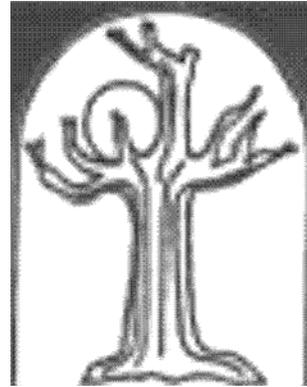




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

**“EVALUACION DEL POSIBLE EFECTO NEUROPROTECTOR
DEL COBRE EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON EN RATONES”**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
BIOL. MIREYA ALCARAZ ZUBELDIA

Tutor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

MARZO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. Camilo Ríos. Además de ser un gran amigo, fuiste cómplice de mi formación, dejando que todas mis ideas fueran tomadas en cuenta. Eres ejemplo de desarrollo científico para todos nosotros, tus estudiantes.

Al Dr. Miguel Morales, quien supo darme ánimos y confianza para cumplir con mi vocación científica.

Al Dr. Rolando Hernández, quien siempre tuvo un ánimo relajado y amigable para escucharme y me acompañó en mi examen de Candidatura.

De la misma manera, agradezco a los colaboradores de la presente tesis: El Dr. Sergio Montes, en el desarrollo experimental de la presente tesis; y en especial, a la Dra. Marie Catherine Boll, quien además de colaborar conmigo durante la realización de los experimentos ha defendido conmigo la hipótesis del cobre como neuroprotector, y con quien comparto una linda amistad.

Agradezco también a los destacados miembros de mi jurado por su amable atención y las importantes aportaciones al presente trabajo de tesis.

Presidente: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Secretario: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Vocal: Dra. Ana Clorinda Arias Alvarez

Vocal: Dr. José Segovia Vila

Vocal: Dra. Selva Rivas Arancibia

Suplente: Dr. Rolando Hernández Muñoz

Suplente: Dra. Leticia Verdugo Díaz

Dedicatoria.

“Tía Mary” sé que tu apoyo invisible, hace visibles efectos en mi vida. Gracias por todo tu amor.

Deseo dedicar esta tesis a los amores más grandes de mi vida, los miembros de mi familia. A Paty y Arturo por ser confidentes, cómplices y amorosos en todo momento. A Guille y Geo por toda la confianza que me han legado; a Gerardo y Juan, mis fabulosos sobrinos que adoro y de quienes me siento sumamente orgullosa. A Lety, Rafa y Pao por ser el mejor refugio bajo cualquier situación. Al Dr. Gerardo Pérez, quien cariñosamente insistió hasta el hartazgo en esta tesis... A todos ellos todo mi amor y gratitud.

A la Dra. Martha Rocha Munive, un alma gemela que siempre ha estado en los momentos importantes de mi vida para bien y para mal, porque si existen los lazos indisolubles, tatuados en el miocardio, nuestra relación sería el mejor ejemplo.

Qué vacía estaría la lista sin mencionarte Adrián. Gracias por sostener la linterna mientras me empujaste hacia los más intrincados sitios de la *psique* sin soltar mi mano...Gracias a mis compañeros de trayecto: Rosy, Carlos, Leonardo, y Javier, ahora ya podemos llamarnos amigos eternos...Esta tesis es un resultado más de su ayuda.

Quisiera agradecerle de una manera muy especial a la Dra. Gisela Cahero y a la Dra. Concepción Nava. Jedis ocultos bajo capas negras, que nunca claudicaron en su empeño de ayudarme y protegerme.

“¿Cuántas veces cierra uno los ojos para no ver y cuántas para ver mejor?... Cerrar los ojos, sentir desde la punta de los pies la certidumbre de que nada puede caber en nuestros pensamientos, más complicados que la maquinaria increíble con que los pensamos. Una maquinaria que se manda sola y que no nos debe nada. Tantear el privilegio de vivir en ella, incluso cuando se descompone y nos duele...”

***Angeles Mastreta
("El Mundo Iluminado")***

INDICE

	<i>Pág.</i>
ABREVIATURAS.....	9
1. Abstract.....	12
2. Resumen.	14
3. Introducción.	16
4. Antecedentes.	18
<i>4.1. La Enfermedad de Parkinson: Clasificación, manifestaciones clínicas y datos epidemiológicos.</i>	18
<i>4.2. Alteraciones de la vía nigroestriatal en la EP.</i>	25
<i>4.3 Teorías asociadas a la etiología de la EP.</i>	26
<i>4.4. Trastornos Neuroquímicos en la Enfermedad de Parkinson.....</i>	31
4.4.1. Sistemas dopaminérgicos alterados en la EP.....	31
4.4.1.1. Actividad Tirosina Hidroxilasa (TH).....	33
4.4.1.1.1. Mecanismos de regulación de la actividad de la TH.....	33
4.4.1.2. La Tirosina Hidroxilasa en al EP.....	35
4.4.2. Sistemas no-dopaminérgicos alterados en la EP.....	36
4.4.2.1. Monoaminas.....	36
4.4.2.2. Sistemas colinérgicos.....	36
4.4.2.3. GABA.....	38
4.4.2.4. Neuropeptidos.....	38
4.4.3. Receptores dopaminérgicos.....	38

	<i>Pág.</i>
4.4.4. Estrés Oxidante.....	40
4.4.4.1. Generalidades.....	40
4.4.4.2. El estrés oxidante en la EP.....	42
4.4.5. Alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial en la EP.....	46
4.4.6. Los metales esenciales en la neurodegeneración.....	48
4.4.6.1. Papel del hierro, Incremento en los Depósitos Cerebrales.....	48
4.4.6.1.1. Ferritina, Lactoferrina y Transferrina.....	48
4.4.6.2. Papel del cobre en el organismo.....	53
4.4.6.2.1. Principales Cuproproteínas: Cu/ZnSOD, Citocromo c oxidasa, Metalotioneína, Dopamina β-hidroxilasa.....	58
4.4.6.2.2. Ceruloplasmina.....	60
4.4.6.3. Enfermedades asociadas al desorden en el metabolismo del cobre.....	64
4.4.6.4. Enfermedades neurológicas asociadas al déficit de cobre.....	65
4.4.6.4.1. Enfermedad de Wilson y enfermedad de Menkes.....	65
4.4.6.4.2. Aceruloplasminemia.....	67
4.5. Modelos de la Enfermedad de Parkinson.....	70
4.5.1. Modelos Moleculares de la Enfermedad de Parkinson.....	71
4.5.2. Modelos Farmacológicos de la Enfermedad de Parkinson.....	73
4.5.2.1. Modelo de administración de MPTP, MPP+.....	73
4.5.2.2. Otros modelos farmacológicos de la EP.....	76
4.5.2.2.1. Administración nigral de Hierro.....	76
4.5.2.2.2. Reserpina.....	77
4.5.2.2.3. 6-OHDA.....	77
4.5.2.3. Administración de compuestos considerados como factores de riesgo.....	78
4.5.2.4. Isoquinolinas (R-Salsolinol).....	78
4.6. Neuroprotección de compuestos con cobre.....	79
4.7. Papel del Cobre en las concentraciones de Dopamina y la Actividad Locomotriz.....	83

	<i>Pág.</i>
5. Hipótesis.....	86
6. Objetivo General.....	86
7. Objetivos Particulares.....	86
8. Métodos.....	87
9. Resultados.....	101
10. Discusión.....	119
11. Conclusiones.....	135
12. Referencias.....	137

ABREVIATURAS

- A_{2A} = Receptores a Adenosina tipo 2A.
- ACh = Acetil Colina.
- ALT/GTP = Alanina L-Transaminasa / Transaminasa Glutámico-Pirúvica
- ATV = Area tegmental ventral.
- BH4 = Tetrahidrobiopterina.
- BHE = Barrera hematoencefálica.
- CAM cinasa II = Proteín cinasa calcio-calmodulina dependiente tipo II.
- CCS = Chaperona la Cu/ZnSOD
- ChAT = Colina acetil-transferasa.
- COMT = Catecol-O-metil-transferasa.
- COX = Citocromo c oxidasa.
- Cp = Ceruloplasmina.
- Cu/Zn SOD = Superóxido dismutasa dependiente de cobre/zinc (SOD1, citosólica; SOD3, extracelular).
- Cu-DIIPS = Diisopropil salicilato de cobre.
- CuSO₄ = Sulfato de cobre
- D1 = Receptores a dopamina tipo 1.
- D2 = Receptores a dopamina tipo 2.
- DA = Dopamina.
- DAT = Transportador de dopamina.
- DBH = Dopamina beta-hidroxilasa.
- DLB = Enfermedad de los cuerpos de Lewy.
- EA = Enfermedad de Alzheimer.
- EH = Enfermedad de Huntington.
- ELA = Esclerosis Lateral Amiotrófica.
- ELAF = Esclerosis lateral amiotrófica familiar.
- EM = Esclerosis Múltiple.
- EP = Enfermedad de Parkinson Idiopática.

- EROS = Especies reactivas del Oxígeno.
- EW = Enfermedad de Wilson.
- Fe-S = Proteínas hierro-sulfuradas.
- GABA = Acido gamma-amino butírico.
- GAD = Glutamato descarboxilasa.
- GPe = *Globus pallidus externo*.
- GPi = *Globus pallidus interno*.
- H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno.
- 5-HIAA = Acido 5-hidroxi-indolacético.
- HPLC-ED = Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detector electroquímico.
- HVA = Acido homovanílico.
- i.c.v. = Intracerebroventricular (vía de administración).
- i.v. = Intravenosa (administración).
- IRMN = Imagen por Resonancia Magnética Nuclear.
- KGDH = Alfa-cetoglutarato deshidrogenasa.
- LCR = Líquido Cefalorraquídeo.
- L-DOPA = Levodopa (3,4- dihidrofenil-alanina)
- LO = Lisil oxidasa.
- LPS = Lipopolisacáridos.
- MAO-B = Monoamina Oxidasa tipo B
- MAPK = Protein cinasa activada por mitógeno.
- MAP-KAPK-2 = Protein cinasa-2 activada por la protein cinasa activada por la MAPK.
- MnSOD = Manganeso superóxido dismutasa (SOD2).
- MPP⁺ = 1-metil, 4-fenilpiridinio.
- MPTP = 1-metil, 4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina.
- MT = Metalotioneína.
- Na₂SO₄ = Sulfato de sodio.

- NE = Norepinefrina.
- 3-NP = Acido 3-Nitropropiónico.
- NO = Oxido nítrico.
- O₂' = Radical superóxido.
- OH' = Radical hidroxilo.
- 6-OHDA = 6-Hidroxidopamina.
- PARS = Sintasa poliADP-ribosa.
- PKA = Protein cinasa dependiente de AMPc.
- PKC = Protein cinasa C.
- PLA2 = Fosfolipasa A2.
- PNMT = Feniletanolamina N-metiltransferasa.
- R-SAL = R-Salsolinol.
- R-SAL-Transf = N-metil-R-Salsolinol transferasa.
- SNc = *Sustantia nigra pars compacta*
- SNr = *Sustantia nigra pars reticulata*
- SON = Sintasa del óxido nítrico.
- SONn = Sintasa del óxido nítrico tipo neuronal.
- SQ = Semiquinona.
- α-SYN = Alfa-sinucleína.
- Tf = Transferrina.
- TH = Tirosina hidroxilasa
- TH-IR = Inmunoreactividad de células a la tirosina hidroxilasa.
- U.F. = Unidades arbitrarias de fluorescencia.
- U.I. = Unidades Internacionales.
- UV/VIS = Ultravioleta / Visible (Espectrofotómetro).
- VMAT = Transportador vesicular de monoaminas.
- X = Xantina.
- XD = Xantina Deshidrogenasa.
- XO = Xantina oxidasa.

1. Abstract.

Idiopathic Parkinson's disease is considered as a multifactorial neurodegenerative disorder of unknown etiology. Until now, the development of new therapeutic strategies against Parkinson's disease focused their efforts in the control of its symptoms, but any effective treatment against neurodegeneration has been created yet. The participation of oxidative stress in neurodegenerative disorders has been established and some groups around the world investigate the protective effects of antioxidant enzymes. Transition metals as copper are considered one of the most important cofactors of these enzymes. Copper is considered as an essential metal and its deficiency has been associated with neuropathologies that involve basal ganglia alterations similar to those seen in Parkinson's disease patients. The selective deposition of copper in striatal tissues and the specific depletion of the metal in parkinsonian brains, could suggest that patients lacking copper or cuproproteins that transport it, could be more susceptible to neurodegeneration. Also the MPP⁺ model of Parkinson's disease can cause this striatal copper depletion. Thus, this feature could be considered as a biochemical marker of this disease.

The main objective of this work was to evaluate the ability of copper as a neuroprotector against the neurotoxic effects exerted by MPP⁺. Regarding of this capability, pretreatment with copper sulfate was able to block at both schemes of administration used (acute and chronic) both, the dopamine depletion (acute: blockade at 24h pretreatment; chronic: blockade at 700mg/l) and the oxidative stress increase (acute: blocked either at 16 or 24h of pretreatment; chronic: 95% of protection at the higher dose employed (700mg/l)). This neuroprotection might be associated with the participation of copper metalloproteins as ceruloplasmin and metallothionein, which not only transport this metal to all tissues and organs (and brain regions), but also act as free radicals scavengers, avoiding the oxidative stress caused by the model.

The participation of one of the most important antioxidant enzymes, the superoxide dismutase, was evaluated and results showed that either copper sulfate as MPP⁺ increase the activity of the mitochondrial form of this enzyme (5 and 7 fold, respectively). On the other hand, when both treatments were administrated, the activation of this enzyme showed a synergic effect (7 fold increase). This over activation of MnSOD suggests that this enzyme could be one of the responsible of the neuroprotection observed against the striatal oxidative stress in our mice.

The tyrosine hydroxylase activity (rate limiting enzyme for dopamine synthesis) was also analyzed. Results showed that MPP+ administration induced a 28% decrease in the activity of this enzyme. Moreover, the copper sulfate pretreatment *per se*, induced increases of 14% and 38% in those animals that received this metal 16h or 24h, respectively before the saline solution administration (copper control). Results obtained from those mice pretreated with copper sulfate 16h or 24h before the MPP+ model, showed a complete blockade of the TH inactivation. The MPP+ administration can cause the inactivation of TH by nitration of its tyrosine residues. Since copper ions are able to inactivate the nitric oxide synthase, reducing the nitric oxide levels and avoiding the probability of its nitration, this could be the mechanism associated with copper sulfate neuroprotection against TH inactivation. Moreover, copper might be protecting against the inactivation of tyrosine hydroxylase, avoiding the depletion of allostery to the bipterin cofactor induced by MPP+.

The MPP+ administration induced a 52% decrease in horizontal locomotor activity in mice (akinesia). CuSO₄ *per se* increased the motility of mice in dependence with the time of pretreatment (either 9% or 39% compared with control values at 16h or 24 h, respectively). Copper prevented the akinesia induced by MPP+ in those animals that received the pretreatment with CuSO₄ (protection of either 47%; 16h) or 71% (24h against MPP+ group). Both, motor impairment caused by MPP+ (akinesia) and hiperlocomotion, caused by copper treatment were previously reported, but this is the first report of reversion of MPP+ induced akinesia, by copper sulfate pretreatment. A possible mechanism related with this effect could be the blockade of adenosine A_{2A} receptors, which modulate dopamine release. In fact, adenosine A_{2A} antagonists have been proposed as an effective antiparkinsonian treatment. Another protective effect against akinesia could be related with the copper dependence for dopamine synthesis.

2. Resumen.

La enfermedad de Parkinson idiopática es considerada como una enfermedad neurodegenerativa multifactorial de origen desconocido. Hasta el momento, los tratamientos farmacológicos se han dirigido hacia el control de su sintomatología y aún no se han desarrollado tratamientos eficaces en contra de la neurodegeneración. Actualmente, se ha demostrado la participación del estrés oxidativo en los eventos neurodegenerativos y el tratamiento con antioxidantes ha llamado la atención de diversos grupos alrededor del mundo. Entre los principales cofactores asociados con los sistemas antioxidantes se encuentran algunos metales de transición como el cobre, cuyo déficit se ha relacionado al desarrollo de trastornos en los ganglios basales, semejantes a los observados en el Parkinson. La distribución selectiva del cobre en el cuerpo estriado (caudado-putamen) y la disminución de sus niveles en pacientes con la enfermedad de Parkinson, podría sugerir una susceptibilidad al evento neurodegenerativo en aquéllos individuos carentes del metal o de las metaloproteínas encargadas de transportarlo. También en el modelo de MPP+ se ha observado este déficit estriatal de cobre, lo que podría señalar al cobre como un posible marcador bioquímico de la enfermedad.

El principal objetivo de la presente tesis fue comprobar si un pretratamiento con sulfato de cobre podría modificar las alteraciones neurotóxicas que acompañan a la administración del MPP+. A este respecto, pudo comprobarse que el pretratamiento con sulfato de cobre tanto en el esquema de administración agudo como en el crónico, previene tanto la disminución en las concentraciones de dopamina (bloqueo tras al administración aguda y crónica de CuSO_4 a 24h y a 700mg/l, respectivamente) como el desarrollo del estrés oxidativo (agudo: bloqueo a 16 y 24h; crónico: 95% de protección a 700mg/l) en el cuerpo estriado. La neuroprotección observada podría estar asociada con el incremento en la expresión o actividad de proteínas antioxidantes como la ceruloplasmina y la metalotioneína, que no sólo son transportadoras de cobre a través de los diferentes tejidos y órganos (así como entre las diferentes regiones cerebrales), sino también atrapadoras de radicales libres, protegiendo a las neuronas de la toxicidad generada por el modelo.

Con el fin de valorar la participación de las enzimas antioxidantes en ésta neuroprotección se evaluó la actividad de la superóxido dismutasa. Los resultados demostraron que tanto la administración de cobre como la administración del MPP+, incrementan la actividad de la forma mitocondrial de la enzima (5 y 2 veces

respectivamente en comparación con el grupo control), mientras que la administración de ambos tratamientos tuvo un efecto sinérgico (7 veces) en los animales. Esta magnificación de la respuesta podría ser pieza clave en los mecanismos involucrados en la prevención del desarrollo del estrés oxidante.

También fue evaluada la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH; enzima paso-limitante para la síntesis de dopamina). Los datos demostraron que la administración del MPP+ disminuyó la actividad de la enzima en un 28%. Por su parte, la administración del cobre *per se*, fue capaz de inducir incrementos en la actividad de la TH del 14% y 38% en los animales tratados con el metal 16 o 24h antes de la administración de solución salina, respectivamente. De esta manera, el cobre bloqueó la inactivación de la TH al ser administrado 16 ó 24h antes de la administración de MPP+. La inactivación que el cobre ejerce sobre la sintasa del óxido nítrico (de acuerdo a lo reportado previamente en la literatura), podría evitar la nitración de la enzima a través de su interacción con el óxido nítrico. Además, el cobre podría ejercer protección en contra de la inactivación de la TH al evitar la pérdida del efecto alostérico de la biopterina por la TH, provocada por el MPP+, ya que la TH depende de dicho cofactor para su activación.

La administración del MPP+ generó una disminución del 52% en la actividad locomotriz de los animales (acinesia). El CuSO_4 por sí solo nuevamente demostró tener efectos importantes, ya que incrementó la actividad basal en dependencia al tiempo de pretratamiento con respecto a los organismos control en un 9% y 39% (a 16 y 24 h, respectivamente). Por su parte, el cobre previno la acinesia de los ratones con MPP+ pretratados con el metal (47% (16h) y 71% (24h) de protección con respecto al grupo con MPP+). El mecanismo por medio del cual actúa el cobre sobre la actividad locomotriz no ha sido determinado aún. Sin embargo, podría estar asociado con un bloqueo de los receptores A_{2A} de adenosina, que a su vez modulan la liberación de dopamina o bien al aumento en el recambio de dopamina, ya que se ha demostrado que la presencia del metal es esencial para la síntesis de dicho neurotransmisor.

Por último, es importante mencionar que la administración del sulfato de cobre a las dosis empleadas en ambos esquemas de administración no generó toxicidad en los animales expuestos, lo cual pudo ser corroborado a través del análisis de la enzima Alanina L-Transaminasa (ALT) (valores considerados dentro del rango normal (0-20 U.I.).

. Introducción.

A lo largo del estudio de la Enfermedad de Parkinson (EP) se han detectado diversos trastornos bioquímicos que, en asociación al análisis clínico, permiten el diagnóstico de la enfermedad.

Sin embargo, hasta el momento se carece de un instrumento bioquímico (por ejemplo una batería de pruebas bioquímicas y/o moleculares) capaz de detectar la susceptibilidad de cualquier individuo al desarrollo de la enfermedad de Parkinson. El estudio de los diversos factores que interactúan en la enfermedad resulta de capital importancia para el desarrollo de dicha batería. Con este fin, se han desarrollado diversos estudios entre los que se cuenta la presente tesis.

El desarrollo de diferentes modelos experimentales de las enfermedades neurodegenerativas, ha permitido el estudio de la naturaleza multifactorial de las mismas, con el fin de favorecer el desarrollo de terapias alternativas en contra de la muerte neuronal acelerada que las caracteriza. En el caso de la EP se han descubierto un gran número de modelos capaces de generar trastornos celulares que conducen a los animales al parkinsonismo. Para esta tesis se empleó un modelo experimental considerado como uno de los que mejor representa las alteraciones bioquímicas del Parkinson, que es el modelo de la administración intracerebroventricular (i.c.v.) del MPP+ (1-metil, 4-fenilpiridinio) a ratones macho de la cepa C57 Black. En estos animales se evaluó el efecto protector del sulfato de cobre en contra de la toxicidad del MPP+, representada por el incremento en la tasa de estrés oxidativo y un importante descenso en las concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado de dichos animales. Es por esto que la neuroprotección se valoró a través de la evaluación de ambos parámetros, los cuales se presentan no sólo en ese modelo experimental sino que también acompañan el desarrollo de la enfermedad.

El cobre se ha propuesto como un neuroprotector en nuestro trabajo, debido a un gran número de evidencias previas que así lo señalan. Por ejemplo, se ha demostrado que el déficit de importantes proteínas transportadoras de cobre, como la ceruloplasmina, se encuentra asociado al daño a las vías dopaminérgicas, afectando principalmente los ganglios basales. Si bien la disminución en las

concentraciones de dicha proteína no ha sido demostrada en la EP, se pudo observar un importante deterioro en su actividad, la cual guarda una relación directa con la gravedad de los síntomas (a mayor gravedad de los síntomas, menor capacidad como ferroxidasa).

El Parkinson como otras enfermedades neurodegenerativas tiene como un importante factor de riesgo a la edad. A lo largo de la vida del individuo, la capacidad del organismo para transportar y almacenar al cobre disminuye y, por lo tanto, también sus concentraciones en el organismo. El cerebro (y en particular los ganglios basales), es uno de los órganos que acumulan preferentemente a dicho metal. Es en esta zona donde el deterioro celular que conduce al Parkinson es observado y donde las concentraciones de dopamina alcanzan sus mayores proporciones.

Como anteriormente citamos, la sobreproducción de las especies reactivas del oxígeno conduce al establecimiento del estrés oxidativo neuronal, condición que se encuentra asociada al desarrollo y grado de severidad de los síntomas de la enfermedad de Parkinson. A este respecto, el cobre ha demostrado tener un efecto antioxidante al participar como cofactor de un gran número de proteínas antioxidantes (metalotioneína, ceruloplasmina, superóxido dismutasa, etc) y al ser capaz de actuar de manera indirecta sobre el control de los niveles de hierro en sus depósitos cerebrales, evitando de esta manera sus efectos tóxicos.

El papel del cobre en el desarrollo o susceptibilidad a la neurodegeneración ha sido planteado previamente. De manera más reciente, con el descubrimiento de enfermedades como la aceruloplasminemia (caracterizada por el déficit de ceruloplasmina, principal transportadora plasmática de cobre, lo cual trae como consecuencia una degeneración neuronal selectiva de los ganglios basales), se ha sugerido una susceptibilidad a la enfermedad de Parkinson en individuos que poseen una reducida capacidad antioxidante, dependiente en algunos casos, de la biodisponibilidad de cobre.

La excitotoxicidad generada por el glutamato, forma parte de los trastornos bioquímicos presentes en los eventos neurodegenerativos. Los niveles de glutamato y la activación de los receptores para NMDA, se presentan en

enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica. Los efectos tóxicos asociados con la excesiva liberación estriatal de glutamato podrían ser controlados a través de la administración de sulfato de cobre. El control del cobre en contra del desarrollo de la excitotoxicidad ha sido reportado por diversos grupos, principalmente asociado a la actividad de cuproenzimas antioxidantes como la Cu/ZnSOD. Hasta el momento, el cobre por si solo, se sabe que actúa como modulador endógeno de la función sináptica y como potente inhibidor de diversos tipos de receptores, entre los que se encuentran los receptores para glutamato, íntimamente relacionados con el control motor.

Sin embargo, la evaluación del efecto de suplementos de cobre en el control de los niveles de glutamato y el desarrollo de la excitotoxicidad, no forma parte de los estudios incluidos en la presente tesis aunque podrían verse involucrados en la neuroprotección del cobre sobre la toxicidad del MPP+. Dicha neuroprotección, fue evaluada a través del análisis del status oxidativo, el funcionamiento dopaminérgico y la respuesta locomotriz espontánea de los animales expuestos a los diferentes tratamientos.

4. Antecedentes.

4.1. La enfermedad de Parkinson (EP): Clasificación, manifestaciones clínicas y datos epidemiológicos.

La enfermedad de Parkinson fue descubierta por James Parkinson, quien en 1817 la describe: “La enfermedad es de una naturaleza grandemente aflictiva, un mal de los denominados sin perspectiva de escape, es de larga duración, requiere de una continua observación o cuando menos una correcta historia de sus síntomas y aún por muchos años será una tediosa y sumamente angustiada enfermedad” (Parkinson J., 1817). La certeza de las palabras de Parkinson nos alcanza, ya que hasta el momento las investigaciones realizadas alrededor de todo el mundo no han podido generar resultados concluyentes con respecto a las causas de la neurodegeneración en la EP, evitando el desarrollo de terapias efectivas para prevenir o detener la muerte celular que genera dicha enfermedad.

Con el fin de simplificar la mención de la enfermedad de Parkinson, a lo largo de la presente tesis, las siglas EP serán utilizadas para señalar el Parkinson idiopático, que es el verdadero motivo de estudio del presente trabajo, excluyendo de este concepto a todo Parkinson de etiología conocida y cualquier otro trastorno que involucre diversos sistemas, o a cualquiera que muestre lesiones en el estriado, tales como la parálisis supranuclear progresiva, la atrofia olivopontocerebelosa, el síndrome de Shy-Drager, la atrofia multisistemas y la degeneración estriato-nigral. En su caso, la mención de este tipo de parkinsonismos será citada explícitamente en el texto. A continuación se presenta la clasificación de parkinsonismos propuesta por Barbeau y Roy, entre las que se hace referencia al Parkinson idiopático EP (Barbeau, 1984).

Tipo de Parkinsonismo	Clasificación	Subclasificación
Tipo I	Postencefálico	-----
Tipo II	Idiopático	A. Temblor Predominante B. Predominancia Acinético-rígida
Tipo III	Familiar	A. Parkinsonismo con patrón autosómico dominante B. Parkinsonismo con patrón autosómico recesivo
Tipo IV	Sintomático	A. Parkinsonismo con atrofia multisistemas B. Parkinsonismo con disparadores conocidos C. Parkinsonismo inducido mecánicamente

Tabla 1. Clasificación de los parkinsonismos. (Barbeau y Roy, 1984)

La EP como todos los desórdenes neurodegenerativos puede ser definida como el conjunto de alteraciones que aceleran la tasa de muerte celular de grupos neuronales específicos, que en este caso, corresponde a las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta* (SNc), que a su vez mandan proyecciones al cuerpo estriado dándose como consecuencia un descenso dramático del contenido del neurotransmisor dopamina en ésta región cerebral, como será revisado mas adelante. La pérdida de dichas neuronas resulta de capital importancia ya que cerca del 80% de la dopamina cerebral se encuentra concentrada en el cuerpo estriado (Siegel et al., 1999).

Se requiere que mueran entre un 80 y un 90% de las neuronas dopaminérgicas nigrales para que los síntomas y signos del Parkinson se hagan evidentes (Jellinger, 1987).

Algunos hallazgos de la literatura han permitido suponer que existe uno o varios factores que se presentan a lo largo de la vida del sujeto y que desencadenan la

neurodegeneración en los individuos que a la postre presentarán la enfermedad. La mayor parte de estos factores parecen ser ambientales en el caso de la EP (Semchuk et al., 1993). El descubrimiento del factor o factores involucrados en la pérdida neuronal acelerada, constituye la piedra angular para el descubrimiento de una estrategia terapéutica eficaz para evitar la neurodegeneración, ya que las enfermedades neurodegenerativas dependen de un mecanismo que actúa por períodos relativamente prolongados antes de la aparición de los síntomas que las constituyen. Desde el descubrimiento de la relación existente entre la muerte de las neuronas nigroestriatales y la EP (Hornykiewicz y Kish, 1986), se han desarrollado un gran número de terapias enfocadas a la regulación de la transmisión sináptica dopaminérgica. Estas incluyen la administración del fármaco levodopa (Lees, 1994), de agonistas dopaminérgicos (Goetz, 1990), y de inhibidores de la monoamino-oxidasa tipo B (MAO-B) y de la catecol-O-metil-transferasa (COMT) (Olanow, 1993). Sin embargo, la pérdida acelerada de neuronas dopaminérgicas en la SNc de estos pacientes no ha podido ser controlada. Actualmente se cree que los signos que constituyen el parkinsonismo aparecen cuando la pérdida de las neuronas dopaminérgicas excede un umbral crítico (Ver Figura 1), el cual se cree que corresponde al 70-80% de las terminales nerviosas y un 50-60% de los cuerpos celulares en la SNc (Scherman et al., 1989). Después de la aparición de los signos clínicos, la muerte neuronal continúa y las alteraciones motoras se incrementan, aunque esta evolución es lenta (Schulzer et al., 1994).

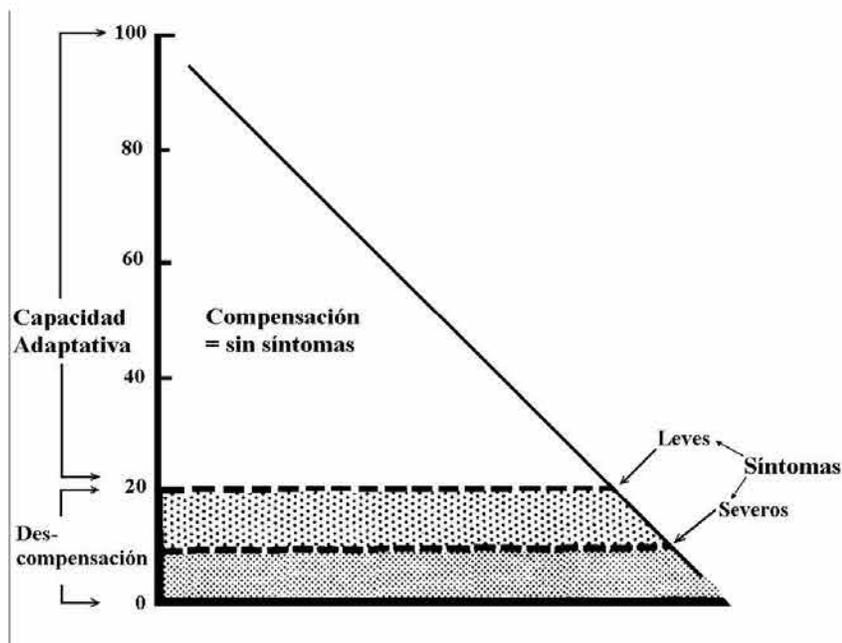


Figura 1. Curso temporal de la pérdida celular de la SNc en la EP. La pérdida gradual de las células de la SNc conduce a la aparición de los síntomas de la EP, los mecanismos de plasticidad sináptica generan una compensación funcional que evita que los síntomas sean evidentes. Al cruzar el umbral que divide la funcionalidad de la neurodegeneración es que estos síntomas se vuelven evidentes. Es este momento al que se denomina "edad de inicio" de la EP (Hornykiewicz y Kish, 1986).

La aparición gradual de los signos clínicos es debida a la existencia de mecanismos compensatorios, que podrían enmascarar el inicio de la EP, creando confusión en cuanto a la edad de inicio y la valoración de la gravedad de las alteraciones conductuales motoras. Varios factores se encuentran involucrados en dicho mecanismo de compensación, entre los que pueden contarse tanto las propiedades intrínsecas de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales como algunos fenómenos de plasticidad neuronal. Una vez establecido el evento neurodegenerativo, el control en el balance del contenido de dopamina se vuelve indispensable y la regulación de la actividad dopaminérgica busca su control homeostático (Bezard y Gross, 1998).

Actualmente la Enfermedad de Alzheimer se considera como la primera causa de demencia en el mundo. Sin embargo, en México, la EP se considera como la enfermedad neurodegenerativa mas frecuente, presentándose en un 12 a un 13% en los adultos de 65 años o mayores. En la mayoría de las naciones occidentales las tasas de prevalencia van de 50 a 180 por 100,000 habitantes, con

variaciones regionales en su distribución mundial. En México, sin embargo, se ha propuesto que esta prevalencia es menor, cercana a 44 por 100,000 como ocurre en países orientales como China y Japón. Sin embargo, a diferencia de otros países, las tasas en población rural son mayores que en la población urbana (Otero-S, 1996).

Es importante mencionar que la prevalencia mundial para el Parkinson secundario es diferente y más baja que para el Parkinson idiopático (EP), lo que se refleja de la siguiente manera:

Parkinson postencefálico	6% prevalencia del EP
Parkinson angioesclerótico	30% prevalencia del EP
Parkinson plus	1% prevalencia del EPI

El lento avance de la EP y de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas depende de varios factores denominados “factores de riesgo”. Entre estos factores se encuentran la edad de inicio de la sintomatología (que en la mayoría de los casos se correlaciona con la gravedad de los síntomas) y la interacción de los factores ambientales mencionados anteriormente y aquellos intrínsecos al sujeto (susceptibilidad genética) que forman parte del entorno y de la variabilidad biológica del mismo.

Este grupo de variables hace de la EP un padecimiento difícil de predecir y controlar. En la siguiente tabla se enumeran los principales factores de riesgo que han llamado la atención de los investigadores dedicados al estudio de la etiología de la EP (Ver Tabla 2).

FACTOR DE RIESGO	EVIDENCIAS	REFERENCIAS
Edad	Elevada Incidencia de EP en pacientes mayores de 65 años	Baldereschi et al., 2000;
Género	Mayor incidencia (2 veces mas) en hombres que en mujeres	Dluzen y McDermott, 2000; Baldereschi et al., 2000;
Raza	Menor frecuencia en afro-americanos y japoneses que en caucásicos	Eastham et al., 1996; Kurtzke J.F. y Goldberg, 1988
Asentamientos rurales	Agua de pozo, agricultura	Priyadarshi et al., 2001; Gorell et al., 1998
Pesticidas	Paraquat, dieldrin, paraxonasas	Fleming et al.,1994; Blair et al.,1993; Akhmedova et al., 2001
Fungicidas	Maneb (contiene Mn)	Kurtzke y Murphy,1990; Thiruchelvam et al., 2000
Industria	Exposición a: Manganeso e Hidrocarburos.	McMillan D.E., 1999; Iregren, 1999; Hudnell, 1999; Pezzoli et al., 2001

Tabla 2. Principales factores de riesgo considerados como desencadenantes de la EP.

Las diferencias de género, edad, escolaridad, tipo de asentamiento (rural o ciudadano) y tipo racial entre otras, son empleadas en estudios controlados como covariables para corregir los sesgos derivados de la comparación entre poblaciones. La posible causa de estas diferencias ha sido estudiada con detenimiento. Asimismo, la realización de una serie de estudios epidemiológicos ha enfocado la atención de investigadores de todo el mundo en otros factores considerados hasta el momento como “neuroprotectores”

Entre los factores protectores de la EP que llaman más la atención se encuentra el tabaquismo (Baron, 1986; Sugita et al., 2001). Las teorías al respecto señalan dos posibilidades. La primera, sugiere la presencia de sustancias inductoras de metaloproteínas neuroprotectoras en las hojas del tabaco (Fratiglioni y Wang, 2000), mientras que la segunda presume que dicha neuroprotección es derivada de la inhibición de la apoptosis por la nicotina a través de la inhibición de la digestión de la cromatina en el sistema dopaminérgico. Este evento en regiones externas al SNC, podría desencadenar la generación de neoplasias, pero que en el cerebro favorece la supervivencia de grupos neuronales vulnerables como las células de la SNc (Peitsch et al., 1994; Kelton et al., 2000).

Entre los factores considerados como de riesgo para la aparición de la EP se encuentran las diferencias en la pigmentación cutánea (melanina). De esta manera, mientras para los sujetos caucásicos este es un factor de riesgo, para el caso de los japoneses y negros esto ha sido considerado como un factor protector. Asociada a la susceptibilidad de algunos grupos raciales también han sido estudiados diversos factores demográficos como la alimentación, nivel de industrialización y clima (Eastham et al., 1996).

Si bien las diferencias de género son consideradas (en el caso de los varones), como un factor de riesgo, algunas evidencias señalan a los factores hormonales como protectores. Estas líneas de investigación han derivado en la propuesta de una protección estrogénica (Dluzen y McDermott, 2000). Los estrógenos parecen ejercer una acción neuroprotectora selectiva sobre los ganglios basales, lo que podría asociarse al incremento en la síntesis de proteínas encargadas de la defensa celular (ceruloplasmina), confiriéndoles de esta manera

resistencia a los eventos neurotóxicos que participan en la neurodegeneración a aquellos individuos capaces de generarlos (Sawada y Shimohama, 2000). Esto se ha demostrado a partir de estudios llevados a cabo en ratas sujetas a tratamiento con estradiol, en las que se reporta un incremento en el contenido de cobre y de ceruloplasmina en suero y tejido cerebral, al tiempo que el contenido de cobre en los depósitos hepáticos se reduce significativamente (Mehta y Eikum, 1989).

A pesar de todos estos estudios aún no se ha podido demostrar el papel que cada uno de los factores mencionados juega en la generación de la susceptibilidad o neuroprotección, asociada a la neurodegeneración presente en la EP.

4.2. Alteraciones de la vía nigroestriatal en la enfermedad de Parkinson.

Como se ha mencionado, la enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por la pérdida acelerada de las neuronas de la *sustantia nigra pars compacta* (SNc), que mandan proyecciones axonales al cuerpo estriado (caudado-putamen) a través de la vía nigroestriatal (Ver Figura 2). Las neuronas de la SNc proyectan sus axones en sentido rostral hacia neuronas GABAérgicas en el cuerpo estriado. La estimulación de receptores tipo D1 en estas células GABAérgicas puede considerarse excitadora y la de receptores del tipo D2, inhibidora. Las células con impulsos aferentes tipo D1 se proyectan a través de la vía directa hacia la parte *reticulata* de la *sustantia nigra* (*sustantia nigra pars reticulata* (SNr)) en donde proporcionan impulsos inhibidores.

Las células estriatales que expresan principalmente receptores D2 se proyectan sus axones a través de la vía indirecta hacia la parte externa del *globus pallidus* (GPe) en donde también proporcionan estímulos inhibidores. A continuación, las neuronas GPe GABAérgicas inhiben células del núcleo subtalámico (STN) que envían conexiones excitadoras a la parte interna del *globus pallidus* (GPi), un grupo de células análogo funcionalmente a la SNr. Por lo tanto, las neuronas estriatales inhiben células en la SNr a través de la vía directa y excitan células en el GPi a través de la vía indirecta. Tanto las células GPi como las de la SNr se proyectan a continuación al tálamo motor, en donde inhiben la generación del movimiento. Debido a que la dopamina excita a la vía indirecta e inhibe la indirecta, su pérdida en la EP origina menor actividad en la vía directa y

mayor en la indirecta, con el efecto neto de incremento de la actividad en la SNr y el GPi y movimiento reducido. La lesión quirúrgica de la vía indirecta en el GPi, desarrollada originalmente a partir de este circuito, reduce con efectividad los síntomas en la EP (palidotomía). (Olanow, 2002).

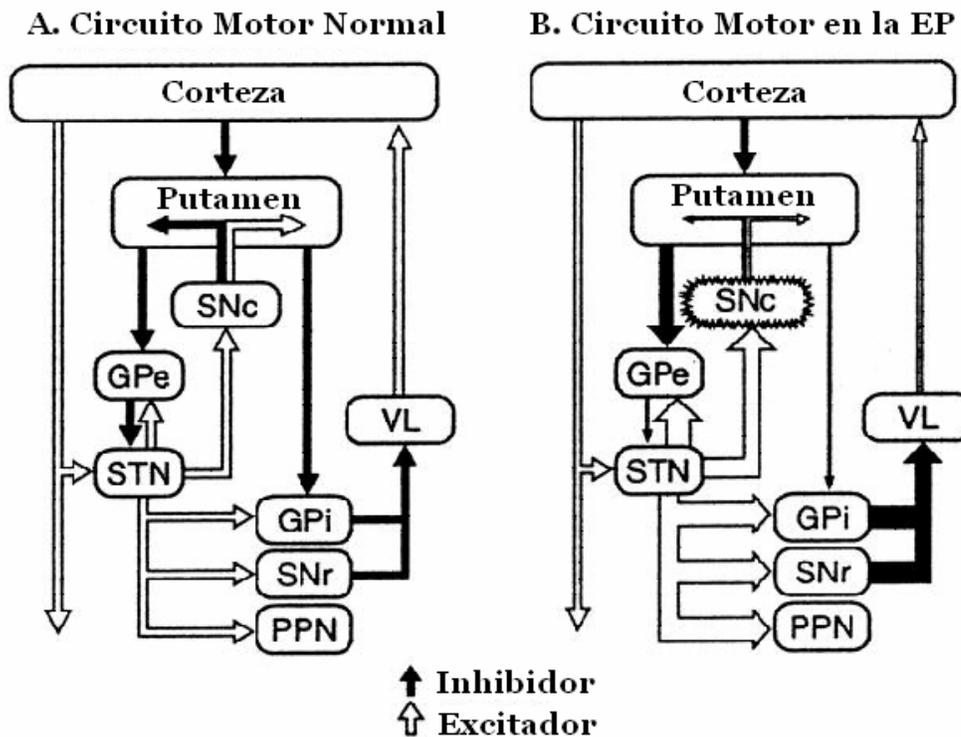


Figura 2. Alteraciones de la vía nigroestriatal en la EP. GPe= Globus pallidus externo; GPi= Globus pallidus interno; SNC= Substantia nigra pars compacta; SNr= Substantia nigra pars reticulata; STN= Núcleo Subtalámico; VL= Tálamo Ventrolateral (Pollack, 2001).

4.3 Teorías asociadas a la etiología de la EP.

1) *Teoría de la aparición fortuita o del envejecimiento acelerado.* Esta teoría propone que la muerte de las neuronas dopaminérgicas ocurre de manera normal y es acelerada por factores que se encuentran en contacto con el sujeto a lo largo de su vida, acelerando los procesos de envejecimiento (Calne et al, 1983).

2) *Teoría del Soporte Neurotrófico:* Apoya la idea de que la falla en la producción de neurohormonas o factores de crecimiento, es la responsable de un deficiente mantenimiento en la supervivencia neuronal en zonas específicas del SNC, lo que

a su vez podría predisponer al sujeto al desarrollo de la enfermedad de Parkinson (Robbins et al., 1985).

3) *Teoría de la falla en la reparación de DNA*: Propone la existencia de defectos en los mecanismos de reparación del DNA. Esto se deriva de estudios con cultivos de fibroblastos de pacientes con EP, los cuales son hipersensibles a los efectos letales de los agentes que dañan al DNA, como son las radiaciones ionizantes (rayos X, generación de radicales libres). (Barbeau y Pourcher, 1982).

4) *Predisposición genética*: Los factores genéticos involucrados en la EP son según esta teoría, los que inician el daño neuronal en la EP a través de la generación de cambios fisiológicos importantes a lo largo de la vida del sujeto, que lo predisponen a la neurodegeneración quizás inducida por factores externos (Langston et al., 1983).

5) *Etiología Viral*: La relación viral con la EP ha sido propuesta ya que los virus convencionales pueden inducir una forma de EP como una rara complicación de una infección (Parkinson post-encefalicó). Las evidencias de esto son pocas y han sido estudiadas sobre anticuerpos virales enmascarados (Elizan y Casals, 1983).

6) *Compuestos tóxicos ambientales (MPTP)*: Uno de los más grandes avances en la etiología de la enfermedad se dio lugar como resultado del descubrimiento de que la administración accidental de la neurotoxina MPTP análoga a la meperidina sintética era capaz de generar Parkinson. Los sujetos que se administraron por vía intravenosa (i.v.) la droga contaminada con la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) presentaron la sintomatología típica de la EP, que además demostró ser crónica e irreversible y capaz de controlarse con levodopa (L-DOPA) (Langston et al., 1983). Basándose en estos hallazgos, investigadores de todo el mundo adoptaron la administración de dicha toxina el fin de desarrollar un modelo experimental de la EP, el cual es considerado como el modelo que

mejor representa los trastornos bioquímicos y conductuales de esta enfermedad. Desde su descubrimiento, algunos investigadores han propuesto que gente expuesta a compuestos con similar conformación química presentes en la industria o en forma natural, podrían desarrollar EP.

7) *Compuestos Inhibidores de la Cadena Respiratoria Mitocondrial.* Uno de los trastornos bioquímicos que se destacan en el desarrollo de la neurodegeneración en la EP es el déficit energético derivado de la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (que será detallado posteriormente). De esta manera, la administración de inhibidores como rotenona (inhibidor del complejo I) demuestra la importancia de estos trastornos en el establecimiento de los eventos neurodegenerativos. Basados en dichos hallazgos, algunos autores han apoyado la idea de que la EP es una mitocondriopatía, idea que ha sido rebatida por algunos grupos en razón de que la EP incluye además otros factores, que no se encuentran involucrados únicamente con la falla mitocondrial.

8) *Alteraciones en la α -Sinucleína, la Parkina y la Ubiquitina c-hidroxilasa.* El reciente descubrimiento de dos alteraciones genéticas asociadas al desarrollo de la EP ha llevado a un grupo de investigadores en todo el mundo a evaluar la posible participación de los factores genéticos involucrados en la EP en base a trastornos en dos proteínas conocidas como α -sinucleína y parkina, las cuales se encuentran asociadas con algunos casos de Parkinson familiar.

La α -sinucleína es una proteína presináptica pequeña de función desconocida, cuyos agregados se encuentran asociados a la presencia de cuerpos de Lewy, (depósitos de proteínas ubiquitinadas) considerados como una de las evidencias histopatológicas que caracterizan a la EP entre otras enfermedades neurodegenerativas (como la demencia con cuerpos de Lewy y la atrofia multisistemas, entre otras) (Lucking & Brice, 2000; Galvin et al., 2001). La presencia de agregados de α -sinucleína tampoco es privativa de la EP, sino que

forma parte de un grupo de padecimientos neurodegenerativos a los que se ha denominado sinucleopatías (Galvin et al., 2001). Sin embargo, el descubrimiento de ésta forma autosómica dominante de la enfermedad de Parkinson ha llevado a numerosos grupos al estudio de los factores asociados al desarrollo de la misma (Spillantini et al., 1998; Galvin et al., 1999; Kaplan et al., 2003).

Por su parte, la parkina es una E3-ubiquitina ligasa. Esta familia de proteínas se encarga de unir pequeñas cadenas de péptidos de ubiquitina a algunas proteínas (ubiquitinación) con el fin de evitar su degradación a través de la vía de degradación proteosomal (Lücking et al., 2000). La mutación de la parkina altera su capacidad como ubiquitina ligasa y genera en el paciente una forma autosómica recesiva de Parkinson. A pesar de que la incidencia de las mutaciones de la parkina es mayor a la observada en los casos de alteraciones en la α -Sinucleína, ésta última ha llamado especialmente la atención de los investigadores, debido a su asociación con algunos trastornos bioquímicos que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad, así como debido a la relación que guarda con la parkina misma, ya que recientes estudios sugieren que el recambio de la α -Sinucleína depende de su ubiquitinación por la parkina (Shimura H. et al., 2001).

9) *Compuestos tóxicos endógenos (Salsolinol)*: Durante el desarrollo de las investigaciones sobre los mecanismos de toxicidad de la MPTP, algunos grupos alrededor del mundo hicieron descubrimientos que dan apoyo a la teoría de los compuestos tóxicos endógenos, ideada desde épocas tempranas hasta ese momento sin ningún argumento decisivo. Actualmente, algunas investigaciones han logrado determinar coincidencias sorprendentes entre el modelo de MPTP con la generación de compuestos endógenos tóxicos. Entre este tipo de compuestos se encuentran las tetrahidroisoquinolinas, siendo la más representativa de dichas moléculas el salsolinol, derivado de la condensación entre aminas biogénicas y acetaldehídos que habitualmente coexisten en las células (Naoi et al., 1993; Antkiewicz-Michaluk et al., 2000).

A continuación presentamos un esquema de algunos factores de generación del Parkinson propuesto por Ischiropoulos y Beckman en 2003, basándose en propuestas previas de Jenner y colaboradores en 1992.

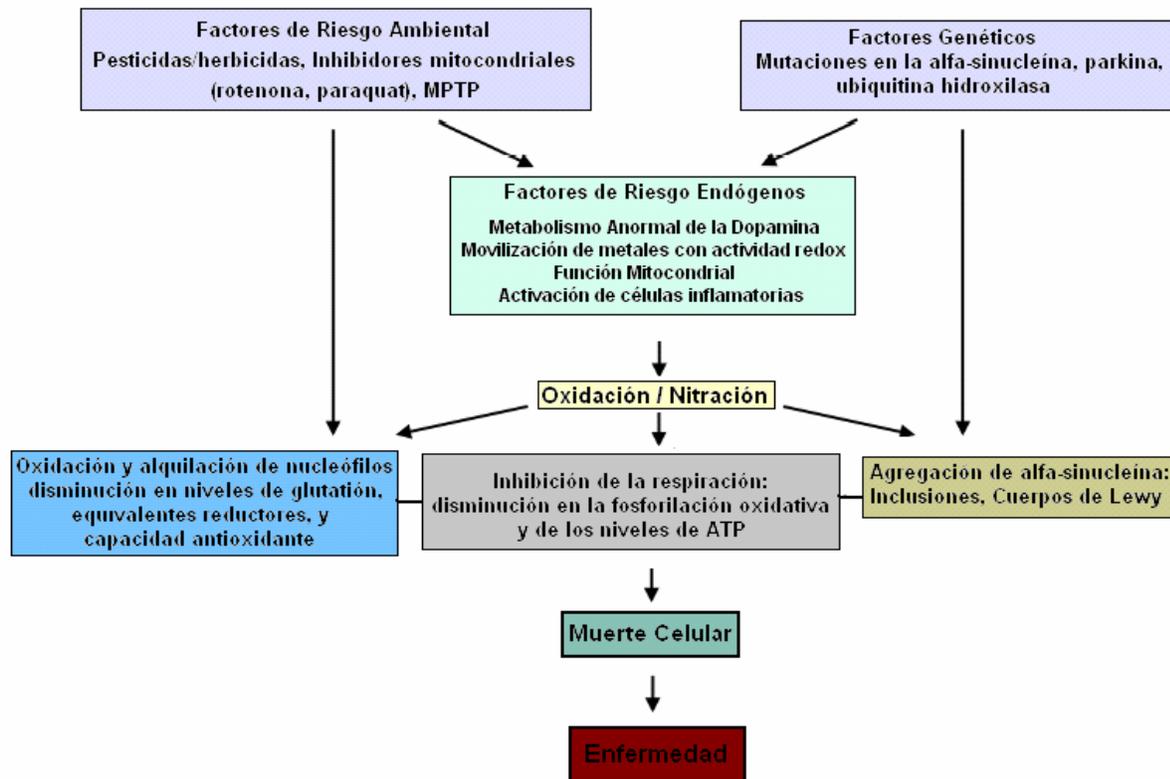


Figura 3. Propuesta de los factores asociados al desarrollo de la EP (Ischiropoulos y Beckman, 2003)

De acuerdo con lo propuesto por Hornykiewicz (1966), el síndrome rígido-acinético derivado de la falta de dopamina, es la consecuencia de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, en especial de aquellas que se encuentran en la *substantia nigra*, asociadas a la presencia de cuerpos de Lewy. La susceptibilidad genética podría determinar un metabolismo aberrante de sustancias químicas cerebrales, o bien incapacitar a las células en la defensa en contra de toxinas exógenas. La idea de un componente genético implicado en el desarrollo de la EP se apoya no solo en la idea de un déficit en la expresión de proteínas antioxidantes, sino

también en el desarrollo de estudios recientes sobre las mutaciones de la α -Sinucleína y la parkina, mencionadas con anterioridad (Ma et al., 2003).

El metabolismo de la dopamina por sí sola podría potenciar la neurotoxicidad. Las toxinas exógenas podrían ser poco comunes pero letales o tóxicas a la SNc si el sistema se encuentra en desventaja, dependiendo del grado de incapacidad del sistema de defensa para controlarlas; en caso contrario, inclusive podría ser inocua su presencia. Además, los procesos de envejecimiento podrían contribuir en la vulnerabilidad de la SNc hacia cualquiera de estos agentes (Jenner et al., 1992).

4.4. Trastornos Neuroquímicos en la Enfermedad de Parkinson.

4.4.1. Sistemas dopaminérgicos alterados en la EP.

La dopamina es considerada como un neurotransmisor clásico cuya localización se encuentra principalmente relacionada con 4 vías dopaminérgicas principales: 1) *Vía Nigroestriatal*: Es la vía mas alterada en la EP (de neuronas mesencefálicas A9 (SNc hacia el cuerpo estriado); 2) *Vía Mesolímbica*: Que manda proyecciones neuronales (desde neuronas mesencefálicas A8, hacia hipocampo, corteza del cíngulo y amígdala); 3) *Vía Mesocortical*: Cuyas proyecciones van del grupo mesencefálico A10 hacia la corteza prefrontal e hipocampo. 4) *Vía Tubero-Infundibular* del hipotálamo. En asociación a estas vías, la retina es considerada también como un sitio de importante concentración dopaminérgica (Siegel et al., 1999).

Los trastornos motores, que en conjunto conforman la principal manifestación clínica de la EP, se ven asociados con una disminución en las concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado (caudado-putamen), con el putamen marcadamente más afectado que el núcleo caudado (Bernheimer et al., 1973). Esto es debido al patrón específico de la pérdida de las células nigrales en la EP, con las porciones caudal (y lateral) de la *substantia nigra pars compacta*- que se proyectan preferentemente hacia el putamen - mas severamente degeneradas que la porción rostral (y media) de la nigra (que se proyecta a su vez hacia el núcleo caudado) (Bernheimer et al., 1973).

Para comprender el efecto que las alteraciones en la concentración estriatal de dopamina induce en los pacientes con EP es importante señalar los principales

pasos de la síntesis y degradación de este neurotransmisor, así como hacer énfasis en el papel de diversas enzimas (y cofactores) y su relación con otras catecolaminas. De esta manera, dichos eventos podrían resumirse de la siguiente manera:

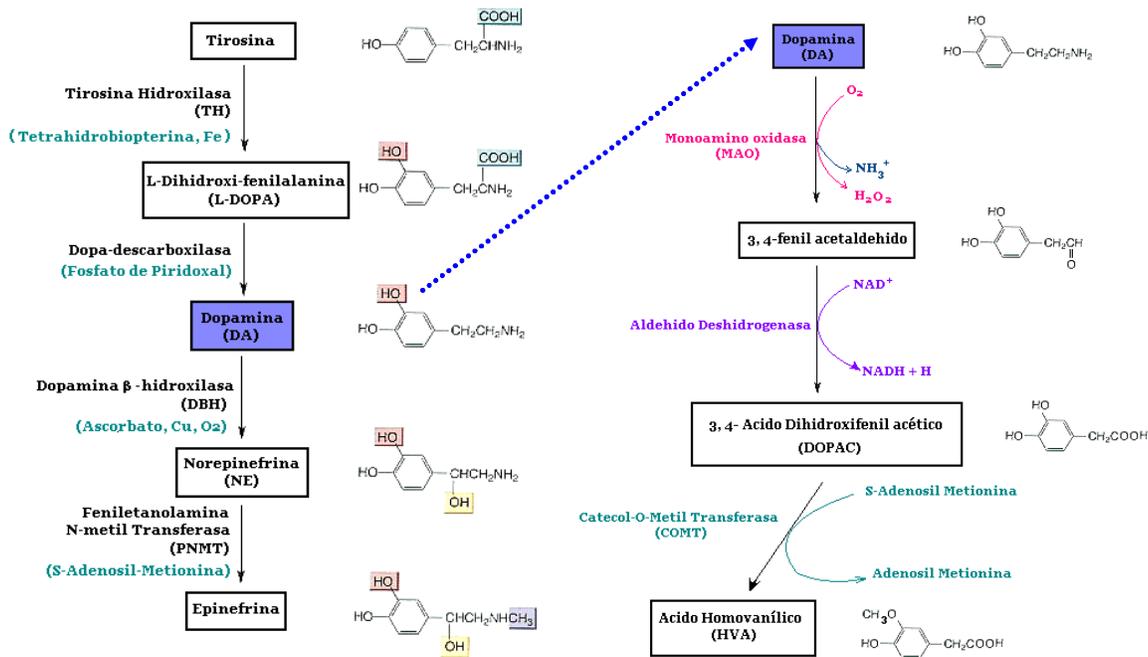


Figura 4. Síntesis de las catecolaminas (Siegel et al., 1999).

Habitualmente, las concentraciones de catecolaminas libres presentes en el citosol son bajas, donde son metabolizadas por enzimas, que incluyen a la monoamino-oxidasa (MAO). Por lo tanto, la conversión de tirosina a L-DOPA y de L-DOPA a dopamina (DA) es llevada a cabo en el citosol; la DA es entonces guardada en vesículas para su almacenaje en el interior celular. En las neuronas que contienen norepinefrina (NE), la β-hidroxi-lación final es llevada a cabo en el interior de las vesículas. En la glándula adrenal, la NE es N-metilada por la PNMT en el citoplasma. La epinefrina es entonces transportada dentro de los gránulos cromafines, donde es almacenada (Siegel et al, 1999).

A pesar de que el precursor inmediato de la dopamina es la levodopa (L-DOPA) (derivado del aminoácido tirosina), la Tirosina Hidroxilasa (TH) es

considerada como la enzima paso-limitante de la síntesis de dopamina. Esto es debido a que la dopa-descarboxilasa, también llamada descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos es inespecífica, mientras que la evaluación del número de células reactivas a TH es considerada como un método de localización de neuronas catecolaminérgicas. Los cofactores asociados con las funciones descritas, así como la L-tirosina en su mayoría provienen de la dieta, por lo que algunos autores han sugerido que la falta de algún cofactor o la incapacidad de integrarlo al sistema, podría ser uno de los factores que determinen la susceptibilidad del sujeto para el desarrollo de la enfermedad.

Así como la síntesis de las catecolaminas se encuentra asociada a diversas enzimas, su catabolismo es dirigido a través de enzimas como la monoamino oxidasa (MAO). El principal metabolito de la dopamina es el ácido homovanílico, de manera que el cociente resultante entre las concentraciones de DA y HVA es considerado un fiel reflejo del recambio de dopamina. Además del cuerpo estriado, principal foco en las disminuciones de dopamina cerebral debido al deterioro en la vía nigroestriatal, otras regiones cerebrales asociadas y no asociadas directamente con esta vía se encuentran alteradas en la EP. Regiones límbicas subcorticales tales como el *nucleus accumbens*, el área olfatoria media, el hipotálamo lateral y el núcleo amigdaloides muestran una reducción en los niveles de DA y/o HVA. En la médula espinal se ha reportado una moderada reducción en las concentraciones de DA en las astas dorsal y lateral, pero no en la ventral. Estas alteraciones podrían ser consecuencia de la pérdida de las fibras dopaminérgicas diencefálicas y/o mesencefálicas que concluyen en la médula espinal (Scatton et al., 1984).

4.4.1.1. Actividad Tirosina Hidroxilasa (TH).

4.4.1.1.1. Mecanismos de regulación de la actividad de la TH.

Como se mencionó, la TH es la enzima paso-limitante para la formación de DA. La actividad de esta enzima se regula por diferentes mecanismos entre los que se encuentran involucrados tanto mecanismos a corto como a largo plazo. La regulación a corto plazo incluye cambios post-traduccionales, tales como la fosforilación de la enzima y su inhibición por catecolaminas, mientras que la regulación a largo plazo

involucra modificaciones transcripcionales y alteraciones en la estabilidad de la enzima (Hearing y Jiménez, 1987; Kappock y Caradonna, 1996; Gahn y Roskoski, 1995).

La inhibición por producto final generada por las catecolaminas sobre la TH se reportó hace más de 40 años (Nagatsu et al., 1964). Actualmente se sabe que esta inhibición se encuentra relacionada con la alta afinidad de las catecolaminas por el hierro confinado al sitio activo de la TH y otras hidroxilasas de aminoácidos aromáticos (Soret et al., 1995). Las catecolaminas atrapan el Fe(III) del sitio activo de la TH, pero parece que además también protegen a la TH de su inactivación (Kumer y Vrana, 1996) al prevenir su interacción con el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y otros oxidantes. Aunque las catecolaminas se unen al sitio activo de la TH, es el dominio amino terminal (N-terminal) el que se encuentra involucrado en la regulación por producto final. Por lo tanto, las formas truncadas de TH de rata y humano, que carecen de 52-157 aminoácidos de la porción N-terminal, son más susceptibles a la inhibición por catecolaminas y a tener actividades específicas mayores o iguales a las que las enzimas originales poseen (Ota et al., 1996; Moffat et al., 1997).

La secuencia N-terminal de la TH de mamíferos contiene varios residuos de Serina que se sabe son fosforilados por varias protein-cinasas (Ser8, Ser19, Ser31 y Ser40). La regulación por medio de las cinasas es específica para cada uno de los residuos. De esta manera, se sabe que la Ser8 es fosforilada *in vitro* por una proteína-cinasa relacionada a las protein-cinasas ciclina-dependientes, la Ser19 se fosforila por la protein-cinasa II calmodulina-dependiente (CAM cinasa II) y por la protein-cinasa-2 activada por la MAP-cinasa (MAP-KAPK-2; Sutherland et al., 1993). La Ser31 es fosforilada por la protein-cinasa activada por mitógeno (MAPK), mientras la Ser40 es fosforilada *in vitro* por la CAM cinasa-II, la protein-cinasa AMPc-dependiente (PKA), la protein-cinasa C (PKC), la MAPKAPK-1, y la MAPKAPK-2. Resulta interesante que la regulación de la TH por fosforilación y a través de la unión de catecolaminas son fenómenos relacionados, ya que la fosforilación de la Ser40 incrementa la K_i para la inhibición de las catecolaminas (Daubner et al., 1992).

Entre los mecanismos que se asocian a la regulación a largo plazo también se encuentran los mecanismos de fosforilación. Las hormonas (glucocorticoides), drogas (cocaína), o segundos mensajeros tales como el AMPc, incrementan la transcripción de

la TH (Kumer y Vrana, 1996). El AMPc activa a la PKA, la cual fosforila y activa a los elementos de respuesta a unión de proteínas asociados al AMPc (CREB y/o *c-jun*). La unión a dichos elementos de respuesta en la región promotora del gen de la TH, induce de esta manera su transcripción (Kim et al., 1993).

Las alteraciones de la expresión de la TH por medio del “procesamiento alternativo” (*alternative splicing*) del RNA de la TH fueron descubiertas inicialmente en humanos, mecanismo del que se derivan por lo menos cuatro isoformas diferentes de la TH (Grima et al., 1987). La presencia de diferentes isoformas con diferencias en su actividad y distribución regional ha sugerido que el procesamiento alternativo podría actuar como un mecanismo adicional en la regulación de la actividad de la TH y en el control de la síntesis de catecolaminas, ya que se ha visto que en pacientes con parálisis supranuclear progresiva, estas variantes del RNAm son producidas en un mayor porcentaje a lo observado en sujetos testigo (Dumas et al., 1996).

La regulación a largo plazo de la actividad de la TH también involucra mecanismos post-transcripcionales (Tumer et al., 1996). La limitada disponibilidad de oxígeno (hipoxia), incrementa tanto el porcentaje de transcripción del gen de la TH como la estabilidad del RNAm en los cuerpos carotídeos (Czyzyk Krzeska et al., 1992) y en las células PC12 sensibles a oxígeno (Czyzyk Krzeska et al., 1994). El incremento en la estabilidad se correlaciona con un incremento en la unión de una proteína citoplásmica a la secuencia en la región 3' del RNAm de la TH, lo que podría estar protegiendo al RNAm de la degradación por nucleasas (Czyzyk Krzeska et al., 1997).

4.4.1.2. La Tirosina hidroxilasa en la EP.

Actualmente el tratamiento de la EP se basa en la administración de sustancias que compensen la deficiencia de DA en las neuronas dopaminérgicas. Dichos tratamientos incluyen la administración de L-DOPA. Sin embargo, se ha especulado que la L-DOPA exógena podría ser una fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (Walkinshaw y Waters, 1995). La administración de agonistas dopaminérgicos solos o en conjunto con la administración de L-DOPA, es exitosa y suprime una gran variedad de síntomas de la enfermedad. Sin embargo, el tratamiento gradualmente

pierde su capacidad, quizás debido a la pérdida de eficacia del fármaco, o bien debido a la aparición de efectos secundarios (p. Ej. Discinesias). Actualmente no se sabe si esto es debido al transcurso natural de la degeneración o bien a la toxicidad generada por el tratamiento. Debido a todo esto, la restitución de la enzima paso limitante de la síntesis de DA se sugiere como una alternativa terapéutica posiblemente asociada a la implementación de trasplantes celulares o terapia génica (Haavic y Toska, 1998).

Ya que posiblemente la deficiencia en TH sea el factor limitante en la producción de DA en la EP, recientemente se propuso la introducción de genes a través de su transfección en modelos experimentales *in vivo*, utilizando diferentes vectores que incluyen plásmidos o virus recombinantes con secuencias blanco y/o sistemas para regular la expresión del gen (Miller y Vile, 1995), lo que podría restituir su función.

4.4.2. Sistemas no-dopaminérgicos alterados en la EP.

4.4.2.1. Monoaminas.

Las concentraciones de norepinefrina se encuentran reducidas en muchas regiones del cerebro de pacientes con EP, que incluyen los ganglios basales y áreas asociadas del tallo cerebral (caudado, putamen, núcleo *accumbens*, *globus pallidus* y *substantia nigra*), así como regiones extra-estriatales como el hipotálamo (Javoy-Agid, 1984), la corteza, el cerebelo y la médula espinal. La pérdida marcada de neuronas noradrenérgicas (NAg) sugiere que tanto los sistemas *del locus ceruleus*, como los sistemas del área tegmental lateral están afectados en la EP. La pérdida de células en el *locus ceruleus* es una alteración característica de la EP (Hornikiewickz y Kish, 1986).

Por otro lado, una pérdida moderada de serotonina (5-HT) y su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) se ha detectado en muchas regiones del cerebro y médula espinal de pacientes con EP (Scatton et al., 1983). La disminución en las concentraciones de este neurotransmisor en el núcleo del rafe, sugiere que en la EP existe una moderada pérdida de estas células que dan lugar a tractos de fibras ascendentes y descendentes. Por otro lado, también se ha reportado un incremento en la unión a receptores 5-HT_{2C} en la *substantia nigra pars reticulata* en la EP (Fox y Brotchie, 2000).

4.4.2.2. Sistemas colinérgicos.

En los ganglios basales, la actividad de la enzima considerada como la marcadora neuronal de la acetilcolina (ACh), la colina acetiltransferasa (ChAT) se ha reportado inalterada (Ruberg et al., 1982) o reducida (Reisine et al., 1977) en el estriado de pacientes que murieron con la EP.

Además, la actividad de la ChAT se encuentra predominantemente reducida en algunas regiones corticales inervadas por grupos celulares colinérgicos localizados en el *nucleus basalis* (Ruberg et al., 1982). La disminución cortical e hipocampal de la ChAT, se presume, es debida a la pérdida celular en el *nucleus basalis* que comúnmente se aprecia en la EP (Candy et al., 1983).

Actualmente, se encuentra bien establecido que los receptores nicotínicos en el estriado de los mamíferos están involucrados en la modulación de la liberación de algunos neurotransmisores, que incluyen a la dopamina. Además, los receptores nicotínicos con alta afinidad por agonistas están generalmente reducidos en el cuerpo estriado de pacientes con la EP. Inclusive algunos autores han logrado identificar cuales son las subunidades de estos receptores que contribuyen a la deficiencia de receptores nicotínicos en la EP. Entre las subunidades analizadas se encuentran la α -3, α -4, α -7 y β -2, los cuales demostraron estar inalterados, al mismo tiempo que la unión a receptores para la [³H] nicotina disminuyó. Estos resultados podrían sugerir que dicha pérdida de unión a nicotina en el putamen podría involucrar otra subunidad del receptor (α -5 ó α -6), o bien alteraciones en el ensamblaje de la subunidad al receptor (Martin-Ruiz et al., 2000; Durany et al., 2000).

A pesar de lo anterior, el papel de la ACh y sus receptores no ha sido clarificado con certeza aún en la EP. Sin embargo, se ha establecido el papel de la nicotina en la neuroprotección (Ver Tabla 2). Este hallazgo, tiene su base en estudios epidemiológicos que correlacionan al tabaquismo como factor protector para el desarrollo de la EP y en modelos de neurodegeneración en roedores, donde ha tenido efectos interesantes. Por ejemplo, se ha reportado que la administración de nicotina en dos modelos de daño dopaminérgico (MPTP+ Dietilditiocarbamato y administración de metanfetaminas en roedores) promueve un aumento en los niveles de factores neurotróficos en estriado y

previene el parkinsonismo generado por la falta de dopamina estriatal en ambos modelos. Ya que algunos factores neurotróficos tienen efectos neuroprotectores en contra de la muerte de neuronas dopaminérgicas en la EP, los autores sugieren que este podría ser el mecanismo asociado a la neuroprotección de la nicotina en la EP (Maggio et al., 1998).

4.4.2.3. GABA.

En la EP las concentraciones de GABA se encuentran elevadas en el estriado (Kish et al., 1986) , mientras que la actividad de la enzima utilizada como marcador de neuronas GABAérgicas, la glutamato descarboxilasa (GAD), se encuentra reducida en los ganglios basales (caudado, putamen, *globus pallidus*, *substantia nigra*) de pacientes con la EP (Gaspar et al., 1980). En contraste, las reducciones extraestriatales de la GAD podrían ser resultado de los efectos *post mortem* (Monfort et al., 1985).

Posteriormente, Jiménez-Jiménez y colaboradores, evaluaron las concentraciones de glutamato, glutamina, glicina y GABA en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de 31 pacientes con EP. Los pacientes con EP no mostraron tener diferencias estadísticamente significativas con los sujetos testigo en los niveles de glutamato, glutamina y glicina, mientras los niveles de GABA en el LCR se reportaron como elevados al compararlos con los niveles de los sujetos control (Jiménez-Jiménez et al., 1994).

4.4.2.4. Neuropéptidos.

Se han reportado bajos niveles de los neuropéptidos meta-enkefalina, LBU-enkefalina, colecistokinina y sustancia P (Mauborgne et al., 1983; Studler et al., 1982; Taquet et al., 1983) en el putamen, *globus pallidus*, y/o *substantia nigra* -área tegmental ventral (ATV).

Por otro lado, no se han encontrado cambios en los niveles de la hormona liberadora de tirotrópina (Javoid-Agid, et al, 1983), vasopresina (Rossor et al., 1982), neurotensina (Bissette et al., 1985), ni somatostatina (Epelbaum et al., 1983) en los ganglios basales de pacientes con la enfermedad.

4.4.3. Receptores dopaminérgicos.

Como un reflejo de las alteraciones en las concentraciones de los neurotransmisores, los receptores sufren fenómenos de hipersensibilidad (afinidad; Kd) a través de mecanismos de regulación asociados a eventos post-transcripcionales y/o post-traduccionales. En el caso específico de los receptores dopaminérgicos su actividad y número cambian como una estrategia para compensar la falta de dopamina en la sinapsis. Los cambios funcionales y bioquímicos generados por las neuronas en la búsqueda de mecanismos compensatorios son representados en la siguiente tabla:

Sitio	Cambio funcional	Cambio bioquímico
Presinapsis	Hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas restantes	Incremento en el recambio de DA
Postsinapsis	Hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos	Incremento en el número de receptores D2

Tabla 3. Cambios funcionales y bioquímicos en los receptores dopaminérgicos. Dopamina (DA), Autoreceptor D2 (D2) (Hornykiewicz y Kish, 1986).

La destrucción de los sistemas dopaminérgicos nigroestriatales tienen consecuencias claras y reproducibles. Lesiones unilaterales de este sistema produce conductas de giro. Estudios conductuales en ratas lesionadas indican que los receptores dopaminérgicos en el estriado denervado son supersensitivos. La administración de agonistas dopaminérgicos (tales como la apomorfina) que estimulan selectivamente a los receptores dopaminérgicos, induce la conducta de giro en ratas con lesiones unilaterales de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. El número de receptores dopaminérgicos en el estriado ipsilateral a la lesión incrementa significativamente, lo que parece correlacionarse con el grado de supersensibilidad conductual, reflejado a través de la conducta de giro. La pérdida de la dopamina mesencefálica en la enfermedad de Parkinson se acompaña por la marcada pérdida del transportador de dopamina y un incremento en la densidad de receptores D1 y D2. Estas alteraciones se presentan en el núcleo caudado y putamen de pacientes no-medicados. El tratamiento con agonistas dopaminérgicos (Barbeau, 1986) y L-DOPA a

largo plazo, parecen restaurar la densidad normal de receptores D1 y D1/D2, respectivamente (Cooper et al., 1991).

4.4.4. Estrés Oxidante.

4.4.4.1. Generalidades.

La funcionalidad del SNC requiere de un intrincado y exquisito balance de numerosos procesos eléctricos y químicos. Actualmente, se sabe que muchos de estos procesos son vulnerables a la presencia de radicales libres entre ellos, las especies reactivas del oxígeno (EROS) (Moore y Roberts, 1998).

Los radicales libres son definidos como aquel átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados. Esta característica los hace altamente inestables, capaces de reaccionar con casi cualquier molécula biológica. Estos radicales son generados de manera natural en el interior celular y son considerados intermediarios en la reducción del oxígeno. Estos intermediarios incluyen al radical superóxido, al peróxido de hidrógeno (EROS reactiva no considerada radical libre, pero con potencial para la generación de los mismos) y al radical hidroxilo, que corresponden a la reducción por uno, dos y tres electrones respectivamente (De Zwart et al., 1999). Además, estas moléculas pueden generar a su vez más especies reactivas del oxígeno al combinarse con otras moléculas biológicas, aumentando de esta manera su vida media (que en algunos casos es muy reducida; ver Tabla 4) incrementando su distribución y alcance de daño (Bergendi et al., 1999).

Intermediario	Fórmula	Tiempo de vida media (segundos)
Radical Hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-9}
Anión Peroxinitrito	ONOO^-	0.05-1.0
Radical Peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	7
Oxido Nítrico	NO	1-10
Semiquinona (radical)	$\cdot\text{SQ}$	Días
Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2	Descomposición enzimática
Radical Superóxido	$\text{O}_2\cdot$	Descomposición enzimática

Tabla 4. Vida media de los radicales libres (Sies H., 1993).

El radical superóxido (Tabla 4) contiene tres electrones en los orbitales y cuando es disuelto en disolventes orgánicos es extremadamente reactivo. Dos moléculas de superóxido son reducidas por dismutación (con dos protones) a peróxido de hidrógeno. A un pH fisiológico, la baja concentración de protones reduce el porcentaje de dismutación. El peróxido de hidrógeno generado *in vivo* a través de enzimas específicas encargadas de su remoción, como la catalasa y la glutatión peroxidasa (Ver Figura 5), puede ser aún más peligroso que el radical superóxido. El radical hidroxilo, producido cuando el agua es expuesta a radiaciones ionizantes de alta energía, es altamente reactivo. En los sistemas vivientes este radical es generado a través de la reacción conocida como de Fenton al tener contacto con iones libres de cobre o hierro (Cu(I) o Fe(II))(Bergendi et al., 1999).

Habitualmente, las neuronas están expuestas a los radicales libres provenientes del metabolismo intermediario, la cadena respiratoria mitocondrial y de la respuesta inmune celular (Simonian y Coyle, 1996). En estas condiciones, existe un balance homeostático entre la generación de los radicales libres y la capacidad defensiva de los sistemas celulares (Ames et al., 1993).

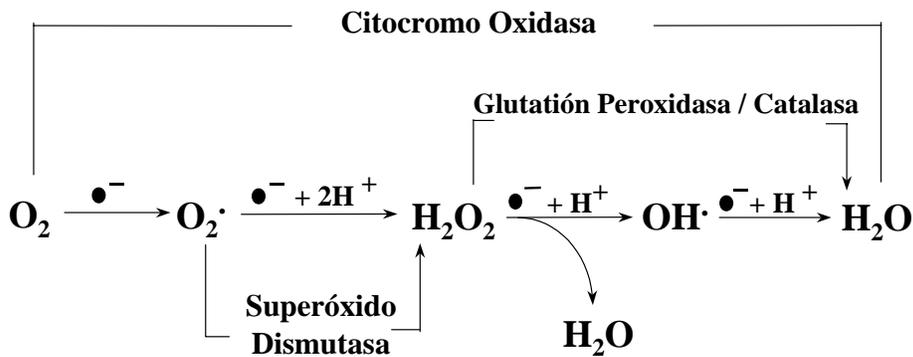


Figura 5. Transferencia de electrones asociada a los sistemas de defensas antioxidantes y radicales libres liberados por su trastorno.

Las EROS pueden combinarse con otros átomos o moléculas más grandes para formar radicales peroxilo ó alquilo (Tabla 4). Recientemente, el interés se ha centrado en el radical óxido nítrico ($\dot{\text{N}}\text{O}$) que es la forma activa del también conocido como factor relajante derivado del endotelio, y otras especies radicales con centros nitrogenados, como el peroxinitrato y el ion peroxinitrito (Bergendi et al., 1999). Estos radicales derivados del nitrógeno, poseen una larga vida media y son medianamente reactivos. La alta reactividad de los radicales libres dificulta la evaluación directa de sus niveles en el organismo en modelos *in vivo*. Para solucionar este problema, los radicales son evaluados de manera indirecta “atrapándolos” al hacerlos reaccionar con otras moléculas químicas y midiendo sus productos *ex vivo* usando técnicas diversas (Moore y Roberts, 1998).

Evidencias Experimentales del Papel del NO en la Patogénesis de las Enfermedades Neurodegenerativas

Enfermedad de Alzheimer

- La β -Amiloide estimula la síntesis de NO

Esclerosis Múltiple (EM)

- Incremento en la síntesis de NO en lesiones de EM y en modelos de EM
- Elevada vulnerabilidad de oligodendrocitos a la toxicidad del NO
- Inhibidores de la Sintasa del Oxido Nítrico (NOS) atenúan dramáticamente la patología de algunos modelos de EM.

Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)

- Incremento en los niveles de metabolitos del NO en el LCR
- Elevada expresión de (SONi) Sintasa del Oxido Nítrico inducible
- Elevada inmuno reactividad a anticuerpos anti-nitrotirosina

Enfermedad de Parkinson

- Las neuronas estriatales tienen un incremento selectivo en los niveles de NO
 - Inhibidores de la NOS atenúan los daños provocados por la MPTP.
-

4.4.4.2. El estrés oxidante en la EP

Recientemente, el estudio de las especies reactivas del oxígeno (EROS) ha tomado gran interés, haciendo énfasis en su participación en la fisiopatogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Simonian y Coyle, 1996). La excesiva formación de radicales libres en el tejido cerebral parece ser un mecanismo que participa de manera relevante en el Parkinson (Ames et al., 1993). Entre los factores que asociados con la sobreproducción de radicales libres en las enfermedades neurodegenerativas se encuentra el incremento en los niveles de hierro de los depósitos que éste guarda en la *substantia nigra*, señalado como uno de los posibles factores patogénicos de la EP (Gerlach et al., 1994). El hierro puede producir radicales hidroxilo a través de la conocida reacción de Fenton, en la que el Fe^{2+} al combinarse con H_2O_2 se transforma en Fe^{3+} y radicales hidroxilo.



La distribución heterogénea del hierro cerebral es un argumento más que lo relaciona con los eventos neurodegenerativos que forman parte de la EP. Se sabe que esta distribución regional en orden descendente tiene como sitio de acumulación preferente al *globus pallidus* > putamen > *substantia nigra* > núcleo caudado (Riederer et al., 1989).

En la EP es importante mencionar que además existe un incremento en la relación de Fe(II) a Fe(III), de 2:1 comparada con los cerebros normales, y de 1:2 en los cerebros de pacientes que murieron con dicha enfermedad (Sofic et al., 1988; Riederer et al., 1989). Asimismo, algunos otros autores reportan no solo un contenido elevado de hierro total, sino también una acumulación de Fe(III) específico de la *substantia nigra pars compacta* (SNc) (Dexter et al., 1989).

La relación que guardan el contenido nigral de hierro con el grado de intensidad de la enfermedad (gravedad de los síntomas, escala de Hoehn y Yahr) (Gerlach et al., 1994), se asocia a su vez con el elevado índice de peroxidación lipídica presentes en la EP (Youdim et al., 1990), lo que sugiere la participación fisiopatogénica del hierro en la muerte neuronal asociada con la enfermedad.

Los cambios en las proporciones de Fe(II) a Fe(III) anteriormente señalados, podrían indicar que la reacción de Fenton está favoreciendo la generación de radical hidroxilo (OH \cdot). Estos radicales son considerados por algunos autores como el radical libre que posee el mayor potencial citotóxico, ya que puede reaccionar con la hebra doble o sencilla del DNA, provocando las alteraciones bioquímicas de la desoxirribosa, bases púricas y pirimídicas, lípidos de membrana y carbohidratos, daño mitocondrial, alteraciones en la homeostasis del calcio, inducción de proteasas, incremento en la peroxidación de lípidos, pérdida de la fluidez e integridad de la membrana, todo lo cual lleva a la muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1985; Ebadi et al., 1996).

El avance reciente en las técnicas de imagen por resonancia magnética nuclear (IRMN) permitió observar la acumulación cerebral de hierro en la EP

(Gerlach et al., 1994), sugiriendo nuevamente que la acumulación de hierro acompaña a la neurodegeneración de los ganglios basales. El incremento *post mortem* en la peroxidación de lípidos en cerebros de pacientes con Parkinson quizás pueda entonces ser el resultado de la sobreproducción de radicales libres inducida por hierro (Dexter et al., 1989).

Las evidencias de la participación de los radicales libres en la EP se han descrito por diversos autores como se representa en la Tabla 5.

EVIDENCIA	REFERENCIA
Incremento en los niveles de hierro (Fe^{+3}) en la SNc	(Riederer et al., 1989; Jenner et al., 1992; Dexter et al., 1991)
Insuficiencia en ferritina y transferrina cerebrales (almacenamiento y transporte del hierro cerebral)	(Connor et al., 1995; Dexter et al., 1992)
Disminución en el contenido de cobre estriatal (alteración en el control de la homeostasis del hierro) Reducción en la Actividad Ferroxidasa de la Ceruloplasmina	(Ebadi, et al., 1996; Boll et al., 1999)
Aumento en el recambio de dopamina y facilitación en la generación de H_2O_2 cerebral	(Cohen 1988)
Disminución nigral, significativa en el contenido de Glutatión Reducido y ligera en el contenido de Glutatión Peroxidasa	(Perry et al., 1982; Sian et al., 1994; Kish et al., 1985)
Disminución en actividad de Catalasa	(Ambani et al., 1975)
Incremento en la tasa de Peroxidación de Lípidos	(Dexter et al., 1989)
Inhibición de complejo I de cadena respiratoria Mitocondrial (sobreproducción de O_2^- Asociada)	(Hasegawa et al., 1990)
Regulación positiva de la Superóxido Dismutasa, Mitocondrial (MnSOD)	(Saggiu et al., 1989)
Muerte neuronal por Apoptosis (Uno de sus generadores, el O_2^-)	(Mochizuki H. et al., 1996)
Oxidación del DNA (niveles elevados de 8-OH-2-deoxiguanosina)	(Sanchez-Ramos et al., 1994)

TABLA 5. Eventos considerados por algunos autores como evidencias de la participación de los radicales libres en la EP.

4.4.5. Alteraciones de la Cadena respiratoria mitocondrial en la EP.

El papel de la disfunción mitocondrial en la EP ha recibido una considerable atención a partir de estudios que demostraron que la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), considerada como el mejor modelo de la EP, es capaz de inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. La disminución en la actividad en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en la SNc de pacientes con EP ha sido establecida desde hace varios años por diferentes grupos alrededor del mundo (Schapira et al., 1990; Janetzky et al., 1994). Estas alteraciones han sido reportadas a través tanto de estudios enzimáticos (actividad de los complejos acoplados a enzimas) como a través de estudios inmuno histoquímicos (Hattori et al., 1991). A lo largo del desarrollo de estos estudios, algunos grupos han reportado que la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial en la EP es específica del complejo I (Schapira et al., 1989; Ver Tabla 6), mientras que otros estudios realizados con mitocondrias purificadas de plaquetas de pacientes con la EP, han demostrado que no sólo presentan una marcada disminución en la actividad del complejo I sino también una reducción (de menor proporción) en la actividad del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual no se presenta en los casos con Parkinson-plus (asociación de las manifestaciones del Parkinson con otros síndromes neurológicos (p. Ej. Parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, degeneración cortico-basal, como los casos más frecuentes) (Benecke et al., 1993). El papel de la citocromo c oxidasa en la cadena respiratoria guarda un lugar especial ya que esta enzima, es responsable de la mayor parte del consumo de oxígeno y es esencial para la generación celular de ATP. Contiene cuatro centros para metales redox activos, uno de los cuales es para cobre (Cooper y Springett, 1997).

Otras evidencias que apoyan la presencia de alteraciones en la fosforilación oxidativa en la EP son la disminución en el metabolismo cortical y subcortical de la glucosa en pacientes no demenciados de la EP (Eberling et al., 1994) y el incremento de lactato en ganglios basales en 12 de 24 pacientes con EP (Chen et al., 1994).

Además de estas alteraciones, se han reportado también una elevada proporción de mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial de pacientes con EP y EA (Shoffner et al., 1993).

Si bien las alteraciones en el transporte de electrones, provocadas por la inhibición del complejo I en la EP, podrían ser superadas a través del complejo II como vía alternativa, la disminución de la enzima α -cetoglutarato-deshidrogenasa en la SNc de pacientes con EP, podría limitar la síntesis de succinato, limitando de esta manera la actividad del complejo II (Mizuno et al., 1989). Esto podría producir a su vez un déficit de ATP y el riesgo de un daño excitotóxico, aún en la presencia de niveles normales de aminoácidos excitadores (Beal, 1992).

A su vez, la activación de la cadena respiratoria a través del Complejo II podría fomentar la sobreproducción de radicales libres (Jenner y Olanow, 1997), lo que se ha reportado en estudios con fibroblastos de pacientes con la EP (Mytilineou et al., 1994). Alternativamente, la inhibición del complejo I y la elevada generación de radicales superóxido, podrían empeorar el defecto del complejo I (Cooper y Schapira, 1997). Es por esto, que los defectos en el transporte electrónico en la EP son de capital importancia en el desarrollo de la enfermedad.

EVALUACIÓN	REFERENCIA	RESULTADOS	n
P	Parker et al., 1989	-54% Complejo I	10
C	Mann et al., 1992	Sin diferencias	14
P	Bravi et al., 1992	Sin diferencias	17
C	Yoshino et al., 1992	-26% Complejo I -20% Complejo II	20
P	Krige et al., 1992	-16% Complejo I	25
P	Benecke et al., 1993	-52% Complejo I -30% Complejo IV	27
P	Haas et al., 1995	-25% Complejo I	36

Tabla 6. Algunos de los estudios realizados para evaluar la actividad de los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial de pacientes con EP en comparación con sujetos control. P= Mitocondrias aisladas; C= Estudio en crudo, n =número de pacientes por grupo.

4.4.6. Los metales esenciales en la neurodegeneración.

4.4.6.1. Papel del Hierro en el desarrollo de la neurodegeneración

La homeostasis del hierro, depende de varios factores entre los que se encuentran las proteínas encargadas de almacenar y transportar el metal en el SNC. Entre estas proteínas se destaca la participación de la ferritina, la transferrina y la ceruloplasmina, entre otras (Figura 6). Esta última no es considerada como una proteína dependiente de hierro, sino como una proteína dependiente de cobre, otro metal esencial. Ambos metales han demostrado tener asociaciones importantes que mantienen su control homeostático de manera inversamente proporcional (Crowe y Morgan, 1996a). Es decir, que del contenido de uno de ellos en el organismo, dependen las concentraciones del otro (a mayor concentración de cobre, la proporción del hierro disminuye y viceversa) desde etapas tempranas del desarrollo (Crowe y Morgan, 1996b). De esta manera las alteraciones en ceruloplasmina y ferritina pueden considerarse un buen marcador del incremento selectivo de hierro en los depósitos cerebrales en la EP (Boll et al., 1999).

4.4.6.1.1. Ferritina, Lactoferrina y Transferrina

La ferritina y transferrina son dos importantes metaloproteínas encargadas de acumular y transportar el hierro a través del organismo. Algunos autores, sugieren que el gran número de sitios para el transportador de transferrina en las neuronas nigrales, es la que les permite acumular mayor proporción de hierro, lo que explica que el hierro se acumule de manera preferente en los ganglios basales (Chiueh y Rauhala, 1998). Algunos estudios han demostrado una correlación entre la gravedad de los síntomas de la EP (nivel IV de la escala de Hoehn y Yahr) y la disminución en la densidad de receptores a transferrina en la parte ventral de la SNc (Fearnley y Lees, 1991). Estos datos sugieren que una densidad disminuida de receptores a transferrina, se asocia con la severidad de la pérdida neuronal. Además, su desequilibrio, podría explicarse a través de las alteraciones que se presentan en la ferritina y de la relación ferritina/transferrina para regular la homeostasis del contenido de hierro cerebral (Figura 6). La ferritina (principal proteína almacenadora de hierro), es capaz de acumular 4,500 átomos de hierro por mol de proteína y podría estar involucrada en la generación de daño neuronal a través de la liberación de la gran proporción del hierro que almacena

(Youdim y Lavie, 1994; Connor et al., 1995)). A este respecto algunos estudios han reportado una disminución en las concentraciones de ferritina, lo que podría sugerir que el hierro se encuentra libre y capaz de generar nuevos radicales libres a través de la reacción de Fenton (Dexter et al., 1990).

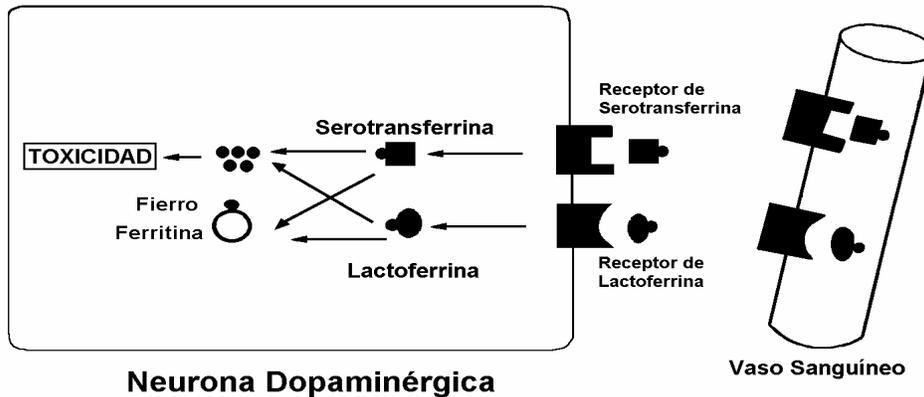


Figura 6. Control de la homeostasis del hierro por lactoferrina, ferritina y transferrina. El hierro puede penetrar al cerebro al nivel de los microvasos pasando a través de los receptores de transferrina y lactoferrina siendo recuperado por las neuronas dopaminérgicas a través de los mismos transportadores. En las neuronas, el hierro se une a la ferritina, la cual participa en la homeostasis intracelular del hierro. (Hirsch y Faucheux, 1998).

La homeostasis cerebral del hierro es controlada por la interacción de la ferritina con la transferrina. Cuando los niveles de hierro intracelulares son bajos y más hierro es requerido, la densidad de los receptores a transferrina se eleva en la misma proporción en que el contenido de ferritina disminuye. Cuando por el contrario, los niveles de hierro intracelulares son muy altos, el número de receptores a transferrina disminuye y los niveles de ferritina se incrementan. En condiciones patológicas con niveles de hierro elevados, como es el caso de la EP, se ha propuesto que este tipo de regulación se encuentra alterada, lo que explicaría la ligera disminución del contenido de ferritina en la SN de dichos pacientes (Klausner et al., 1993). La incapacidad del organismo para mantener en óptimas condiciones el almacenamiento (ferritina), y distribución (transferrina) del hierro cerebral podría ser la responsable del incremento en los depósitos de dicho metal en los ganglios basales en la EP (Hirsch y Faucheux, 1998).

Además de estas proteínas, algunas otras han sido señaladas como responsables del control de la homeostasis del hierro, entre ellas la lactoferrina (también

citada como lactotransferrina) y sus receptores específicos. A través de estudios de inmunohistoquímica, esta proteína ha podido detectarse, acompañando a diversas condiciones patológicas, en enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentran la Enfermedad de Alzheimer, el Síndrome de Down, la Enfermedad de Pick, la Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica y el complejo ELA/Parkinson-demencia (de Guam). Esto ha llevado a proponer que el aumento en la expresión del receptor de lactoferrina, podría favorecer el incremento nigral de hierro en la EP. El receptor a lactoferrina difiere del de transferrina y se ha reportado que se expresa en el mesencéfalo de humanos (Hirsch y Faucheux, 1998). La inmunorreactividad de dicho receptor se ha visto preferentemente en la SNc, el área tegmental ventral (ATV), el grupo celular catecolaminérgico A8, la sustancia negra central y otras regiones mesencefálicas. La inmuno tinción de la lactoferrina es mayor en los grupos celulares dopaminérgicos afectados por la EP, en los pacientes con dicha enfermedad, al compararse con lo observado en sujetos control (Faucheux et al., 1995). Estos datos sugieren una relación entre la pérdida de las neuronas dopaminérgicas y el incremento en la densidad de receptores a lactoferrina, lo que es apoyado por posteriores estudios en los que se comprueba que las regiones con una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas presentan una mayor tasa de expresión del receptor (el ATV y A8, con incrementos más discretos a los observados en la SNc) (Leveugle et al., 1996).

Las alteraciones en el contenido intracelular de hierro son detectadas por otro tipo de proteínas que pertenecen a la familia de las proteínas de reguladoras de hierro (IRPs). De esta manera, cuando las IRPs detectan una deficiencia del metal, inducen la traducción de transferrina al mismo tiempo que bloquean la traducción de la ferritina (Klausner et al., 1993); en caso de un exceso de hierro, el proceso sigue un mecanismo semejante pero en sentido contrario (favoreciendo la ferritina e inhibiendo a la transferrina).

Las alteraciones en el contenido de hierro pueden actuar promoviendo las alteraciones en el metabolismo de las catecolaminas en el Parkinson. Desde 1988 Cohen sugiere que el incremento en el recambio de dopamina generado por las neuronas como un mecanismo compensatorio alterno en la EP, podría dar lugar a un

incremento en los niveles de H_2O_2 como producto de la reacción de la monoamino oxidasa (MAO, Figura 7; Cohen, 1988).

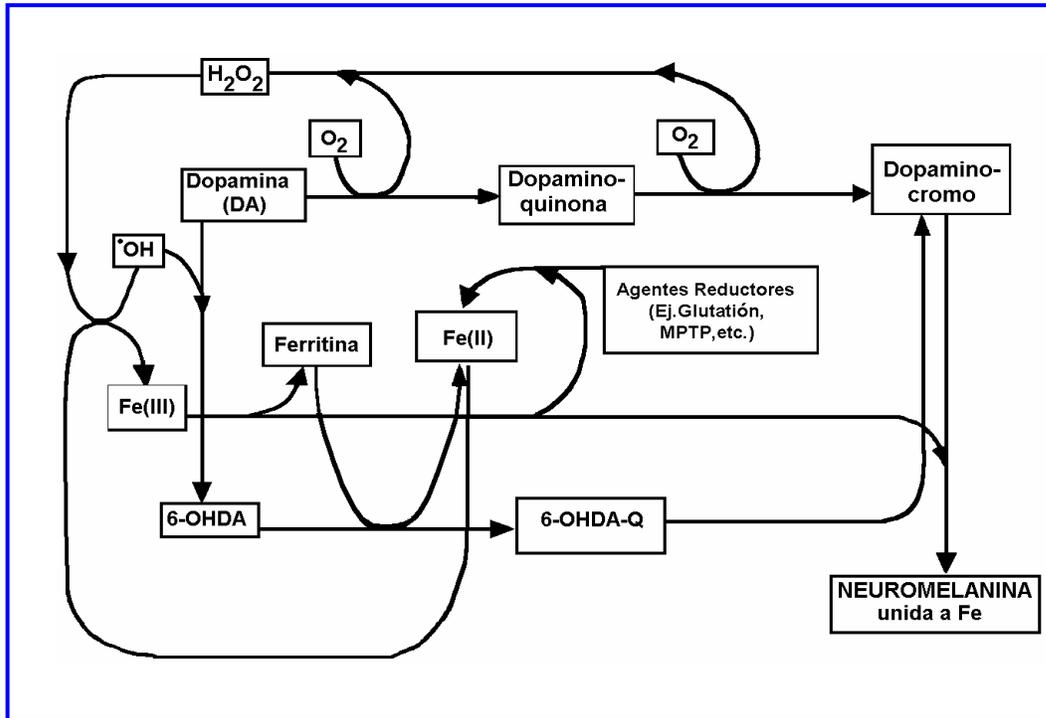


Figura 7. Efectos tóxicos de la excesiva liberación de dopamina. La dopamina puede predisponer a la célula al estrés oxidante, ya que favorece la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de su oxidación a través la actividad de la MAO o bien por medio de un proceso no enzimático (auto-oxidación). El H_2O_2 generado a partir de esta reacción, puede ingresar a la reacción de Fenton al tener contacto con los iones de hierro (II) y generar de esta manera radicales hidroxilo. Además, el Fe(II) transforma la dopamina en melanina, quien promueve su toxicidad en forma de complejos Fe(II) - melanina a través de uniones débiles que permiten la oxidación del Fe(III) a Fe(II) , disponible para la reacción de Fenton y por tanto para la propagación de la lipoperoxidación (LPO) y muerte celular (Cohen, 1988).

El H_2O_2 generado participa en una serie de reacciones enzimáticas (a través de la MAO (i)); y no-enzimáticas (por autooxidación; (ii), (iii)), que conducen a la célula a la generación del potente radical hidroxilo y a la neurodegeneración a través de la generación de estrés oxidativo. Esta es una de las razones por las que la administración de inhibidores de la MAO es una alternativa terapéutica en la EP (Olanow, 1993). Por otro lado, la abundancia y facilidad de activación de esta enzima en los ganglios basales favorece aún más el control de la sobreproducción de H_2O_2 (Riederer y Youdim, 1986). Es conocido el hecho de que la forma predominante de MAO en el tejido cerebral es la MAO-B, cuya actividad aumenta con respecto a la edad (Fowler et

al., 1980). En conjunto con el deterioro en el control de las concentraciones de hierro libre disponible para la reacción de Fenton y el incremento en la liberación de dopamina al medio, la actividad de la MAO juega un papel importante en la muerte neuronal asociada con el estrés oxidante presente en la EP (Figura 7).

Algunos autores señalan que la dopamina, en condiciones de estrés oxidativo puede sufrir una oxidación aberrante que concluye en la formación de 6-OHDA, que al auto-oxidarse traerá como consecuencia la generación de quinonas y la liberación de radicales superóxido (i), o bien renovar al potencialmente tóxico peróxido de hidrógeno (ii) (Jellinger et al., 1995; Aschner, 1997).

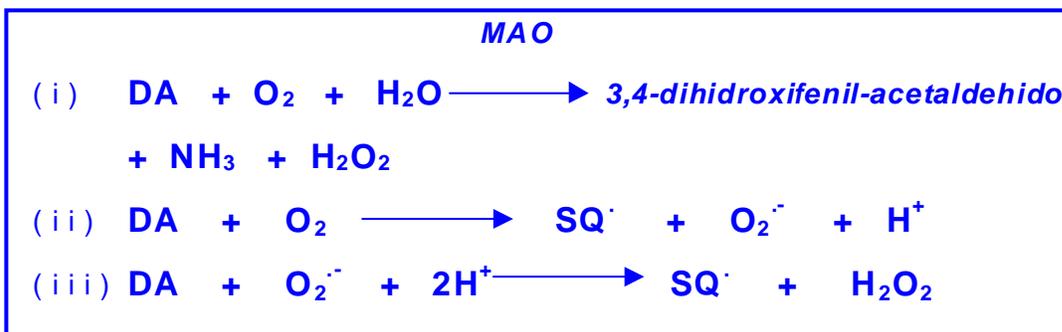


Figura 8. Oxidación enzimática y auto-oxidación de la dopamina (DA) asociadas a la generación de especies reactivas del oxígeno (radical superóxido (O₂^{·-}) y H₂O₂).

Esta reacción en cadena de la quinona, por sí misma o amplificada por las reacciones redox, promueve la generación de EROS a expensas de los reductores celulares y pueden explicar la muerte de las neuronas parcialmente afectadas por el efecto tóxico inicial provocado por la generación del radical superóxido (Napolitano et al., 1999).

Otro importante producto de la oxidación de la dopamina relacionado con la EP es la neuromelanina, que ha sido propuesta como una molécula que promueve la acumulación sitio-específica y la reducción del hierro en la SNc (Ben-Sachar et al., 1991b).

Por otro lado, la adecuada interacción entre la glía y las neuronas es fundamental para el control de los niveles de hierro en el SNC. Durante el envejecimiento, los astrocitos de la SNc son un importante depósito de grandes concentraciones de hierro cerebral, particularmente dentro de sus mitocondrias.

(Schipper et al., 1998). Esta acumulación se ve acentuada durante la EP (Olanow, 1992). Estas evidencias asocian a los astrocitos en el desarrollo de los eventos neurodegenerativos, a través tanto del incremento en los niveles de hierro libre, como de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, presentes en la EP (Beal, 1992; Reichman y Riederer, 1994).

4.4.6.2. El papel del cobre en el organismo.

El cobre es un metal esencial que se encuentra en el organismo desde etapas muy tempranas del desarrollo y actúa como cofactor de diversas enzimas a través de reacciones de oxidación-reducción necesarias para la síntesis de moléculas biológicas indispensables para la vida (Tabla 7).

El cobre tiene propiedades tanto prooxidantes como antioxidantes en los sistemas biológicos. Dicha dualidad de efectos, ha llevado a diferentes grupos de investigación a establecer su potencialidad como prooxidante ó antioxidante y las condiciones que favorecen una u otra actividad (Prohaska y Bailey, 1994).

Como se observa en la Tabla 7, el cobre actúa como un potente cofactor de enzimas asociadas con la neuroprotección y el desarrollo del SNC. Actualmente el cobre es considerado como un elemento esencial proveniente de la dieta (Ver Tabla 8), que no solo se asocia con la función de enzimas dependientes de cobre sino también con la síntesis de proteínas asociadas con otros metales. Tal es el caso de la transcripción del gen de la metalotioneína (Culotta et al., 1989) y de la formación del grupo hemo de la hemoglobina a través de la función de la cuproproteína (la δ -Aminolevulinato deshidratasa) encargada de la condensación de dos moléculas de δ -aminolevulinato para formar el porfobilinógeno, indispensable para la síntesis del grupo hemo (Östenberg, 1980).

CUPROPROTEINAS	FUNCION
PROTEINAS INTRACELULARES	
Citocromo c Oxidasa	Enzima terminal de la respiración (Complejo IV)
Superóxido Dismutasa (SOD 1,2)	Dismutación del radical superóxido
Metalotioneína (MT)	Quelante de metales, atrapadora de radicales libres
Dopamina-β -hidroxilasa	Síntesis de NE y E
Tirosinasa (catecol-oxidasa)	Síntesis de melanina
*Adenilato ciclasa	Síntesis de AMPc
*Guanilato ciclasa	Síntesis de GMPc
*ACE1 y CUP2	Proteínas reguladoras de la transcripción del gen de la MT
PROTEINAS EXTRACELULARES	
Ceruloplasmina (Cp)	Principal transportadora de cobre; metabolismo de hierro; atrapadora de radicales superóxido
Superóxido Dismutasa (SOD 3)	Dismutación de radicales superóxido
Metalotioneína extracelular	Quelante de metales, atrapadora de radicales libres
Lisil oxidasa	Mantenimiento de la integridad estructural del tejido óseo y vascular (desaminación de elastina/ colágena)
Albúmina y Transcupreína	Transportadoras del cobre desde el intestino hasta su unión a Cp en el hígado
Amino-oxidasa	Metabolismo de aminas primarias
Proteínas de Bajo Peso Molecular	Transporte en plasma y LCR; Posibles efectos antioxidantes (Histidina)
PROTEINAS CHAPERONAS	
Chaperona para Cu/ZnSOD (CCS)	Transporta al cobre para la síntesis de Cu/ZnSOD
ATPasa Cu (HAH1, ATP7B)	Unen al cobre con la ATPasa tipo P Cobre-dependiente
ATOX1	Favorece la unión del cobre con HAH1 y ATP7B
Citocromo c oxidasa (COX17)	Favorece la unión del cobre con el sitio para la citocromo c oxidasa

Tabla 7. Función de las principales cuproproteínas en el organismo (Östenberg, 1980; Sorenson et al., 1995; Linder y Hazeg-Azam, 1996). *No totalmente demostrado.

DISTRIBUCION	Contenido de Cobre (µg/g)
Alimentos	
Carnes con músculo	0.9-1.0
Pescado de agua salada	2-3
Pescado de agua dulce	0.3-3
Moluscos	12-37
Cerdo	0.5-3
Hígado	4.6-6.2
Nueces	6-37
Granos y semillas	3-8
Fibra	15
Germen	6
Harina blanca	0.6
Legumbres	3-7
Vegetales	0.3-3
Frutas	0.4-1.5
Papas	2.1
Suelos ¹	
Inorgánicos	≥4
Orgánicos	20-30
Agua dulce	0.0001-0.001
Agua salada	
Superficie	0.001
-1000 m	0.1
Algas	0.05-0.29
Levaduras	8
Animales	1.5-2.5
Humanos	1.7

Tabla 8. Distribución del cobre en alimentos, suelos, agua y organismos. ¹ Principalmente en forma de rocas.(Linder y Hazeg-Azam, 1996).

Las funciones que llevan a cabo las cuproproteínas, enfatizan la importancia del cobre en el control homeostático de los niveles de otros cationes divalentes que se presentan en el organismo. Como anteriormente citábamos el contenido y

niveles de cobre y el hierro tienen una íntima relación que los asocia de manera inversa. Es decir, que a mayor concentración de cobre, la concentración de hierro disminuye (y viceversa) (Crowe y Morgan, 1996). Las alteraciones en los niveles de cobre podrían ser por tanto, la causa del incremento en los niveles de hierro en los depósitos cerebrales (ganglios basales) de los pacientes con la EP y de la disfunción de las diferentes enzimas dependientes del metal encargadas de mantener el estado oxidante celular en óptimas condiciones. Esto es apoyado por estudios que revelan que la deficiencia de cobre en el SNC se asocia con un gran número de alteraciones celulares e inclusive con la neurodegeneración (Hartmann y Evenson, 1992).

Metabolismo del Cobre.

En los seres humanos, el cobre es absorbido en el estómago y el duodeno, y excretado por la vía biliar. Después de su absorción, el cobre es transportado al hígado por vía sanguínea unido a la albúmina desde donde es capturado por los hepatocitos. El cobre es entonces exportado nuevamente a la sangre desde el hígado mediante su incorporación a apoproteínas sintetizadas en relación directa con sus concentraciones.

Más del 95% del cobre en el plasma de todas las especies de vertebrados se encuentra unido a la ceruloplasmina, la cual es una “multicobre-oxidasa”. Esta enzima es sintetizada en el hígado donde el cobre es incorporado antes de su secreción al torrente sanguíneo (Ver Figura 8; Harris y Gitlin, 1996; Linder et al., 1998).

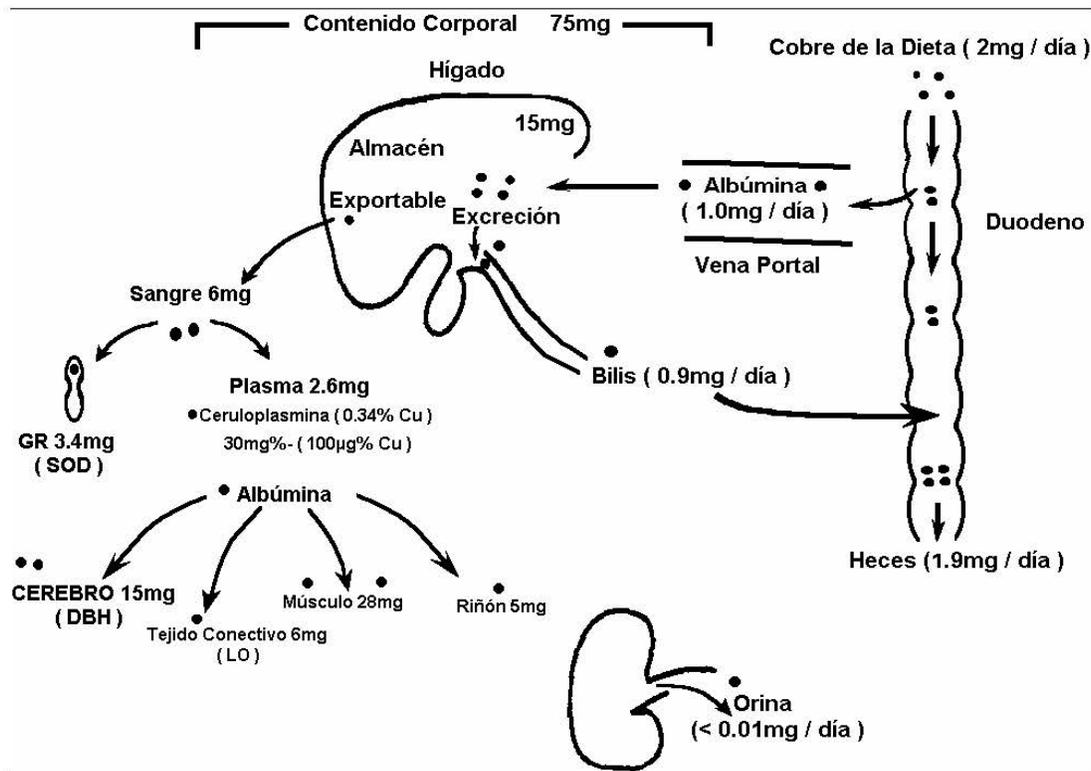


Figura 9. Rutas de absorción y excreción del cobre en humanos. La figura enfatiza el papel del hígado y los fluidos biliares en la eliminación del cobre para mantener el balance metabólico del mismo. G.R.= Glóbulos rojos; DBH= Dopamina β -Hidroxilasa; LO= Lisil Oxidasa; SOD= Superóxido Dismutasa (Harris y Gitlin, 1996).

La excreción de cobre por la bilis es el principal mecanismo encargado de la eliminación del cobre y se sabe que el contenido de cobre excretado es casi directamente proporcional al contenido de cobre absorbido. Deficiencias en la excreción del metal desde el hígado (como es el caso de la enfermedad de Wilson) han sido asociadas con un daño neurológico específico de los ganglios basales (Stuerenburg y Eggers, 2000).

En la mayoría de los mamíferos, el cobre, el hierro y el zinc se acumulan en el hígado durante la última etapa de la gestación (Linder y Munro, 1973). La acumulación del cobre se lleva a cabo primeramente en la metalotioneína, la cual se deposita tanto en el citosol como en el núcleo de los hepatocitos (Nartey et al., 1987). La acumulación prenatal de estos metales asegura su disponibilidad inmediatamente después del nacimiento y durante el período de lactancia, cuando la leche es el principal alimento. La leche tiene bajo contenido de elementos traza

aunque estos son necesarios para un crecimiento rápido (Linder, 1991). Las concentraciones hepáticas de cobre y fierro se reducen dramáticamente durante la lactancia, y en humanos ha llegado a reportarse (tan solo en algunos casos), que las concentraciones de estos elementos pueden alcanzar los niveles presentes al momento del nacimiento (Linder y Munro, 1973). Las ratas y ratones difieren del humano, ya que estos continúan depositando cobre en el hígado aún durante la primera semana de vida (Linder, 1991), ya que su leche tiene un mucho mayor contenido de este catión (Suttle, 1989). Pero aún en estas especies, las concentraciones hepáticas de cobre disminuyen de manera importante durante el destete (Linder, 1991; Linder y Munro, 1973).

Es poco lo que actualmente se sabe acerca del transporte de cobre al feto durante la gestación, aunque se ha reportado que el metal pasa a través de la placenta (McArdle y Erlich, 1991). En 1992, Lee y colaboradores proponen que el cobre destinado para el feto durante la gestación es transportado principal o exclusivamente por la ceruloplasmina (Cp). Los autores sugieren que el metal podría entrar a través de receptores para Cp presentes en la superficie de la placenta, llegando al plasma fetal en forma iónica, para su posterior unión a la Cp fetal (Lee et al., 1992).

4.4.6.2.1. Principales cuproproteínas: Cu/Zn SOD, citocromo c oxidasa, metalotioneína, dopamina β -hidroxilasa.

Si bien el cobre es transportado principalmente por la ceruloplasmina a través de los diferentes tejidos y órganos en su trayectoria por el plasma sanguíneo, este metal también se asocia a otras proteínas quienes dependen de sus concentraciones para mantener una actividad óptima.

Tal es el caso de la superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima tiene tres diferentes formas:

- 1) SOD1 (Cu/ZnSOD; citosólica)
- 2) SOD2 (MnSOD; mitocondrial)
- 3) SOD3 (Cu/ZnSOD; extracelular)

En todos los casos, su función es la de controlar los niveles de radicales superóxido generados por procesos metabólicos naturales y alterados (generado por ejemplo a partir de la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en la EP; Ver Figura 5).

Mientras las formas dependientes de cobre y zinc (Cu/ZnSOD; SOD1 y SOD3) se expresan constitutivamente, la expresión de la MnSOD (SOD2), responde a diversos estímulos que incluyen las citocinas, lipopolisacáridos bacteriales (Visner et al., 1990) o la presencia del radical del óxido nítrico (ON[•]) (Sano et al., 1997)

La síntesis y funcionalidad de la SOD depende de la entrada de cobre al organismo a partir de la dieta. Desde hace ya casi 30 años se conoce que una disminución en la actividad enzimática de la SOD cerebral relacionada a dietas deficientes de cobre en ratas en las etapas tempranas del desarrollo (Prohaska y Wells, 1974; Linder y Hazegh-Azam, 1996). Esta enzima es considerada por algunos autores como la primera línea de defensa de las células en contra del estrés oxidante mediado por las EROS, la deficiencia de cobre podría ser un factor que haga susceptible al sujeto a la generación de un daño peroxidativo (Hartmann y Evenson, 1992).

En el ser humano, también se ha hecho patente la necesidad de una adecuada ingesta de cobre en la dieta para el mantenimiento de la actividad antioxidante de la SOD; inclusive algunos autores han relacionado erróneamente, la adecuada actividad de la SOD como un marcador del *status* de cobre en el organismo (Okahata et al., 1980; Uauy et al., 1985). Los pacientes expuestos a dietas bajas en cobre y que presentan alteraciones en la actividad de la SOD, son capaces de restaurar la actividad de la enzima a partir de la administración de suplementos de cobre o cuando alimentos ricos en cobre son integrados a la dieta (Ver Tabla 8) (Uauy et al., 1985; Klevay et al., 1984).

Se han reportado alteraciones en la actividad de la SOD1 en enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Ikonomidou et al., 1996), la EA (de Lustig et al., 1993) y en la EP (Torsdottir et al., 1999).

En el caso de la EP, la actividad de la SOD1 permanece inalterada, mientras que la actividad de la SOD2, se incrementa significativamente (Saggu et al., 1989). Este comportamiento se ha interpretado, por los autores, como una respuesta de “primera mano” del sistema antioxidante a la generación mitocondrial de los radicales superóxido por efecto de la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en la EP. Los autores sugieren a su vez, que la activación de la Cu/ZnSOD en un lapso previo no puede ser descartada, ya que quizás ésta fue inhibida por el exceso en las concentraciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), su producto final. Esta acumulación excesiva del H_2O_2 , podría ser consecuencia de las deficiencias en la actividad de la catalasa y la glutatión peroxidasa, encargadas de su transformación (Saggu et al., 1989).

Aunado a los trastornos en la actividad de la SOD, en sujetos deficientes de cobre, se ha reportado una reducción significativa en la actividad de la citocromo c oxidasa (COX) en leucocitos y plaquetas. Dicha disminución en la actividad de la COX se presenta antes de la reducción en la actividad de la SOD (Milne D.B. et al., 1988), lo que sugiere que la evaluación de la actividad de la COX, es un indicador sensible del status de cobre (Milne y Johnson, 1993).

4.4.6.2.2. Ceruloplasmina.

En 1948 se aisló por primera vez, una proteína azul abundante a partir del suero de cerdos, denominada desde entonces como ceruloplasmina (Cp) (Holmberg y Laurel, 1948). Posteriormente, estudios clínicos revelaron que esta es una proteína de fase aguda (su regulación responde a eventos de estrés celular) y revelaron diferencias asociadas a la herencia en la concentración de dicha proteína en el suero (Cox, 1966).

La hipótesis de la actividad ferroxidasa en la función de la Cp, enunciada por primera vez en los años sesenta, es considerada como el primer intento para asociar el metabolismo del hierro con las funciones metabólicas del cobre. La hipótesis proponía que la ceruloplasmina catalizaba la oxidación de los iones de hierro (II) en una reacción que era esencial para movilizar el hierro formando

complejos con la transferrina (Curzon y O'Reilly, 1960). Tanta aceptación tuvo esta hipótesis que se denominó a la Cp como "la ferroxidasa", título que fue cambiado a "ferroxidasa I", cuando una segunda ferroxidasa fue descubierta (Topham y Frieden, 1970). La reacción de opositores a esta hipótesis no se hizo esperar. El argumento en contra de esta hipótesis señalaba que la oxidación espontánea del hierro era tan rápida, que resultaba innecesaria la participación de la Cp. Estas propuestas fueron apoyadas por descubrimientos clínicos. Tal es el caso de los pacientes con enfermedad de Wilson, quienes en raras ocasiones sufren de anemia, a pesar de que los niveles de la ceruloplasmina se encuentran significativamente disminuidos o casi inexistentes. Sin embargo, la enfermedad de Wilson no se considera como una alteración asociada a la carencia de Cp. Con el descubrimiento de la aceruloplasminemia, la hipótesis de la "ferroxidasa I" se ha retomado y se inició una serie de estudios que involucran a trastornos en la enzima con diferentes padecimientos (Miyajima et al., 1987; Logan et al, 1994).

La Cp es secretada desde los hepatocitos como una proteína de cadena sencilla de 1,046 aminoácidos con seis átomos de cobre, que son incorporados a la proteína durante su proceso de biosíntesis (Takahashi et al., 1984). El gen de la Cp posee 19 exones y se transcribe a partir de dos transcritos que difieren en tamaño, como resultado de sus sitios de poliadenilación alternativa. El cobre no afecta el porcentaje de síntesis o secreción de la apoceruloplasmina, pero un defecto en la incorporación del cobre durante la biosíntesis de la misma puede generar una proteína inestable carente de actividad oxidasa (Sato y Gitlin, 1991; Gitlin et al., 1992).

A pesar de los años de investigación alrededor de la Cp, aún no ha podido establecer definitivamente el papel funcional de esta enzima. La Cp ha ocupado el papel central de numerosos estudios en parte debido a su abundancia en el suero, lo que ha llevado a la asociación de ésta con algunas enfermedades que presentan alteraciones en el contenido de cobre como la enfermedad de Wilson, la diabetes, la demencia, los síntomas asociados a daños a ganglios basales (como la EP) y la aceruloplasminemia (Harris y Gitlin, 1996).

Aunque el estudio de la Cp se ha centrado en su síntesis hepática, esta proteína también se puede producir en algunos otros tejidos que incluyen el cerebro (Yang et al., 1989), el útero (Thomas y Schreiber, 1989), las glándulas mamarias (Jaeger et al., 1991), el pulmón (Fleming y Gitlin, 1990) y los testículos (Aldred et al., 1987). En el cerebro, se ha demostrado una expresión abundante de la Cp en los plexos coroides y en la barrera hematoencefálica. En el interior celular, la Cp se expresa preferentemente en una subpoblación de astrocitos de la retina y de la microvasculatura cerebral (Klomp et al., 1996).

El hecho de que la transferrina es sintetizada en los oligodendrocitos indica que, a diferencia de lo que ocurre en el hígado, diferentes tipos celulares son responsables de la biosíntesis de la ceruloplasmina y la transferrina en el SNC (Bloch et al., 1985)

Debido a la importante relación existente entre la Cp y el transporte de fierro, algunos autores han asociado el papel neurotóxico del incremento en los depósitos de fierro cerebrales, presente en la EA, la EH y la EP, con posibles alteraciones en el metabolismo de la Cp cerebral (Loeffler et al., 1996). Los trabajos derivados de estas premisas han permitido dar una nueva perspectiva acerca de la relación existente entre los eventos neurodegenerativos y la carencia de cobre en los pacientes que sufren la EP y otras enfermedades. Loeffler et al., reportan un incremento en los niveles de Cp estadísticamente significativos en el hipocampo, corteza frontal, parietal y temporal en un estudio *post mortem* empleando tejido cerebral de pacientes que murieron con la EP, y comparándolos con los niveles de la proteína encontrados en controles de edad avanzada sin dicha enfermedad. Los resultados son interpretados como la respuesta natural de esta proteína de fase aguda a la presencia del estrés oxidativo en los eventos neurodegenerativos (Loeffler et al., 1996).

Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que si bien los niveles de la proteína podrían estar elevados en la EP, la enzima parece carecer del cobre unido a ella. Esto se deriva del análisis de la actividad ferroxidasa de la Cp en el LCR de pacientes con EP (con y sin tratamiento con Levodopa) (Boll et al., 1999). En este trabajo, la actividad de la enzima en el LCR de los pacientes sin

tratamiento, se ve deteriorada. A su vez, se ha reportado un incremento en los niveles de cobre libre en el LCR, lo que sugiere que la enzima podría presentarse como apoenzima, careciendo de esta manera de su capacidad ferroxidasa, presentándose como un componente de la acumulación de hierro en los ganglios basales, sin poder hasta el momento establecer de manera contundente su relación causal o consecuente al daño neurodegenerativo en la EP (Boll et al., 1999).

Si bien este estudio carece de la evaluación del estado oxidante imperante en los pacientes con la EP, estudios previos con pacientes aceruloplasminémicos indican que los niveles de peroxidación lipídica (índice del estado oxidante en el organismo), se encuentran elevados (Miyajima et al., 1996), lo que sugiere que la falla en una adecuada síntesis de la Cp, podría conducir a un evento neurodegenerativo afectando selectivamente a los ganglios basales debido al tropismo que la deficiencia de cobre (Dexter et al., 1991) y la acumulación de hierro derivada de esta, tienen por dicha región cerebral (Uitti et al., 1989).

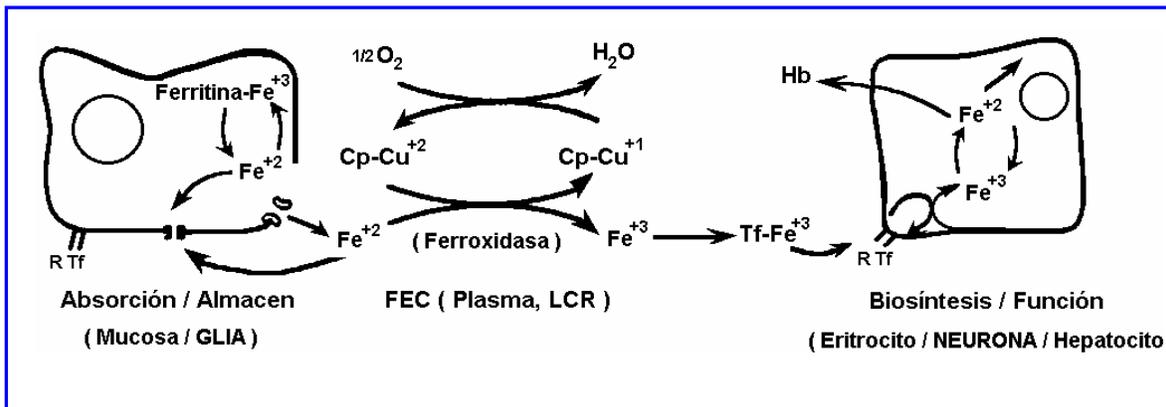


Figura.10. Función de la ceruloplasmina. De manera natural, la ferritina pierde su hierro por reducción, de esta manera los iones de hierro (II) son liberados al pool de Fe(II) quelable, este hierro puede eventualmente, también encontrar su salida hacia la circulación. Tan pronto como el hierro entra al torrente sanguíneo, se oxida a su estado férrico (Fe(III)) por el O_2 en la presencia de la proteína ferroxidasa ceruloplasmina. De esta manera el Fe(III) es entonces inmediatamente secuestrado por la transferrina. Es posible por lo tanto, que la deficiencia en ceruloplasmina lleve a un decremento en la liberación celular de hierro a la circulación y por tanto, se promueva un incremento en las concentraciones intracelulares (gliales) del metal. (Harris & Gitlin, 1996).

El papel antioxidante de la Cp no sólo se reduce a la movilización del hierro desde sus depósitos cerebrales. Además, la ceruloplasmina es capaz de actuar como "atrapadora" (scavenger) de radicales superóxido, así como de mediar la

reducción de los cuatro electrones del oxígeno, sin liberar al medio al radical superóxido ni al potencialmente tóxico peróxido de hidrógeno a través de una reacción no enzimática de autooxidación (Medda et al., 1996). Por esto, podemos presumir hasta el momento que la presencia de una Cp funcional en la EP podría llevar a cabo funciones antioxidantes relevantes, ya que cumple con diversas funciones neuroprotectoras (Ver Tabla 9; Goldstein et al., 1979).

FUNCION	MECANISMO DE NEUROPROTECCION
Transporte de cobre.	Presencia del cobre como cofactor de importantes enzimas en tejidos diversos
Actividad oxidasa	Dirigida a iones de Fe(II), así como a numerosas aminas aromáticas y fenoles, evita acumulación del Fe(II) cerebral, disponible para la reacción de Fenton.
Actividad antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad para inhibir la autooxidación de los lípidos. • Atrapadora de radicales libres superóxido.
Evita acumulación de Semiquinonas	Previene la acumulación de productos generados a partir de la oxidación de la 6-OHDA generada como consecuencia a la excesiva liberación de dopamina
Formación de Nitrosotioles	A través de la Formación de nitrosotioles (a partir del ON en presencia de grupos "tiol"(SH)) con capacidad antioxidante e inactivando al ON, evitando la formación de peroxinitrito

Tabla 9. Actividad neuroprotectora de la ceruloplasmina, mecanismos asociados (Guarnieri y Ventura, 1985; Medda et al., 1996; Inoue et al., 1999).

4.4.6.3. Enfermedades asociadas al desorden en el metabolismo del cobre.

Debido a la gran importancia del cobre durante el desarrollo, la deficiencia del metal se encuentra asociada a la aparición de enfermedades que involucran de

manera relevante al SNC. Siendo los ganglios basales un centro de acumulación del metal, la deficiencia de cobre en las primeras etapas del desarrollo conduce a neuropatías que involucran los centros de control del movimiento (Arce y Keen, 1992).

Se han reportado otras enfermedades que no pueden ser asociadas a la deficiencia del metal durante el desarrollo, que se basan en alteraciones genéticas. Aunque este tipo de padecimientos no se basan *per se* en la deficiencia del cobre, las consecuencias derivadas de una síntesis aberrante de los transportadores del metal, pueden provocar la falta de cobre en algunos tejidos y órganos (inclusive cerebral, principalmente en los ganglios basales, sitio de su mayor concentración en el cerebro (Hartard et al., 1993).

Como representantes de este tipo de alteraciones genéticas que involucran situaciones de estrés oxidativo y neurodegeneración tenemos a la enfermedad de Wilson y la aceruloplasminemia.

4.4.6.4. Enfermedades Neurológicas Asociadas al Déficit de Cobre.

4.4.6.4.1. Enfermedad de Wilson y Enfermedad de Menkes.

La enfermedad de Wilson (EW) es un desorden autosómico recesivo (necesita de dos copias defectuosas del gen para producir un individuo homocigoto) que afecta a una de cada treinta mil personas (Portmann & Sarlioz, 2005). Sin embargo, el número de heterocigotos es mucho mayor, probablemente el 2% de la población. Se ha sugerido que la presencia de este defecto en la población podría ser un factor de riesgo para generar la EP, ya que la EW es una enfermedad que habitualmente cursa con alteraciones extrapiramidales que derivan en síntomas parkinsónicos. De esta manera, se han asociado algunas de las alteraciones bioquímicas (entre ellas la reducción en el contenido de ceruloplasmina) de la EW con la EP (Johnson, 2001).

Sin embargo, a diferencia de lo reportado para la EP, en la EW el cobre se acumula en diferentes órganos, particularmente en el cerebro, el hígado y la córnea. Como anteriormente citamos, esta acumulación de cobre en ganglios basales, provoca síntomas que coinciden con los que se presentan en la EP como

temblor, rigidez y discinesias (Siegel et al., 1999). La mayor parte del cobre plasmático es transportado por la ceruloplasmina, cuyos niveles se encuentran reducidos en la EW (Hartard et al., 1993). La falta de ceruloplasmina funcional (unida a cobre) acarrea a su vez otros problemas como la acumulación de hierro en dicha región cerebral. Debido a la íntima relación que el cobre y el hierro comparten, aún no se ha podido determinar si es el contenido excesivo de cobre, o bien de hierro libre, el responsable de las lesiones producidas en el núcleo lenticular, incluyendo el *pallidum* y el putamen, y otras regiones cerebrales, lo que a su vez genera la rigidez progresiva, el temblor esencial y, por último, el deterioro mental en los pacientes que sufren dicha enfermedad (Bruehlmeier et al., 2000). De cualquier manera, la persistencia de algunos síntomas extrapiramidales después de realizadas intervenciones quirúrgicas como el trasplante ortotópico de hígado, sugiere que la destrucción de los ganglios basales es irreversible (Bax et al., 1998).

Actualmente se sabe que la presencia de mutaciones en el gen que codifica para la Cu-ATPasa es el responsable de la acumulación del cobre en el organismo (Bull et al., 1993).

La carencia de cobre en el cerebro causa daño irreversible a las neuronas, lo que se desprende de la enfermedad de Menkes (Iwata et al., 1979). Este padecimiento hereditario es causado por deleciones y mutaciones del gen humano (llamado Mc1) que codifica para la síntesis de una proteína transportadora de cobre (Vulpe et al., 1993).

En este padecimiento, el gen se encuentra asociado al cromosoma X y se expresa en otros tejidos más que en el hígado, mientras que el gen de la EW se expresa predominantemente en el hígado (Vulpe et al., 1993). La EM se manifiesta como un bajo contenido de cobre en el hígado, cabello anormal (*kinky hair*) y una atrofia cerebral masiva (degeneración de la materia gris), que afecta a los sujetos portadores de la alteración genética desde el momento de su nacimiento, lo que conduce a la muerte a edades muy tempranas (Bull et al., 1994).

Mientras que en la EM el defecto en la ATPasa de cobre (Cu-ATPasa) actúa a través de un deficiente transporte de cobre a través de la placenta, y una falla en la absorción intestinal del metal, produciendo un estado de *hipocupronemia* que

inicia al momento del nacimiento; la EW se presenta a edades más avanzadas (Heffter et al., 1993).

Por su parte, el inicio de la EW ocurre en etapas tardías de la infancia a través de una disfunción severa de los ganglios basales que se asocia con elevadas concentraciones de cobre hepático y una disminución en la tasa de eliminación de este metal a través de la bilis, su principal vía de excreción. La acumulación de cobre en el citosol evita la incorporación del metal en la Ceruloplasmina (Cp), lo que genera el estado *hipercupronémico* y la síntesis de una Cp sin cobre (apoproteína), carente de actividad ferroxidasa y con una vida media menor a la evaluada en condiciones normales (holoproteína) (Harris y Gitlin, 1996).

Las terapias empleadas en la EW se basan principalmente en la reducción del contenido de cobre, para la droga empleada más frecuentemente es la D-Penicilamina (Sternlieb, 1990; Shimizu et al., 1999), la cual incrementa la tasa de excreción de cobre y la síntesis de metalotioneína por las células hepáticas que al formar complejos con el cobre, evita el desarrollo de eventos tóxicos e inclusive tiene efectos antioxidantes (Scheinberg et al., 1987).

La relevancia de estas enfermedades con relación a la EP radica en la íntima relación que guardan las alteraciones en el contenido de cobre cerebral (como cobre libre, no unido a ceruloplasmina) con la generación de estados de estrés oxidante y neurodegeneración de los ganglios basales, derivadas de éstas. Estos resultados apoyan la idea de que la adecuada función de algunas cuproproteínas y el contenido de cobre cerebral podrían jugar un papel protagónico en la protección de los individuos susceptibles a presentar la EP.

4.4.6.4.2. Aceruloplasminemia.

La Aceruloplasminemia es un desorden autosómico recesivo del metabolismo del hierro que involucra la incapacidad de la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina, debido a mutaciones en el gen de dicha proteína (Morita et al., 1995; Harris et al., 1995).

Las consecuencias de falta de la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina saltan a la vista sí tomamos en cuenta el papel de esta en la remoción de hierro de los depósitos gliales (Ver Figura 10). De manera que podríamos sugerir que la acumulación de hierro en este padecimiento, y quizás en otras enfermedades como la EP, es debido a la falla en el gen de dicha cuproproteína.

La enfermedad se ve representada por una tríada que comprende diabetes (Daimon et al., 1995), degeneración retinal (Miyajima et al., 1987) y daño neurológico (Takahashi et al., 1996), que se encuentra caracterizado por síntomas extrapiramidales como blefarospasmos, gesticulaciones y rigidez (Miyajima et al., 1997), así como disartria, distonia, demencia (Klomp et al., 1996) y en algunos casos, corea (Yonekawa et al., 1999).

La presencia de daño que concuerdan con las principales vías dopaminérgicas afectadas en la EP y la pérdida en la capacidad ferroxidasa de la Cp hacen de la aceruloplasminemia una enfermedad interesante que podría responder algunas inquietudes de la EP como el aumento en la concentración de hierro en los depósitos cerebrales y el aumento en la proporción de iones Fe(III) con respecto a la observada para los iones Fe(II) (2:1), en las células astrocíticas de los ganglios basales de pacientes que murieron con la EP (Connor y Benkovic, 1992). Estos efectos han sido asociados con la disminución que los pacientes con aceruloplasminemia muestran en los niveles de transferrina cerebral, que al igual que en la EP, se traduce en el incremento en los depósitos de hierro en ganglios basales (Harris et al., 1995). A este respecto, el tratamiento con quelantes de hierro en la aceruloplasminemia, como la desferroxiamina, ha demostrado tener efectos benéficos en los pacientes que sufren de esta enfermedad (Miyajima et al., 1997). Previamente, el incremento en la tasa de peroxidación de lípidos en los pacientes que sufren de esta enfermedad también había sido reportado, como consecuencia al incremento en los niveles de hierro (de hasta 3 veces) en ganglios basales (Miyajima et al., 1996; Ver figura 10). En respuesta a las alteraciones en el estado oxidativo celular, la actividad de algunas enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa, también se ha reportado elevada (Miyajima et al., 1998).

Además, como parte de las alteraciones dopaminérgicas derivadas de la falta de cobre, en el LCR de estos pacientes, se ha detectado un incremento del 36% en los niveles de ácido homovanílico (HVA) (normal = 59 ng/ml; aceruloplasminemia = 80.6 ng/ml) y una ligera disminución en los niveles de ácido 5-hidroxiindolacético del 22% (5-HIAA; 32.7 ng/ml en pacientes; 42 ng/ml normal). La galactorrea también presente en la enfermedad, se reduce sólo en un 30% (normal, >50%) por efecto de la administración oral de levodopa (500 mg) (Miyajima et al., 1987), lo que reitera la falla grave en las vías dopaminérgicas en dichos pacientes.

Un dato interesante consiste en la edad de inicio de las enfermedades neurodegenerativas que afectan a los ganglios basales, tales como la EH y la EP. En estas enfermedades, tal y como ocurre en la aceruloplasminemia, la edad de inicio suele presentarse con más frecuencia después del comienzo de la edad reproductiva (Barbeau, 1996). A pesar de que la causa de la neurodegeneración en la EP es aún desconocida, algunos autores sugieren que este retraso en la aparición de los síntomas, podría deberse a la persistencia de mutaciones en los genes que codifican para diversas proteínas, (tal y como ocurre en la EH (Hungrintina (Paulson y Fishbeck., 1996)) y la aceruloplasminemia), como respuesta al envejecimiento. De esta manera, debido a la variabilidad genética, los individuos podrían presentarse como susceptibles o refractarios al evento neurodegenerativo (Johnson, 2001). Alteraciones en la Cp podría provocar el incremento en los niveles de hierro considerado como un evento fisiopatológico asociado a la neurodegeneración tanto en la EP como en la EH (Connor et al., 1992; Sofic et al., 1988), lo que genera en ambos casos, importantes desequilibrios en el manejo de las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Richardson, 1993; Schulzer et al., 1994).

La asociación de la actividad ferroxidasa de la Cp con el desarrollo de la EP involucra a una proteína análoga a ésta, presente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* denominada FET3. Esta proteína es una oxidasa asociada a varios iones de cobre, la cual actúa como una ferroxidasa y transportadora de hierro. Aunque la FET3 es una proteína de membrana y la Cp es una proteína sérica, sus

funciones fisiológicas son casi las mismas. Ambas proteínas oxidan el Fe(II) a Fe(III), solo que mientras la proteína FET3 transporta el hierro al interior celular, la Cp se encarga de la exportación del metal hacia el exterior. Estudios recientes demuestran que levaduras que poseen una proteína FET3 mutante, presentan alteraciones importantes asociadas al transporte de hierro (Dancis et al., 1994; Askwith et al., 1994). Aunque no ha sido demostrada la presencia de enzimas similares a FET3 en los seres humanos, no se descarta la posibilidad de la presencia de otras proteínas con capacidad ferroxidasa, asociadas al metabolismo y transporte intracelular de hierro, que al presentar mutaciones provoquen la acumulación de hierro intracelular, tal y como ocurre en la EP (Morita et al., 1995).

Otra evidencia neuropatológica que liga a la aceruloplasminemia con la EP consiste en la inhibición del complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que sugiere que la deficiencia de cobre unido a ceruloplasmina podría contribuir en la generación de radicales libres del oxígeno y a los eventos neurodegenerativos asociados (Kohno et al., 2000).

4.5. Modelos de la Enfermedad de Parkinson.

Para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se han empleado diversos modelos experimentales capaces de simular las condiciones bioquímicas, histopatológicas y conductuales con el fin de entender los mecanismos celulares relacionados con la muerte neuronal en los pacientes que padecen alguna enfermedad neurodegenerativa. Estos modelos deben ser altamente reproducibles, de fácil manejo y, de ser posible de bajo costo, con el fin de facilitar su uso cotidiano.

Hasta el momento han sido desarrollados tanto modelos *in vitro* como *in vivo*, obteniendo de estos estudios piezas claves para el desarrollo terapéutico de las enfermedades neurodegenerativas. A pesar de que a través del estudio con modelos, se han podido controlar algunos de los síntomas derivados de las enfermedades neurodegenerativas, la verdadera causa de la muerte celular acelerada de grupos neuronales específicos en ellas no se ha podido descubrir. Con este fin han sido desarrollados modelos basados en principios farmacológicos y moleculares.

4.5.1. Modelos Moleculares de la Enfermedad de Parkinson.

A diferencia de lo reportado para otros padecimientos neurodegenerativos, las alteraciones bioquímicas representativas de la EP no se han podido asociar exitosamente con trastornos genéticos que favorezcan la predicción de la susceptibilidad, o edad del inicio de la enfermedad. Hasta el momento, los estudios realizados con gemelos monocigotos (idénticos) no han sido concluyentes, por lo que se ha apoyado el estudio de los factores ambientales con potencial desencadenante de la neurodegeneración (Langston et al., 1984).

A pesar de esto, se han desarrollado modelos celulares basados en las alteraciones del DNA mitocondrial de pacientes con la EP. Estos modelos celulares se denominan células híbridas ("Cybrids"). Dichas células híbridas se forman a partir de células de neuroblastoma que carecen de DNA mitocondrial a las que se les interioriza el DNA mitocondrial proveniente de plaquetas de pacientes con EP (las cuales presentan tal y como ocurre en humanos, (Hattori et al, 1991) un déficit funcional en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Cassarino et al., 1997). De esta manera, se genera un modelo que representa las alteraciones en el metabolismo energético que forman parte de la EP.

Otro modelo de la EP fue creado a partir de la asociación de dicha enfermedad con los cuerpos de Lewy, cuando fue identificado un pequeño número de familias con Parkinson de inicio temprano positivas para cuerpos de Lewy (Duvoisin & Johnson, 1992). El estudio de estas familias europeas, permitió la identificación de dos mutaciones (A53T y A30P) en el gen que codifica para la α -Sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997; Kruger R. et al., 1998).

Esta mutación deriva en una poco frecuente forma familiar de la EP y a través del descubrimiento de su acumulación en los cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy, se iniciaron los intentos para la obtención de un modelo de ratón transgénico que sobre expresara la α -SIN humana (Sommer et al., 2000). La α -SIN podría ser considerada como una proteína relacionada con la patología de Lewy y con aspectos clínicos de enfermedades como la EP, la Demencia de los Cuerpos de Lewy (DLB) y una variante de Alzheimer con cuerpos de Lewy (patología con la

que fue inicialmente asociada); de allí su importancia en el estudio de modelos de neurodegeneración. Los modelos actualmente desarrollados en animales transgénicos con α -sinucleopatía neuronal derivada de mutaciones en la α -SIN, representan alteraciones muy similares a aquellas observadas en pacientes con patología de los cuerpos de Lewy, degeneración neuronal, y defectos motores, a pesar de carecer de la expresión del transgén en las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra pars compacta (SNc) (Lo Bianco et al, 2002). En este modelo las neuronas que parecen ser más vulnerables son las del tallo cerebral y las neuronas motoras. La patología de las neuronas motoras incluye daño axonal y denervación de uniones neuromusculares en diversos músculos, sugiriendo que la α -SIN interfiere con un mecanismo universal de mantenimiento de las sinapsis. La expresión del transgén Thy1 de la α -SIN del tipo silvestre (wild-type) de la α -SIN humana desencadena cambios patológicos similares, apoyando de esta manera el papel central de la α -SIN y la mutante y wild type en formas idiopáticas y familiares de enfermedades con α -sinucleopatía neuronal y patología de los cuerpos de Lewy. Estos modelos en ratones proveen de información acerca de aspectos relacionados con la α -sinucleinopatía y favorecen el avance en la búsqueda de alternativas terapéuticas en estos casos (Van der Putten et al., 2000).

Sin embargo, ha sido cuestionada la funcionalidad del modelo, ya que algunos grupos de estudio han reportado que la mutación en el gen de la α -Sinucleína es un factor que no se encuentra asociado a la incidencia de Parkinson familiar (Scott et al., 1999). Además, el defecto en esta proteína no es privativa de la EP sino que la EP se incluye otras enfermedades degenerativas denominadas sinucleopatías que incluyen la demencia de los cuerpos de Lewy (DBL; una clase de demencia presente en las últimas etapas de la vida, clínicamente similar a la enfermedad de Alzheimer) y la atrofia multisistemas (Duda et al., 2000).

Otra mutación que ha llamado la atención de los investigadores es la que se presenta en una proteína que ha sido denominada parkina. Las mutaciones en el gen de la parkina, son responsables de una forma autosómica recesiva juvenil (aparece antes de los 40 años) de la EP y se considera que juega un papel más

amplio en los casos prevalentes de EP a lo observado para la mutación en la α -sinucleína (Lücking et al., 2000; Sharma & Standaert, 2002). Como anteriormente citamos, la parkina es una E3-ubiquitina ligasa y se expresa principalmente en el sistema nervioso (Kitada et al., 1998). Las mutaciones en la parkina no sólo han sido asociadas con los casos familiares de la EP, sino también con algunos casos aparentemente esporádicos de la misma de aparición más tardía (durante la quinta o sexta décadas de la vida). Inclusive se han reportado (en muy pocos casos) casos de aparente Parkinson esporádico clásico con un solo alelo del gen de la parkina mutado (Farrer et al., 2001)

4.5.2. Modelos Farmacológicos de la Enfermedad de Parkinson.

4.5.2.1. Modelo de administración de MPTP/MPP+.

Existe una gran variedad de toxinas capaces de inhibir la cadena respiratoria mitocondrial, entre las que se encuentran moléculas como la rotenona (Complejo I; Seaton et al., 1997) y el 3-NP (Complejo II; Gould y Gustine, 1982), las cuales se emplean como modelos de neurodegeneración. Otro caso es el del modelo farmacológico mas comúnmente utilizado para emular los trastornos bioquímicos y conductuales presentes en la EP, que es la administración del 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un potente inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Buu, 1993).

La neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina) es considerada hasta el momento como el mejor modelo de Parkinson disponible, capaz de inducir un síndrome parkinsoniano, tanto en humanos (Langston et al., 1984) como en monos (Chiueh et al., 1985), y roedores (Przedborski y Jackson-Lewis, 1998). El MPTP es un compuesto altamente lipofílico. Por tanto, cuando este ha sido administrado sistémicamente, tiene acceso al cerebro atravesando libremente la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro, la MPTP (pro-toxina), es convertida en su metabolito activo el ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), por medio de la acción de la Monoamina Oxidasa tipo B (MAO-B) en el interior de células no dopaminérgicas (Ver Figura 11). El siguiente paso importante para su toxicidad es su recaptura por las

terminales nerviosas dopaminérgicas. Ya que el MPP+ es una molécula polar (a diferencia de su precursor el MPTP), este no puede atravesar libremente las membranas celulares por lo que depende de acarreadores presentes en la membrana plasmática. El MPP+ tiene alta afinidad por el transportador de dopamina (DAT) de la membrana plasmática. Dentro de las neuronas dopaminérgicas, el MPP+ puede ser secuestrado por los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs) que lo almacenan dentro de la mitocondria y las vesículas sinápticas (Przerdborski y Jackson-Lewis, 1998).

Algunos autores aseguran que la toxicidad del MPP+ se basa principalmente en su capacidad para atravesar la membrana mitocondrial, inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria, además de provocar alteraciones en la homeostasis del calcio y una sobreproducción de radicales libres; eventos que llevan a la célula a una excitotoxicidad y muerte. Otros autores también han reportado alteraciones en el complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial y daño directo al DNA por el MPP+ (Buu, 1993), aunque existe controversia al respecto (Hattori et al., 1991).

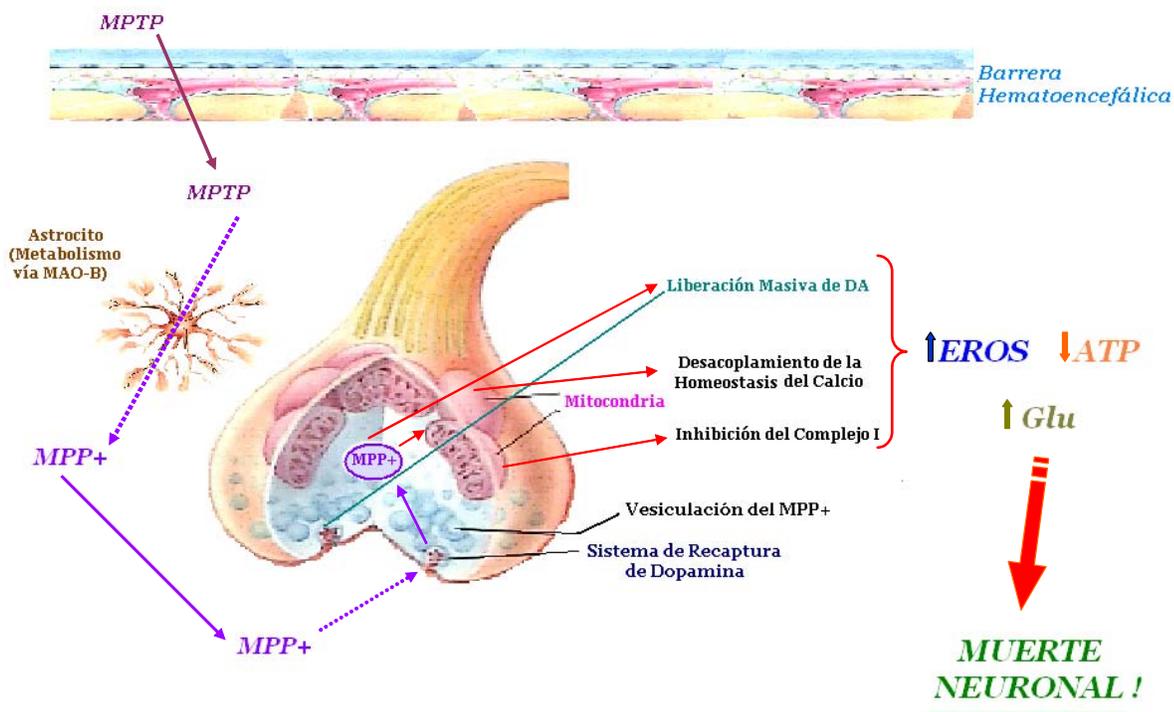


Figura 11. Modelo de Parkinsonismo generado por la 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a través de su metabolito tóxico, el 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+).

La idea de que el óxido nítrico (NO) se encuentra relacionado con la neurotoxicidad inducida por el MPP⁺ (al combinarse con el radical superóxido derivado de la interferencia en el transporte de electrones mitocondrial), transformándose en el altamente reactivo anión peroxinitrito, fue comprobada por Pzardborski y colaboradores por medio de la administración de inhibidores de la sintasa del NO (7-Nitroindazol). Dicha administración demostró que la protección se comporta de manera dosis-dependiente contra los efectos tóxicos del MPTP administrado a ratones o monos (Przedborski et al., 1996). Al estudiar la participación de la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en la toxicidad del metabolito con células Rho 0 mutantes, carentes de actividad de transporte electrónico, se ha reportado, aunque en menor proporción, la presencia de eventos necróticos y apoptóticos como en las células control. Esto confirma que en la muerte celular inducida por el modelo, no sólo se encuentra involucrada la alteración del transporte de electrones, sino algunas otras alteraciones bioquímicas no elucidadas aún (Tipton y Singer, 1993). Entre las principales alteraciones bioquímicas derivadas de la administración del MPP⁺, se encuentran tanto un incremento en la peroxidación de lípidos como un decremento en el contenido de dopamina estriatal (Rojas y Ríos, 1993).

Una de las ideas más seductoras al hacer estudios con modelos de enfermedades neurodegenerativas, es la de conseguir una asociación positiva entre los modelos moleculares y farmacológicos. Tal es el caso de los estudios realizados en épocas recientes por el grupo de Pzardborski y colaboradores, quienes encontraron una asociación entre el modelo de MPTP y la α -sinucleína.

A través de su trabajo, los autores reportan que la administración del MPTP, induce una regulación positiva en la α -sinucleína específica de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* (Vila M., et al., 2000). Estos estudios son apoyados por el grupo de Ferrante, que reporta que el MPTP, induce la agregación de la α -sinucleína en primates (Kowall et al., 2000).

Posteriormente, Pzardborski reporta la resistencia al modelo de MPTP en ratones de la cepa C57 Black que carecen de α -sinucleína (Dauer et al., 2002). A

diferencia de trabajos previos en los que se sugiere una interacción entre la α -sinucleína y el transportador de dopamina (DAT) (Lee et al., 2001), los autores reportan una independencia a las anomalías del DAT en dicho proceso, ya que a través de sus estudios en tejido estriatal, cultivos de neuronas dopaminérgicas y sinaptosomas, no observaron alteraciones funcionales del DAT en dichos ratones. La resistencia al modelo es asociada por los autores con la incapacidad que demostró el MPP+ para inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, en los ratones sin la α -sinucleína (Dauer et al., 2002).

Sin embargo, otros estudios reportan que la sobre expresión de la α -sinucleína, no modifica la susceptibilidad al MPTP (Rathke et al., 2001; Dong et al., 2002; Schluter et al., 2003).

Estos resultados podrían apoyar la idea de una interacción entre los factores ambientales y genéticos en relación a la susceptibilidad de presentar la EP.

4.5.2.2. Otros modelos farmacológicos de la EP

4.5.2.2.1. Administración Nigral de Fierro.

Modelos basados en la administración estereotáxica de sustancias que producen daños neuronales incluyen la infusión de fierro en la *substantia nigra* por esta vía, provocando la pérdida de neuronas (Ben-Sachar y Youdim, 1991a) en dicha región cerebral y la disminución en los niveles de dopamina estriatales (Sengtock et al., 1992) en roedores. La administración de una dosis única de fierro es capaz de generar anomalías histológicas (caracterizadas por microgliosis) (Shoham y Youdim, 2000), neuroquímicas y conductuales (rotatorias) importantes (Susel et al., 1989). Por su parte, las células PC12 expuestas a altas concentraciones de fierro presentan una disminución en la actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Cooper y Schapira, 1997). Es por todas estas razones, que el fierro también se ha postulado como un modelo de neurodegeneración (Shoham y Youdim, 2000; Guo et al., 2000).

4.5.2.2.2. Reserpina.

Además del modelo de MPTP se han desarrollado diferentes modelos farmacológicos de la EP con buenos resultados. Inicialmente, en 1957 al demostrar Carlsson que las alteraciones motoras derivadas del Parkinson se encontraban relacionadas a su vez con el abatimiento en las concentraciones de dopamina estriatal, se idearon modelos en los que se llevara a la disminución en las concentraciones del neurotransmisor. De esta manera, se empleó la reserpina, un inhibidor del transportador vesicular de monoaminas, que disminuye el contenido estriatal de dopamina, produciendo temblor y reducción de la actividad motora en los animales. A pesar de ser muy utilizado para el estudio de la EP durante los años 60's y 70's, el uso de la reserpina como modelo de EP ya no se emplea debido a su inespecificidad en la liberación de neurotransmisores. Sin embargo aún es un modelo útil para el estudio de alteraciones motoras (Gerlach y Riederer, 1996).

Siguiendo el mismo principio de la reducción en las concentraciones de dopamina, se han ideado otros modelos como el basado en la administración de metanfetaminas, provocando de esta manera la reducción de dopamina y sus dos principales metabolitos (HVA y DOPAC) en el cuerpo estriado, así como la disminución en la actividad de la TH. El mecanismo de acción de las metanfetaminas se basa en su capacidad para favorecer la liberación de la dopamina al espacio sináptico. La transformación de la metanfetamina contribuye al daño neuronal al transformarse a su vez, por un mecanismo no enzimático, en la toxina 6-OHDA (Gerlach y Riederer, 1996).

4.5.2.2.3. 6-OHDA.

La administración de la 6-OHDA es un modelo de la EP empleado desde hace varias décadas con buenos resultados (Méndez & Finn, 1975). Su administración intracerebroventricular (i.c.v.) promueve la destrucción selectiva de las terminales nerviosas catecolaminérgicas. Al ser incapaz de atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE), la 6-OHDA administrada sistémicamente no induce efectos tóxicos al Sistema Nervioso Central. Sin embargo, su administración i.c.v. en pequeñas dosis (150µg de base libre) en el ventrículo lateral u otras regiones

cerebrales (8µg de base libre), es capaz de inducir la destrucción selectiva de neuronas catecolaminérgicas (Dabbeni-Sala et al., 2001). Esto trae como consecuencia la disminución de dopamina, noradrenalina y adrenalina en las regiones cerebrales dañadas, mientras que otros neurotransmisores como el GABA, la acetilcolina y la serotonina, se mantienen inalterados (Anichtchik et al., 2000).

El mecanismo de acción de la 6-OHDA es a través de lesiones en la vía nigroestriatal Dopaminérgica, a través de la generación de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, derivados de la reacción de Fenton. Evidencia indirecta de la participación del radical hidroxilo en este modelo, generada por algunos autores, subraya la trascendencia de los sistemas detoxificadores de radicales libres (Medda et al., 1996). Además se ha demostrado que la 6-OHDA es capaz de liberar los iones férricos de la ferritina almacenada en células gliales y neuronas (Monteiro y Winterbourn, 1989), lo que contribuye a su neurotoxicidad.

4.5.2.3. Administración de compuestos considerados como factores de riesgo.

A la par del descubrimiento de modelos que favorecen la disminución en el contenido de catecolaminas también se han creados modelos basados en los factores de riesgo para la generación de la enfermedad. Tal es el caso de la administración de tóxicos ambientales tales como los pesticidas (paraquat) (Fredriksson et al., 1993), el monóxido de carbono (Lee y Marsden, 1994), cianuro (Cooper y Schapira, 1997) y el manganeso (Perl et al., 1994), los cuales producen efectos conductuales semejantes a los observados en la enfermedad de Parkinson (Parkinsonismo) en humanos.

4.5.2.4. Isoquinolinas (R-Salsolinol).

El estudio y generación de los modelos experimentales ha llevado a la comunidad científica a la búsqueda de endotoxinas relacionadas con la neurodegeneración. En esta búsqueda, las isoquinolinas han resultado de particular interés para los investigadores de la EP. El éxito de los derivados de isoquinolinas como modelos farmacológicos de la EP se basa en su semejanza con el MPTP. Las

isoquinolinas son capaces de producir la misma cadena de eventos que el modelo de MPTP, con la ventaja de ser endotoxinas. La más estudiada hasta el momento es el llamado R-Salsolinol (R-SAL), la cual es una tetrahidroisoquinolina derivada de la condensación de dopamina con acetaldehído o piruvato (Naoi et al., 1993), seguido de una descarboxilación y una N-metilación para formar el N-metil-R-salsolinol (R-SAL) (Maruyama et al., 1997). Como el MPTP, el R-SAL es incapaz de atravesar la BHE por lo que requiere de su transformación a través de la Monoamino oxidasa-B (MAO-B), para su oxidación al metabolito polar 1-2-dimetil 6,7-dihidroxiisoquinolinio (Di-Me-HIQ+) (Naoi et al., 1995), y de esta manera llegar al SNC. Es importante citar que tanto el R-SAL como el Di-Me-HIQ+ son capaces de generar una inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (otra característica que comparte con el modelo de MPTP) en células SH-SY5Y de neuroblastoma (Minami et al., 1998). Además esta endotoxina es capaz de inhibir la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa e inducir la apoptosis (como el MPTP) (Maruyama et al., 1997), lo cual apoya su uso, no sólo como un modelo que representa las alteraciones conductuales y patológicas inducidas por el dramático descenso en las concentraciones estriatales de dopamina observadas en la enfermedad, sino que señala una de las posibles causas endógenas para la predisposición o susceptibilidad para la aparición de la EP. La presencia de la N-metil-R-Salsolinol Transferasa (R-SAL-Transf) en humanos y de la correlación de sus niveles con los niveles de Di-Me-HIQ+ generados, dan apoyo a la hipótesis que señala al R-SAL como un compuesto con relevancia científica en el estudio de la EP (Naoi et al., 1995).

4.6. Neuroprotección de compuestos con cobre.

La búsqueda de un mecanismo de neuroprotección a través de compuestos naturales ha llevado a diferentes grupos en todo el mundo al desarrollo de investigaciones que esclarezcan el potencial que compuestos asociados a metales de transición pueda tener en la protección contra de los eventos neurodegenerativos (Rojas y Ríos, 1995; Sorenson et al., 1995).

La idea de administrar un suplemento de cobre como neuroprotector contra la neurodegeneración tiene su origen en una gran variedad de estudios que demuestran un bajo contenido de cobre en la *substantia nigra* y cuerpo estriado de cerebros parkinsonianos a través tanto de estudios *post mortem* (Riederer, et al., 1989; Dexter et al., 1991) como de valoraciones de su principal transportadora cerebral (la ceruloplasmina) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes parkinsonianos (Boll et al., 1999). El déficit reportado para la actividad ferroxidasa de la Cp, enzima asociada con importantes funciones neuroprotectoras (Inoue et al., 1999), podría ligar a esta enfermedad con alteraciones en el manejo del cobre cerebral (Ver Tabla 9).

El uso de los compuestos de cobre, ha demostrado tener un potencial tan importante a este respecto que se ha sugerido su utilización en casos muy diversos de daño celular. Entre los estudios realizados, destaca el efectuado por Sorenson en 1995, en el que los autores administran varios compuestos de cobre tanto endógenos (ceruloplasmina, metalotioneína) como sintéticos (cobre-diisopropilsalicilato; Cu-DIIPS) generados por el mismo grupo, con el fin de evaluar la sobrevivencia de ratones expuestos a radiaciones ionizantes (generadoras importantes de radicales libres). El Cu-DIPS es un compuesto capaz de dismutar al radical libre superóxido, tal y como lo hace la Cobre/Zinc-Superóxido Dismutasa (Cu/ZnSOD). La sobrevivencia de los animales a los que estos compuestos les fueron administrados fue mayor al enfrentarse a los efectos tóxicos de las radiaciones, lo que sugiere su papel protector en contra del estrés oxidativo (Sorenson et al., 1995), condición que ha sido demostrada en la EP (Dexter et al., 1989) y otras enfermedades neurodegenerativas (Marcus et al., 1998; Bowling et al., 1993)

La metalotioneína (MT) es una proteína de cadena sencilla de bajo peso molecular, que contiene una alta proporción de residuos de cisteínas (20 cisteínas/61 aminoácidos), lo que confiere a esta proteína de una gran capacidad antioxidante, gracias al gran contenido de grupos tiol que poseen dichas cisteínas, considerados a su vez como buenos atrapadores de radicales libres (Kojima y Kägi, 1978).

La síntesis de la MT puede ser estimulada en varios órganos y responde a las concentraciones de metales como el cadmio, zinc y cobre. Además, la síntesis de esta proteína puede ser inducida por algunos compuestos no metálicos como el etanol, la

indometacina, la dexametasona, y algunos agentes alquilantes y quelantes (Hamer 1986; Gutiérrez-Reyes et al., 1998).

A pesar de la gran cantidad de enzimas antioxidantes presentes en el organismo, la única molécula capaz de atrapar al radical libre hidroxilo es la MT, lo que le confiere un lugar privilegiado para el estudio de su capacidad antioxidante (Sato y Bremner, 1993). Hasta el momento han sido identificadas 4 isoformas de la MT (MT-I, -II, -III y -IV) en los mamíferos. Mientras los genes de la MT-I y la MT-II se expresan en varios órganos (ubicua), la MT-III es considerada como exclusiva de las neuronas. La expresión de la isoforma de MT-IV, se encuentra también confinada exclusivamente al epitelio escamoso estratificado de la piel, la lengua y la parte superior del tracto digestivo (Palmiter et al., 1992).

El papel neuroprotector de la MT en la EP se ha postulado por diversos grupos debido a que la respuesta de esta proteína se ejerce en situaciones de estrés celular (Ver Tabla 10), provocado tanto por daño mecánico, como a través del estrés oxidativo generado por factores de riesgo asociados a la EP como el paraquat, el cual ejerce su toxicidad a través de la generación de altas concentraciones de radical superóxido (Sato et al., 1988). Estos hallazgos sugieren que la MT responde a la presencia del radical superóxido que, como anteriormente señalamos, se genera en altas concentraciones en la EP y en algunos de sus modelos experimentales.

FUNCION	MECANISMO DE NEUROPROTECCION	REFERENCIA
Antioxidante	Atrapadora de radicales hidroxilo y superóxido	Thornaley y Vasak, 1985
Liberación del Zinc	<ul style="list-style-type: none"> • Estabiliza membranas (suprime peroxidación) • Inhibición de NADPH-citocromo reductasa • Inducción de MT • Incremento en la actividad de la GPX 	Thomas et al., 1986
Quelante de Hierro y otros Metales de Transición	Formación de complejos Fe-MT, incapacita al Fe(II) para su participación en la reacción de Fenton	Aschner et al., 1997
Bloquea el Daño Excitotóxico	La MT-III protege vs el daño neuronal inducido por KA	Erickson et al., 1997

Tabla 10. Mecanismos propuestos de neuroprotección de la MT. GPX= Glutación peroxidasa.

La afinidad de los iones metálicos a los sitios de unión de la metalotioneína (MT) difiere marcadamente dependiendo de las concentraciones disponibles de cada metal. Sin embargo, en condiciones normales, esta guarda la siguiente relación de afinidad: Zn<Cd<Cu<Hg<Ag (Holt et al., 1980), mientras que la dependencia para su síntesis presenta un esquema diferente (Cu, Hg>Cd>Zn; Sato y Bremner, 1993).

La administración por vía oral de suplementos de cobre en la dieta, incrementa sólo en una pequeña proporción la síntesis hepática de MT, mientras la inyección del mismo, induce significativamente su síntesis (Bremner et al., 1986). Sin embargo, se ha reportado que la administración del cobre no sólo promueve la síntesis de MT, sino también de otras cuproproteínas como la Cp. Esta situación puede verse modificada

debido al déficit de cobre imperante en la EP, ya que dichas cuproproteínas antioxidantes permanecen como apoenzimas (inactivas), presentando a dichos sujetos como susceptibles a los eventos oxidativos. En este mismo contexto, es importante señalar que el transporte de cobre se encuentra reducido en los animales de edad avanzada en comparación con animales jóvenes, lo que sugiere que además que el cerebro envejecido puede ser más sensible a la carencia de cobre y cuproenzimas que el cerebro joven (Connor et al., 1993).

En el caso de la MT, el mecanismo parece tener un comportamiento diferente ya que conforme avanza la edad, el contenido de MT aumenta considerablemente. Lo que de primera instancia parece ser una respuesta del organismo hacia una mejor defensa en contra del estrés oxidativo, ha sido también considerado como desafortunado, ya que la disminución en la liberación del zinc altera a su vez los mecanismos estabilizadores a cargo de este catión en el citoesqueleto, vulnerando al tejido nervioso frente al incremento en la tasa de peroxidación, que forma parte de los cambios bioquímicos que conllevan al envejecimiento (Mocchegiani et al., 2001).

4.7. Papel del Cobre en las concentraciones de Dopamina y la Actividad Locomotriz.

Como mencionamos anteriormente, el cobre no sólo es un importante cofactor ó grupo prostético de proteínas del sistema antioxidante, y participante en el control homeostático de los niveles de hierro cerebrales. Este metal también participa como cofactor de enzimas involucradas directamente en la síntesis y metabolismo de la dopamina (Barbeau, 1986) (Ver Tabla 7).

A este respecto, el suplemento de cobre en la dieta es indispensable para mantener la función dopaminérgica (Prohaska y Bailey, 1994). Se ha reportado que los animales expuestos a dietas deficientes en cobre durante el desarrollo, presentan alteraciones irreversibles en la función catecolaminérgica. Ya que la generación del movimiento es dependiente de una adecuada función catecolaminérgica entre otros sistemas neurotransmisores (Sian et al., 1999), la deficiencia de cobre en los ganglios basales de pacientes con la EP, podría jugar un papel importante en la susceptibilidad intrínseca del individuo a la neurodegeneración (Hartmann y Evenson, 1992).

Por su parte, en el modelo de MPP+ se induce tanto un déficit bioquímico (concentraciones estriatales de cobre (Rojas et al., 1996)) como alteraciones motoras (acinesia (Fredriksson y Archer, 1995)). La asociación entre movimiento y cobre nace desde hace varios años y se basa en la presencia de ataxias en corderos de la región oeste de Australia. Fueron Bennetts y Chapman, quienes llegaron a la conclusión de que estas alteraciones se basaban en una deficiencia de cobre (Bennetts y Chapman, 1937). Posteriormente, este grupo reportó la reversión de las ataxias a través de la administración de cobre (Bennetts y Beck, 1942), lo que precede por más de 20 años al descubrimiento de la enfermedad de Menkes (EM) (Menkes et al., 1962).

En modelos animales de deficiencia de cobre, como el de los ratones "*mottled*" ("*mottled mouse*"; (*Mo/mouse*)), se ha podido constatar que existe una clara asociación entre la disminución en la actividad de la dopamina- β -hidroxilasa y la deficiencia de cobre, lo que sugiere una correspondencia más a una pérdida neuronal, que al déficit de la actividad de la vía dopaminérgica (Hunt, 1980). De la misma manera, se ha reportado una hiperactividad locomotriz en animales sujetos a la administración de un suplemento de cobre en la dieta (250mg/kg), lo que a su vez se refleja como un incremento en los niveles de dopamina (Murthy et al., 1981). La deficiencia de cobre en ratas ha demostrado no sólo tener efectos irreversibles, sino que la segunda generación de ratas deficientes de cobre, también presentan bajas concentraciones estriatales de dopamina y signos análogos a la EP (O'Dell, 1993)

En la actualidad, se sabe que la actividad dopaminérgica es responsable del control de los centros de generación del movimiento, y esta se encuentra modulada por algunos receptores como los receptores a adenosina (Velluci et al., 1993; Poppoli et al., 1998). Los receptores a adenosina se dividen en tres subtipos principales (A1, A2 y A3). El receptor A2 a su vez se subdivide en dos subtipos conocidos como A_{2A} y A_{2B} (Daly et al., 1983). De ellos, el receptor A_{2A}, se destaca como el más íntimamente involucrado en el metabolismo de la dopamina (Josselyn y Beninger, 1991), acumulándose preferentemente en caudado-putamen, núcleo accumbens y tubérculos olfatorios (Schiffmann et al., 1989). El interés de esta modulación ha llegado inclusive a proponer a los receptores a adenosina como pieza clave en el desarrollo de agentes terapéuticos antiparkinsonianos (Kanda, et al., 1997).

Los trastornos en la actividad dopaminérgica se han asociado a los déficits motores que se presentan como parte de la senectud y en patologías asociadas con la edad (correlación con bajas concentraciones de dopamina estriatal) (Emerich et al., 1993). La deficiencia en cobre, por lo tanto, podría contribuir de manera importante a la generación de los trastornos motores que forman parte de la EP. De aquí, que podamos sugerir que la disponibilidad adecuada del cobre, no sólo favorecerá la defensa en contra de los radicales libres generados en la EP, sino también permitirá una adecuada actividad dopaminérgica estriatal a través de la recuperación en las concentraciones de dopamina estriatal.

5. Hipótesis.

Si las proteínas antioxidantes dependientes de cobre actúan como neuroprotectores, entonces un suplemento con sulfato de cobre a ratones expuestos al MPP+ tendrá un efecto neuroprotector, logrando la defensa neuronal en contra del estrés oxidativo, presunto responsable de la neurodegeneración que caracteriza a la enfermedad de Parkinson.

6. Objetivo General.

Evaluar el posible efecto antioxidante del sulfato de cobre en el modelo de enfermedad de Parkinson, basado en la administración de MPP+ a ratones, así como su papel en el control funcional del sistema dopaminérgico.

7. Objetivos Particulares.

- 1) Evaluar la capacidad protectora del CuSO_4 (a través de su administración crónica ó aguda) en el modelo experimental basado en la administración intracerebroventricular del MPP+, a través del análisis de índices de estrés oxidativo, contenido cerebral de cobre, funcionalidad dopaminérgica y actividad motora.
- 2) Analizar los mecanismos considerados como posibles candidatos a la neuroprotección generada por el sulfato de cobre, en contra de los trastornos bioquímicos y conductuales que caracterizan al modelo de MPP+ (participación de cuproproteínas; tirosina hidroxilasa, superóxido dismutasa).

8. Métodos.

Se utilizó un modelo experimental de neurodegeneración, basado en la administración intracerebroventricular del 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺, el metabolito tóxico de la neurotoxina MPTP) a ratones, como un modelo de la enfermedad de Parkinson, de acuerdo con lo reportado previamente (Rojas y Ríos, 1993; Rojas y Ríos, 1997). Los animales se separaron en cuatro grupos experimentales asignados al azar y recibieron el pretratamiento con CuSO₄ en dos diferentes esquemas de administración (crónico o agudo) de la siguiente manera:

LOTE	GRUPO	PRETRATAMIENTO (Oral ó i.p.)	ADMINISTRACION i.c.v
1	CONTROL	Na ₂ SO ₄	Solución Salina
2	Cu	CuSO ₄	MPP+
3	Cu / MPP+	CuSO ₄	MPP+
4	MPP+	Na ₂ SO ₄	Solución Salina

Todos los experimentos se realizaron en ratones adultos de la cepa C57 Black machos (25- 30g de peso). Una dosis única de de 20µg/3µl de MPP+ fue administrada a cada animal de los lotes 3 ó 4. A diferencia de éstos, los animales de los grupos 1 ó 2 recibieron solución salina. Todos los animales se mantuvieron en un ambiente controlado de temperatura y consumieron alimento estándar para roedores *ad libitum* (Purina Chow), con un contenido estándar de cobre (10 mg/kg) y permanecieron en condiciones constantes de luz/oscuridad (12:12).

Administración aguda del CuSO₄.

En el caso del tratamiento agudo, los animales recibieron la administración del CuSO₄ (ó Na₂SO₄ como un control del sulfato) a una dosis única de 2.5 mg/kg por vía intraperitoneal, 30 min, 8 h, 16h, ó 24h antes de la administración del MPP+, de acuerdo a reportes previos de la literatura (Rojas et al., 1996).

Posteriormente, se realizó la inducción del daño por medio de la inyección i.c.v. del metabolito tóxico MPP+ (Rojas y Ríos, 1993).

Administración crónica del metal.

Con el fin de realizar una administración del cobre más acorde al modo de administración habitual del metal al organismo (a través de la dieta), se empleó un esquema crónico basado en la administración del cobre en el agua de bebida, y por lapso de 1 mes previo a la inducción del daño, por medio de una solución de CuSO_4 o Na_2SO_4 (350 mg/l y 700 mg/l) a ratones de la misma cepa, sexo y peso anteriormente citados. Estas dosis que corresponden a las reportadas en estudios anteriores como suplementos de cobre que no producen daño hepático (Crowe y Morgan, 1996a).

Co-tratamiento agudo del CuSO_4 y el MPP+.

La administración (aguda o crónica) del sulfato de cobre, terminó con la inyección i.c.v. de la solución salina o en su caso del metabolito tóxico MPP+. Tiempo después de la administración i.p. del CuSO_4 (30min, 8h, 6h, 24h en el esquema agudo y 30 días después en el esquema crónico), los animales recibieron la administración i.c.v. del MPP+. Posteriormente, dependiendo del marcador biológico a analizar (ver Fig. 11 y 12), los animales fueron sacrificados por dislocación para la obtención del cuerpo estriado en el que fueron llevados a cabo diversos estudios bioquímicos con el fin de comprobar la neuroprotección del cobre y los posibles mecanismos de acción involucrados. Entre los marcadores evaluados se encontraron: I) Valoración del estrés oxidativo; II) Evaluación del sistema dopaminérgico estriatal; III) La actividad respiratoria mitocondrial; IV) Análisis del contenido cerebral de cobre y de su posible toxicidad; y V) Evaluación conductual de los animales sujetos a los diferentes tratamientos.

I. Valoración del estrés oxidante para los diferentes tratamientos.

Se emplearon dos marcadores bioquímicos:

- (a) Peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado en los animales lesionados, después de dos horas de la inducción del modelo de acuerdo con la descripción de Rojas y Ríos (Rojas y Ríos, 1993).
- (b) Actividad estriatal de la enzima superóxido dismutasa total y sus dos formas por separado (MnSOD y Cu/ZnSOD) (Schwartz et al., 1998) 16 ó 24 horas después de la administración del pretratamiento y 2 horas después de realizada la lesión.

II. Evaluación del sistema dopaminérgico estriatal.

- (a) Contenido estriatal de dopamina por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión con detector electroquímico (HPLC-Det.EQ), 24h después de la inducción del modelo, basado en estudios previos (Rojas y Ríos, 1993).
- (b) Evaluación de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) *ex vivo* a través de la determinación de la acumulación de L-DOPA por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Presión con detector electroquímico (HPLC-Det.EQ) de acuerdo a lo reportado previamente (Gutiérrez-Reyes et al., 1998).

III. Evaluación del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial

- (a) Actividad estriatal de la cuproenzima Citocromo c Oxidasa de acuerdo a lo reportado en la literatura (Cooperstein y Lazarow, 1951), posterior a la administración de los modelos de neurodegeneración anteriormente mencionados con las modificaciones realizadas posteriormente (Pettersen y Cohen, 1985).

IV. Análisis del contenido cerebral de cobre y de su posible toxicidad.

- (a) Contenido estriatal y mesencefálico de cobre, 24 horas después de la inducción de los modelos, de acuerdo con lo informado por Ríos et al. (Ríos et al., 1995).
- (b) Evaluación de la toxicidad inducida por el pretratamiento con cobre tanto en el esquema crónico como en el agudo por medio de la actividad plasmática de la alanina transaminasa (ALT/GPT) usando espectrofotometría de luz visible (Rosenberg et al., 2000).

V. Valoración conductual de los animales sujetos a los diferentes tratamientos.

- (a) Se evaluaron las alteraciones de la actividad locomotriz de los animales sujetos a la administración del MPP+, como reflejo de la protección del cobre en contra del daño motor, por medio de un equipo de medición de actividad locomotriz basado en el paso de los animales a través de cuadrantes delineados por rayos de luz infrarroja, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Fredriksson y Archer, 1994).

CuSO₄ Agudo

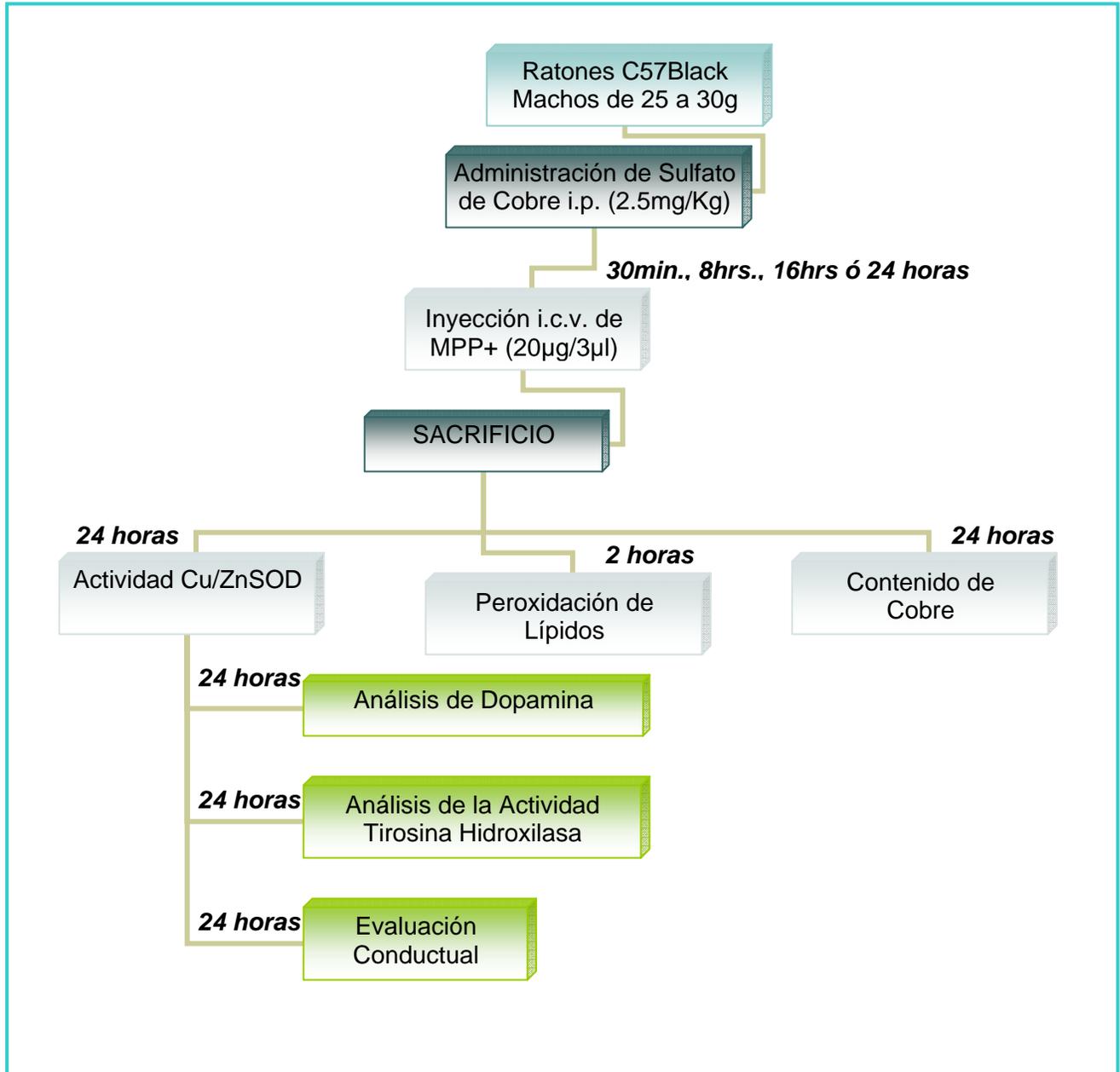


Figura 12. Diagrama de Flujo de la administración aguda del CuSO₄.

CuSO₄ Crónico

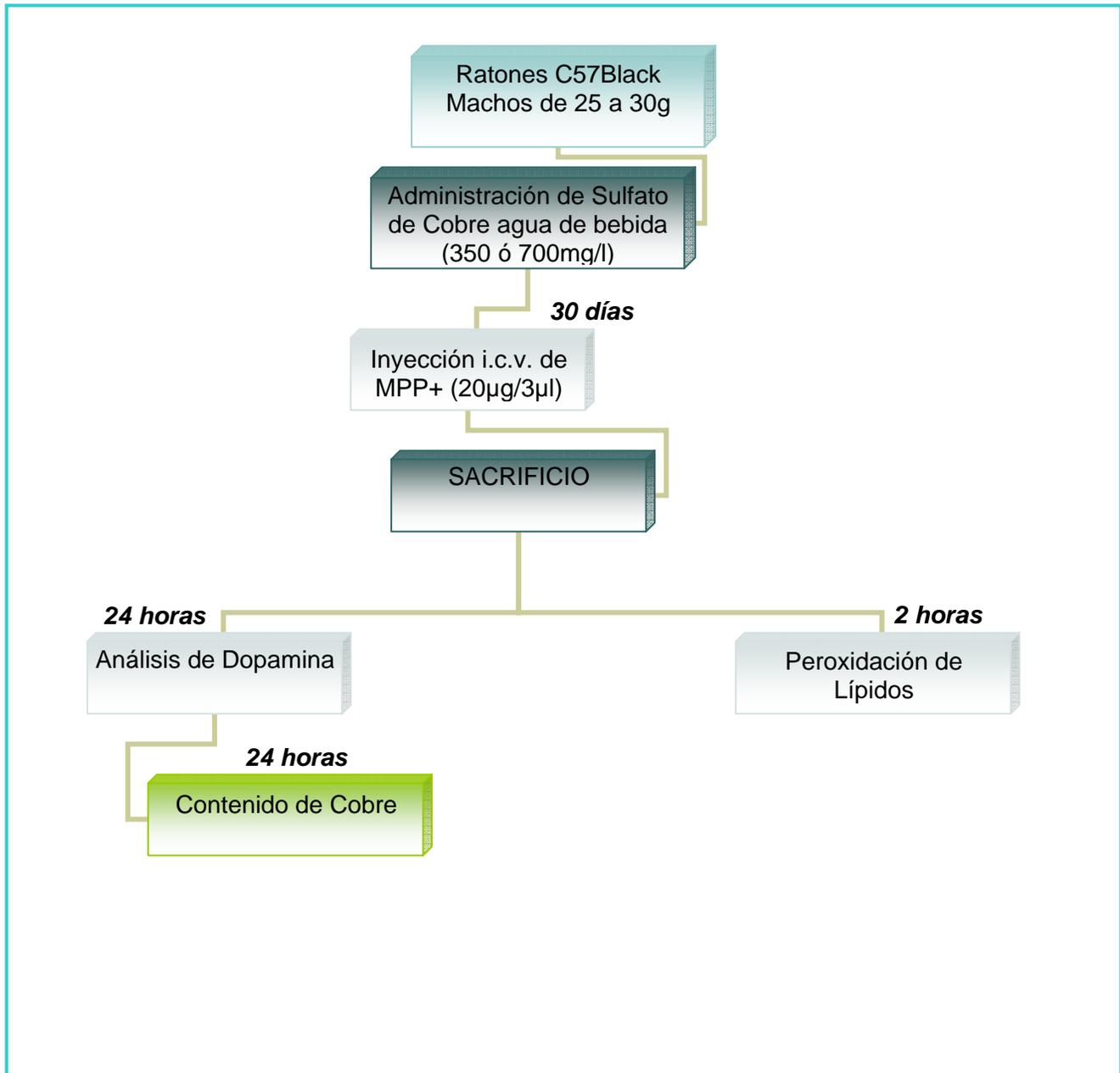


Figura 13. Diagrama de Flujo de la administración crónica del CuSO₄.

I. Valoración del estado oxidante para los diferentes tratamientos.

(a) Peroxidación de Lípidos (LPO)

El análisis de la formación de los productos fluorescentes de la peroxidación lipídica, como un índice de estrés oxidante, se llevó a cabo en el cuerpo estriado de los ratones usando una técnica previamente descrita (Rojas et al., 1996). La técnica llevada a cabo consistió en:

Obtención del cuerpo estriado y su homogenizado en solución salina. Posteriormente, 1ml del homogenado fue depositado en tubos de vidrio con tapa cubiertos de la luz por duplicado a los que les fueron agregados 4ml de la mezcla cloroformo metanol (2:1; v/v) dejándolos en hielo durante 30min. Una vez habiendo descartado la fase proteica (superior) por aspiración esta fue descartada. Se tomó 1ml de la solución y se agregaron 100µl de metanol en una celda de cuarzo para la evaluación de los productos fluorescentes derivados de la lipoperoxidación (bases de Schiff y aldehídos).

Se preparó una solución de quinina como control interno (1mg/l en una solución de ácido sulfúrico 0.05M) 15 min antes de la lectura de las muestras. La fluorescencia del estándar de quinina y las muestras se midió a 370nm como longitud de onda para la excitación y de 430nm como longitud de onda de emisión a un slit de 15nm.

La evaluación de la fluorescencia de la quinina es empleada con el fin de calibrar la sensibilidad del aparato (140 Unidades de Fluorescencia (U.F.) corresponden a 350 unidades arbitrarias de fluorescencia de acuerdo a lo reportado por Rojas et al., 1996. Los resultados se expresaron como U.F. /g tejido húmedo (% de cambio vs control)

(b) Actividad Superóxido Dismutasa

Para la evaluación de la superóxido dismutasa se obtuvo el cuerpo estriado de los animales y se almacenó en tubos Eppendorff protegidos de la luz en congelación (-70°C) hasta el momento de su análisis por medio del método de xantina/xantina oxidasa, modificado para la evaluación de la enzima en el tejido cerebral por Schwartz

(Schwartz et al., 1998). Al momento de su análisis, el tejido fue homogenizado en una solución amortiguadora de bicarbonatos con 20mM de bicarbonato de sodio, 0.02% de Triton X-100, pH = 10.2.

Cincuenta microlitros del sobrenadante obtenido a partir de la homogenización de la muestra se adicionaron a una celda de vidrio de 3ml que contenía 950 μ l de la mezcla de reacción consistente en: 10 μ M de azida de sodio, 100 μ M de Xantina, 10 μ M de citocromo c reducido, y 1mM de EDTA en 20mM de bicarbonato de sodio con 0.02% de Tritón X-100, todo esto con un pH = 10.2.

La reacción se inició por la adición de xantina oxidasa y fue monitoreada a través de la evaluación de los cambios de absorbancia a 560nm generados por la reacción (cada minuto por lapso de 5min.) en un Espectrofotómetro UV/VIS Lambda-20, Perkin Elmer. Los análisis se realizaron por duplicado y la participación de cada una de las formas de SOD fue distinguida a través de la adición de Cianuro de Potasio a una concentración final en la celda de 5mM, ya que este es capaz de inhibir selectivamente la forma de SOD dependiente de cobre (Cu/ZnSOD). Por lo tanto, la adición del cianuro permite la evaluación de la actividad SOD dependiente de manganeso (MnSOD). A través de la resta de este valor al que corresponde a la Actividad Total de la SOD, se obtiene la participación de la Cu/ZnSOD. Los resultados se expresaron como el porcentaje de variación vs sus respectivos valores control (sobre la base de los valores de Unidades Internacionales de SOD/g de tejido húmedo).

Las Unidades Internacionales de SOD (U.I. SOD) se evaluaron a través de la técnica basada en la oxidación del citocromo c reducido acoplada a la generación de radicales superóxido a partir del sistema de Xantina / Xantina Oxidasa, considerando como una U. I., aquella que corresponde al 50% de la inhibición de la generación del citocromo oxidado (Flohe y Otting, 1984) por cada 5 min en relación al peso del tejido.

II. Evaluación del sistema dopaminérgico estriatal.

(a) Contenido de Dopamina

(Rojas y Ríos, 1993)

La determinación de las concentraciones de estriatales dopamina se llevó a cabo usando un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Presión Perkin Elmer (LC 250 Perkin Elmer) con detector electroquímico (Metrohm 641) y un integrador (Hewlett-Packard 3396-II).

Una vez disecado, el cuerpo estriado de los animales se pesó y homogenizó en una alícuota de 500µl de solución antioxidante que consistió en una solución de ácido perclórico y metabisulfito de sodio (0.1% w/v). Las muestras fueron centrifugadas a 4000g durante 10 min. Los sobrenadantes fueron colectados en tubos Eppendorff protegidos de la luz a los que se les mantuvo a -70°C hasta el momento de su análisis.

El análisis de las muestras fue llevado a cabo previa filtración a través de filtros para membrana de nitrocelulosa (Millipore) con un tamaño de poro de 0.45µm. Se realizaron curvas de calibración basándose en concentraciones conocidas de dopamina. Las concentraciones de dopamina o L-DOPA en las muestras, se obtuvieron por la interpolación en las curvas estándar. Se empleó una columna para catecolaminas (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL) de 100 x 4.8 mm con un tamaño de partícula de 3µm.

La fase móvil consistió en un buffer de fosfatos (pH = 3.2) que contenía Octil sulfato de sodio (0.2mM), EDTA (0.1mM), en solución acuosa 16.5% (v/v) de Metanol (Mallincrodt).

Condiciones del Cromatógrafo: Flujo = 1.2ml/min; Potencial del detector amperométrico = 0.8V vs el electrodo de referencia de Ag/AgCl.

Las áreas bajo la curva de obtenidas a partir de los cromatogramas fueron interpoladas a las curvas estándar y los resultados obtenidos fueron reportados como µg de dopamina por gramo de tejido húmedo (DA (µg/g tej.húmedo)).

(b) Actividad Tirosina Hidroxilasa (TH)

El análisis de la actividad de la enzima TH se realizó *ex vivo* a través de la evaluación de la L-DOPA estriatal. El procedimiento puede resumirse de la siguiente manera:

1. Los animales 30min antes de la eutanasia, recibieron la administración i.p. de un inhibidor central de la dopa-descarboxilasa (NSD 1015) a una dosis de 100mg/kg (Kehr et al., 1972).
2. Una vez bloqueada la síntesis de dopamina a partir de L-DOPA, fue posible la evaluación de la acumulación de éste aminoácido por medio de la HPLC-Det.EQ (con modificaciones a partir de Gutiérrez-Reyes et al., 1998) (Ver Figura 14), siguiendo los pasos 1) a 5) del apartado de evaluación de las concentraciones de dopamina estriatal.
3. Las áreas bajo la curva de obtenidas a partir de los cromatogramas fueron interpoladas a las curvas estándar y los resultados obtenidos fueron reportados como μg de L-DOPA por gramo de tejido húmedo (L-DOPA ($\mu\text{g/g}$ tej.húmedo)).

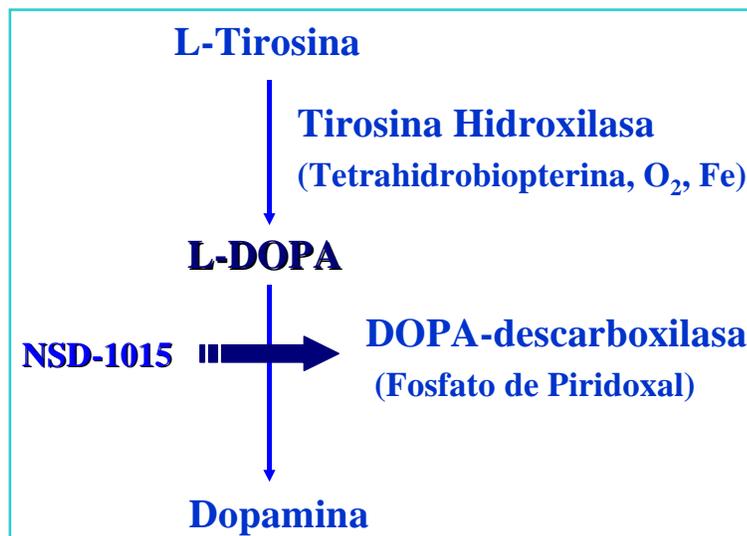


Figura 14. Procedimiento para evaluar la actividad de la TH (Gutiérrez-Reyes, 1998).

III. Evaluación de la actividad respiratoria mitocondrial

(a) Actividad Citocromo c Oxidasa (COX)

(Cooperstein y Lazarow, 1951; Pettersen y Cohen, 1985).

La actividad de la citocromo c oxidasa fue evaluada después de la disección y pesado de diferentes regiones cerebrales (cuerpo estriado, mesencéfalo, cerebelo, corteza), las cuales se homogenizaron al 10% con solución salina fría. Para su análisis se tomaron 12.5µl de la solución al 10% y se adicionaron 500µl de una solución amortiguadora de fosfatos (0.03M, pH =7.4), dilución al 0.25%.

Posteriormente, se adicionaron a la mezcla de incubación 100µl de la solución anterior para la evaluación de la actividad de la citocromo c oxidasa.

Mezcla de Incubación: Fue preparada a través de la deposición de 2.4ml de la solución amortiguadora de fosfatos en una celda de vidrio a la que fue adicionado posteriormente el homogenado.

El inicio de la reacción se llevó a cabo al agregar 0.5ml de citocromo c reducido 0.01mM. Las lecturas de absorbancia a 550nm se realizaron cada 5min. por un lapso de 30min.

Con el fin de oxidar totalmente el citocromo c, se adicionó Ferricianuro de Potasio y se obtuvo de esta manera una lectura final del Citocromo c Oxidado Total.

La cuantificación de la actividad de la COX se basó en la evaluación del promedio de las lecturas de absorbancia obtenidas por medio de la Espectrofotometría de luz UV/VIS, como resultado de la oxidación del Ferrocitocromo c por unidad de tiempo. Los resultados están expresados como el logaritmo del Ferrocitocromo c por gramo de tejido por minuto (Log ferrocitocromo c/g de tej. /min.)

IV. Análisis del contenido cerebral de cobre y valoración de su potencial hepatotóxico.

(a) Contenido de cobre

(Ríos et al., 1995).

Las concentraciones de cobre en el cuerpo estriado y mesencéfalo de los animales fueron evaluados de acuerdo a lo reportado con anterioridad. De esta manera, el cuerpo estriado de los animales fue digerido en 500µl de una solución de ácido nítrico (Suprapur Merck) por medio de un baño de agitación a 60°C durante 30 min. (Bonilla, 1978). Después de la digestión del tejido, el contenido de cobre de las muestras biológicas fue analizado en un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 3110, equipado con un Horno de Grafito (HGA-600) y un Automuestreador AS-60, utilizando las siguientes condiciones (Boll et al., 1999):

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de Rampa (seg.)	Hold (seg)	Flujo de Nitrógeno
Secado	120	10	50	300
Eliminación de Materia Orgánica	1000	1	30	300
Purgado	20	1	15	300
Atomización	2300	0	5	0
Limpieza	2600	1	5	300
Enfriamiento	20	5	5	300

Los resultados fueron reportados como µg de cobre por gramo de tejido húmedo (% de cambio vs control).

(b) Evaluación de la toxicidad del cobre: Actividad Alanina Transaminasa o Glutámico-Pirúvica) (ALT/GPT)

Para la evaluación de la actividad de la enzima ALT/GPT, como indicador del posible daño que el cobre podría ejercer en el tejido hepático (necrosis), se realizó una punción cardiaca a los animales para la obtención de sangre NO HEMOLIZADA.

Posterior a la extracción del suero, las muestras fueron analizadas usando un Kit comercial (Stanbio Laboratory Inc., San Antonio Texas, USA) y monitoreado en un Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible de doble haz Mod.Lambda-20 de Perkin Elmer. Los resultados fueron expresados como Unidades Internacionales por litro (U.I. /l) (Wroblewski F. y La Due, 1956).

V. Valoración conductual de los animales sujetos a los diferentes tratamientos.

Actividad Locomotriz Espontánea.

Con el fin de hacer una correlación entre los resultados bioquímicos y su expresión motora, se evaluó la actividad locomotriz espontánea de los animales en los diferentes grupos.

Una vez administrado el pretratamiento con sulfato de cobre y la posterior administración del MPP+ (24h después), se evaluó la actividad locomotriz espontánea en todos los animales que fueron expuestos a los diferentes tratamientos. La actividad locomotriz espontánea de los animales se evaluó con la ayuda de una caja de evaluación de conducta para roedores (45 x 45 x 15cm; Opto-Varimex Minor), la cual consiste de dos series de 15 rayos de luz infrarroja proyectados a partir de fotoceldas tanto verticales como horizontales que forman cuadrantes asociados a detectores de la emisión de rayos, de manera que al interrumpir el paso de la luz, esta intermitencia es registrada por el detector y contabilizada en una pantalla del equipo a manera de cuentas de actividad motora. La actividad ambulatoria es definida como un movimiento que cubre una distancia de 4cm en cualquier dirección, mientras la locomoción es definida como un movimiento en el que se cubren 8 fotoceldas o bien, 32 cm. La actividad vertical se detecta a través de sensores localizados a 9cm sobre el piso de la

caja para detectar el número de ocasiones en que el animal se levanta sobre sus pares traseros.

Los animales se depositaron en la caja de evaluación conductual por un período de 30min para su habituación al medio. Posteriormente, fueron establecidos dos períodos consecutivos de evaluación conductual de 30min cada uno, de acuerdo a lo reportado previamente en animales de la misma cepa (Fredriksson y Archer, 1994). La evaluación conductual se realizó durante las horas de luz (8:00-15:00hrs) en un cuarto con luz natural, evitando cualquier tipo de ruido que perturbara el estudio conductual.

Nota: Los animales empleados para este estudio fueron los mismos en los que se analizó la actividad de TH, con el fin de realizar correlaciones.

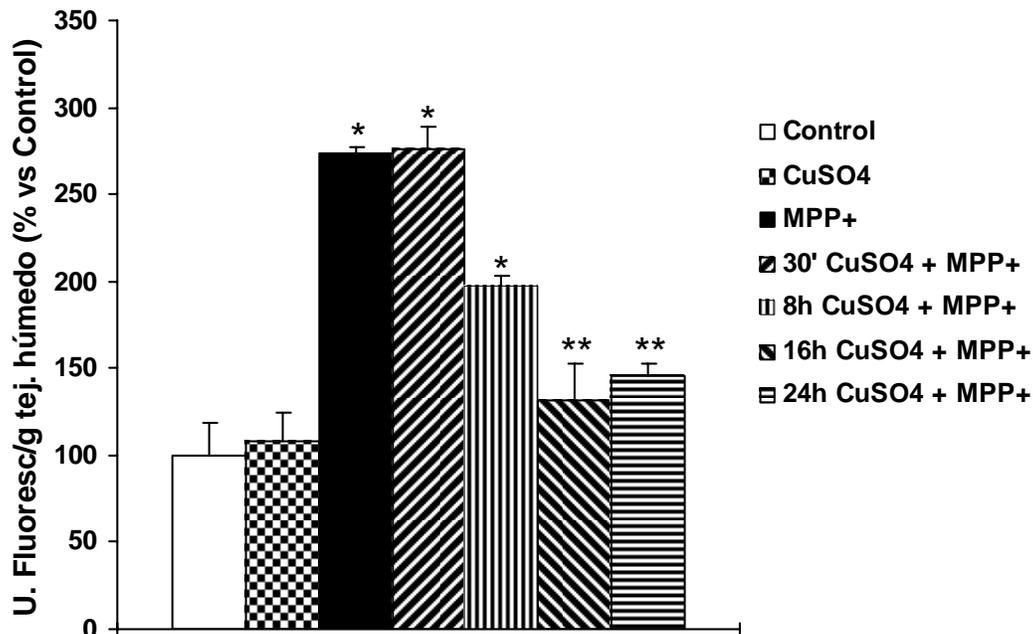
9. Resultados.

I. Evaluación del estado oxidante para los diferentes tratamientos.

(a) Peroxidación de Lípidos (LPO)

La evaluación del efecto neuroprotector del cobre se determinó basándose en las dos alteraciones bioquímicas más representativas de la EP (disminución en las concentraciones de dopamina y el desarrollo de estados de estrés oxidante estriatales) (Barbeau, 1986) que también suelen presentarse en el modelo de EP empleado en este estudio (Rojas y Ríos, 1993).

Los resultados del pretratamiento agudo con cobre a diferentes tiempos sobre la LPO se presentan en la gráfica 1:



Gráfica 1. Evaluación de los productos lipídicos fluorescentes derivados de la peroxidación de lípidos provocada por la administración i.c.v. de MPP+ (20µg/3µl) i.p. El CuSO₄, (2.5 mg/Kg) fue administrado 30', u 8, 16 ó 24 h antes de la aplicación del modelo neurodegenerativo por vía i.p. Los resultados están expresados como el promedio ± E.S. n=4-6 experimentos independientes por cada grupo.* Estadísticamente diferente del grupo control, ** Estadísticamente diferente del grupo con Na₂SO₄ MPP+; ANOVA seguida de una prueba de Tukey, p< 0.05.

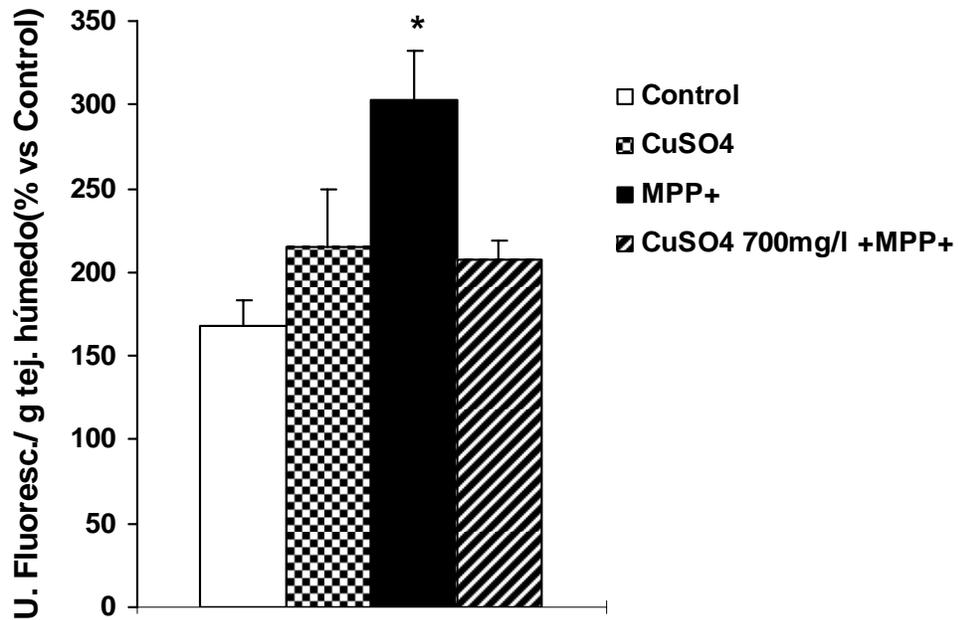
La administración del MPP+ indujo un incremento de un 173% en los niveles de LPO (428±13.18 U.F. / g tejido húmedo) vs el grupo control (156 ± 28 U.F. / g tejido

húmedo), lo que corrobora lo obtenido previamente por nuestro grupo de trabajo (Rojas et al., 1996). A los 30 min. de pretratamiento no se presentó un cambio significativo en los niveles de peroxidación de lípidos (LPO) del grupo dañado con MPP+ por efecto de la administración del CuSO_4 al compararlo con el grupo que no recibió el pretratamiento con dicho metal.

Por otro lado, pudo observarse una protección en contra del incremento en los niveles de LPO provocada por el MPP+ en los organismos tratados con CuSO_4 tanto a las 16 como a las 24h antes de la aplicación de la toxina. El efecto observado fue parcial en el caso del pretratamiento a las 8 horas, y casi total para los animales que lo recibieron tanto a las 16 como a las 24 horas antes de la inyección con MPP+ con una disminución en la tasa de LPO de un -28% (308 ± 15.4 U.F. / g tejido húmedo) -53% (228 ± 47.4 U.F. / g tejido húmedo) y -47% (202 ± 14.8 U.F. / g tejido húmedo) en los animales pretratados a las 8, 16 y 24h respectivamente.

La administración del sulfato de cobre demostró no tener efectos peroxidantes en los animales que recibieron el tratamiento del metal sin administración del MPP+. Los resultados derivados de este estudio demuestran que el efecto protector del CuSO_4 en contra de la LPO se presenta a las 16 y 24 horas del pretratamiento, sin bloquear la LPO al ser administrado 30 min. u 8h antes de producirse el daño.

Con la finalidad de evaluar la capacidad protectora de la administración crónica del sulfato de cobre en contra del estrés oxidante generado por el MPP+, se analizaron los niveles de LPO (Ver Gráfica 8). Los resultados de estos análisis se representan en la gráfica 2.



Gráfica 2. Evaluación de los productos lipídicos fluorescentes derivados de la peroxidación de lípidos provocada por la administración i.c.v. de MPP+ (20µg / 3µl) i.p. El CuSO₄ (700mg/l) fue administrado en el agua de bebida durante los 30 días previos a la aplicación del modelo neurodegenerativo. Los resultados están expresados como el promedio ± E.S. n=4-5 experimentos independientes por cada grupo.* Estadísticamente diferente de todos los demás grupos, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, p< 0.05.

Los niveles de peroxidación de lípidos se incrementaron en un 80% (303.31 ± 28.8 U.F. /g tej. húmedo) en el tejido estriatal de los animales expuestos al MPP+ al compararlos con los obtenidos para el grupo control (168.43 ± 15.32 U.F. /g tej. húmedo). Dicho incremento en los niveles de LPO estriatales inducido por el MPP+, disminuyó en un 67% en los animales que recibieron el pretratamiento con cobre, (203.91± 10.2 U.F. /g tej. húmedo) únicamente a la mayor dosis empleada (700mg/l). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de LPO debido al tratamiento con sulfato de cobre por 30 días (215.16 ± 20.7 U.F. /g tej. húmedo) en contra de los valores reportados para el grupo control.

Estos resultados sugieren una neuroprotección antioxidante tanto en el esquema crónico como en el agudo. Aunque en ambos casos, esta neuroprotección en contra de la LPO se confirmó, esto fue dependiente de tanto de la dosis empleada como del tiempo de pretratamiento, factores que podrían sugerir mecanismos que se inducen alternativamente, y que podrían señalar la participación de enzimas antioxidantes.

Como anteriormente citamos, el MPP+ es una toxina capaz de inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Derivado de esta inhibición, el radical superóxido protagoniza el daño oxidativo generado por el modelo. Esta es una de las razones, que condujeron la investigación hacia la evaluación de la actividad de la enzima encargada de la dismutación (metabolismo) de este radical, la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuyas formas citosólica y extracelular se encuentran asociadas a cobre y zinc.

(b) Actividad Superóxido Dismutasa

La actividad de las enzimas antioxidantes puede ser una pieza clave en la defensa en contra del estrés oxidante generado tanto en la EP como en el modelo de parkinsonismo del MPP+. No han sido reportados cambios en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en este modelo.

Debido a la dependencia que muestra esta proteína antioxidante a la biodisponibilidad de cobre, y habiendo observado que el MPP+ genera una disminución en el contenido de cobre estriatal, nos dimos a la tarea de evaluar los efectos que la administración de sulfato de cobre tiene sobre las dos formas de SOD (dependiente de cobre/zinc y dependiente de manganeso).

El análisis de la actividad de la SOD demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas en la enzima dependiente de cobre/zinc (Cu/ZnSOD) en ninguno de los grupos de tratamiento a 16h ni a 24h (Ver Tabla 13).

Por otro lado, cuando se analizaron los resultados derivados de la actividad de la enzima dependiente de manganeso, estos resultados demostraron que tanto la administración del MPP+, como la del sulfato de cobre provocan claras alteraciones en la actividad enzimática de la forma dependiente de manganeso (MnSOD)

ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA

	Pretratamiento 16h			Pretratamiento 24h		
	SOD Total (%)	Cu/ZnSOD (%)	MnSOD (%)	SOD Total (%)	Cu/ZnSOD (%)	MnSOD (%)
CuSO ₄ /Salina	23.94 ± 8.15	9.742 ± 7.92	455.26 ± 10.86*	27.47 ± 17.84	14.58 ± 8.18	25.56 ± 8.0
Na ₂ SO ₄ /MPP+	30.70 ± 7.45	10.07 ± 12.66	218.05 ± 34.65**	25.08 ± 19.77	20.75 ± 15.94	173.41 ± 12.18**
CuSO ₄ /MPP+	42.54 ± 6.82	13.06 ± 11.07	729.46 ± 16.61***	12 ± 5.91	7.22 ± 5.03	320 ± 9.47*

Tabla 11. Actividad estriatal de la enzima Superóxido Dismutasa Total (SOD TOTAL) y sus dos formas correspondientes (MnSOD y Cu/ZnSOD) de ratones de la cepa C57Black machos 25-30 g para los diferentes tratamientos a través de la técnica de Xantina/Xantina Oxidasa (pH=10.2, 25°C). La administración i.c.v. de MPP+ (20µg/3µl) fue realizada 2h antes del sacrificio. El pretratamiento agudo (de 2.5 mg/Kg por vía i.p.) con CuSO₄ ó Na₂SO₄ se realizó 16 ó 24 horas antes de la aplicación del modelo. Los resultados fueron comparados con los niveles control y son representados como porcentaje vs control, basándose en las Unidades Internacionales de SOD (U.I.) obtenidas. Los resultados están expresados como el porcentaje de cambio vs control ± % E.S. n= 6-8 experimentos independientes por grupo. Fueron consideradas diferencias significativas vs grupo control: *p<0.05, **p<0.01, *p<0.001 (ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Dunnet).**

El incremento del 218% y 173% a 16h y 24h respectivamente, específico de la MnSOD, en los animales que recibieron el MPP+ con respecto al grupo control, coincide con lo reportado previamente por Hung y Lee, quienes a su vez señalan una respuesta antioxidante diferencial entre los grupos dopaminérgicos mesolímbicos y nigroestriatales (Hung y Lee, 1998).

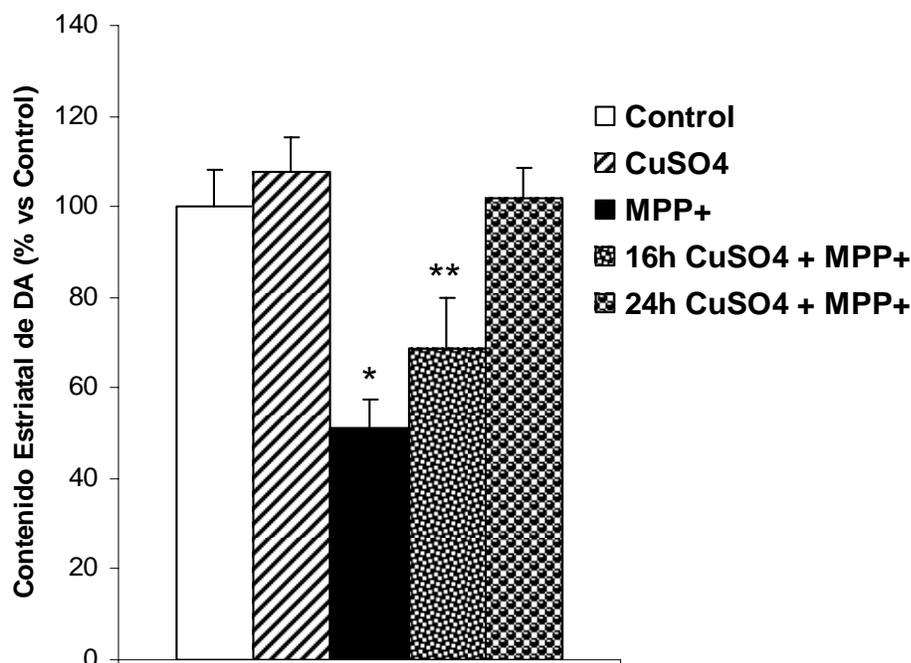
Es interesante la respuesta diferencial de las dos formas de SOD a la sola presencia del sulfato de cobre, observando a las 16h un incremento estadísticamente significativo (de 4.5 veces contra el control) en la actividad de la MnSOD. Sin embargo, esta respuesta no se observó a las 24h (incremento del 14.5%), lo que señala además una temporalidad de respuesta hacia esta forma dependiente de manganeso, considerada como una proteína de fase aguda (St. Clair et al., 2002).

La presencia de ambos tratamientos ejerció un efecto sinérgico en la actividad de la MnSOD de los animales a 16h (7.2 veces vs control), mientras que a las 24h (3.2 veces vs control), este efecto podría ser considerado como una potenciación de efectos, estadísticamente significativa. La presencia del sulfato de cobre, antes de la administración del MPP+ genera un incremento en la tasa de respuesta a la presencia del metal en la célula, de acuerdo a lo observado en el grupo que únicamente recibió el sulfato de cobre. Es en esta situación, que al administrar el MPP+ la respuesta se ve facilitada, a través de un “sinergismo” de efectos (a 16h) o bien a través de la potenciación de los mismos (a 24h), pudiendo considerarse esta respuesta en ambos casos como estadísticamente significativa.

II. Evaluación del sistema dopaminérgico estriatal.

(a) Contenido de Dopamina

Los estudios en relación con los efectos agudos del cobre como pretratamiento en la protección contra la pérdida neuronal estriatal, que acarrea como consecuencia una dramática disminución en las concentraciones de dopamina en dicha región, fueron llevadas a cabo en los períodos en los que la protección contra el incremento en la LPO fue comprobada (es decir a 16 y 24h).



Gráfica 3. Evaluación del contenido estriatal de dopamina en ratones de la cepa C57 Black (25-30g de peso), con la administración de MPP+ (20µg/3µl) o Solución Salina i.c.v. El CuSO₄ (2.5 mg/Kg) fue administrado 16 ó 24h antes de la aplicación del modelo neurodegenerativo por vía i.p. Los resultados están expresados como el promedio ± E.S. n=4-6 experimentos independientes por cada grupo. * Estadísticamente diferente de todos los demás grupos, excepto 16h CuSO₄ + MPP+, ** Estadísticamente diferente del grupo CuSO₄, ANOVA seguida de una prueba de Tukey, p< 0.05.

La administración del MPP+ generó una disminución del 66% ($3.40 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo) en las concentraciones estriatales de dopamina en los animales sometidos al modelo (sin administración del pretratamiento) vs el grupo control ($10.2 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo) (Ver Gráfica 3).

Por otro lado, se observó una completa recuperación en los niveles de dopamina estriatal de los animales a los que fue administrado el MPP+ y que recibieron también sulfato de cobre como pretratamiento a las 24h ($11 \pm 1.3 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo), previo a la administración del MPP+, mientras que aquellos que recibieron el tratamiento 16h del modelo no mostraron protección estadísticamente significativa en contra de esta disminución ($5.1 \pm 0.47 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo). Los animales que recibieron el sulfato de cobre y no fueron expuestos al MPP+, no presentaron cambios estadísticamente significativos ($13.4 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo) con respecto al grupo control.

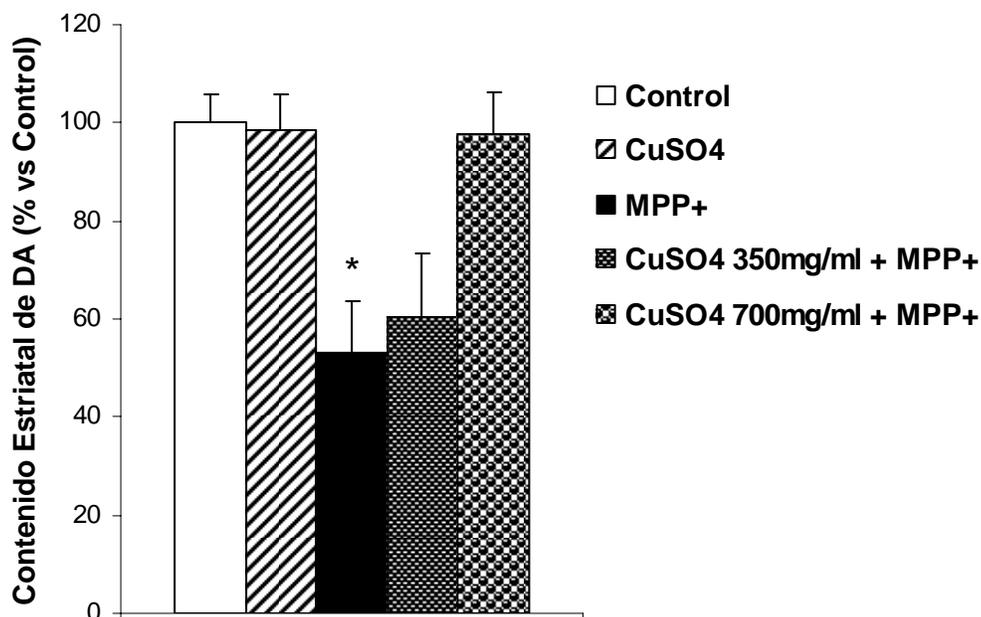
Estos resultados aumentan nuestros conocimientos y amplían nuestro horizonte de investigación pues nos revelan que el menor índice de daño neuronal producido por la generación de radicales libres, logrado por efecto de la administración aguda del sulfato de cobre (como lo apoyan los niveles de LPO a 24 y 16h (Gráfica 1)), podría estar asociada a una menor pérdida de neuronas dopaminérgicas estriatales (representada por el control de los niveles de dopamina en dicha región cerebral) por efecto del MPP+.

Sin embargo, la disminución de DA a 16h no fue bloqueada por el pretratamiento con sulfato de cobre. Este resultado no corresponde con el bloqueo que el cobre induce sobre la LPO. Esta dicotomía de efectos podría reflejar la presencia de otros factores involucrados en la toxicidad del MPP+ (que podrían presentarse antes de que el daño peroxidativo se lleve a cabo), que no fueron controlados por completo por la administración del cobre, al ser administrado 16h antes de provocado el daño o bien que las dosis efectivas alcanzadas en estriado sean diferentes.

Continuando con la evaluación del efecto neuroprotector del sulfato de cobre, fueron evaluadas las concentraciones del neurotransmisor dopamina en los animales expuestos a dos diferentes dosis crónicas de sulfato de cobre en el agua de bebida (350mg/l o 700mg/l), previamente reportadas en la literatura (Crowe y Morgan, 1996), con la idea de simular la ingesta diaria del metal como ocurre de manera habitual en los mamíferos.

La administración del MPP+ provocó una disminución en las concentraciones de dopamina estriatal del 60% ($5.15 \pm 0.68 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo) al compararlos con el grupo control ($13.19 \pm 1.23 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo).

El pretratamiento con sulfato de cobre en la dosis menor del esquema crónico (350mg/l) no fue capaz de proteger a los animales contra la disminución en las concentraciones de dopamina en el cuerpo estriado. A diferencia de estos resultados, los animales que recibieron la dosis de 700mg/l de sulfato de cobre presentaron una protección de un 97% ($12.56 \pm 1.31 \mu\text{g/g}$ tejido húmedo), al comparar los niveles de dopamina con el grupo expuesto al MPP+, que no recibió el sulfato de cobre como pretratamiento.



Gráfica 4. Evaluación del contenido estriatal de dopamina en ratones C57 Black (25-30 g) con administración crónica de CuSO₄ (700mg/l) en agua de bebida. El CuSO₄ fue administrado durante los 30 días previos a la inyección i.c.v. de MPP+ y la evaluación de los niveles de dopamina a las 24 h posteriores al daño. Los resultados están expresados como el promedio \pm E.S. n=6-8 experimentos independientes por cada grupo. * Estadísticamente diferente de todos los demás grupos, excepto por el grupo con 350mg/l CuSO₄ + MPP+. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Tukey, $p < 0.05$.

Estos resultados apoyan a los obtenidos previamente para los niveles de la peroxidación de lípidos y demuestran que este efecto de recuperación de la dopamina debida a la administración de cobre, no es sólo dependiente del tiempo del pretratamiento sino también del esquema de administración (agudo o crónico), y aún sobre el mismo esquema, de la dosis en la que éste es administrado. Es importante recalcar que a pesar de las diferencias en los esquemas de administración, fue posible observar en ambos un efecto de recuperación de los niveles de dopamina a 700mg/l.

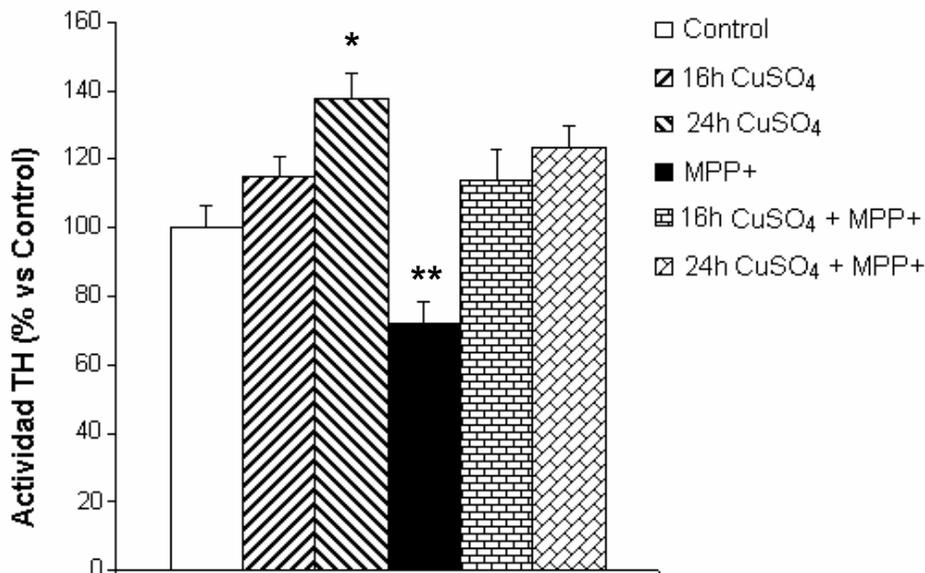
(b) Actividad Tirosina Hidroxilasa (TH)

Con el fin de evaluar la funcionalidad del sistema dopaminérgico, la actividad de la enzima paso limitante en la síntesis de dopamina (tirosina hidroxilasa (TH)) se analizó siguiendo el mismo protocolo en animales a los que simultáneamente les fue evaluada

la conducta locomotriz, fiel reflejo de las alteraciones de dicho sistema dopaminérgico (Kobayashi y Sano, 2000).

La actividad de la TH se midió en los animales sujetos al pretratamiento con sulfato de cobre con la idea de establecer si el pretratamiento con el metal influye en la actividad de la enzima, lo que a su vez podría ser el mecanismo por medio del cual el pretratamiento con el metal, genera una neuroprotección en contra de la disminución en los niveles de dopamina estriatal generada por la administración del MPP+.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la actividad de la TH arrojaron los siguientes resultados:



Gráfica 5. Evaluación de la actividad estriatal de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en ratones macho de la cepa C57 Black (25-30g de peso), con la administración de MPP+ (20µg/3µl) o Solución Salina i.c.v. El CuSO₄ (2.5 mg/Kg) fue administrado 16 ó 24h antes de la aplicación del modelo neurodegenerativo por vía i.p. Los resultados están expresados como el promedio ± E.S. n= 8-10 experimentos independientes por cada grupo.* Estadísticamente diferente del grupo control, **Estadísticamente diferente de todos los demás grupos. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Tukey, p< 0.05.

Ya que el modelo de parkinsonismo empleado favorece la formación de la quinotirosina (Kuhn et al., 1999) e induce la nitración de los residuos de tirosina de la TH, al interactuar directamente con ellos o a través de la generación de EROS (Ara et al., 1998), la disminución en la actividad de la TH es un evento que podría haberse previsto como respuesta a la administración del MPP+.

Es importante recordar que nuestros resultados evidencian por primera vez este trastorno en la actividad de la TH en el modelo de parkinsonismo del MPP+. Hasta el momento, la disminución en la actividad de TH había sido inferida a través de estudios que demuestran una reducción en el número de células reactivas a la TH. Sin embargo, la presencia o ausencia de la enzima no proveía de información alguna con respecto a su adecuada actividad en el modelo.

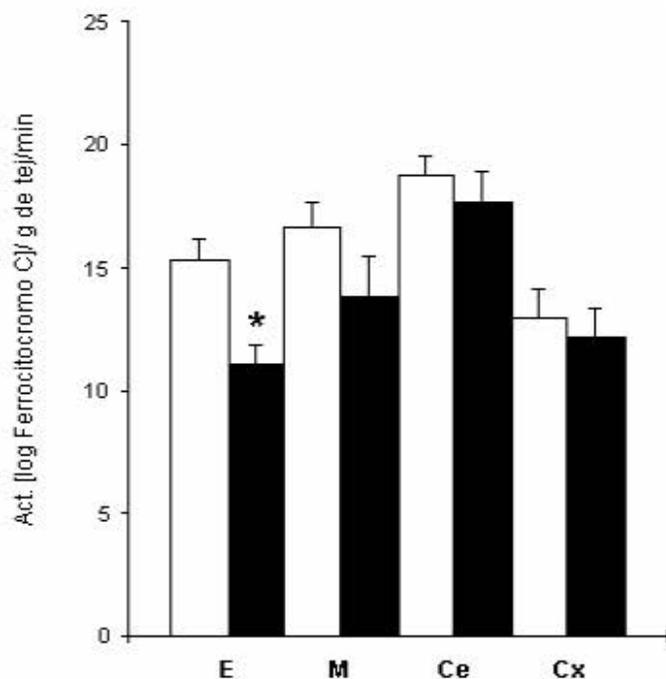
La actividad de la TH se redujo un 28% (2.24 ± 0.14 $\mu\text{g/g}$ de L-DOPA) en los animales expuestos al MPP+ con respecto a lo observado para el grupo control ($3.12 \pm 0.19\mu\text{g/g}$ de L-DOPA). Sin embargo, la actividad de TH se incrementó en un 14% ($3.58 \pm 0.19\mu\text{g/g}$ de L-DOPA) y 38% ($4.3 \pm 0.31\mu\text{g/g}$ de L-DOPA) a 16h y 24h ($p < 0.05$), respectivamente, en el grupo de animales que únicamente recibieron el sulfato de cobre.

Por su parte, el pretratamiento con sulfato de cobre bloqueó totalmente la disminución en la actividad de la TH inducida por el MPP+ a 16h ($3.56 \pm 0.30\mu\text{g/g}$ de L-DOPA) y 24h ($3.84 \pm 0.23\mu\text{g/g}$ de L-DOPA), no siendo los niveles de ninguno de los dos estadísticamente diferentes con respecto al grupo control.

III. Evaluación de la actividad respiratoria mitocondrial

(a) Actividad Citocromo c Oxidasa (COX)

Los resultados obtenidos hasta el momento, podrían sugerir el papel determinante de proteínas relacionadas con el efecto neuroprotector del cobre, por lo cual se llevó a cabo la evaluación de la actividad enzimática de la Citocromo c Oxidasa (gráfica 6), enzima terminal de la respiración que es dependiente de cobre.



Gráfica 6. Evaluación de la actividad de la enzima citocromo c oxidasa cerebral de ratones C57 Black expuestos a la administración i.c.v. de MPP+. La actividad de la enzima citocromo c oxidasa esta reportada como logaritmo del ferrocitocromo c formado por gramo de tejido por minuto (Log ferrocitocromo c / g de tej. / min). E= Cuerpo estriado, M= Mesencéfalo, Ce= Cerebelo, Cx= Corteza. Los resultados están expresados como el promedio \pm E.S. n=5-8 experimentos independientes por cada grupo. *Estadísticamente diferente de su control, ANOVA de una vía, seguida de una prueba t de Student, $p < 0.05$.

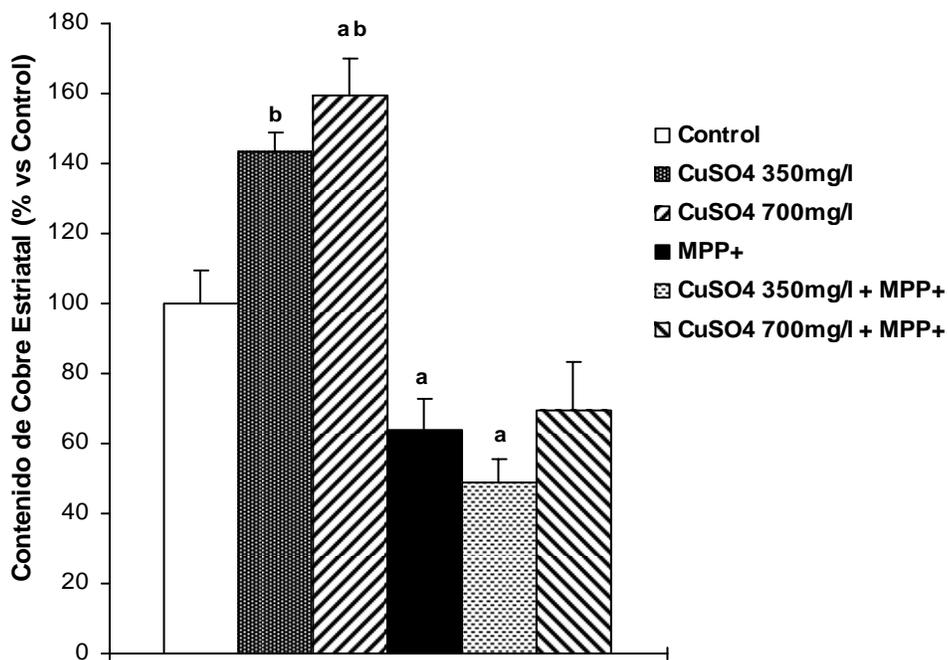
En esta gráfica se aprecia una disminución del 27.5 % en la actividad de la enzima Citocromo c Oxidasa en el tejido estriatal de los animales con la administración de MPP+, lo que podría sugerir que la deficiencia de cobre específica del estriado inducida por el MPP+, podría alterar tanto el manejo de las especies reactivas del oxígeno por la COX, así como disminuir directamente la actividad de dicha enzima, cuya actividad es dependiente de cobre.

Otra alternativa es que este comportamiento sea un reflejo de la alteración de la respiración mitocondrial neuronal provocada directamente por el metabolito tóxico MPP+, lo cual tendría que ser apoyado por estudios en períodos previos a las 24h, asegurando la integridad mitocondrial, con el fin de distinguir los efectos tóxicos que el MPP+ haya generado a la célula, de la pérdida mitocondrial. Sin embargo, estos estudios no forman parte de los objetivos contemplados para esta tesis, por lo que estos serán llevados a cabo posteriormente por nuestro grupo de investigación.

IV. Análisis del contenido cerebral de cobre y de su posible toxicidad.

(a) Contenido estriatal de cobre

Las concentraciones de cobre cerebral fueron evaluadas con la idea de constatar la llegada del metal al estriado y mesencéfalo, blancos selectivos del daño inducido tanto por MPP+ como por la neurodegeneración asociada al Parkinson. Los resultados demostraron lo siguiente:



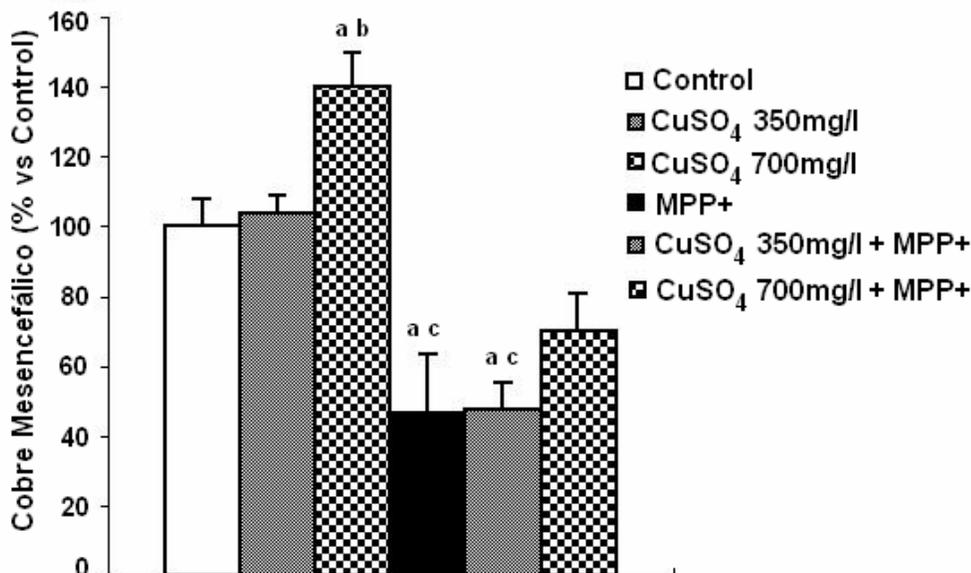
Gráfica 7. Evaluación del contenido estriatal de cobre total en ratones C57 Black con administración crónica de CuSO₄ (350 ó 700mg/l) en agua de bebida. El CuSO₄ fue administrado durante los 30 días previos a la inyección i.c.v. de MPP+. La evaluación de los niveles de cobre total fue realizada 24h después del daño. Los resultados están expresados como el promedio \pm E.S. n=6-8 experimentos independientes por cada grupo. Estadísticamente diferente de: a= grupo control; b= de todos los grupos con MPP+. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Tukey, $p < 0.05$.

Los animales pretratados de manera crónica con sulfato de cobre, y que no recibieron el MPP+, tienen un incremento dosis-dependiente en las concentraciones estriatales del metal de un 43% ($13.96 \pm 0.64 \mu\text{g}$ cobre/g tej.húmedo) y 60% ($15.63 \pm 1.61 \mu\text{g}$ cobre/g tej.húmedo) respectivamente, en comparación con el grupo control

(9.77 ± 0.64 μg cobre/g tej.húmedo). Mientras tanto, los organismos expuestos al MPP+ presentan, como había sido ya previamente demostrado en estudios previos, un decremento en los niveles de cobre del 53.5% (5.22 ± 0.68 μg cobre/g tej.húmedo) estadísticamente diferente con respecto al grupo control. Este decremento en los niveles de cobre estriatal no fue revertido o bloqueado por el pretratamiento crónico con el metal a ninguna de las dos dosis de sulfato de cobre empleadas (en la dosis de 350mg/l de 4.45 ± 0.62 μg cobre/g tej.húmedo y de 6.35 μg cobre/g tej.húmedo para la dosis de 700mg/l).

(b) Contenido mesencefálico de cobre

Por su parte, en el contenido mesencefálico (Ver Gráfica 6) de cobre de los animales sin MPP+ que recibieron el pretratamiento con sulfato de cobre, pudo observarse un comportamiento similar al observado en el estriado, ya que se obtuvo un incremento en los niveles de cobre de un 4% (4.05 ± 0.19 μg cobre/g tej.húmedo) y de un 40% (1.09 ± 0.19 μg cobre/g tej.húmedo) para los grupos que recibieron la dosis de 350 y 700mg/l, respectivamente al compararlos con los niveles de cobre del grupo control (3.89 ± 0.31 μg cobre/g tej.húmedo). El grupo que recibió la menor dosis de sulfato de cobre (350mg/l) durante los 30 días anteriores a la aplicación del modelo no presentó diferencias estadísticamente significativas en contra del grupo con MPP+ que no recibió el pretratamiento. A diferencia de estos resultados el grupo que recibió la mayor dosis crónica (700mg/l) del metal y la posterior administración de MPP+, mostró una disminución de tan sólo el 30% (2.72 ± 0.30 μg cobre/g tej.húmedo) sin mostrar diferencias estadísticamente significativas contra los valores observados en el grupo control.



Gráfica 8. Evaluación del contenido mesencefálico de cobre total en ratones C57 Black con administración crónica de CuSO₄ (350 ó 700mg/l) en agua de bebida. El CuSO₄ fue administrado durante los 30 días previos a la inyección i.c.v. de MPP+. La evaluación de los niveles de cobre total fue realizada 24h después del daño. Los resultados están expresados como el promedio ± E.S. n= 6-8 experimentos independientes por cada grupo. Estadísticamente diferente de: a= grupo control; b= de todos los grupos con MPP+, c= del grupo con 350mg/ml CuSO₄. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Tuckey, p<0.05.

Los resultados derivados de la evaluación del contenido de cobre estriatal y mesencefálico, indican una mayor tendencia del estriado a acumular el cobre, lo que puntualiza la importancia del control de los niveles de cobre en dicha región cerebral.

De la misma manera, los resultados obtenidos para los animales expuestos al MPP+ corresponden a lo reportado previamente (Ríos et al., 1995), ya que la disminución en las concentraciones estriatales del metal fue de mas del 50%. Si bien los grupos que recibieron el pretratamiento no demostraron evitar la disminución en el contenido de cobre estriatal, es también cierto que desconocemos la proporción de cobre libre ó unido a cuproproteínas en esta evaluación. De esta manera, aunque los niveles estriatales de cobre se encuentren por debajo del grupo control en los animales que recibieron el pretratamiento, este cobre podría estar asociado a cuproproteínas antioxidantes que colaboran en la defensa celular.

(c) Evaluación de la toxicidad del cobre:

Actividad Alanina Transaminasa (ALT/GPT)

Con el fin de descartar el posible efecto hepatotóxico del cobre, se midió la actividad de la enzima alanina transaminasa (ALT) también conocida como glutámico-pirúvica (GPT). La ALT, esta reportada en una amplia variedad de tejidos, aunque su principal fuente es de origen hepático. Altos niveles séricos de dicha enzima se encuentran en hepatitis, cirrosis e ictericia obstructiva (Wroblewski y La Due 1956; Rosenberg et al., 2000).

De los resultados obtenidos para la administración tanto aguda como crónica del sulfato de cobre, a las 24 horas o 30 días respectivamente, se obtuvo la siguiente tabla:

GRUPO	ALT (UI / L)
CONTROL	6.94 ± 0 .36
Na₂SO₄ Agudo	7.29 ± 0 .14
Na₂SO₄ Crónico	9.23 ± 0 .81
CuSO₄ Agudo	9.40 ± 1 .05
CuSO₄ Crónico	11.13 ± 1 .58

Tabla 12. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad de la enzima alanina transaminasa (ALT) plasmática de ratones de la cepa C57Black machos 25-30 g que recibieron un tratamiento agudo (de 2.5 mg/Kg por vía i.p.) ó crónico (durante 30 días en el agua de bebida a una dosis de 700mg/l) de CuSO₄ ó Na₂SO₄. La evaluación de su actividad se realizó después 24 horas después de administrado el tratamiento para el caso de los animales que recibieron el tratamiento agudo y de 30 días después del tratamiento para el caso del esquema crónico, comparados con los niveles control. El rango de los valores de ALT (U.I.) considerado como normal en humanos, se encuentra entre 0-20 U.I. El único reporte en ratas arroja valores de 47 U.I.(Sokol et al., 1993).

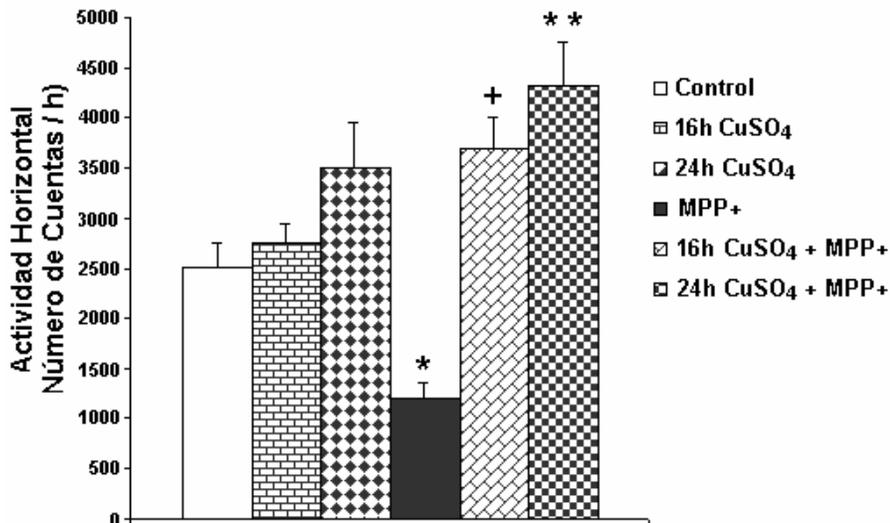
En los que podemos observar un incremento del 35% en los animales tratados con sulfato de cobre con respecto a los animales control, estadísticamente significativo. No existen reportes relacionados con los niveles de ALT sérica en ratones de esta cepa. Sin embargo, en estudios previos con ratas a las que fue administrada un suplemento de cobre (mucho mayor que el administrado en nuestro estudio; de 1g extra durante los días de la primera semana, seguido de 2g para la segunda) han sido evaluados los niveles de la enzima y se han observado incrementos de casi un 100%. Además, es

importante mencionar que los valores control obtenidos en dicho trabajo superan ampliamente los obtenidos en este estudio (47 UI/L), lo que puede deberse a las diferencias de especie y cepa utilizados (Sokol et al., 1993).

I. **Valoración de la representación conductual de los animales sujetos a los diferentes tratamientos.**

Acoplada a la disminución en la actividad de la TH y a la disminución en las concentraciones de dopamina tanto en la EP como en el modelo de parkinsonismo

empleado en este estudio, se han reportado alteraciones motoras tanto en humanos (Haavic y Tosca, 1998) como en animales (Kim et al., 2000). En el caso de los ratones expuestos al MPP+ se ha descrito una disminución en la actividad locomotriz (acinesia) como respuesta a la administración del MPTP. No ha sido descrito hasta el momento el mecanismo por medio del cual el MPP+ provoca la acinesia en los animales, pero se ha sugerido un efecto similar en la generación de la rigidez.



Gráfica 9. Análisis de la Actividad Locomotriz espontánea de ratones de la cepa C57 Black machos (25-30g peso) para los diferentes pretratamientos con cobre 16hó 24h antes de la administración del MPP+. La actividad fue evaluada durante 30 minutos previo período de habituación (60 minutos). La conducta locomotriz fue evaluada 6 días después de la administración del modelo y 24 horas antes de su sacrificio para la evaluación de las concentraciones de L-DOPA estriatales. La actividad se encuentra expresada como el número de cuentas durante 30 minutos de acuerdo a lo reportado previamente (Fredriksson y Archer, 1995). Los resultados están expresados como el promedio± E.S. n = 8-10 experimentos independientes por cada grupo. Fueron consideradas diferencias significativas vs grupo control: *p<0.01; +p<0.05; Interacción. ANOVA de dos vías, seguida de una prueba de Dunnet.**

La disminución en la actividad locomotriz en los animales expuestos al MPP+ fue de un 52% (1192.11±161.68 Cuentas de Actividad/h) en comparación con el grupo control (2509± 233.86 Cuentas de Actividad/h).

La administración del sulfato de cobre por sí sola, produjo incrementos en la actividad locomotriz de los animales de un 9% a 16h (2755±196.83 Cuentas de Actividad/h) y de un 39% a 24h (3491.5±447.39 Cuentas de Actividad/h) de pretratamiento, observándose únicamente en éste último, efectos estadísticamente significativos en contra del grupo control.

En los grupos que recibieron el pretratamiento con sulfato de cobre se observó una protección en contra de la acinesia inducida por el MPP+, tanto a 16h (47%) como a 24h (71%) ($3688.33 \pm$ y $4309.75 \pm$ Cuentas de Actividad/h, respectivamente). El efecto de la interacción fue estadísticamente significativo únicamente en el grupo que recibió el pretratamiento con cobre 24h antes del modelo.

La coincidente protección del sulfato de cobre en contra de la disminución en la actividad de TH y de la actividad locomotriz espontánea de los animales expuestos al MPP+, sugiere una vez más que la administración de un suplemento de cobre podría jugar un papel importante en contra de la neurodegeneración presente en la EP.

10. Discusión.

El cobre es considerado un elemento muy importante en la dieta, ya que es esencial para el desarrollo en humanos y animales (Olivares y Uauy, 1996). La deficiencia de cobre se ha relacionado con la neurodegeneración como es el caso de la enfermedad de Menkes (Iwata et al., 1979). Además, alteraciones en los ganglios basales se han observado en aquellos pacientes con aceruloplasminemia, careciendo de este modo de la principal proteína acarreadora de cobre en el plasma sanguíneo, la ceruloplasmina (Prohanska y Bailey, 1994).

Recientemente, numerosas evidencias se han acumulado, demostrando que el cobre participa de manera activa en el control de la sobreproducción de los radicales libres. Este metal actúa como grupo prostético de importantes enzimas tales como la superóxido dismutasa, demostrando ser capaz de proteger a los animales contra el daño celular inducido por la radiación ionizante (Sorenson et al., 1995).

COBRE AGUDO

Nuestros resultados demuestran que la administración aguda de cobre tanto a 16h como 24h antes de la administración del MPP+, fue capaz de bloquear la lipoperoxidación inducida por este modelo. Este pretratamiento, también demostró tener un efecto preventivo contra el decremento en los niveles de dopamina estriatal causado por el MPP+, solo cuando el pretratamiento con el sulfato de cobre fue administrado 24h antes del MPP+. Estos resultados sugieren que el cobre necesita ser incorporado a un proceso bioquímico que ejecute la protección, lo que podría provocar un retardo en el efecto neuroprotector, quizás asociado a la síntesis y regulación de algunas cuproproteínas (Prohanska y Bailey, 1994). La incapacidad del cobre para proteger a las células del decremento en los niveles de dopamina a las 16h, en comparación con los resultados derivados de los índices de lipoperoxidación, sugieren que el pretratamiento a 16h permite la protección contra el estrés oxidativo generado en el sistema por este modelo experimental, pero que esta protección, resulta insuficiente para evitar la pérdida de células dopaminérgicas estriatales. Este efecto protector del cobre, presente únicamente a las 24h de pretratamiento, podría estar relacionado con procesos asociados a la toxicidad del modelo y que no involucran directamente al estrés

oxidativo, que son bloqueados si el sulfato de cobre es administrado con 16h de anticipación a la administración del modelo de parkinsonismo. Tal es el caso de los eventos excitotóxicos asociados al modelo.

Una vez que el MPP+ ejecuta las alteraciones celulares anteriormente enumeradas, el proceso excitotóxico es generado a través de una liberación masiva de glutamato al medio debido al incremento en los niveles de calcio intracelulares (Jenner y Olanow, 1997). En el modelo de neuroprotección propuesto en la presente tesis, se sabe poco de la interacción del cobre con el sistema glutamatérgico pero éste se ha asociado con la activación de enzimas antioxidantes (Ikonomidou et al., 1996).

Es importante recordar que al entrar el cobre al organismo, éste es unido rápidamente a proteínas entre las que se cuentan proteínas plasmáticas como la ceruloplasmina, que lo transportan hasta el cerebro (Linder y Hazegh-Azam, 1996). El mecanismo de protección contra el efecto tóxico del MPP+ podría estar presentándose por efecto de la activación de sistemas enzimáticos antioxidantes dependientes del metal (tales como la SOD) promoviendo su síntesis, o bien activando a proteínas preexistentes que por efecto de la administración del MPP+ carecen del ión al verse disminuidas sus concentraciones estriatales (Ríos et al., 1995), lo que podría mantenerlas de forma inactiva hasta el momento de su unión con el cobre.

La activación de los sistemas de defensa antioxidante dependientes del metal, podría explicar su efecto neuroprotector observado a las 16 y 24 horas de pretratamiento. Por su parte, la ausencia de este efecto a los 30 min y 8h (tiempo suficiente para asegurar su llegada al tejido cerebral), podría indicar el período necesario para activar los mecanismos responsables de la neuroprotección asociados a la administración del sulfato de cobre.

De este modo, sin llegar aún a ninguna conclusión definitiva, podemos pensar en un posible efecto neuroprotector del cobre contra los efectos lipoperoxidantes provocados por el MPP+, lo que ha sido apoyado por reportes previos de nuestro grupo de trabajo (Rojas y Ríos, 1997).

Por otro lado, algunos autores asocian la excitotoxicidad inducida por el glutamato con la falla en sistemas antioxidantes como es el caso de la Esclerosis Lateral Amiotrófica Familiar (ELAF), cuya principal alteración génica se asocia al gen de

la Cu/ZnSOD. Como anteriormente se mencionó, animales transgénicos que sobre expresan el gen que codifica para esta enzima encuentran protección en contra del modelo de MPTP (Przedborski et al., 1992), provocando la pérdida progresiva de neuronas motoras a través del establecimiento de un desbalance energético promovido por la una excesiva producción de radicales superóxido y la falta de un mecanismo especializado en el control de sus niveles. Esto en concomitancia con un elevado contenido de calcio intracelular, lo que a su vez induce una masiva liberación de glutamato (Bowling et al., 1993; Alexianu et al., 1998); eventos que no se encuentran aislados bioquímicamente y que suelen presentarse también en la EP (Cassarino et al., 1997). La asociación de la ELAF con la excitotoxicidad inducida por el glutamato y la neuroprotección que la sobre expresión de la Cu/ZnSOD lleva a cabo en modelos experimentales de la enfermedad *in vivo* (Chan et al., 1990) e *in vitro* (Schwartz y Coyle, 1998), enfatiza la importancia de la adecuada actividad de los sistemas antioxidantes y su íntima relación con los eventos neurodegenerativos (Rojas y Ríos, 1993; Tipton y Singer, 1993).

Las evidencias anteriormente citadas nos hacen pensar en la existencia de un mecanismo de neuroprotección alterno a la estrategia de los sistemas antioxidantes que, en colaboración con ellos o en forma independiente, impida la muerte neuronal generada por el MPP+. Con el fin de establecer la neuroprotección del sulfato de cobre en los animales expuestos al modelo de MPP+, se evaluó la capacidad de este metal al ser administrado crónicamente.

COBRE CRONICO

El esquema que mejor representa la ingesta diaria de cobre por los mamíferos es el crónico, empleado en esta tesis con base en estudios previos dedicados a la valoración de los requerimientos diarios necesarios, administrados como un suplemento de cobre en la dieta diaria de roedores (Crowe y Morgan, 1996).

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos demostraron que la administración crónica del sulfato de cobre también fue capaz de proteger a las neuronas de la disminución de los niveles de dopamina provocada en el cuerpo

estriado de los animales expuestos al MPP+. Este efecto solo pudo apreciarse en los animales expuestos a la dosis más alta (700mg/l), lo que coincide a su vez con la neuroprotección que el metal ejerce en contra del estrés oxidativo inducido por el modelo de MPP+

La neuroprotección del sulfato de cobre en contra de los parámetros de toxicidad analizados tanto en el tratamiento crónico como en el agudo apoyan la idea de un mecanismo alternativo que podría evitar la cascada oxidante y la pérdida neuronal derivadas de la administración del modelo de Parkinson empleado. A este respecto, es importante señalar que en el caso de las enfermedades neurodegenerativas resultaría poco real pensar en un solo mecanismo de neuroprotección, ya que la EP (como los modelos desarrollados para representarla) es considerada como de etiología multifactorial.

Sin embargo, en la EP como en otras enfermedades neurodegenerativas, el déficit de un metal traza como el cobre o en su caso el hierro, quienes actúan como cofactores de varios mecanismos biológicos, podría favorecer el desarrollo de trastornos bioquímicos que derivaran en una cascada neurotóxica y degenerativa (Hartman y Evenson, 1992). En el caso del hierro, su acumulación elevada en los ganglios basales en la EP en forma libre, podría provocar alteraciones en funciones neuronales esenciales como la formación de la mielina (Larkin y Rao, 1990) y la síntesis de algunos neurotransmisores (GABA, dopamina y norepinefrina) (Glinka et al., 1997).

Por su parte, la disminución en el contenido estriatal de cobre, inducida por el MPP+, genera no solo un deterioro funcional en las enzimas dependientes de su biodisponibilidad, sino también incide en la excesiva acumulación del hierro en los ganglios basales como consecuencia de la falta de cuproproteínas que lo transporten (como la ceruloplasmina) (Harris et al., 1995). Estos cambios, traen consigo consecuencias importantes. Por ejemplo, la actividad de la citocromo c oxidasa (enzima terminal de la respiración) depende por completo de la presencia de cobre, por lo que la privación del metal ocasiona por sí misma un daño energético importante, ya que se sabe que el 95% de todo el oxígeno que es

consumido por las células en los mamíferos es reducido por los 4 electrones de la citocromo c oxidasa, para formar 2 moléculas de agua (Grisham, 1992).

A su vez, la dependencia que la dopamina β -hidroxilasa, enzima íntimamente involucrada en la síntesis de dopamina, y de dos de las tres formas de superóxido dismutasa (citosólica (SOD1) y extracelular (SOD3)) presentan a la biodisponibilidad del cobre, podría asociar a varias proteínas (relacionadas directa o indirectamente con el cobre) con muy diversos sistemas biológicos colocando de esta manera a dicho metal, como una pieza esencial en la neuroprotección obtenida.

A partir de nuestros resultados, podemos sugerir que la correcta biodisponibilidad de cobre en los animales expuestos al MPP+, es capaz de protegerlos en contra de fallas funcionales en el balance energético y de alteraciones en el sistema dopaminérgico, quizás a través de la activación de las diferentes líneas de defensa antioxidante celular. Esto es de particular importancia, ya que alteraciones en el contenido cerebral de cobre, tales como un reducido contenido de cobre en la *substantia nigra pars compacta* y la disminución en la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina, han sido reportados en pacientes con enfermedad de Parkinson (Dexter et al., 1991; Boll et al., 1999).

Es por este motivo, que el avance de la presente tesis nos condujo a la búsqueda de los mecanismos asociados a la neuroprotección del sulfato de cobre en contra del modelo de MPP+, entre los cuales propusimos como candidatos tanto a la enzima superóxido dismutasa, como a la enzima paso limitante para la formación de dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH).

ALT

Es importante recalcar que previo a la evaluación de los mecanismos involucrados en la neuroprotección que el sulfato de cobre ejercía en los animales pretratados con el metal, se analizaron los niveles de alanina-transaminasa (ALT/GPT). Esta es una enzima de escape que permite evaluar la posible toxicidad que la administración del suplemento de cobre podría inducir en los animales expuestos tanto de forma aguda como crónica. Por medio de estos estudios, pudo

constatarse que no fueron rebasados los niveles considerados como permisibles en ninguno de los dos esquemas de administración empleados (crónico o agudo).

ACTIVIDAD SOD

Una vez que sulfato de cobre demostró no ser hepatotóxico, los mecanismos anteriormente descritos (actividad de la SOD y concentraciones estriatales de DA) se evaluaron.

Las dos formas de la enzima superóxido dismutasa analizadas (Cu/ZnSOD y MnSOD) mostraron una respuesta diferencial entre sí. Mientras para la Cu/ZnSOD la administración del sulfato de cobre pareció no promover su actividad, la MnSOD incrementó su actividad significativamente. Las diferencias entre ambas formas de superóxido dismutasa podrían ser la clave para explicar estos resultados. La naturaleza de la MnSOD permite que situaciones de estrés celular promuevan su activación (St.Clair et al., 2002), mientras que en el caso de la Cu/ZnSOD, las consecuencias de este incremento en la tasa de estrés oxidante podrían repercutir en su actividad inhibiéndola, ya que se sabe que su actividad es sensible al incremento en la producción de peróxido de hidrógeno (Bray et al., 1974).

Por otro lado, se ha demostrado en estudios previos que en condiciones de hipoxia-normoxia en cultivos celulares de la línea celular de glioma C6, la única enzima sensible a la activación es la MnSOD y que la actividad de la enzima Cu/ZnSOD se mantiene inalterada. Asimismo, en este estudio se reporta una disminución del RNAm específico de la MnSOD. Estas respuestas han sido sugeridas como uno de los posibles factores compensatorios en respuesta a la sobreproducción de radicales libres generada por condiciones de anoxia/reperfusión (Fridovich, 1986), condición que está asociada tanto con el modelo de MPP+ como con la misma EP.

Hasta el momento no existen evidencias de que la administración del cobre incremente la actividad de la Cu/ZnSOD. Sin embargo, la falta de reacción de la enzima dependiente de cobre en contraste con la activación de la MnSOD llamó nuestra atención. Aunque de acuerdo a los resultados obtenidos, la actividad de la Cu/ZnSOD parece no cambiar como respuesta a la administración del cobre, estudios a tiempos más cortos no se llevaron a cabo. Sí como ocurre en la hipoxia/reperfusión, existe una

reacción en “*tandem*”, es decir en “*relevos*” entre ambas superóxido dismutasas, podríamos confundir una activación selectiva de la MnSOD con una “fotografía” del evento tomada una vez que la activación de la Cu/ZnSOD ha concluido (quizás por su previa inhibición). La activación de la Cu/ZnSOD podría haberse llevado a cabo antes de concluido el tiempo previo al sacrificio de los animales. La participación de la Cu/ZnSOD por tanto no puede ser descartada. Esto se apoya en una serie de estudios a través del empleo de ratones transgénicos que sobre expresan el gen de la Cu/ZnSOD en los que se reporta resistencia a los eventos tóxicos provocados por el modelo de MPTP (Przedborski et al., 1992).

Si bien es importante no descartar la temporalidad de la respuesta entre ambas formas de superóxido dismutasa, también es importante recordar que la MnSOD es considerada como una enzima de fase aguda, capaz de reaccionar ante situaciones en las que la homeostasis del sistema se encuentre alterada. Actualmente, se ha reportado que algunos otros metales además del manganeso, son capaces de activar la MnSOD entre los que se encuentra al hierro (Jiralerspong et al., 2001), el cual guarda una íntima asociación con el cobre en su control homeostático (Crowe y Morgan, 1996a).

Con respecto a la respuesta de los animales a la administración del MPP+, esta respuesta específica de la forma mitocondrial de la superóxido dismutasa, coincide con lo obtenido a partir de estudios previos en los que se reporta una respuesta específica de la MnSOD en pacientes que murieron con la EP (*post mortem*), mientras que la expresión de la Cu/ZnSOD en estos pacientes, no demuestra cambios con respecto al grupo control al momento de su análisis (Saggu et al., 1989).

Este importante incremento en la tasa de activación de la forma mitocondrial podría presentarse en respuesta a la neurotoxicidad mitocondrial que el modelo inflige en los animales sometidos al MPP+ (Tipton y Singer, 1993). Siendo la MnSOD considerada como la primera línea de defensa antioxidante que se activa en el modelo (debido al efecto que este tiene sobre la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial), podría incrementar su actividad con el fin de combatir la liberación masiva de radicales superóxido asociada a la inhibición de dicho sitio (Ramsay y Singer, 1992; Pitkanen y Robinson, 1996; Genova et al., 2001).

En este caso, la forma dependiente de cobre podría no haber cambiado su tasa de activación debido a una regulación negativa por producto final, provocado por el incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno liberados por la MnSOD, siendo esta inactivación selectiva sobre las formas dependientes de cobre pero no de manganeso, cuestión que ha sido demostrada previamente en la literatura (Bray et al., 1974).

La participación simultánea de otros mecanismos neuroprotectores podría generar estas diferencias en la activación de las dos formas de SOD (MnSOD sobre la activación de la Cu/ZnSOD), favoreciendo a su vez una temporalidad en la respuesta (a 16h sobre la respuesta a 24h) de las enzimas. Si bien el análisis de la respuesta de la superóxido dismutasa se considera como relevante en el modelo de Parkinson empleado, otros factores antioxidantes deben ser evaluados. Tal es el caso de la glutatión peroxidasa, la cual se encuentra íntimamente asociada al daño oxidativo que encabeza el MPP+ (Wullner et al., 1996).

ACTIVIDAD DE TH

Por su parte, la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) evaluada en esta tesis, demostró una disminución importante por efecto de la administración del MPP+, cuestión que ha sido previamente reportada a partir de estudios *in vivo* en roedores (Maruyama y Naoi, 1994). La TH utiliza como cofactores para su actividad tanto iones de hierro (Fe^{+3}) como a la tetrahidrobiopterina y es regulada por una diversidad de factores asociados con cambios a corto y largo plazo. Entre estos, la nitración de los residuos de tirosina ha llamado nuestra atención, ya que la TH se inactiva por nitración tanto en la misma EP, (Good, 1998) como por efecto de la administración del anión peroxinitrito y de la MPTP (Ara et al., 1998) en animales de experimentación.

Actualmente se carece de información acerca de la inhibición de la enzima por efecto de la falta de cobre como la que genera el MPP+ en el tejido estriatal (Ríos et al., 1995), pero se ha descrito una disminución en las concentraciones de dopamina y otras catecolaminas en animales con deficiencia de cobre (Prohaska y Bailey, 1994).

Sin embargo, el cobre podría estar asociado a la activación de la TH a través de cuproenzimas antioxidantes, ya que se sabe que en los animales transgénicos que

sobre expresan el gen de la Cu/ZnSOD, la nitración generada por el modelo se encuentra inhibida (Ara et al., 1998).

Los datos asociados a la actividad de la enzima son muy escasos. Sin embargo, un gran número de grupos ha estudiado la inmunorreactividad de la TH (TH-IR) con el fin de constatar los efectos que el modelo y la EP tienen en la cuenta total de células reactivas a TH, que a su vez corresponden al número de neuronas capaces de sintetizar dopamina (Nagatsu e Hirata, 1987). A este respecto, se ha demostrado que la disminución en la TH-IR generada por el MPTP/MPP+ se debe a la pérdida celular más que por disminución en expresión de la proteína (Turmel et al., 2001; Michel et al., 1990), aunque la escasa presencia de la misma no asegura su adecuada actividad.

La asociación del modelo con los procesos oxidantes y la nitración de la enzima tiene su apoyo en estudios que involucran la administración de compuestos antioxidantes como el EUK-134, el cual es un compuesto sintético que posee actividad tanto de SOD como de catalasa (Pong et al., 2000).

Así como para el caso del modelo de MPP+, la administración de 6-OHDA a cultivos neuronales dopaminérgicos promueve la nitración de los residuos de Tirosina de la TH. Por su parte, la administración del EUK-134 ha demostrado la capacidad de bloquear por completo la nitración, por lo que se apoya el papel del estrés oxidante (a través de la generación de peroxinitrito) en ambos modelos para la nitración de TH (Pong et al., 2000; Torreilles et al., 1999).

Por otro lado, el cobre es capaz de inhibir selectivamente la forma neuronal de la Sintasa del óxido nítrico (SONn) (Colasanti et al., 2000). Este efecto podría disminuir los niveles de óxido nítrico (NO) generado, que al interactuar con los radicales libres superóxidos generados por la administración del MPP+, podrían generar nuevas especies reactivas como el peroxinitrito, poniendo a las neuronas en riesgo de una nitración de sus residuos de tirosina (Ara et al., 1998). Otro cofactor que tanto la SON como la TH comparten para su activación es el fierro. En un inicio, algunos descubrimientos sugirieron que el cobre interfería con el dominio reductasa de la enzima, haciendo sin embargo hincapié en la presencia de un segundo sitio con mayor afinidad en el que se encuentra involucrado el dominio oxigenasa (Perry et al., 2000). A pesar de que en diversos estudios se ha demostrado el antagonismo entre ambos

metales (cobre y hierro), aún se desconoce si el cobre es capaz de sustituir al hierro en el dominio oxigenasa.

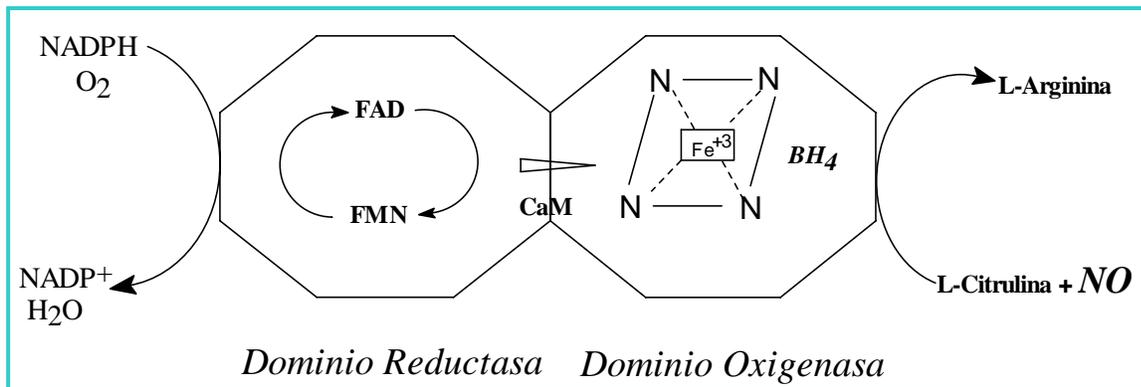


Figura 15. Representación de un monómero de la Sintasa del Oxido Nítrico (SON). Las SON se consideran como dímeros. Cada uno de los monómeros que las componen a su vez se encuentran compuestos por dos dominios (reductasa y oxigenasa). Emplean 3 substratos: L-Arginina, NADPH y O₂, y requiere de 5 cofactores: FAD, FMN, Calmodulina (CaM), tetrahydrobiopterina (BH₄) y hemo

Por sí solo, el NO promueve el daño oxidativo elevando la producción de radical hidroxilo a través de dos mecanismos: a) reaccionando con el superóxido y/o, b) incrementando los niveles de hierro libre.

Como anteriormente citamos, la tetrahydrobiopterina (BH₄) es necesaria para la actividad de la TH, (condición que comparte con la NOS). Por su parte, se sabe que el MPP⁺ es capaz de inhibir a la tirosina hidroxilasa a través de su interacción con la proteína provocando la pérdida de la capacidad de la TH para ser estimulada por la BH₄. (Maruyama y Naoi, 1994).

En nuestro modelo, la inactivación de la TH podría estar siendo llevada a cabo a través de dos mecanismos diferentes: 1) El NO generado por el modelo podría estar interactuando con el hierro de la TH inactivándola, ó 2) El MPP⁺ podría interactuar con la enzima haciendo que se pierda el alosterismo de su principal cofactor, la BH₄.

El pretratamiento con cobre podría ejercer su efecto protector en contra de la disminución de la actividad de la TH inducida por el MPP⁺ a través de: a) La inhibición de la SONn; b) Atrapando al radical hidroxilo por medio de cuproproteínas antioxidantes; c) Interactuando directamente con el NO formando complejos estables incapaces de reaccionar con las proteínas Fe-S (tal y como ocurre con el hierro) y

evitando la nitración de la TH; d) Activando directamente a la TH aún presente en el sistema en sustitución por el hierro y/o; e) Evitando la pérdida del alosterismo de la BH₄.

De esta manera, el pretratamiento con el metal no sólo podría evitar la propagación de la reacción en cadena provocada por el estrés oxidativo generado por el MPP+, sino que también podría actuar favoreciendo la interacción de la TH con sus cofactores y manteniendo la estructura funcional de la proteína al evitar su nitración. Nuestros resultados sugieren que la reducción en el número de células reactivas a TH, así como la disminución en la actividad de la enzima, inducidas por la administración del MPP+, podrían prevenirse a través del suplemento con sulfato de cobre.

Sin embargo, antes de llegar a dichas propuestas es necesario evaluar el número de células reactivas a TH en las condiciones experimentales de nuestro estudio.

Los resultados obtenidos a partir de la valoración conductual demostraron que la propia administración del cobre, favorece la hiperactividad de los animales y que la presencia del MPP+ genera en los animales expuestos al modelo (sin pretratamiento con cobre) una acinesia importante. Ambos resultados se han reportado previamente en la literatura en estudios independientes (Murthy et al., 1981; Fredriksson y Archer, 1995). Los resultados obtenidos a partir de la presente tesis son la primera evidencia de los efectos que el cobre ejecuta sobre el déficit motor inducido por el modelo de MPP+.

La actividad locomotriz se ve regulada por diversos factores, entre los que se cuentan como principales, los niveles de dopamina en el sistema nigroestriatal (Kim et al., 2000). La regulación de este sistema es a su vez coordinado por otros factores entre los que se cuenta la adenosina y sus receptores (principalmente los receptores A₂), quienes son considerados como moduladores de la liberación de dicho neurotransmisor (Dasesse et al., 2001). Inclusive, se ha considerado al empleo de bloqueadores de los receptores de adenosina como un tratamiento que podría optimizar la función dopaminérgica, en un esfuerzo más por controlar los síntomas cardinales de la EP (Kanda et al., 1998). La administración de antagonistas de adenosina no específicos ha demostrado incrementar la actividad locomotriz (Daly et al., 1983). En el caso del modelo de la MPTP, la administración de antagonistas específicos de receptores A_{2A}

como el KW-6002 demostró aminorar la hipolocomoción inducida por el modelo (Shiozaki et al., 1999).

Además, la obtención de un ratón knock out para el receptor A_{2A} de adenosina, demostró que dichos animales presentan una reducción en la actividad locomotriz tanto espontánea como inducida por la administración de cafeína (Ledent et al., 1997).

Actualmente se sabe que existe una relación antagónica e independiente entre los receptores de tipo 2 de dopamina (D2) y los receptores A2 para adenosina en lo que se refiere al control de las funciones neuronales y motoras en los ganglios basales. Sin embargo, existen también evidencias de que el efecto antiparkinsoniano generado por los antagonistas selectivos para los receptores A2 podría involucrar un mecanismo no dopaminérgico (Aoyama et al., 2000). Es por todo esto, que la hiperlocomoción generada a través del pretratamiento con cobre (acorde a lo reportado previamente; Murthy et al., 1981) podría deberse a diversos factores que podrían estar interactuando entre sí y que serán discutidos en detalle posteriormente.

Como anteriormente mencionábamos, los factores que podrían estar involucrados en la hiperlocomoción que el cobre provoca en nuestros animales, pueden ser muy diversos y no se han estudiado con detenimiento hasta el momento por ningún grupo. Sin embargo, entre ellos podrían estar por ejemplo:

1) *La interacción directa del cobre con el sistema dopaminérgico.* Como anteriormente fue citado, reportes previos han demostrado que la administración de suplementos de cobre en la dieta es capaz de inducir un incremento en la locomoción debido al incremento en los niveles de dopamina (Murthy et al., 1981).

2) *La inhibición selectiva del cobre sobre la SONn.* En apoyo a esta posibilidad se ha demostrado por medio de estudios *in vitro* que la inhibición específica de la SONn es capaz de disminuir la generación de radicales hidroxilo inducida por la administración del MPP+ (Rose et al., 1999).

Ya que la presencia del NO contribuye a la inhibición que el MPP+ realiza sobre el Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Cleeter et al., 2001), la sobreproducción de radicales superóxido generada por el modelo podría verse también reducida gracias a la inhibición de la SONn.

3) *La inactivación de los receptores A_{2A} para adenosina.*

Recientemente, se ha descrito la acción neuroprotectora generada a través de la administración de fármacos capaces de bloquear los receptores a adenosina A_{2A} (moduladores de la liberación de dopamina), como el SCH 58261, el CGS 21680 o el KW-6002, en modelos de parkinsonismo en primates. Ejemplos de dicha neuroprotección incluyen tanto el incremento en la actividad locomotriz (Chen et al., 2001), así como la inhibición en la liberación de aminoácidos excitatorios (Norenberg et al., 1997), que contribuyen al desarrollo de la excitotoxicidad generada por el MPP+. La inhibición irreversible que el cobre ejerce sobre la unión de diversos agonistas de los receptores a adenosina (Marangos et al., 1983), podría sugerir el papel de los receptores A_{2A} en la hiperlocomoción de nuestros animales.

Por su parte, nuestros resultados se apoyan en evidencias previas en que se reporta que la administración de cobre a roedores es capaz de generar hiperlocomoción, en una respuesta al incremento en los niveles de dopamina estriatal (Murthy et al., 2001).

4) *El control de la excitotoxicidad generada por el Glutamato.* Además de la dopamina, otros neurotransmisores como el glutamato, se encuentran involucrados en la generación y control del movimiento (Marino et al., 2002).

En el estriado, la liberación del glutamato es modulada por diversos receptores presinápticos entre los que se incluyen receptores para acetilcolina, dopamina, GABA, opioides y adenosina (Siegel et al., 1998).

La excitotoxicidad generada por el glutamato forma parte de los efectos neurotóxicos asociados a la administración del MPP+ (Leist et al., 1998). De la misma manera, también el MPP+ contribuye a la toxicidad del glutamato sobre las neuronas dopaminérgicas (Sawada et al., 1996). La administración de antagonistas de receptores para glutamato de tipo NMDA (MK-801, dizocilpina) han tenido respuestas contradictorias. En algunos reportes, la administración de MK-801 demostró ejercer una parcial neuroprotección en contra del descenso en las concentraciones estriatales de dopamina (Sonsalla et al., 1989), mientras que en otros, éste decremento de dopamina

y la inactivación de la tirosina hidroxilasa, no pudieron evitarse por la administración del MK-801 (Sonsalla et al., 1992).

Estudios con microdiálisis demostraron que la administración de MK-801 no evita la liberación masiva de dopamina inducida por el MPP+, aunque fue capaz de bloquear la liberación de glutamato (Leist et al., 1998).

La capacidad de la adenosina como modulador de los receptores para glutamato, podría sugerir al cobre como protector contra de la excitotoxicidad generada por este neurotransmisor, por medio de la ya mencionada inhibición irreversible sobre la unión de agonistas de los receptores para adenosina.

Alternativamente, el sulfato de cobre podría ejercer protección en contra de la excitotoxicidad generada por el glutamato, a través de la activación de cuproenzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, cuya sobre expresión ha demostrado a su vez ejercer efectos neuroprotectores en contra de la excitotoxicidad glutamatérgica (Schwartz et al., 1998). Sin poder asegurarlo, podríamos sugerir que de presentarse una protección del cobre en contra la excitotoxicidad, este podría ser uno de los mecanismos involucrados en el restablecimiento de la actividad locomotriz espontánea de los animales pretratados con cobre.

Aunque en la presente tesis únicamente evaluamos los efectos de la administración de cobre a corto plazo, éste metal podría también generar cambios a largo plazo a través de cambios en la expresión, síntesis y activación de diferentes cuproproteínas antioxidantes que colaboran en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, proveyéndolas, de mecanismos de defensa contra de la muerte neuronal y la propagación del estrés oxidativo. Tal es el caso de la ceruloplasmina, cuya presencia podría favorecer la supervivencia neuronal a través de la movilización del hierro de sus depósitos en los ganglios basales; favoreciendo el control en los niveles de radical superóxido y transportando de manera eficiente el cobre.

Por lo tanto, los mecanismos sugeridos de neuroprotección del sulfato de cobre podrían ser resumidos a través de la siguiente propuesta:

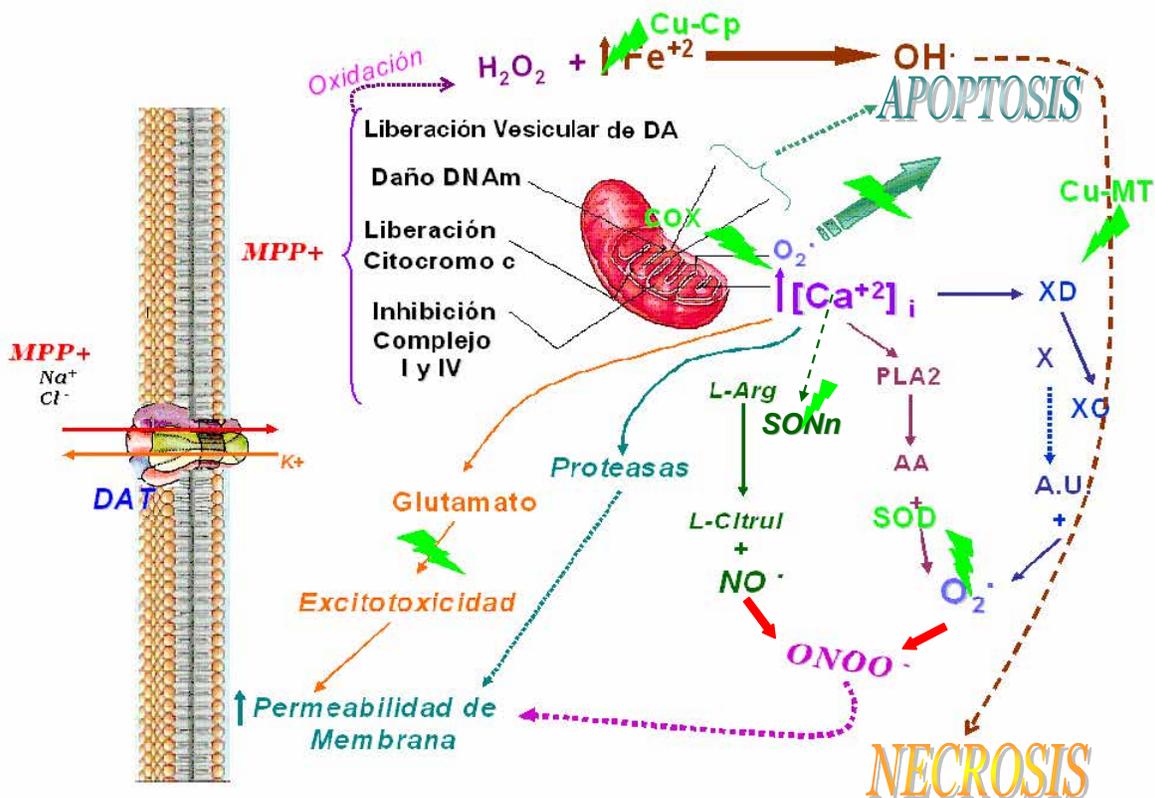


Figura 16. Propuesta gráfica de los mecanismos involucrados en la neuroprotección del sulfato de cobre y sus cuproproteínas en contra de los efectos tóxicos inducidos por la administración de MPP+. L-Arg: L-Arginina; L-Citrul: L-Citrulina; NO: Oxido nítrico; O₂^{·-}: Radical superóxido; ONOO⁻: Anión peroxinitrito; PLA2: Fosfolipasa A2; SONn: Sintasa del óxido nítrico neuronal; TDA: Transportador de Dopamina; TH: Tirosina hidroxilasa; XD: Xantina deshidrogenasa; XO: Xantina oxidasa.

(⚡ = Intervención del Cobre).

El cobre podría intervenir principalmente en la cascada oxidativa a través de:

- 1) La participación de enzimas antioxidantes dependientes del metal o activadas por él como la ceruloplasmina, la metalotioneína y la superóxido dismutasa, importantes "atrapadoras" de los radicales libres superóxido e hidroxilo.
- 2) Inhibiendo a la SONn, lo que podría evitar la reacción neurotóxica en cadena derivada de: a) la interacción de éste con otros radicales libres y la generación de peroxinitrito; b) interviniendo en el contacto del NO con proteínas hierro-sulfuradas; c) evitando el incremento en el contenido de Hierro libre disponible para la reacción de Fenton; o bien d) a través del bloqueo de la nitración de la TH.

- 3) También podría evitar el incremento en los niveles de Fe(II) libre gracias al antagonismo existente entre ambos metales o a través de la activación de la ceruloplasmina, encargada de transportarlo y mantenerlo unido a transferrina y ferritina.

11. CONCLUSIONES

A lo largo del desarrollo de la presente tesis pudimos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) El déficit en el contenido de dopamina estriatal, generado por la administración del MPP+, se revirtió por el pretratamiento con sulfato de cobre, tanto en el esquema crónico (en dependencia de la dosis administrada), como en el agudo (en relación con el tiempo de pretratamiento). La protección en contra este modelo experimental podría involucrar la participación del cobre en la síntesis de dopamina.
- 2) El estrés oxidativo generado por este modelo (evaluado a través de los niveles de lipoperoxidación), fue bloqueado también tanto en el esquema crónico (a la dosis más alta empleada) como en el agudo (únicamente a 24h). En esta neuroprotección, podrían encontrarse involucrados tanto la optimización funcional de la cadena respiratoria mitocondrial, así como la activación de enzimas antioxidantes y transportadoras del mismo.
- 3) Las dosis empleadas de sulfato de cobre en ambos esquemas de administración no resultaron tóxicas a los animales.
- 4) La evaluación de la actividad de la superóxido dismutasa, demostró un incremento selectivo de la forma particulada de la misma, lo que podría estar asociado al mecanismo de daño (mitocondrial) ejercido la administración de MPP+, a las características intrínsecas de la MnSOD, así como a la posible regulación negativa por producto final de la actividad de la forma dependiente de cobre. Posiblemente, la activación de esta enzima participe en la neuroprotección en contra del estrés oxidativo, ya que es considerada como la primera línea de defensa en contra del MPP+, controlando la liberación de radicales superóxido liberados como resultado de la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria.
- 5) El pretratamiento con sulfato de cobre evitó la reducción en la actividad de la TH inducido por el MPP+. El cobre podría llevar a cabo esta protección a través de la inactivación de la SON, reduciendo la producción de NO que provoca la nitración de los residuos de tirosina de la TH, o bien evitando que el MPP+ modifique la capacidad de la biopterina para activar a la enzima. Además, ya que el NO

contribuye a la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial inducida por el MPP+, la disminución en el contenido de NO podría evitar dicho daño y la propagación del estrés oxidativo.

- 6) La acinesia de los animales expuestos al MPP+ apoya lo obtenido por otros grupos experimentales en estudios previos. El cobre modificó esta acinesia en los animales que recibieron el pretratamiento, quizás debido a la interacción del metal con los receptores a adenosina, los cuales modulan la liberación de dopamina o bien a través de la facilitación de la síntesis de dopamina, lo cual se apoya en los resultados obtenidos a partir de la evaluación de la actividad de la TH y las concentraciones de dopamina.

12. PERSPECTIVAS.

La presente tesis deja una serie de interrogantes que planeamos aclarar en estudios posteriores. Entre ellas:

- 1) El mecanismo por medio del cual el cobre es capaz de inducir selectivamente a la MnSOD.
- 2) Comprobar si a otros tiempos en cobre no induce la Cu/Zn SOD ó si esta es inhibida por producto final a los tiempos que evaluamos su respuesta.
- 3) Valorar la capacidad del sulfato de cobre en el rescate dopaminérgico funcional de los ratones expuestos al MPP+, una vez establecido dicho daño.
- 4) Analizar otros posibles mecanismos de acción que participen en la neuroprotección del cobre como su capacidad para inducir a la SONn, la posible participación en los mecanismos de plasticidad neuronal, la participación de metaloproteínas (incremento en su expresión o activación) en la neuroprotección, entre otros.
- 5) De la misma manera, pretendemos continuar con estudios en muestras biológicas de pacientes con EP, encaminados a establecer la participación del cobre y sus cuproproteínas, en el desarrollo y/o susceptibilidad para padecer dicha clase de neurodegeneración.

13. REFERENCIAS.

Akhmedova S.N., Yakimovsky A.K., Schwartz E.I. 2001. Paraoxonase 1 Met-Leu 54 polymorphism is associated with Parkinson's disease. *J.Neurol.Sci.* 184(2): 179-182.

Aldred A.R., Grimes A., Schreiber G., Mercer J.F.B. 1987. Rat ceruloplasmin: molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta and testis. *J.Biol.Chem.* 262: 2875-2878.

Alexianu M.E., Robbins E., Carswell S., Appel S.H. 1998. 1 Alpha, 25 dihydroxyvitamin D3-dependent up-regulation of calcium-binding proteins in motoneuron cells. *J.Neurosci. Res.* 51(1): 58-66.

Ambani L.M., van Woert M.H., Murphy S. 1975. Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease. *Arch.Neurol.*32: 114-118.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M.1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.

Anichtchik O.V., Huotari M., Peitsaro N., Haycock J.W., Mannisto P.T., Panula P. 2000. Modulation of histamine H3 receptors in the brain of 6-hydroxidopamine-lesioned rats. *Eur.J.Neurosci.*; 12(11): 3823-3832.

Antkiewicz-Michaluk L., Michaluk J., Romanska I., Papla I., Vetulani J. 2000. Antidopaminergic effects of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol. *J.Neural Transm.* 107(8-9): 1009-1019.

Aoyama S., Kase H., Borrelli E. 2000. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A_{2A} receptor antagonist. *J.Neurosci.* 20(15): 5848-5852.

Ara J., Przedborski S., Naini A.B., Jackson-Lewis V., Trifiletti R.R., Horwitz J., Ischiropoulos H. 1998. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 95(13): 7659-7663.

Arce D.S., Keen C.L. 1992. Reversible and persistent consequences of copper deficiency in developing mice. *Reprod.Toxicol*.6(3): 211-221.

Aschner M. 1997. Manganese neurotoxicity and oxidative damage. In: *Metals and oxidative damage in Neurological Disorders*. Ed.Connor J.M. Plenum Press, New York: 77-93.

Aschner M., Cherian M.G., Klaassen C.D., Palmiter R.D., Erickson J.C., Bush A.I. 1997. Metallothioneins in brain. The role in physiology and pathology. *Toxicol.Appl.Pharmacol*.142: 229-242.

Askwith C., Eide D. van Ho A., et al.1994. The FET3 gene for *S.cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell*.76: 403-410.

Baldereschi M., Di Carlo A., Rocca W.A., Vanni P., Maggi S., Perissinotto E., Grigoletto F., Amaducci L., Inzitari D. 2000. Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two fold higher incidence in men. *Neurology*. 55(9): 1358-1363.

Barbeau A. y Pourcher E. 1982. New data on the genetics of Parkinson's Disease. *Can.J.Neurol.Sci*. 9: 53-60.

Barbeau A. y Roy M. 1984. Familial subsets in idiopathic Parkinson's disease. *Can.J. Neurol.Sci.*; 11: 144-150.

Barbeau A. 1986. Parkinson's disease: Clinical features and etiopathology. In: Extraparamidal disorders; Handbook of chemical Neurology. 5 (49). Eds. Vinken P.J., Bruyn G.W., and Klawans H.L.: 87-150.

Baron J.A. 1986. Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology*. 36:1490-1496.

Bax R.T., Hassler A., Luck W., Heftner H., Krageloh-Mann I., Nehaus P., Emmrich P. 1998. Cerebral manifestation of Wilson's disease successfully treated with liver transplantation. *Neurology*. 51(3): 863-865.

Beal M.F. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann.Neurol*. 31:119-130.

Ben-Sachar D., Youdim M.B.H. 1991a. Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats. *J.Neurochem*. 57: 2133-2135.

Ben-Sachar D., Riederer P., Youdim M.B.H. 1991b. Iron-Melanin interaction and lipid peroxidation: Implications for Parkinson's disease. *J.Neurochem*. 57: 1609-1614.

Benecke R., Strumper P., Weiss H. 1993. Electron transfer complexes I and IV of platelets are abnormal in Parkinson's disease but normal in Parkinson-plus syndromes. *Brain*. 116: 1451-1463.

Bennetts H.W., Chapman F.E. 1937. Copper deficiency in sheep in Western Australia. *Aust.Vet.J.*13: 138-149.

Bennetts H.W., Beck A.B. 1942. Enzootic ataxia and copper deficiency of sheep in Western Australia. *Commonwealth Australia Council Sci.Ind.Res.Bull.*147: 4-52.

Bergendi L., Benes L., Duracková Z., Ferencik M. 1999. Chemistry, Physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65 (18-19): 1865-1874.

Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. *J.Neurol.Sci.* 20: 415-455.

Bezard E. and Gross C.E. 1998. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: Towards a dynamic approach. *Prog.Neurobiol.* 55: 93-116.

Bhardwaj A., Northington F.J., Koehler R.C., Stiefel T., Hanley D.F., Traystman R.J. Adenosine modulates N-methyl-D-Aspartate-stimulated hippocampal nitric oxide production in vivo. *Stroke.* 26(9): 1627-1633.

Bissette G., Nemeroff C.B., Decker M.W., Kizer J.S., Javoy-Agid Y., Javoy-Agid F. 1985. Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 17: 324-328.

Blair A., Dosemici M., Heineman E.F. 1993. Cancer and other causes of death among male and female farmers from twenty three states. *Am.J.Ind.Med.*; 23: 729-742.

Bloch B., Popovici T., Levin M.J., Treil D., Kahn A. 1985. Transferrin gene expression visualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 82: 6706-6710.

Boccheta A. y Corsini G.U. Parkinson's disease and pesticides. *Lancet.* 2: 1163.

Boll MC, Sotelo J., Otero E., Alcaraz-Zubeldia M., Ríos C.1999. Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's Disease. *Neurosc.Lett.*265: 155-158.

Bonilla E. 1978. Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of manganese in rat brain and other tissues. *Clin.Chem.*24: 471-474.

Bowling A.C., Schulz J.B., Brown R.H., Beal M.F. 1993. Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familiar and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J.Neurochem.* 61: 2322-2325.

Bray R.C., Cockle S.A., Fielden E.M., Roberts P.B., Rotilio G., Calabrese L. 1974. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem.J.* 139: 43-48.

Bremner I., Mehra R.K., Morrison J.N., Wood A.M.1986. Effects of dietary copper supplementation of rats on the occurrence of metallothionein-I in liver and its secretion into blood, bile and urine. *Biochem.J.*235: 735-739.

Bruehlmeier M., Leenders K.L., Vontobel P., Calonder C., Antonini A., Weindl A. 2000. Increased brain iron uptake in wilson's disease: a ⁵²Fe-citrate PET study. *J.Nucl.Med.*41(5): 781-787.

Bull P.C., Thomas G.R., Rommens J.M., Forbes J.R., Cox D.W. 1993. The Wilson's disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat.Genet.* 5: 327-337.

Bull, P.C., Cox, D.W. 1994. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport, *Trends Genet.* 10: 246-252.

Buu N.T. 1993. Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium and dopamine in the mouse brain cell nuclei. *J. Neurochem. (Rapid communication).* 61:1557-1560.

Calne D.B., Langston J.W. 1983. Etiology of Parkinson's disease. *Lancet.* 2: 1457-1459.

Candy J.M., Perry R.H., Perry E.K., Irving D., Blessed G., Fairbairn A.F., Tomlinson B.E. 1983. Pathological changes in the nucleus of Meynert in Alzheimer's and Parkinson's disease. *J.Neurol.Sci.* 59: 277-289.

Cassarino D.S., Fall C. P., Swerdlow R.H, Smith T.S, Halvorsen E.M., Miller S.W., Parks J.P., Parker W. D. Jr., Bennett J.P.Jr. 1997. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim.et Biophys Acta.* 1362:77-86.

Chan P.H., Chu L., Chen S.F., Carlson E.J., Epstein C.J. 1990. Reduced neurotoxicity in transgenic mice overexpressing human copper-zinc-superoxide dismutase. *Stroke.* 21(11 Suppl.): 11180-11182.

Chen Y.I., Jenkins B.G., Rosen B.R. 1994. Evidence for impairment of energy metabolism in Parkinson's disease using in vivo localized MR spectroscopy. *Proc.Soc.Magn.Res.1:* 194.

Chiueh C.C., Burns R.S., Markey S.P., Jacobowitz D.M., Kopin I.J. 1985. Primate model of parkinsonism: selective lesion of nigrostriatal neurons by 1-methyl, 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in rhesus monkeys. *Life Sci.* 36: 213-218.

Cleeter M.W.J., Cooper J.M., Schapira A.H.V. 2001. Nitric Oxide enhances MPP+ inhibition of complex I. *FEBS Letters.* 504: 50-52.

Cohen, G. 1988. Oxygen radicals and Parkinson's Disease. In: *Oxygen radicals and tissue injury.* B. Halliwell, Ed. : 130-135. *FASEB.* Bethesda, Md.

Connor J.R., Benkovic A. 1992. Iron regulation in the brain: histochemical, biochemical, and molecular considerations. *Ann.Neurol.* 32: S51-S61.

Connor J. Snyder B., Beard J., Fine R., Mufson E. 1992. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's Disease. *J.Neurosci.Res.* 31: 327-335.

Connor, J.R., Tucker, P., Johnson, M. and Snyder, B.1993. Ceruloplasmin levels in the human superior temporal gyrus in aging and Alzheimer disease, *Neurosci. Lett.* 159: 88-90.

Connor J.R., Snyder B.S., Arosio P., Loeffler D.A.,LeWitt P. 1995. A quantitative analysis of isoferitins in select regions of aged, parkinsonian and Alzheimer's disease brains. *J.Neurochem.* 65: 717-724.

Cooper CE and Springett R. 1997. Measurement of cytochrome oxidase and mitochondrial energetics by near-infrared spectroscopy. *Eur-J-Biochem.* May 1; 245 (3): 521-32.

Cooper J.M. and Schapira A.H.V. 1997. Mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *J. Bioener. Biomemb.* 29 (2): 175-183.

Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H. 1991. Dopamine. In: The biochemical basis of Neuropharmacology. Sixth Ed. Oxford Univ. Press. U.S.A. 285-337.

Cooperstein, S.J., Lazarow,A. 1951. A microspectrophotometric method for the determination of cytochrome oxidase. *J.Biol.Chem.* 189: 665-670.

Cox D.W. 1966. Factors influencing serum ceruloplasmin levels in normal individuals. *J.Lab.Clin.Med.* 68: 893-904.

Crowe, A. and Morgan, E.H. 1996a. 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.* 126: 183-194.

Crowe, A. and Morgan, E.H. 1996b. The effects of iron loading and iron deficiency on the tissue uptake of ⁶⁴Cu during development in the rat. *Biochim.Biophys Acta.* 1291(1): 53-59.

Culotta V.C., Hsu T., Hu S., Furst P., Hamer D. 1989. Copper and the ACE1 regulatory protein reversibly induce yeast metallothionein gene transcription in a mouse extract. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86: 8377-8381.

Curzon G., O'Reilly S. 1960. A coupled iron-ceruloplasmin oxidation system. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2: 284-286.

Czyzyk Krzeska M.F., Bayliss D.A., Lawson E.E., Millhorn D.E.1992. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J.Neurochem.*58: 1538-1546.

Czyzyk Krzeska M.F., Furnari B.A., Lawson E.E., Millhorn D.E.1992. Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J.Biol.Chem.*269: 760-764.

Czyzyk Krzeska M.F., Paulding W.R., Beresh J.E., Kroll S.L.1997. Post-transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by oxygen in PC12 cells. *Kidney Int.* 51: 585-590.

Dabbeni-Sala F., Di Santo S., Franceschini D., Skaper S.D.,Giusti P. 2001. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J.* 15 (1): 164-170.

Daimon M., Kato T., Kawanami T., Tominaga M., Igarashi M., Yamatani K., Sasaki H. 1995. A nonsense mutation of the ceruloplasmin gene in hereditary ceruloplasmin deficiency with diabetes mellitus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 217 (1):89-95.

Daly J.W., Butts-Lamb P., Padgett W. 1983. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cel Mol.Neurobiol.* 3: 69-74.

Dancis A., Yuan D.S., Haile D. et al. 1994. Molecular characterization of a copper transport protein in *S.cerevisiae* : A unexpected role for copper in iron transport. *Cell.*76: 393-402.

Dassesse D., Massie A., Ferrari R., Ledent C., Parmentier M., Arckens L., Zoli M., Schiffmann S.N. 2001. Functional striatal hypodopaminergic activity in mice lacking adenosine A (A2) receptors. *J.Neurochem.*2001. 78(1): 183-198.

Daubner S.C., Lauriano C., Haycock J.W., Fitzpatric P.F. 1992. Site-directed mutagenesis of serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. Effects of dopamine and cAMP-dependent phosphorylation on enzyme activity. *J.Biol.Chem.*267:12639-12646.

Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R.1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease, *J. Neurochem.* 52: 381-389.

Dexter D.T., Carayon, A.,Vidailhet M., Ruberg M., Agid, F., Agid, Y., Lees, A.J., Wells F.R., Jenner, P., Marsden, C. D. 1990. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 55: 16-20.

Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P., Marsden, C. D.1991. Alterations in the levels of iron, ferritin, and other trace

metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia, *Brain* 114: 1953-1975.

Dexter D.T., Jenner, P., A.H.V. Schapira, Marsden, C. D. 1992. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace elements in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Ann.Neurol.*32: S94-S100.

De Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E. 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans. *Free Rad.Biol.Med.* 26(1-2): 202-226.

Dluzen D.E., McDermott J.L. 2000. Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease. *J.Gend.Specif.Med.* 3(6): 36-42.

Dong Z., Ferger B., Feldon J., Bueler H. 2002. Overexpression of Parkinson's disease-associated alpha-synuclein A53T by recombinant adeno-associated virus in mice does not increase the vulnerability of dopaminergic neurons to MPTP. *J.Neurobiol.* 53(1): 1-10.

Duda J.E., Lee V.M., Trojanowski J.Q. 2000. Neuropathology of msynuclein aggregates new insights into mechanisms of neurodegenerative diseases. *J.Neurosci.Res.* 61:121-127.

Dumas S., Le Hir H., Bodeau Pean S., Hirsch E., Thernes C., Mallet J. 1996. New species of human tyrosine hydroxylase mRNA are produced in variable amounts in adrenal medulla and are overexpressed in progressive supranuclear palsy. *J.Neurochem.*67: 19-25.

Duvoisin R.C., Johnson W.G. 1992. Hereditary Lewy-body parkinsonism and evidence for a genetic etiology of Parkinson's Disease. *Brain Pathol.* 2: 309-320.

Eastham J.H., Lacro J.P., Jeste D.V. 1996. Ethnicity and movement disorders. *Mt.Sinai J.Med.* 63(5-6): 314-319.

Ebadi, M. , Srinivasan, S.K. and Baxi, M.D.1996. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease, *Prog. Neurobiol.* 48: 1-19.

Eberling J.L., Richardson B.C., Reed B.R., Wolfe N., Jagust W.J. 1994. Cortical glucose metabolism in Parkinson's disease without dementia. *Neurobiol.Aging.* 15(3):329-335.

Elizan T.S., Casals J. 1983. The viral hypothesis of Parkinsonism. *J.Neurol.Transm.Suppl.* 19: 75-88.

Emerich D.F., McDermott P., Krueger P., Banks M., Zjhao J., Marszalowski J., Frydel B., Winn S.R., Sanberg P.R. 1993. Locomotion of aged rats: relationship to neurochemical but not morphological changes in nigrostriatal dopaminergic neurons. *Brain Res.Bull.* 32:477-486.

Epelbaum J., Ruberg M., Moyse E., Javoy-Agid F., Dubois B., Javoy-Agid Y. 1983. Somatostatin and dementia in Parkinson's disease. *Brain Res.* 278: 376-379.

Erickson J.C., Hollopeter G., Thomas S.A., Froelick G.J., Palmiter R.D. 1997. Disruption of the metallothionein-III gene in mice: Analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging and seizures. *J.Neuroscience.* 17 (4): 1271-1281.

Farrer M., Chan P., Chen R., Tan L., Lincoln S., Hernández D., Forno L., Gwinn-Hardy K., Petrucelli L., Hussey J., Singleton A., Janner C., Hardy J., Langston J.W. 2001. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann. Neurol.* 50: 293-300.

Faucheux B.A., Nillese N., Damier P. et al. 1995. Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 92:9603-9607.

Fearnley J.M., Lees A. 1991. Aging and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 114: 2283-2302.

Fitzpatrick P.F. 1989. The metal requirement of rat tyrosine hydroxylase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 161(1): 211-215.

Fleming R.E., Gitlin J.D. 1990. Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression during development. *J.Biol.Chem.*265: 7701-7707.

Fleming L., Mann J.B., Bean J., Briggie T., Sanchez-Ramos J.R.1994. Parkinson's Disease and brain levels of organochlorine pesticides. *Ann.Neurol.* 36: 100-103.

Flohé L., Ötting F. 1984. Superoxide dismutasa assays. *Methods Enzymol.* 105: 93-104.

Forloni G., Bertani I., Calella A.M., Thaler F., Invernizzi R. 2000. Alpha-synuclein and Parkinson's disease: selective neurodegenerative effect of alpha-synuclein fragment on dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *Ann Neurol.* 47(5): 632-640.

Fowler C.J., Oreland L., Marcusson J., Winblad B. 1980. Titration of human brain monoamine oxidase-A and -B by clorgyline and l-deprenyl. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 311: 263-272.

Fox S.H., Brotchie J.M. 2000. 5-HT_{2C} receptor binding is increased in the substantia nigra pars reticulata in Parkinson's disease. *Mov.Disord.*15(6): 1064-1069.

Fratiglioni L., Wang H.X. 2000. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: review of the epidemiological studies. *Behav.Brain.Res.* 113(1-2): 117-120.

Fredriksson A., Fredriksson M., Eriksson P. 1993. Neonatal exposure to paraquat or MPTP induces permanent changes in striatum dopamine and behavior in adult mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 122(2): 258-264.

Fredriksson A., Archer T. 1995. MPTP-induced behavioral and biochemical deficits a parametric analysis. *J.Neural Transm.[P-D Sect]* 7: 123-132.

Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch.Biochem.Biophys.* 247: 1-11.

Gahn L.G., Roskoski R. Jr. 1995. Thermal stability and CD analysis of rat tyrosine hydroxylase. *Biochemistry.* 34:252-256.

Galvin J.E., Uryu K., Lee V.M., Trojanowski J.Q. 1999. Axon pathology in Parkinson's Disease and Lewy body dementia hippocampus contains α , β , and γ -synuclein. *PNAS.* 96 (23): 13450-13455.

Galvin J.E., Lee V.M., Trojanowski J.Q. 2001. Synucleinopathies: Clinical and pathological implications. *Arch.Neurol.* 58: 186-90.

Gaspar P., Javoy-Agid F., Ploska A., Javoy-Agid Y. 1980. Regional distribution of neurotransmitter synthesizing enzymes in the basal ganglia of human brain. *J.Neurochem.* 34:278-283.

Genova M.L., Ventura B., Giuliano G., Bovina C., Formiggini G., Parenti Castelli G., Lenaz G. 2001. The site of production of superoxide radical in mitochondrial complex I is

not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.* 505(3): 364-368.

Gerlach, M., Ben-Sachar, D., Riederer, P., Youdim, M.B.H. 1994. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases?, *J. Neurochem.* 63: 793-807.

Gerlach M. and Riederer P. 1996. Animal models of Parkinson's disease: An empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural. Transm.* 103: 987-1041.

Gitlin J.D., Schroeder J.J., Lee-Ambrose L.M., Cousins R.J. 1992. Mechanisms of ceruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rat. *Biochem.J.* 282: 835-839.

Glinka Y., Gassen M., Youdim M.B.H. 1997. Iron and neurotransmitter function in the brain. Chapter I In: *Metals and Oxidative Damage: 1-21*. In: *Neurological Disorders*. Ed. Connor J.R. *Plenum Press*, NY, USA.

Goetz G.G. 1990. Dopaminergic agonists in the treatment of Parkinson's Disease. *Neurology.* 46: 50-57.

Goldstein I.M., Kaplan H.B., Edelson H.S., Weissman G. 1979. Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radical. *J. Biol. Chem.* 254(10): 4040-4045.

Good P.F., Hsu A., Werner P., Perl D.P., Olanow W. 1998. Protein nitration in Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57(4): 338-342.

Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Richardson R.J. 1998. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* 50(5): 1346-1350.

Gould D.H. and Gustine D.L. Basal Ganglia degeneration, myelin alterations, and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropionic acid. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 8 (5): 377-393. 1982.

Grima B., Lamouroux A., Boni C., Julien J.F., Javoy-Agid F., Mallet J. 1987. A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature.*326: 707-711.

Grisham M.B. 1992. Sources of reactive oxygen metabolites. In: *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine.* R.G.Laude Co. : 20-28.

Guarnieri C., Ventura C. 1985.Inhibition by ceruloplasmin of the cardiac sarcolemmal adenochochrome formation. Biosci. Rep. 5: 473-476.

Guo Z., Erzo A., Butterfield D.A., Mattson M.D. 2000. Beneficial effects of dietary restriction on cerebral cortical synaptic terminals: preservation of glucosa and glutamate transport and mitochondrial function after exposure to meylold beta-peptide, iron, and 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem* Jul;75(1):314-20.

Gutiérrez-Reyes E.Y., Albores A., Ríos C. 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology.* 131: 145-154.

Haas H.L., Selbach O. 2000. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 362: 375-381.

Haas R.H., Bchir , Nasirian F., Nakano K., Ward D., ChB M.P., Hill R., Shults C.W. 1995. Low platelet mitochondrial complex I and Complex II/III activity in early untreated Parkinson's Disease. *Ann.Neurol.* 37: 714-722.

Haavic J., Toska K. 1998. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol.Neurobiol.*16 (3): 285-309.

Halliwell, B., Gutteridge J.M.C. 1985. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Lavendon Press, Oxford.

Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J.Neurochem.* 59: 1609-1623.

Hamer D.H. 1986. Metallothionein. *Ann.Rev.Biochem.* 55:913-951.

Harris Z.L., Takahashi Y., Miyajima H., Serizawa M., MacGillivray R.T.A., Gitlin J.D. 1995. Aceruloplasminemia: molecular characterization of a novel disorder of iron metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 92: 2539-2542.

Harris Z.L., Gitlin J.D. 1996. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am.J.Clin.Nutr.* 63: 836S-841S.

Hartard C., Weisner B., Dieu C., Kunze K. 1993. Wilson's Disease with cerebral manifestation: monitoring therapy by CSF copper concentration. *J.Neurol.* 241: 101-107.

Hartmann H.A., Evenson M.A.. 1992. Deficiency of copper can cause degeneration. *Med. Hypotheses.* 38(1): 75-85.

Hasegawa E., Takeshige K., Oishi T., Murai Y., Minakami S. 1990. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*170: 1049-1055.

Hattori N., Tanaka M., Ozawa T., Mizuno Y. 1991. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 30(4): 563-571.

Hearing V.J., Jiménez M. 1987. Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int.J.Biochem.* 19: 1141-1147.

Hefter H., Kuwert T., Herzog H., Arendt G., Stremmel W., Feinendegen L.E. 1993. Relationship between striatal glucose consumption and copper excretion in patients with Wilson's disease treated with D-penicillamine. *J.Neurol.*241(1): 49-53.

Hirsch E.C., Facheaux B.A. 1998. Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov.Dis.*13(Suppl 1): 39-45.

Holmberg C.G., Laurell C.B.1948. Investigations in serum copper. II. Isolation of the copper containing protein, and a description of some of its properties. *Clin.Chim.Acta.*2: 550-556.

Holt D., Magos L., Webb M. 1980. The interaction of cadmium-induced rat renal metallothionein with bivalent mercury in vitro. *Chem.-Biol.Interact.* 32: 125-135.

Hornykiewicz O., Kish S.J. 1986. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 45: 19-34.

Hornykiewicz O. 1966. Dopamine (3-hydroxytryptamine) and brain function. *Pharmacol.Rev.* 18: 925-964.

Hudnell H.K. 1999. Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies. *Neurotoxicology.*20(2-3): 379-397.

Hung H.C., Lee E.H. 1998. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic.Biol.Med.* 24: 76-84.

Hunt D.M. 1980. Copper and neurological function. *Ciba Found Symp.*79: 247-266.

Ikonomidou C., Qin Q. Y., Labruyere J., Olney J.W. 1996. Motor neuron degeneration induced by excitotoxin agonists has features in common with those seen in the SOD-1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55(2):211-24.

Inoue K., Akaike T., Miyamoto Y., Okamoto T., Sawa T., Otagiri M., Suzuki S., Yoshimura T., Maeda H. 1999. Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism *in vivo*. *J.Biol.Chem.* 274 (38): 27069-27075.

Iregren A. 1999. Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests. *Neurotoxicology.* 20(2-3): 315-323.

Ischiropoulos H. and Beckman J.S. 2003. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration. Cause, effect or association? *J.Clin.Invest.*111: 163-169.

Iwata, M., Hirano, A. and French, J.H. 1979. Degeneration of the cerebellar system in X-chromosome-linked copper malabsorption, *Ann. Neurol.* 5: 542-549.

Jaeger J.L., Shimizu N., Gitlin J.D. 1991. Tissue specific ceruloplasmin gene expression in the mammary gland. *Biochem.J.*280: 671-677.

Janetzki B., Hauck S., Youdim M.B.H., Riederer P., Jellinger K., Pantucek F., Zochiling R. 1994. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci.Lett.*169 (1-2): 126-128.

Javoy-Agid F. Grouselle D., Tixier-Vidal A., Javoy-Agid Y. 1983. Thyrotropin releasing hormone in brain of patients with Parkinson's disease. *Neuropeptides.* 3: 405-410.

Javoy-Agid F., Ruberg M., Pique L., Bertagna X., Taquet H., Studler J.M., Cesselin F., Epelbaum J. Javoy-Agid Y. 1984. Biochemistry of the hypothalamus in Parkinson's disease. *Neurology*.34:672-675.

Jellinger, K.1987.Overview of morphological changes in Parkinson's disease, In: *Advances in Neurology* vol. 45, pp1-18, Yahr, M.D. and Bergmann, K.J. (Eds.), Raven Press.

Jellinger K., Linert L., Kienzl E., Herlinger E., Youdim M.B. 1995. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J.Neural.Transm.Suppl.* 46: 297-314.

Jenner P., Schapira A.H.V., Marsden C.D. 1992. New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*. 42: 2241-2250.

Jenner P.,Olanow C.W. 1997. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 47(6 Suppl.3): 161-170.

Jimenez-Jimenez F.J. ;Molina J.A., Vargas C., Gomez P., Navarro J.A., Benito-Leon J., Orti-Pareja M.,Gasalla T., Cisneros E., Arenas J. 1994. Neurotransmitter amino acids in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J.Neurol.Sci.*141(1-2): 39-44.

Jiralerspong S., Ge B., Hudson T.J., Pandolfo M.2001. Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Lett.* 509(1): 101-105.

Joselyn S.A., Beninger R.J. 1991. Behavioral effects of intrastriatal caffeine mediated by adenosinergic modulation of dopamine. *Pharmacol.Biochem.Behav.*39: 97-103.

Johnson S. 2001. Is Parkinson's Disease the heterozygote form of Wilson's disease: PD = ½ WD? *Med.Hypotheses*. 56(2): 171-173.

Kanda T., Jackson M.J., Smith L.A., Pearce R.K.B., Nakamura J., Kase H., Kuwana Y., Jenner P. 1998. Adenosine A_{2A} antagonist: A novel antiparkinsonian agent that does not provoke dyskinesia in Parkinsonian monkeys. *Ann.Neurol*.43: 507-513.

Kaplan B., Ratner V., Haas E. 2003. alpha-synuclein. Its biological function and role in neurodegenerative diseases. *J.Mol.Neurosci*. 20 (2): 83-92.

Kappock T.J., Caradona J.P.1996. Pterin-dependent amino acid hydroxylases.*Chem.Rev*.96: 2659-2756.

Kehr W., Carlsson A., Lindquist M., Magnusson T., Atack C. 1972. Evidence for a receptor mediated feedback control of striatal tyrosine hydroxylase activity. *J.Pharm.Pharmacol*.24: 744-747.

Kelton M.C., Kahn H.J., Conrath C.L., Newhouse P.A. 2000. The effects of nicotine on Parkinson's disease. *Brain Cogn*. 43(1-3): 274-282.

Kim D.S., Szczypka M.S., Palmiter R.D. 2000. Dopamine-deficient mice are hypersensitive to dopamine receptor agonists. *J.Neurosci*. 20 (12): 4405-4413.

Kim K.S., Park D.H., Wessel T.C., Song B., Wagner J.A., Joh T.H. 1993. A dual role for the cAMP-dependent protein kinase in tyrosine hydroxylase gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*.90: 3471-3475.

Kish S.J., Rajput A., Gilbert J., Rozdilsky B., Chang L.J., Shannak K., Hornykiewicz O. 1986. Elevated gamma amino butyric acid levels in striatal but not extrastriatal brain

regions in Parkinson's disease: correlation with striatal dopamine loss. *Ann.Neurol.* 20 (1): 26-31.

Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Miroshima S., Yokochi M., Mizuno Y., Shimizu N. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392: 605-608.

Klausner R.D., Rouault T.A., Harford J.B. 1993. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell.*72: 19-28.

Klevay L.M., Inman L., Johnson L.K. 1984. Increased cholesterol in plasma in a young man during experimental copper depletion. *Metabolism.*33: 1112-1118.

Klomp L.W.J., Farhangrazi Z.S., Dugan L.L., Gitlin J.D. 1996. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. *J.Clin.Invest.* 98: 207-215.

Kobayashi K., Sano H. 2000. Dopamine deficiency in mice. *Brain.Dev.* 22(Suppl. 1): S54-S60.

Kohno S., Miyajima H., Takahashi Y., Suzuki H., Hishida A. 2000. Defective electron transfer in complexes I and IV in patients with aceruloplasminemia. *J.Neurol.Sci.* 182(1): 57-60.

Kojima Y., Kägi J.H.R. 1978. Methallothionein. *Trends Biochem.Sci.* 3: 90-93.

Kowall N.W., Hantraye P., Brouillet E., Beal M.F., McKee A.C., Ferrante R. 2000. MPTP induces alpha-synuclein aggregation in the substantia nigra of baboons. *Neuroreport.* 11 (1): 211-213.

Kuhn D.M., Arthur R.E.Jr., Thomas D.M., Elferink L.A. 1999. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's Disease. *J.Neurochem.* 73(3): 1309-1317.

Kumer S.C., Vrana K.E. 1996. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J.Neurochem.*67:663-645.

Kurtzke J.F., Goldberg I.D. 1988. Parkinsonism death rates by race, sex, and geography. *Neurology.* 38(10): 1558-1561.

Kurtzke J.F., Murphy F.M. 1990. The changing patterns of death rates in parkinsonism. *Neurology*; 40: 42-49.

Langston J.W., Ballard P.A., Tetrud J.W. 1983. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science.* 219: 979-980.

Langston J.W., Forno L.S., Rebert C.S., Irwin I. 1984. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl,1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390-394.

Lee M.S. and Marsden C.D. 1994. Neurological sequelae following carbon monoxide poisoning clinical course and outcome according to the clinical types and brain computed tomography scan findings. *Mov.Disord.* 9(5):550-558.

Lees A.J. 1994. Levodopa substitution: the golden standard. *Clin Neuropharmacol.* 17: S1-S7.

Leist M., Volbracht C., Fava E., Nicotera P. 1998. 1-methyl-4-phenylpyridinium induces autocrine excitotoxicity, protease activation, and neuronal apoptosis. *Mol.Pharmacol.* 54 (5): 789-801.

Leveugle B., Faucheux B.A., Bouras C. et al. 1996. Immunohistochemical analysis of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol.* 91: 566-572.

Levivier M., Przedborski S., Bencsics C., Kang U.J. 1995. Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J.Neurosci.* 15: 7810-7820.

Linder M.C., Munro H.N. 1973. Iron and copper metabolism during development. *Enzyme.* 15: 111-138.

Linder M.C. 1991. The biochemistry of copper. New York: Plenum Press.

Linder, M.C., Hazegh-Azam, M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology, *Am. J. Clin. Nutr.* 63: 797S-811S.

Linder M.C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R., Lomeli N. 1998. Copper transport. *Am.J.Clin.Nutr.* 67(5 Suppl.): 965S-971S.

Lo Bianco C., Ridet J-L., Schneider B.L., Déglon N., Aebischer P. 2002. α -Synucleopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *PNAS.* 99 (16): 10813-10818.

Logan J.I., Harveyson K.B., Hughes A.E., Archbold G.P.R. Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus. *Q.J.Med.* 87: 663-670.

Lücking C.B., Durr A., Bonifati V., Vaughan J.R, De Michele G., Gasser T., Harhangi B.S., Meo G., Deneffe P., Wood N.W. 2000. Association between early-onset

Parkinson's Disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N.England J.Med.* 342 (21): 1560-1567.

Lücking C.B., and Brice A. 2000. Alpha-synuclein and Parkinson's Disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (13-14): 1894-1908.

Ma Q., Chan P., Yoshii M., Veda K. 2003. Alpha-synuclein aggregation and neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 5 (2): 139-148.

Maggio R., Riva M., Vaglini F., Fornai F., Molteni R., Armogida M., Racagni G., Corsini G.U. 1998. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. *J.Neurochem.* 71(6): 2439-2446.

Marcus D.L., Thomas C., Rodriguez C., Simberkoff K., Tsai J.S., Strafaci J.A., and Freedman M.L. 1998. Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Exp.Neurol.* 150: 40-44.

Marino M.J., Awad H., Poisi K.O., Wittmann M., Conn P.J. 2002. Localization and physiological roles of metabotropic glutamate receptors in the direct pathways of the basal ganglia. *Amino acids.* 23 (1-3): 185-191.

Martin-Ruiz C.M., Piggot M., Gotti C., Lindstrom J., Mendelow A.D., Siddique M.S., Perry R.H., Court J.A. 2000. Alpha and beta nicotinic acetylcholine receptors subunits and synaptophysin in putamen from Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 39 (13): 2830-2839.

Maruyama W., Nakahara D., Ota M., Takahashi T., Takahashi A., Nagatsu T., Naoi M. 1992. N-Methylation of dopamine derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study. *J.Neurochem.* 59: 395-400.

Maruyama W., Naoi M. 1994. Inhibition of tyrosine hydroxylase by a dopamine neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion: depletion of allosteric site to the bipterin cofactor. *Life Sci.* 55(3): 207-212.

Maruyama W., Sobue G., Matsubara K., Hashizume Y., Dostert P., Naoi M. 1997. A dopaminergic neurotoxin, 1(R), 2(N)-dimethyl 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl(R)salsolinol, and its oxidation product 1,2(N)-dimethyl 6,7-dihydroxyquinolinium ion, accumulate in the nigro-striatal system of the human brain. *Neurosci.Lett.* 223:61-64.

Mauborgne A., Javoy-Agid F., Legrand J.C., Agid Y., Cesselin F. 1983. Decrease of substance P-like immunoreactivity in the substantia nigra and pallidum of parkinsonian brains. *Brain Res.* 268: 167-170.

McArdle H.J., Erlich R. 1991. Copper uptake and transfer to the mouse fetus during pregnancy. *J.Nutr.* 121: 208-214.

McMillan D.E. 1999. A brief history of the neurobehavioral toxicity of manganese: some unanswered questions. *Neurotoxicology.* 20 (2-3): 499-507.

Medda R., Calabrese L., Musci G., Padiglia A., Floris G. 1996. Effect of ceruloplasmin on 6-hydroxydopamine oxidation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38 (4): 721-728.

Mehta S.W., Eikum R. 1989. Effect of estrogen on serum and tissue levels of copper and zinc. *Adv.Exp.Med.Biol.* 258:156-162.

Mendez J.S., Finn B.W. 1975. Use of 6OHDA to create lesions in catecholamine neurons in rats. *J. Neurosurg.* 42 (2): 166-173.

Menkes J.H., Alter M., Steigleder G.K., Weakley D.R., Sung J.H. 1962. A sex-linked recessive disorder with retardation in growth, peculiar hair and focal cerebral degeneration. *Pediatrics*. 29: 764-779.

Messipour, M. and Haddady, H. 1988. Effect of ascorbic acid administration on copper-induced changes of rat brain hypothalamus catecholamine contents. *Acta Neurol.Scand*. 77: 481-485.

Soret M.I., Anderson K.K., Que L.Jr. Haavick J. 1995. Resonance Raman studies of catecholate and phenolate complexes of recombinant human tyrosine hydroxylase. *Biochemistry*.34: 5504-5510.

Michel P.P., Dandapani B.K., Knusel B., Sanchez-Ramos J., Hefti F. 1990. Toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium for rat dopaminergic neurons in culture: selectivity and irreversibility. *J.Neurochem*. 54(4):1102-1109.

Miller N., Vile R. 1995. Targeted vectors for gene therapy. *FASEB J*: 9: 190-199.

Milne D.B., Klevay L.M., Hunt J.R. 1988. Effects of ascorbic acid supplements and a diet marginal in copper on indices of copper nutriture in women. *Nutr.Res*. 8: 865-873.

Milne D.B., Johnson P.E. 1993. Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults. *Clin.Chem*.39: 883-887.

Minami C., Deng Y., Maruyama W., Takahashi T., Kawai M., Nakahara D., Naoi M. 1998. Generation of the reactive oxygen species account for cytotoxicity of an endogenous dopaminergic neurotoxin, (R)-N-methylsalsolinol, to differentiated dopaminergic SH-SY5Y cells. *J.Neural.Transm*. 105: 397-405.

Miyajima H., Nishimura Y., Mizoguchi K., Sakamoto M., Shimizu T., Honda N. 1987. Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology*. 37: 761-767.

Miyajima H., Takahashi Y., Serizawa M., Kaneko E., Gitlin J.D. 1996 . Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. *Free Rad.Biol.Med.* 20(5): 757-760.

Miyajima H., Takahashi Y., Kamata T., Shimizu H., Sakai N., Gitlin J.D. 1997. Use of desferroxamine in the treatment of aceruloplasminemia. *Ann.Neurol.* 41: 404-407.

Miyajima H., Fujimoto M., Kohno S., Kaneko E., Gitlin J.D. 1998. CSF abnormalities in patients with aceruloplasminemia. *Neurology*.51(4): 1188-1190.

Mizuno Y., Matuda S., Yoshina H., Mori H., Hattori N. 1989. An immunohistochemical study on α -ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.* 35: 204-210.

Mocchegiani E., Giacconi R., Cipriano C., Muzzioli M., Fattoretti P., Bertoni-Freddari C., Isani G., Zambenedetti P., Zatta P. 2001. Zinc-bound metallothioneins as potential biological markers of ageing. *Brain Res. Bull.* 55 (2): 147-153.

Mochizuki H., Goto K., Mori H., Mizuno Y. 1996. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J.Neurol.Sci.* 137: 120-123.

Moffat M., Harmon S., Haycock J., O'Malley K.L. 1997. L-DOPA and dopamine-producing gene cassettes for gene therapy approaches to Parkinson's disease. *Exp.Neurol.*144: 69-73.

Monfort J.C., Javoy-Agid F., Hauw J.J., Dubois B, Javoy-Agid Y. 1985. Brain glutamate decarboxylase in Parkinson's disease with particular reference to a premortem severity index. *Brain*. 108: 301-313.

Monteiro H.P., Winterbourn C.C. 1989. 6-Hydroxydopamine releases iron from ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. *Biochem.Pharmacol*. 38: 4177-4182.

Moore K., Roberts. 1998. Measurement of lipid peroxidation. *Free Rad.Res*. 28: 659-671.

Morett E. and Bork P. 1999. A novel transaction domain in parkin. *Trends Biochem Sci*. 24 (6): 229-231.

Morita H., Ikeda S., Yamamoto K., Morita S., Yoshida K., Nomoto S., Kato M. 1995. Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann.Neurol*. 37(5): 646-656.

Murthy R.C., Lal S., Saxena D.K., Shukla G.S., Ali M.M., Chandra S.V. 1981. Effect of manganese and copper interaction on behavior and biogenic amines in rats fed a 10% casein diet. *Chem.Biol.Interact*.37 (3):299-308.

Mytilineou C., Werner P., Molinari S., Di Rocco A., Cohen G., Yahr M.D. 1994. Impaired oxidative decarboxylation of pyruvate in fibroblasts from patients with Parkinson's disease. *J.Neural Transm*.8: 223-228.

Nagatsu T., Levitt M., Underfriend S. 1964. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J.Biol.Chem*. 239: 2910-2917.

Nagatsu T., Hirata Y. 1987. Inhibition of the tyrosine hydroxylase system by MPTP, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) and the structurally related compounds *in vitro* and *in vivo*. *Eur.Neurol.* 26 Suppl.1: 11-15.

Napolitano A., Pezzella A., Prota G. 1999. New reaction pathways of dopamine under oxidative stress conditions: nonenzymatic iron-assisted conversion to norepinephrine and the neurotoxins 6-hydroxydopamine and 6,7-dihydroxytetrahydroisoquinoline. *Chem.Res.Toxicol.* 19: 1959-1964.

Naoi M., Dostert P., Yoshida M., Nagatsu T. 1993. N-methylated tetrahydroisoquinolines as dopaminergic neurotoxins. *Adv.Neurol.* 60: 212-217.

Naoi M., Maruyama W., Matsubara K., Hashizume Y. 1997. A neutral N-methyltransferase activity in the striatum determines the level of an endogenous MPP+-like neurotoxin, product 1,2(N)-dimethyl 6,7-dihydroxyquinolinium ion, in the substantia nigra of human brains. *Neurosci.Lett.* 235: 81-84.

Naoi M., Maruyama W., Zhang Le, Takahashi T., Deng Y., Dostert P. 1995. Enzymatic oxidation of the dopamine neurotoxin, 1(R), 2(N)-dimethyl 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into 1,2, (N)-dimethyl 6,7-dihydroxyquinolinium ion. *Life Sci.* 57: 1061-1066.

Nartey N.O., Banerjee D., Cherian M.G. 1987. Immunohistochemical localization of metallothionein in cell nucleus and cytoplasm of fetal human liver and kidney and its changes during development. *Pathology.*19: 233-238.

Norenberg W., Wirkner K., Illes P. 1997. Effect of adenosine and some of its structural analogues on the conductance of NMDA receptor channels in a subset of rat neostriatal neurones. *Br.J.Pharmacol.* 122:71-80.

O'Dell B.L. 1993. Roles of zinc and copper in the nervous system. *Prog.Clin.Biol.Res.* 380: 147-162.

Okahata S., Nishi Y., Hatano S., Kobayashi Y., Usui T. 1980. Changes in erythrocyte superoxide dismutase in a patient with copper deficiency. *Eur.J. Pediatr.*134: 121-124.

Olanow C.W. 1993. A rationale for monoamine oxidase inhibition as a protective therapy for Parkinson's Disease. *Mov.Disord.* 8: 81-87.

Olanow C.W.1992. Magnetic resonance imaging in parkinsonism. In: *Neurological Clinics*. Cederbaum J.M. and Gancher S.T., Eds.Saunders, Philadelphia. Part 2, Vol.10: 405-420.

Olanow C.W. 2002. Surgical therapy for Parkinson's Disease. *Eur.J.Neurol.* Nov.,9 Suppl.3: 31-39.

Olivares M., Uauy R. 1996. Copper as an essential nutrient. *Am.J.Clin.Nutr.* 63: 791S-796S.

Östenberg R., 1980. Physiology and pharmacology of copper. *Pharmac.Ther.* 9: 121-146.

Ota A., Yoshida S., Nagatsu T. 1996. Regulation on N-terminus-deleted human tyrosine hydroxylase tipe 1 by end-products of catecholamine biosynthetic pathway. *J.Neural.Transm.*103: 1415-1428.

Otero-Siliceo E. 1996. Parkinson: incidencia y prevalencia, Cap. II. En: *Parkinson: Enfoque al futuro*. Coordinador Enrique Otero-Siliceo: 16-24. Fondo de Cultura Económica, México D.F.

Palmiter R.D., Findley S.D., Whitmore T.E., Durnam D.M. 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein family. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 89: 6333-6337.

Parkinson J., 1817. An Essay on the shaking palsy. Londres, Sherwood Neely and Jones,. Reprinted in Crichtley M, Mc Menemey W.H., Walshe F.M.R., Greenfield J.G. (eds), James Parkinson (1755-1824). A Bicentenary volume of Papers Dealing with Parkinson's Disease. Londres, Macmillan, 1955.

Pascual J., Misiego M. 1997. Neuroquímica de la Enfermedad de Parkinson y parkinsonismos plus. *Rev.Neurol*. 25 (Supl 2): S141-S146.

Paulson H.L., Fishbeck. 1996. Trinucleotide repeats in neurogenetic disorders. Ann.Rev.Neurosci. 19:79-107.

Peistch M. C., Mannherz H.G., Tschoopp J.1994. The apoptosis endonucleases: Cleaning up after death? *Trends Cell Biol.*; 4: 37-41.

Perl D.P., Olanow C.W., Shintoh H., Hewitt K., Calne D.B. 1994. Manganese-induced neurotoxicity: Differentiation from Parkinson's Disease. *Neurology*. 44: A367.

Perry J.M., Zhao Y., Marletta M.A. 2000. Cu⁺² and Zn⁺² inhibit nitric oxide synthase through an interaction with the reductase domain. *J.Biol.Chem*. 275: 14070-14076.

Perry T.L., Godin D.V., Hansen S.1982. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci.Lett*. 33: 305-310.

Perry T.L., Yong VW, Clavier RM, Jones K, Wright JM, Foulks JG, WallRA. 1985. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-Metil-4-Penyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neurosci.Lett*. 60: 109-114

Pettersen, J.C., Cohen, S.D. 1985. Antagonisms of cyanide poisoning by chlorpromazine and sodium thiosulfate. *Toxicol. & Appl. Pharmacol.* 81: 265-273.

Pezzoli G., Canesi M., Antonini A., Righini A., Perbellini L., Barichella M., Mariani C.B., Tenconi F., Tesei S., Zecchinelli A., Leenders K.L. 2000. Hydrocarbon exposure and Parkinson's disease. *Neurology.* 55(5): 667-673.

Pitkanen S., Robinson B.H. 1996. Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 98(2):345-351.

Pollack A.E. 2001. Anatomy, physiology and pharmacology of the basal ganglia. Basal Ganglia. Mosby Inc. Boston, Massachusetts. 2125-3393.

Pong K., Doctrow S.R., Baudry M. 2000. Prevention of 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced nitration of tyrosine hydroxylase and neurotoxicity by EUK-134, a superoxide dismutase and catalase mimetic in cultured dopaminergic neurons. *Brain Res.* 881(2): 182-189.

Poppoli P., Reggio R., Pézzola A., Fuxe K., Ferré. 1998. Adenosine A₁ and A_{2A} receptor agonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. *Neurosci. Lett.* 251: 201-204.

Portmann R., Sarlioz M. 2005. Purification and functional reconstitution of the human Wilson copper ATPase, ATP7B. *FEBS Lett.* 579(17): 3589-3595.

Priyadarshi A., Khunder S.A., Schaub E.A., Priyadarshi S.S. 2001. Environmental risk factors and Parkinson's Disease: A metaanalysis. *Environ. Res.* 86(2): 122-127.

Prohaska J.R., Wells W.W. 1974. Copper deficiency in the developing rat brain: a possible model for Menkes' steely-hair disease. *J. Neurochem.* 23: 91-98.

Prohaska J.R., Bailey W.R. 1994. Regional specificity in alterations of rat brain copper and catecholamines following perinatal copper deficiency. *J. Neurochem.* 63: 1551-1557.

Przedborski, S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Naini, A.B., Simonetti, S., Cadet, J.L. 1992. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 1658-1667.

Przedborski, S., Jackson-Lewis V., Yokoyama R., Shibata T., Dawson V.L., Dawson T.M. 1996. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4565-4571.
Przedborski S., Jackson-Lewis V. 1998. Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov. Des.* 13(1): 35-38.

Ramsay R.R., Singer T.P. 1992. Relation of superoxide generation and lipid peroxidation to the inhibition of NADH-Q oxidoreductase by rotenone, piericidin A, and MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189(1): 47-52.

Rathke-Hartlieb S., Kahle P.J., Neumann M., Ozmen L., Haid S., Okochi M., Haas C., Schulz J.B. 2001. Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice. *J. Neurochem.* 77 (4): 1181-1184.

Reichmann H., Riederer P. 1994. Mitochondrial disturbances in neurodegeneration. In *Neurodegenerative diseases.* Calne D.B., Ed. Saunders, Philadelphia: 195-204.

Reisine T.D., Fields J.Z., Yamamura H.I., Bird E., Spokes E., Schreiner P., Enna S.J. 1977. Neurotransmitter receptor alterations in Parkinson's disease. *Life Sci.* 21: 335-344.

Richardson J.S. Free radicals in the genesis of Alzheimer's Disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 695: 73-76. 1993.

Riederer, P., Youdim, M.B.H.1986.Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with L-deprenyl. *J.Neurochem.* 46: 1359-1365.

Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W.-D., Schmidt, B., Reynolds, G.P., Jellinger, K., Youdim, M.B.H.1989. Transition metals, ferritin, glutathione , and ascorbic acid in parkinsonian brains, *J. Neurochem.* 52: 515-520.

Riffée W.H., Wilcox R.E. 1985. Effects of multiple pretreatment with apomorphine and amphetamine on amphetamine-induced locomotor activity and its inhibition by apomorphine. *Psychopharmacology.* 85: 97-101.

Ríos, C., Alvarez-Vega, R., Rojas, P. 1995. Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice, *Pharmacol. Toxicol.* 76: 348-352.

Robbins J.H., Otsuka F., Tarone R.E.1985. Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Hypersensitivity to X-rays in culture cells lines. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.*48: 916-923.

Rojas, P. and Ríos, C. 1993. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP+ administration to mice, *Pharmacol. Toxicol.* 72: 364-368.

Rojas, P. and Ríos, C. 1995. Short-term manganese pretreatment partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Neurochem.Res.* 20(10): 1217-1223.

Rojas, P., Alvarez-Vega, R. and Ríos, C. 1996. Copper supplementation blocks 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in mice, *Soc. Neurosci. Abstr.* 22: 222.

Rojas, P. and Ríos, C. 1997. Metallothionein inducers protect against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice, *Neurochem. Res.* 22: 17-22.

Rose S., Hindmarsh J.G., Jenner P. 1999. Neuronal nitric oxide synthase inhibition reduces MPP+-evoked hydroxyl radical formation but not dopamine efflux in rat striatum. *J.Neural.Transm.*106:477-486.

Rosenberg D., Ilic Z., Yin L., Sell S. 2000. Proliferation of hepatic lineage of normal C57Black and IL-6 knock out mice after cocaine-induced periportal injury. *Hepatology.*31(4): 948-955.

Rossor M.N., Hunt S.P., Iversen L.L., Bannister R., Hawthorn J., Ang V.T.Y., Jenkins J.S. 1982. Extrahypothalamic vasopressin is unchanged in Parkinson's disease and Huntington's disease. *Brain Res.* 253: 341-343.

Ruberg M., Ploska A., Javoy-Agid F., Agid Y.1982.Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res.*253: 341-343.

Saggu H., Cooksey J., Dexter D., Wells FR, Lees A., Jenner P., Marsden CD. 1989. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in Parkinsonism Substantia Nigra. *J.Neurochem.* 53: 692-697.

Sanchez-Ramos J.R., Over vik E., Ames B.N.1994. A marker of oxyradical-mediated DNA damage ((-hydroxy-2-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum in Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration*. 3: 197-204.

Sano H., Hirai M., Saito H., Nakashima I., Isobe K.I. 1997. A nitric oxide-releasing reagent, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, enhances the expression of superoxide dismutases mRNA in the murine macrophage cell line RAW264-7. *Immunology*. 92(1): 118-122.

Sato M., Bremner I. 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad.Biol.Med.* 14: 325-337.

Sato M., Gitlin J.D. 1991. Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J.Biol.Chem.*266: 5128-5134.

Satoh M., Naganuma A., Imura N. 1988. Involvement of cardiac metallothionein on paraquat toxicity. *Arch.Toxicol.*66: 145-148.

Sawada H., Shimohama S. 2000. Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 24(1): 143-147.

Scatton B., Javoy-Agid F., Rouquier L., Dubois B, Agid Y. 1983. Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.*275: 321-328.

Scatton B., Javoy-Agid F., Montfort J.C., Agid Y. 1984. Neurochemistry of monoaminergic neurons in Parkinson's disease. In: Catecholamines: Neuropharmacology and Central Nervous System-Therapeutic Aspects. Ed E.Usdin, A. Carlsson, A. Dahlström, J. Engel. A. ; Liss, New York: 43-52.

Schapira A.H.V., Cooper J.M., Dexter D., Jenner P., Clark J.B., Marsden C.D. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's Disease. *Lancet*.1 (8649): 1269.

Schapira A.H.V., Mann V.M., Cooper J.M., Dexter D., Daniel S.E., Jenner P., Clark J.B., Marsden C.D. 1990. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J.Neurochem*. 55(6): 2142-2145.

Scheinberg I.H., Sternlieb I., Schilsky M. 1987. Penicillamine may detoxify copper in Wilson's disease. *Lancet*. 11: 95.

Scherman D., Desnos C., Darchen F., Pollack P., Javoy-Agid F. and Agid Y. 1989. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's Disease: Role of aging. *Ann.Neurol*. 26: 551-557.

Schiffmann S.N., Libert F., Vassart G., Vanderhaeghen J-J. 1989. Distribution of adenosine A2 receptor mRNA in the human brain. *Neurosci.Lett*. 130:177-181.

Schipper H.M., Vininsky R., Brull R., Small L., Brawer J.R. 1998. Astrocyte mitochondria: A substrate for iron deposition in the aging rat substantia nigra. *Exp.Neurol*. 152: 188-196.

Schluter O.M., Fornai F., Alessandri M.G., Takamori S., Geppert M., Jahn R., Sudhof T.C. 2003. Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuroscience*. 118 (4): 985-1002.

Schulzer M., Lee C.S. Mak E.K., Vingerhoets F.J.G. and Calne D.B. 1994. A mathematical model of pathogenesis in idiopathic parkinsonism. *Brain*. 117: 509-516.

Schwartz P.J., Reaume A., Scott R., Coyle J.T. 1998. Effects of over- and under expression of Cu, Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brain Res.* 789: 32-39.

Schwartz P.J., Coyle J.T. 1998. Effects of overexpression of the cytoplasmic copper-zinc superoxide dismutase on the survival of neurons in vitro. *Synapse.* 29(3): 206-212.

Scott W.K., Yamaoka L.H., Stajich J.M., Scott B.L., Vance J.M., Roses A.D., Pericak-Vance M.A., Watts R.L., Nance M., Hubble J., Koller W., Stern M.B., Colcher A., Allen F.H. Jr., Hiner B.C., Jankovic J., Ondo W., Laing N.G., Mastaglia F., Goetz C., Pappert E., Small G.w., Masterman D., Haines J.L., Davies T.L. 1999. The alpha-synuclein gene is not a major risk factor in familial Parkinson's disease. *Neurogenetics.*2(3): 191-192.

Seaton T.A., Cooper J.M., Schapira A.H.V. 1997. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res.* 777: 110-118.

Semchuk, K.M., Love, E.J. and Lee, R.G.1993. Parkinson's disease : A test of the multifactorial etiologic hypothesis, *Neurology* 43: 1173-1180.

Sengtock G., Olanow C.W., Dunn A.j., Arendash G.W. 1992. Iron induces degeneration of Nigrostriatal neurons. *Brain Res.Bull.* 28: 645-649.

Shimizu N., Yamaguchi Y., Aoki T. 1999. Treatment and management of Wilson's disease. *Pediatr.Int.*41(4): 419-422.

Shimura H., Schlossmacher M.G., Hattori N., Frosch M.P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K.S., Selkoe D.J. 2001.Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's Disease. *Science.* 293: 263-269.

Shiozaki S., Ichikawa S., Nakamura J., Yamada K., Kuwana Y. 1999. Actions of adenosine A_{2A} receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. *Psychopharmacology*.147(1): 90-95.

Shoham S., Youdim M.B. 2000. Iron involvement in neural damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cel Mol. Biol.* 46(4): 743-760.

Shoffner J.M., Brown M.D., Torroni A., Lott M.T., Cabell M.F., Mirra S.S., Beal M.F., Yang C.C., Gearing M., Salvo R. 1993. Mitochondrial DNA mutations associated with Alzheimer's and Parkinson's disease. *Genomics*.17: 171-184.

Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S., Agid Y., Javoy-Agid F., Jenner P., Mraden C.D. 1994. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann.Neurol.* 36: 348-355.

Sian J., Youdim M.B.H., Riederer P., Gerlach M. 1999. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. Cap.45. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. 6th edición. Ed. Siegel G.J. et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W., Fisher S.K. and Uhler M.D. 1999. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. Sixth Edition. *Lippincott-Raven*. Part 6, Chapter 45: 917-947.

Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur.J.Biochem*.215: 213.

Simonian, N.A. and Coyle, J.T.1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36: 83-106.

Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckmann, H., Reynolds, G.P., Hebenstreit, G., Youdim, M.B.H. 1988. Increased Iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain, *J. Neural. Transm.* 74: 199-205.

Sokol R.J., Deveraux M.W., O'Brien K., Rhashimi A.K., Loehr J.P. 1993. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome c oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology*. 105: 178-187.

Sommer B., Barbieri S., Hofele K., Wiederhold K., Probst A., Mistl C., Danner S., Kauffmann S., Spooren W., Tolnay M., Bilbe G., van der Putten H., Kaufmann S., Caromi P., Rugg M.A. 2000. Mouse models of alpha-synucleinopathy and Lewy pathology. *Exp. Gerontol.* 35 (9-10): 1389-403.

Sonsalla P.K., et al. 1989. Role of excitatory aminoacids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science*. 243 (4889): 398-400.

Sonsalla P.K., Zeevalk G.D., Manzino L., Giovanni A., Nicklas W.J. 1992. MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenyl-pyridinium in rats. *J. Neurochem.* 58 (5): 1979-1982.

Sorenson, J.R.J., Soderberg, L.S.F. and Chang, L.W. 1995. Radiation protection and radiation recovery with essential metalloelement chelates, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210: 191-204.

Spillantini M.G., Crowther R.A., Ross J., Hasegawa M., Goedert M. 1998. α -synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *PNAS*. 95: 6469-6473.

St.Clair D.K., Porntadavity S., Xu Y., Kiningham K. Transcription regulation of human manganese superoxide dismutase gene. *Methods Enzymol.* 2002; 349: 306-312.

Sternlieb I. 1990. Perspectives on Wilson's disease. *Hepatology.*12: 1234-1239.

Studler J.M., Javoy-Agid F., Cesselin F., Legrand J.C., Agid Y. 1982. CCK-8 immunoreactivity distribution in human brain: selective decrease in the substantia nigra from parkinsonian patients. *Brain Res.* 243: 176-179.

Stuerenburg H.J., Eggers C. 2000. Early detection of non-compliance in Wilson's disease by consecutive copper determination in cerebrospinal fluid. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.* 69(5): 701-702.

Sugita M., Izuno T., Tatemichi M., Otahara Y. 2001. Metaanalysis for epidemiologic studies on the relationship between smoking and Parkinson's disease. *J.Epidemiol.*11(2): 87-94.

Susel Z., Engber T.M., Chase T.N. 1989. Behavioral evaluation of the anti-excitotoxic properties of MK-801: comparison with neurochemical measurements. *Neurosci.Lett.* 104:125-129.

Sutherland C., Alterio J., Campbell D.G., Le-Bourdelles B., Mallet J., Haavik J., Cohen P. 1993. Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. *Eur.J.Biochem.*217: 715-722.

Suttle N.F. 1989. The nutritional requirements for copper in animals and man. In *Copper in animals and man*. Eds.HowellJ.M., Gawthorne J.M. Boca Raton, FL:CRC Press: 22-38.

Taquet H., Javoy-Agid F, Hamon M., Legrand J.C., Javoy-Agid Y. 1983. Parkinson's disease affects differently Met5- and Leu5-enkephalin in the human brain. *Brain Res.*280: 379-382.

Takahashi N., Ortel T.L., Putnam F.W. 1984. Single chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 81: 390-394.

Takahashi Y., Miyajima H., Shirabe S., Nagataki S., Suenaga A., Gitlin J.D. 1996. Characterization of a nonsense mutation in the ceruloplasmin gene resulting in diabetes and neurodegenerative disease. *Hum.Mol.Genet.* 5(1): 81-84.

Thiruchelvam M., Brockel B.J., Richfield E.K., Baggs R.B., Cory-Slechta D.A. 2000. Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease? *Brain Res.* 873(2): 225-234.

Thomas D.G., Linton H.J., Garvey J.S. 1986. Fluorometric ELISA for the detection and quantitation of metallothionein. *J.Immunol.Methods.* 89: 239-247.

Thomas T., Schreiber G. 1989. The expression of genes coding for positive acute-phase proteins in the reproductive tract of the female rat. High levels of ceruloplasmin mRNA in the uterus. *FEBS Lett.*243: 381-384.

Thornalley P.J., Vasak M. 1985. Possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim.Biophys.Acta.* 827: 36-44.

Tipton K.F., Singer T.P. 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J.Neurochem.* 61(4): 1191-1206.

Topham R.W., Frieden E. 1970. Identification and purification of a non-ceruloplasmin ferroxidase of human serum. *J.Biol.Chem.* 245k: 6698-6705.

Torreilles F., Salman'Tabcheh S., Guérin M-C.,Torreilles J. 1999. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain.Res.Rev.* 30:153-163.

Torsdottir G, Kristinsson J, Sveinbjornsdottir S, Snaedal J, Johannesson T. 1999 Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease.. *Pharmacol Toxicol.* 85(5):239-243

Treseder S.A., Smith L.A., Jenner P. 2000. Endogenous dopaminergic tone and dopamine agonist action. *Mov.Disord.*15(5): 804-812.

Tumer N., Brown J.W., Carballeira A., Fishman L.M. 1996. Tyrosine hydroxylase gene expression in varying forms of human pheochromocytoma. *Life Sci.*59: 1659-1665.

Turmel H., Hartmann A., Parain K., Douhou A., Srinivasan A., Agid Y., Hirsch E.C. 2001. Caspase-3 activationb in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice. *Mov.Disord.* 16 (2): 185-189.

Uauy R., Castillo-Durán C., Fisberg M., Fernández N., Valenzuela A. 1985. Red cell superoxide dismutase activity as an index of human copper nutrition. *J.Nutr.*115: 1650-1655.

Uitti R.J., Rajput A.H., Rozdilsky B., Bickis M., Wollin T., Yuen W.K. 1989. Regional metal concentrations in Parkinson's disease, other chronic neurological diseases, and control brains. *Can.J.Neurol.Sci.* 16: 310-314.

Van der Putten H., Wiederhold K., Probst A., Barbieri S., Misti C., Danner S., Kauffmann S., Hofele K., Spooren W., Ruegg M.A., Lin S., Sommer B., Tolnay M.,

Bilbe G. 2000. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J.Neurosci.* 15; 20(16):6021-9.

Velluci S.V., Sirinathsinghji D.J.S., Richardson P.J. 1993. Adenosine A2 receptor regulation of apomorphine-induced turning in rats with unilateral striatal dopamine denervation. *Psychopharmacology.* 111:383-388.

Vila M., Vukosavic S., Jackson-Lewis V., Neystat M., Jakowec M., Przedborski S. 2000. *J. Neurochem.* 74(2): 721-729.

Visner G.A., Dougall W.C., Wilson J.M., Burr I.A., Nick H.S. 1990. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response. *J.Biol.Chem.* 265: 2856-2864.

Vulpe C., Levinson B., Whitney S., Packman S., Gitschier J. 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper transporting ATPase. *Nat.Genet.* 3: 7-13.

Walkinshaw G., Waters C.M. 1995. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J.Clin.Invest.* 95: 2458-2464.

Wullner U., Loschmann P.A., Schulz J.B., Schmid A., Dringen R., Eblen F., Turski L., Klockgether T. 1996. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP+ toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport.* 7(4): 921-923.

Yang F., Friedrichs W.E., Cupples R.L., Bonifacio M.J., Sanford J.A., Horton W.A., Bowman B.H. 1989. Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *J.Biol.Chem.* 265: 10780-10785.

Yonekawa M., Okabe T., Asamoto Y., Ohta M. 1999. A case of hereditary ceruloplasmin deficiency with iron deposition in the brain associated with chorea, dementia, diabetes mellitus and retinal pigmentation: administration of fresh-frozen human plasma. *Eur.Neurol.* 42(3): 157-162.

Youdim M.B.H., Ben-Sachar D., Yehuda S., Riederer P. 1990. The role of iron in the basal ganglion. *Adv.Neurol.* 53: 155-162.

Youdim M.B.H., Lavie L. 1994. Selective MAO-A and MAO-B inhibitors, radical scavengers and nitric oxide synthase inhibitors in Parkinson's disease. *Life Sci.* 55 (25/26): 2077-2082.

Zhang Y., Gao J., Chung K.K.K., Huang H., Dawson V.L., Dawson T.M. 2000. Parkin functions as an E2-ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the vesicle-associated protein, Cd-Crel-1. *PNAS.* 97(24): 1354-1359.

Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease

Marie-Catherine Boll^a, Julio Sotelo^b, Enrique Otero^b, Mireya Alcaraz-Zubeldia^c, Camilo Rios^{c,*}

^aDepartment of Neurology, National Institute of Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suarez', Mexico, Mexico

^bDepartment of Neuroimmunology, National Institute of Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suarez', Mexico, Mexico

^cDepartment of Neurochemistry, National Institute of Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suarez', Mexico, Mexico

Received 28 December 1998; received in revised form 25 February 1999; accepted 25 February 1999

Abstract

Recent evidence suggest the implication of transition metals leading to overproduction of free radicals as a possible causal factor in the death of nigral cells associated to Parkinson's disease (PD). Iron depots in the basal ganglia of PD patients have been described; in addition, contents of nigral copper have been found decreased, while its concentration in cerebrospinal fluid (CSF) is raised, particularly the free form of the metal. To search for a possible link between altered copper concentrations and PD, we advanced the hypothesis that ferroxidase activity of ceruloplasmin is decreased in the CSF of PD patients. We studied 35 untreated PD patients, 14 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-treated PD patients and 26 controls. Both CSF ferroxidase activity and CSF copper content were measured and correlated with the clinical stage of the disease. We found that untreated PD patients had a significant reduction of 40% in CSF ferroxidase while CSF copper was slightly increased as compared with both the values in L-DOPA-treated PD patients and controls. We also found that the fraction of copper linked to ferroxidase in untreated PD is inversely related to the clinical stage of the disease. © 1999 Published by Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ferroxidase activity; Cerebrospinal fluid; Ceruloplasmin; Parkinson's disease; Iron; Copper

Oxidative stress seems to play an important role in nigrostriatal cell death associated to Parkinson's disease (PD), as it has been shown both in the experimental models of the illness [18] and in human Parkinson's cases [4]. For instance, glutathione (an antioxidant defense against free radicals) is diminished in the substantia nigra of PD patients [10], while iron, a transition metal involved in the initiation of free radicals via the Fenton reaction, is increased in PD basal ganglia [4,6,10,14]. Copper ions can similarly react to produce hydroxyl radicals. It has been reported that nigral concentrations of copper are reduced in the brain of PD patients [4], while free (low-molecular-weight) copper has been found raised in cerebrospinal fluid (CSF) [15]. In the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) model of PD, copper concentrations in basal ganglia are decreased [17]. Paradoxically, copper is essential for antioxidant functions bound to proteins such as ceruloplasmin (CP), superoxide dismutase and metallothioneins, however, it acts as a

pro-oxidant in its free, ionized form. All reports relating copper with PD are in agreement with a reduced ability of the brain cuproproteins to retain the metal and would explain the release of copper into the extra-cellular space in its free form.

The main copper protein in blood, CP, is expressed in the central nervous system [16] and seems to be involved in the control of oxidative stress [8]. The hereditary deficiency of this protein in aceruloplasminemia [7] is associated to both basal ganglia degeneration and iron brain accumulation [12,13]. This late consequence is probably a result of the decreased ferroxidase activity of CP, that transforms Fe(II) into Fe(III), facilitating mobilization of the ferric form by transferrin.

The aim of this study was to seek alterations in the homeostasis of copper ion in PD patients by measuring ferroxidase activity directly related to copper bound to CP, and total copper concentrations in the same CSF sample.

New cases of untreated PD, admitted during a period of 18 months to the Movement Disorders Clinic of our Institute, were asked to participate in this study ($n = 35$). An

* Corresponding author. Fax: + 52-5-606-2282.

E-mail address: camilorc@fournier.facmed.unam.mx (C. Rios)

Table 1
Clinical variables^a

Variables	Controls (n = 26)	Untreated PD (n = 35)	L-DOPA treated PD (n = 14)	P-value
Age	58.7 (2.37)	62.8 (1.6)	67.6 (2.27)	NS
Male	46%	71%	50%	NS
Rural	24%	67% ^b	30%	0.0027
Evolution time		4.7 years (0.66)	6.64 (1.1)	NS
Hoehn and Yahr stage		2.11	2.29	NS
UPDRS daily activity		17.83 (1.37)	19.5 (1.9) ^c	NS
UPDRS motor scale		29.02 (1.62)	29.21 (2.61) ^c	NS

^a Results are expressed as means, standard error of the mean (SEM), proportions and statistical significance of the difference between the three groups. PD, Parkinson's disease; UPDRS, Unified Parkinson's disease rating scale; NS, non-significant.

^b Different from controls and L-DOPA treated patients; χ^2 test.

^c Before L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) intake.

additional group of 14 PD patients treated with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (>6 months with >400 mg, daily) at the moment of admission, was selected at random to search for possible changes of copper status as a consequence of chronic medication. The control group consisted of 26 ambulatory patients with no neurodegenerative disease known (for instance from the ophthalmologic clinic, or from myelography for radicular syndrome). The same inclusion criteria was applied to each group: age between 39 and 79 years, written informed consent before undergoing the study, computed tomography or magnetic resonance images without evident cerebral lesion, total proteins and cells in the CSF within the normal range, and the subjects were not receiving any antioxidant, antimetabolic or

immunosuppressant treatment. General and neurologic examination of each patient were carried out in addition to comprehensive laboratory studies. All patients with PD were scored with the Hoehn and Yahr scale and the Unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS) [5,9].

CSF samples were separated into two aliquots: 2 ml for cytochemical analysis, and 2 ml were collected in plastic tubes previously washed with nitric acid solution to avoid external contamination with metals, to measure total copper and ferroxidase activity. The aliquots were stored frozen until assayed. Total CSF copper concentrations were measured using a Perkin-Elmer 3110 atomic absorption spectrophotometer with an HGA-500 graphite furnace and AS-60 auto-sampler, applying optimized conditions for copper analysis [17]. The ferroxidase activity of CP was measured as described by Arnaud [1] and Tanabe [20]. In brief: CSF aliquots of 100 μ l were mixed with 200 μ l of acetate buffer (0.3 M, pH 6). After incubation at 30°C for 5 min, 100 μ l of freshly prepared 0.01 M ammonium ferrous sulfate solution were added. Samples were then incubated for 5 more min at the same temperature. The reaction mixture was stopped by addition of 200 μ l of 1.25 M perchloric acid. Samples were centrifuged for 3 min at 10 000 \times g. Ferric iron produced by ferroxidase activity was determined by adding the same volume of 0.5 M ammonium thiocyanate solution to the incubation mixture. The red thiocyanate-Fe(III) complex was monitored at 450 nm in a Beckman DU-spectrophotometer. With this technique, a coefficient of variation lower than 7% was obtained for between-days assay of CSF samples. To test the reliability of ferroxidase activity assay, 10 samples of serum taken from normal donors, were also assayed as described and values ranged (0.24–0.37 μ mol Fe (III)/min per ml); results similar to those described by Tanabe et al. [20].

As ferroxidase activity data were not symmetrically distributed, we used non-parametric tests (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, χ^2 tests and Spearman correlation) to compare groups and find correlations. For all other measurements, parametric analyses were made.

We studied 35 new cases of untreated PD and 14 PD patients under L-DOPA treatment. Mean age and gender

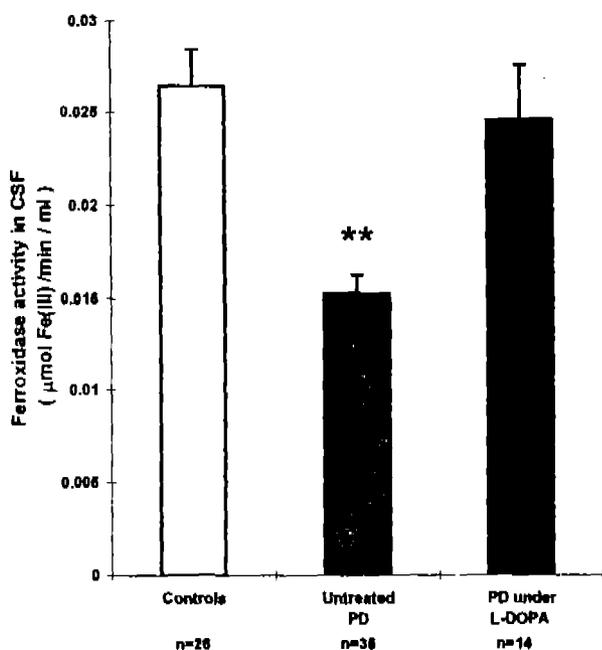


Fig. 1. Ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients and controls. **Different from controls and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-treated PD patients, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney test to compare with controls.

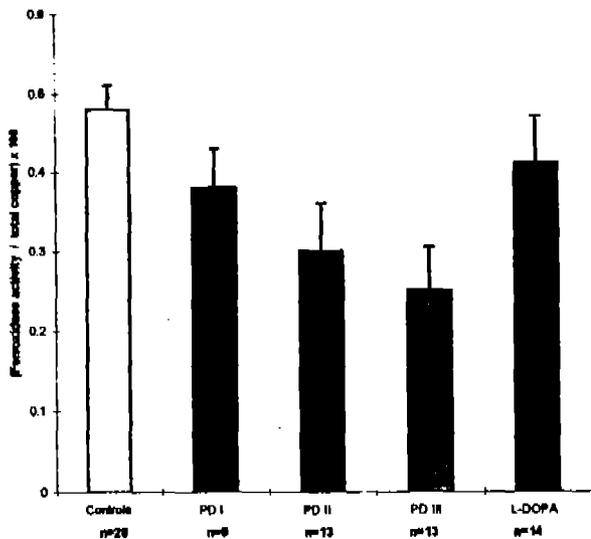


Fig. 2. Ratio of Ferroxidase activity/total copper in cerebrospinal fluid (CSF). Results are means plus one standard error of the mean (SEM) in controls, untreated PD subjects with Hoehn and Yahr stage I (PD I), stage II (PD II) and stage III (PD III) [9] and those treated with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Units of ferroxidase activity: $\mu\text{mol Fe (III)}/\text{min per ml}$. Units of total copper: $\mu\text{g}/\text{l}$. The ratio was correlated with the clinical stages 0, I, II, III in untreated patients, $P = 0.027$, Spearman $\rho = -0.25$.

frequency were not significantly different among groups, but the proportion of rural subjects versus urban inhabitants was significantly higher in the untreated PD group than in the other groups studied (Table 1). The evolution time of the disease in the untreated and treated PD groups was not significantly different, and so was the number of patients in each stage of the Hoehn and Yahr scale, and the mean value of the motor scale of the UPDRS [5] before treatment among groups of PD patients. In our hands, CSF ferroxidase activity in controls was 11.6 times lower on average than serum activity. It was significantly lower in the group of untreated PD subjects as compared to both the L-DOPA treated PD and the controls (Fig. 1). As no differences in CSF ferroxidase activity were found between Hoehn and Yahr values I, II and III, data in PD patients were pooled in a single bar in Fig. 1. L-DOPA treated patients did not show any difference with control's CSF ferroxidase activity.

Total copper in CSF showed a mean of $4.65 \mu\text{g}/\text{l}$ (± 2.77 SD) in controls, while 5.04 ± 3.89 in the untreated group and 4.21 ± 3.12 in the L-DOPA group, showing no statistically significant difference between groups. However, the ratio of ferroxidase activity/total copper was found to be significantly correlated ($P = 0.027$, Spearman's coefficient $\rho = -0.248$) with the clinical stage of the disease, in the group of untreated PD patients (Fig. 2).

In conclusion, the enzymatic activity (ferroxidase activity) of ceruloplasmin was significantly reduced in untreated PD and this might be related to the raised iron depots observed in basal ganglia of Parkinson subjects. Both total copper and ionic free copper have been reported elevated in

CSF of untreated PD patients by Pall et al. [15] and this could be explained by a decreased ability of cuproproteins to bind the metal. In our study, total CSF Cu concentrations were only slightly increased in the untreated PD, while ferroxidase/Cu ratio was significantly correlated with the progression of the disease, suggesting an increased concentration of copper unbound to ceruloplasmin in the CSF of untreated PD subjects. In the presence of L-DOPA, copper ions can form complexes with the catecholamine that accelerate the intake of the metal by the cells [2,3]. This might explain the restoration of the normal values of ceruloplasmin activity in PD patients treated with this drug, as the protein is synthesized intracellularly by the brain [16], so is the maintenance of the oxidative process associated with the degradation of catecholamines [19]. As CSF ferroxidase activity was found decreased in untreated PD patients at the initial stage of the disease (Hoehn and Yahr stage I) [9], we can conceive that this decrease is preexistent to the symptomatology appearance, thus, our data suggest that diminished ferroxidase activity could be related to the development of PD. Loeffler et al. [11] reported increased ceruloplasmin concentrations in PD brain regions post-mortem. This increase may be a consequence of the medication of subjects, as many of them were under L-DOPA treatment.

- [1] Arnaud, Ph., Gianazza, E. and Miribel, L., Study of acute-phase reactants. *Methods Enzymol.*, 163 (1988) 441–448.
- [2] Bonnet, J.J., Benmansour, S., Amejdki-Chab, N. and Costentin, J., Effect of $\text{CH}_3\text{-HgCl}$ and several transition metals on the dopamine neuronal carrier. *Eur. J. Pharmacol.*, 266 (1994) 87–97.
- [3] Crowe, A. and 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.*, 126 (1996) 183–194.
- [4] Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P. and Marsden, C.D., Alterations in the levels of iron, ferritin, and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*, 114 (1991) 1953–1975.
- [5] Fahn, S. and members of the UPDRS Development Committee, Unified Parkinson's Disease Rating Scale. *Recent Developments in Parkinson's Disease*, Vol. II, McMillan, NJ, 1987, pp. 153–163.
- [6] Gerlach, M., Ben Shachar, D., Riederer, P. and Youdim, B.H., Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.*, 63 (1994) 793–807.
- [7] Harris, Z.L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., McGillivray, R.T.A. and Gitlin, J.D., Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 2539–2543.
- [8] Hartmann, H.A. and Everson, M.A., Deficiency of copper can cause neuronal degeneration. *Med. Hypoth.*, 38 (1992) 75–85.
- [9] Hoehn, M.M. and Yahr, M.D., Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17 (1967) 422–427.
- [10] Jenner, P., Schapira, A.H. and Marsden, D., New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*, 42 (1992) 2241–2250.
- [11] Loeffler, D.A., LeWitt, P.A., Jumeau, P.L., Sima, A.A.F.,

- Nguyen, H.U., DeMaggio, A.J., Brickman, C.M., Brewer, G.J., Dick, R.D., Troyer, M.D. and Kanaley, L., Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res.*, 738 (1996) 266-274.
- [12] Miyajima, H., Takahashi, Y., Serizawa, M., Kaneko, E. and Gitlin, J.D., Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. *Free Rad. Biol. Med.*, 20 (1996) 757-760.
- [13] Morita, H., Ikeda, S., Yamamoto, K., Morita, S., Yoshida, K., Nomoto, S., Kato, M. and Yanagisawa, N., Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann. Neurol.*, 37 (1995) 646-656.
- [14] Olanow, C.W. and Drayer, B., Magnetic resonance imaging studies of iron distribution in Parkinson's disease and aging. *Arch. Neurol.*, 45 (1988) 809.
- [15] Pall, H.S., Blake, D.R., Gutteridge, J.R., Williams, A.C., Lunec, J. and Taylor, A., Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in Parkinson's disease. *Lancet*, 2 (1987) 238-241.
- [16] Patel, B.N. and Davis, S., A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 20185-20190.
- [17] Rios, C., Alvarez-Vega, R. and Rojas, P., Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 78 (1995) 348-352.
- [18] Rojas, P. and Rios, C., Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP+ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 72 (1993) 364-368.
- [19] Sotomatsu, A., Nakano, M. and Hirai, S., Phospholipid peroxidation induced by the catechol-Fe³⁺ (Cu²⁺) complex: a possible mechanism of nigrostriatal cell damage. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283 (1990) 334-341.
- [20] Tanabe, S., Shiori, T., Murakami, K. and Imanari, T., A new method for assay of ferroxidase activity and its application to human and rabbit sera. *Chem. Pharm. Bull.*, 32 (1984) 4029-4035.

Neuroprotective Effect of Acute and Chronic Administration of Copper (II) Sulfate against MPP⁺ Neurotoxicity in Mice

Mireya Alcaraz-Zubeldia,¹ Patricia Rojas,² Catherine Boll,¹ and Camilo Ríos^{1,3}

(Accepted October 24, 2000)

Neurodegenerative effects of MPP⁺, the main metabolite of MPTP include dopamine (DA) depletion and enhanced lipid peroxidation (LPO) in mice striata, both associated to free radicals overproduction. Since copper is related to several antioxidant enzymes, we tested its neuroprotective effect against MPP⁺-induced neurotoxicity (20 µg/3 µl). CuSO₄ pretreatment was administered by either acute (2.5 mg/kg, i.p) or chronic (350 or 700 mg/l doses through drinking water, for 30 days) schemes. Acute administration blocked MPP⁺-induced striatal LPO only when administered 16 or 24 hours before MPP⁺, and prevented the DA-depleting effect only at 24 hours. Chronic CuSO₄ prevented the LPO increase, and blocked the DA depletion only at the higher dose used (700 mg/l). Neuroprotective effect of CuSO₄ was dependent on the dose and the time of pretreatment, which suggest that this lag could be related with mechanisms of activation or synthesis of copper-dependent proteins responsible of cellular defense against MPP⁺.

KEY WORDS: Copper; MPP⁺; free radicals; dopamine; Parkinson's Disease; lipid peroxidation.

INTRODUCTION

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) administration to mice and non-human primates is the most widely used model of Parkinson's disease (PD) consequences, as it produces effects resembling the neurochemical and neuropathological features of the disease (1). It has been established that toxic effects of MPTP are produced by its final active metabolite, the 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). These MPP⁺-induced effects include striatal biochem-

ical alterations, such as increased lipid peroxidation (LPO), a process related to the reactive oxygen species overproduction, and dopamine (DA) depletion, associated with the loss of dopaminergic neurons accompanying the neuronal death (2). A depletion of striatal copper content has also been reported after MPTP administration to mice (3). Copper acts as the prosthetic group of several neuroprotective proteins such as the copper/zinc-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) and ceruloplasmin (Cp) enzymes, which depend on copper availability to be functional and to have an optimal activity (4). Other copper-dependent enzymes could also be affected by copper deficiency (5). In regard with copper and MPTP neurotoxicity, it has been reported that animals administered with the copper chelating agent diethyldithiocarbamate (DDC) are more susceptible to the oxidative damage and neuronal death caused by MPTP (6). For this reason, lacking of copper could lead to a disadvantage for neurons in their defense against oxidative stress (7).

¹ Department of Neurochemistry.

² Laboratory of Neurotoxicology, National Institute of Neurology & Neurosurgery, "Manuel Velasco Suárez" Ave. Insurgentes Sur, No. 3877, Mexico City 14269, D.F., México.

³ Address reprint requests to: Camilo Ríos, Department of Neurochemistry, National Institute of Neurology & Neurosurgery, Ave. Insurgentes Sur No. 3877, México City 14269, D.F., México. Tel: (525) 606-40-40; Fax: (525) 528-00-95; E-mail: camilorc@intersky.com

According to reports in the literature, transgenic mice that over-express the Cu-Zn superoxide dismutase gene are resistant to the development of MPTP-induced damage (8). In the case of Cp, a protective effect against radiation-induced damage has been reported (9); while its ferroxidase activity improves the iron management, detoxifying brain from ferrous ions, inducers of hydroxyl radicals' overproduction through the well-known Fenton's reaction (10).

In agreement with a putative role of copper-dependent enzymes in neuroprotection against free radicals overproduction and the copper depletion accompanying MPTP action, we hypothesized that a copper supplementation might restore the copper-dependent defense mechanisms which in turn may prevent neuronal death associated to MPP⁺ neurotoxicity in mice. In this study, we supplemented mice with copper sulfate either chronic or acutely administered, as a strategy to protect striatal neurons from the neurotoxic effects exerted by the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of MPP⁺, the toxic metabolite of MPTP.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals, Copper Pretreatment, and MPP⁺ Administration (20 µg/3 µl). All experiments were conducted on male C57 Black adult mice weighing 25-30 g. They were fed *ad libitum* with a standard rodent Purina Chow. For acute exposure to CuSO₄, animals were administered with a single i.p. dose of either CuSO₄ (2.5 mg/Kg) or saline solution (11). Dopaminergic damage was experimentally produced by the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of 20 µg/3 µl of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺ iodine, from RBI, the toxic metabolite of MPTP), according to Rojas and Ríos (2), to mice at either 0.5, 8, 16, or 24 hours after the CuSO₄ pretreatment. For chronic copper (II) sulfate pretreatment, mice received a solution containing either 350 or 700 mg/L of CuSO₄ dissolved in deionized water as their drinking water. These doses have been used in nutritional studies as a copper supplement for rodents (12). Control animals were given deionized water containing sodium sulfate at the same molar concentration of sulfate present in the respective CuSO₄ solution.

Striatal Lipid Peroxidation Assay. Lipid fluorescence products formation as an index of LPO were monitored in the *corpora striata* of mice using the technique described by Triggs & Willmore (13), two hours after MPP⁺ administration (20 µg/3 µl). Mice were killed by decapitation and their *striata* were dissected out, carefully weighed and homogenized in 2.5 ml of deionized water. One-milliliter aliquots of the homogenate were then separated in glass tubes and added with 4 ml of a chloroform-methanol 2:1 mixture. Tubes were capped, gently mixed for 2 minutes and then placed on ice for 30 min to allow phase separation. Aqueous phase was discarded and 1 ml of the chloroformic layer was then transferred into a quartz cuvette and 0.1 ml of methanol was added. Fluorescence was measured in a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrophotometer at 370 nm of excitation and 430 nm of emission. Sensitivity of the spectrophotometer was adjusted to 140 fluorescence units with a

0.1 mg/l quinine standard, prepared in 0.05 M aqueous sulfuric acid solution, prior to the measurement of the samples. Results were expressed as fluorescence units per gram of wet tissue per ml of extraction read. All samples were run in duplicate.

Analysis of Striatal Dopamine Content. Mice brains were removed quickly and their *corpora striata* were dissected out upon ice as described by Glowinski and Iversen (14). An aliquot (500 µl) of perchloric acid-sodium metabisulfite solution (0.1% w/v) was added to the tissue and homogenized. Samples were then centrifuged at 4,000 g for 10 min and the supernatants were kept at -70°C until analyzed. Striatal content of DA was analyzed using an HPLC system (LC 250 Perkin Elmer) with a Metrohm 641-electrochemical detector and a Hewlett-Packard 3396-II integrator (11). Calibration curves were constructed for dopamine and the concentrations were obtained by interpolation in the standard curve. An Alltech Associates, Inc. (Deerfield, IL) adsorbosphere catecholamine analytical column of 100 × 4.8 mm with 3 µm of particle size was used. The mobile phase was prepared with phosphate buffer (pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulfate, 0.1 mM EDTA, and 15% (v/v) of methanol. The results were expressed as µg of dopamine per gram of wet tissue.

Measurement of Striatal and Midbrain Copper Contents. Copper contents in midbrain and striatum were measured as previously described (3). Striatal tissue samples were added with 500 µl of HNO₃ (Suprapur, Merck) and then digested in a shaking water bath at 60°C for 30 minutes, as described by Bonilla (15). After digestion, copper content was measured in a Perkin-Elmer 3110 Atomic Absorption Spectrophotometer equipped with an HGA-600 graphite furnace and an AS-60 autosampler, using previously reported operating conditions (16). Results were expressed as µg of copper per gram of wet tissue or percent of change versus control.

Serum Transaminase Activity (ALT/GPT). In order to test if copper is reaching liver in high amounts possibly hepatotoxic to animals after the chronic treatment, ALT/GPT (alanine transaminase/glutamic pyruvic transaminase) activity was measured in serum samples taken by cardiac puncture of mice either at 24 h (for the analysis of samples of animals receiving acute administration) or 30 days (for the same analysis in groups receiving chronic administrations) after the CuSO₄ treatment. ALT/GPT was measured using a commercial Kit by Stanbio Laboratory Inc. (2930 East Houston Street, San Antonio Texas 78202, USA) and monitored in a Lambda-20 Perkin Elmer UV/VIS Spectrophotometer. Results were expressed as International Units per Liter (I.U./L).

Data Analysis. Results were statistically analyzed by two-way ANOVA followed by the Tukey's test for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered of statistical significance.

RESULTS

Striatal Lipid Peroxidation. Striatal lipid-soluble fluorescent products were measured at four different pretreatment times (0.5, 8, 16 and 24 h after MPP⁺ injection) in the acute CuSO₄ schedule. Results of these experiments are shown in Fig. 1. Striatal LPO was enhanced 2 h after MPP⁺ administration by 173% as compared to control values. In the group of mice receiving CuSO₄ as a pretreatment 30 min before MPP⁺, no preventive effect was observed as compared to the MPP⁺

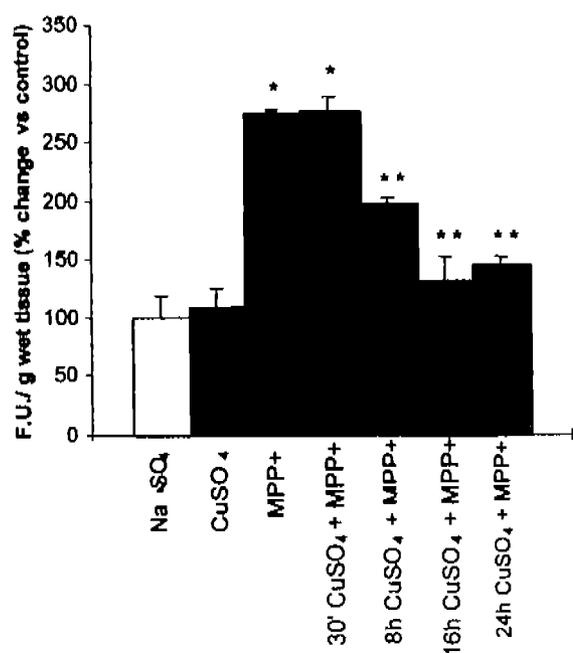


Fig. 1. Striatal lipid peroxidation (LPO) as the percentage of change of lipid-soluble fluorescence products formation against control 2 hours after MPP⁺ i.c.v. administration (20 μ g/3 μ l). Mice were pretreated acutely with a single i.p. copper sulfate injection (2.5 mg/Kg) at either 0.5, and 8, 16, or 24h. Results are expressed as mean \pm SEM of n = 4–6 mice per group. *Statistically different from control group, **Statistically different from MPP⁺ group, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

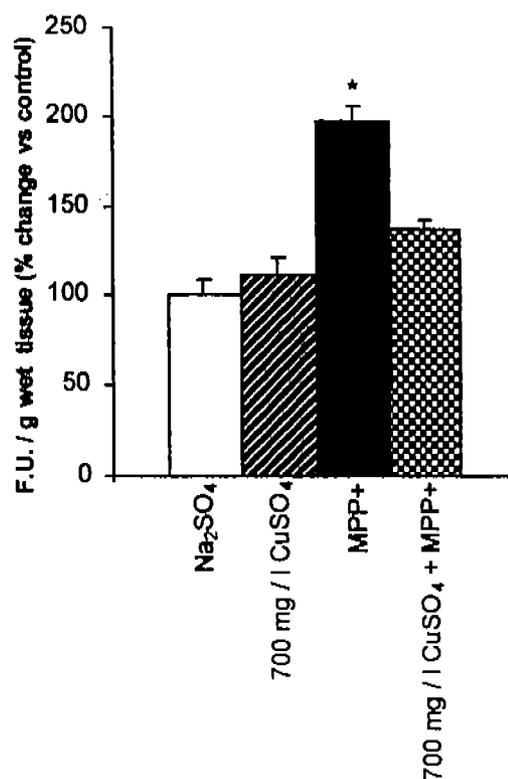


Fig. 2. Striatal LPO, as the percentage of change of lipid-soluble fluorescence products formation against control 2 hours after MPP⁺ i.c.v. administration (20 μ g/3 μ l). Mice were chronically administered for 30 days with a copper sulfate solution (700 mg/l) through their drinking water, before MPP⁺ (20 μ g/3 μ l) or saline solution i.c.v. administration. Results are expressed as mean \pm SEM of n = 4–5 mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

group. In contrast, those groups receiving the copper administration 8 to 24h prior to the neurotoxin injection, showed a significant decrease of LPO as compared to MPP⁺ group values (–37% for the 8 h group and a complete prevention in the case of both 16 and 24 h groups) when compared to the group intoxicated with MPP⁺ alone. When CuSO₄ pretreatment was applied in a chronic schedule of administration at two different doses (350 and 700 mg/l of CuSO₄), LPO was blocked only with the highest dose employed (Fig. 2).

Striatal Dopamine Content. Striatal dopamine concentrations were measured 24 h after MPP⁺ administration. Results showed that the acute CuSO₄ pretreatment protected mice against the dopamine-depletory effect of MPP⁺ only when administered 24 h before the neurotoxicant (Fig. 3). With the 16 h CuSO₄ pretreatment only a slight prevention (MPP⁺: 3.40 \pm 0.13 μ g / g of tissue weight vs Cu/MPP⁺: 50.8 \pm 0.47 μ g / g tissue weight; Control: 10.2 \pm 0.6 μ g / g of tissue weight) of 16% was achieved against MPP⁺ effect, and no protection was obtained with shorter times of pretreatment (data not shown).

Chronic administration of CuSO₄ was also completely preventive of the dopamine-depletory effect of MPP⁺ (Control: 13.19 \pm 1.23 μ g/g of tissue weight vs MPP⁺/Cu: 12.56 \pm 1.31 μ g/g of tissue weight), only at the highest dose employed (700 mg/l of CuSO₄). Results of those experiments are shown in Fig. 4.

Striatal and Midbrain Copper Contents. Striatal and midbrain copper concentrations measured 24 hours after MPP⁺ administration in the groups of animals submitted to the chronic schedule of CuSO₄ pretreatment are shown in Fig. 5 and 6, respectively. Striatal copper depletion induced by MPP⁺ administration reached a 53.5% decrease (MPP⁺: 5.22 \pm .68 μ g of copper/ g. of tissue weight), as compared to the control group values (9.77 \pm 0.64 μ g of copper/g of tissue weight). Midbrain tissue showed a depletion of 54 percent (MPP⁺: 1.81 \pm 0.30 μ g of copper/g of tissue weight vs Control: 3.89 \pm 0.31 μ g of copper/g

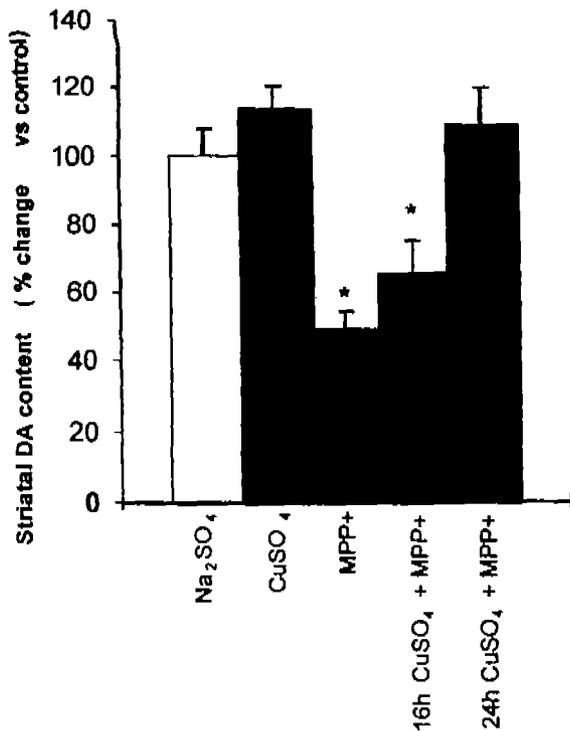


Fig. 3. Striatal dopamine content of mice acutely administered with a single dose of CuSO_4 (2.5 mg/kg; i.p.) either at 16 or 24 hours before MPP^+ or saline solution i.c.v. administration (20 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$). Dopamine content was measured 24 hours after MPP^+ administration. Results are mean \pm SEM of $n = 4-6$ mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, $p < 0.05$.

tissue weight). In both brain regions, copper levels in MPP^+ -untreated mice receiving the copper pretreatment showed that the metal has been accumulated in comparison with control animals. This copper status probably represents the striatal copper content at the moment of MPP^+ i.c.v. administration. All mice treated with MPP^+ showed the copper-induced depletory effect of the neurotoxicant in spite of the copper sulfate pretreatment with the exception of the higher CuSO_4 dose (700 mg/l) in midbrain tissue. In this brain region a slight decrease of only 30% of copper content was observed as compared with control values (Control: $3.89 \pm 0.31 \mu\text{g}$ of copper/g of tissue weight vs Cu/MPP^+ : $2.722 \pm 0.30 \mu\text{g}$ of copper/g of tissue weight) (Fig. 6).

Serum Transaminases Activity. In order to assess whether or not the administration of acute or chronic CuSO_4 was causing hepatic alterations in mice treated with CuSO_4 , we measured the serum ALT/GPT activity. Results of these measurements are shown in Table I. ALT/GPT activity, remained below the values consid-

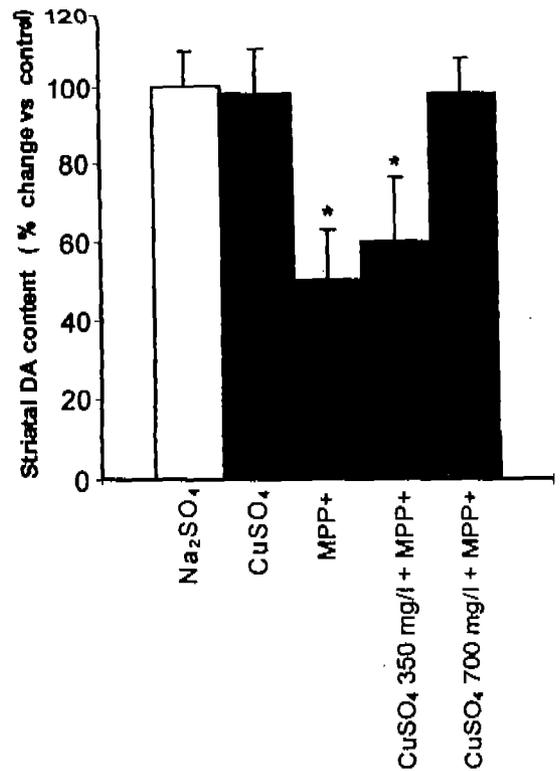


Fig. 4. Striatal dopamine content mice chronically administered for 30 days with a copper sulfate (700 mg/l) solution, through their drinking water, before MPP^+ (20 $\mu\text{g}/3 \mu\text{l}$) or saline solution i.c.v. administration. Dopamine content was measured 24 hours after MPP^+ administration. Results are expressed as mean \pm SEM of $n = 6-8$ mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, $p < 0.05$.

ered as indication of hepatic damage (0 to 20 IU/l) in all the groups tested.

DISCUSSION

Copper is considered an important dietary element since it is essential for human and animal development (17). Copper deficiency has been related to neuronal degeneration in an inherited human condition known as Menke's disease (18). Moreover, basal ganglia degeneration is observed in those patients with hereditary aceruloplasminemia, lacking of the main plasma copper protein, ceruloplasmin (19). Recently, evidences have been accumulated showing that copper participates in the control of free radicals overproduction as the prosthetic group of important enzymes such as superoxide dismutase, as for example, in its ability to protect animals against cell damage caused by radiation injury (9).

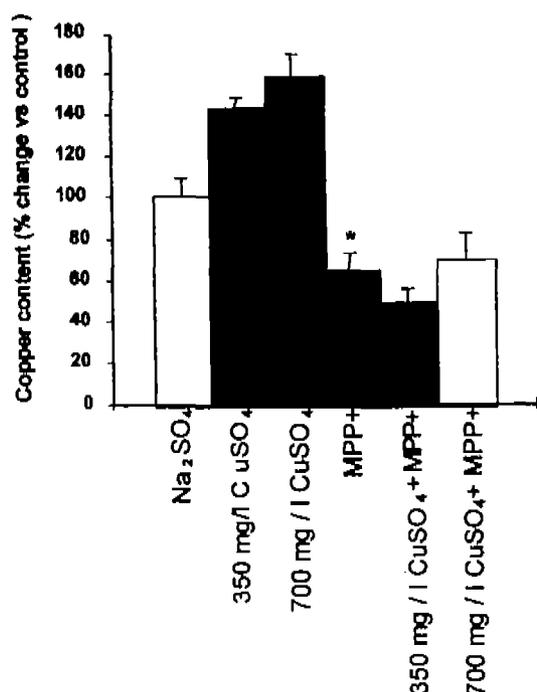


Fig. 5. Striatal copper content as the percentage of change against control after MPP⁺ i.c.v. administration (20 µg/3 µl). Mice were chronically administered for 30 days with a copper sulfate solution (700 mg/l) through their drinking water, before MPP⁺ (20 µg/3 µl) or saline solution i.c.v. administration. Copper was measured 24 h after MPP⁺ administration. Results are expressed as mean ± SEM of n = 6–8 mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

Our results showed that acute copper administration at both 16 and 24 h before MPP⁺ administration was able to block the MPP⁺-induced LPO. This pretreatment was also preventive against the striatal dopamine depletion caused by the MPP⁺ administration only when copper sulfate pretreatment was administered 24 hours prior to MPP⁺. These results suggest that copper needs to be incorporated into a protective process with a delayed effect, perhaps in the form of cuproprotein synthesis and up regulation (19). The inability of copper to protect cells from MPP⁺-induced dopamine depletion at 16 hours, compared with the results derived from LPO measurements, suggest that the 16 h pretreatment allows protection against oxidative stress, but it was not enough to induce neuroprotection against dopaminergic cells loss. An alternative explanation is that LPO, as a gross index of free radicals overproduction, is giving a "false negative" on what is occurring at sub-cellular level. For example, in mitochondria, with free radical's overproduction.

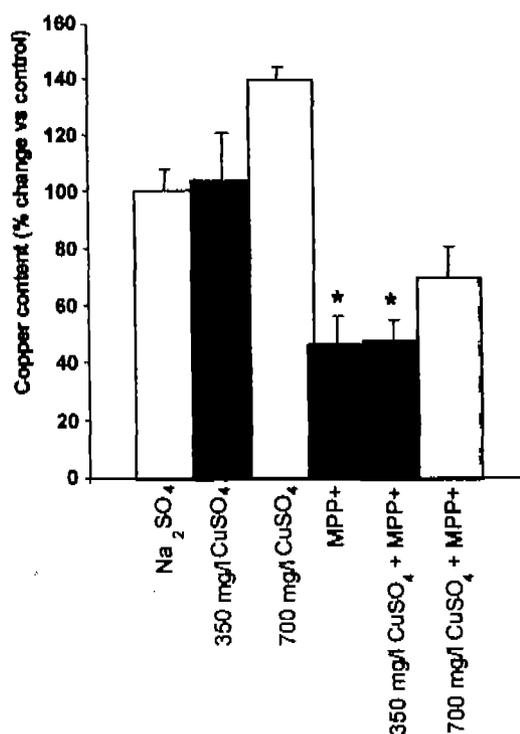


Fig. 6. Midbrain copper content as the percentage of change against control after MPP⁺ i.c.v. administration (20 µg/3 µl). Mice were chronically administered for 30 days with a copper sulfate solution (700 mg/l) through their drinking water, before MPP⁺ (20 µg/3 µl) or saline solution i.c.v. administration. Copper was measured 24 h after MPP⁺ administration. Results are mean ± SEM of n = 6–8 mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

The best scheme resembling the daily copper intake of mammals is the chronic administration employed in this study as a copper supplement in nutrition experiments (12). Results from our experiments showed

Table I. Alanine Transaminase Activity of the Experimental Groups of C57 Black Mice Pretreated (Chronically or Acutely) with CuSO₄ (or Na₂SO₄ as a Control for Sulfate)

GROUP	ALT/GPT (U/L)
CONTROL	6.939 ± 0.36
Acute Na ₂ SO ₄	7.296 ± 0.14
Chronic Na ₂ SO ₄	9.232 ± 0.81
Acute CuSO ₄	9.406 ± 1.05
Chronic CuSO ₄	11.131 ± 1.58

Serum alanine transaminase activity (ALT/GPT) measured in C57Black male mice (25–30 g weight) administered either acutely or chronically with a 2.5 mg/Kg (i.p.) or 700 mg/ml (in drinking water) doses of CuSO₄ (or Na₂SO₄) solutions, respectively. Transaminase was measured 24 h after the Na₂SO₄/CuSO₄ administration (n = 6).

that chronic administration of copper sulfate was able to protect neurons from MPP⁺-induced dopamine depletion, only at the highest dose used (700 mg/l). Besides, this dose also protected striatal tissue from the oxidative damage caused by MPP⁺. It is important to remark that transaminase levels did not reach levels considered harmful to mice neither at the acute nor at the chronic schemes of copper administration.

The raised copper contents in the brain regions involved in MPP⁺ damage at the moment of the administration of the neurotoxicant indicates that copper has been delivered to the cells of those regions in sufficient amounts to prevent the neurotoxicity exerted by the metabolite.

Taken together, all these findings showed that copper sulfate administration is able to prevent MPP⁺-induced striatal neurotoxicity, as measured by dopamine depletion and LPO enhancement. Results also support the hypothesis of a relationship between brain copper status, and the susceptibility to free radical's induced striatal damage caused by MPP⁺ administration. This is particularly important since alterations of copper status, such as reduced nigral copper content and reduced cerebrospinal fluid ceruloplasmin ferroxidase activity have been reported in Parkinson's disease patients (16,20). Further experiments are needed to explain why copper is being depleted from striatal and midbrain tissue after MPP⁺ administration, however, the role of down-regulation or direct damage of copper chelating proteins, such as metallothioneins (21), has been suggested as an explanation for this copper loss. If brain tissue is enriched with copper, in the form of protein-bound metal, at the moment of MPP⁺ delivery, the damaging consequences of copper deficiency could be prevented.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by CONACYT grant No. 26504-M

REFERENCES

- Langston, J. W. 1985. MPTP neurotoxicity I: An overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci.* 36:201-206.
- Rojas, P. and Rios, C. 1993. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP⁺ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.* 72:364-368.
- Rios, C., Alvarez-Vega, R., and Rojas, P. 1995. Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76:348-352.
- Linder, M. C. 1991. Nutrition and metabolism of the major minerals. In Linder, M. C. ed. *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*. Second Edition.
- Prohaska, J. R. 1991. Changes in Cu, Zn-Superoxide Dismutase, Cytochrome c Oxidase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Transferase Activities in Copper-Deficient mice and rats. *J. Nutr.* 121:355-363.
- Miller, D. B., Reinhard, J. F., Daniels, A. J., and O'Callaghan, J. P. 1991. Diethyldithiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 57:541-549.
- Hartmann, H. A. and Evenson, M. A. 1992. Deficiency of Copper can cause Neuronal Degeneration. *Med. Hypot.* 38:75-85.
- Przedborski, S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Simonetti, S., Stanley, F., Carlson, E., Epstein, C. J., and Cadet, J. L. 1992. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12:1658-1667.
- Sorenson, J. R. J., Soderberg, L. S. F., and Chang, L. W. 1995. Radiation protection and radiation recovery with essential metal-element chelates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210:191-204.
- Linder, M. C. and Hazegh-Azam, M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:797S-811S.
- Rojas, P., Alvarez-Vega, R., and Ríos, C. 1996. Copper supplementation blocks 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:222.
- Crowe, A. and Morgan, E. H. 1996. 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.* 126:183-194.
- Triggs, W. J. and Willmore, L. J. 1984. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* 42:976-979.
- Glowinski, J. and Iversen, L. L. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-Norepinephrine, ³H-Dopamine and ³H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13:655-669.
- Bonilla, E. 1978. Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of manganese in rat brain and other tissues. *Clin. Chem.* 24:471-474.
- Boll, M.-C., Sotelo, J., Otero, E., Alcaraz-Zubeldia, M., and Rios, C. 1999. Reduced Ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 265:155-158.
- Olivares, M. and Uauy, R. 1996. Copper as an essential nutrient. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:791S-796S.
- Iwata, M., Irano, A., and French, J. H. 1979. Degeneration of the cerebellar system in X-chromosome-linked copper malabsorption. *Ann. Neurol.* 5:542-549.
- Prohaska, J. R. and Bailey, W. R. 1994. Regional specificity in alterations of rat brain copper and catecholamines following perinatal copper deficiency. *J. Neurochem.* 63:1551-1557.
- Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P., and Marsden, C. D. 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin, and other trace metals in Parkinson's disease and other degenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114:1953-1975.
- Rojas, P., Hidalgo, J., Ebadi, M., and Rios, C. 2000. Changes of MT I y II proteins in the brain after 1-methyl-4-phenylpyridinium administration in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. and Biol. Psychiat.* 24:144-154.

Participation of manganese-superoxide dismutase in the neuroprotection exerted by copper sulfate against 1-methyl 4-phenylpyridinium neurotoxicity

M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes and C. Ríos*

Department of Neurochemistry, National Institute of Neurology and Neurosurgery "Manuel Velasco Suárez", México City, México

ABSTRACT: Neurodegenerative effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), the main metabolite of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) include enhancement of lipid peroxidation in the striatum of mice, associated to overproduction of free radicals. Copper acts as a prosthetic group of several copper-dependent antioxidant enzymes, and we previously showed the neuroprotective effect of CuSO₄ pretreatment against the MPP+-induced neurotoxicity. In those studies, acute administration of CuSO₄ (2.5 mg/kg) blocked MPP+-induced striatal lipid peroxidation, suggesting the activation of Cu-dependent proteins that defend neurons from damage elicited by free radicals. In the present study, we evaluated the activity of superoxide dismutase in mice pretreated with CuSO₄ 16 h or 24 h prior to MPP+ administration. Copper administration produced a specific and significant increase in manganese superoxide dismutase activity in both the CuSO₄/saline (fivefold increase) and the CuSO₄/MPP+ groups of animals (sevenfold increase). The Na₂SO₄/MPP+ group showed a twofold increase in manganese superoxide dismutase activity versus control levels. The results suggest that the load of copper activating manganese-dependent superoxide dismutase could be responsible for neuroprotection against the MPP+ insult. © 2001 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Antioxidant defense, Oxidative stress, Parkinson's disease, Metals.

INTRODUCTION

The administration of the 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) metabolite of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) provides the animal model that best resembles the biochemical alterations characteristic of Parkinson's disease [7]. Among them, an increased level of lipid peroxidation, an index resulting from elevated production of free radicals, has been reported [13]. Reactive oxygen species are naturally released from the intermediary metabolism, the mitochondrial respiratory chain, as well as from the cellular immune response [16]. The rate of production of free radicals is controlled by an effective antioxidant system constituted by several enzymes, most of them dependent on transition metals [2]. Copper is one of those transition metals that acts as a cofactor of important antioxidant enzymes.

Copper is considered an essential trace metal involved in the regulation of cell function [9]. Copper deficiency has been asso-

ciated with several neurological diseases [10]. Brain and liver are considered the organs with the highest levels of this metal [8]. Copper is related to antioxidant enzymes allowing the dismutation of superoxide radicals. One of these enzymes is represented by superoxide dismutase located in the cytoplasm and dependent on copper and zinc (Cu/Zn SOD), while the other is located in mitochondria and dependent on manganese (MnSOD). Superoxide radical is partially controlled by cerebral copper availability [9]. Deficiency of this metal in brain has been associated with neurodegenerative diseases, including those related to hereditary copper metabolism disturbance such as Menkes' disease [3]. We have previously investigated the relationship between copper availability and a possible protection against toxins producing cellular oxidative stress, such as MPP+. We showed that MPTP administration in mice induces marked and regionally specific striatal copper depletion [12]. When we tested the ability of CuSO₄ administration to prevent MPP+ neurotoxicity [1], mice pretreated with copper sulfate (CuSO₄) at least 16 h before the MPP+ insult were protected against increased lipid peroxidation produced by the administration of the neurotoxin. The blockade of MPP+-induced lipid peroxidation by copper sulfate pretreatment could be related to the time interval needed to develop mechanisms of synthesis and/or activation of some copper-dependent antioxidant enzymes such as the superoxide dismutases. With the aim of studying this possible mechanism, we measured in the present study the activity of the two superoxide dismutase enzymes (Cu/ZnSOD and MnSOD) in mice pretreated with copper sulfate at 16 h and 24 h prior to the MPP+ insult.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Copper Pretreatment, and MPP+ Administration

All experiments were conducted under approval of the institutional animal welfare committee. Male C57 Black adult mice ($n = 5-8$ per group), weighing 25–30 g, were used. They were fed *ad libitum* with a standard rodent Purina chow. Mice were administered with a single intraperitoneal dose of either CuSO₄ (2.5 mg/kg) or Na₂SO₄ solution [14]. Damage to the dopaminergic system was experimentally produced by the intracerebroventricular administration of 18 μ g/3 μ l of MPP+ iodine (RBI, Natick, MA, USA), according to Rojas and Ríos [13], at either 16 h or 24 h after CuSO₄ pretreatment.

* Address for correspondence: Dr. Camilo Ríos, Department of Neurochemistry, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Ave. Insurgentes Sur 3877, México City 14269, D.F., México. Fax: +52-5528-0095; E-mail: crios@cueyatl.uam.mx

TABLE 1
SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITY IN THE DIFFERENT EXPERIMENTAL GROUPS

	At 16 h Pretreatment			At 24 h Pretreatment		
	Total SOD (%)	Cu/ZnSOD (%)	MnSOD (%)	Total SOD (%)	Cu/ZnSOD (%)	MnSOD
CuSO ₄ /saline	23.94 ± 8.15	9.742 ± 7.92	455.26 ± 10.86*	27.47 ± 17.84	14.58 ± 8.18	25.56 ± 8.0
Na ₂ SO ₄ /MPP+	30.70 ± 7.45	10.07 ± 12.66	218.05 ± 34.65**	25.08 ± 19.77	20.75 ± 15.94	173.41 ± 12.18**
CuSO ₄ /MPP+	42.54 ± 6.82	13.06 ± 11.07	729.46 ± 16.61***	12 ± 5.91	7.22 ± 5.03	320 ± 9.47*

Cu/ZnSOD, copper and zinc SOD; MnSOD, manganese SOD; MPP+, 1-methyl-4-phenylpyridinium. Results are expressed as the mean ± SEM. Statistically significant differences against control level: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; by a two-way analysis of variance, followed by the *post-hoc* Dunnett's test

Superoxide Dismutase Activity Measurement

Mice were sacrificed by decapitation, and the brains were quickly removed; the striatum was then dissected out upon ice as described by Glowinski and Iversen [4] and carefully weighed. Striatal tissue was removed and kept at -70°C until analysis for SOD activity, that was assayed by the method of xantine/xantine oxidase following the method described by Schwartz et al. [18]. Tissue was homogenized in a buffer consisting of 20 mM sodium bicarbonate, 0.02% Triton X-100, pH 10.2. Then, 50 μl of clarified supernatant from homogenization was added to 950 μl of the reaction mixture consisting of 10 μM sodium azide, 100 μM xanthine, 10 μM reduced cytochrome c, and 1 mM EDTA in 20 mM sodium bicarbonate, 0.02% Triton X-100, pH 10.2. The assay was initiated by adding xanthine oxidase and monitored by measuring the change in absorbance at 560 nm in a Lambda-20 Perkin Elmer UV/VIS spectrophotometer. The analysis of samples was carried out in duplicate and the participation of each SOD type was calculated as total activity minus the activity inhibited by 5 mM of sodium cyanide, since this substance inhibits selectively the Cu/Zn SOD isoform. Thus, addition of cyanide to the reaction mixture reflected MnSOD activity, while the difference between total SOD and MnSOD reflected Cu/Zn SOD activity. The results were expressed as percentage of variation against the respective control values (International Units of SOD/g of wet tissue).

Data Analysis

Results were statistically analyzed by two-way analysis of variance followed by the Dunnett's test, $p < 0.05$ was considered of statistical significance.

RESULTS

Pretreatment with CuSO₄ at 16 h

Total SOD activity showed no statistically significant difference between pretreated groups (16 h and 24 h pretreatment; Table 1). Nevertheless, when we evaluated each enzyme activity separately, only the manganese-dependent SOD isoform activity was altered. After 16 h pretreatment, the MnSOD activity increased fourfold and significantly ($p < 0.05$) in the group receiving the copper pretreatment without the MPP+ insult (CuSO₄/saline) in respect to control level. Such an increase was sevenfold and highly significant ($p < 0.001$) with respect to control levels in the group receiving MPP+ (CuSO₄/MPP+). On the other hand, in the group receiving MPP+ only (Na₂SO₄/MPP+) MnSOD activity levels increased only by twofold when compared with the control group ($p < 0.01$).

Pretreatment with CuSO₄ at 24 h

Total SOD and Cu/ZnSOD activities did not exhibit statistically significant inter-group differences also after the 24 h pretreatment (Table 1). As for the 16 h pretreatment, only the MnSOD activity was affected by the 24 h pretreatment with copper. In this case, pretreatment with CuSO₄ alone did not cause any statistically significant increase in the MnSOD activity. However, when copper was administered to animals of the group treated also with MPP+ the enzyme activity increased threefold and significantly ($p < 0.05$) in respect to control levels. At this time an effect produced by MPP+ by itself was also observed, because in the group of Na₂SO₄/MPP+ animals MnSOD activity exhibited a twofold and significant ($p < 0.01$) increase.

DISCUSSION

Evidence has recently accumulated showing that copper participates in the control of overproduction of free radicals as prosthetic group of important enzymes, such as superoxide dismutase isoforms. One example of this is the ability of copper-containing compounds to protect animals against cell damage caused by radiation injury [17]. The present results showed that the administration of copper sulfate did not influence the Cu/ZnSOD activity. This is probably due to the compartmentalization of the metal in brain, because, for example, severe copper deficiency decreases liver Cu/ZnSOD but not brain Cu/ZnSOD [15].

The results of the present study showed instead an increment in MnSOD activity, compared with the control group, in mice treated with MPP+. Such increment was previously reported after MPP+ treatment [6], and could be related with the MPP+-induced inhibition of complex I observed after the exposure to this neurotoxin. Complex I inhibition by MPP+ was reported to increase the production of superoxide radicals [5], which in turn could activate this enzyme due to a protective mechanism. Copper pretreatment itself was also able to increase MnSOD. The increase observed by the copper sulfate pretreatment upon the SOD mitochondrial form could be due to the MnSOD intrinsic characteristics of acute phase protein [19], possibly capable of modifying its threshold in response to the presence of metals.

The effect obtained by the combination of treatments (CuSO₄/MPP+, with both 16 h and 24 h pretreatment) is, however, remarkable, because MnSOD activity was highly increased with pretreatment at both the examined time points. These increments suggest an interaction between copper and MPP+, which leads the MnSOD activation.

Our results, however, do not exclude the possible participation of other mechanisms of protection against free radicals [11]. Therefore, further experiments are needed to clarify how copper

sulfate exerts its neuroprotective effects. Altogether, the main finding of the present study is that copper sulfate supplementation elicits an activation of an antioxidant enzyme (MnSOD) in the model of MPP⁺ toxicity, and this deserves further consideration.

REFERENCES

- Alcaraz-Zubeldia, M.; Rojas, P.; Boll, M. C.; Ríos, C. Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP⁺ neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* 26:61–66; 2001.
- Ames, B. N.; Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7915–7922; 1993.
- Bull, P. C.; Cox, D. W. Wilson disease and Menkes disease: New handles on heavy metal transport. *Trends Genet.* 10:246–252; 1994.
- Glowinski, J.; Iversen, L. L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-norepinephrine, ³H-dopamine and ³H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13:655–669; 1966.
- Hasegawa, E.; Takeshige, K.; Oishi, T.; Murai, Y.; Minakami, S. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170:1049–1055; 1990.
- Hung, H. C.; Lee, E. H. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 24:76–84; 1998.
- Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W.; Irwin, I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979–980; 1983.
- Linder, M. C. Nutrition and metabolism of the trace elements. In: Linder, M. C., ed. *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*. Norwalk, CT: Appleton & Lange; 1991:215–276.
- Linder, M. C.; Hazegh-Azam, M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:797S–811S; 1996.
- Prohaska, J. R. Neurochemical roles of copper as an antioxidant or prooxidant. In: Connor, J. R., ed. *Metals and oxidative damage in neurological diseases*. New York: Plenum Press; 1997:57–75.
- Przedborski, S.; Jackson-Lewis, V.; Yokoyama, R.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4565–4571; 1996.
- Ríos, C.; Alvarez-Vega, R.; Rojas, P. Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76:348–352; 1995.
- Rojas, P.; Ríos, C. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP⁺ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.* 72:364–368; 1993.
- Rojas, P.; Alvarez-Vega, R.; Ríos, C. Copper supplementation blocks 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:222; 1996.
- Rossi, L.; Ciriolo, M. R.; Marchese, E.; De Martino, A.; Giorgi, M.; Rotilio, G. Differential decrease of copper content and of copper binding to superoxide dismutase in liver, heart and brain of copper deficient rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203:1028–1034; 1994.
- Simonian, N. A.; Coyle, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36:83–106; 1996.
- Sorenson, J. R. J.; Soderberg, L. S. F.; Chang, L. W. Radiation protection and radiation recovery with essential metalloelement chelates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210:191–204; 1995.
- Schwartz, P. J.; Reaume, A.; Scott, R.; Coyle, J. Effects of over and under expression of Cu/Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brain Res.* 789:32–39; 1998.
- Viseri, G. A.; Dougall, W. C.; Wilson, J. M.; Barr, I. A.; Nick, H. S. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 265:2856–2863; 1990.



LA CAMARA NACIONAL DE LA
INDUSTRIA FARMACEUTICA

OTORGA

RECONOCIMIENTO

A LA

Biol. Mireya Alcaraz Zubeldia

COMO COLABORADORA EN EL TRABAJO

**“Evaluación del posible efecto neuroprotector del cobre
en un modelo de la enfermedad
de parkinson en ratones”**

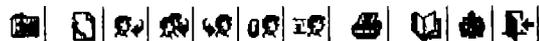
QUE SE HIZO ACREEDOR A MENCIÓN HONRIFICA
DEL PREMIO CANIFARMA 2002

C.P. Mauro López
Presidente de CANIFARMA

**PREMIO
CANIFARMA
2 0 0 2**

ENTRADA (1/90)

1741 bytes



Mapa de caracteres [iso-8859-1 *]

GUARDADOS [Mover] [Copiar]

◀ 1/90 ▶

Todos los encabezados

Fecha: Mon, 13 Feb 2006 18:37:36 -0000
Remitente: behav.br.res@umich.edu
Destinatario: <crios@correo.xoc.uam.mx>
Asunto: Submission Confirmation
Dear Camilo,

Your submission entitled "Copper Sulfate Prevents Tyrosine Hydroxylase Inactivation and Motor Deficits in a Parkinson's Disease Model in Mice" has been received by Behavioural Brain Research

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/bbr/>.

Your username is: camilorios
Your password is: rios72

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Behavioural Brain Research

◀ 1/90 ▶