



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN DE COBRE, HIERRO Y MANGANESO POR
ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN MEDIO
EXTRACELULAR EN EL MODELO ANIMAL DEL PARKINSON EN
CEREBRO DE RATA POR TRATAMIENTO CON YODURO DE 1-
METIL-4-FENILPIRIDINIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

FRANCISCO SANTIAGO GUADARRAMA SÓLOMON



CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: JOSÉ LUZ GONZÁLEZ CHÁVEZ**

VOCAL: **Profesor: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS**

SECRETARIO: **Profesor: LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: LUIS ALEJANDRO DÍAZ FLORES**

2° SUPLENTE: **Profesor: ALBERTO COLÍN SEGUNDO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA, CIUDAD DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Camilo Ríos

SUSTENTANTE (S):

Francisco S. Guadarrama S.

Los méritos de este trabajo se los dedico a los enfermos de Parkinson, a sus familiares, así como a todos aquellos que trabajan por aliviar este malestar.

Quisiera agradecer al Dr. Camilo Ríos, quien me abrió espacio en su laboratorio para poder desarrollar este proyecto de investigación y me introdujo al mundo de las neurociencias.

También al Dr. Sergio Montes, de quien recibí conocimientos invaluable para la investigación.

Por último le hago una dedicación a mis padres, sin quienes esto no hubiera sido posible.

Gracias,

TABLA DE CONTENIDO

I. RESUMEN	p. 8
II. INTRODUCCIÓN	p. 9
III. ANTECEDENTES	p. 12
3.1 - Enfermedad de Parkinson	p. 12
3.2 - Modelo animal de la enfermedad	p. 15
3.3 - Los metales cobre, hierro y manganeso en la enfermedad de Parkinson y el modelo animal	p. 17
3.4 - Espectroscopía de absorción atómica	p. 20
IV. OBJETIVO E HIPÓTESIS	p. 21
V. MÉTODOS	p. 22
5.1 – Sitio de estudio	p. 22
5.2 - Sistema de estudio	p. 22
5.3 - Métodos	p. 23
5.3.1 - Preparación de la disolución de nutrientes buffer de Krebs-Ringer	p. 23
5.3.2 - Preparación de la disolución de MPP ⁺	p. 23
5.3.3 - Animales	p. 23
5.3.4 - Disección de las muestras	p. 24
5.3.5 - Equipo empleado	p. 24

5.3.6 - Muestreo del medio extracelular _____	p. 24
5.3.7 - Cuantificación de metales por espectroscopía de absorción atómica _____	p. 25
5.3.7.1 - Cuantificación de cobre _____	p. 26
5.3.7.2 - Cuantificación de manganeso _____	p. 27
5.3.7.3 - Cuantificación de hierro _____	p. 28
5.3.8 - Análisis de proteínas en las rebanadas de estriado _	p. 29
5.3.8.1 - Homogeneización de las muestras __	p. 29
5.3.8.2 - Preparación del análisis _____	p. 29
5.3.9 - Análisis estadístico _____	p. 30
VI. RESULTADOS _____	p. 31
6.1 - Curva de calibración para el análisis proteico _____	p. 31
6.2 - Cuantificación de hierro en medio extracelular _____	p. 32
6.3 -Cuantificación de manganeso en medio extracelular _	p. 34
6.4 - Cuantificación de cobre en medio extracelular _____	p. 37
6.5 - Resultados conjuntos del análisis de cobre, hierro y manganeso _____	p. 40
VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES _____	p. 42
VIII. LITERATURA CONSULTADA _____	p. 48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Estructura general de la neurona _____ p. 10
- Figura 3.1 - Diagrama ilustrando la posición de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* del cerebro humano ____ p. 13
- Figura 3.2 - Esquema de los modelos animales de la EP inducidos por neurotoxinas _____ p. 16
- Figura 3.3 - Estructura de la enzima que contiene manganeso superóxido dismutasa humana 2 _____ p.19
- Figura 3.4 - Mecanismo de dismutación del O_2^- por la SOD ____ p. 20
- Figura 3.5 - Esquema de un horno de grafito para obtención de átomos en estado fundamental en espectroscopía de absorción atómica _____ p. 21
- Tabla 5.1 - Programa de temperatura para el análisis de cobre por espectroscopía de absorción atómica _____ p. 26
- Tabla 5.2 - Programa de temperatura para el análisis de manganeso por espectroscopía de absorción atómica _____ p. 27
- Tabla 5.3 - Programa de temperatura para el análisis de hierro por espectroscopía de absorción atómica _____ p. 28
- Tabla 6.1 - Preparación de la curva de calibración para el análisis proteico _____ p. 31
- Gráfica 6.1 - Curva de calibración realizada para el análisis del contenido proteico de las muestras _____ p. 31
- Tabla 6.2 – Resultados normalizados para el análisis de hierro _ p. 33

Gráfica 6.2 – Resultados del análisis de hierro _____ p. 34

Tabla 6.3 - Resultados normalizados para el análisis
de manganeso _____ p. 35

Gráfica 6.3 - Resultados del análisis de manganeso _____ p. 36

Tabla 6.4 - Resultados normalizados para el análisis de cobre ___ p. 38

Gráfica 6.4 - Resultados del análisis de cobre _____ p. 39

Tabla 6.5 - Resultados promedio del análisis de cobre, hierro y
manganeso _____ p. 40

Gráfica 6.5 - Resultados del análisis de cobre, hierro y
manganeso _____ p. 41

I. RESUMEN

En este trabajo se informa detalladamente la investigación realizada en el INNN, para obtener el título de licenciatura en química. Se resume la información relevante de la enfermedad de Parkinson relacionada con la investigación, así como de los modelos animales de la enfermedad. Para lograr reproducir la enfermedad, se induce un daño neurológico como plataforma para la investigación de los mecanismos de daño en el Parkinson.

Uno de los elementos importantes del padecimiento es el cobre. Este metal está involucrado en la producción de neurotransmisores; además ha demostrado tener efectos neuroprotectores contra la inducción de un modelo de Parkinson por tratamiento con yoduro de 1-4 fenilpiridinio (MPP⁺). Por otra parte, el hierro se ha encontrado en concentraciones elevadas en la sustancia negra de cerebros afectados por la enfermedad. La exposición elevada a manganeso produce temblores y otros síntomas neurodegenerativos que son similares a la enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, todos estos metales están involucrados en la defensa antioxidante de las células.

Los análisis se realizaron *in vitro* administrando el MPP⁺ para producir un daño neurológico similar al de la enfermedad de Parkinson. Se obtuvieron muestras del medio extracelular antes, a los 30 y a los 60 minutos después de la aplicación de la neurotoxina, y se analizó la concentración de los metales por espectroscopía de absorción atómica. Se observó un aumento significativo en la concentración del cobre y hierro en el medio de cultivo. El manganeso disminuyó, pero no de forma significativa. Los resultados indican una participación del Cu y Fe en la neurotoxicidad ejercida por el MPP⁺.

II. INTRODUCCIÓN

El estudio de las enfermedades neurodegenerativas es de suma importancia pues estas aflicciones afectan severamente a millones de personas en todo el mundo. Las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes en la población incluyen la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y Huntington. Por desgracia, muchas no son tratables hasta el momento, y en general son enfermedades progresivas que producen condiciones debilitantes del movimiento y de la función cognitiva (demencias). La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en el mundo, por lo que resulta de gran importancia su investigación. Es de interés notar que en México se ha reportado una mayor incidencia de la enfermedad de Parkinson que de otras enfermedades neurodegenerativas [1]. En nuestro país, 50 de cada 100000 habitantes puede padecerla. Además, se estima que hay más de 4 millones de casos de Parkinson alrededor del mundo y este número podría duplicarse para 2030 [2].

El cerebro es el órgano central del sistema nervioso en todos los seres vertebrados y en la mayoría de los invertebrados. Las neuronas son las células cerebrales que, interconectadas unas con otras, nos permiten ver, leer, oír y pensar, puesto que transmiten y procesan la información que recibimos. Las neuronas se comunican unas con otras mediante impulsos eléctricos que recorren los axones, largas fibras nerviosas conductoras de electricidad; estas señales eléctricas se transforman en señales químicas, los neurotransmisores, que cruzan las sinapsis neuronales excitando o inhibiendo a otras neuronas para que transmitan la señal nerviosa. El cerebro contiene una cantidad

enorme de neuronas y también incluye otras células no neuronales [3].

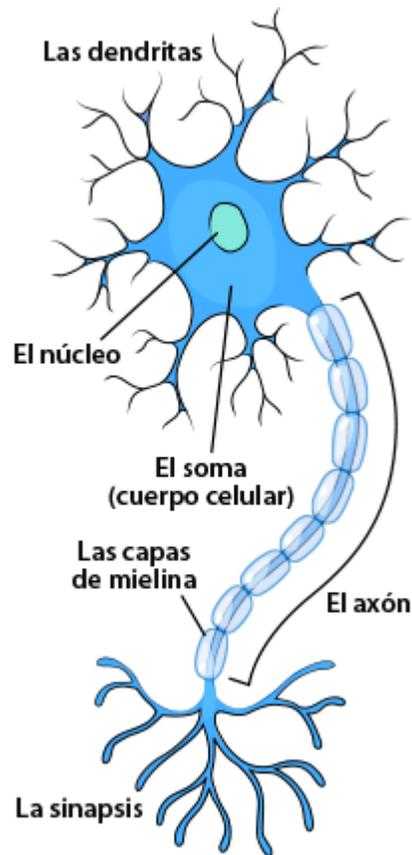


Figura 2.1 - Estructura general de la neurona [4]

Las neuronas son el elemento principal del sistema nervioso; son un tipo de célula que no se reproduce normalmente, por lo que cuando se dañan o mueren generalmente no pueden ser reemplazadas por el cuerpo [5]. A pesar de esto, existe evidencia de neurogénesis en el hipocampo de personas adultas, por lo que estas preguntas se siguen explorando en las investigaciones científicas [6].

Los modelos experimentales son de gran utilidad para el entendimiento de las enfermedades, ya que permiten reproducir los mecanismos de algunas de estas mediante tratamientos químicos; invaluable para el estudio del desarrollo de estos padecimientos y para probar nuevos tratamientos experimentales. El estudio de las enfermedades mediante modelos animales resulta un excelente apoyo para la investigación médica, proporcionando valiosa información biológica [7].

Una de las limitaciones sobre la investigación actual radica en la fisiopatogénesis de la EP, pues se conocen factores genéticos así como ambientales de riesgo para ella; sin embargo, no se conoce la causa del padecimiento. La EP presenta una gran complejidad, ya que muchos pacientes presentan síntomas distintos, así como niveles de degeneración diferentes y con algunas peculiaridades interesantes, inclusive demencia en los casos más avanzados.

Es evidente que la investigación actual sobre la enfermedad del Parkinson es de suma importancia en el desarrollo de nuevas medidas de prevención, así como para proponer tratamientos novedosos que pudieran mejorar la calidad de vida de aquellos afectados por este padecimiento.

III. ANTECEDENTES

3.1 - Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson es un grave problema de salud que afecta a millones de personas alrededor del mundo. Es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes y está relacionada con el envejecimiento [8]. La enfermedad de Parkinson se produce por la pérdida de neuronas que sintetizan dopamina en la *sustancia nigra*, produciendo una consecuente deficiencia de este neurotransmisor, generalizada en todo el cerebro [9]. La EP fue descrita extensivamente en 1817 por James Parkinson en su ensayo *An Essay on the Shaking Palsy*, quien también acuñó el nombre de "parálisis agitante". Este trastorno es el más común de una serie de enfermedades que se caracterizan por la acumulación de la proteína α -sinucleasa en pequeños agregados llamados cuerpos de Lewy, además, se ha comprobado que únicamente el 10 % de los casos tienen una causa genética. El resto de los casos son esporádicos [10].

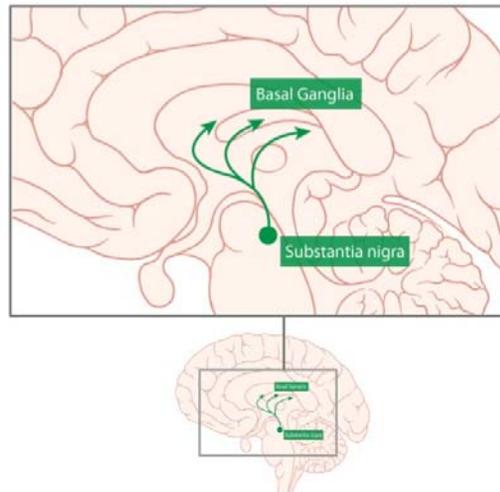


Figura 3.1 - Diagrama ilustrando la posición de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra* del cerebro humano [11]

Los principales síntomas de la enfermedad se separan en motores y neuropsiquiátricos. Los síntomas motores principales son rigidez, temblores, dificultad en el movimiento y la pérdida de habilidad de mantener una postura erguida. La enfermedad también puede causar síntomas neuropsiquiátricos que varían en intensidad y pueden incluir desórdenes cognitivos, dificultad para el habla, depresión y pérdida de memoria. Adicionalmente a estos síntomas, la enfermedad puede también alterar otras funciones del cuerpo produciendo disfunción sexual o alterando el sueño, produciendo insomnio [12].

El tratamiento actual de la EP abarca tres aspectos. El farmacológico, en donde el tratamiento de los síntomas motores (temblores, rigidez y bradicinesia) consiste en sustituir la pérdida de dopamina mediante el uso de levodopa, precursor de la dopamina. Otros tipos de fármacos utilizados para el tratamiento son los agonistas dopaminérgicos, cuya función es estimular los receptores

dopaminérgicos; se utilizan también inhibidores de la enzima monoamina oxidasa (MAO), enzima que degrada la dopamina, por lo que mantienen la dopamina activa por más tiempo en el cerebro. Otro tipo de tratamiento es mediante fármacos anticolinérgicos que inhiben la actividad de la acetilcolina, cuyos efectos son opuestos a los de la dopamina. Algunos casos son tratables con una cirugía llamada estimulación cerebral profunda en donde se implantan electrodos para ayudar a controlar los síntomas de la enfermedad. El ejercicio físico también resulta eficaz en el tratamiento [13].

Se han encontrado similitudes entre modelos animales y el padecimiento que incluyen distintos mecanismos de muerte celular en la *substancia nigra* a partir de la disrupción de funciones mitocondriales, peroxidación de lípidos, acumulación incrementada de hierro libre y un incremento en la actividad de la enzima dismutasa de superóxido [14].

La enfermedad de Parkinson fue la primera enfermedad neurodegenerativa en ser estudiada a través de modelos animales, y con base en la experimentación y estudios clínicos se desarrolló un tratamiento de reemplazo de neurotransmisores utilizando L-DOPA para cubrir la deficiencia de dopamina con cierto éxito, pero el tratamiento no logra detener la degeneración progresiva de la enfermedad [6]. Es por esto que investigadores continúan estudiando la EP utilizando modelos animales. En éstos se producen daños neurológicos utilizando una sustancia química, comúnmente 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) o bien 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), las cuales producen daño selectivamente a neuronas dopaminérgicas generando síntomas muy parecidos a los de

la enfermedad [15].

Aunque se ha ligado la enfermedad a diferentes factores de riesgo genéticos, exposición tóxica, aspectos infecciosos y envejecimiento prematuro, desafortunadamente seguimos sin conocer su causa. Además, esta enfermedad no sólo afecta a aquellos en edades avanzadas pues se han reportado casos en personas menores de 40 años [16].

3.2 - Modelo animal de la enfermedad

Actualmente el modelo de la enfermedad de Parkinson (EP) más estudiado es el que utiliza como neurotoxina selectiva a neuronas dopaminérgicas la 6-hidroxi dopamina (6-OHDA). Esta sustancia genera daños muy similares a los de la EP y es exclusivo a neuronas dopaminérgicas, por lo que es un candidato ideal para un modelo de la enfermedad. En estudios recientes y utilizando la 6-OHDA como modelo de la enfermedad en cerebro de ratón, se ha comprobado la efectividad de la L-DOPA como neuroprotector hacia los efectos neurotóxicos de la 6-OHDA. Los resultados obtenidos en pruebas de laboratorio indican que los ratones tratados con L-DOPA, producen un flujo de cobre en el estriado de los animales lesionados significativamente más pequeño que en animales no tratados con L-DOPA [17].

En el modelo utilizado en la investigación se utiliza MPTP, que penetra en la barrera hematoencefálica y es metabolizado a MPP⁺ por las células gliales. Luego es absorbido por las neuronas mediante el transportador de dopamina causando daño mitocondrial al inhibir la cadena de transporte de electrones produciendo daño oxidativo y la activación de mecanismos moleculares de muerte celular programada. Otros modelos emplean paraquat y rotenona, originalmente empleados como herbicidas pero ligados al desarrollo de la enfermedad [18].

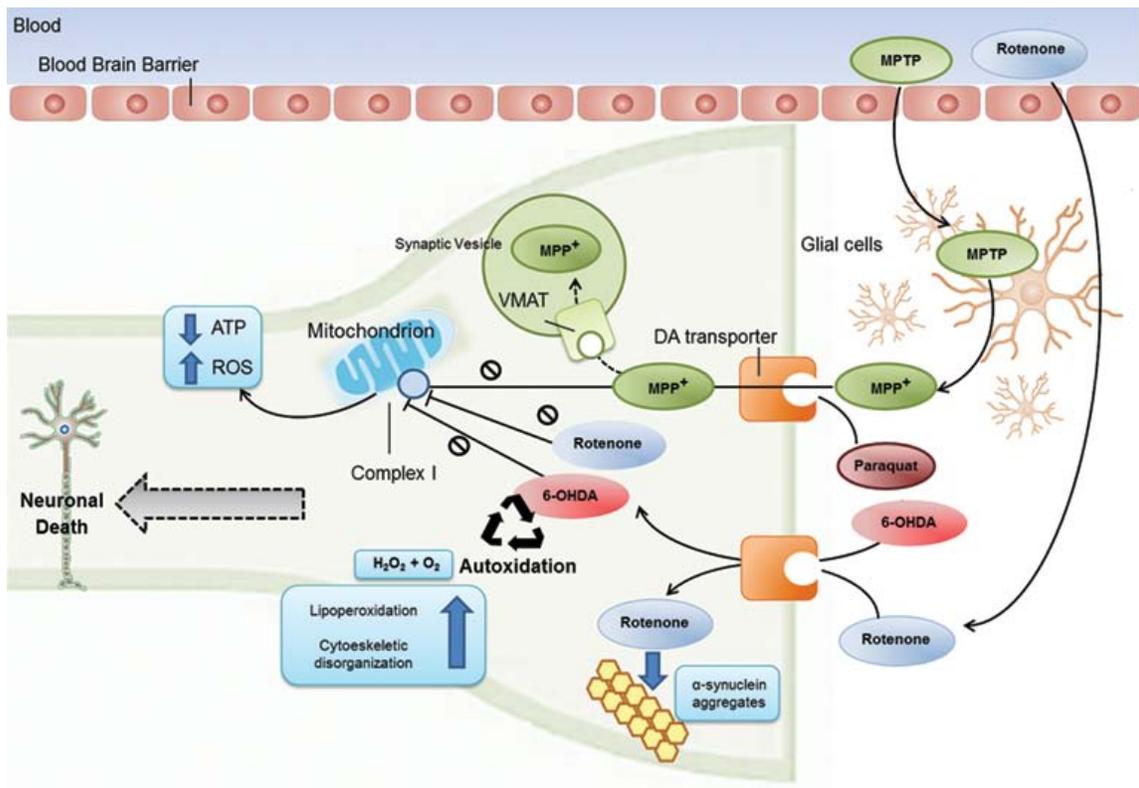
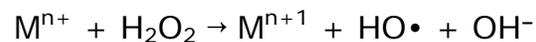


Figura 3.2 - Esquema de los modelos animales de la EP inducidos por neurotoxinas [18]

3.3 - Los metales cobre, hierro y manganeso en la enfermedad del Parkinson y el modelo animal

El hierro libre es responsable de incrementar el estrés oxidativo y de potenciar la neurodegeneración a través de la química de Fenton con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sin embargo, sólo ha sido detectado en estados avanzados de la enfermedad sugiriendo que la liberación del metal es una consecuencia de la enfermedad que promueve su agravamiento [19].

La reacción de Fenton puede ocurrir con varios cationes metálicos, produciéndose la degradación del peróxido en un ion hidróxido y un radical hidroxilo [20] como se muestra a continuación:



El hierro libre se ha ligado también a la producción de radicales libres y de la peroxidación de lípidos con catecolaminas [19]. Además, se ha reportado que una inyección directa de Fe(III) a la *sustancia nigra* de la rata causa síntomas de parkinsonismo y una disminución del contenido dopaminérgico en un 95 % [21]. En adición a esto, se ha reportado un efecto neuroprotector a partir del uso de agentes quelantes de hierro previos al tratamiento con MPTP, lo cual parece indicar que el hierro libre es un agente potenciador de la degeneración [22].

El cobre es un metal de transición esencial en la bioquímica del organismo, actuando como grupo prostético para diversas enzimas involucradas en la respiración celular, en la síntesis de catecolaminas, en la oxidación del hierro y en el sistema antioxidante [23]. El uso de agentes quelantes específicos al cobre previo al tratamiento con

MPTP, propicia la neurodegeneración en roedores [24]. Además, se ha demostrado que la administración de cobre (en forma de CuSO_4) previo al tratamiento con MPP^+ actúa como neuroprotector contra sus efectos neurotóxicos [25], así como un incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa en ratones [26], lo que sugiere que el cobre es responsable de la neuroprotección contra el radical superóxido. Es relevante añadir que se ha reportado contenido de cobre disminuido en pacientes con la enfermedad de Parkinson [27], sus efectos neuroprotectores se vuelven relevantes en el caso de una deficiencia para esta enfermedad.

En el metabolismo del oxígeno se produce el radical superóxido (O_2^-) y de no ser regulado puede producir daño celular. La enzima superóxido dismutasa (SOD) es responsable de eliminar el O_2^- y el manganeso juega un rol como cofactor de ésta. Se piensa que el metal podría estar relacionado con la enfermedad jugando un papel importante para acelerar el desarrollo de ésta. Además, se sabe que la exposición al manganeso puede causar neurotoxicidad y un síndrome neurológico muy similar a la enfermedad del Parkinson. Se diferencia de la enfermedad del Parkinson en que el manganeso se acumula y daña el globo pálido, en lugar de la sustancia negra [28].

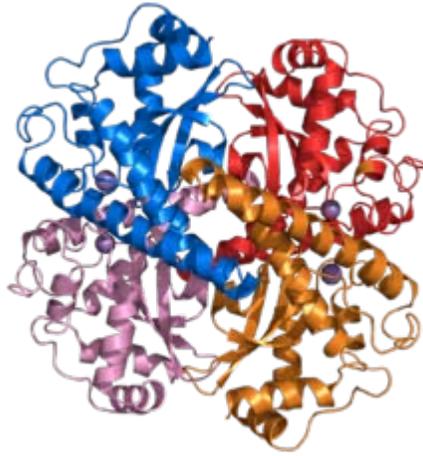
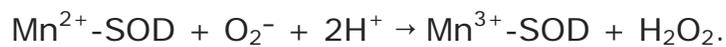
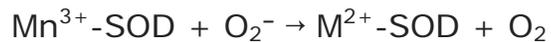


Figura 3.3 - Estructura de la enzima que contiene manganeso superóxido dismutasa humana 2 [29]

La enzima SOD es responsable de dismutar el superóxido (O_2^-) en oxígeno molecular (O_2) o bien en peróxido (H_2O_2), por lo que tiene una importante función biológica al actuar en el sistema antioxidante, protegiendo a las neuronas y otras células. Involucra la reducción y oxidación de un metal catalítico, en este caso el manganeso, en el sitio activo de ésta.



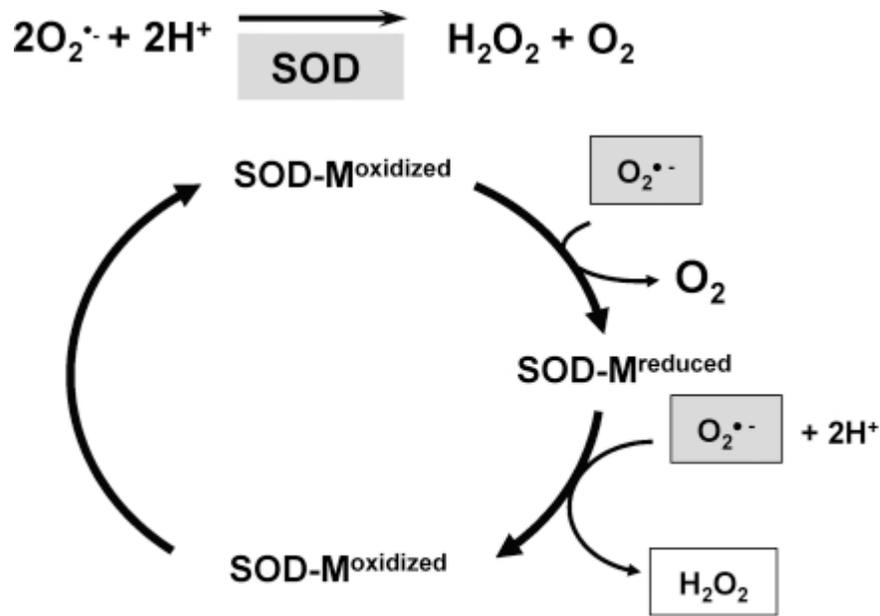


Figura 3.4 - Mecanismo de dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ por la enzima SOD [30]

3.4 - Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica es una técnica con la cual se puede realizar el análisis cuantitativo de elementos traza en una buena variedad de materiales. Con este método es posible obtener una alta sensibilidad para una amplia gama de elementos, así como una alta selectividad en los análisis de éstos. Por estas razones, son diversos los campos de aplicación de esta técnica analítica [31].

Esta técnica consiste en la medición de las especies atómicas por su absorción a una longitud de onda particular. La especie atómica se lleva a un estado gaseoso y se atomiza utilizando un programa de temperaturas. La técnica más utilizada es la de Absorción Atómica con flama o llama, donde se crea un nebulizado de la muestra y luego se

disemina dentro de una flama. En este experimento se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito.

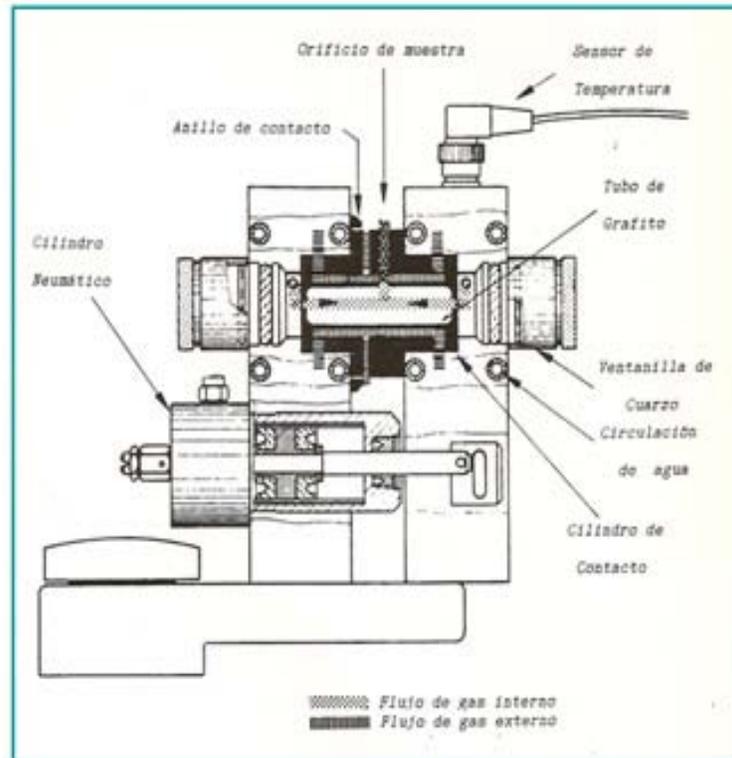


Figura 3.5 - Esquema de un horno de grafito para obtención de átomos en estado fundamental en espectroscopía de absorción atómica [32]

IV. OBJETIVO E HIPÓTESIS

El objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad de Parkinson relacionada con los metales en el cerebro. Específicamente se midieron los niveles de cobre, hierro y manganeso en el medio extracelular en el modelo animal del Parkinson en cerebro de rata inducido por la administración

in vitro de yoduro de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), metabolito activo del MPTP y responsable del daño selectivo a las neuronas dopaminérgicas, a tejido obtenido del estriado de la rata con el fin de entender más a fondo los mecanismos de daño de esta neurotoxina.

Se producirían aumentos significativos en los niveles extracelulares del Cobre, Hierro y Manganeso, ya que están relacionados con los mecanismos del sistema antioxidante del cuerpo, además de estar ligados a la EP por sus funciones en la bioquímica cerebral y su toxicidad.

V. MÉTODOS:

5.1 - Sitio de estudio

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) de la Ciudad de México, en el Departamento de Neuroquímica y sus laboratorios. Se utilizó el apoyo del bioterio de la institución con el fin de obtener animales para los experimentos.

5.2 - Sistema de estudio

El sistema de estudio que se utilizó fue el cerebro de rata. Específicamente se utilizaron ratas de la cepa Wistar blancas; fueron sacrificadas por ya no tener un valor experimental por su avanzada edad. Sin embargo, fueron de utilidad para estos experimentos puesto que se realizó *in vitro*.

5.3 - Métodos:

5.3.1 - Preparación de la disolución de nutrientes buffer de Krebs-Ringer:

Se preparó una disolución buffer de Krebs-Ringer que se utilizó como medio extracelular artificial con el fin de mantener las muestras conservadas y las neuronas viables. Contiene lo que se describe a continuación:

- NaCl 119 mM
- NaHCO₃ 12 mM
- Glucosa 11.1 mM
- CaCl₂.H₂O 1.6 mM
- KH₂PO₄ 1.2 mM
- MgSO₄.7H₂O 1.2 mM
- KCl 4.7 mM

5.3.2 - Preparación de la disolución de MPP⁺:

En un tubo Eppendorf de 1 mL de capacidad se agregaron 0.0024 g de MPP⁺I⁻ y 1 mL de disolución salina comercial. Esta disolución se preparó para obtener una concentración de MPP⁺ 15 µM.

5.3.3 - Animales:

En este estudio se utilizaron ratas Wistar hembra. Se hospedaron en jaulas de acrílico y fueron colocadas en un cuarto con condiciones de temperatura y humedad constante. Se les

proporcionaron croquetas para rata comerciales y agua *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados siguiendo los lineamientos institucionales de manejo de animales de laboratorio.

5.3.4 - Disección de las muestras:

Se realizó la disección del cerebro de rata de acuerdo con lo reportado con Iversen y Glowinski [33] para obtener muestras del cuerpo estriado de la siguiente manera: Primeramente se sacrifica la rata utilizando una guillotina para desprender el cráneo. Seguido de esto y utilizando pinzas, se extrae el cerebro y se pone en una bandeja de Pietri sobre hielo. Se desechan los lóbulos olfatorios y el cerebelo. Se separan los hemisferios y se cortan a la mitad con el fin de hacer visible el estriado. Seguido se extrae el cuerpo estriado y utilizando láminas de microscopio y una navaja de afeitar bien afilada se rebana cuidadosamente para obtener las muestras de tejido de acuerdo con lo reportado por Mcilwain [34]. Este procedimiento se basa en el método de disección de Klingler, quien fue el primero en describir la disección de fibras en el cerebro humano al congelarlas para poder separarlas [35].

5.3.5 - Equipo empleado

El análisis se realizó utilizando un equipo para espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito marca Perkin Elmer modelo AAnalyst 600 con automuestreador.

5.3.6 - Muestreo del medio extracelular:

El tubo se enjuaga previamente con la disolución buffer y se desecha para minimizar errores por contaminación. Se colocan 4

rebanadas de estriado en un tubo de ensayo con 2.5 mL de la disolución buffer medio extracelular. Se introducen los tubos a un baño térmico y de agitación a 37 °C. A los 10 minutos se toma una muestra control de 0.6 mL de la disolución y se agrega 0.1 mL de la disolución de MPP⁺ 15 µM con el fin de alcanzar una concentración 1 µM en las muestras. Se muestrea otra vez a los 30 minutos después de agregar la neurotoxina, la cantidad de 0.5 mL del medio extracelular. Se repite la operación a los 60 minutos. Finalizado el muestreo se congelan los tubos con el tejido para posterior cuantificación proteica.

5.3.7 - Cuantificación de metales por espectroscopía de absorción atómica:

La cuantificación se realizó en el equipo de absorción atómica AAnalyst 600. Como estándar de referencia para el análisis de los metales se utilizó el GFAAS Mixed Standard marca Perkin Elmer con n° de lote 31-102AS con las siguientes especificaciones:

-100 µg/mL de Al, As, Pb, Sb, Se y Tl.

-50 µg/mL de Ba, Co, Cu y Ni.

-30 µg/mL de Co, Fe, Mn.

-10 µg/mL de Ag.

-5 µg/mL Be, Cd.

5.3.7.1 - Análisis de cobre:

El intervalo de trabajo utilizado fue de 1-15 ppb. Se utilizó el estándar GFAAS en concentraciones de 10 y 20 ppb para realizar la calibración. Se utilizó una lámpara de cobre con longitud de onda $\lambda=324.8$ nm, slit width: 0.7 L (nm). Se obtuvo una señal de tipo AA-BG que mide el área de los picos. El tiempo de lectura utilizado fue de 3.0 segundos. No se utilizó modificador de matriz.

El automuestreador inyectó 20 μ L en el horno de grafito para su análisis mediante el siguiente programa de temperaturas:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de retención (s)	Flujo interno (pie³/min)
1	110	8	40	250
2	700	8	15	250
3 (Lectura)	1 900	0	3	0
4	2 450	2	2	250

Tabla 5.1 - Programa de temperatura para el análisis de cobre por espectroscopía de absorción atómica

5.3.7.2 - Análisis de manganeso:

El intervalo de trabajo fue de 1-15 ppb. Se utilizó el estándar GFAAS en 2 y 20 ppb para realizar la calibración. Se utilizó una lámpara de manganeso con longitud de onda $\lambda=279.5$ nm, slit width: 0.2 L (nm). Se obtuvo una señal de tipo AA-BG midiendo el área de los picos. El tiempo de lectura fue de 2.0 segundos. Se utilizó $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y Tritón X-100 (0.01 %) como modificadores de matriz para obtener una lectura más precisa (se realiza una dilución 1:1 con el modificador y la muestra).

El automuestreador inyectó 20 μL en el horno de grafito para su análisis mediante el siguiente programa de temperaturas:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de retención (s)	Flujo interno (pie^3/min)
1	110	8	40	250
2	700	8	15	250
3 (Lectura)	1 900	0	3	0
4	2 450	2	2	250

Tabla 5.2 - Programa de temperatura para el análisis de manganeso por espectroscopía de absorción atómica

5.3.7.3 - Análisis de hierro:

El intervalo de trabajo utilizado fue de 2-20 ppb. Se utilizó el estándar GFAAS en concentración de 8 y 20 ppb para realizar la calibración. Se utilizó una lámpara de hierro con longitud de onda $\lambda=248.3$ nm, slit width: 0.2 L (nm). Se obtuvo una señal de tipo AA-BG midiendo el área de los picos. El tiempo de lectura fue de 3.0 segundos. Se realizó una dilución 1:5 de las muestras para el análisis de hierro con HNO_3 para entrar al intervalo de trabajo. No se utilizó modificador de matriz.

El automuestreador inyectó 20 μL en el horno de grafito para su análisis mediante el siguiente programa de temperaturas:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de retención (s)	Flujo interno (pie^3/min)
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	1 400	10	20	250
4 (Lectura)	2 100	0	3	0
5	2 450	1	3	250

Tabla 5.3 - Programa de temperatura para el análisis de hierro por espectroscopía de absorción atómica

Los programas de temperatura, así como los métodos utilizados en el espectrofotómetro de absorción atómica se obtuvieron con base en el manual de usuario proporcionado por Perkin Elmer; se utilizaron las condiciones recomendadas en el manual.

5.3.8 - Análisis de proteínas en las rebanadas de estriado.

5.3.8.1 - Homogeneización de las muestras:

Los remanentes de las muestras se homogenizan usando un tubo para homogeneización y un pistilo para homogeneización (de 2 mL).

5.3.8.2 - Preparación del análisis:

Se utilizó el método de cuantificación de proteínas descrito por Lowry, Rosebrough, Farr y Randall [36]. Se diluyeron las muestras 1:20 con un volumen final de 1 mL. Se utilizaron los siguientes reactivos: NaOH 0.1 N, Na₂CO₃ 2 % en NaOH 0.1 N, tartrato de sodio y potasio al 2 %, sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) al 1 %. Se mezclan 0.5 mL de disolución de tartrato de sodio y potasio al 2 % con 0.5 mL de disolución de CuSO₄ 1 %. Se agregan 49 mL de Na₂CO₃ al 2 % en NaOH 0.1 N. Se realiza una curva de calibración con albúmina bovina (12.5 mg en 25 mL H₂O) en el espectrofotómetro de UV-visible.

-Se diluyó la muestra 1:20 y se preparó un homogeneizado de tejido.

-Se tomaron 0.2 mL de la muestra diluida.

-Se agregó 1 mL de disolución A. Se agitó en vortex y se dejó reposar 30 minutos.

-Se agregaron 100 μ L del reactivo folin fenol diluido 1:1.

-20 minutos después, se tomó una lectura en el espectrofotómetro a $\lambda=550$ nm en el espectrofotómetro UV-visible.

5.3.9 - Análisis estadístico:

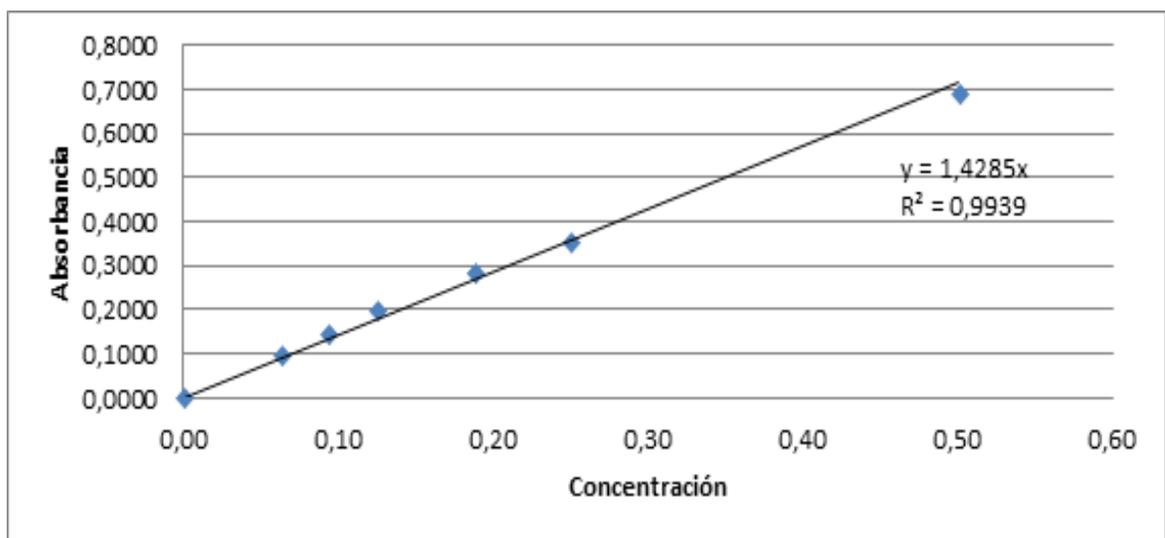
Se utilizó la prueba de hipótesis mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA), realizada en Microsoft Excel, con el fin de utilizar parámetros estadísticos para definir si hay cambios cuantitativos en la concentración de los metales estudiados en medio extracelular. La significación estadística fue de 95 % ($\alpha=0.05$).

VI. RESULTADOS

6.1 - Curva de calibración para el análisis de proteínas:

Tubo	Vol. disolución de albúmina (µL)	Agua (µL)	Concentración (µg/µL)	µg de proteína
A	0	200	0	0
B	25	175	0.0625	12.5
C	37.5	162.5	0.0936	18.75
D	50	150	0.125	25
E	75	125	0.1875	37.5
F	100	100	0.25	50
G	200	0	0.5	100

Tabla 6.1 - Preparación de la curva de calibración para el análisis proteico



Gráfica 6.1- Curva de calibración realizada para el análisis del contenido proteico de las muestras

La curva fue lineal en el intervalo de concentraciones seleccionado (0-0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). El coeficiente de determinación de la curva fue $R^2=0.9939$. No hay ordenada al origen.

La ecuación de la curva fue: $y = 1.4285x$

Utilizando esta curva se obtuvo la cantidad de proteína de cada muestra por interpolación. Se expresaron los resultados obtenidos como la concentración del analito (Cu, Fe y Mn) en ppb, por la cantidad de proteína en el tejido, en mg. Esto con el objetivo de obtener un resultado normalizable entre muestras y con el fin de corregir los resultados por la cantidad de células presentes en cada rebanada de tejido.

6.2 Cuantificación de hierro en medio extracelular:

El espectrofotómetro se calibró automáticamente utilizando el estándar GFAAS con un intervalo de trabajo de 2-20 ppb obteniendo una curva de calibración con coeficiente de determinación $R^2>0.99$; en el caso que el coeficiente obtenido fuera $R^2<0.99$, se recalibraba automáticamente el espectrofotómetro.

El límite de detección reportado por el fabricante para Fe en espectroscopía de AA con horno de grafito es de 0.06 ppb [37]. En el laboratorio de Neuroquímica del INNN se ha trabajado con concentraciones menores a 1 ppb [38].

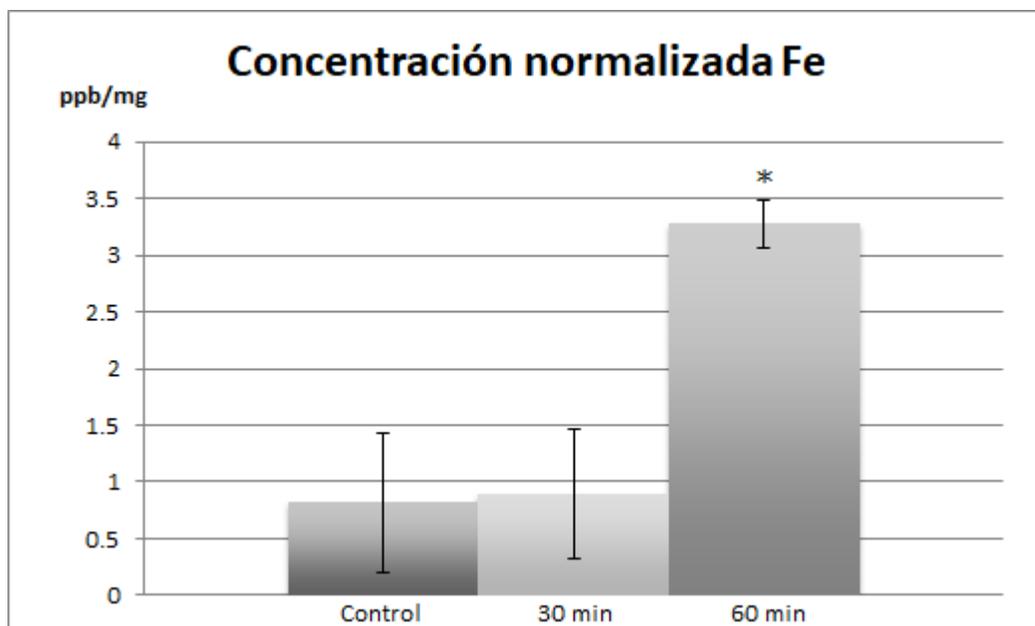
Se realizaron las mediciones y se normalizaron los resultados corrigiendo la concentración de hierro (ppb) en medio extracelular por la cantidad de proteína (mg) obtenida del tejido de las muestras. Las unidades utilizadas fueron ppb/mg.

Concentración normalizada = concentración medida/cantidad de proteína

A continuación se presenta una tabla y la gráfica correspondiente a los resultados promedio del análisis.

Concentración normalizada Fe (ppb/mg)			
	Control	30 min	60 min
1	0.716	0.809	7.587
2	1.204	1.130	2.136
3	0.176	0.419	1.515
4	1.183	1.229	1.867
Promedio	0.819	0.897	3.276
Desviación estándar	1.236	1.135	0.415

Tabla 6.2 – Resultados normalizados para el análisis de hierro



Gráfica 6.2 – Resultados del análisis de hierro. * $p \geq 0.05$

Al ver la gráfica a simple vista, hubo una liberación de hierro al medio extracelular después de 60 minutos. El valor de $p=0.12$ y además $p > 0.05$, por lo que los resultados no son significativos.

6.3 Cuantificación de manganeso en medio extracelular:

El espectrofotómetro se calibró automáticamente utilizando el estándar GFAAS con un intervalo de trabajo de 1-15 ppb. Se obtuvo una curva de calibración con coeficiente de determinación $R^2 > 0.99$; en el caso que el coeficiente obtenido fuera $R^2 < 0.99$, se recalibraba automáticamente el espectrofotómetro.

El límite de detección reportado por el fabricante para Mn en espectroscopía de AA con horno de grafito es de 0.005 ppb [37]. En el laboratorio está reportado un límite de detección de 0.5 ppb [39].

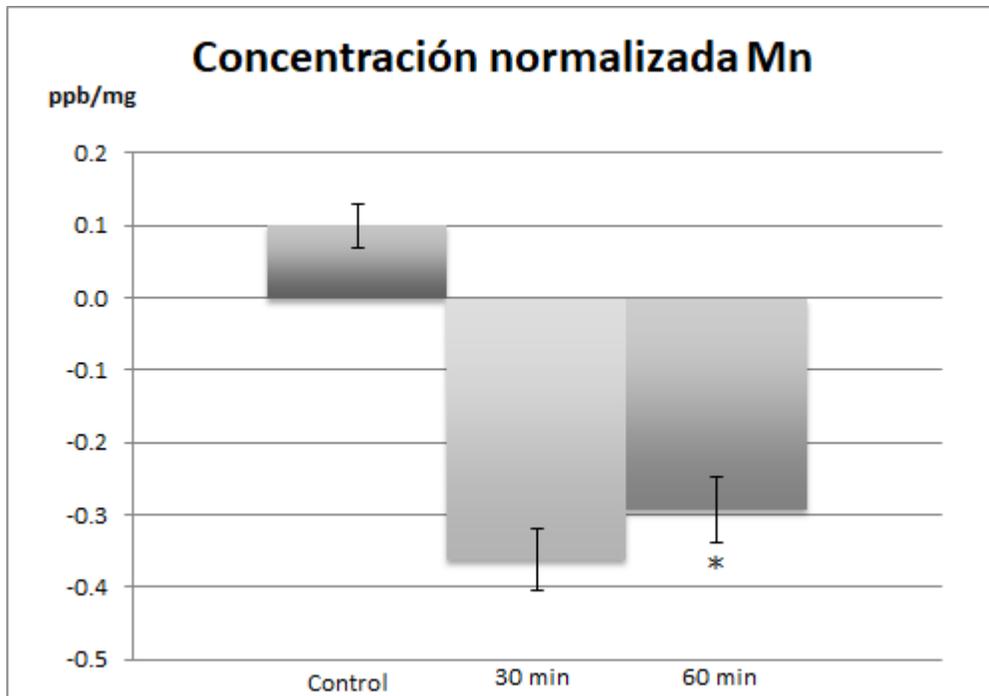
Se realizaron las mediciones y se normalizaron los resultados corrigiendo la concentración de manganeso (ppb) en medio extracelular por la cantidad de proteína (mg) obtenida del tejido de las muestras. Las unidades utilizadas fueron ppb/mg.

$$\text{Concentración normalizada} = \frac{\text{concentración medida}}{\text{cantidad de proteína}}$$

A continuación se presenta una tabla y una gráfica con los resultados promedio del análisis.

Concentración normalizada Mn (ppb/mg)			
	Control	30 min	60 min
1	0.051	-0.080	-0.138
2	0.026	-0.523	-0.200
3	0.224	-0.482	-0.545
Promedio	0.100	-0.362	-0.294
Desviación estándar	0.060	0.084	0.090

Tabla 6.3 - Resultados normalizados del análisis de manganeso



Gráfica 6.3 - Resultados del análisis de manganeso. * $p \geq 0.05$

Se puede observar una disminución en la concentración del manganeso en medio extracelular. El valor de $p=0.06$ y además $p > 0.05$ por lo que consideramos que los resultados obtenidos no son significativos.

6.4 - Cuantificación de cobre en medio extracelular:

El espectrofotómetro se calibró automáticamente utilizando el estándar GFAAS con un intervalo de trabajo de 1-15 ppb. Se obtuvo una curva de calibración con coeficiente de determinación $R^2 > 0.99$; en el caso que el coeficiente obtenido fuera $R^2 < 0.99$, se recalibraba automáticamente el espectrofotómetro.

El límite de detección reportado por el fabricante para Cu en espectroscopía de AA con horno de grafito es de 0.014 ppb [37]. En el laboratorio se han medido concentraciones por debajo de 1 ppb [38].

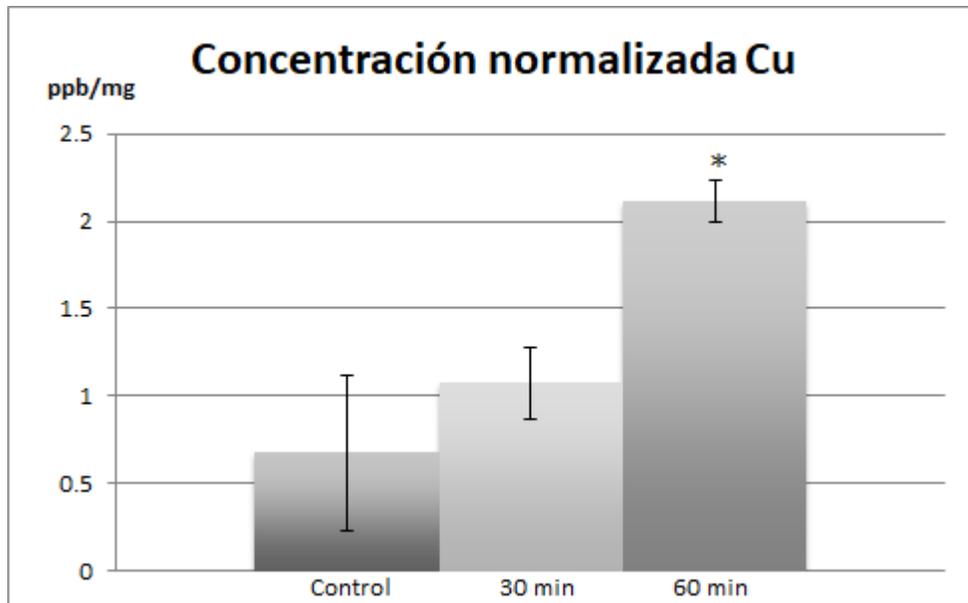
Se realizaron las mediciones y se normalizaron los resultados corrigiendo la concentración de cobre (ppb) en medio extracelular por la cantidad de proteína (mg) obtenida del tejido de las muestras. Las unidades utilizadas fueron ppb/mg.

$$\text{Concentración normalizada} = \frac{\text{concentración medida}}{\text{cantidad de proteína}}$$

A continuación se presenta una tabla y una gráfica con los resultados promedio del análisis de cobre.

Concentración normalizada Cu (ppb/mg)			
	Control	Krebs MPP ⁺ 30 min	Krebs MPP ⁺ 60 min
1	0.467	0.852	1.388
2	0.582	1.246	2.196
3	0.308	1.080	2.228
4	1.034	1.203	2.583
5	0.495	0.588	1.663
6	1.167	1.467	2.640
Promedio	0.675	1.073	2.117
Desviación estándar	0.888	0.407	0.242

Tabla 6.4 - Resultados normalizados del análisis de cobre



Gráfica 6.4 - Resultados del análisis de cobre. * $p \geq 0.05$

Se observa un aumento en la cantidad de cobre del medio extracelular para ambas muestras a los 30 y 60 min. El valor de $p = 4 \times 10^{-5}$ y además $p < 0.05$ por lo que consideramos que los resultados obtenidos son significativos.

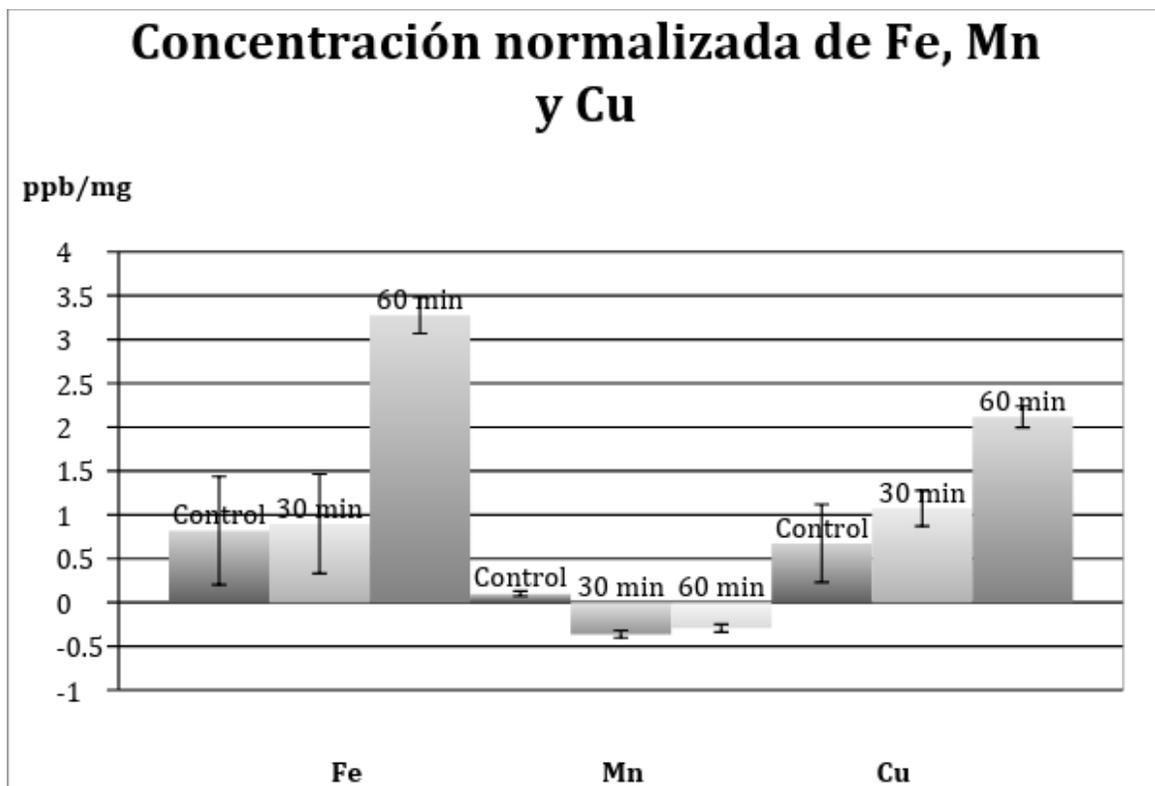
6.5 - Resultados promedio del análisis de cobre, hierro y manganeso:

En la siguiente tabla se muestran los resultados promedio del análisis de los tres metales con su desviación estándar:

Concentraciones normalizadas de cobre, hierro y manganeso (ppb/mg)			
	Control	30 min	60 min
Fe	0.819 ± 1.236	0.897 ± 1.135	3.276 ± 0.415
Mn	0.100 ± 0.060	-0.362 ± 0.084	-0.294 ± 0.090
Cu	0.675 ± 0.888	1.073 ± 0.407	2.117 ± 0.242

Tabla 6.5 - Resultados promedio del análisis de cobre, hierro y manganeso

Se muestra a continuación el conjunto de los tres análisis en una misma gráfica para fines comparativos:



Gráfica 6.5 - Resultados del análisis de cobre, hierro y manganeso.

VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se realizó una prueba de hipótesis estadística mediante un análisis de varianza de un factor con significación estadística de 95 % ($\alpha=0.05$) con el fin de determinar si los resultados presentan cambios significativos, o bien, no son de interés estadístico. Se reportan los resultados como el promedio de las mediciones con su desviación estándar.

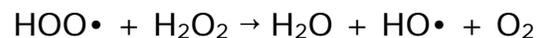
Para el manganeso, los resultados no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($F(2,6)=4.70$, $p=0.06$, $F \text{ crit}=5.14$). Sin embargo, resulta interesante observar una pequeña disminución en la concentración del medio extracelular del metal (ver tabla 6.5) del control 0.100 ± 0.062 ppb/mg a -0.362 ± 0.141 ppb/mg a los 30 minutos de acción del MPP⁺ y -0.294 ± 0.127 ppb/mg a los 60 minutos, aunque no fue posible determinar si el cambio se debe al efecto de la neurotoxina, a un error en la medición o falta de sensibilidad del método. Es probable que sea lo primero debido a la acción del MPP⁺ en un incremento de actividad en la SOD-Mn [40], lo cual podría inducir la absorción del metal de medio extracelular para compensar el exceso de actividad de esta enzima. Es por esto que se recomendaría realizar una investigación más extensa expandiendo el tiempo de acción de la neurotoxina, así como el número de muestras, con la intención de poder determinar los efectos del tratamiento en la concentración extracelular de manganeso a tiempos más largos. También podría usarse un método más sensible, como la espectrometría de masas acoplada a plasma inductivamente acoplado [41]. Estos resultados pueden corroborarse al realizar adicionalmente un análisis de la cantidad de manganeso intracelular, comparar los

datos en el medio extracelular e intracelular. Sin embargo, este estudio sugiere que el manganeso, en principio, no es responsable de potenciar la disrupción enzimática y la falla del sistema antioxidante del sistema inmunológico en el tratamiento con MPP⁺.

Para el caso del cobre los resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa ($F(2,15)=21.46$, $p=4 \times 10^{-5}$, $F_{crit}=3.68$). Podemos observar una liberación gradual del metal, de 0.675 ± 0.140 ppb/mg al iniciar el estudio, a los 30 minutos de acción de la neurotoxina se observa un aumento a 1.073 ± 0.127 ppb/mg, finalmente liberándose hasta 2.117 ± 0.204 ppb/mg a los 60 minutos (ver tabla 6.5). Esto indica un posible daño enzimático en las primeras etapas de acción de la neurotoxina en el sistema nervioso, ya que el cobre es un metal esencial para el funcionamiento bioquímico de la célula y funciona como grupo prostético de varias enzimas ligadas a la respiración celular, además de estar ligado a la síntesis de catecolaminas y a la oxidación del hierro [42]. Es importante recalcar este resultado ya que parece indicar la disrupción del sistema antioxidante a partir del cobre, y con base en esto, un subsecuente daño al mecanismo de oxidación de hierro con su posterior liberación al medio extracelular debido a la incapacidad de la célula de mantener sus funciones bioquímicas adecuadas; además, se ha demostrado que la administración de cobre en forma de CuSO_4 como suplemento, previo al tratamiento *in vivo* con MPP⁺, tiende a atenuar los efectos neurotóxicos del MPP⁺; también se ha demostrado su toxicidad puesto que presenta reacciones de la química de Fenton y puede producir daños oxidativos al sistema nervioso [43]. El cobre resulta de gran interés debido a sus propiedades tanto tóxicas, como neuroprotectoras. Adquiere gran importancia notar la liberación

gradual de este metal a medio extracelular y sería recomendable corroborar los resultados realizando análisis de la concentración de Cu en medio intracelular. Sin embargo, hay evidencia sustancial de una depleción de cobre en el sistema nervioso con base en el tratamiento con MPTP [44], lo que indica posiblemente que el cobre libre sea responsable de potenciar los daños producidos por la neurotoxina mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres.

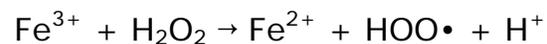
A continuación se muestra la química de fenton que posibilita la liberación del cobre:



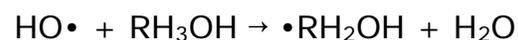
En el caso de hierro, no hay una diferencia estadística significativa en los resultados ($F(2,9)=2.69$, $p=0.12$, $F \text{ crit}=4.26$). La concentración se mantiene prácticamente igual después de 30 minutos de la inyección con MPP^+ , comparando el resultado control de 0.819 ± 0.242 ppb/mg contra 0.897 ± 0.183 ppb/mg a los 30 minutos de acción del MPP^+ . Sin embargo, es clara la liberación del metal al medio extracelular para la muestra tomada después de los 60 minutos de acción de la neurotoxina, en donde aumenta la concentración de hierro hasta 3.276 ± 1.443 ppb/mg. Esto podría ser un indicador de que el hierro se libera a partir de daños causados con base en la química de Fenton potenciada con cobre libre en medio

extracelular. Se ha demostrado que el tratamiento con MPP⁺ produce una disminución sustancial en la enzima de la ferroxidasa [45], lo cual concuerda con la liberación del metal a medio extracelular, además potenciando la degeneración mediante la formación adicional de radicales libres y superóxidos. Se ha propuesto que el hierro potencia los daños neurodegenerativos al incrementar la formación de especies oxidativas, ya que se ha encontrado acumulado en la sustancia negra de pacientes con estados avanzados de la enfermedad [46]. Sin embargo, se piensa que éste es un factor consecuente al desorden degenerativo, potenciando el desorden con un mayor estrés oxidativo al aparato neuronal.

La liberación de hierro potencia los daños oxidativos mediante la química de Fenton que se describe a continuación:



Adicionalmente, los radicales formados pueden generar una reacción en cadena formando radicales libres orgánicos:



Es esta reacción en cadena generada por los radicales libres se considera la responsable de potenciar el daño generado por la neurotoxina, produciendo la degeneración progresiva del sistema nervioso.

Sin duda el interés de los resultados obtenidos radica en la liberación del cobre como principal mecanismo de potenciación al daño degenerativo, posteriormente observándose la liberación del

hierro al medio extracelular. Queda claro, debido a la química de Fenton, que la liberación de metales es responsable de producir un mayor estrés oxidativo. Sin embargo, no es posible concluir si la liberación del cobre se produce debido a la degeneración del sistema respiratorio o bien por un daño al sistema antioxidante gracias a la acción del MPP⁺. Se espera una disminución en la actividad de ferroxidasa conjunta a la liberación de hierro. Esto podría corroborarse con una investigación posterior midiendo actividades de ferroxidasa contra la concentración de hierro libre en medio extracelular.

La cuantificación de los metales cobre, hierro y manganeso por espectroscopía de absorción atómica en medio extracelular para el modelo animal de la EP por tratamiento con MPP⁺ fue exitosa. El experimento fue satisfactorio ya que con poca cantidad de muestras y de reactivos obtuvimos resultados cuantitativos y valiables para el conocimiento de los daños producidos en el modelo animal de la EP mediante el tratamiento con MPP⁺. El presente estudio podría ampliarse modificando algunos parámetros experimentales tal como el tiempo de contacto de la neurotoxina con el tejido neuronal, para observar el efecto de ésta después de 60 minutos de acción en el tejido; así como aumentar la cantidad de muestras utilizadas, para obtener resultados con mayor precisión. Una limitación del presente estudio es el hecho de que las muestras se analizaron únicamente en el medio extracelular; razón por la cual se realizó una homogeneización de las muestras con la cantidad de proteína en éstas. El estudio puede complementarse mediante la cuantificación de los metales en el tejido, antes y después del tratamiento y no sólo en medio extracelular, con el fin de obtener un resultado comparativo. Además, se podría ampliar más allá el estudio incluyendo pruebas de

estrés oxidativo mediante análisis de fluorescencia, así como una cuantificación de zinc por su asociación a la SOD Cu/Zn.

A manera de conclusión podemos decir que el daño producido con la neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridinio produce una liberación gradual de cobre a medio extracelular, seguido con una fuerte liberación de hierro. Esto puede observarse claramente en la gráfica comparativa, en donde se ve la primera liberación de cobre a los 30 minutos del tratamiento, así como una fuerte liberación de hierro a los 60 minutos del tratamiento, así como una posterior liberación de cobre a los 60 minutos. El tratamiento no tiene un efecto cuantitativo en la concentración extracelular de manganeso. Los resultados hacen pensar que posiblemente los daños producidos al sistema neurológico ocurran primeramente dentro de los mecanismos que incluyen al cobre, liberándose al medio extracelular y produciendo daño oxidativo adicional al sistema nervioso por medio de la formación de especies oxidantes reactivas a través de la química de Fenton con este metal de transición en su estado libre. El daño continúa incrementando conforme se libera gradualmente el hierro. Sin embargo, hace falta continuar con las investigaciones para determinar precisamente cómo y en dónde ocurre el daño.

El desarrollo de nuevos tratamientos experimentales dependerá en gran medida de nuestro entendimiento de la enfermedad, por lo que resulta crucial que se continúen las investigaciones sobre la EP pues es un grave problema de salud que afecta a nuestra sociedad y de la que aún no se conoce la causa exacta.

VIII. LITERATURA CONSULTADA

[1] L. J. Ramírez-Jirano, J. L. Ruiz-Sandoval, F. J. Jiménez-Gil, J. Ramírez-Vega, E. Vargas-Frutos, M. Patricia Gallegos-Arreola, Polimorfismo -116C-G del gen α -sinucleína en pacientes con enfermedad de Parkinson. *Salud Pública de México*, 48 (4), 2006, 289-290.

[2] E.R. Dorsey, R. Constantinescu, J.P. Thompson, K.M. Biglan, R.G. Holloway, K. Kiebertz, F.J. Marshall, B.M. Ravina, G. Schiffito, A. Siderowf, C.M. Tanner, Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68, 2007, 384-386.

[3] F. Azevedo, L.R. Carvalho, L.T. Grinberg, J.M. Farfel, R.E. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent, S. Herculano-Houzel, Equal Numbers of Neuronal and Nonneuronal Cells Make the Human Brain an Isometrically Scaled-Up Primate Brain. *Journal of Comparative Neurology*, 513, 2009, 532-541.

[4] Dr. Biology, Anatomía de la Neurona, ASU - Ask A Biologist, 2017, recuperado de la página <https://askabiologist.asu.edu/anatomia-de-la-neurona>

[5] A. Björklund, O. Lindvall, Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature*, 3 (6), 2000, 537-544.

[6] K.L. Spalding, O. Bergmann, K. Alkass, S. Bernard, M. Salehpour, H.B. Huttner, E. Boström, I. Westerlund, C. Vial, B.A. Buchholz, G. Possnert, D.C. Mash, H. Druid, J. Frisén, Dynamics of hippocampal neurogenesis in human adults. *Cell*, 153 (6), 2013, 1219-1227.

- [7] R. Betarbet, T.B. Sherer, J.T. Greenamyre, Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays*, 24, 2002, 308-318.
- [8] J.C. Lee, J.E. Kim, E.V. Pletneva, J. Faraone-Mennella, H.B. Gray and J.R. Winkler, Protein folding, misfolding, and disease. *Neurodegenerative Diseases and Metal Ions*, 1, 2006, 9–60.
- [9] E. Hirsch, A.M. Graybiel, Y.A. Agid, Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*, 334, 1988, 345–348.
- [10] I.G. McKeith, D. Galasko, K. Kosaka, E.K. Perry, D.W. Dickson, L.A. Hansen, D.P. Salmon, J. Lowe, S.S. Mirra, E.J. Byrne, G. Lennox, N.P. Quinn, J.A. Edwardson, P.G. Ince, C. Bergeron, A. Burns, B.L. Miller, S. Lovestone, D. Collerton, E.N. Jansen, C. Ballard, R.A. de Vos, G.K. Wilcock, K.A. Jellinger, R.H. Perry, Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): Report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology*, 47 (5), 1996, 1113-1124.
- [11] F. Guzmán, Vías dopaminérgicas y antipsicóticos, 2017, recuperado de la página <http://psicofarmacologia.com/antipsicoticos/vias-dopaminérgicas-y-antipsicoticos>
- [12] M. Rodríguez, A. Cervantes, A. Ruiz, A. Arellano, Z. Trujillo, J. Hernández, L. Agüero, H.J. González, Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. México: Secretaría de Salud, 2010, 1-4.
- [13] R. García-Ramos, Tratamiento para el Parkinson - Asociación

Parkinson Madrid, 2016, recuperado de la página <https://www.parkinsonmadrid.org/el-parkinson/el-parkinson-tratamiento/>

[14] P. Jenner, Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 13 (1), 1998, 24–34.

[15] J. Lotharius, L.L. Dugan, K. L. O'Malley, Distinct Mechanisms Underlie Neurotoxin-Mediated Cell Death in Cultured Dopaminergic Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 19 (4), 1999, 1284–1293.

[16] A. Schrag, Y. Ben-Shlomo, R. Brown, C.D. Marsden, N. Quinn, Young-onset Parkinson's disease revisited-clinical features, natural history and mortality. *Movement Disorders*, 13 (6), 1998, 885-894.

[17] A. Sussulini, A. Matusch, M. Klietz, A. Bauer, Quantitative imaging of Cu, Fe, Mn and Zn in the L-DOPA-treated unilateral 6-hydroxydopamine Parkinson's disease mouse model by LA-ICP-MS. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 1, 2012, 125–136.

[18] J. Blesa, I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela and N. Lopez-Gonzalez del Rey, *Animal Models of Parkinson's Disease, Challenges in Parkinson's Disease*, 2016, recuperado de la página <https://mts.intechopen.com/books/challenges-in-parkinson-s-disease/animal-models-of-parkinson-s-disease>

[19] S. Rivera-Mancía, I. Pérez-Neri, C. Ríos, L. Tristán-López, L. Rivera-Espinosa, S. Montes, The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*, 186, 2010, 184-199.

[20] K. Barbusinski, Fenton reaction - controversy concerning the

chemistry, *Ecological Chemistry and Engineering*, 16 (3), 2009, 347-358.

[21] D. Ben-Shachar, M.B.H. Youdim, Intranigral Iron Injection Induces Behavioral and Biochemical "Parkinsonism" in Rats. *Journal of Neurochemistry*, 57 (6), 1991, 2133-2135.

[22] D. Kaur, F. Yantiri, S. Rajagopalan, J. Kumar, J.Q. Mo, R. Boonplueang, V. Viswanath, R. Jacobs, L. Yang, M.F. Beal, D. DiMonte, I. Volitaskis, L. Ellerby, R.A. Cherny, A.I. Bush, J.K. Andersen, Genetic or Pharmacological Iron Chelation Prevents MPTP-Induced Neurotoxicity In Vivo A Novel Therapy for Parkinson's Disease. *Neuron*, 37, 2003. 899–909.

[23] E. Madsen, J. Gitlin, Copper and Iron Disorders of the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 2007, 317-337.

[24] D.B. Miller, J.F. Reinhard Jr., A.J. Daniels, J.P. O'Callaghan, Diethyldithiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Journal of Neurochemistry*, 57 (2), 1991, 541–549.

[25] M. Rubio-Osornio, S. Montes, F. Pérez-Severiano, P. Aguilera, E. Floriano-Sanchez, A. Monroy-Noyola, C. Rubio, C. Ríos, Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP⁺ in rats. *Neurochemistry International*, 54, 2009, 447–451.

[26] M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes, C. Rios, Participation of manganese-superoxide dismutase in the neuroprotection exerted by

copper sulfate against 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Brain Research Bulletin*, 55, 2001, 277–279.

[27] D.T. Dexter, F.R. Wells, A.J. Lees, F. Agid, Y. Agid, P. Jenner, C.D. Marsden, Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease, *Journal of Neurochemistry*, 52, 1989, 1830–1836.

[28] C.W. Olanow, Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012, 2006, 209-223.

[29] G.E. Borgstahl, H.E. Parge, M.J. Hickey, M.J. Johnson, M. Boissinot, R.A. Hallewell, J.R. Lepock, D.E. Cabelli, J.A. Tainer, Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*, 35 (14), 1996, 4287–4297.

[30] T. Fukui, M. Ushio-Fukai, Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15 (6), 2011, 1583-1606.

[31] G. Kingbright, Atomic absorption spectroscopy. *Elemental Analysis of Biological Materials*, 197, 1980, 141-165.

[32] F. Gil Hernández, Determinación de Metales por absorción atómica - Horno de grafito, 2014, recuperado de la página <http://www.ugr.es/~fgil/proyecto/grafito/fundamento3.html>

[33] J. Glowinski, LL. Ivarsen, Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *Journal of*

Neurochemistry, 13 (8), 1966, 655-669.

[34] H. McIlwain, Techniques in Tissue Metabolism - Chopping and slicing samples. Biochemical Journal, 78, 1961, 213-218.

[35] J. Martino, C. Borgona, S.G. Robles, F. Vergani, H. Duffau, Anatomic dissection of the inferior fronto-occipital fasciculus revisited in the lights of brain stimulation data. Cortex, 46 (5), 2010, 691-699.

[36] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193, 1951, 256-275.

[37] Perkin Elmer, Atomic Spectroscopy - A guide to Selecting the Appropriate Technique and System. 2008, 14.

[38] M.C. Boll, M. Alcaraz-Zubledia, S. Montes, C. Ríos, Free copper, ferroxidase and SOD1 Activities, Lipid Peroxidation and NO Content in the CFS. A Different Marker Profile in Four Neurodegenerative Diseases. Neurochemical Research, 33, 2008, 1717-1723.

[39] R. Torres-Agustín, Y. Rodríguez-Agudelo, A. Schilmann, R. Solís-Vivanco, S. Montes, H. Riojas-Rodríguez, M. Cortez-Lugo, C. Ríos, Effect of environmental manganese exposure on verbal learning and memory in Mexican children. Environmental Research, 121, 2013, 39-44.

[40] R. Kurosakia, Y. Muramatsub, H. Katoc, T. Araki, Biochemical, behavioral and immunohistochemical alterations in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 78 (1), 2004, 143-153.

- [41] U. Fantz, Basics of plasma spectroscopy. *Plasma Sources Science and Technology*, 15, 2006, S137-S147.
- [42] I. Hamza and J.D. Gitlin, Copper Chaperones for Cytochrome c Oxidase and Human Disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34 (5), 2002, 381-388.
- [43] H.C. Sutton, C.C. Winterbourn, On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *Free Radical Biology & Medicine*, 6 (1), 1989, 53-60.
- [44] C. Ríos, R. Alvarez-Vega, P. Rojas, Depletion of Copper and Manganese in Brain after MPTP Treatment of Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 76 (6), 1995, 348–352.
- [45] M. Rubio-Osornio, S. Montes, Y. Heras-Romero, J. Guevara, C. Rubio, P. Aguilera, S. Rivera-Mancia, E. Floriano-Sánchez, A. Monroy-Noyola, C. Ríos, Induction of ferroxidase enzymatic activity by copper reduces MPP(+)-evoked neurotoxicity in rats. *Neuroscience Research*, 75 (3), 2013, 250-255.
- [46] M.C. Boll, M. Alcaraz-Zubeldia, S. Montes, C. Ríos, Free Copper, Ferroxidase and SOD1 Activities, Lipid Peroxidation and NOx Content in the CSF. A Different Marker Profile in Four Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, 33, 2008, 1717–1723.