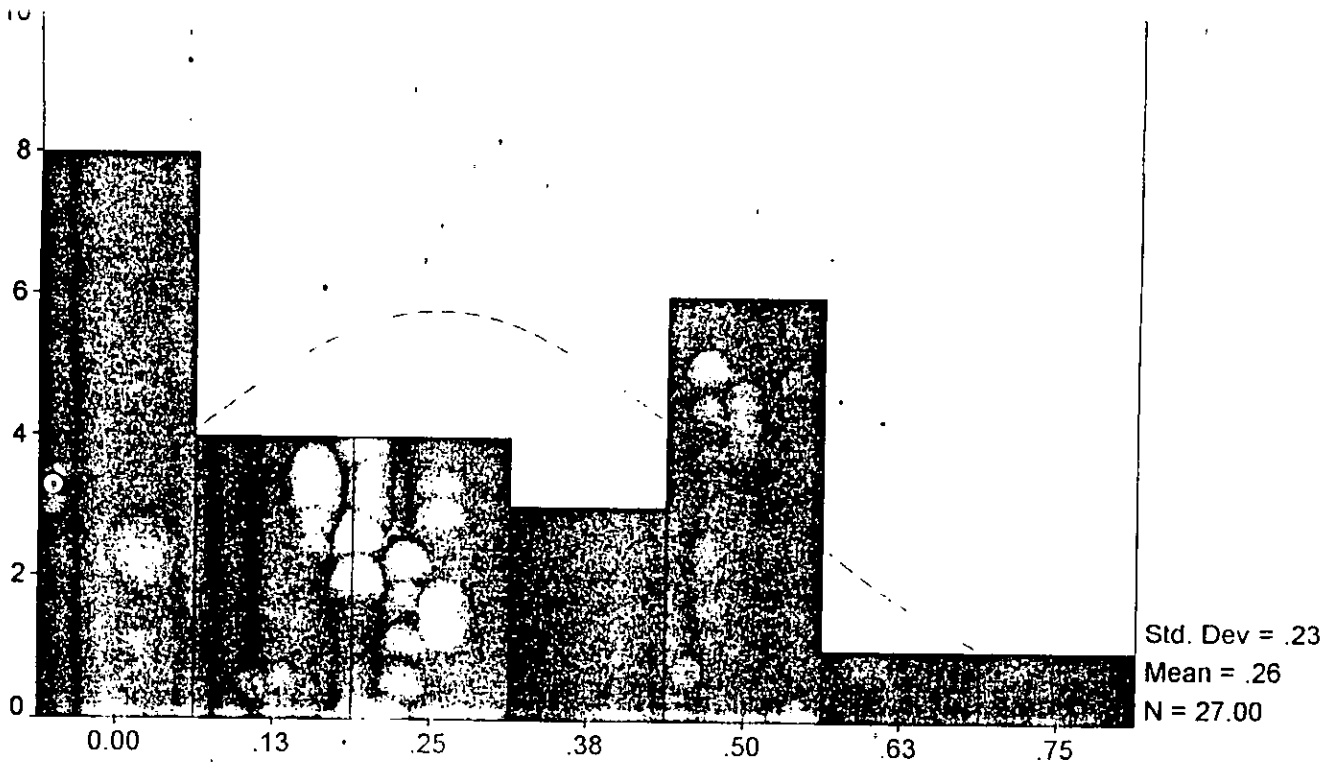


**Fig.8: Actividad de la SOD en el LCR de los 3 grupos:**  
 Representación de los promedios y EE en controles, Parkinson no tratado y grupo tratado con L-DOPA

\*\*\* p=0.039 KW-ANOVA



**Fig.9: Transformación logarítmica de la variable actividad CP en controles el histograma de abajo muestra la normalización de la distribución**



**Fig.10: Histograma con curva de distribución de la variable "actividad promedio de SOD" en controles. En el histograma de abajo se representa la transformación logarítmica para normalizar la distribución.**

En regresión logística tomando como variable dependiente el Dx de caso no tratado (1) ó de control (0) y el set de variables biológicas se estableció un modelo con ajuste significativo del cobre y la actividad ferroxidasa en el LCR.

Dependent Variable.. CASO  
 Beginning Block Number 0.  
 Initial Log Likelihood Function  
 -2 Log Likelihood 40.168047

\* Constant is included in the model.  
 Beginning Block Number 1. Method: Enter

Variable(s) Entered on Step Number  
 1.. CERULO  
     CUTOTAL Cobre total en LCR  
     INDIC Cu total/ ceruloplasmina  
     PCINHIB1 act SOD  
     PROTRRAQ

-2 Log Likelihood 22.617  
 Goodness of Fit 20.636

	Chi-Square	df	Significance
Model Chi-Square	17.551	5	.0036
Improvement	17.551	5	.0036

Classification Table for CASO

Observed	Predicted		Percent Correct
	0	1	
0	11	3	78.57%
1	3	12	80.00%
Overall			79.31%

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
CERULO	-61.9665	27.7281	4.9943	1	.0254	-.2730	.0000
CUTOTAL	6.9186	3.2580	4.5096	1	.0337	.2500	1010.950
INDIC	-3.2570	1.5348	4.5032	1	.0338	-.2496	.0385
PCINHIB1	3.1504	3.2334	.9493	1	.3299	.0000	23.3465
PROTRRAQ	-.0895	.0555	2.6058	1	.1065	-.1228	.9144
Constant	32.7751	14.0375	5.4514	1	.0196		

El coeficiente B representa en impacto de la variable sobre el diagnóstico de caso o de control. El índice de Wald es equivalente a una X<sup>2</sup> con un grado de libertad (df), R el ajuste



de la variable y el exponencial de R, la razón de momios ó *odds ratio* . Una actividad de la CP reducida y el cobre total elevado son las variables que más se ajustan al diagnóstico de enf. de Parkinson no tratada en este modelo de regresión logística.

**c) Medición de la concentración de MT por técnica de saturación de plata:**

El estudio piloto con 5 muestras analizadas 3 veces mostró un rango de plata de 0.001 a 1.2µg/L y un coeficiente de variación muy elevado. Los resultados se reportaron en varias ocasiones fuera del rango de calibración aunque la curva de plata se realizó con concentraciones muy bajas de AgNO<sub>3</sub> 25, 50, 100, 200 y 400 ppb (partes por billón) Concluimos que esta técnica no tiene la sensibilidad suficiente para detectar la proteína en LCR.

Se adaptó una técnica de HPLC recientemente descrita por Ait Oukhatar (1996), en breve: se prepararon 2 fases: A: metanol puro sonicado y B: un buffer de fosfato de potasio a 6.8 g/L. Mediante un cromatógrafo equipado con sistema de liberación de solvente y detector UV monitoreado a 254nm, una columna macrosphere C-18 5U, se realizó la elución con los siguientes parámetros: flujo: 1.2ml/min; tiempo de corrida 12 min; inicialmente con porcentaje de solución A: 5%, hasta 23% a los 12 min. Tiempo de lavado con sol. A 100%: 5min.

Se inyectaron sucesivamente 3 soluciones estándar de MT-I Sigma con mercaptoetanol 5mM como antioxidante.

Obtuvimos un pico a 4.61min con las 3 diluciones 6.25, 12.5 y 25 µg/ml. Los resultados están representados en la figura 11.

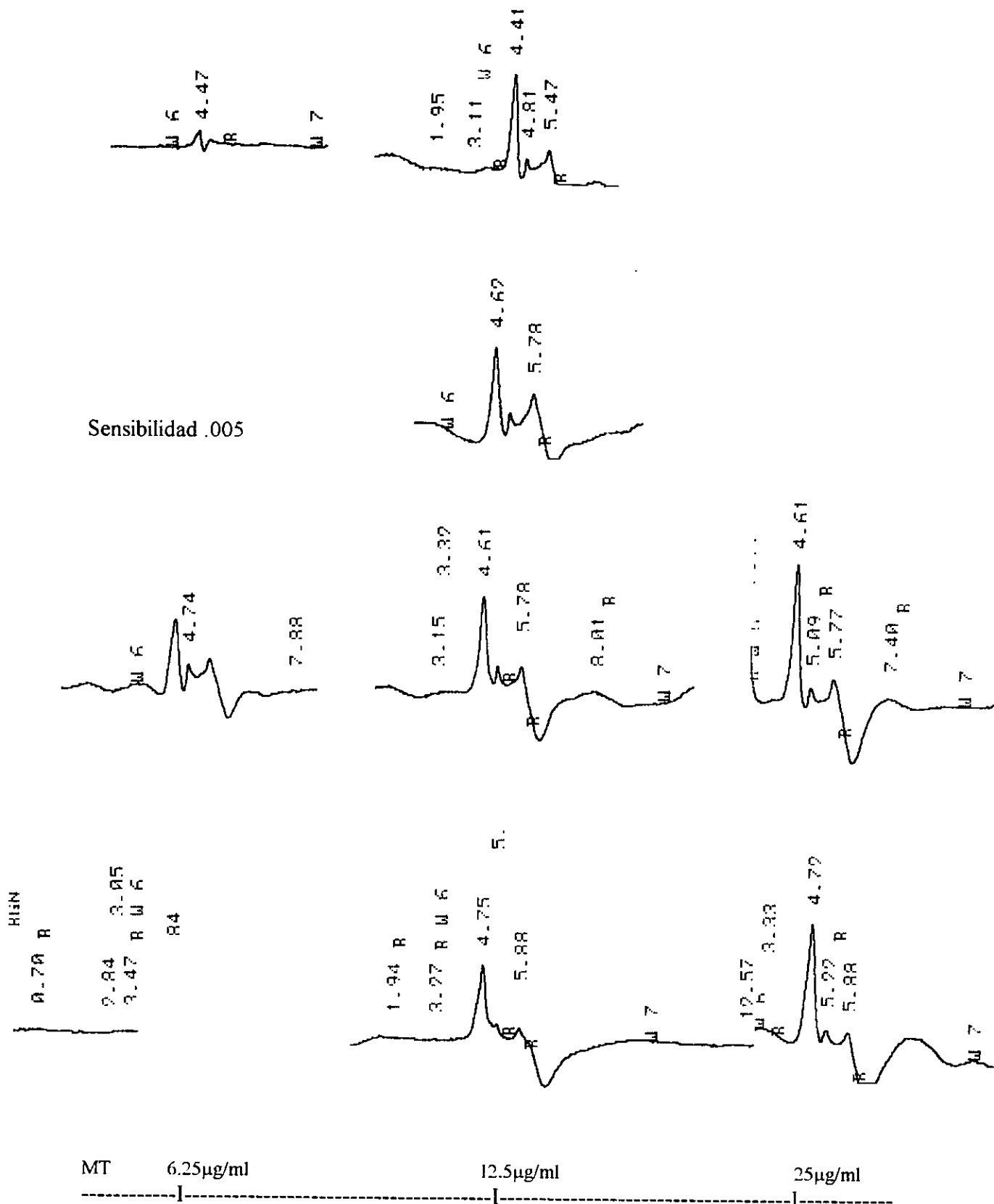


Fig.11: Cromatogramas típicos con 3 distintas concentraciones de un estándar de metalotioneina I (Sigma)

## DISCUSION.

La actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina en LCR está significativamente reducida ( 40%) en la enfermedad de Parkinson no tratada con L-DOPA, lo que da una explicación posible de los depósitos excesivos de hierro encontrados en la *substantia nigra* de los pacientes con Parkinson, ya que la forma ferrica Fe(III) producida en presencia de CP es la forma movilsable. La baja concentración en cobre tisular en estas áreas se puede relacionar con la falta de retención por la ceruloplasmina. Se ha descubierto recientemente que la síntesis de CP también se induce en el SNC (Harris 1995, Patel 1997).

Tanto el cobre total como la fracción ionizada (de bajo peso molecular) ha sido reportada elevada en el LCR de parkinsonianos no tratados con levodopa ( Pall 1987) lo que podría explicarse por la disminución de la capacidad de las metaloproteinas para fijar el metal. En nuestro estudio, la concentración de cobre total en el LCR se encontró discretamente elevada en la Parkinson no tratado, mientras que la relación Cu/ferroxidase se correlacionó significativamente con la progresión de la enfermedad, lo que sugiere un aumento de la concentración de cobre no fijado a la ceruloplasmina en el LCR de los enfermos con Parkinson no tratado con L-DOPA.

En presencia de L-DOPA, los iones de cobre forman complejos con la catecolamina, que aceleran la captación del metal por la neurona (Sotomatsu 1990, Hartmann 1992, Bonnet 1994, Crowe 1996). Esto podría explicar el restablecimiento de valores normales del cociente de cobre ionizado en el LCR de los parkinsonianos tratados con este fármaco así como quizás, el mantenimiento de los procesos oxidativos asociados con el catabolismo de la dopamina.

Encontramos una reducción de la actividad ferroxidasa en el LCR desde los estadios más precoces de la enfermedad (H&Y I) . Esto sugiere que el defecto existe antes de la revelación clínica de la enfermedad y podría estar relacionado con el desarrollo del Parkinson. Loeffler *et al.* (1996) reportaron un aumento de la concentración de CP en algunas regiones cerebrales de Parkinson *post mortem*. Este aumento puede ser

consecuencia del tratamiento substitutivo de los sujetos ya que la mayoría de ellos estaban manejados con levodopa.

La actividad SOD, ó actividad de otra proteina protectora contra el daño oxidativo, se midió por la técnica de autoxidación de la adrenalina. Esta actividad enzimática se halló ligeramente reducida en el LCR en la enfermedad no tratada ( $p=0.07$ ) mientras se eleva significativamente en aquellos tratados con levodopa.

Se sabe que el daño protéico y al DNA es, como la peroxidación lipídica, una consecuencia del estrés oxidativo (Jenner 1996). La deficiencia enzimática puede ser originada a nivel transcripcional ó, como el déficit en complejo I mitocondrial, ser consecuencia del daño ocasionado en membranas (mitocondriales, retículo endotelial etc..) y específicamente de la sustancia negra.

¿Que pasa en presencia de levodopa? El metabolismo en dopamina y sus subsecuentes transformaciones enzimáticas y autoxidaciones (Fig.2 y3) son potenciales promotores del estrés oxidante que pueden llevar al daño neuronal nigral. La levodopa es tóxica en cultivos neuronales y, en sinergia con hierro (y cobre), contribuye a la muerte neuronal dopaminérgica. También reduce por si misma, la actividad del complejo I mitocondrial in vitro (Przedborski 1993).

El importante aumento de la actividad SOD en el grupo tratado con levodopa ( no reportado anteriormente) se puede explicar por los siguientes mecanismos posibles: inducción de la síntesis de la enzima por estrés oxidante mayor, mayor avance de la enfermedad, mayor metabolismo energético en las células restantes, aumento de la producción de RLO por oxidación de las catecolaminas especialmente de la dopamina.

En el caso de la metalotioneina, la técnica de saturación con plata no tuvo la sensibilidad suficiente para usarla en la medición de concentración de MT en el LCR, por lo que decidimos iniciar la estandarización de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución ( HPLC ) para estudios futuros (Ait Ukatar 1997). (Fig.11)

En cuanto a las dos otras cuproproteínas, especialmente la CP, tienen - como se sospechó al formular la hipótesis - una actividad reducida en LCR de enfermedad de Parkinson idiopática no tratada y se relacionan con la gravedad clínica, por lo que estas mediciones podrían ser indicadoras de mal pronóstico cuando están reducidas . Las escalas funcionales de la enfermedad de Parkinson a saber la clasificación de Hoehn & Yahr y la UPDRS se utilizan mundialmente y han sido validadas por diferentes equipos, es decir que se han demostrado su consistencia, exactitud, precisión y reproducibilidad . (Feinstein, 1983)

Estudios futuros nos permitirán determinar si un constructo con las variables biológicas, un rango especial ó un punto de corte nos ayude a diseñar una prueba pronóstica o diagnóstica tomando en cuenta que se requeriría una técnica automatizada para evitar la variabilidad intra (de un día al otro) e interobservador. También habrá que considerar que las proteínas son fácilmente inducibles, es decir poco específicas, por lo que habrá que establecer claramente la lista de criterios y de confusores que controlar en estudios futuros.

Nuestros resultados nos llevan igualmente a aplicar estas mediciones en otras formas de patología neurodegenerativa .

El hecho de que dos cuproproteínas presenten disminución en su actividad enzimática sugiere que la enfermedad de Parkinson cursa con un déficit de la cantidad de cobre unido a sus proteínas. Estos hallazgos contribuyen a sustentar un ensayo clínico controlado con inductores de dichas proteínas (ver tabla 1) en los pacientes con Parkinson desde los estadios más precoces de la enfermedad.

## CONCLUSIONES.

- Este trabajo pone en evidencia una reducción del 40% de la actividad ferroxidasa en el LCR de pacientes con Parkinson idiopático no tratado con L-DOPA, desde los estadios más precoces de la enfermedad. La mayor proporción de esta actividad se lleva a cabo por acción de la ceruloplasmina del SNC.
- El cobre total se encuentra elevado de manera no significativa en nuestra serie de enfermos con Parkinson no tratado.
- El cociente de cobre libre está elevado en este grupo de Parkinson no tratado comparado con los controles y de manera proporcional a la gravedad clínica de la enfermedad.
- El tratamiento con L-DOPA de los pacientes con Parkinson aumenta la actividad ferroxidasa hasta niveles parecidos a los controles.
- En la enfermedad de Parkinson no tratada existe una disminución de la proteinorraquia total que no es estadísticamente significativa en nuestra serie.
- El aumento de la proteinorraquia total en el grupo tratado con L-DOPA también resultó no significativo.
- En un modelo de regresión múltiple tomando la actividad ferroxidasa como variable dependiente, se Ajustan con alta significancia estadística las variables independientes: tabaquismo positivo y el resultado de la valoración motora.
- En un modelo de regresión logística tomando como variables dependiente el diagnóstico de caso ( no tratado con L-DOPA) o control, se ajustan todas las variables biológicas que hemos medido en el LCR con mayor impacto de la actividad ferroxidasa, del cobre total y de la proteinorraquia total.
- La actividad de otra enzima protectora contra radicales libres, la SOD, está reducida en el LCR del grupo con Parkinson idiopático no tratado, mostrando una correlación significativa con el estadio de gravedad clínica de la enfermedad.

- En los pacientes bajo tratamiento con L-DOPA la actividad SOD aumenta significativamente con el avance clínico del Parkinson.
- La técnica de saturación de plata usada para medir la concentración de metalotioneina en estudios experimentales no tiene la sensibilidad suficiente para ser aplicada en el LCR de nuestros pacientes.

## **ANEXOS:**

- 1.- Indice de abreviaciones
- 2.- Carta de consentimiento informado
- 3.- Escala de Hoehn y Yahr
- 4.- Escala funcional UPDRS
- 5.- Video-grabaciones de referencia



## INDICE DE ABREVIACIONES

- aa	amino ácido
- BH	biometría hemática
- CA 3	cuerno de Ammon campo3
- CP	ceruloplasmina
- COX	citocromo-oxidasa
- Cu <sup>+</sup> o Cu I	cobre cuproso (ionizado)
- Cu <sup>++</sup> o Cu II	cobre cúprico (ionizado)
- DA	dopamina
- DE	desviación estándar
- EE	error estándar del promedio
- EGO	examen general de orinas
- Fe	hierro
- IRM	imágenes de resonancia magnética
- K-W	prueba de Kruskal-Wallis
- LCR	liquido cefalo- raquideo
- L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina ó levodopa
- MTPT	droga metil- fenil- tetrahidropiridina
- MAO	monoamina oxidasa
- MT	metalotioneina
- M-W	prueba U de Mann-Whitney
- nm	nanometro
- NMDA	N-Metil-D-Aspartato
- PH	perfil hepático
- PL	punción lumbar
- ppb	partes por billón

- QS química sanguínea
- Rc receptor
- RIA radio inmuno análisis
- RLO radicales libres de oxígeno
- SOD superóxido dismutasa
- Zn zinc

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROQUIRURGIA

NOTAS

Numero

Fecha

Estamos realizando un estudio de COBRE y GURROPROTEINAS

pacientes que (canaprotin) y utilizan el cobre en el organismo humano) en pacientes con enfermedad de Parkinson y comparando nuestros resultados con los de pacientes que NO PADECEN DE ENFERMEDAD NEURODEGENERATIVAS con el fin de definir el papel de dichas sustancias y probar un nuevo tratamiento.

El proyecto ha sido APROBADO POR:

- EL COMITE DE INVESTIGACION DEL INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROQUIRURGIA M.V.S.

- EL COMITE DE ETICA

- EL COMITE DE INVESTIGACION DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION S.Z.

- LA U.N.A.M.

- EL JEFE DE LA CLINICA DE PARKINSON DEL I.N.N.N.

- EL JEFE DE LA CONSULTA EXTERNA DEL MISMO INSTITUTO

- LA DIRECCION DEL INNM M.V.S.

Los pacientes que aceptan entrar en estudio serán sometidos a una analisis de sangre, una punción lumbar, una encuesta nutricional de metales y una consulta neurológica. Las citas se daran segun las posibilidades de cada paciente en un intervalo de 15 dias.



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROQUIRURGIA  
MANUEL VELASCO SUAREZ

MSUNGMES SUR 100 217  
C.P. 14200 TEL. 505-2072

Fecha

IDENTIFICACION

PARA LA REALIZACION DE LA PRUEBA (VERBA DENTRO DEL CUADRO DEL ESTUDIO DEL COBRE Y GURROPROTEINAS EN EL PARKINSON

El que suscribe (nombre)

(apellidos)

HE LEIDO ESTA FORMA Y ENTENDIDO LOS FINES DEL TITULAR DE INVESTIGACIONES MEXICANAS Y ACEPTO ESTAR EN PROTECCION. LO QUE IMPLICA SER SOMETIDO A:

(numero 1, 2) \_\_\_\_\_ prueba (es) (admites)

\_\_\_\_\_ analisis de sangre (especificar)

\_\_\_\_\_ analisis de orinas

\_\_\_\_\_ Consultas

FIRMA \_\_\_\_\_ NOMBRE Y FIRMA \_\_\_\_\_ MEDICO  
DEL PACIENTE: del familiar: testigo: que hace la solicitud:

firmas

# **Grado de incapacidad clínica del Parkinson primario Estadios I-V según Hoehn y Yahr (1967)**

**Estadio I:** Manifestaciones unilaterales, generalmente con poca o ninguna incapacidad.

Duración: promedio 3 años ( $\pm$  7DE)

**Estadio II:** Manifestaciones bilaterales o de línea media sin trastorno del equilibrio.

Duración: 6 años ( $\pm$  6.9)

**Estadio III:** El primer signo es la disminución de los reflejos posturales. Se observa inestabilidad cuando el paciente se da la vuelta o cuando es empujado en posición de pie, con los pies juntos y los ojos cerrados. El paciente tiene cierto impedimento funcional pero puede vivir independiente.

Duración: 7 años ( $\pm$  6.3)

**Estadio IV:** Enfermedad plenamente manifestada, muy incapacitante. El paciente puede todavía levantarse y caminar pero con mucha dificultad.

Duración: 9 años ( $\pm$  7.2)

**Estadio V:** Confinado a silla de ruedas o cama.

Duración: 14 años ( $\pm$  3.4)

(N=183 pacientes)

ESCALA UNIFICADA PARA LA ENFERMEDAD DE PARKINSON  
(UPDRS)

**Instrucciones:**

Esta escala está diseñada para registrar la información acerca de los síntomas del paciente y su funcionamiento. Con excepción del examen motor, las tareas se califican de acuerdo a la información disponible para el examinador, basados tanto en la observación clínica como en lo referido por el paciente, en la semana anterior inmediata. El examen motor deberá ser calificado de acuerdo al estado del paciente en el momento de la consulta. Es conveniente anotar el tiempo transcurrido desde la última dosis de cualquier medicamento antiparkinsoniano.

*1. Examen motor, conducta y talante*

	0	1	2	3	4
1. Trastorno intelectual	ninguno	leve, alteraciones de la memoria con recolección parcial de eventos	alteración de la memoria con desorientación y poca dificultad para manejar problemas complejos, funciona en casa con ayuda ocasional.	gran alteración de la memoria con desorientación para tiempo y a menudo de lugar, gran alteración para resolver problemas, requiere mucha ayuda para su cuidado personal, no puede permanecer solo.	grán pérdida de la memoria con orientación solo para persona, incapaz de efectuar juicios o resolver problemas
2. Alteraciones del pensamiento (debido a demencia o a intoxicación medicamentosa)	ninguna	ensoñaciones	alucinaciones "benignas" con retención de la introspección introspección puede interferir en las actividades diarias	alucinaciones de ocasionales a frecuentes o ilusiones sin	alucinaciones persistentes o psicosis florida
3. Depresión	ninguna	periodos de tristeza o culpa más frecuentes de lo normal, nunca más de un día	depresión sostenida (una semana o más) insomnio, anorexia, pérdida de peso y del interés	depresión sostenida con síntomas vegetativos o ideación o intento suicida	depresión sostenida con síntomas vegetativos

	0	1	2	3	4
4. Motivación e iniciativa	normal que en general más pasivo actividades electivas diarias	menos animado iniciativa o desinterés en actividades	pérdida de la iniciativa o desinterés en	pérdida de la plet de la motivación	pérdida com-
<b>II. Actividades de la vida diaria (determinación para on y off)</b>					
Se califican cada apartado para los periodos on y off por separado					
5. Lenguaje	normal	levemente afectado sin dificultad para ser entendido	moderadamente afectado, algunas veces se le pide que repita las oraciones	gran afección, frecuentemente se le pide que repita las oraciones	no se le entiende la mayor parte del tiempo
6. Salivación	normal	exceso de saliva en la boca, sobre todo en la noche	exceso de saliva en cantidad media con salida mínima	gran exceso de saliva con salida por la boca	requiere de pañuelo constanemente
7. Deglución	normal	se ahoga raramente	se ahoga ocasionalmente	requiere dieta blanda	requiere sonda nasogástrica o gastrostomía
8. Escritura	normal	lenta o pequeña se entienden todas las letras	lenta o pequeña son legibles	no todas las letras la mayoría de de las letras	no son legibles
9. Manejo de cubiertos	normal	lento y torpe no requiere ayuda alimentos, requiere alguna ayuda	puede cortar la mayoría de los puede alimentarse lentamente	la comida debe ser cortada por alguien	requiere ser alimentado
10. Vestido	normal	algo lento, no requiere ayuda	asistencia ocasional, con los botones y las mangas	requiere considerable ayuda, puede realizar algunas cosas solo	requiere ayuda total
11. Higiene	normal	algo lento, no requiere ayuda o es muy lento en su aseo personal	requiere ayuda para bañarse, lavarse, peinarse e ir al baño	requiere asistencia para bañarse,	requiere sonda de Foley y otras ayudas mecánicas

12. Movimiento al estar acostado	normal	algo lento y torpe, no requiere ayuda	puede voltearse en la cama solo y ajustar sus cobertores pero con gran dificultad	puede iniciar el movimiento pero no completarlo	requiere ayuda total
13. Caídas	no	raramente menos de una una al día	ocasionales una al día	en promedio al día	más de una
14. Parálisis en la marcha	no	tatamente	ocasional	frecuente	caídas frecuentes desde la parálisis
15. Marcha	normal	poca dificultad puede mover los brazos o tender a arrastrar los pies.	dificultad moderada, requiere poca ayuda.	gran dificultad requiere ayuda.	no puede caminar
16. Temblor	ausente	leve y no frecuente	moderado puede molestar al paciente.	severo, interfiere en muchas actividades	interfiere en la mayoría de las actividades.
17. Síntomas sensitivos relacionados al Parkinson	ninguno	ocasional, parestesia, disestesia y poco dolor.	frecuente parestesia y disestesia.	sensaciones dolorosas frecuentes.	dolor intolerable.

### III.- EXAMEN MOTOR

*Se califica a cada apartado en base al estado del paciente durante el examen, las visitas subsecuentes deben ser a la misma hora del día y con intervalos similares entre las dosis.*

18. Lengua je	normal	leve pérdida de la expresión, dicción o volumen.	aprosodia se entiende,	gran alteración con dificultad para ser entendido.	no se le entiende.
---------------	--------	--	------------------------	--	--------------------

	0	1	2	3	4
19.Expresión	normal	hipomimia minima	disminución de la expresión facial.	hipomimia moderada	fascies inexpresiva
20.Temblo r de reposo	ausente	leve y no frecuente.	moderado en amplitud y persistente o moderado en amplitud pero intermitente.	moderado en amplitud presente la mayor parte del tiempo.	gran amplitud presente la mayor parte del tiempo.
21.Temblo r de acción ó postural	ausente	leve, presente durante la acción.	moderado en amplitud se presenta durante acción	moderado en amplitud se presenta al fijar la articulación y durante la acción.	gran amplitud interfiere con la alimentación.
22.Rigidez*	ausente	leve o sólo se detecta cuando se activa por imitación y otros movimientos.	leve a moderado	gran rigidez, se obtienen todos los arcos de movimiento.	gran dificultad, los arcos de movimiento se obtienen con dificultad
23.Golpes con el dedo**	normal	lento, con reducción en la amplitud.	lento, se fatiga pronto puede detener el movimiento.	gran afectación dificultad frecuente para iniciar el movimiento.	no puede completar la tarea.

\* Rigidez, calificado en la movilidad pasiva de las articulaciones mayores con el paciente relajado en posición sentado, el signo de rueda dentada no debe ser tomado en cuenta.

\*\* Golpes con el dedo, el paciente golpea el pulgar con el índice en sucesión rápida con la mayor amplitud posible, se explora cada mano por separado.

\*\*\* Movimientos de las manos, el paciente abre y cierra las manos en sucesión rápida con la mayor amplitud posible, se explora cada mano por separado.



	0	1	2	3	4
24. Movimientos de las manos ***	normal	lento, con amplitud reducida puede de tener el movimiento.	lenta, se fatiga pronto puede para iniciar el movimiento o lo detiene.	gran afección dificultad para tarea	no puede completar la
25. Movimientos de las manos alternos y rápidos*	normal	lento, con amplitud reducida.	lento, se fatiga pronto puede de tener el movimiento.	gran afección dificultad para iniciar el movimiento o lo detiene.	no puede completar la tarea
26. Agilidad con los pies. **	normal	lento, con amplitud reducida.	lento, se fatiga pronto puede de tener el movimiento.	gran afección dificultad frecuente para iniciar el movimiento.	no puede completar la tarea.
27. Levantarse de la silla	normal	lento, puede requerir más de un intento.	se empuja a si mismo con los brazos sobre el asiento.  una vez pero lo logra sin ayuda.	tiende a caer hacia atrás y puede tratar de levantar se más de	incapaz de levantarse.
28. Postura	normal erecto	ligera-mente en corvado puede ser normal para una persona anciana	definitivamente anormal, puede inclinarse hacia al gún lado.	muy inclinado con xilosis puede inclinarse hacia algún lado.	flexion marcada con anomalía de la postura extrema.

29. Marcha	normal	camina lentamente puede acortar los pasos no hay marcha festinante o propulsiva.	camina con dificultad pero requiere poca ayuda, puede haber poca marcha festinante, pasos cortos o propulsión.	gran trastorno de la marcha, requiere de asistencia	no puede caminar ni con ayuda.
30. Estabilidad postural****	normal	retropulsión, se recupera sin ayuda	ausencia de reflejo postural puede caer si no lo detiene el examinador.	muy inestable, tiende a perder el balance espontáneo.	incapaz de permanecer de pie.
31. Bradicinesia del cuerpo.	ninguna	lentitud mínima se les da a los movimientos un carácter deliberado es posible la amplitud reducida.	lentitud con pocos movimientos que son definitivamente anormales, la amplitud está reducida.	moderada lentitud con poca amplitud del movimiento.	lentitud marcada con poca amplitud del movimiento.

\* Movimientos de las manos alternos y rápidos, movimientos de pronación-supinación de las manos, vertical u horizontal con la mayor amplitud posible, ambas manos simultáneamente.

\*\* Agilidad con los pies, el paciente golpea el talón, en el suelo en rápida sucesión levantando todo el tiempo, la amplitud debe ser de 3 pulgadas (7.5 mm).

\*\*\* Levantarse de la silla, el paciente intenta levantarse de una silla con respaldo de madera o metal con los brazos cruzados sobre el pecho.

\*\*\*\* Estabilidad postural, respuesta al desplazamiento súbito posterior producido al empujar por los hombros al paciente mientras éste se encuentra parado con los ojos abiertos y los pies ligeramente separados, se prepara al paciente.

#### IV.- Complicaciones de la terapia (en la semana pasada).

##### 1.- Disquinesias

	0	1	2	3	4
Qué proporción está presente durante el día (Información Histórica).					
32. Dura ción	ninguna	1-25% del día	26-50% del día	51-75% del día	76-100% del día

Que tan incapacitantes son las disquinesias? (Información histórica, puede ser modificado durante el examen).

33. Incapacidad	no incapacitante	poco incapacitante	incapacidad moderada	gran incapacitante.	completamente incapacitante.
-----------------	------------------	--------------------	----------------------	---------------------	------------------------------

Que tan dolorosas son las disquinesias

34. Disquinesias dolorosas	no hay	leve	moderada	severa	incapacitante.
----------------------------	--------	------	----------	--------	----------------

35. Distonía temprana

no si

##### B.- Fluctuaciones clínicas

36. Los períodos off son predecibles de acuerdo al tiempo de la última dosis.

no si

37. Los períodos off son predecibles de acuerdo al tiempo de la última dosis

no si

38. Alguno de los períodos off sobreviene repentinamente por ejemplo en segundos?

no si

\* Bradicinesia del cuerpo e hipocinesia, se combinan lentitud, duda al iniciar el movimiento, disminución del movimiento de los brazos, poca amplitud y disminución de los movimientos en general.

	0	1	2	3	4
39. Qué proporción del día se encuentra el paciente en periodo "off" en promedio?	ninguna	1-25% del día	26-50% del día	51-75% del día	76-100% del día
40. El paciente tiene anorexia, náusea o vómito.	no	si			
41. El paciente presenta alteraciones del sueño, por ejemplo hipersomnia o somnolencia?	no	si			
42. El paciente presenta hipotensión ortostática?	no	si			

*Registre la presión arterial, frecuencia cardíaca y peso en la forma de llenado.*

Fahn, S. Elton RI. Members of the UPDRS Development Comittee. Unified Parkinson's Disease rating scale. In: Fahn, S. Marsden CD CalneDB Goldstein M. eds. Recent Developments in Parkinson's disease Vol. 2, Florham Park, NJ Macmilan Health Care Information, 153-164, 1987

## **VIDEOS**

Klawans HL, Goetz Ch G & Tanner C.M  
**Common Movement Disorders**  
Chicago Raven Press 1988  
IBSN 088167 312-9

**UPDRS Motor Scale**  
Raven Press 1989 by the  
Movement Disorders Association

## REFERENCIAS BIBLIO-HEMEROGRAFICAS:

- AIT-OUKHATAR N, BUREAU F, BOUDEY M et al. Determination of metallothioneins by HPLC: application to zinc metabolism *Ann Biol Clin (Paris)* 1996, 54: 87-90
- ARNAUD Ph, GIANAZZA E, MIRIBEL L Study of acute-phase reactants *Methods in Enzymology* 1988;163 (40): 441-448
- ASCHNER M. The functional significance of brain metallothioneins *FASEB J.*1996; 10(10):1129-1136
- BEAL M.F. Aging, Energy, and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases *Ann Neurol* 1995; 38:357-366
- BOLL, M.C. OTERO E, CORONA T et al. *La enfermedad extrapiramidal y su traducción en I.R.M.* In: Parkinson, Enfoque al Futuro, Fondo de Cultura Económica/U.N.A.M, México, 1996 1ra Ed.pp 127-146
- BONNET, J.-J. et al. Effect of CH<sub>3</sub>-HgCl and Several Transition Metals on the Dopamine Neuronal Carrier. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994; 266 (Molec. Pharmacol, section): 87-97.
- BROWN RH Superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis: model for gain and function *Current Biology* 1995, 5: 841-846
- CHAN P.H, YANG G.Y, CHEN S.F. et al. Cold-induced Brain Edema and Infarction Are Reduced in Transgenic Mice Overexpressing CuZn-Superoxide Dismutase *Ann Neurol* 1991; 29:482-486
- CEBALLOS I. LAFON M, JAVOY-AGID F, et al. Superoxide dismutase and Parkinson's disease. *Lancet* 1990 ; 335: 1035
- COHEN G. Enzymatic/Nonenzymatic Sources of Oxyradicals and Regulation of Antioxidant Defenses *Annals New York Academy of Sciences* 1994:8-14
- COHEN O, KOHEN R, LAVON E et al. Serum Cu/Zn superoxide dismutase activity is reduced in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients *J Neurol Sci* 1996; 143: 118-120
- CROWE A. & MORGAN, E.H. Iron and Copper Interact During their Uptake and Deposition in the Brain and Other Organs of Developing Rats Exposed to Dietary Excess of the two Metals. *J. Nutr.*, 1996, 126: 183-194.
- DALY L.E et al. Sample size formulae In: Interpretation and Uses of Medical Statistics Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991 4<sup>a</sup> Ed.: 426-27

- DEXTER DT, CARAYON A, JAVOY-AGID F. et al. Alterations in the Levels of Iron, Ferritin, and Other Trace Metals in Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases Affecting the Basal Ganglia. *Brain*, 1991, 114: 1953-1975.
- DIMAURO, S. Mitochondrial Involvement in Parkinson's Disease. *Neurology*, 1993; 43: 2170-2172
- FAHN, S. and members of the UPDRS Development Committee (1987) *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*. En: Recent Developments in Parkinson's Disease, McMillan Florham Park, N.J., 1987; Vol. II, pp. 153-163.
- FEINSTEIN A.R. An additional Basic Science for Clinical Medicine: IV The Development of Clinimetrics *Ann Int. Med* 1983; 99:843-848
- FEINSTEIN A.R. Multivariable Analysis Yale University Press 1996. 613pp
- FISHMAN R.A. Cerebrospinal fluid in Diseases of the Central Nervous System 1992 WB Saunders Company Phil. second Edition p197
- GARDINER, P.E. y OTTAWAY, J.M. The Application of Gel Filtration and Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry to the Speciation of Protein Bound Zinc and Copper in Human Blood Serum. *Analytica Chim. Acta*, 1981; 124: 281-294.
- GERLACH M., BEN SHACHAR D, RIEDERER P, YODIM B.H. Altered Brain Metabolism of Iron as a cause of Neurodegenerative Diseases? *J. Neurochem* 1994;(63) 3: 793-807
- GLANZ SA Primer of Biostatistics McGraw-Hill N-Y 1981 4<sup>o</sup> Edition; 473pp
- GREENE JG, GREENAMYRE JT Bioenergetics and excitotoxicity: the weak excitotoxic hypothesis In: Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease 1996, Academic Press London, Olanow, Jenner & Youdim Eds. 224 pp.
- HARRIS Z.L., TAKAHASHI Y, MIYAJIMA H, SERIZAWA M, MCGILLIVRAY R.T.A, GITLIN J.D. Aceruloplasminemia: Molecular Characterization of this disorder of iron metabolism *Proc Natl Acad Sci* 1995 (92): 2539-2543
- HARRISON T.R. in Principes de Médecine Interne 1988 Flammarion Paris 4<sup>o</sup> edition: p2119
- HARTARD C. WEISNER B, DIEU C, KUNZE K. Wilson's disease with cerebral manifestation: monitoring therapy by CSF copper concentration *J Neurol* 1993 : 241: 101-107
- HARTMANN, H.A. & EVERSON, M.A. Deficiency of Copper Can Cause Neuronal Degeneration. *Medical Hypotheses*, 1992; 38: 75-85.

- HERTZMAN, C. Parkinson's Disease: Case-Control Study of Occupational and Environmental Risk Factors. *Am. J. Int. Med.*, 1990, 17: 349-356.
- HOEHN, M. & YAHR, M. Parkinsonism: Onset, Progression and Mortality. *Neurology*, 1967: 422-427.
- JENNER P. & OLANOW C.W. Pathological evidence for oxidative stress in Parkinson's disease and related degenerative disorders. In: Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease, London, 1996, Academic Press 224pp.
- JENNER P, SCHAPIRA AH, MARSDEN D, New insights into the cause of Parkinson's disease *Neurology*, 1992; 42: 2241-2250
- JIMENEZ JIMENEZ, F.J., FERNANDEZ-CALLE P, MARTINEZ VANACLOCHA M *et al.* Serum Levels of Zinc and Copper in Patients with Parkinson's Disease. *J. Neurol. Sci.*, 1992, 112 (1-2): 30-33.
- KESSLER, I.I. y DIAMOND, E.L. Epidemiologic Studies in Parkinson's Disease: I.- Smoking and Parkinson's Disease: A survey and Explanatory Hypotesis. *Am. J. Epidemiol.*, 1971; 94: 16-25.
- KLOMP L.W, FARHANGRAZI Z.F, DUGAN L.L, GITLIN J.D. Ceruloplasmin Gene Expression in the Murine Central Nervous System *J Clin Invest* 1996 (98) 1: 207-215
- LAZO J.S, KONDO Y, DELLAPIAZZA D *et al.* Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I & II genes *J.Biol.Chem* 1995; 270: 5506-10
- LINDER M.C. & AZEGH-AZAM M. Copper biochemistry and molecular biology *Am J Clin Nutr* 1996;63:797S-811S
- LINDER M.C, GOODE C.A. Biochemistry of Copper Plenium Press NY 1991
- LOEFFLER D.A, LeWITT P.A, JUMEAU P.L. Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders *Brain Res* 1996: 265-274
- MILNE, D.B. y JOHNSON, Ph.E. Assessment of Copper Status: Effect of Age and Gender of Reference Ranges in Healthy Adults. *Clin. Chem.*, 1993, 39 (5): 883-887.
- MISRA H.P. & FRIDOVICH I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem*, 1972,(247)10: 3170-3175
- MIZUTA, E. & KUNO, S. Effects of D-Penicillamine on Pharmacokinetics of Levodopa in Parkinson's Disease. *Clin. Neuropharmacol.*, 1993, 16 (5): 448-450.



- MIYAJIMA H, TAKAHASHI Y, SERIZAWA M, KANEKO E, GITLIN J.D. Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia *Free Radical Biology & Medicine* 1996 (20)5:757-760
- MORITA H, IKEDA S, YAMAMOTO K, MORITA S, YOSHIDA K, NOMOTO S, KATO M, YANAGISAWA N. Hereditary Ceruloplasmin Deficiency with Hemosiderosis: A Clinicopathological Study of a Japanese Family *Ann Neurol* 1995; 37:646-656
- MULTHAUP G, RUPPERT T, SCHLICKSUPP A , et al. Reactive Oxygen Species and Alzheimer's Disease *Biochem Pharmacol* 1997 (54)5: 533-539
- NAKAGAWA HATTORI, Y. et al. Is Parkinson's Disease a Mitochondrial Disorder? *Jour. Neurol. Sci.*, 1992; 107: 29-33.
- OLANOW CW, DRAYER B. Magnetic resonance imaging studies of iron distribution in Parkinson's disease and aging. *Arch Neurol* 1988; 45:809
- OLIVARES M & UAUY R Copper as an essential nutrient *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 791S- 6S
- PAJOVIC S, SAICIC ZC, SPASIC MB et al. Effects of progesterone and estradiol benzoate on superoxide dismutase activity in the brain of male rats *Experientia*,1996;52: 221-224
- PALL H.S., BLAKE D.R., GUTTERIDGE J.R, WILLIAMS A.C, LUNEC J, TAILOR A. Raised Cerebrospinal-fluid Copper Concentration in Parkinson's Disease. *Lancet*, 1987, ii: 238-241.
- PATEL BN, DAVIS S, A novel glycosylphosphatidylinositol anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes *J Biol Chem* 1997,272:32
- PROHASKA, J.R, Functions of Trace Elements in Brain Metabolism. *Physiol. Rev.*, 1987, 67: 858-901.
- PRZEDBORSKI S, JACKSON-LEWIS V, MUTHANE U et al, Chronic Levodopa Administration Alters Cerebral Mitochondrial Respiratory Chain Activity *Ann Neurol* 1993; 34: 715-723
- PRZEDBORSKI S, DONALDSON D, JAKOWECK M, et al. Brain Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase Activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39:158-165
- PRZEDBORSKI S, JACKSON-LEWIS V, YOKOHAMA R. et al. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induced dopaminergic neurotoxicity *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1996,(93): 4565-4571
- RIOS, C., ALVAREZ-VEGA R, ROJAS P. Depletion of Copper and Manganese in Brain After MPTP Treatment of Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 1995, 76: 1-5.

- ROJAS P, RIOS C Increased Striatal Lipid Peroxidation after Intracerebroventricular MPP+ Administration to Mice. *Pharmacol & Toxicol* 1993,72: 364-368
- ROJAS P. , RIOS C. Short Term Manganese Pretreatment Partially Protects Against MPTP Neurotoxicity. *Neurochem. Res.*, 1995; 20: 1217-1223.
- ROJAS P., RIOS C. Metallothionein Inducers Protects Against 1Methyl-4Phenyl-1,2,3,6,Tetrahydro-Pyridine Neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.*, 1997; (22)1: 17-22 .
- SAGGU H., COOKSEY J., DEXTER D, WELLS F.R., LEES A, JENNER P, MARSDEN C.D. A selective Increase in Particulate Superoxide Dismutase Activity in Parkinsonian Substantia Nigra. *J.Neurochem.* 1989,53: 692-97
- SATO M. , BREMMER, I. Oxygen Free Radicals and Metallothionein Free radicals. *Biol. & Med.*, 1993, 14: 325-337.
- SCHAPIRA, A.H.V. et al. Mitochondrial Complex I, Deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 1990; 54: 823-827.
- SCHIGARA H, PFEIFFER RF, EBADI M. The Effects of 6-hydroxydopamine and Oxidative Stress on the Level of Brain Metallothionein. *Neurochem. Int.*, 1993, 23(6): 561-566.
- SCHEINBERG J.H, STERNLIEB J, SCHILSKY M, STOCKERT R.J. Penicillamine may detoxify copper in Wilson's disease *Lancet* 1987,ii:95
- SCHEUHAMMER, A.M. & CHERIAN, G. Quantification of Metallothioneins by Silver-Saturation Method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1986; 82: 417-425.
- SEATON TA, JENNER P, MARSDEN CD. Mitochondrial Respiratory Enzyme Function and Superoxide Dismutase Activity following Brain Glutathione Depletion in the rat. *Biochem Pharm* 1996; 52: 1657-63
- SOLOMONS *Zinc and Copper*. In: Modern Nutrition in Health and Disease. Shild Me and Young Ur. Editors, Philadelphia, 1988, 7<sup>a</sup> Edición.
- SORENSON JR. Bis ( 3,5 diisopropylsalicylato ) copper II, a Potent Radioprotectant with Superoxide Dismutase Mimetic Activity *J. Med. Chem* 1984 27: 1747-1749
- SOTOMATSU,A. Nakano, M Hirai S.. Phospholipid Peroxydation Induced by the Catecol-Fe+++ (Cu++) Complex: A possible Mechanism of Nigrostriatal Cell Damage. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990; 283 (2): 334-341.
- SOUTHHORN PA, POWIS G, Free radicals in medicine. I: Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988, 63 (4): 381-389

- SWAIN JA, DARLEY-USMAR V, GUTTERIDGE JM, Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis *FEBS letters* 1994; 342: 49-52
- TANABE S., SHIORI T., MURAKAMI K & IMANARI T. A new Method for Assay of Ferroxidase Activity and its application to Human and Rabbit sera. *Chem Pharm Bull* 1984, 32(10): 4029-4035
- URAKAMI K, SATO K, OKADA A. et al. Cu,Zn superoxide dismutase in patients with dementia of Alzheimer type *Acta Neurol. Scand* 1995: 91: 165-168
- WHITEMAN M, KAUR H, HALLIWELL B Protection against peroxynitrite dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by some anti-inflammatory drugs and by the antibiotic tetracycline. *Ann Rheum Dis* 1996;55:383-387
- YODIM, M.B.H., BEN SHACHAR D., YEHUDA S & RIEDERER P. The role of Iron in the Basal Ganglion. *Advances in Neurology*, 1990, 53: 155-162.