



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA**

*"IDENTIFICACIÓN DE CONJUGADOS DE QUINONAS DE DOPAMINA-  
GLUTATIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE ESTRÉS OXIDATIVO"*

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ISIDRO BADILLO RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOSÉ MANUEL SANIGER BLESA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DR. LUIS B. TOVAR Y ROMO**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2020



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.



## **TESIS DOCTORAL**

*"IDENTIFICACIÓN DE CONJUGADOS DE QUINONAS DE DOPAMINA-  
GLUTATIÓN EN UN MODELO ANIMAL DE ESTRÉS OXIDATIVO"*

PRESENTA:

**ISIDRO BADILLO RAMÍREZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. JOSÉ MANUEL SANIGER BLESA**

INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

**DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DR. LUIS B. TOVAR Y ROMO**

UNIDAD DE NEUROCIENCIAS, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2020

**Este trabajo de tesis fue realizado en y con la ayuda de:**

**Grupo de Sustratos Nanoestructurados**  
Departamento de Micro y Nanotecnologías,  
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM, México

**Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica**  
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM, México

**Laboratorio Universitario de Nanotecnología Ambiental**  
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, UNAM, México

**Laboratorio de Estrés Oxidativo**  
Departamento de Fisiología  
Facultad de Medicina, UNAM, México

**Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy group**  
Spectroscopy and Imaging Department  
Leibniz Institute of Photonic Technology, Jena, Germany

## INDICE

*página*

<b>I. Agradecimientos</b>	6
<b>II. Lista de figuras y tablas</b>	7
<b>III. Lista de abreviaturas</b>	9
<b>IV. Resumen</b>	10
<b>V. Abstract</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>2. ANTECEDENTES</b>	15
<b>2.1. La Enfermedad de Parkinson</b>	15
<b>2.2. Metabolismo de la dopamina</b>	16
2.2.1. Degradación enzimática oxidativa de la DA	17
2.2.2. Formación de quinonas oxidadas de DA: aminocromo, 5,6-indol quinona y neuromelanina	18
2.2.2.1. Implicación de los metabolitos oxidados de DA la EP	18
2.2.3. Formación de tio-catecolaminas y benzotiazinas: 5-S-GSH-DA, 5-S-CysDA y DHBT-1	19
2.2.3.1. Implicación de las tio-catecolaminas y benzotiazinas en la EP	20
2.2.3.2. Propuesta del 5-S-CysDA como potencial marcador de la EP	21
<b>2.3. Modelo de ozono para entender la neurodegeneración en la EP</b>	22
2.3.1. Contaminación del aire en proceso neurodegenerativos	22
2.3.2. Ozono y sus efectos en el cerebro	23
2.3.2.1. Efecto del ozono en la oxidación de DA y en la EP	23
2.3.3. Modelo murino de neurodegeneración progresiva inducido por ozono	24
<b>2.4. Biomarcadores de la EP</b>	25
2.4.1 Definición de biomarcador	26
2.4.2. Clasificación de biomarcadores usados para la EP	26
2.4.3. Metabolitos de DA como biomarcadores de la EP	26
<b>2.5. Técnicas para la detección de metabolitos como biomarcadores</b>	27
2.5.1. Técnicas cromatográficas para la detección de metabolitos	27
2.5.2. Técnicas espectroscópicas vibracionales para el estudio y la detección de biomarcadores	28
<b>2.6. Materiales nanoestructurados para detectar marcadores de la EP</b>	29
2.6.1. Nanomateriales metálicos y uso para SERS	30
2.6.2. Materiales para sustratos SERS	31
2.6.3. Detección de biomarcadores de la EP mediante SERS	32
<b>2.7. Nanomateriales de grafeno</b>	32
2.7.1. Dispositivos analíticos de grafeno para diseño de biosensores	33

<b>Justificación</b>	35
<b>Hipótesis</b>	36
<b>Objetivo general y objetivos particulares</b>	36
<b>3. METODOLOGÍA</b>	37
<b>3.1. Síntesis, purificación y caracterización de tio-catecolaminas</b>	37
3.1.1. Síntesis de 5-S-CysDA	37
3.1.2. Separación y purificación de 5-S-CysDA	38
3.1.3. Caracterización espectroscópica y estructural de 5-S-CysDA	38
<b>3.2. Método HPLC-MS para la detección de metabolitos derivados de DA</b>	39
3.2.1. Optimización de parámetros analíticos para medición de metabolitos por HPLC-MS	39
3.2.2. Tratamiento y separación de metabolitos por extracción en fase sólida	41
<b>3.3. Detección de metabolitos derivados de DA en el modelo animal</b>	43
3.3.1. Descripción del modelo animal de exposición a ozono	43
3.3.2. Detección de metabolito derivados de DA en homogenados de cerebro de rata del modelo de ozono por HPLC-MS	43
<b>3.4. Detección de metabolitos en sistemas nanoestructurados con respuesta amplificada</b>	44
3.4.1. Detección de metabolitos derivados de dopamina y de 5-S-CysDA asistida con SERS	44
3.4.2. Detección SERS de DA y 5-S-CysDA en agua y en fluidos biológicos sintéticos	45
3.4.3. Adsorción y detección de 5-S-CysDA en sustratos grafénicos	46
3.4.3.1. Preparación de sustratos grafénicos para la adsorción y caracterización de 5-S-CysDA	46
3.4.4. Estudio experimental y teórico de la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO	47
<b>3.5. Análisis estadísticos</b>	48
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	49
<b>4.1. Caracterización de la síntesis, separación y purificación de 5-S-CysDA</b>	49
4.1.1. Análisis y caracterización por UV-Vis	49
4.1.2. Análisis por espectrometría de masas y espectroscopia infrarroja	50
<b>4.2. Detección cromatográfica de metabolitos de DA mediante HPLC-MS</b>	52
4.2.1. Parámetros analíticos del método HPLC-MS para la detección y cuantificación de metabolitos derivados de DA	52
<b>4.3. Cuantificación de metabolitos mediante HPLC-MS en homogenados de cerebro del modelo animal de ozono</b>	56
4.3.1. Cuantificación de metabolitos en SN	56
4.3.2. Cuantificación de metabolitos en el estriado	58
<b>4.4. Detección de metabolitos en sistemas nanoestructurados con respuesta amplificada</b>	62
4.4.1. Detección de metabolitos asistida mediante espectroscopia SERS	62

4.4.1.1 Detección de DA mediante SERS	62
4.4.1.2. Detección de DA mediante SERS en fluidos biológicos simulados	64
4.4.2. Detección de 5-S-CysDA mediante SERS	66
4.4.2.1. Detección de 5-S-CysDA mediante SERS en fluidos biológicos simulados	69
<b>4.5 Adsorción y detección de 5-S-CysDA en sustratos grafénicos</b>	<b>73</b>
4.5.1. Apagamiento de fluorescencia de 5-S-CysDA en GO y detección por espectroscopia Raman	73
4.5.2. Estudio experimental y teórico de la adsorción de 5-S-CysDA sobre óxido de grafeno	75

## **5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS** 78

## **6. REFERENCIAS** 81

## **7. ANEXOS** 94

- **ANEXO 1. Artículo de Revisión:** “5-S-cysteinyl-dopamine a neurotoxic endogenous metabolite of dopamine: Implications for Parkinson's disease. Badillo-Ramírez, I., Saniger, J. M., & Rivas-Arancibia, S. (2019). *Neurochemistry International*, 104514.”

- **ANEXO 2. Artículo experimental:** “Interaction of 5-S-cysteinyl-dopamine with graphene oxide: an experimental and theoretical study for the detection of a Parkinson's disease biomarker. Badillo-Ramírez, I., Landeros-Rivera, B., de la O-Cuevas, E., Vargas, R., Garza, J., & Saniger, J. M. (2019), *New Journal of Chemistry*, 43(40), 15861-15870.”

- **ANEXO 3. Artículo en proceso de publicación:** “SERS-based detection of 5-S-Cysteinyl-dopamine as a novel biomarker of Parkinson's disease in complex artificial biofluids. Badillo-Ramírez I, Mühligh A, Saniger J.M, Cialla-May D and Popp J. *Analytical Chemistry*, 2019 [in process]”.

ANEXO 4. Datos de recuperación y recobro de metabolitos en método HPLC-MS.

ANEXO 5. Valores estadísticos, one-way ANOVA, con prueba Kruskal-Wallis, de las concentraciones de los metabolitos en sustancia nigra y estriado del modelo animal de ozono.

## I. AGRADECIMIENTOS

- ✓ *En este trabajo agradezco enormemente al Dr. José Saniger Blesa, quién confió en mi al inicio de este doctorado y se atrevió a iniciar un reto desafiante para adentrarnos en este tema de investigación. Agradezco todas las charlas que me ayudaron a ir guiando mi camino profesional.*
- ✓ *Agradezco a la Dra. Selva Rivas y los miembros de su laboratorio por todo el apoyo técnico, la orientación y la motivación recibida en todo el transcurso de este doctorado.*
- ✓ *Agradezco al Dr. Luis B. Tovar y Romo, como miembro de mi comité tutorial de doctorado por la ayuda, compromiso y orientación recibida en cada evaluación tutorial.*
- ✓ *Agradezco a todo el equipo de Sustratos Nanoestructurados del ICAT por el compañerismo, orientación, pláticas, vivencias, etc. Siempre fue un gusto haberse rodeado de ustedes para trabajar en el laboratorio.*
- ✓ *Agradezco a varios investigadores del ICAT, con los que pudimos compartir experiencias y siempre se mostrar en la disposición de apoyarme en la mejora de mis proyectos: Dr. Daniel Matatagui, Dr. Enoch Gutiérrez, Dr. Amado Hernández, Dra. Beatriz de la Mora.*
- ✓ *Agradezco al Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE-ICAT-UNAM por la facilidad de la instrumentación para la caracterización espectroscópica y en especial a la Dra. Selene Islas por la ayuda técnica recibida en todo momento.*
- ✓ *Agradezco enormemente al laboratorio de LUNA, del ICAT, por todas las facilidades técnica en el uso HPLC-Masas, así como toda la orientación recibida: Dr. Juan Carlos Duran y Mario Rodríguez, por toda su disponibilidad y ayuda.*
- ✓ *Agradezco al CONACYT por la beca doctoral (registro: 599497) y la ayuda de movilidad para realizar una estancia en el extranjero.*
- ✓ *Agradezco a cada uno de los miembros del jurado doctoral por su tiempo y sus valiosos comentarios en la revisión de esta tesis.*

## II. Lista de Figuras y Tablas

### FIGURAS

Figura 1. Síntesis y metabolismo de dopamina.

Figura 2. Síntesis de tio-catecolaminas y dihidrobenzotiazinas.

Figura 3. Diagrama de efecto de ozono por especies reactivas de oxígeno sobre el cerebro.

Figura 4. Esquema global del fenómeno SERS y sus aplicaciones.

Figura 5. Representación esquemática de la ruta de síntesis del conjugado de 5-S-CysDA.

Figura 6. Procedimiento general de separación selectiva de catecolaminas en cartucho de extracción.

Figura 7. Procedimiento general de la separación selectiva de los metabolitos en los homogenados del tejido cerebral.

Figura 8. Espectros de absorbancia UV-Vis durante la síntesis y separación del conjugado 5-S-CysDA.

Figura 9. Caracterización estructural y espectroscópica del conjugado 5-S-CysDA.

Figura 10. Espectros masas de los metabolitos derivados de dopamina.

Figura 11. Cromatograma de la separación de los metabolitos derivados de dopamina en el método HPLC-MS.

Figura 12. Curvas de calibración de los metabolitos identificados mediante el método HPLC-MS implementado.

Figura 13. Cuantificación de los metabolitos en sustancia nigra en el modelo animal, respecto al tiempo de exposición a bajas dosis de ozono.

Figura 14. Cuantificación de los metabolitos en el estriado en el modelo animal respecto al tiempo de exposición a bajas dosis de ozono.

Figura 15. Espectros normal Raman y SERS de dopamina.

Figura 16. Espectros SERS de dopamina adquiridos en agua ultrapura y en solución sintética de líquido cefalorraquídeo.

Figura 17. Comparación de los espectros Raman y SERS del CDA en la región de la huella dactilar "fingerprint".

Figura 18. Espectros SERS de 5-S-CysDA en diferentes medios y en variaciones de concentración.

Figura 19. Correlación lineal de la integración de bandas respecto a la concentración de 5-S-CsyDA.

Figura 20. Espectros Raman del conjugado 5-S-CysDA adsorbido sobre sustratos de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido en soportes de aluminio.

Figura 21. Configuraciones estructurales de los modelos de óxido de grafeno, la molécula de 5-S-CysDA y moléculas de agua empleados en los cálculos energéticos.

## TABLAS

Tabla 1. Parámetros de optimización por espectrometría de masas para la detección de los compuestos derivados de dopamina.

Tabla 2. Parámetros y condiciones cromatográficas en el método HPLC.

Tabla 3. Resumen de los parámetros analíticos de detección y cuantificación para cada metabolito mediante el método HPLC-MS.

Tabla 4. Asignación de bandas de los espectros normal Raman calculado y SERS de 5-S-CysDA.

Tabla 5. Resumen de los valores estadísticos de linealidad, pendiente y coeficiente de correlación

Tabla 6. Asignación de bandas del espectro normal Raman y SERS de dopamina

### III. Lista de Abreviaturas

EP: Enfermedad de Parkinson  
DA: Dopamina  
SN: Substancia nigra  
5-S-CysDA: 5-S-cisteinil-dopamina  
DOPAL: 3,4-dihidroxifenilacetaldehído  
DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético  
HVA: Ácido homovanílico  
AMDOPA: Alfa-metil-3,4-dihidroxifenil alanina  
MS: Espectrometría de masas  
MAO: Enzima monoamina oxidasa  
DAT: Transportador de dopamina  
VMAT-2: Transportador vesicular de monoamina-2  
 $\alpha$ -syn: Proteína alfa-sinucleína  
SERS: Espectroscopia Raman amplificada en superficie  
GERS: Espectroscopia Raman amplificada por grafeno  
L-DOPA: L-dihidroxifenil alanina  
TH: Tirosina hidoxilasa  
LCR: Líquido cefalorraquídeo  
SPE: Extracción en fase sólida  
GO: Óxido de grafeno  
rGO: Óxido de grafeno reducido  
ERO: Especies reactivas de oxígeno  
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina  
TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
NFkB: Factor nuclear kappa de las células B  
ESI: ionización por electrospray  
FTIR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier  
ATR: Reflectancia total atenuada  
SPE: Extracción en fase sólida  
Ag NPs: Nanopartículas de plata  
DFT: teoría funcional de la densidad  
LDD: Límite de detección  
TFA: Ácido trifluoroacético

#### IV. RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia mundialmente. Las causas de su origen siguen sin ser esclarecidas. Sin embargo, estudios han develado algunos de los principales mecanismos que participan en la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (SN), la región principalmente dañada en la EP. El metabolismo de la dopamina (DA) se ha señalado como un factor intermedio y que juega un papel primordial en dichos mecanismos. La oxidación de DA lleva a la formación de diversos metabolitos, los cuales se han demostrado que causan severas alteraciones celulares, induciendo la muerte neuronal. Algunos de los productos oxidados de DA, de formación endógena, tal como el conjugado 5-S-Cisteinil-dopamina (5-S-CysDA), se ha demostrado ser altamente tóxicos para la célula dopaminérgica. Por otro lado, analizando los niveles de 5-S-CysDA en pacientes con EP, ha llevado a proponer que este metabolito podría ser un buen biomarcador para evaluar y diagnosticar la EP de forma temprana. Sin embargo, los análisis cuantitativos de este conjugado se han centrado en validarlo como un marcador clínico para la EP, sin llegar a estudiar detalladamente la evolución de dicho compuesto en el metabolismo celular de las neuronas dopaminérgicas en un modelo de neurodegeneración. Lo anterior ha llevado a plantear, como parte de los objetivos de este trabajo la búsqueda, detección y cuantificación del conjugado 5-S-CysDA y otros metabolitos derivados de la DA, en un modelo animal de neurodegeneración inducido por ozono. Para lograr tal propósito, se implementó un método analítico, basado en cromatografía líquida HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), en el que se identificaron y cuantificaron los metabolitos DA, ácido homovanílico (HVA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y 5-S-CysDA en las regiones de la SN y el estriado en el cerebro de ratas que fueron expuestas a bajas dosis de ozono durante 7, 15, 30, 60 y 90 días. Por otro lado, como una estrategia alternativa a la detección cromatográfica de dichos metabolitos, se empleó la técnica de espectroscopia Raman amplificada por superficie (SERS). Además, con miras a desarrollar dispositivos analíticos que permitan la detección sensitiva de metabolitos de interés médico, en este trabajo se evaluó como prueba de concepto la adsorción del conjugado 5-S-CysDA sobre óxido de grafeno (GO) y su detección mediante espectroscopia Raman. El conjugado 5-S-CysDA fue cuantificado tanto en la SN como en el estriado en el modelo animal, presentando un notable después de los 30 días de exposición a ozono. Durante todo el tratamiento los productos DA, HVA y DOPAC fueron identificados en el estriado, mientras que en la SN solo se identificó DA y HVA. Estos tres metabolitos presentaron un decremento en su concentración a lo largo de la exposición a ozono, siendo la DA notablemente disminuida a los 60 días de exposición. Lo anterior ha permitido evaluar de forma cercana la síntesis y metabolismo de la DA en condiciones de estrés oxidativo. Además, la DA y el 5-S-CysDA fueron identificados mediante espectroscopia SERS en agua y en fluidos biológicos simulados. 5-S-CysDA fue identificado en agua, líquido cefalorraquídeo (LCR) y en orina sintéticos; en tanto que la DA fue únicamente identificada en agua y en LCR. Estos resultados llevan a proponer que la espectroscopia SERS podría ser un potencial método analítico alternativo para la detección de estos compuestos. Finalmente, la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO permitió apagar su fluorescencia y mostrar, por primera vez en la literatura, su espectro experimental Raman. Por lo que los sustratos gráfenicos podrían permitir desarrollar plataformas analíticas de reconocimiento molecular sensitivo, asistido mediante la espectroscopia Raman.

## V. ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disease worldwide. Extensive research has been conducted to explain the origin of the disease, but it still remains elusive. However, recent studies have better defined the mechanisms involved in the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN), the main region damaged in the PD pathology. Dopamine (DA) metabolism has been identified as an intermediate factor that plays a major role in these processes. Dopamine oxidation leads to the formation of several oxidized metabolites, which has been shown to cause severe cell disruption, leading to dopamine neural death in the SN. Some of the endogenously formed oxidized dopamine products, such as the 5-S-cysteinyl-dopamine (5-S-CysDA) conjugate, have been shown to be highly toxic to the dopamine cell. On the other hand, by analyzing the levels of 5-S-CysDA in PD patients it has been proposed that this metabolite could be a good biomarker to evaluate the progression of the disease for its early diagnosis. However, quantitative analyses of this conjugate have been focused on its validation as an efficient marker for PD, without studying in detail the behavior of this compound in the cellular metabolism of dopaminergic neurons, in a neurodegenerative model. These observations have led to propose in this work for the searching, detection and quantification of the conjugate 5-S-CysDA and other metabolites derived from dopamine metabolism, in an animal model of ozone-induced neurodegeneration. In order to achieve these aims, an analytical method based on HPLC chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) was implemented, in which DA, homovanillic acid (HVA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 5-S-CysDA products, were identified and quantified in SN and the striatum of brain tissues of rats that were exposed to low doses of ozone for 7, 15, 30, 60 and 90 days. In addition, as an alternative strategy to chromatographic detection, the surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) method was used to detect these metabolites in complex media. On the other hand, with the aim of developing analytical devices that allow the sensitive detection of metabolites of medical interest, in this work we evaluated, as a proof of concept, the adsorption of the 5-S-CysDA conjugate on graphite oxide (GO) and its detection by Raman spectroscopy. The 5-S-CysDA conjugate was quantified both in the SN and in the striatum in the animal model, showing a remarkable increase in abundance at higher ozone exposure times. DA, HVA and DOPAC products were identified in the striatum, while DA and HVA were only identified in the SN. These metabolites showed a decrease in concentration over the course of exposure to ozone, being DA significantly reduced after 60 days of exposure. This has allowed to perform a close study of the metabolism of DA under conditions of oxidative stress. DA and 5-S-CysDA were identified by SERS spectroscopy in water and in simulated biological fluids. 5-S-CysDA was identified in water, artificial cerebrospinal fluid (CSF) and in synthetic urine; whereas DA was only identified in water and in CSF. Therefore, we show that SERS spectroscopy could be a potential alternative analytical method for the detection of these compounds in complex samples. The adsorption of 5-S-CysDA on GO allowed to quench its fluorescence, leading to reveal, for a first time, its experimental full Raman spectrum. Also, graphenic derivatives substrates could allow the development of analytical platforms for sensitive molecular detection of 5-S-CysDA, assisted with Raman spectroscopy.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y de mayor incidencia a nivel mundial, afectando mayormente a personas adultas pero los casos de afectación a la población joven han mostrado un incremento [1]. Varios grupos de investigación alrededor del mundo se han dedicado a tratar de entender las causas que la originan, con la finalidad de desarrollar potenciales estrategias terapéuticas o fármacos efectivos que eviten su aparición o alivien sus síntomas [2]. Sin embargo, con los avances realizados hasta, ahora estos objetivos siguen sin ser alcanzados. Una de las mayores dificultades en entender el origen de esta patología es debido a la combinación de múltiples factores relacionados con su aparición, entre los que se encuentran la exposición a tóxicos ambientales, los hábitos de vida del individuo y los factores genéticos hereditarios. Es cada vez más claro que la EP es una enfermedad de múltiples mecanismos celulares y moleculares, los cuales conducen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (SNpc), particularmente en la región de la pars compacta [3]. El estudio a profundidad de estos mecanismos, desde varias perspectivas, podría ayudar a entender las etapas características por las que transcurre esta enfermedad. Investigaciones recientes han apuntado a que el metabolismo de la dopamina (DA) tiene una estrecha relación con la aparición y la progresión de varios de los mecanismos claves que llevan a la muerte de la neurona dopaminérgica [4, 5]. Sin embargo, a pesar de la extensa investigación existente sobre el papel tóxico de la DA sobre las neuronas dopaminérgicas, aún no es claro si la DA por sí misma o alguno de sus múltiples metabolitos sean los responsables de dicha toxicidad.

La degradación de la DA a través de las vías enzimática y oxidativa, llevan a la formación de los productos 3,4-dihidroxifenil acetaldehído (DOPAL), dopamina-o-quinona, aminocromo, indolequinona y 5-S-cisteinil-dopamina (5-S-CysDA). Múltiples investigaciones han demostrado en experimentos *in vivo* e *in vitro* que la exposición a estos productos inducen un daño severo celular, así como la activación de varios de los mecanismos moleculares que caracterizan a la EP [6]. Sin embargo, en la mayoría de los experimentos se ha estudiado la toxicidad de estos metabolitos sobre las células cuando se exponen de forma exógena, y algunas veces en concentraciones elevadas, lo que resulta en un daño severo en un periodo corto. Por otro lado, hasta el momento ningún trabajo ha demostrado que estos metabolitos se formen de manera endógena en las neuronas dopaminérgicas, en el transcurso del tiempo, ante la exposición de agentes exógenos. Además, tampoco se ha estudiado el metabolismo de la DA en la SN o en el estriado en un modelo animal de neurodegeneración progresiva. Por lo que en la primera parte de este trabajo se han evaluado cuantitativamente la DA y los metabolitos ácido homovanílico (HVA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), provenientes del metabolismo enzimático de la neurona dopaminérgica, así como el conjugado 5-S-CysDA, como producto derivado de su metabolismo oxidativo. La cuantificación de dichos productos se realiza empleando un método analítico basado en cromatografía líquida (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), identificando los metabolitos antes mencionados en homogenados de tejido cerebral de la región de la SN y el estriado de ratas expuestas a la inhalación de ozono, como modelo de neurodegeneración

progresiva. El modelo de animal se basa en las condiciones de contaminación ambiental, causadas por la inhalación de ozono y que induce estrés oxidativo [8]. En estas condiciones grupos de ratas fueron expuestas a bajas dosis de este gas durante intervalos de tiempo perfectamente delimitados: 7, 15, 30, 60 y 90 días. El emplear este modelo para estudiar la neurodegeneración en la SN, permitirá realizar un seguimiento detallado sobre la aparición y evolución en el tiempo del conjugado 5-S-CysDA y los metabolitos derivados de DA, lo cual ayudará a entender indirectamente el metabolismo de la neurona dopaminérgica, en su ruta enzimática y oxidativa, ante un estado de estrés oxidativo, lo cual también permitirá correlacionar la formación endógena de dichos compuestos con el daño de las neuronas dopaminérgicas que se ha reportado empleando este modelo animal.

El conjugado 5-S-CysDA ha sido detectado tanto en tejido cerebral como en fluidos biológicos en mamíferos, incluyendo humanos [8]. En estas mediciones se ha determinado que la concentración de este compuesto se encuentra elevadas en pacientes con despigmentación en la SN, pero los niveles de este conjugado fueron considerablemente superiores en pacientes diagnosticados con la EP. Lo anterior llevó a varios autores a proponer el uso del conjugado 5-S-CysDA como un potencial marcador para identificar la EP, incluso de ser empleado como un buen biomarcador de diagnóstico temprano [9]. Sin embargo, los trabajos existentes en la literatura han cuantificado dicho producto únicamente en pacientes con EP e individuos sanos, sin describir la evolución de este compuesto en etapas intermedias de la patología. Por lo anterior, en este trabajo también se busca determinar, de forma cuantitativa, la evolución de dicho metabolito, conforme transcurre la neurodegeneración en el modelo animal. Además, en este trabajo se busca reforzar la propuesta de emplear el compuesto 5-S-CysDA como un metabolito de aparición temprana y que podría ser empleado como un potencial biomarcador de la EP, dado que es un producto de formación endógeno, el cual proviene directamente del metabolismo oxidativo de la neurona dopaminérgica, y por lo tanto, resultaría ser un mejor indicador de un estado de neurodegeneración en la SN.

El conjugado 5-S-CysDA ha sido identificado y cuantificado en autopsias de tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo y plasma, tanto en mamíferos como en humanos y en pacientes con EP, empleando técnicas convencionales cromatográficas, mayoritariamente HPLC [10]. Sin embargo, estas técnicas requieren largo tiempo de análisis y son costosas, por lo que se busca la implementación de técnicas alternativas y complementarias a las cromatográficas, que permitan hacer un análisis en menor tiempo y con mayor versatilidad. Como una alternativa para identificar el 5-S-CysDA, en este trabajo se propone el uso de materiales nanoestructurados, acoplados con la espectroscopia Raman como método de detección. La espectroscopia Raman en combinación con nanomateriales metálicos, mayoritariamente nanopartículas de oro o plata, bajo ciertas condiciones experimentales, permiten generar el llamado fenómeno de espectroscopia Raman amplificada en superficie (SERS, del inglés). El fenómeno SERS permite la amplificación de los modos vibracionales de los grupos funcionales de las moléculas que se encuentran adsorbidas o en interacción cercana con la superficie de la nanopartícula [11]. La espectroscopia SERS se ha enfocado mayoritariamente hacia el estudio y detección de sustancias y moléculas pequeñas, a muy bajas concentraciones, en diversas condiciones fisiológicas o patológicas. Por otro lado, los sustratos gráficos, entre los que se encuentran el grafeno prístino, el óxido de grafeno y el óxido de

grafeno reducido, poseen excelentes propiedades fisicoquímicas que los hacen materiales altamente atractivos para el desarrollo de microarreglos para el sensado de biomoléculas [12]. Entre sus propiedades se encuentran el poseer una gran área superficial, lo cual permite favorecer la adsorción de una gran cantidad de moléculas en regiones específicas de sus superficies. Adicionalmente, la adsorción de estas moléculas puede ser moduladas mediante el control juicioso de los grupos funcionales presentes en los mismos. Además, los sustratos grafénicos también permiten suprimir la fluorescencia de moléculas que se encuentran adsorbidas en su superficie, cuando son excitadas en la longitud de onda que coincide con su espectro de adsorción, así como de generar el llamado efecto de amplificación de bandas Raman por grafeno (GERS, del inglés) [13]. Esta propiedad es altamente atractiva para detectar e identificar, mediante espectroscopia Raman, moléculas que presentan fluorescencia cuando se lleva a cabo su análisis directo sobre soportes inertes, ya que en estos casos la intensidad y anchura de la banda de fluorescencia oculta la señal Raman y no permite observar su espectro. Las propiedades plasmónicas de las nanopartículas metálicas, así como la adsorción selectiva que aportan los sustratos grafénicos, acoplados con la espectroscopia Raman, podrían permitir el desarrollar plataformas analíticas sensitivas, selectivas y de rápida detección, lo que podría significar un aporte relevante para la detección de metabolitos de interés médico [14]. Por lo que en este trabajo también se buscan identificar y demostrar las potencialidades de los métodos SERS y GERS, en conjunto con la espectroscopia Raman, como estrategias alternativas viables para la detección rápida y sensitiva del conjugado 5-S-CysDA, resaltando su capacidad como potencial biomarcador de la EP. El desarrollo de estas nuevas metodologías podría significativamente facilitar el diagnóstico rápido y certero de la EP en la clínica, incluso de ser diagnosticado en una etapa temprana del avance de la enfermedad, lo cual permitirá implementar tratamientos y terapias efectivos en el paciente, conduciendo a mejorar su calidad de vida.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. La Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y con mayor incidencia alrededor del mundo, afectando mayoritariamente a individuos mayores a 65 años [15]. La EP es reconocida por ser una neurodegeneración mayoritariamente de tipo idiopática y multifactorial, en la que el 85-90% de los casos son esporádicos, los cuales se han propuesto ser originados por alguno o varios agentes exógenos, tales como: la exposición a agentes contaminantes utilizados en el medio agrícola, industrial o farmacéutico; atmósferas contaminantes, como el ozono; iones metálicos; la actividad física crónica, entre otros [16, 17]. En tanto que el 5-10 % de los casos restantes corresponden a los factores genéticos asociados con la forma familiar de la EP [18].

La EP tiene como característica principal la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SN). Consecuentemente, la disminución de células en la SNpc conduce a la pérdida de las terminales nerviosas en el estriado, lo cual en conjunto lleva a alterar significativamente las funciones de los ganglios basales, manifestándose mediante alteraciones motoras y cognitivas en el paciente. El daño neurodegenerativo en la EP se ve reflejado en el individuo mediante síntomas motores y no-motores, donde los síntomas motores incluyen inestabilidad de la postura, rigidez muscular, lentitud de movimiento, bradicinesia y temblor en reposo; en tanto que los no-motores se caracterizan por alteraciones cognitivas y autonómicas, tales como la apatía, depresión o alteraciones del sueño [19, 20].

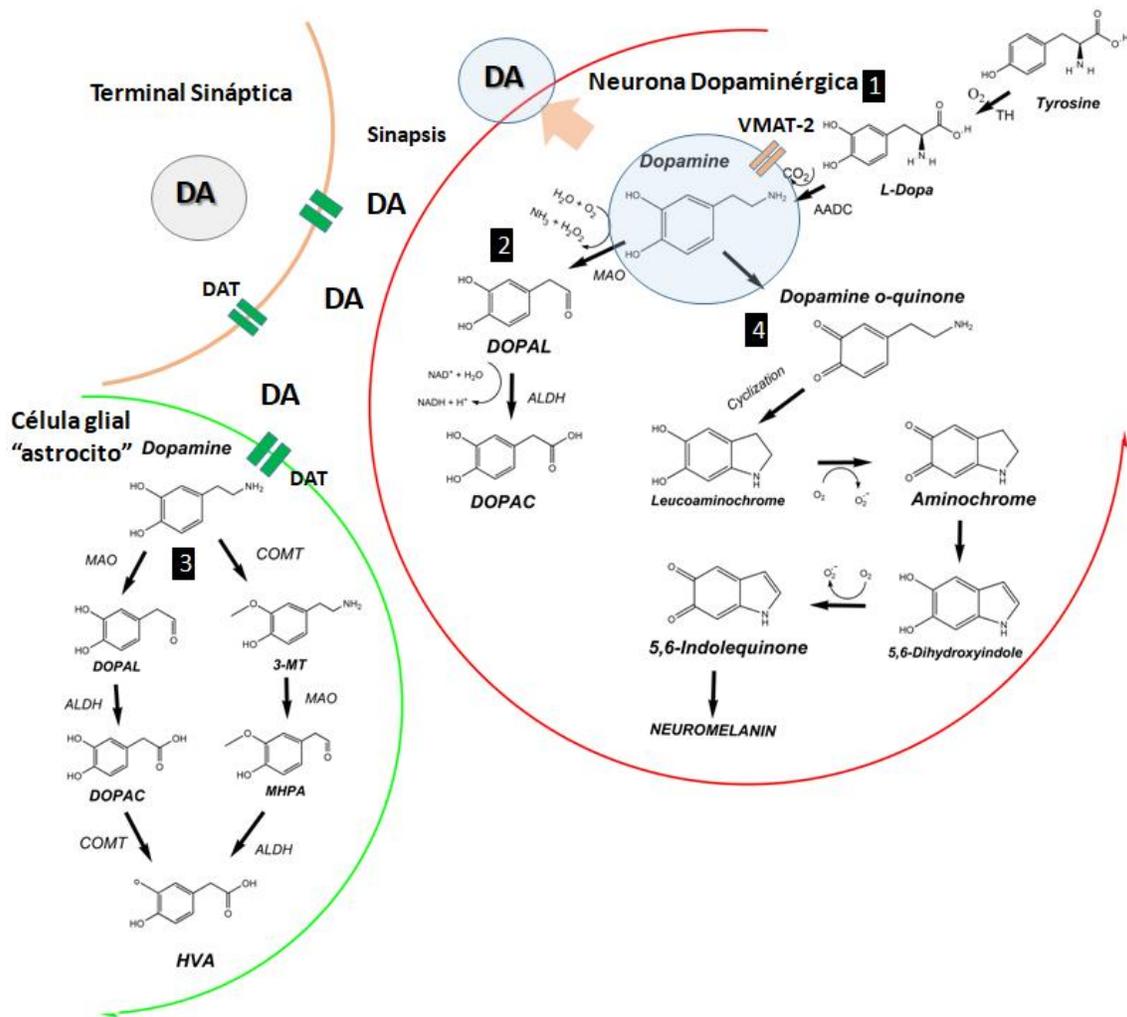
La base fisiopatológica de la EP es debido a la alteración en la función de los ganglios basales, causada principalmente por la falla del sistema dopaminérgico. Los ganglios basales son un conjunto de núcleo subcorticales interconectados anatómicamente y funcionalmente, en los cuales se incluyen el núcleo estriado (caudado y putamen), núcleo subtalámico y los glóbulos pálido externo e interno; dichos núcleos mantienen conectividad con la SNpc, la sustancia nigra pars reticulata (SNr) y el núcleo ventro-lateral del tálamo [21]. Los ganglios basales se encuentran anatómicamente subestructurados en tres circuitos: motor, límbico y asociativo y cognitivo; los cuales son responsables de modular cada una de dichas funciones. La dopamina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA) son los principales neurotransmisores que actúan en estas áreas cerebrales; por lo que la falla o deficiencia de dichos neurotransmisores conduce a alteraciones neurofisiológicas de los ganglios basales, lo cual conduce a manifestar los síntomas antes descritos [22].

Algunos de los principales mecanismos moleculares que subyacen a la patogénesis de la EP, con la finalidad de tratar de explicar la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SN se encuentran: 1) la formación, acumulación y daño inducido por los llamados "cuerpos de Lewy", los cuales son originados cuando la proteína alfa-sinucleína ( $\alpha$ -syn) sufre un mal plegamiento y se agrega insolublemente en forma de placas que se depositan en la SNpc; 2) la disfunción mitocondrial; 3)

el estrés oxidativo y; 4) neuroinflamación [3, 23, 24]. La relación existente entre estos mecanismos, así como su secuencia de aparición en la patogénesis de la EP, aún no es muy clara. Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que la DA oxidada juega un papel clave en el iniciación y vínculo con algunos de los mecanismos moleculares característicos de la EP [4, 5]. Lo anterior ha llevado a plantear que bajo condiciones de estrés oxidativo celular, la DA puede llevar a la formación de metabolitos endógenos, como las quinonas de DA, los cuales se han demostrado ser altamente tóxicos para la neurona dopaminérgica. Múltiples investigaciones han concluido que las quinonas de dopamina y sus productos derivados causan vulnerabilidad hacia las neuronas dopaminérgicas, generando severos daños en la célula e incluso su muerte [6, 25, 26].

## **2.2. Metabolismo de la DA**

La DA es una catecolamina que es sintetizada en el interior de las neuronas dopaminérgicas, principalmente en las neuronas localizadas en la SN. La síntesis de DA se inicia mediante la hidroxilación del aminoácido tirosina, por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), en este paso los cofactores de hidrobipterinas coadyuvan al proceso, llevando a la formación de la L-dihidroxifenil alanina (L-DOPA). Posteriormente, mediante una reacción de descarboxilación y en presencia de la enzima aminoácido aromático de carboxilasa (AADC, en inglés), junto con el fosfato piridoxal, la L-DOPA es descarboxilada para formar DA [27] (**Figura 1, Ruta 1**). Posterior a su síntesis, la DA es internalizada en las vesículas sinápticas por acción del transportador vesicular de monoamina-2 (VMAT-2, del inglés). La DA se mantiene químicamente estable dentro de la vesícula debido al pH interno del medio (pH 5-5.4), el cual la protege de sufrir reacciones de oxidación [28]. El VMAT-2 representa un factor crucial para mantener la estabilidad química de la DA citoplasmática después de su síntesis de novo. Finalmente, la DA almacenada en la vesícula sináptica es transportada y liberada durante la sinapsis para interactuar con las neuronas postsinápticas y actuar como neurotransmisor.



**Figura 1.** Síntesis y metabolismo de la DA. Reacción 1. Síntesis enzimática de DA, almacenamiento vesicular y liberación en la sinapsis. Reacción 2. Degradación enzimática de DA dentro de la neurona dopaminérgica; formación del intermediario DOPAL y DOPAC como producto final. Reacción 3. Degradación enzimática de DA en el astrocito para formar DOPAC y HVA. Reacción 4. Degradación oxidativa de DA, mediante la formación de la orto-quinona de dopamina, aminocromo, 5,6-indolequinona y neuromelanina. (Abreviaturas: Aminoácido aromático de carboxilasa (AADC); aldehído deshidrogenasa (ALDH); catecol-o-metil transferasa (COMT); oxidasa monoamina (MAO); transportador vesicular de monoamina-2 (VMAT-2); transportador de dopamina (DAT); 3,4-dihidroxi-fenil acetaldehído (DOPAL); ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC); ácido homovanílico (HVA); 3-metoxitiramida (3-MT); 3-metoxi-4-hidroxi-fenilacetaldehído (MHPA) y tirosina hidroxilasa (TH)). Modificado de [29].

### 2.2.1. Degradación enzimática y oxidativa de la DA

La DA liberada en el espacio intersináptico es limpiada y reincorporada nuevamente a las vesículas sinápticas por acción de los transportadores de DA (DAT), localizados en la membrana plasmática de la neurona [30]. Sin embargo, cuando la DA no es eficientemente internalizada en las vesículas y queda libre en el citoplasma, ésta puede ser degradada por dos rutas: la ruta enzimática o la ruta oxidativa. En la ruta enzimática la enzima monoamina oxidasa (MAO, del inglés) convierte DA en

3,4-dihidroxifenil acetaldehído (DOPAL) y la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH, del inglés) transforma DOPAL en ácido 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC). Alternativamente, los astrocitos, el tipo de células gliales más abundante, los cuales se encuentran rodeando a la neurona dopaminérgica también son viables de sintetizar DA, llevándola a la formación tanto de DOPAC como del ácido homovanílico (HVA, del inglés), siendo éstos dos metabolitos los principales derivados del metabolismo enzimático de la DA y que son excretados al sistema circulatorio [27] (**Figura 1, Rutas 2 y 3**).

Por otro lado, la ruta oxidativa de la DA se inicia cuando ésta es oxidada tan solo por el cambio de pH del medio celular, de pH 5 en el interior de la vesícula a pH 7.4 en el citoplasma, y ante la presencia de oxígeno molecular. Sin embargo, la oxidación de DA puede ser significativamente acelerada por la presencia de iones metálicos, tales como el Fe (III) o el Cu (II), y por la acción de otras enzimas diferentes de su metabolismo, tales como la xantina oxidasa o el citocromo P450 [31].

La oxidación espontánea de la DA, catalizada por el oxígeno molecular ( $O_2$ ), lleva a la formación del intermediario radical dopamina o-semiquinona, acompañada de la producción de una molécula del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Posteriormente, la dopamina o-semiquinona es oxidada por una segunda molécula de  $O_2$  para formar la ortoquinona de DA (DA-o-Q), junto con una segunda molécula de anión superóxido. Sin embargo, si la oxidación se realiza por vía enzimática, se lleva a la formación directa de la DA-o-Q [32] (**Figura 1, Ruta 4**). Sin embargo, la DA-o-Q es sólo estable a un pH menor a 2.0, por lo que en el pH citoplasmático (7.4) su estabilidad se alterada y sufre subsecuentes reacciones de oxidación [33].

### **2.2.2. Formación de derivados de quinonas de dopamina: aminocromo, 5,6-indolequinona y neuromelanina**

El grupo amino de la DA-o-Q tiende a ciclarse de manera intramolecular de forma espontánea en el pH fisiológico, a una constante de velocidad de 0.15/s, dando paso al intermediario leucoaminocromo, el cual se auto-oxida rápidamente formando el producto aminocromo, junto con un radical superóxido [34]. Posteriormente, el aminocromo se rearregla intramolecularmente, a una constante de velocidad de 0.06/min, para formar el 5,6-dihidroxi indol como intermediario, el cual es fácilmente oxidado ante la presencia de  $O_2$ , llevando a la formación de 5,6-indol quinona. Finalmente, la 5,6-indol quinona puede continuar su autopolimerización junto con agregados lipídicos y proteicos para llevar a la formación de la neuromelanina (NM), como producto final [35] (**Figura 1, Ruta 4**).

#### **2.2.2.1. Implicación de los metabolitos oxidados de DA en la EP**

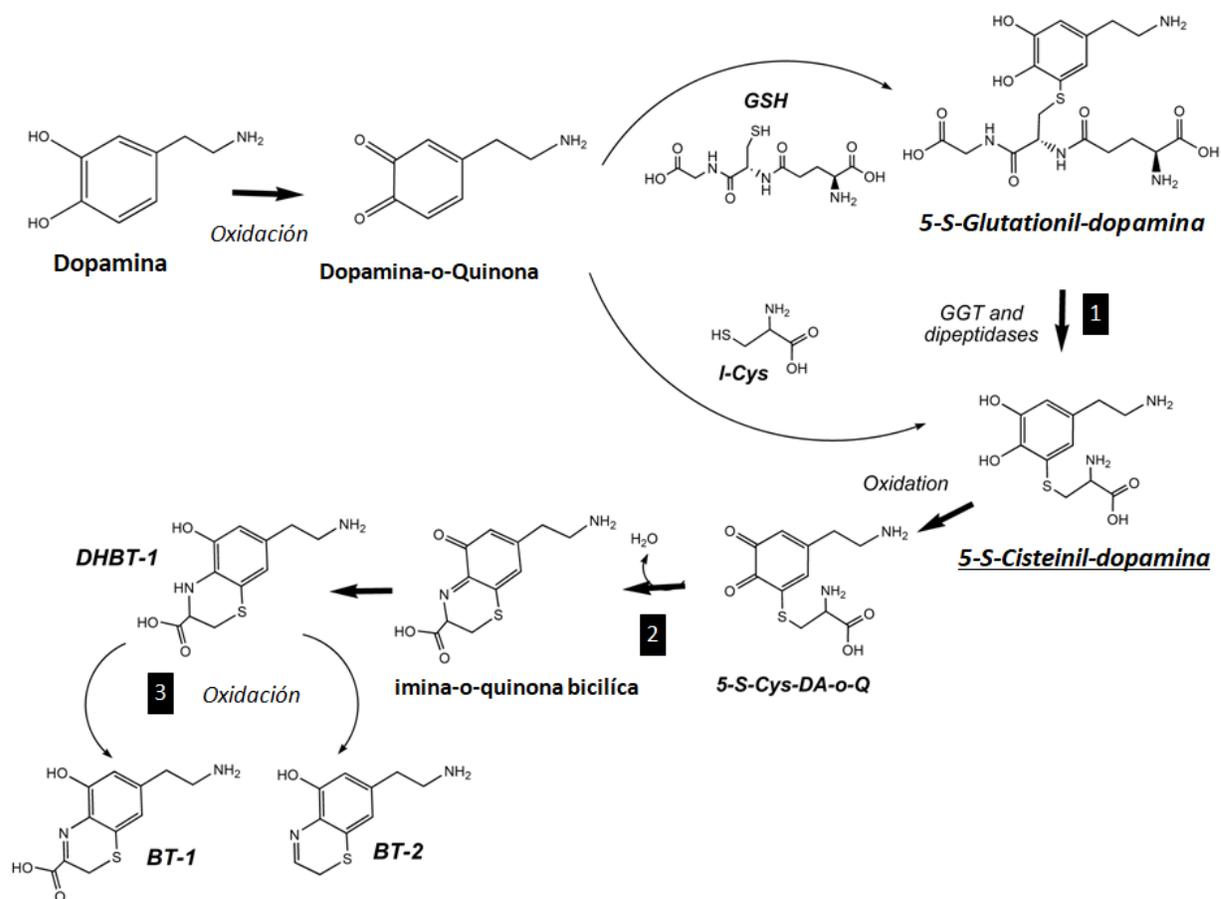
Diversas investigaciones han demostrado que las quinonas de DA y sus metabolitos derivados son altamente tóxicos para las neuronas dopaminérgicas. La toxicidad inducida de estos productos es debida a su capacidad de formar aductos con diversas biomoléculas citoplasmáticas; por ejemplo con proteínas, enzimas y ácidos nucleicos, principalmente. La DA-o-Q se une covalentemente con

los residuos de cisteínas de proteínas y complejos enzimáticos, llevando a la formación de grandes agregados proteicos de cisteinil-catecol; por ejemplo, en la formación del aducto de DA-o-Q con la enzima tirosina hidroxilasa (TH). La formación de estos grandes complejos genera un incremento intracelular de especies reactivas de oxígeno, además de inhibir la pérdida de la actividad de dichas enzimas y de inducir cambios conformacionales sobre las proteínas, alterando sus funciones [36]. Por otra parte, la DA-o-Q también puede unirse a los sitios púricos del DNA mitocondrial, induciendo alteraciones genéticas progresivas y posiblemente hereditarias [37]. Por otro lado, varias investigaciones destacan también la participación tanto del aminocromo como de la 5,6-indol quinona sobre el daño celular en la SN, causando: inducción de la disfunción mitocondrial; formación y estabilización de protofibrillas neurotóxicas de  $\alpha$ -syn; la disrupción del citoesqueleto mediante la formación de aductos con actina, alfa y beta-tubulina; la disfunción de la degradación proteica de los sistemas proteosómicos y lisosómicos; estrés del retículo endoplásmico; contribución del incremento de estrés oxidativo y activación de la señalización apoptótica celular [25, 38, 39].

### **2.2.3. Formación de tio-catecolaminas y benzotiazinas: GSH-DA, 5-S-CysDA y DHBT-1**

Alternativamente a la ciclización intramolecular de la DA-o-Q, ésta puede reaccionar rápidamente con nucleófilos; es decir con moléculas que contienen un átomo de azufre en su estructura química. El aminoácido L-cisteína (L-cys) y el tripéptido de glutatión (GSH), son los nucleófilos más sencillos y de mayor abundancia en las células del sistema nervioso central [40]. Dichas moléculas reaccionan con la DA-o-Q, llevando a la formación de la familia de aductos o conjugados conocidas como "tio-catecolaminas". La reacción de L-cys con la DA-o-Q forma el conjugado 5-S-cisteinil-dopamina (5-S-CysDA), siendo éste el más estable y de mayor abundancia sobre sus isómeros 2-S-cisteinil-dopamina (2-S-Cys-DA) y 2,5-S-dicisteinil-dopamina (2,5-Cys-DA) [41]. Por otro lado, el GSH en la reacción con la DA-o-Q lleva a la formación del conjugado 5-S-glutationil-dopamina (5-S-GSH-DA) como producto mayoritario [42]. Sin embargo, se ha reportado que el 5-S-GSH-DA puede llevar a la formación inmediata del 5-S-Cys-DA, al ser metabolizado por la enzima gama-glutamil-transferasa (GGT) y otras dipeptidasas (**Figura 2. Reacción 1**) [29].

La 5-S-CysDA es un metabolito que ante la presencia de radicales libres y otros agentes oxidantes es fácilmente oxidada en productos secundarios. La oxidación de 5-S-CysDA procede mediante la formación de quinonas imínicas bicíclicas intermediarias, las cuales se estabilizan mediante la formación de la benzotiazina 7-(2-aminoetilico)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2H-1,4- benzotiazina-3-carboxílico (DHBT-1) [43]. La DHBT-1 puede seguir subsecuentes reacciones de oxidación y formar benzotiazinas derivadas, tales como las benzotiazinas 7-(2-aminoetilico)-5-hidroxi-1,4-benzotiazina-3-carboxílico (BT-1) y 7-(2-aminoetilico)-5-hidroxi-1,4-benzotiazina (BT-2), (**Figura 2, Reacciones 2 y 3**) [29]. Sin embargo, estos productos han sido poco estudiados, ya que no es clara su cinética de formación ni estabilidad intracelular.



**Figura 2.** Síntesis de tio-catecolaminas y dihidrobenzotiazinas. Reacción 1. Formación de 5-S-glutationil-dopamina (5-S-GSH-DA) y su degradación enzimática para formar 5-S-cisteinil-dopamina (5-S-Cys-DA). Reacción 2. Oxidación de 5-S-Cys-DA para formar el ácido 7-(2-aminoetilico)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3-carboxílico (DHBT-1). Reacción 3. Formación del ácido 7-(2-aminoetilico)-5-hidroxi-1,4-benzotiazina-3-carboxílico (BT-1) y del ácido 7-(2-aminoetilico)-5-hidroxi-1,4-benzotiazina (BT-2). Reacción 4. Formación de cisteinil-dopamina oxidada por hipoclorito (HOCD). (Abreviaturas: glutatión (GSH); 5-S-Cisteinil-dopamina-o-quinona (5-S-Cys-DA-o-Q) y gamma-glutamil transferasa (GGT)). Adoptado de [29].

### 2.2.3.1. Implicaciones de las tio-catecolaminas y las benzotiazinas en la EP

La toxicidad de los productos 5-S-CysDA y DHBT-1 han sido evaluados en varios modelos celulares, tales como en células humanas de neuroblastoma dopaminérgico, neuronas corticales primarias y en células de la SN inmortalizadas; así como en roedores, tal como en ratón de tipo CD1, demostrado que estos metabolitos generan toxicidad severa y muerte neuronal [44, 45, 46]. Varios estudios en los que se han empleado células de neuroblastoma dopaminérgico de la línea SH-SY5Y expuestas al 5-S-CysDA, se identificó una significativa disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, como principales consecuencias, los cuales causaron una severa alteración en la homeostasis celular [45, 47]. Además, se identificó que el 5-S-CysDA condujo a generar despolarización del potencial en la membrana, oxidación de lípidos y de las bases púricas y pirimidinas, carbonilación de proteínas y una marcada disminución de los niveles de antioxidantes

endógenos [44, 46]. Además, tanto la 5-S-CysDA como la DHBT-1 causan un fuerte daño en la cadena respiratoria mitocondrial, inhibiendo los complejos I y IV, lo cual lleva a activar algunos de los mecanismos apoptóticos celulares, induciendo posteriormente la muerte de la neurona dopaminérgica [43]. Estudios han demostrado que el 5-S-CysDA actúa de forma inductora sobre la expresión, agregación y acumulación de la proteína  $\alpha$ -syn en el citoplasma. Consecutivamente, se ha demostrado que 5-S-CysDA también interfiere con la estabilidad y el desempeño de los transportadores de DA, limitando la recaptura e internalización de DA después su liberación [48]. Una descripción detallada de los mecanismos de formación e implicaciones de daño celular de la 5-S-CysDA, DHBT-1 y sus metabolitos derivados se encuentra en la revisión publicada, derivada de este trabajo doctoral (ver **ANEXO 1**) [29].

### **2.2.3.2. Propuesta de uso del 5-S-Cys-DA como potencial marcador para la EP**

La 5-S-CysDA fue por primera vez identificada en humanos y otros mamíferos en 1986 por Rosengren y colegas [8, 49]. Mediante el análisis en autopsias de cerebros humanos, empleando técnicas cromatográficas, se encontró un incremento de los niveles de 5-S-CysDA y otros tiocatecoles en las regiones del estriado y la SN [50]. Las concentraciones de este metabolito en biopsias de humanos fue reportada en un rango de 37 a 40 pmol/g y de 51 a 36 pmol/g en el estriado y la SN, respectivamente. Particularmente, en este estudio los pacientes que presentaban mayor despigmentación en la SN, contenían la mayor concentración de 5-S-Cys-DA. Sin embargo, la proporción de los niveles de 5-S-CysDA respecto a la concentración de DA fue diez veces mayor en pacientes diagnosticados con la EP [49]. Partiendo de esos hallazgos y de la identificación de 5-S-CysDA en líquido cefalorraquídeo (LCR), en una concentración alrededor de 0.09 pmol/mL, se propuso emplear la relación 5-S-CysDA/DA como un marcador para diagnosticar la EP [9]. Sin embargo, el uso de esa relación como biomarcador ha sido cuestionada debido a que la concentración de DA que circula en fluidos biológicos, LCR, difícilmente refleja un estado de neurodegeneración de la SN, además de que no es específica de la EP [51]. Estudios posteriores correlacionaron los niveles de HVA con los niveles de 5-S-CysDA en el LCR de pacientes con EP, identificando una disminución de la concentración total de HVA, en tanto que la relación de 5-S-CysDA/HVA fue considerablemente incrementada, proponiendo que la relación 5-S-CysDA/HVA podría ser empleada como marcador de mayor certeza para el diagnóstico de la EP [52]. Sin embargo, estos resultados fueron puestos en duda, debido a que la medición de estos metabolitos fue proveniente de pacientes que fueron diagnosticados con EP varios años después del ensayo y que estuvieron en tratamiento con L-DOPA, debido a los efectos adversos a largo plazo del tratamiento de L-DOPA en pacientes con EP [53]. Además, la cuantificación de HVA en el LCR tampoco es específica de la PD, debido a que su síntesis se realiza en las células gliales, lo cual difícilmente refleja un estado real del metabolismo de la DA en la neurona dopaminérgica [54].

Recientemente, mediante métodos analíticos cromatográficos y estudios de neuroimagen se han evaluado los niveles de 5-S-CysDA y DOPAC en el LCR de pacientes con tres diferentes tipos de patologías parkinsonianas: EP, atrofia del sistema múltiple parkinsoniano (MSA-P) y falla pura autonómica (FPA). En este estudio se determinó que los niveles de la relación de 5-S-CysDA/DOPAC drásticamente incrementaron a más del doble en pacientes con EP y MSA-P, en

tanto que esta relación se mantuvo sin cambio en los pacientes con FPA [55]. Los resultados anteriores han llevado a proponer el uso de DOPAC y de la relación de 5-S-Cys-DA/DOPAC como biomarcadores más certeros para el diagnóstico temprano de la EP. Por lo tanto, ante la creciente búsqueda de biomarcadores específicos de la EP, la detección de metabolitos provenientes del metabolismo enzimático y de la degradación oxidativa de DA, podría significar un gran avance para estudiar la progresión de la EP y su posible diagnóstico de forma temprana.

### **2.3. Modelo de ozono para entender la neurodegeneración en la EP**

En la literatura se han empleado varios modelos animales con la finalidad de estudiar y entender algunos de los mecanismos biomoleculares implicados en las patologías neurodegenerativas. Algunos de los cuales incluyen animales modificados genéticamente, knockout, tratados con toxinas químicas o de inducción exógena, entre otros [56]. Estos modelos han ayudado significativamente a entender algunos de los mecanismos involucrados en estas neuropatologías. Sin embargo, aún falta emplear modelos en los que se permita simular la degeneración de forma cercana a lo que se manifiesta en los pacientes. Una propuesta consiste en emplear modelos animales en donde se desarrolle la neurodegeneración tan solo con la exposición a ambientes exógenos, por ejemplo en el modelo animal de ozono, en el cual se pueden simular las condiciones en las que el individuo se encuentra expuesto a contaminantes ambientales [57].

#### **2.3.1. Contaminación del aire en procesos neurodegenerativos**

Los contaminantes ambientales son una mezcla compleja en la que se incluye: material particulado (MP, MP<sub>10</sub>, MP<sub>2.5</sub> y MP<sub>2.5-10</sub>), ozono, monóxido de carbono, óxidos de azufre y nitrógeno, metano, compuestos orgánicos volátiles y metales. Estos contaminantes tienen la capacidad de llegar al cerebro y generar daño en el sistema nervioso central (SNC), además de causar daños respiratorios y enfermedades cardiovasculares [58]. Algunas de las consecuencias de estos contaminantes sobre el SNC son la inflamación crónica cerebral, enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple y eventos cerebrovasculares. Múltiples estudios han demostrado que tanto la inflamación como el estrés oxidativo en el cerebro son consecuencias evidentes que se manifiestan después de una constante exposición a contaminantes ambientales [59]. El envejecimiento, el estrés oxidativo crónico y la disregulación de los sistemas antioxidantes, son algunos de los principales factores que se manifiestan en el transcurso en las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, los mecanismos de formación y propagación de estos compuestos en el cerebro, así como de su daño celular siguen sin ser esclarecidos. Los contaminantes ambientales que con mayor frecuencia se han estudiado en afectaciones neurológicas son el material particulado pequeño y el ozono, los cuales dependiendo de su composición química, pueden migrar desde los pulmones hacia el sistema circulatorio o viajar a través del sistema olfatorio hasta el cerebro, mediante la interacción con células o tejidos extra pulmonares [60]. Estos contaminantes tienen un efecto sobre el cerebro a través de mecanismos indirectos, tales como en la formación de especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo, deterioro en la respuesta de los sistemas antioxidantes, inflamación y estimulación de las neuronas aferentes pulmonares, tal como se ha propuesto para explicar los daños en el sistema

cardiovascular [61]. Por otra parte, en estudios de exposición aguda y repetida al ozono en animales, se han reproducido los mecanismos anteriores, en los cuales también se han identificado alteraciones de tipo estructural, funcional y transcripcionales de algunas proteínas en el cerebro, tales como la alteración estructural secundaria de la proteína  $\beta$  amiloide, 1-42 [62].

### **2.3.2. Ozono y sus efectos en el cerebro**

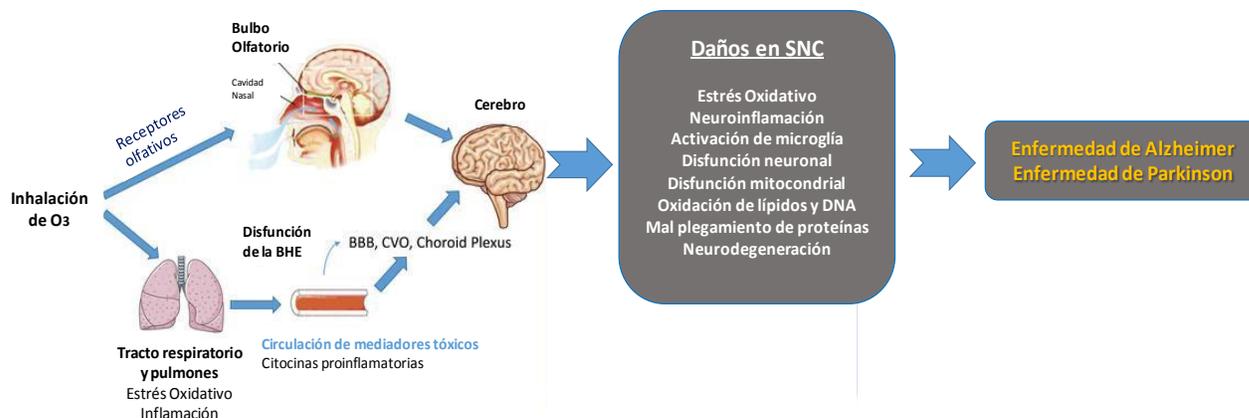
El ozono es un gas atmosférico, generado fotoquímicamente a partir de óxidos de nitrógeno e hidrocarburos volátiles. El ozono es un gas oxidante no fisiológico altamente reactivo, el cual causa efectos inmediatos en el tracto respiratorio posterior a su inhalación. Este gas se consume en los pulmones a través de reacciones con lípidos, proteínas y antioxidantes presentes en el revestimiento de la superficie de las vías respiratorias [63]. Sin embargo, se ha determinado que su toxicidad extrapulmonar es mediada por productos reactivos secundarios, tales como especies reactivas de oxígeno y biomoléculas oxidadas. Se ha reportado que la exposición continua de ratas a este gas, genera daños de tipo biomoleculares y celulares en el cerebro, reflejándose en la disminución del número de neuronas, la neuroinflamación y la disfunción neuronal, lo cual lleva a afectar el desempeño conductual y cognitivo en las ratas, así como del deterioro de las memorias de corto y largo plazo [64].

Investigaciones semejantes también han identificado que la exposición crónica a ozono inhibe la neurogénesis en el giro dentado en animales, promueve la gliosis y disminuye la densidad de espinas de dendritas de neuronas en varias zonas del cerebro [65]. Las afectaciones del ozono sobre la homeostasis celular se han propuestos como mecanismos prominentes que tienen un impacto severo sobre el SNC y que conduce a desarrollar enfermedades neurodegenerativas, tales como la EP o la EA [61, 66]. En la **Figura 3** se describen gráficamente los efectos de la inhalación de ozono en el cerebro y a nivel de SNC. Por otro lado, los efectos del ozono en el cerebro implicados en procesos neurodegenerativos, como en la EA, han sido estudiados en un modelo de ratas, en las cuales después de ser expuestas a bajas dosis de ozono se distingue: incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres, falla de las capacidades antioxidantes, pérdida de la neurogénesis, estimulación glial, inducción de cambios conformacionales y estructurales en la proteína  $\beta$ -amiloide 1-42. Lo anterior conduce finalmente a desarrollar neurodegeneración progresiva en el hipocampo, de forma semejante a los mecanismos neuropatológicos que podrían padecer los pacientes de la EA [61, 67].

#### **2.3.2.1. Efecto del ozono en la oxidación de DA y en la EP**

Estudios recientes en pacientes con EP han reportado que el bulbo olfatorio es afectado en etapas tempranas de la patología, antes de que aparezcan los síntomas motores [68]. Lo anterior sugiere que la inhalación de contaminantes atmosféricos puede ser un factor de riesgo para desarrollar la EP. Además, experimentos en animales han mostrado que la inhalación constante de contaminantes atmosféricos causa una reducción de neuronas dopaminérgicas en la SN. Particularmente, la exposición a bajas dosis de ozono en ratas causa un daño acumulado en el cerebro de roedores, alterando la morfología de las células en la SN e incrementando el nivel de

lípidos oxidados y la oxidación de DA. Estos efectos se intensifican cuanto mayor es el tiempo de exposición al ozono [69].



**Figura 3.** Efectos de la inhalación de ozono sobre el cerebro. El ozono puede llegar al cerebro mediante el tracto respiratorio y los pulmones o a través de los receptores olfativos en el bulbo olfatorio. Las alteraciones celulares en el cerebro son debidas principalmente a la formación de especies reactivas de oxígeno, posterior a la inhalación de ozono. Figura modificada de [61].

Por otro lado, en experimentos con ratas que fueron expuestas a la inhalación subcrónica de gases contaminantes, se encontró en el tejido cerebral que los niveles de las proteínas  $\beta$ -amiloide 1-42, tau fosforilada y  $\alpha$ -syn fueron considerablemente incrementados [70]. Resultados semejantes fueron encontrados en el análisis neuropatológico de tejidos post-mortem de pacientes con patologías neurodegenerativas, los cuales habitaban en áreas altamente contaminadas [58]. Recientemente, reportes mediante meta-análisis han relacionado la incidencia a desarrollar la EP con la exposición a contaminantes ambientales, siendo el material particulado, el NO<sub>2</sub>, el O<sub>3</sub> y el CO<sub>2</sub> las sustancias de mayor impacto en el cerebro [71]. En los estudios anteriores se ha determinado que los efectos tóxicos se deben al tipo de gas, al incremento con la dosis y al tiempo de exposición. Sin embargo, se requieren estudios en poblaciones mayores, lo cual permita establecer las relaciones entre los contaminantes ambientales y la neurobiología de la EP.

### 2.3.3. Modelo murino de neurodegeneración progresiva inducido por especies reactivas de oxígeno

El efecto del estrés oxidativo en modelos animales se ha estudiado comúnmente mediante dos aproximaciones experimentales: la producción de ERO de forma endógena y exógena. En el primero, la formación de las ERO se genera mediante moléculas prooxidantes, como en el modelo del ácido 3-nitropropiónico, el cual altera la función de los complejos de respiración mitocondrial, causando déficit de ATP y un considerable incremento de ERO [72]. Por otro lado, en el modelo de inducción exógena, el animal es expuesto a contaminantes ambientales, tal como es el caso de exponer ratas a bajas dosis de ozono de forma repetida [63, 67]. Este modelo permite inducir de

forma secuenciada un estado de estrés oxidativo crónico, durante un tiempo de ensayo delimitado, y que puede ser monitoreado. Este modelo ha permitido estudiar de forma más cercana los efectos del estrés oxidativo en el cerebro y establecer su relación con procesos neurodegenerativos [74]. El modelo animal de ozono replica las condiciones en las que un individuo puede estar expuesto ante condiciones elevadas de contaminación ambiental. Este modelo tiene la ventaja de ser no invasivo, ya que sin otro factor agregado, la exposición a ozono es suficiente para inducir estrés oxidativo y sus efectos pueden ser evaluados progresivamente en el tiempo.

Empleando este modelo se ha identificado que el estrés oxidativo crónico, mediante la formación de ERO y radicales libres, es un factor crucial de daño celular en el cerebro y que desencadena mecanismos celulares tales como: la disfunción mitocondrial, peroxidación de lípidos, carbonilación de proteínas, daño al retículo endoplásmico, incremento de la neuroinflamación, activación de la microglía y activación de las citocinas proinflamatorias, tal como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). La cascada de eventos anteriores conlleva a causar un severo daño en la célula y posteriormente llevarla a su muerte [63, 67]. Estos mecanismos moleculares han sido involucrados en los procesos de neurodegeneración de la EP y la EA. Particularmente, varios estudios empleando este modelo han correlacionado los daños causados por el ozono sobre las regiones de la SN y el estriado en ratas. En estos ensayos se ha evaluado la reactividad y muerte celular, cuantificando marcadores de citocromo c y p53; peroxidación de lípidos en plasma y homeganados de estriado; identificación de dopamina oxidada en plasma de las ratas, evaluado mediante voltamperometría cíclica; proteínas oxidadas; respuesta inflamatoria de la microglía y daños en los astrocitos, mediante la expresión del factor nuclear kappa de las células B (NFkB) y de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) [69, 74, 75]. Además, en las ratas después de intervalos de exposición a ozono, se evaluaron la actividad motora, conductual, así como el comportamiento de congelamiento y exploratorio [35]. Los resultados en estos experimentos han mostrado que el daño y muerte celular en la SN, causado por eventos de estrés oxidativo, conduce a afectar las capacidades motoras de las ratas, lo cual podría estar implicado en mecanismos que conducen a manifestar la EP en etapas avanzadas.

#### **2.4. Biomarcadores de la EP**

Actualmente el diagnóstico clínico de la EP se basa en la evaluación de los síntomas motores y no-motores, el historial médico y la respuesta a tratamientos dopaminérgicos [76]. Sin embargo, los síntomas motores son evidentes después que se ha perdido un 70% de las neuronas dopaminérgicas en la SN, lo cual limita considerablemente su diagnóstico temprano [77]. Además esta ruta de diagnósticos difícilmente permite diferenciar la EP de otros síndromes parkinsonianos. Las limitantes anteriores revelan una urgente necesidad de desarrollar estrategias para detectar de forma temprana a la EP. En este contexto, el uso de biomarcadores específicos podría permitir realizar avances significativos en la clínica para el diagnóstico oportuno de esta neuropatología [78].

### **2.4.1. Definición de biomarcador**

La definición de “biomarcador” ha sido descrito por el Instituto Nacional de Salud (NIH, en inglés) como “una característica que se mide y evalúa objetivamente, como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o de respuesta farmacológica ante una intervención terapéutica” [79]. En este sentido, los biomarcadores en la EP pueden ser empleados para diagnosticar la enfermedad (de diagnóstico), describir la severidad de la enfermedad (de marcaje) y ayudar a la selección del tratamiento de apoyo (marcadores teranósticos). Los marcadores de diagnóstico pueden ser útiles para detectar la enfermedad antes de que la sintomatología motora o no motora se manifieste en el paciente, o incluso para detectar una población asintomática con riesgo de desarrollar la EP. Idealmente se esperaría que un buen biomarcador pueda identificar la EP de forma temprana y con gran especificidad [80]. Sin embargo, actualmente no existe ningún biomarcador que cumpla dichas características, por lo que mayores investigaciones en este campo permitirían aportar un avance significativo al diagnóstico clínico de la EP.

### **2.4.2. Clasificación de biomarcadores usados para la EP**

Actualmente se ha propuesto el uso de varios marcadores que podrían ser empleados para diagnosticar la EP, los cuales han sido clasificados en seis grupos, organizados como: 1) neurotransmisores, neuromoduladores y sustancias relacionadas, entre los que se incluyen la dopamina, la serotonina, la acetilcolina y neuropéptidos; 2) neurotoxinas endógenas, tales como los derivados de la tetrahydro isoquinolina (TIQ) o salsolinol; 3) marcadores de estrés oxidativo, que incluye lípidos peroxidados o bases oxidadas del DNA; 4) marcadores inmunológicos e inflamatorios, tal como el factor de necrosis tumoral (TNF); 5) factores neurotróficos y de crecimiento, en el que se incluye el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ); y 6) biomoléculas proteicas relacionadas con la EP, tales como la proteína  $\alpha$ -syn o proteínas del neurofilamento [81]. Estos marcadores pueden ser encontrados en tejido cerebral, sangre, orina y LCR. La mayoría de los estudios clínicos se han enfocado en identificar estos marcadores en muestras que se obtengan de la forma menos invasiva posible. Sin embargo, tanto la selección del marcador, así como del tratamiento de la misma y su método de detección, son factores que determinan la eficiencia en el diagnóstico clínico.

### **2.4.3. Metabolitos de DA como biomarcadores de la EP**

La búsqueda de metabolitos que migren fuera del cerebro, que sean altamente específicos de la EP y que permitan evaluar el metabolismo de la neurona dopaminérgica, durante el transcurso de la neurodegeneración, son los objetivo de mayor ambición para un diagnóstico oportuno de la EP. Ante tal caso, el seguimiento y la cuantificación de la DA y sus metabolitos más comunes, DOPAC y HVA, han sido mayormente empleados con esta finalidad [82].

La cuantificación de la DA, DOPAC y HVA se ha realizado mayoritariamente en muestras de LCR de pacientes en varios estados de la patología. Estos estudios han determinado variaciones en las

concentraciones de dichos metabolitos; por ejemplo, los niveles del HVA se han encontrado notablemente disminuidos en pacientes avanzados con la EP, respecto a los controles [83].

Estudios semejantes han reportado alteraciones de las concentraciones de estos tres metabolitos, en las cuales tanto DA como HVA se mantienen constantes pero DOPAC tiende a disminuir cuanto mayor es el avance de la patología [84]. Las diferencias encontradas en estos estudios han sido debidas a la administración de levodopa, como tratamiento de control en los pacientes en etapas avanzadas. Sin embargo, el consumo de levodopa tiende a incrementar los niveles de HVA, además de la posibilidad de desarrollar discinesias inducidas por levodopa (LID, inglés) [85]. Por otro lado, la cuantificación de DA en el LCR difícilmente refleja el metabolismo de DA en la neurona dopaminérgica, además de no ser un marcador confiable para diferenciar la EP de otros síndromes parkinsonianos. Estudios recientes han sugerido que la medición de DOPAC podría evaluar con mayor eficiencia el metabolismo endógeno de la DA, incluso con la ventaja de ser más específico para identificar la EP [55, 86]. Las evidencias anteriores sugieren que el estudio y la búsqueda de diversos metabolitos provenientes del metabolismo de la DA podrían permitir estudiar el avance degenerativo en la SN. En este sentido el estudio de metabolitos oxidados que provengan del metabolismo oxidativo de DA, tal como el 5-S-CysDA y sus productos derivados, como se describió anteriormente, podrían aportar mayor información de las condiciones del metabolismo de la DA en la SN ante un evento de neurodegeneración.

## **2.5. Técnicas para la detección de metabolitos como biomarcadores**

Los avances en instrumentación científica han permitido emplear una mayor cantidad de herramientas analíticas para estudiar y detectar sensiblemente marcadores neurodegenerativos. Entre estas técnicas, la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) ha sido la herramienta mayormente empleada con este propósito, proporcionando varias ventajas en la cuantificación de metabolitos, por ejemplo una gran sensibilidad de detección, lo cual han sido altamente atractivo para análisis clínico [87]. Por otra parte, las técnicas espectroscópicas, tal como la resonancia magnética nuclear (RMN), se han introducido de forma complementaria y con otras ventajas sobre las cromatografías, por ejemplo en el estudio *in vivo* de biomarcadores de diversas patologías [88]. Por otro lado, la implementación de herramientas computacionales ha permitido el análisis masivo de datos para detectar, clasificar y cuantificar una gran cantidad de biomarcadores presentes en muestras de paciente [89].

### **2.5.1. Técnicas cromatográficas para la detección de metabolitos**

Las cromatografías tanto de líquidos como de gases acopladas a la espectrometría de masas, clasificadas en cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS), incluyendo HPLC, han sido las herramientas analíticas mayormente empleadas para la detección de metabolitos de diversas patologías [90].

En la GC-MS los compuestos a analizar deben ser fácilmente volátiles y poco polares, los cuales son separados en fase gas en una larga columna para después ser ionizados e identificados

mediante la espectrometría de masas [91]. En la LC-MS, así como en HPLC-MS, los compuestos deben cumplir la característica de ser mayormente polares, los cuales deben ser previamente suspendidos en un volumen pequeño de solución para posteriormente ser fragmentados por ionización y luego ser analizados en el espectrómetro de masas [92]. La versatilidad del HPLC-MS para el análisis de muestras en medio acuoso y la gran sensibilidad de detección a muy bajas concentraciones, ha favorecido su uso hacia la búsqueda y el análisis de marcadores relacionados con alguna patología. Múltiples trabajos en la literatura se han presentado para evaluar y cuantificar diversos metabolitos como biomarcadores de la EP, integrándolos en la llamada “metabolómica” de biomarcadores para estudiar la EP [93]. Lo anterior ha permitido estandarizar robustos métodos cromatográficos para la detección sensible y selectiva de marcadores en muestras de poblaciones de pacientes con EP, logrando establecer parámetros cuantitativos, con la finalidad de ayudar a un diagnóstico clínico de mayor precisión [94]. Sin embargo, estas técnicas requieren de largos tiempos tanto de análisis como de preparación de las muestras, cantidades elevadas de solventes y otros reactivos, incrementando los costos operacionales; además del costo añadido en la instrumentación, mantenimiento y sistemas de análisis. Estas limitaciones han hecho que las cromatografías sean minimizadas en su uso para el análisis rutinario en el sector clínico. Lo anterior ha llevado hacia la búsqueda e implementación de nuevas herramientas que mejoren esas limitaciones operacionales y económicas, con la finalidad de analizar metabolitos como marcadores de diagnóstico con mayor versatilidad y viabilidad de ser trasladables a la clínica.

### **2.5.2. Técnicas espectroscópicas vibracionales para estudio y detección de biomarcadores**

Las técnicas espectroscópicas vibracionales, en las que se encuentran las espectroscopias infrarrojo (IR) y Raman, se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la muestra de estudio, mediante su absorción (caso IR) o esparcimiento (caso Raman). En ambos fenómenos, los enlaces químicos de los grupos funcionales en la molécula vibran ante la interacción de dicha radiación. Las vibraciones de los enlaces son representados gráficamente como bandas, posicionadas en números de onda específico en un espectro IR o Raman. Estas técnicas proporcionan información en la composición y estructura de la (bio)molécula o sistema químico en estudio [95]. Además, mediante el espectro Raman/IR también es posible obtener información del microentorno de la molécula. Algunas ventajas en ambas técnicas es ser de tipo no destructiva, son de rápido análisis, se requiere mínima cantidad de muestra y poca o nula preparación de la misma. Las ventajas anteriores han logrado promover a estas espectroscopias como herramientas de mayor versatilidad y económicas a largo plazo, a diferencia de las técnicas cromatográficas o de imagen antes descritas. Lo anterior ha permitido la aplicación de estas técnicas en varios campos de la biomedicina para el estudio de metabolitos, biomoléculas, células, microorganismos, tejidos, etc. [96, 97].

En la literatura se ha reportado mayormente el uso de la espectroscopia IR, a comparación de la espectroscopia Raman, para el estudio de tejidos y sustancias como marcadores relacionadas con enfermedades neurodegenerativas [98]. Por ejemplo, mediante el análisis por IR se ha permitido la detección de la proteína  $\beta$  amiloide 1-42, identificando su conformación de estructura

secundaria en muestras de plasma y LCR de pacientes con EA, logrando identificar dicha proteína con un 85% de precisión [99]. Estrategias semejantes se han empleado para detectar y estimar modificaciones oxidativas en el sustrato de plasma, comparativamente en muestras de pacientes con EP y sujetos control con envejecimiento normal; en las que se lograron distinguir variaciones espectrales significativas entre los dos grupos con un 75% de sensibilidad [100].

Por otra parte, la espectroscopia Raman posee algunas ventajas sobre la espectroscopia IR, por ejemplo una menor interferencia de las bandas de vibración de la molécula de agua, lo cual ha permitido realizar el análisis *in vivo* e *in vitro* en medio acuoso, facilitando el estudio de las muestras en su estado nativo. Además, en combinación con métodos de microscopía se puede obtener una mayor resolución espectral, incluso la obtención de imágenes o mapeos sin el uso de marcadores (label-free). Lo anterior ha permitido emplear la espectroscopia Raman para el análisis de muestras en su estado nativo y que procedan de alguna condición neurodegenerativa. Por ejemplo, en el análisis Raman de células del hipocampo en tejido cerebral de rata, proveniente del modelo animal de ozono, se identificó la variación estructural de la conformación secundaria de la proteína  $\beta$  amiloide 1-42, mediante el seguimiento de la posición de la banda de la amida I, a lo largo de la exposición a bajas dosis de ozono (trabajo publicado de nuestro grupo multidisciplinario) [62]. Por otro lado, la espectroscopia Raman para el estudio de la EP ha sido mayormente enfocada en el análisis estructural y conformacional de la proteína  $\alpha$ -syn, durante su proceso de plegamiento que da paso a formar los llamados cuerpos de Lewy. Estos ensayos se han realizado bajo diferentes condiciones experimentales, tanto en medios químicos, como en modelos celulares [101, 102]. Sin embargo, la aplicación de esta técnica ha sido poco extendida en estudios estructurales *in vivo* en modelos de la EP.

La espectroscopia Raman presenta limitaciones para aportar información química cuando el analito en estudio se encuentra a bajas concentraciones, típicamente inferior a 1 mM, limitando su detección mediante un análisis por espectroscopia Raman convencional [103]. Sin embargo, esta limitante ha logrado ser superada considerablemente empleando materiales nanoestructurados. Por ejemplo, mediante el uso de nanopartículas metálicas, las cuales permitan generar el llamado fenómeno de espectroscopia Raman de amplificación por superficie (SERS, del inglés). Esta estrategia ha permitido una extensa aplicación para el estudio, identificación y cuantificación de sustancias o metabolitos marcadores de diversas patologías. Detalles de estas estrategias se discutirán en la siguiente sección.

## **2.6. Materiales nanoestructurados para detectar marcadores de la EP**

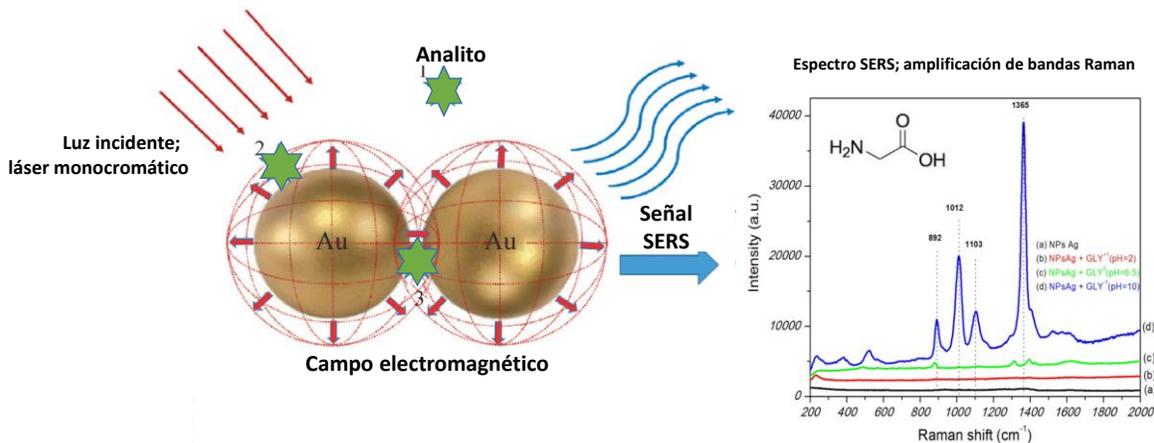
En las últimas décadas el avance en el desarrollo de materiales nanoestructurados ha permitido conducirlos hacia diversas aplicaciones de sensado, por ejemplo en la detección sensible de moléculas, metabolitos, células o cualquier tipo de marcadores [104]. Estos materiales pueden ser específicamente diseñados para identificar una respuesta del estado sano o patológico de un sistema. En este sentido, los materiales nanoestructurados podrían aportar grandes ventajas para el desarrollo de dispositivos, por ejemplo en la fabricación de biosensores. Por otro lado, las técnicas espectroscópicas ópticas y moleculares, tales como las espectroscopias Raman o IR, con

sus ventajas antes descritas, podrían potenciar el uso de los arreglos nanoestructurados hacia la mejora en la detección de biomarcadores.

### **2.6.1. Nanomateriales metálicos y uso para SERS**

En el apartado anterior se describieron las ventajas de emplear las espectroscopias vibracionales, Raman e IR, para el estudio de sustancias biológicas mediante sus espectros característicos. Estas estrategias podrían ser perfectamente aplicables hacia la búsqueda y detección sensible de metabolitos en procesos neurodegenerativos.

La espectroscopia Raman en combinación con nanomateriales metálicos, mayoritariamente nanopartículas de oro o plata, bajo ciertas condiciones experimentales permiten generar el efecto SERS. Este fenómeno se basa por un lado, en las propiedades de superficie plasmónicas de las nanopartículas metálicas cuando se acoplan a un campo electromagnético; y por el otro, depende también de las propiedades fisicoquímicas de la molécula adsorbida sobre la superficie metálica de la nanopartícula [105]. La combinación de ambos factores conduce a amplificar considerablemente los modos vibracionales de los grupos funcionales de las moléculas que se encuentren adsorbidas o en interacción cercana con la nanopartícula. La amplificación de los modos vibracionales en SERS puede ser en un orden 10-100 veces superior, respecto a su espectro normal Raman [106]. Una representación esquemática del fenómeno SERS y la amplificación de bandas se muestran esquemáticamente en la **Figura 4**. La espectroscopia SERS se ha enfocado mayoritariamente hacia el estudio y la detección de sustancias y moléculas pequeñas en muy bajas concentraciones, ya sea en ensayos químicos o en condiciones fisiológicas. Esta técnica también se ha aplicado eficientemente para la detección de marcadores biológicos en procesos patológicos y neurodegenerativos [107, 108]. Por ejemplo, mediante SERS se ha logrado detectar la proteína  $\beta$ -amiloide 1-42, a muy bajas concentraciones, en fluidos biológicos de modelos animales, en los cuales se ha logrado diferenciar también el cambio de la conformación en su estructura secundaria en su forma alfa hacia una estructura tipo beta plegada [109].



**Figura 4.** Representación esquemática del fenómeno SERS. La incidencia de la radiación electromagnética, empleando una fuente de luz de una longitud de onda monocromática, sobre las nanopartículas metálicas genera un campo electromagnético en su entorno, lo cual induce la amplificación de los modos vibraciones de las moléculas adsorbidas en la superficie metálica. La combinación de los efectos electromagnéticos y químicos conduce a la amplificación de las bandas Raman, representadas en un espectro SERS, distinguiendo notablemente los modos vibraciones de los grupos funcionales en la molécula que ha sido adsorbida sobre la superficie de la nanopartícula. Espectro SERS de la molécula de glicina en una solución coloidal de nanopartículas de plata. Imagen modificada de [110].

## 2.6.2. Materiales para sustratos SERS

Los sustratos SERS se refieren tanto a sustratos sólidos como a dispersiones coloidales, en un medio acuoso, en ambos casos se contiene una gran cantidad de nanopartículas metálicas con la finalidad de amplificar la dispersión Raman de la molécula adsorbida superficialmente. Las dispersiones coloidales de nanopartículas de oro (Au NPs) o de plata (Ag NPs) han sido mayormente preferidas por ser económicas y de fácil síntesis; además poseen la ventaja de estar dispersas en un medio acuoso, lo cual facilita la compatibilidad con metabolitos provenientes de un fluido biológico [111]. Sin embargo, algunas limitantes de los medios coloidales consiste en la poca reproducibilidad de la síntesis para obtener una forma y tamaño consistentes; pérdida de la estabilidad de las nanopartículas a lo largo del tiempo, así como de un limitado efecto de amplificación, el cual es fácilmente afectado en las condiciones experimentales. Por contraparte, en los sustratos sólidos es posible obtener arreglos ordenados de nanopartículas metálicas, los cuales se fabrican mediante procesos químicos o físicos. Estas estrategias han permitido fabricar sustratos sólidos con nanopartículas bien ordenadas, tanto en forma como en tamaño, para cubrir grandes áreas en soporte sólido, llevando también a obtener sustratos flexibles o rugosos con distintos fines de aplicación en sensado SERS [112]. Sin embargo, estos sustratos presentan algunas limitantes en su fabricación, por ejemplo en la reproducibilidad y costos elevados en su producción. Los diversos sistemas de sustratos nanoestructurados con nanopartículas metálicas han sido ampliamente empleados en diversa aplicaciones de reconocimiento SERS de analitos de interés biomédico [113, 114].

### **2.6.3. Detección de biomarcadores de la EP mediada por SERS**

Reportes en la literatura han demostrado la eficiencia de la espectroscopia SERS en la detección de metabolitos y neurotransmisores relacionados con enfermedades neurodegenerativas, siendo para la EA y la EP en donde más enfoques se han realizado [108]. Particularmente, en la EP el uso de SERS se ha enfocado mayoritariamente para la detección de la DA, como propuesta de biomarcador para identificar la EP [115]. Por ejemplo, se han diseñado arreglos con nanopartículas metálicas, mayoritariamente de plata debido a que existe una mayor interacción superficial para adsorción de los grupos catecoles de la DA con la superficie metálica de plata, lo cual ha llevado a fabricar nanoelectrodos de plata para detectar DA en fluidos biológicos, como en el LCR, en concentraciones del orden nanomolar [116]. Otras aproximaciones, bajo el mismo principio, han empleado materiales híbridos con nanopartículas metálicas, ya sea de Ag o Au funcionalizadas con agentes de reconocimiento celular, por ejemplo combinando códigos de barras de ADN con inmunoensayos de microesferas, con la finalidad de incrementar la selectividad hacia la DA, donde se tiene mezclas complejas con otros neurotransmisores [117, 118]. Sin embargo, hasta el momento no se ha aplicado la espectroscopia SERS para la detección de otras biomoléculas o metabolitos que pueden ser de gran relevancia para estudiar la EP, debido a que, por un lado, existen pocos grupos de investigación dedicados en el estudio SERS de biomoléculas para estudiar la neurodegeneración y por otro lado, debido a la poca especificidad existente de metabolitos que sean específicos de la EP. Además, la optimización de síntesis para obtener robustos materiales nanoestructurados, que permita incrementar la respuesta SERS, así como la implementación de métodos que permitan un fácil reconocimiento SERS en muestras complejas, siguen en constante desarrollo. En este sentido la espectroscopia SERS aplicada hacia la detección de otros metabolitos, tal como el conjugado 5-S-CysDA, podría aportar un método alternativo de gran potencialidad en la detección de biomarcadores para la EP.

### **2.7. Nanomateriales de grafeno**

Los materiales derivados de grafeno tales como grafeno prístino, óxido de grafeno, óxido de grafeno reducido o quantum dots de grafeno se caracterizan por poseer una gran cantidad de enlaces C-C tipo  $sp^2$  y  $sp^3$ , además de la presencia de algunos grupos funcionales superficiales, mayoritariamente grupos OH, dependiendo de su método de obtención [119]. Estas características químicas y estructurales les confieren excelentes propiedades químicas, físicas y eléctricas, tales como: una alta conductividad eléctrica y de calor, gran área superficial, estabilidad y resistencia química, biocompatibilidad, etc [120]. Estos materiales, junto con sus propiedades, han sido ampliamente explorados en los últimos años en diversas aplicaciones biomédicas; por ejemplo, en el diseño y fabricación de biosensores con múltiples tipos de reconocimientos tanto electrónicos, ópticos y espectroscópicos [121].

El óxido de grafeno (GO), obtenido mediante la oxidación de grafeno, y el óxido de grafeno reducido (rGO), proveniente de la reducción de GO, poseen ventajas químicas adicionales, debido a la presencia de grupos oxigenados en su superficie, principalmente hidroxilos, ácidos carboxílicos y epóxidos, los cuales les confieren mayor dispersabilidad en un medio acuoso pero sin perder sus

propiedades fisicoquímicas [122]. Estas ventajas han permitido explorar sus aplicaciones en interacción directa en ambientes biológicos, permitiendo desarrollar dispositivos de reconocimiento con vías de sensado para la detección de moléculas, proteínas, células o patógenos, con múltiples enfoques de interés desde el ambiental hasta en casos clínicos [119, 121].

### **2.7.1. Dispositivos analíticos de grafeno para diseño de biosensores**

Las propiedades de los materiales grafénicos han permitido construir biosensores para la detección sensitiva y reproducible de múltiples metabolitos de interés clínico y biomédico. Los materiales grafénicos para la detección de biomarcadores se han enfocado principalmente en el desarrollo de tres tipos: biosensores electroquímicos, inmunobiosensores y biosensores de DNA [123]. Lo anterior ha llevado a desarrollar prototipos de dispositivos de detección de biomarcadores de la EA; por ejemplo, en el desarrollo de inmunobiosensores para identificar la proteína  $\beta$ -amiloide 1-42, basado en quantum dots de grafeno, integrados en una plataforma con un doble método de reconocimiento, mediante espectroscopia de fluorescencia y electroquímica [124]. En otros diseños se ha empleado el rGO en el cual se han realizado modificaciones químicas superficiales, con la finalidad de ser funcionalizado y anclar anticuerpos contra  $\beta$ -amiloide 1-42, proporcionándoles selectividad superficial, permitiendo distinguir un cambio de resistencia en el biosensor, cuando el péptido se adsorbe en su sitio específico de reconocimiento con el anticuerpo [125]. El diseño de biosensores basados en grafeno para detectar biomarcadores de EP también ha sido explorado, de forma semejante a la EA, donde gran parte de los diseños de los biosensores han sido enfocados en un reconocimiento de tipo electroquímico. Por ejemplo, electrodos basados en grafeno han sido modificados superficialmente para generar estructuras tridimensionales, con la finalidad de detectar dopamina y ácido úrico simultáneamente, siendo identificados mediante voltamperometría diferencial pulsada, en los cuales se llegaron a detectar dichas moléculas en concentraciones en el orden de 1 nM en muestras de pacientes con EP [126].

Los materiales derivados de grafeno también poseen excelentes propiedades en el apagamiento de la fluorescencia de moléculas altamente fluorescentes. Por ejemplo, mediante la adsorción de la rodamina verde 6 (R6G) sobre la superficie de grafeno, se ha logrado disminuir significativamente su fluorescencia en condiciones experimentales [127]. Estas propiedades aportan una ventaja considerable del uso de estos materiales cuando se emplea la espectroscopia Raman, como método de detección de los metabolitos, ya que además de apagar la fluorescencia, se puede favorecer la amplificación de algunos modos vibracionales de las moléculas que están adsorbidas en la superficie, generando el llamado amplificación de dispersión Raman basada en grafeno (GERS, del inglés) [128]. Este fenómeno tiene un principio semejante a SERS, en el cual el efecto químico de interacción superficial juega un papel de mayor relevancia para promover dicho fenómeno, permitiendo obtener un espectro Raman más claro, estable y reproducible en las bandas de los vibracionales de la molécula en estudio, a comparación de un espectro SERS. Sin embargo, ambas estrategias pueden ser perfectamente combinadas, mediante la formación híbrida de sustratos grafénicos en los que se crecen o depositan nanopartículas metálicas. Lo

anterior permite combinar en un solo dispositivo los efectos de área superficial, propiedades eléctricas y estabilidad del sustrato gráfenico, con las propiedades plasmónicas de las nanopartículas, en la obtención conjunta del llamado efecto G-SERS [129]. Ejemplos en la literatura han mostrado que estas estrategias combinadas, asistidas con la espectroscopia Raman como el método de detección, permiten detectar una diversidad de moléculas a muy bajas concentraciones, con gran sensibilidad y de mayor reproducibilidad en sus espectros [130].

Los ejemplos anteriores muestran que los materiales gráfenicos y sus derivados son potenciales recursos para la fabricación de plataformas analíticas, las cuales puedan facilitar la detección selectiva y sensible de (bio)moléculas de interés médico. Particularmente, para la detección de marcadores de la EP aún existen múltiples alternativas experimentales, en las que se pueden emplear diversos materiales nanoestructurados, lo cual permita la fabricación de biosensores y dispositivos de reconocimientos, que posteriormente puedan ser trasladados al diagnóstico clínico de esta patología.

## Justificación

El metabolismo oxidante de la DA ha sido señalado como un factor clave que promueve la activación de varios mecanismos celulares, los cuales conducen a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SN, la principal zona dañada en la EP. Los metabolitos oxidados de la DA se han reportado en la literatura como compuestos que causan toxicidad en la célula, entre ellos se encuentra el conjugado 5-S-CysDA. Dicho conjugado causa una severa alteración en la homeostasis de la célula y activa mecanismos apoptóticos de muerte celular programada, lo cual ha llevado a especular que la formación desmedida y la acumulación de este producto puede jugar un papel significativo en el transcurso de la neurodegeneración en la SN. Sin embargo, los reportes existentes en la literatura se han enfocado mayoritariamente en demostrar los efectos tóxicos de dicho conjugado de forma exógena. Por otro lado, el conjugado 5-S-CysDA ha sido identificado en el tejido cerebral de mamíferos, incluyendo humanos, siendo abundante en el estriado y la SN. Además, también se ha identificado su presencia en el LCR de pacientes diagnosticados con la EP, siendo sus niveles considerablemente mayores, casi del doble, en comparación con los pacientes sanos; por lo que varios autores han propuesto emplear el 5-S-CysDA como un potencial biomarcador de la EP. Sin embargo, hasta el momento no existe un reporte en la literatura que demuestre cuantitativamente si existe una evolución de dicho compuesto en el metabolismo celular de las neuronas dopaminérgicas ante un estado de neurodegeneración. Además, a pesar de que varios autores han señalado una relación entre la contaminación de la atmósfera con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN, en la literatura aún no existen evidencias experimentales suficientes que muestren que gases contaminantes atmosféricos, como el ozono, conducen a la alteración de la síntesis y el metabolismo de la DA en un modelo animal. Por lo que en este trabajo, se planteó evaluar cuantitativamente los niveles del conjugado 5-S-CysDA y otros metabolitos derivados de DA en un modelo animal, el cual se basa en la exposición de ratas a bajas dosis de ozono en intervalos de tiempo delimitados. Por otro lado, el conjugado 5-S-CysDA ha sido identificado y cuantificado en biopsias de tejido cerebral y en LCR de pacientes con EP, empleando técnicas cromatográficas convencionales, comúnmente HPLC. Sin embargo, estas técnicas requieren largo tiempo de análisis y conllevan costos elevados, por lo que la introducción de técnicas analíticas alternativas, con miras a su uso clínico, podrían facilitar la detección de éste y otros metabolitos con alta sensibilidad pero en menor tiempo. Como una alternativa para la identificación del 5-S-CysDA, en este trabajo se propuso por un lado, el uso de materiales nanoestructurados, tales como nanopartículas metálicas y sustratos derivados de grafeno, como el sistema de reconocimiento, y por otro lado, a la espectroscopia Raman como la técnica de identificación de dicho conjugado. Combinando estos métodos se generan efectos plasmónicos de superficie, lo cual permite detectar moléculas en muy baja concentración y con gran sensibilidad mediante su espectro Raman. Por lo que en este trabajo, se evaluaron las capacidades de los métodos de superficie amplificada (SERS) y de adsorción molecular en sustratos grafénicos (GERS), para identificar a la DA y el conjugado 5-S-CysDA. Estas herramientas podrían permitir desarrollar plataformas analíticas sensibles y de rápida detección para estos y otros metabolitos de interés médico.

## Hipótesis

Los conjugados de quinonas de dopamina-glutación pueden ser identificados de forma confiable y precisa en un modelo animal de neurodegeneración progresiva, inducida con la exposición a ozono, empleando métodos analíticos cromatográficos y espectroscópicos, para ser empleados como marcadores biológicos en la EP.

## Objetivo General

Identificar y cuantificar la presencia de conjugados de dopamina-glutación en la SN y el estriado de cerebros de un modelo murino de neurodegeneración progresiva, empleando métodos analíticos, cromatográficos y espectroscópicos.

## Objetivos Particulares

- 1.- Sintetizar los conjugados de dopamina-glutación y caracterizarlos mediante técnicas analíticas convencionales y espectroscópicas vibracionales complementarias (espectroscopias Raman e infrarroja).
- 2.- Implementar un método analítico basado en HPLC-espectrometría de masas que permita la identificación y cuantificación de metabolitos derivados de DA y los conjugados de dopamina-glutación en la SN y el estriado del modelo animal.
- 3.- Demostrar la eficiencia de la espectroscopia SERS, como herramienta alterna a los métodos cromatográficos, para la detección sensitiva de metabolitos derivados de DA y los conjugados de dopamina-glutación.
- 4.- Desarrollar una prueba de concepto para adsorber alguno de los conjugados de dopamina-glutación en sustratos basados en materiales grafénicos, con miras hacia el desarrollo de biosensores selectivos y sensitivos.

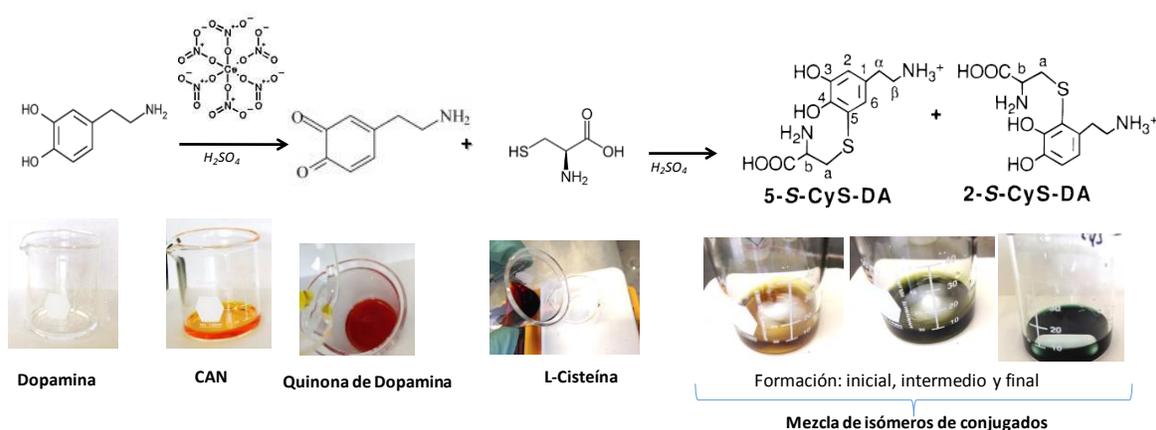
# 3. METODOLOGÍA

## 3.1. Síntesis, purificación y caracterización de tio-catecolaminas

Con la finalidad de lograr el objetivo particular 1, previamente descrito, se realizó la síntesis química del conjugado 5-S-CysDA, debido a que no existe comercialmente. Además, su síntesis química, con los métodos aquí reportados, permitió obtener una mayor cantidad de la muestra pura y ser empleado como un criterio analítico en los diversos análisis previamente propuestos.

### 3.1.1. Síntesis de 5-S-CysDA

La síntesis del conjugado 5-S-CysDA se realizó siguiendo las rutas previamente reportadas en la literatura con algunas modificaciones menores [44, 131]. Se preparó una solución de 10 mmoles de DA, disuelta en 5 mL de  $H_2SO_4$ , 2M, a la cual se le adicionaron 20 mmoles de nitrato de amonio y cerio (IV) (CAN, del inglés), disuelto en 10 mL de  $H_2SO_4$ , 2M. CAN es un agente oxidante comúnmente empleado en reacciones de química orgánica, en esta reacción se empleó para oxidar a la DA y generar el intermediario de DA-o-Q. La mezcla de la reacción anterior fue rápidamente añadida a una solución que contenía 20 mmoles de L-Cys, disuelta en 5 mL de  $H_2SO_4$ , 2M. La solución de color marrón, correspondiente a la DA-o-Q, presentó varios cambios de color posterior a la reacción con L-Cys, pasando por amarillo, verde y finalmente azul-verdoso (**Figura 5**). Estos colores son indicativos tanto de la reacción de DA-o-Q con L-Cys y los cambios del estado de oxidación de CAN, IV a III. Después de la reacción completa, la solución contenía la mezcla de los isómeros 5-S-CysDA y 2-S-Cisteinil-dopamina (2-S-CysDA). En la **Figura 5** se representa un esquema de la reacción experimental para formar el conjugado 5-S-CysDA.



**Figura 5.** Representación esquemática de la ruta de síntesis del conjugado de 5-S-CysDA, asistida mediante la oxidación de DA con el complejo de nitrato de amonio y cerio (CAN).

Posteriormente, la solución fue inmediatamente transferida a una columna (2 x 40 cm) de intercambio iónico (forma H<sup>+</sup>), Dowex 50Wx8, equilibrada previamente con agua desionizada. La columna fue lavada con agua desionizada y posteriormente eluida con 50 mL de HCl 0.5 M para eliminar la DA que no reaccionó, la cual fue seguida espectrofotométricamente a un máximo de absorbancia de  $\lambda_{\text{max}} = 280$  nm. Posteriormente, se hicieron eluciones con HCl 3 y 4 M, empelando 150 y 300 mL, respectivamente. Las soluciones provenientes de cada medio ácido fueron analizadas espectrofotométricamente para medir la formación de 5-S-CysDA, siguiendo los máximos de absorción a  $\lambda_{\text{max}} = 254$  y 292 nm. Se colectó y redujo el volumen de las fracciones provenientes de las eluciones con HCl, 4M. La solución anterior se transfirió a una segunda columna (2 x 40 cm), empaquetada con una resina Dowex 50Wx2 (forma H<sup>+</sup>), equilibrada con HCl 2M. Se hicieron eluciones con HCl 2M (150 mL), monitoreando las fracciones mediante espectrofotometría y se colectaron solo aquellas fracciones con los máximos de absorción a  $\lambda_{\text{max}} = 254$  y 292 nm, lo cual es indicativo que el conjugado 5-S-CysDA se encontraba mayoritariamente presente en el medio. En la literatura se ha reportado que mediante esta síntesis el conjugado 5-S-CysDA se encuentra en mayor proporción que el isómero 2-S-CysDA (5:1 aproximadamente) [132]. Sin embargo, se realizó una purificación adicional mediante HPLC en fase reversa, con la finalidad de obtener el compuesto lo más puro posible para ser empleado como estándar analítico de referencia en los ensayos posteriores.

### **3.1.2. Separación y purificación de 5-S-CysDA**

La purificación de 5-S-CysDA se realizó mediante HPLC en fase reversa, empleando un cromatógrafo HPLC con detección espectrofotométrica (Prominence Shimadzu HPLC). Se empleó una columna C-18 y las fases móviles empleadas fueron A: agua con ácido trifluoroacético (TFA) 1% (pH 3) y B: agua-acetonitrilo (1:1). Se empleó un gradiente de elución: 10% por 2 min; 100% por 10 min; 20% por 20 min y 2% por 5 min. Se colectaron las alícuotas fijando los máximos de absorción por espectrofotometría a  $\lambda_{\text{max}} = 254$  y 292 nm. Las alícuotas colectadas se concentraron en volumen y se separaron en varias fracciones para: ser analizadas espectroscópicamente, ser empleada como estándar HPLC para la cuantificación analítica y ser empleados en las pruebas de identificación mediante SERS y GERS.

### **3.1.3. Caracterización espectroscópica y estructural de 5-S-CysDA**

El conjugado 5-S-CysDA sintetizado previamente fue caracterizado espectroscópicamente y estructuralmente, con la finalidad de verificar tanto la estructura química como la pureza del compuesto y poder ser empleado como estándar de referencia en los análisis cualitativos y cuantitativos. Además, en la literatura no se ha mostrado una caracterización completa de dicho compuesto, por ejemplo no se ha reportado previamente un espectro experimental por espectroscopia infrarroja.

Se emplearon las siguientes técnicas y condiciones de caracterización: 1) Espectrofotometría UV-Vis, se realizó empleando un espectrofotómetro UV-Vis (Cary UV-Vis, 5000, Agilent), se analizó una solución acuosa del producto sintetizado en una celda de cuarzo, colectando el espectro de absorción en un intervalo de 200-800 nm; 2) Resonancia magnética nuclear (MRN) de protón ( $^1\text{H}$ ), empleando un espectrómetro NMR de 300 MHz (Bruker, Avance 300 MHz), el análisis se realizó en líquido empleando una muestra concentrada; 3) Espectrometría de masas, el análisis se realizó empleando en un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (Agilent serie 6490, LC-Masas, QqQ), mediante el modo de ionización por electrospray (ESI, inglés); y 4) Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), se realizó empleando un espectrómetro Nicolet iS50R (Thermo Scientific, USA) equipado con un aditamento de reflectancia total atenuada (ATR, del inglés) con cristal de diamante, se depositó una cantidad de 5-S-Cys-DA liofilizado sobre la ventana de diamante y se cubrió para evitar su hidratación, se colectaron varios espectros con 32 scans, a  $4\text{ cm}^{-1}$  de resolución espectral en un rango de  $500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.2. Método HPLC-MS para la detección de metabolitos derivados de DA**

Con la finalidad de lograr el objetivo particular 2, primero se desarrolló un método analítico basado en HPLC-espectrometría de masas (HPLC-MS), combinando estrategias recientes de métodos de la literatura [133, 134]. El diseño de este método permitió implementarlo como un método de rutina para identificar y cuantificar con alta sensibilidad y selectividad los metabolitos DA, HVA, DOPAC, así como el conjugado 5-S-CysDA, previamente sintetizado. Además, este método también fue empleado para cuantificar dichos compuestos en los tejidos de la SN y el estriado de las ratas en el modelo animal de ozono.

#### **3.2.1. Optimización de parámetros analíticos para medición de metabolitos por HPLC-MS**

En la optimización de la identificación analítica el primer paso consistió en obtener los espectros de masas y fragmentaciones en masa de cada uno de los metabolitos definidos: dopamina (DA), ácido homovanílico (HVA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 5-S-CysDA y el 1- $\alpha$ -metil-3,4-dihidroxifenil alanina (AMDOPA), como estándar interno. El análisis por masas se realizó mediante cromatografía HPLC acoplada a espectrómetro de masas (Agilent 6490, LC-Masas de triple cuadrupolo, QqQ), empleando el modo ionización por electrospray (ESI). Se analizó cada uno de los metabolitos para obtener su espectro de masas, en el cual se pudiera identificar tanto el ion molecular, en su relación carga/masa, así como el pico más abundante en todo el espectro. La identificación sensitiva de cada compuesto se realizó empleando el modo de adquisición de monitoreo de ion selectivo (SIM). Posteriormente, cada ion molecular y su pico de mayor abundancia se optimizaron en las siguientes condiciones de medición en el detector de masas: voltaje del fragmentador, dwell, voltaje del capilar, temperatura del gas ionizante, flujo del gas y presión del nebulizador. Los valores de los parámetros de optimización para cada compuesto se muestran en detalle en la **Tabla 1**. Las condiciones anteriores permitieron asegurar una selectividad de detección de los iones de cada compuesto, así como en incrementar la sensibilidad de detección.

**Tabla 1.** Parámetros de optimización por espectrometría de masas para la detección de los compuestos derivados de DA y el conjugado 5-S-CysDA.

Compuesto	ion molecular	Ion a seguir	Voltaje Frag (V)	Voltaje Capilar (V)
Dopamina	154	154.1	85	3
HVA	182	137.1	60	3
DOPAC	168	123.1	80	3
5-S-CysDA	273	273.1	75	4

#### Agilent 6490 QQQ, LC-Masas con tecnología JetStream

Modo del ion	ESI (+) para DA, HVA, CysDA y DHTB-1, ESI(-) para DOPAC
Temperatura del gas	350°C
Flujo del gas	11 L/min
Presión del nebulizador (nitrógeno)	18 psi
Dwell time	40 ms

Posteriormente, se determinaron las condiciones de elución y detección de los metabolitos en HPLC, empleando las condiciones anteriormente optimizadas por espectrometría de masas. Con esta finalidad se empleó una columna analítica Agilent Pursuit 3 PFP (150 X 2.0 mm, 3 µm de tamaño de partícula), en la cual se favorece la retención de moléculas aromáticas polares. Las condiciones implementadas en HPLC y en la columna PFP fueron: temperatura en la columna, 30°C; volumen de inyección, 15 µL. Se utilizaron dos fases móviles para eluir los analitos en la columna: A (agua ultrapura con ácido fórmico 0.2%) y B (metanol), con un flujo de arrastre de 3 mL/min y empleando una curva de gradiente tal como se describe en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Parámetros y condiciones cromatográficas en el método de HPLC para la detección y cuantificación de los metabolitos.

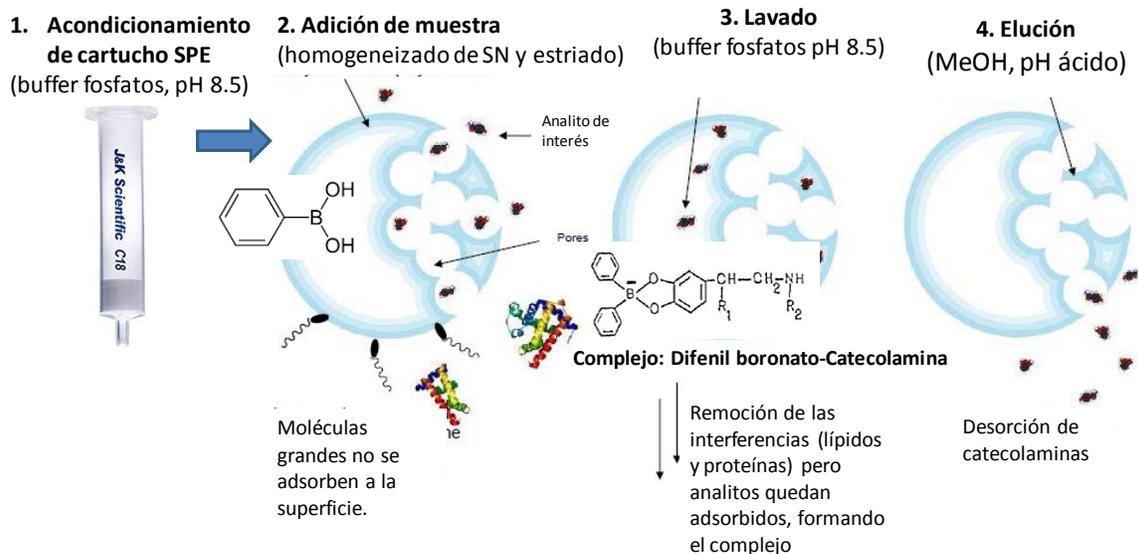
Parámetro	Valor	
Columna	Analítica: Agilent Pursuit PFP, 2x 150 mm, 3 µm	
Temperatura de columna	30°C	
Volumen de inyección	15 µL	
Temperatura de inyector	4° C	
Fases móviles	A: Agua ultrapura con 2% ácido fórmico, B: Metanol	
Flujo de arrastre	3 mL/min, constante	
Gradientes de flujo	<b>Tiempo (min)</b>	<b>%B</b>
	0.0	2
	0.5	2
	1.5	20
	11.0	40
	20.0	60
	21.0	2



Posteriormente, con las condiciones optimizadas en HPLC y espectrometría de masas se determinaron los tiempos de retención de cada analito y lograron establecer los criterios analíticos de cuantificación en el método. Finalmente, se crearon las curvas de calibración de cada analito, empleando concentraciones conocidas de cada uno de ellos en un intervalo de  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-8}$  M, con la finalidad de establecer los parámetros analíticos para determinar los límites de detección y cuantificación, así como la sensibilidad del método para cuantificar los compuestos puros. La determinación del límite de detección se realizó mediante la integración total del área bajo la curva del pico de cada analito, a la concentración dada, y en el tiempo de retención previamente determinado. La cuantificación de DA, 5-S-CysDA y HVA se realizó por medio de una curva de calibración utilizando como estándar interno la AMDOPA. La curva de calibración se validó de acuerdo a los parámetros establecidos por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC, 2017) de la COFEPRIS, la cual establece los parámetros aceptados de intervalo lineal, intervalo de trabajo, precisión, exactitud (recobro), límites de detección (LDD) y de cuantificación (LDC). Los parámetros de precisión y exactitud se consideraron aceptables cuando el coeficiente de variación (CV) es menor al 10 % y el recobro se ubica entre el 60-120 % (CCAYAC, 2017) [135]. Por otro lado, la cuantificación de DOPAC se realizó mediante una curva de calibración con estándar externo y se emplearon los mismos criterios de validación descritos para los compuestos anteriores.

### **3.2.2. Tratamiento y separación metabolitos por extracción en fase sólida**

Con la finalidad de separar con mayor eficiencia las catecolaminas contenidas en la muestra del homogenado del tejido cerebral, se empleó un cartucho de extracción en fase sólida (SPE, del inglés), (Agilent, SPE Bond Elut). Este cartucho permite crear una adsorción con alta preferencia por catecolaminas, mediante variaciones tipo ácido-base en el medio, favoreciendo su adsorción en la superficie del cartucho mediante enlaces covalentes, formando de un complejo difenilboronato catecolamina [136]. La finalidad de emplear el cartucho SPE fue para proporcionar selectividad de retención a las catecolaminas en el cartucho, lo cual reduce la cantidad de matriz interferente en la inyección de la muestra en la columna de HPLC. Lo anterior permitió obtener un espectro más limpio y con los picos bien definidos, lo cual incrementa la sensibilidad de detección de cada metabolito.



**Figura 6.** Descripción gráfica del procedimiento de separación de catecolaminas el cartucho SPE. 1. Se acondiciona el cartucho; 2) adición y carga de la muestra, se adsorben las catecolaminas; 3) lavado, se remueven los interferentes y se forma el complejo difenil-boronato-catecolamina; y 4) elución, se hace la extracción selectiva de las catecolaminas. Figura adaptada de [137].

La adsorción y elución de las catecolaminas en el cartucho SPE se realizó mediante cuatro pasos de tratamiento, previo a la inyección del analito en la columna HPLC: 1) acondicionamiento del cartucho SPE con 1 mL de agua-acetonitrilo (70:30) con ácido fórmico 1%, 1mL de amortiguador de lavado (amortiguador de fosfatos 0.5 M a pH 11) y 1 mL de amortiguador fosfatos 0.5 M a pH 8.5; 2) adición de los metabolitos, previamente incorporados en el amortiguador de fosfatos (pH 5.6); 3) lavado del cartucho con 1mL de amortiguador de fosfatos y acetonitrilo 5% a pH 8.5; y 4) elución con 1 mL agua-acetonitrilo (70:30) con ácido fórmico 1% y secado al vacío durante 3 s. Posteriormente, la muestra colectada se transfiere en un vial para su inmediato análisis en el método HPLC-MS. Una representación esquemática del proceso de separación en el cartucho SPE se muestra en la **Figura 6**.

Previo a la cuantificación de los metabolitos en el tejido cerebral del modelo animal, se debe determinar la eficiencia de recobro en todo el método, con la finalidad de descartar el efecto matriz que aporta la composición compleja del tejido cerebral. Para este propósito se homogenó el cerebelo de una rata control del modelo, esa región no debe contener los metabolitos que se desean analizar. En el sobrenadante del homogenado se agregó una concentración conocida de cada metabolito (DA, HVA, DOPAC, 5-S-CysDA), incluyendo el estándar interno (AMDOPA). Posteriormente, esa matriz se separó en el cartucho SPE, bajo el mismo procedimiento antes descrito y finalmente se hizo la inyección en el cromatógrafo para cuantificar cada uno de los metabolitos en el método HPLC-MS establecido. La determinación del porcentaje de recuperación, recobro y exactitud se realizó bajo los parámetros analíticos previamente establecidos y bajo los criterios de la norma CCAYAC, 2017 [135]. El método descriptivo y los resultados obtenidos del recobro y recuperación se muestran complementariamente en el **Anexo 4**.

### **3.3. Detección de los metabolitos derivados de DA en el modelo murino de exposición a ozono**

El método HPLC-MS previamente desarrollado fue posteriormente empleado para realizar la cuantificación real de los metabolitos en las muestras de los tejidos de cerebro de las ratas del modelo de exposición a ozono.

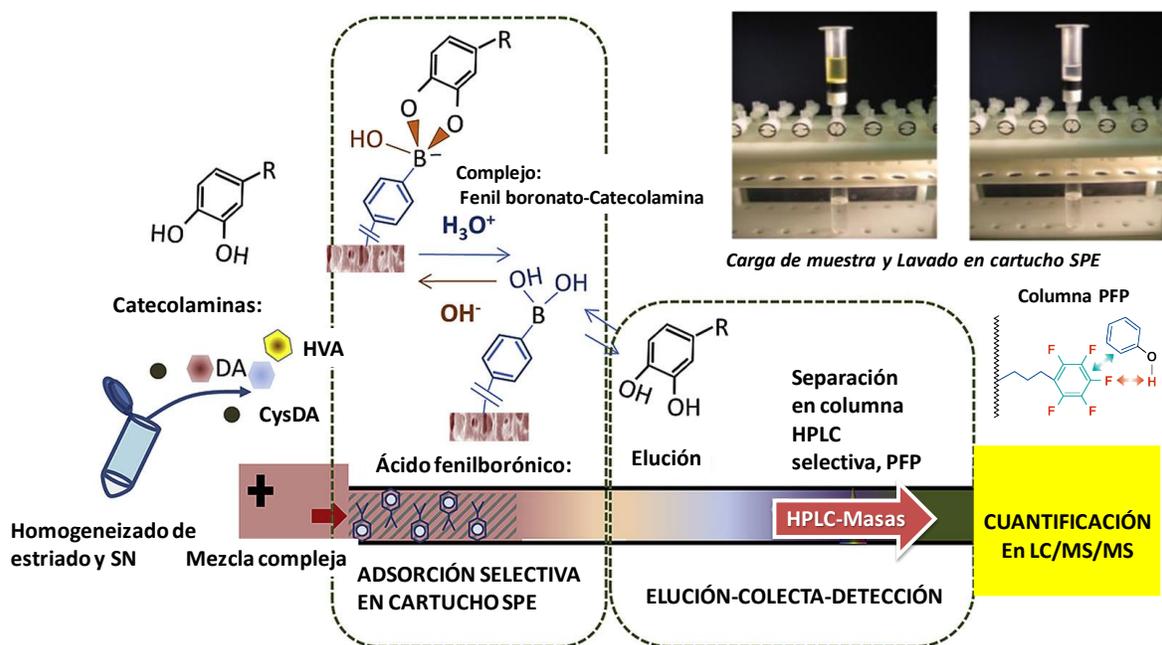
#### **3.3.1. Descripción del modelo animal de exposición a ozono**

La manipulación de los animales se llevó a cabo de conformidad con las directrices del Instituto Nacional de Sanidad para el Tratamiento de los Animales, la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y fueron aprobadas por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Medicina, UNAM.

Se emplearon ratas macho Wistar que pesaban entre 250-300 g, las cuales fueron alojadas individualmente en cajas de acrílico con libre acceso al agua y comida (Purina, Minnetonka, MN, EE.UU.) y mantenidas en una habitación al aire libre. Las ratas se dividieron al azar en seis grupos, conteniendo 10 individuos: Grupo 1, control, expuesto a una corriente de aire libre de ozono durante 30 días; Grupo 2, expuesto durante 7 días a ozono; Grupo 3, expuesto durante 15 días a ozono; Grupo 4, expuesto durante 30 días a ozono; Grupo 5, expuesto durante 60 días a ozono; y Grupo 6, expuesto durante 90 días a ozono. Las ratas fueron expuestas a ozono (0.25 ppm) diariamente durante 4 h. Una vez cumplido el tiempo establecido de exposición para cada grupo, los animales fueron devueltos a sus jaulas de origen y 2 h después fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (50 mg/kg) para después ser decapitadas. Se extrajeron los cerebros de 3 ratas de cada grupo y se hicieron las disecciones para obtener las regiones del estriado y la SN. Los tejidos fueron criopreservados a -70°C para posteriormente ser homogenados. Este modelo se trabajó siguiendo los protocolos de manejo de los animales y procedimientos de extracción del cerebro implementados en el grupo de la Dra. Selva Rivas [63, 64].

#### **3.3.2. Detección de los metabolitos derivados de DA en homogenados de cerebro de rata del modelo con ozono por HPLC-MS**

La detección y cuantificación de los metabolitos, antes definidos, en las muestras de los tejidos cerebrales en el modelo de ozono se realizó bajo el siguiente procedimiento: i) se disectaron las regiones del cerebro de la rata, SN y estriado, en cada uno de tiempos de exposición a ozono; ii) se determinó la masa de cada tejido y se adicionaron 500 µL de ácido perclórico 0.1 M con EDTA de 5%; iii) el tejido se homogenó; iv) la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min; v) se colectó el sobrenadante, se adicionaron 500 µL del acondicionador de fosfatos pH 8 y el volumen correspondiente del estándar interno (AMDOPA) para obtener una concentración final de  $1 \times 10^{-6}$  M; vi) el homogenado se separó empleando el cartucho SPE, siguiendo el método antes descrito; vii) se colectó el volumen de la elución de los metabolitos para su cuantificación en el método HPLC-MS. La descripción gráfica en **Figura 7**.



**Figura 7.** Procedimiento general de la separación selectiva de los metabolitos en los homogenados del tejido cerebral. Las catecolaminas contenidas en el homogenado de SN o estriado son separadas mediante el cartucho SPE, se colectan los analitos, se inyectan en la columna de HPLC y se cuantifican mediante espectrometría de masas. Figura adaptada de [138].

### 3.4. Detección de DA y 5-S-CysDA en sistemas nanoestructurados con respuesta amplificada

Con la finalidad de lograr el objetivo 3 previamente descrito, se desarrolló la metodología que permitiera mostrar la eficiencia de la espectroscopia SERS en la detección de la DA y el conjugado 5-S-CysDA.

#### 3.4.1. Detección de los metabolitos derivados de DA y de 5-S-CysDA asistida con SERS

##### a) Síntesis de nanopartículas de plata.

Una solución coloidal de nanopartículas de plata fue preparada siguiendo el método convencional de reducción mediada por citratos, reportado por Lee-Meisel [139]. En la síntesis se emplearon 18 mg de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) los cuales fueron añadidos a 100 mL de agua ultrapura en ebullición. Posteriormente, se añadieron 2 mL de una disolución de citrato de sodio tribásico 1%, manteniendo la solución en agitación vigorosa y en ebullición durante 90 min, después se redujo la temperatura gradualmente hasta llegar a la ambiente pero manteniendo la agitación constante. Al final de la reacción, la solución fue de color amarillo verdoso, lo cual es indicativo de la formación coloidal, tal como se ha reportado en la literatura. Finalmente la solución coloidal fue caracterizada mediante espectroscopia de absorbancia UV-Vis (Agilent, Cary UV-Vis 5000), con la finalidad de verificar la banda de superficie plasmónica, característica de las nanopartículas de plata.

*b) Preparación de fluidos biológicos sintéticos.*

i) Orina artificial. La preparación de esta solución se siguió bajo el protocolo reportado en la literatura por Yang et al. con ligeras modificaciones [139]. Se preparó una solución stock de 250 mL añadiendo: KCl 162.71 mM, CaCl<sub>2</sub> 13.72 mM, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 5.92 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 34.21 mM, NH<sub>4</sub>Cl 86 mM, NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O 17.05 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.25 mM, NaCl 23.69 mM, citrato de sodio 5.46 mM, creatinina 19.44 mM y urea 832.5 mM. Además se añadió 2 mM de ácido úrico, que representa la concentración normal que excreta diariamente una persona sana [140]. La solución se ajustó a pH 5, se mantuvo a 4°C hasta su uso y por un máximo dos semanas.

ii) Líquido cefalorraquídeo artificial (LCF). Esta solución fue preparada siguiendo el método reportado por Tamano et al. el cual es comúnmente empleado en experimentos de transmisión sináptica [141]. En una solución stock de agua ultrapura de 250 mL se añadieron: CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM, KCl 2.5 mM, NaCl 119 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26.2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mM y D-glucosa 11mM. El pH de la disolución se mantuvo en 7.3. La solución se almacenó a 4°C para ser usada por un periodo máximo de una semana.

### **3.4.2. Detección SERS de DA y 5-S-CysDA en agua y en fluidos biológicos sintéticos**

a) Preparación de las muestras. Se prepararon concentraciones conocidas, en un intervalo de 10<sup>-5</sup> hasta 10<sup>-8</sup> M, de DA en agua ultra pura, pH 7 y de 5-S-CysDA en agua ultrapura, pH 4. Es importante resaltar que para evitar la oxidación del 5-S-CysDA las soluciones se mantuvieron siempre en un pH inferior a 5. Las soluciones de DA y 5-S-CysDA en los fluidos biológicos simulados se hicieron diluyendo los metabolitos en el respectivo medio hasta alcanzar la concentración deseada. Las mediciones SERS se hicieron en medio acuoso en una cubeta, es decir se empleó un microtubo de PCR, en el cual se mezclaron 100 µL del metabolito con 100 µL de las nanopartículas de plata coloidal, agitado *in situ* con la misma micropipeta. En los casos de las mezclas donde el metabolito se encontraba diluido únicamente en agua, se adicionaron 10 µL de KCl 1M, como agente agregante, con la finalidad de generar la agregación de las nanopartículas. Para los metabolitos diluidos en la orina sintética o el LCR no fue necesario adicionar el agente agregante. El mismo orden y condiciones de mezcla se siguieron para todas las mediciones.

b) Adquisiciones SERS. Las mediciones en cubeta se hicieron empleando un microespectrómetro confocal Raman (WITec, Ulm, Germany) empleando dos diferentes fuentes de excitación láser a longitudes de onda de 488 y 514 nm. La fuente de generación láser empleada fue un láser de estado sólido bombeado por diodos de onda continua. El haz del láser fue enfocado a mitad de la solución mediante un objetivo 20X (Zeiss, N.A. 0.9). Las potencias empleadas fueron 5 mW y 30 mW para los láseres de 488 y 532 nm, respectivamente. En todos los casos se colectaron 100 espectros por cada medición, con 1 s de tiempo de integración. Los espectros SERS se colectaron empleando una rejilla de 600 líneas por mm, favoreciendo una resolución espectral de 5 cm<sup>-1</sup>. La detección se realizó empleando un detector CCD de enfriamiento termoeléctrico.

c) Tratamiento y análisis de los espectros SERS. Los espectros se pre-procesaron manualmente empleando el software Witec project 5.1, con la finalidad de remover los rayos cósmicos; realizar corrección de línea base y suavizado, basado en el método Savinsky-Golay, empleando una ventana de 5 puntos con un algoritmo de segundo orden. Los 100 espectros de cada medición se promediaron para obtener un único espectro representativo. El procesamiento analítico para determinar la cuantificación de cada metabolito en cada una de las concentraciones establecidas se realizó mediante GnuR, en un algoritmo previamente escrito para dicho propósito. Se seleccionaron al menos 4 bandas características de cada espectro SERS, con la finalidad de determinar el límite de detección de cada analito. Se integró el área bajo la curva de cada una de las bandas, en función de cada valor de concentración conocido de cada analito, obteniendo su abundancia en nm. Finalmente se obtuvieron los valores analíticos de la correlación lineal, con los valores antes establecidos para determinar la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación lineal.

### **3.4.3. Adsorción y detección de 5-S-CysDA en sustratos grafénicos**

Con la finalidad de lograr el objetivo particular 4, como prueba de concepto, se evaluaron los sustratos grafénicos, óxido de grafeno (GO) y óxido de grafeno reducido (rGO) para adsorber superficialmente el conjugado 5-S-CysDA y ser detectado mediante la espectroscopia Raman. Además, se estudiaron los fenómenos de interacción fisicoquímica involucrados en la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO.

#### **3.4.3.1. Preparación de los sustratos grafénicos para la adsorción y caracterización de 5-S-CysDA**

a) Síntesis de rGO. Se realizó siguiendo el método de reducción asistida por citratos [142]. Se emplearon 25 mL de una dispersión de GO a 0.1 mg/mL, la cual fue adquirida comercialmente a Graphenea (San Sebastian, España). La solución de GO mantenida en agitación y reflujo (80-90 °C) se añadieron 30 mg de citrato de sodio; se mantuvieron dichas condiciones durante 3 horas y al final de la reacción la solución se enfrió en agitación hasta temperatura ambiente. Se retiró el exceso de citratos, lavando consecutivos en una centrífuga. La solución de rGO fue finalmente redispersada en 10 mL de agua desionizada en un baño ultrasónico y posteriormente caracterizada, mediante espectroscopias UV-Vis, XPS, Raman e FTIR, con la finalidad de verificar la obtención del rGO.

b) Preparación de sustratos de GO y rGO. Se preparó una solución stock de GO a 100 ppm en agua desionizada, la cual se mantuvo en baño ultra sónico durante 1 h, con la finalidad de dispersar y homogeneizar las laminillas de GO. Un sustrato sólido de espejo de aluminio fue empleado como el soporte para fabricar los sustratos GERS. Se depositaron 10 µL de la solución de GO o rGO sobre el soporte de aluminio. La gota de GO o rGO se secó primero en un desecador a temperatura ambiente y después se depositaron 3 µL de la solución ácida de 5-S-CysDA, distribuyéndose perfectamente sobre toda la gota del sustrato seco. Los sistema 5-S-Cys-DA/GO/Al y 5-S-Cys-

DA/rGO/Al se secaron en un desecador y a temperatura ambiente para realizar su posterior análisis por espectroscopia Raman.

c) Análisis espectroscópico Raman y GERS. Las mediciones Raman se realizaron empleando un microespectrómetro Raman WITec alpha 300R (Ulm, Germany). Se empleó una fuente de excitación láser a 532 nm de longitud de onda, originada de una fuente de estado sólido Nd:YVO<sub>4</sub>. El láser incidente fue enfocado a través de un objetivo 100X (Zeiss, 0.9 de apertura numérica (NA)), localizando varias regiones de la gota seca de los sustratos preparados. Los espectros Raman se adquirieron con una potencia de láser de 3.56 mW, 4 s de integración y 20 acumulaciones. Se empleó una rejilla de 672 líneas por mm, logrando una resolución de 5 cm<sup>-1</sup> y un detector CCD enfriado termoeléctricamente. Como primera prueba se intentó coleccionar un espectro Raman del producto 5-S-CysDA liofilizado, depositado únicamente sobre el soporte de aluminio. Sin embargo, la muestra se hidrata rápidamente, y se adquiría únicamente una intensa banda de fluorescencia que cubría todo el espectro Raman. El análisis de los sistemas 5-S-Cys-DA/GO/Al y 5-S-Cys-DA/rGO/Al se realizó adquiriendo varios espectros puntuales Raman, coleccionados aleatoriamente en la zona media de la gota seca. Posteriormente, los espectros fueron pre-procesados para la remoción de rayos cósmicos y la corrección de la línea base; se obtuvo un espectro promedio de cada sistema para su posterior asignación de bandas.

d) Análisis por espectroscopia FTIR de la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO. Se obtuvieron los espectros FTIR de referencia de los compuestos de GO y 5-S-Cys-DA, empleando un espectrómetro Nicolet iS50R (Thermo Scientific, USA) equipado con un aditamento de reflectancia total atenuada (ATR, del inglés) con cristal de diamante, como se describió previamente. Posteriormente, se preparó una mezcla semisólida de la solución de 5-S-Cys-DA con GO. La mezcla se montó en el cristal de diamante y se adquirieron varios espectros IR. Se obtuvo un espectro promedio de las diferentes mediciones del complejo 5-S-CysDA/GO.

#### **3.4.3.2. Estudio experimental y teórico de la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO**

Con la finalidad de aportar información adicional del proceso de adsorción del conjugado 5-S-CysDA sobre GO, aparte de los métodos experimentales antes descritos, se emplearon también métodos de simulación computacional. En dicho estudio, se diseñaron primero diferentes tipos de arreglos de las configuraciones de la molécula de 5-S-CysDA y de la estructura de GO, considerando variaciones en la protonación del conjugado, así como de las moléculas de agua en el complejo diseñado. Posteriormente, sus energías potenciales fueron exploradas y optimizadas con el método de recocimiento simulado por el código ASCEC. Las conformaciones energéticamente más bajas de los diseños moleculares anteriores, fueron optimizadas empleando el nivel de teoría B3LYP-D3/DZVP con el software NWChem. Una vez optimizado, todas las moléculas de agua fueron eliminadas, y el sistema fue reoptimizado bajo el mismo procedimiento, obteniendo las estructuras de conformación mínima y las más estables. Además, las energías de interacción, así como su clasificación en términos de energías electrostática, polarización, dispersión y repulsión (Pauli), de los complejos sin la presencia de agua fueron calculados empleando la aproximación CE-B3LYP/6-31G (d,p), con la paquetería Crystal Explorer. Por último, un análisis mediante la teoría cuántica de los átomos en las moléculas (QTAIM) y el método de interacciones no covalentes (NCI)

se realizaron con una cuadrícula de algoritmos, acelerada por una unidad de procesamiento de gráficos (GPU), con la finalidad de obtener el tipo y fuerza de las interacciones involucradas en la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO. La metodología detallada del análisis computacional puede ser revisada en el trabajo publicado de esta sección [143].

### **3.5. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad PRISM, empleando el análisis ANOVA unidireccional (one-way), mediante la prueba de Kruskal-Wallis, para determinar si hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ). Esta prueba de tipo no-paramétrica, la cual compara tres o más grupos que no se encuentran relacionados entre sí. Los parámetros estadísticos se obtuvieron comparando el rango medio de cada columna con el rango medio de la columna control. Todas las representaciones gráficas en percentil de los datos denotan la media + SEM.

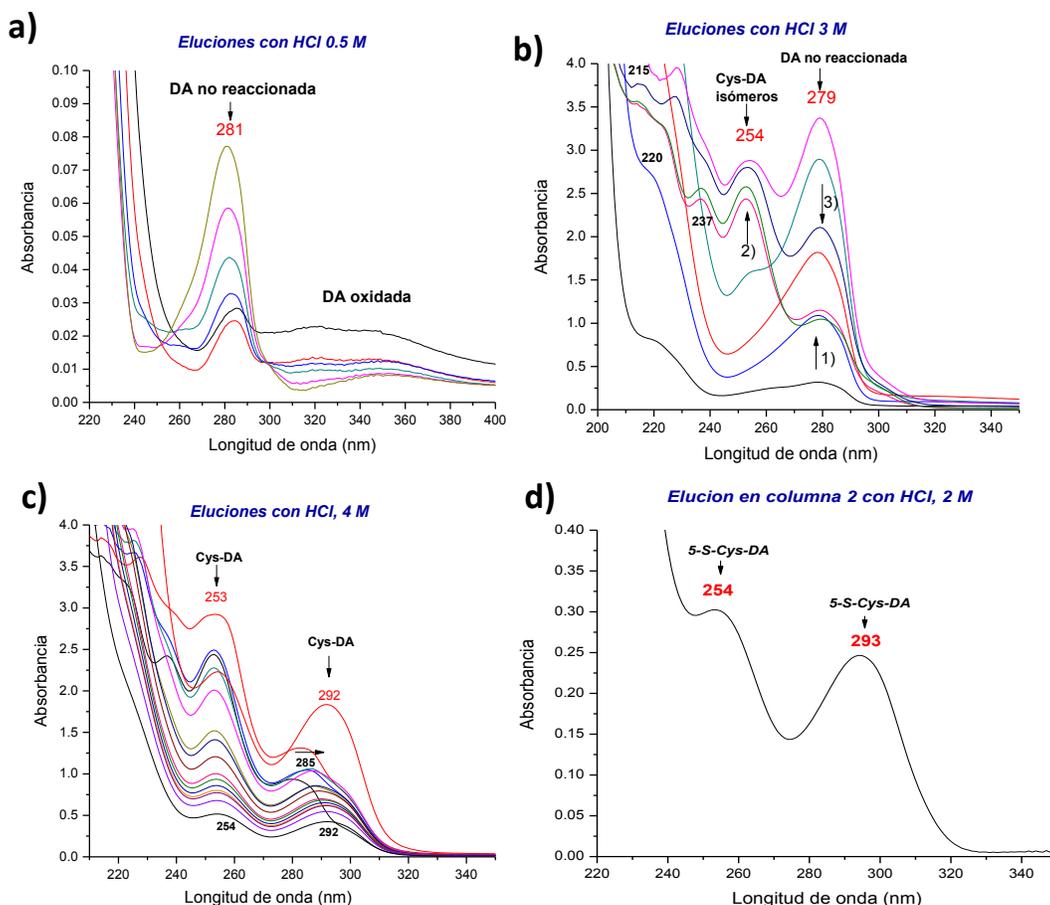
# 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

## 4.1. Caracterización de síntesis, separación y purificación de 5-S-CysDA

### 4.1.1. Separación y caracterización de 5-S-CysDA mediante UV-Vis

El conjugado 5-S-CysDA fue químicamente sintetizado mediante la ruta de oxidación de la DA, asistida con el complejo de cerio (IV). Esta ruta permite oxidar a la dopamina de forma controlada, a pH ácido, favoreciendo la obtención mayoritaria del conjugado 5-S-CysDA [41]. Sin embargo, esta mezcla de reacción, además de 5-S-CysDA también se obtiene la formación de los isómeros 2-S-CysDA y 2,5, di-S-CysDA, por lo que se realizó la separación de 5-S-CysDA mediante espectrofotometría UV-Vis. En la **Figura 8** se muestran los espectros de absorbancia del seguimiento de la separación de 5-S-CysDA de la ruta de síntesis empleada. La mezcla de reacción contiene productos de DA sin reaccionar, DA oxidada y los isómeros de 5-S-CysDA. Se ha reportado que cada uno de estos productos presenta bandas distintivas de absorción en el espectro de absorbancia [132]. La DA sin reaccionar fue monitoreada en un máximo de absorción a  $\lambda = 281$  nm, la cual fue eliminada después de la primera elución con HCl 0.5 M en la columna de intercambio; consecutivamente la DA-o-Q, que presenta un banda ancha de absorbancia a partir de los  $\lambda = 340$  nm también se eluye en estas condiciones (**Figura 8a**). Posteriormente, la elución de los isómeros de 5-S-CysDA se realizó empleando una mayor concentración de HCl (3 y 4M). La presencia de esos isómeros se ve reflejado por el surgimiento de nuevas bandas y el desplazamiento en la posición de los máximos de absorción de las existentes. Se distingue la aparición de nuevas bandas en las posiciones a 220, 237 y 254 nm, los cuales son indicativos de la aparición de los isómeros 2-S-CysDA y 2,5,di-S-CysDA (**Figura 8b**) [134, 144]. Conforme se incrementa el número de eluciones con HCl 4M, la banda a 253 nm se mantiene en dicha posición con variaciones en su intensidad, en tanto la banda a 285 nm se desplaza considerablemente hasta 292 nm (**Figura 8c**). Lo anterior permitió verificar que el conjugado ha sido sintetizado y se separó del resto de sus isómeros de la mezcla de reacción. Sin embargo, como medida para asegurar la pureza del producto, se realizó una posterior purificación mediante HPLC en fase reversa con detección espectrofotométrica, tal como se describe en la metodología, en la cual se fijaron los máximos de absorción a 254 y 294 nm y colectando únicamente el producto eluido en esos parámetros. El producto puro fue caracterizado nuevamente mediante espectrofotometría UV-Vis, obteniendo únicamente los máximos a 254 y 294 nm (**Figura 8d**); estas bandas se originan por las transiciones  $\pi - \pi^*$  del anillo aromático y de las transiciones  $n - \pi^*$  del grupo del ácido carboxílico [145]. Además, empleando el coeficiente de extinción molar del 5-S-CysDA a  $\lambda = 294$  nm ( $3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), se calculó la concentración del compuesto en la solución. La identificación de este conjugado mediante espectrofotometría UV-Vis es una estrategia que podría permitir su rápida detección. Sin embargo, esta herramienta carece de selectividad y limitada sensibilidad al momento de su identificación en biofluidos biológicos, donde la concentración de este conjugado se encuentra en el orden nM; por lo que esta herramienta se emplea en este trabajo únicamente como método de caracterización rápida, siempre y cuando el compuesto se encuentre puro.

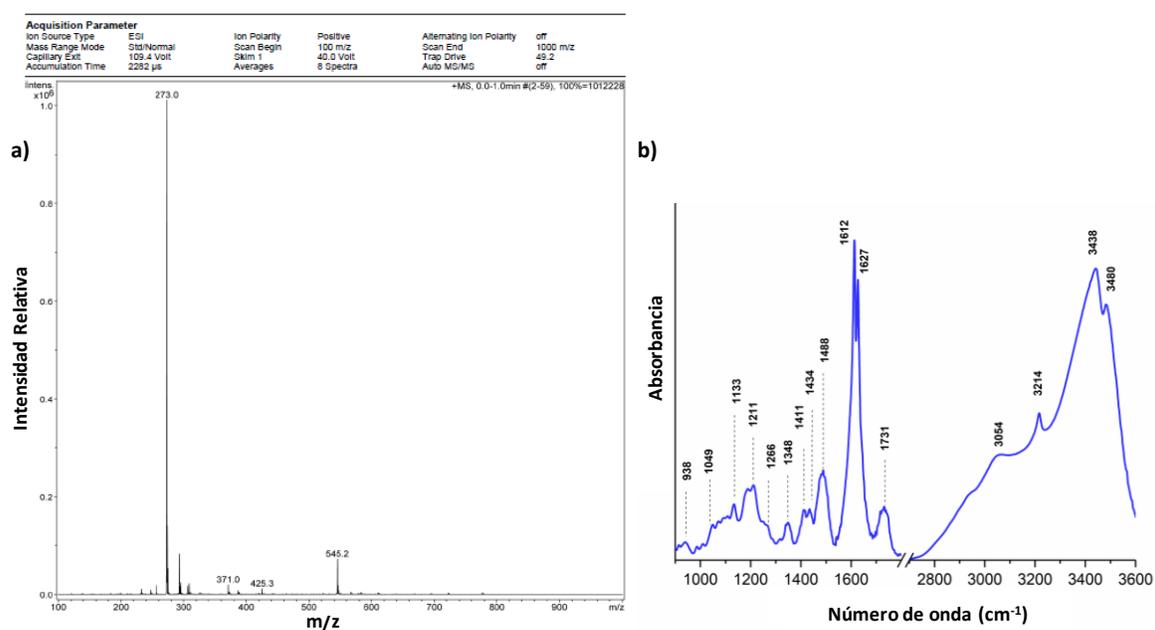


**Figura 8.** Espectros de absorción UV-Vis durante la síntesis y separación del conjugado 5-S-CysDA. a) Eluciones con HCl 0.5 M en la primera columna de intercambio iónico para eliminar la DA no reaccionada y los residuos de DA oxidada; b) Eluciones con HCl, 3M para separar y eliminar isómeros del 5-S-CysDA (2-S-CysDA, 2,5-S-di,CysDA), conforme se incrementa el volumen de HCl aparecen nuevas bandas en diferentes longitudes de onda y ocurre desplazamientos a mayores longitudes de onda de las bandas existentes; c) Eluciones con HCl, 4M permite separar los isómeros de 5-S-CysDA en su totalidad; y d) Elución con HCl, 2M en la segunda columna para obtener únicamente los máximos a 254 y 293 nm, característicos del conjugado 5-S-CysDA.

#### 4.1.2. Análisis y caracterización por espectrometría de masas y espectroscopia infrarroja

Posterior a la síntesis y purificación del conjugado 5-S-CysDA, éste fue también caracterizado mediante espectrometría de masas (MS) y espectroscopias de infrarrojo (IR), con la finalidad de asegurar la identidad estructural del compuesto y ser empleado posteriormente como estándar en los análisis de tipo cualitativo y cuantitativo. En la **Figura 9a** se presenta el espectro de masas del 5-S-CysDA, adquirido mediante ionización por electrospray (ESI) en modo positivo, en el cual se distinguen varios picos correspondientes a las diferentes masas de fragmentación de la molécula posterior a su ionización. El espectro de masas es dominado por un pico intenso a 273 m/z, correspondiente al ion molecular del compuesto. La gran intensidad de este pico en el espectro indica que el producto de síntesis se encuentra puro y la composición química corresponde integralmente al conjugado 5-S-CysDA, tal como se ha reportado en la literatura [146].

El producto puro sintetizado también fue caracterizado mediante espectroscopia IR. Cabe mencionar que este es el primer reporte experimental presentado en la literatura de la caracterización por IR del 5-S-CysDA. En la **Figura 9b** se presentan el espectro IR del producto liofilizado, adquirido mediante ATR. En el espectro se presentan los números de onda de las principales bandas, las cuales fueron asignadas recurriendo a compendios en la literatura. Característicamente las bandas en las posiciones de número de onda en 3480, 3438, 3214 y 3054  $\text{cm}^{-1}$  indican la presencia de los grupos  $\text{NH}_3^+$ , OH, CH y  $\text{CH}_2$ , respectivamente, asignadas a sus modos de estiramientos. La banda en 1731  $\text{cm}^{-1}$ , es característica del modo de estiramiento  $\text{C}=\text{O}$ , indica la presencia del ácido carboxílico de la unidad de la L-Cys. Las dobles bandas a 1627 y 1612  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales resultan ser las más intensas en todo el espectro, son correspondientes al modo de estiramiento  $\text{C}=\text{C}$  del anillo aromático cuando el átomo de azufre se encuentra unido covalentemente en su posición lateral [147]. Las bandas a 1488 y 1348  $\text{cm}^{-1}$ , originadas de los modos de deformación de los grupos OH, confirma la presencia de los grupos catecoles en la estructura de la molécula de DA. Una descripción detallada de las bandas IR y su completa asignación se encuentra en el **Anexo 2** [143]. Esta caracterización ha permitido corroborar de forma complementaria la estructura molecular del conjugado sintetizado; además, el espectro IR del conjugado será empleado como referencia para el estudio de las interacciones de adsorción con los sustratos grafénicos a describir en las secciones posteriores.



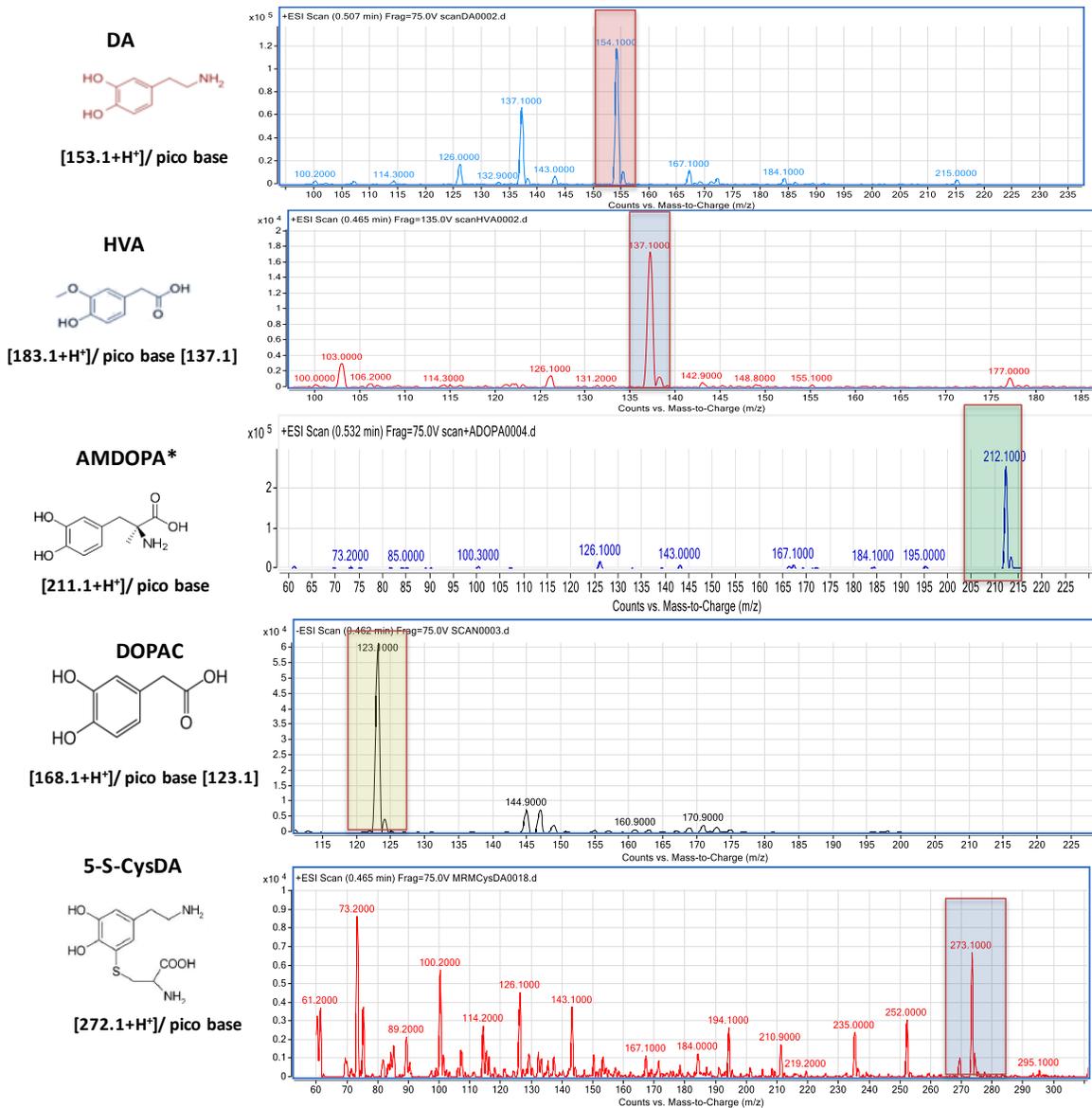
**Figura 9.** Caracterización estructural y espectroscópica del conjugado 5-S-CysDA. a) Análisis por espectrometría de masas del conjugado después de su síntesis, mediante ionización por electro spray (ESI+), distinguiendo el pico más abundante en 273 m/z, correspondiente a su masa molecular. b) Caracterización mediante espectroscopia de infrarrojo del 5-S-CysDA, indicando los números de onda de las principales bandas en el espectro, las cuales corresponden a los principales grupos funcionales en la estructura molecular del conjugado. El análisis detallado de la asignación de las bandas se encuentra en **Anexo 2** [143].

## 4.2. Detección cromatográfica de metabolitos de dopamina mediante el método HPLC-MS

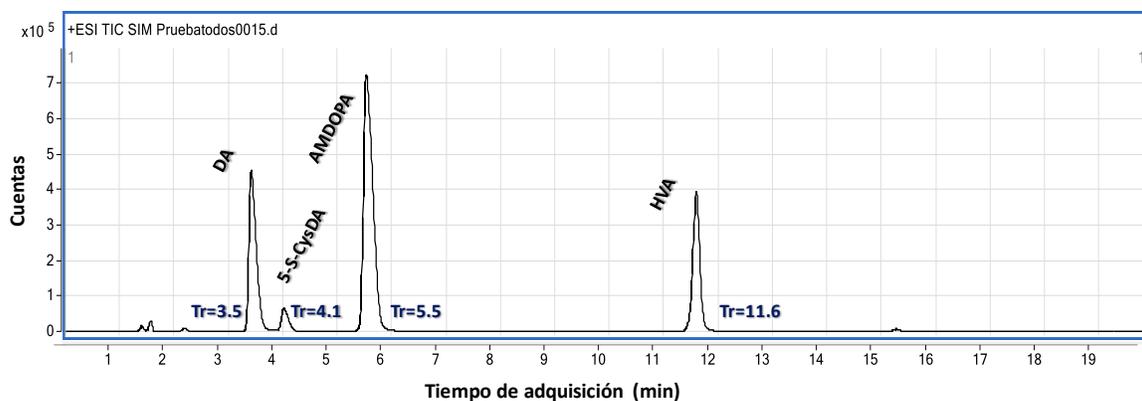
### 4.2.1. Parámetros analíticos del método HPLC-MS para la detección y cuantificación de metabolitos derivados de DA

Trabajos en la literatura han reportado métodos basados en HPLC-MS, combinando novedosas herramientas, tales como el uso de columnas de alta especificidad y cartuchos de extracción selectiva, lo cual ha mejorado la sensibilidad de detección y cuantificación de la DA y sus metabolitos más comunes, tales como la epinefrina o la norepinefrina, en fluidos biológicos de pacientes con diversas patologías [148]. Siguiendo estas estrategias, en este trabajo se desarrolló y optimizó un método analítico de uso continuo mediante HPLC-MS, con la finalidad de identificar y cuantificar los metabolitos derivados de DA en las muestras de cerebro, provenientes del modelo animal con ozono. En la **Figura 10** se muestran los espectros de masas de los metabolitos comerciales DA, HVA, DOPAC y AMODA (estándar interno), así como del conjugado 5-S-CysDA previamente sintetizado. En estos espectros se indica tanto el ion molecular, que corresponde al peso molecular de cada compuesto, como el pico más abundante, el cual se refiere a la masa del producto o fragmento molecular que se mantiene más estable y de mayor abundancia después de la ionización. Este análisis permite identificar por un lado, el pico más abundante que será empleado en la detección y cuantificación en la muestra compleja, y por otro lado, se evita seleccionar picos repetitivos entre los compuestos que pudieran aportar un valor adicional en la cuantificación total de cada metabolito. Se distingue que el pico seleccionado de cada metabolito (los sombreados en el espectro) corresponde a una masa independiente, lo cual permite asegurar una detección selectiva para cada compuesto en los análisis de la muestra compleja.

Posteriormente, la mezcla de esos metabolitos fue separada empleando una columna polar hiperfluorada C18, con la finalidad de identificar la forma del pico y los tiempos de retención, siguiendo el ion principal de cada metabolito. En la **Figura 11** se muestra el cromatograma de la separación en la mezcla de los metabolitos, indicando sus respectivos tiempos de retención. Las condiciones optimizadas de separación en la columna permiten identificar los metabolitos en el siguiente orden de elución: DA, 5-CysDA, AMDOPA y HVA, con los tiempos de retención de 3.5, 4.1, 5.5, y 11.6 min, respectivamente. Además, bajo estas condiciones es perfectamente distinguible cada uno de los picos de cada metabolito, lo cual facilita integrar el ancho de banda y obtener su área para determinar los valores cuantitativos de la concentración de cada metabolito en la mezcla compleja.

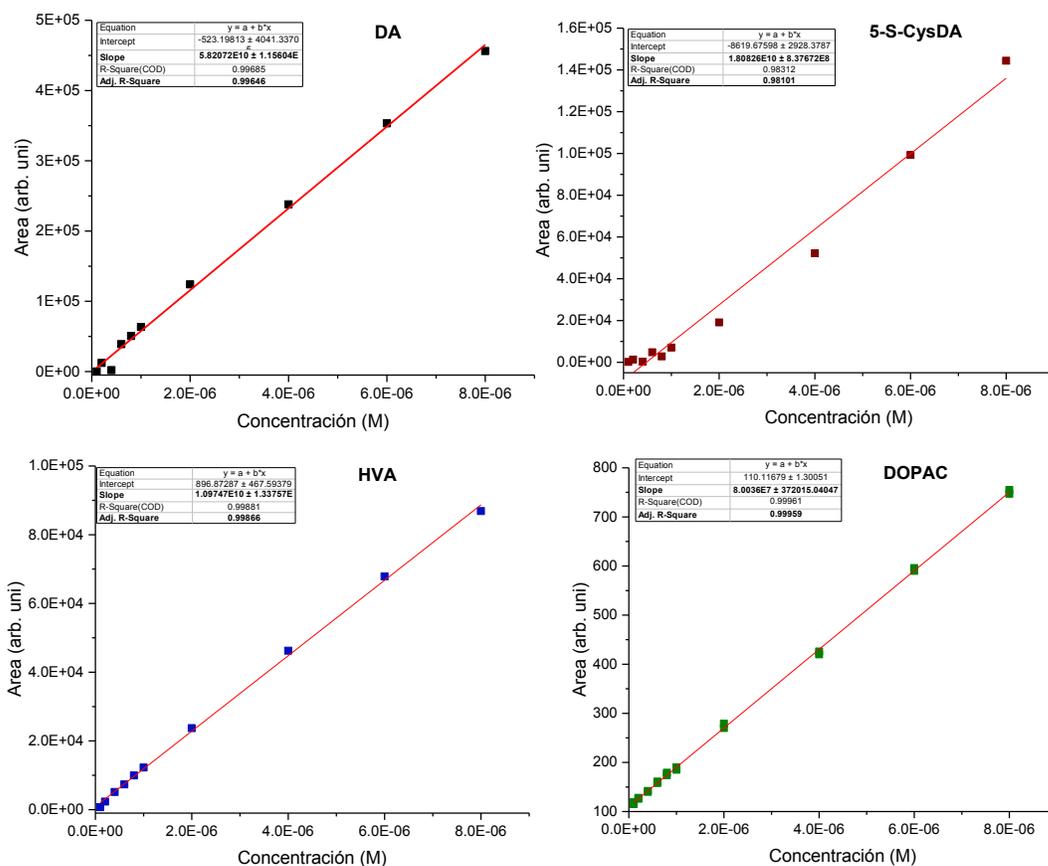


**Figura 10.** Espectros masas de los metabolitos derivados de dopamina. Se indica la estructura molecular, el ion molecular y los picos base, aquellos sombreados en color en cada espectro, que fueron empelados para su identificación en el método HPLC-MS. \*AMDOPA fue empleado como estándar interno en la calibración.



**Figura 11.** Cromatograma de la separación en modo ESI positivo de los metabolitos DA, 5-S-CysDA, HVA, AMDOPA en el método HPLC-MS. Se indican sus tiempos de retención (Tr), los compuestos fueron identificados empleando sus picos base de fragmentación, previamente establecidos en por MS.

Se realizaron varias repeticiones de separación de los metabolitos con el método HPLC-MS previamente establecido, empleando diferentes concentraciones, en un intervalo de  $1 \times 10^{-5}$  M hasta  $1 \times 10^{-8}$  M, con la finalidad de trazar las curvas de calibración para cada uno de ellos y establecer los límites de detección y cuantificación. En la **Figura 12** se muestran las curvas de calibración para los metabolitos DA, 5-S-CysDA y HVA, analizados en el modo ESI positivo, en tanto DOPAC fue analizado en el modo ESI negativo. En la **Tabla 3** se presenta el resumen de los parámetros de linealidad, correlación, intervalo de detección, límite de detección y límite de cuantificación para cada metabolito. Se distingue un coeficiente de correlación lineal mayor a 0.98 para los cuatro metabolitos, lo cual permite detectar el metabolito con alta sensibilidad y en un amplio rango de concentración. Se determinaron los límites de detección para cada metabolito bajo el criterio IUPAC; la señal del blanco más tres veces su desviación estándar. Los límites de detección alcanzados con este método para los cuatro metabolitos se encuentra en el orden de  $1 \times 10^{-7}$  M. Estas curvas de calibración y los parámetros de linealidad de la cuantificación se emplearon para estimar la concentración total de los metabolitos en la matriz del tejido analizado.



**Figura 12.** Curvas de calibración de los metabolitos identificados mediante el método HPLC-MS implementado. Gráfica de la integración del área del pico base respecto a la concentración del metabolito. Los parámetros de regresión lineal y las variables analíticas de los límites de detección y cuantificación son detallados en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Resumen de los parámetros analíticos de detección y cuantificación para cada metabolito mediante el método HPLC-MS

Parámetros/Metabolito	DA	5-S-CysDA	HVA	DOPAC
Coef. de Correlación (R <sup>2</sup> )	0.996	0.981	0.998	0.999
Pendiente	5.82E10	1.808E10	1.097E10	8.0E7
Intervalo lineal	1x10 <sup>-7</sup> a 8x10 <sup>-6</sup> M	6x10 <sup>-7</sup> a 8x10 <sup>-6</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> a 8x10 <sup>-6</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> a 8x10 <sup>-6</sup> M
Límite de detección	1x10 <sup>-7</sup> M	6x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M	1x10 <sup>-7</sup> M
Límite de cuantificación	2x10 <sup>-7</sup> M	8x10 <sup>-7</sup> M	2x10 <sup>-7</sup> M	4x10 <sup>-7</sup> M

Por otro lado, con la finalidad de verificar la detección de los metabolitos y la eficiencia del método, se realizaron pruebas analíticas de la determinación del porcentaje de recuperación y recobro. Dichas pruebas se realizaron empleando el homogenado de cerebelo de una de las ratas del modelo de ozono, en el cual la muestra se fortificó con la mezcla de los metabolitos a una concentración conocida. Se siguieron los métodos analíticos de separación en cartucho de extracción en fase sólida, inyección, separación y análisis bajo las condiciones antes descritas en la sección de métodos. Las gráficas y resultados obtenidos se presentan en las Figuras 1-2 del **Anexo 4**. Los recobros obtenidos de cada metabolito se encuentran en un rango de 60-80%, que de acuerdo a los criterios de la CCAYAC,2017, previamente descritos, por lo que se consideran aceptables, estos parámetros permite garantizar la robustez del método y cuantificación sensible aún en muestras complejas.

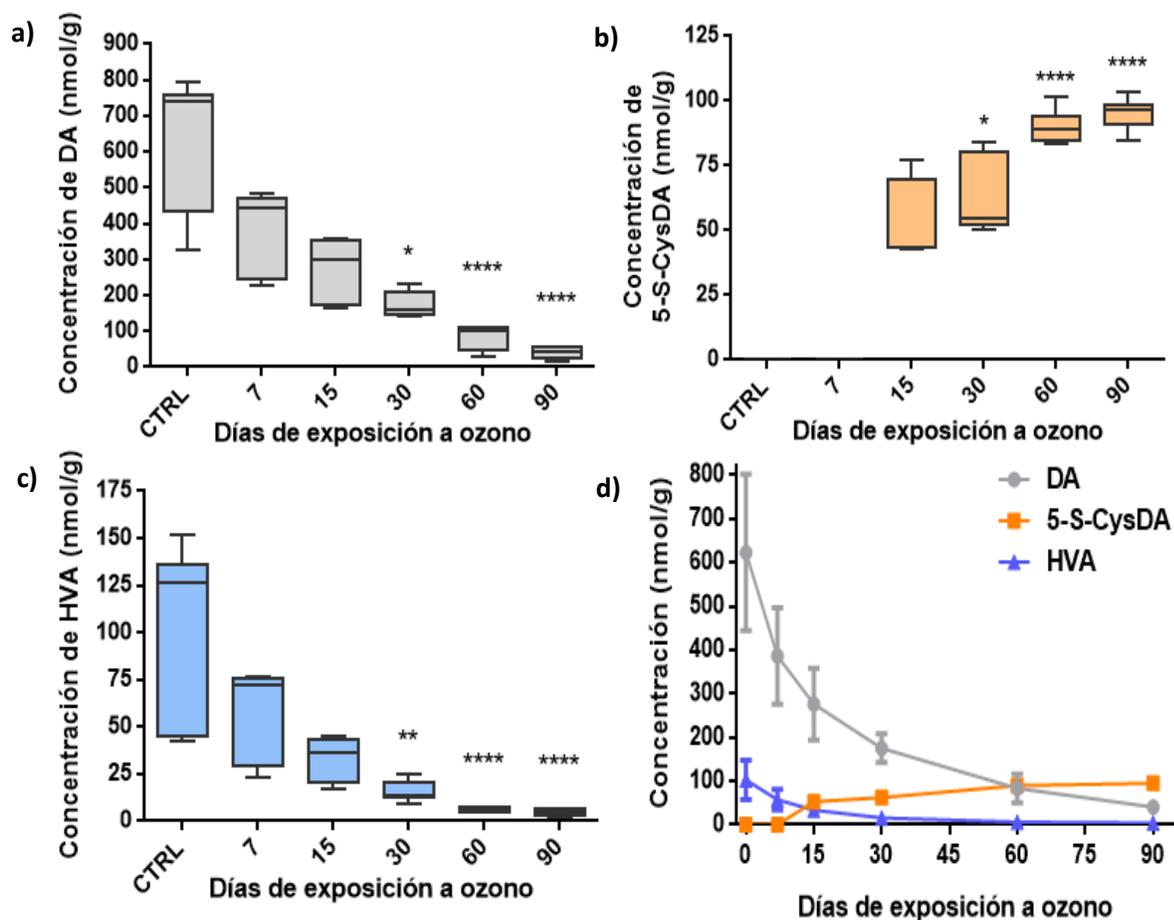
### **4.3. Cuantificación de los metabolitos mediante HPLC-MS en homogenados de cerebro del modelo animal de ozono**

#### **4.3.1. Cuantificación de metabolitos en SN**

El método analítico de HPLC-MS fue implementado para la identificación y cuantificación de los compuestos DA, HVA, DOPAC y 5-S-CysDA en el estriado y la SN de las ratas del modelo de ozono. Se colectaron los tejidos de la SN y el estriado de tres ratas de cada grupo; cada ensayo se realizó en mediciones por triplicado.

En la **Figura 13 a-c** se presentan gráficamente las concentraciones de los metabolitos de DA, HVA y 5-S-CysDA en la SN en los diferentes tiempos de exposición a ozono. Cabe mencionar que con este método no fue posible cuantificar el metabolito DOPAC, ya que se encontraba por debajo del límite de detección ( $<1 \times 10^{-7}$  M). El resumen de los parámetros estadísticos del análisis se presenta de forma resumida en las Tablas 1-2 en el **Anexo 5**. En la **Figura 13a** se observa que la concentración de DA en la SN presenta una tendencia constante de disminuir conforme se incrementa el tiempo de exposición a ozono. La concentración de DA disminuye rápidamente durante los primeros 7 y 15 días del tratamiento, a pesar que su valor estadístico no es significativo, lo cual se debe al reducido número de animales empleados en el ensayo. Sin embargo, al emplear un mayor número de ratas mejoraría la correlaciones estadísticas. Se distingue que a los 30 días, la concentración de DA es significativamente reducida ( $p < 0.01$ ) en más del 50%, respecto a la concentración del grupo control y al final del tratamiento la DA disminuyó significativamente en un 90% respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ). El conjugado 5-S-CysDA (**Figura 13b**) se encuentra por debajo del límite de detección en el grupo control y a los 7 días del tratamiento, imposibilitando su detección. Sin embargo, su concentración en la SN incrementa considerablemente a partir de los 15 días; dicha concentración es mayor conforme se incrementa la exposición, en la cual su valor se duplica a los 60 días, manteniéndose constante hasta el final de la exposición. Por otro lado, el metabolito HVA (**Figura 13c**) disminuyó progresivamente desde el inicio del tratamiento, resultando ser estadísticamente significativo en los 30 días del tratamiento; nuevamente los valores a los 7 y 15 días no logran ser significativos debido al reducido número de

ratas empleadas en el análisis. Interesantemente, después de 60 días de exposición la concentración de HVA se redujo significativamente en un 90% ( $p < 0.001$ ), respecto a la concentración del grupo control, dicho valor se mantuvo constante hasta el final del tratamiento. En la **Figura 12d** se resumen gráficamente las tendencias de la concentración de los tres metabolitos cuantificados en la SN de las ratas del modelo, en función del tiempo de exposición de ozono.



**Figura 13.** Cuantificación mediante HPLC-MS de los metabolitos en sustancia nigra (SN) en el modelo animal, respecto al tiempo de exposición de ozono: a) Dopamina (DA); b) conjugado 5-S-Cisteinil-dopamina (5-S-CysDA); c) ácido homovanílico (HVA); y d) descripción comparativa de la evolución de la concentración de los metabolitos DA, 5-S-CysDA y HVA, en la SN durante el transcurso del tiempo de exposición de las ratas a ozono. Número de ratas  $n=3$ , análisis de muestras por triplicado. Parámetros estadísticos: \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) y \*\*\*\* ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.2. Cuantificación de metabolitos en el estriado

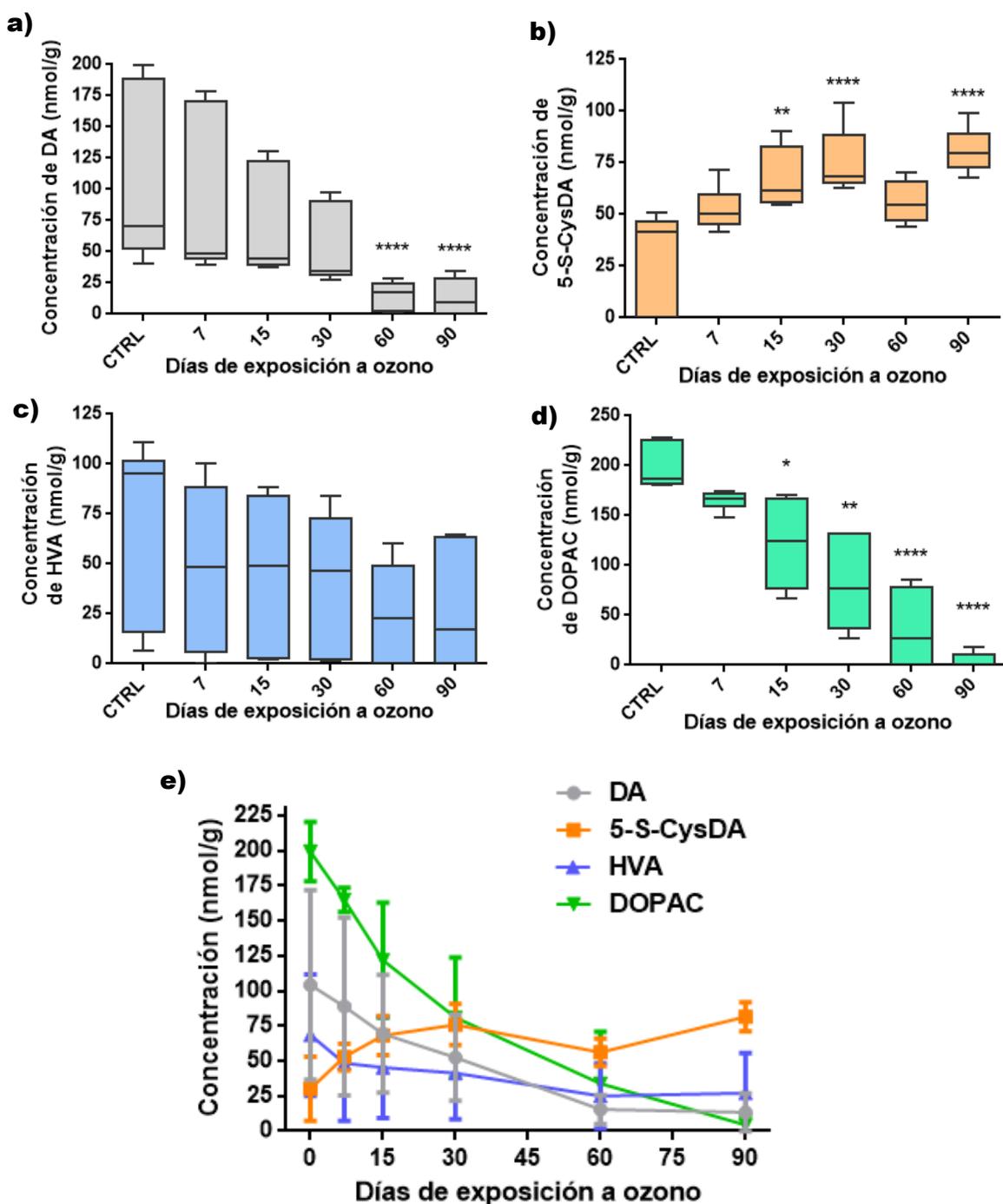
El método de HPLC-MS también fue empleado para detectar y cuantificar los metabolitos derivados de la DA en la región del estriado de las ratas en el modelo de ozono. Se lograron cuantificar los cuatro metabolitos de interés: DA, HVA, DOPAC y 5-S-CysDA. En la **Figura 14** se muestran las representaciones gráficas individuales de las concentraciones de cada metabolito, en los diferentes tiempos de exposición a ozono.

Los niveles de DA presentan una tendencia a disminuir durante los primeros 30 días de exposición, sin ser significativamente estadísticos, debido a la alta dispersión de los datos entre cada ensayo. Sin embargo, los valores disminuyen drásticamente y de forma significativa a los 60 y 90 días después del tratamiento ( $p < 0.001$ ) (**Figura 14a**). La concentración del conjugado 5-S-CysDA en el estriado incrementó de forma constante desde el primer momento de la exposición a ozono, siendo significativo a los 15 días. Sin embargo, a los 60 días del tratamiento la concentración del conjugado disminuye ligeramente, sin ser estadísticamente significativo, pero dicha concentración incrementa nuevamente y de forma significativa al final de la exposición ( $p < 0.001$ ) (**Figura 14b**).

Los niveles de HVA en el estriado presentan una tendencia a disminuir conforme se incrementa el tiempo de exposición. Sin embargo, dichos valores no son significativamente estadísticos entre cada grupo de tratamiento respecto al grupo control (**Figura 14c**). Finalmente, la concentración del metabolito DOPAC disminuyó a lo largo de la exposición a ozono, siendo estadísticamente significativo a los 15 días del tratamiento ( $p < 0.05$ ). Interesantemente, la concentración de DOPAC a los 90 días de exposición es drásticamente disminuido en más del 80%, respecto a la concentración de los grupos controles (**Figura 14d**). En la **Figura 14e** se presenta un resumen gráfico de la tendencia de la concentración de los metabolitos en el estriado de las ratas, en función del tiempo de exposición a ozono.

La cuantificación de los metabolitos DA, HVA, DOPAC y el conjugado 5-S-CysDA tanto en el estriado como en la SN de ratas expuestas a bajas dosis de ozono, permite evaluar indirectamente el metabolismo de las neuronas dopaminérgicas en estas dos regiones. De forma general, los productos DA, HVA y DOPAC disminuyen su concentración conforme se incrementa el tiempo de exposición a ozono. Es de esperar que los niveles de estos metabolitos se encuentren en diferentes concentraciones en la SN y en el estriado, dada la diversidad de células presentes en cada región y debido a las variaciones en sus funciones metabólicas [ 27, 149]. La DA se sintetiza en la SN, donde existe mayor abundancia de neuronas dopaminérgicas, por lo que se espera una mayor concentración de DA respecto al estriado, que es donde la DA es liberada. Estas tendencias se ven corroboradas con los resultados cuantitativos obtenidos en este análisis. La disminución de la concentración de DA en estas dos zonas, durante el transcurso de la exposición a ozono, podría ser explicada debido a que: i) se agote la disponibilidad de DA en la célula de forma progresiva en el tiempo; ii) ocurre la transformación de DA en otros productos derivados; iii) la formación de DA es disminuida por la alteración de alguna de las enzimas o cofactores fundamentales para su síntesis, o que; vi) existe pérdida neuronal dopaminérgica en la rata durante el transcurso de la exposición a ozono. Las hipótesis anteriores podrían ser evaluadas en trabajos posteriores, de

forma complementaria al emplear el mismo modelo animal, con la finalidad de correlacionar el daño celular en la SN por efecto de la inducción de la exposición a ozono.



**Figura 14.** Cuantificación mediante HPLC-MS de los metabolitos en el estriado en el modelo animal, respecto al tiempo de exposición a ozono: a) Dopamina (DA); b) conjugado 5-S-Cisteinil-dopamina (5-S-CysDA); c) ácido homovanílico (HVA); d) Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC); y e) descripción comparativa de la evolución de la concentración de los metabolitos DA, 5-S-CysDA, HVA y DOPAC en el estriado, a lo largo del tiempo de exposición de ratas a ozono. Número de ratas n=3, análisis de muestras por triplicado. Parámetros estadísticos: \* (p<0.05), \*\* (p<0.01) y \*\*\*\* (p<0.001).

Por otro lado, los metabolitos HVA y DOPAC, disminuyeron su concentración tanto en la SN como en el estriado a lo largo de la exposición a ozono. Inicialmente, los niveles de HVA en el grupo control son mayores en el estriado que en la SN, lo cual es de esperarse dado que el HVA es sintetizado por los atrociitos que se encuentren cercanos a las conexiones de la terminal sináptica, lo cual estará ocurriendo con mayor actividad en el estriado [150]. La disminución de este metabolito corrobora el hecho que el metabolismo de los astrociitos se ve reducido ante la menor disponibilidad de DA en la SN. Varios trabajos en la literatura han reportado la disminución de los niveles de HVA, asociados al agotamiento de DA, en modelos animales de neurodegeneración e incluso en pacientes con EP [151, 152]. Sin embargo, algunos de estos estudios han llegado a resultados contradictorios, limitando el que se pueda definir la tendencia general de dicho metabolito ante un evento de neurodegeneración en la SN. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían aportar una referencia adicional para corroborar la tendencia de disminución de este metabolito, empleando un modelo animal de neurodegeneración progresiva. Por otro lado, en los resultados previamente obtenidos, el producto DOPAC fue únicamente cuantificable en el estriado, el cual puede provenir tanto de la degradación enzimática de DA en la neurona dopaminérgica, así como del metabolismo de las los astrociitos [27]. Además, se ha reportado que la mayoría del DOPAC se produce cuando la DA es recapturada en la terminal sináptica del axón, lo cual estaría ocurriendo favorablemente en el estriado [153]. La disminución en la concentración de DOPAC, de forma semejante a la concentración de HVA, refleja una consecuencia directa de la disminución de la disponibilidad de DA tanto en la SN como en el estriado. Es interesante notar que las concentraciones de DA, HVA y DOPAC disminuyen conjuntamente de forma considerable a los 60 días de la exposición a ozono, lo cual indica que el tratamiento con ozono genera una alteración severa sobre el metabolismo de la neurona dopaminérgica, afectando tanto su síntesis como su metabolismo.

El conjugado 5-S-CysDA presenta un incremento de su concentración tanto en la SN como en el estriado, conforme se incrementa el tiempo de exposición a ozono; siendo la SN la que presenta una mayor concentración de este producto a mayor tiempo de exposición. Estos valores sugieren que el metabolismo de la DA en la SN tiende a dirigirse mayoritariamente hacia su ruta de degradación oxidativa, lo cual ocurre en un tiempo intermedio-avanzado de la exposición a ozono. El hecho anterior también se ve reflejado por la disminución considerable de los metabolitos HVA y DOPAC, a tiempos más largos de exposición a ozono. La formación del conjugado 5-S-CysDA y su incremento en el cerebro de las ratas, sugiere que el ozono podría estar facilitando la ruta oxidativa de la DA. Esta divergencia podría ser intensificada debido a la formación constante de ERO y radicales libres, los cuales se formen después de una exposición prolongada al ozono [154]. En estas condiciones la formación constante de ERO también podría estar favoreciendo la oxidación de la DA, llevando a la formación intracelular de quinonas de dopamina, las cuales podrían estar reaccionando rápidamente con el glutatión o la L-Cys que se encuentren disponibles tanto en la SN como en el estriado, formando el conjugado 5-S-CysDA. Lo anterior podría explicar el incremento observado de dicho conjugado en la SN, a tiempos más largos de exposición a ozono [155].

Este trabajo integra experimental y analíticamente el estudio del metabolismo de la DA en la SN y en el estriado, mediante la evaluación de los siguientes parámetros cuantitativos: 1) determinación total de DA, como forma indirecta para evaluar el comportamiento de los niveles de DA procedentes de la neurona dopaminérgica; 2) cuantificación de los niveles de HVA y DOPAC para evaluar el metabolismo enzimático tanto de la neurona dopaminérgica como de las células gliales; y 3) cuantificación de los niveles del conjugado 5-S-CysDA para evaluar la ruta de degradación oxidativa de la neurona dopaminérgica. Los resultados anteriores también han permitido determinar los intervalos de tiempo en el que los niveles de DA han sido completamente atenuados y llevan a la formación del conjugado 5-S-CysDA en la rata, lo cual se podría establecer que ocurre durante los 30 y 60 días de exposición a ozono. La evidencia anterior sugiere que el cuantificar los niveles totales de este conjugado permitiría estudiar el metabolismo oxidativo en la SN. Además, los resultados aquí obtenidos también refuerzan la propuesta de emplear el 5-S-CysDA como un biomarcador, de aparición temprana, de un evento de neurodegeneración en la EP. Sin embargo, trabajos adicionales son requeridos, en los cuales se empleen otros modelos animales de EP, tales como el modelo de MPTP o 6-OHDA, así como extender su cuantificación en fluidos biológicos, como en LCR o suero, permitirán definir al 5-S-CysDA como potencial biomarcador para diagnosticar la EP.

Este trabajo es el primer reporte en la literatura que muestra de forma cuantitativa el agotamiento de la DA y las alteraciones en su metabolismo, empleando un modelo animal de larga exposición al ozono [64]. Estos resultados también permitirían ayudar a explicar el daño morfológico celular en la SN y la disminución del número de neuronas dopaminérgicas, que han sido reportados en trabajos previos empleando el modelo animal de exposición a ozono [74].

Por otro lado, los resultados aquí obtenidos también ayudan a reforzar los trabajos reportados en la literatura, en los cuales se ha descrito que la formación y acumulación del conjugado 5-S-CysDA podría ser un factor de inducción de muerte en las neuronas dopaminérgicas [29, 155]. El incremento desmedido del 5-S-CysDA así como de otros metabolitos oxidados de DA en la SN, conduciría a incrementar la formación de especies reactivas de oxígeno endógenas; alterar la cadena transportadora de electrones en la mitocondria; afectar la función de proteínas y sistemas enzimáticos, debido a la formación de aductos proteicos con las quinonas de DA; facilitar la agregación y acumulación tóxica de la proteína  $\alpha$ -syn; e inducir la señalización apoptótica celular [156], lo cual en conjunto llevaría a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SN. Los eventos anteriores han sido ampliamente señalados como mecanismos claves en la fisiopatología de la EP [15]. Además, la disminución tanto del número de neuronas de la SN como por la concentración de DA, conduciría a afectar progresivamente las funciones motora y cognitiva relacionadas al sistema dopaminérgico en los ganglios basales [22]. Estos eventos celulares podrían estar ocurriendo en una etapa intermedia de la patología, antes de que inicien los síntomas motora en el paciente [157]. Por lo que, un estudio más detallado en un modelo animal, sobre la aparición de los mecanismos moleculares en la SN permitiría entender su progresión en la EP.

#### 4.4. Detección de metabolitos de DA en sistemas nanoestructurados con respuesta amplificada

##### 4.4.1. Detección de metabolitos asistida mediante espectroscopia SERS.

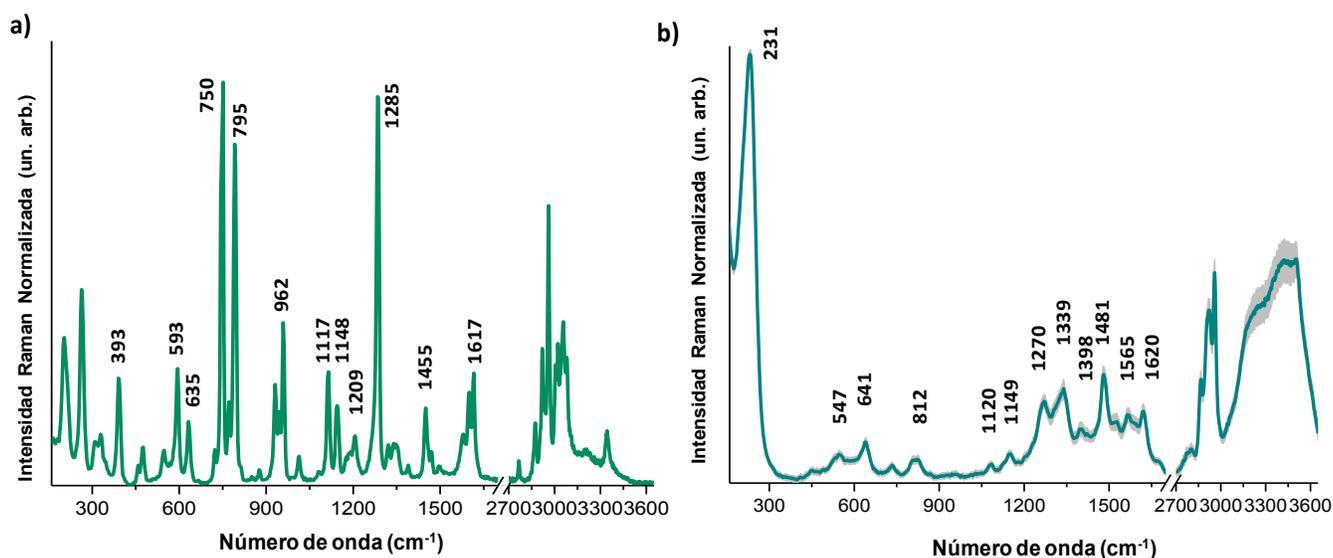
###### 4.4.1.1. Detección de DA mediante SERS

Uno de los objetivos de este trabajo fue introducir una estrategia analítica alternativa, a los métodos cromatográfico, para la detección de los metabolitos derivados de DA previamente analizados. Con esta finalidad se empleó el método de espectroscopia SERS para el análisis y la identificación de los metabolitos en un medio acuoso.

Previo a la obtención de los espectros SERS, se obtuvieron los espectros normales Raman (NR) en un sólido cristalino puro, adquirido comercialmente, de cada metabolito y se realizó la asignación de sus bandas características, con la finalidad de ser empleados como espectros de referencia. Posteriormente, se adquirieron los espectro SERS en medio acuoso de cada metabolito. Cabe resaltar que bajo estas condiciones experimentales no se obtuvieron los espectro SERS de DOPAC ni de HVA. Reportes en la literatura han argumentado la imposibilidad de obtener los espectros SERS de dichos metabolitos empleando nanopartículas de plata, en los cuales se atribuye a limitada interacción de los grupos catecoles y el grupo amino en ambas estructuras químicas sobre la superficie de la nanopartícula de plata [158]. Sin embargo, trabajos posteriores en los cuales se realicen modificaciones superficiales en las nanopartículas metálicas, podrían favorecer la selectividad de detección de dichas moléculas.

El espectro normal Raman del sólido cristalino de DA se presenta en la **Figura 15a**. En el espectro se indican los números de onda de las bandas más intensas que corresponden a los diferentes modos vibracionales de los grupos funcionales en la molécula de DA. Algunas de las bandas más características de la molécula se encuentran en las posiciones: 1617, 1455, 1285, 962, 795 y 750  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los modos vibracionales de la deformación del anillo aromático, deformaciones en el plano de los grupos C-O-H, deformaciones de los grupos  $\text{NH}_2$ , modo de respiración del anillo aromático y deformaciones del enlace CH fuera del plano del anillo aromático. Un análisis detallado de la asignación de estas bandas tanto del espectro normal Raman la DA se encuentra en la **Tabla 5**. La asignación de bandas anteriores permite verificar la identidad estructural de la molécula de DA en el sólido cristalino; la asignación de estas bandas es consistente con los reportes presentados en la literatura, analizando el espectro normal Raman de la DA [159, 160]. Por otro lado, en la **Figura 15b** se presenta el espectro SERS de la DA, adquirido con una dispersión de Ag NPs en agua ultrapura, a una concentración de DA de  $1 \times 10^{-5}$  M. Cabe mencionar que fue imposible obtener un espectro NR de la DA en agua, sin Ag NPs, a esta concentración y bajo estas condiciones experimentales. Comparativamente los espectros NR y SERS de la DA presentan diferencias significativas en bandas, tanto en la forma como en la posición del número de onda. Una característica notable en el espectro SERS es la presencia de la banda ancha e intensa a 231  $\text{cm}^{-1}$ , la cual es característica del estiramiento del enlace Ag-Cl, indicando la adsorción de los iones  $\text{Cl}^-$  en la superficie de la nanopartícula, indicativa de la agregación de las Ag NPs en el medio acuoso con las moléculas de DA. Las variaciones en los espectros NR y SERS de la DA son atribuidas a múltiples factores, tanto experimentales como

intrínsecos moleculares, por ejemplo, puede ser explicada debido a la presencia de moléculas de agua y al valor de pH en el medio, dado que estas condiciones determinan la protonación de la molécula de DA, la cual puede estar presente en las formas aniónica, catiónica o zwitteriónica [160]. Además, las formas y los tamaños de las nanopartículas, así como las condiciones de agregación de las mismas también influyen en la forma e intensidad de las bandas. Por otro lado, las posiciones e intensidades de las bandas en el espectro SERS, también son determinadas por el tipo de interacciones molécula-sustrato, lo cual conduce a inducir una cierta orientación preferencial de la molécula sobre la nanopartícula metálica [161]. Los factores anteriores han sido estudiados en varios trabajos reportados en la literatura; argumentando que la forma y bandas características en el espectro SERS de DA se debe a una combinación de las formas aniónica, catiónica y zwitteriónica de la forma de la molécula de DA en el medio acuoso y en pH 7, así como a la interacción favorable de los grupos catecoles en la molécula con la superficie de las Ag NPs, lo cual conduce a intensificar la vibración de los enlaces C-OH, notándose en el espectro como un ensanchamiento e incremento de intensidad de la banda posicionada en  $1481\text{ cm}^{-1}$  [162]. La semejanza de los espectros SERS previamente reportados en la literatura con los aquí reportados, permite verificar por un lado la reproducibilidad de los experimentos, lo cual es un factor crítico y de relevancia en experimentos SERS [163]. Además, estos resultados han permitido identificar las bandas más prominentes en el espectro SERS de la DA y serán empleadas para en las determinaciones analíticas en los siguientes ensayos. En **Tabla 5** se muestra la asignación detallada de las principales bandas en el espectro SERS, comparativamente con el espectro normal Raman de la DA.



**Figura 15.** Espectros normal Raman y SERS de dopamina (DA): a) Espectro de referencia de DA adquirido a partir del sólido cristalino; b) Espectro SERS de DA [ $1 \times 10^{-5}$  M], colectado en medio acuoso conteniendo una dispersión de AgNPs; la desviación estándar de los SERS colectados se resalta en gris en el contorno del espectro. La asignación detallada de las bandas de ambos espectros se presenta en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Asignación de las bandas de los espectros normal Raman y SERS de DA

NR DA	SERS DA	Asignación de bandas
número de onda (cm <sup>-1</sup> )		
1617	1620	def. del anillo, del. de OH
	1565	Str. de C-C del anillo, def. OH del catechol
	1481	def. del anillo, def. de C-O-H en-plano, def. NH <sub>2</sub>
1455		str. de C-C de anillo Arom, def. de C-O-H, str. asym de COO-
	1398	Wag. de CH <sub>2</sub> , twist. NH
	1339	def. de Anillo, scis. de OH, twist. de CH
1285	1270	Respiración de anillo., def. de CH en-plano, bend. de CCH
1209		str. de C-O
1148	1149	rock. de OH, def. rock. de CH arom., Respiración del anillo
1117	1120	twist. de CH, twist. de NH, str. de CN
962		twist. de NH, wag. de CH, Def. del anillo
931		twist. de NH
795	812	CH def. fuera-del-plano del anillo
750	733	CH def. fuera-del-plano del anillo
	733	wag. de CH, def. anillo arom.
635	641	wag. de CH, vibr. de C-C de cadena alifática
593		def. de CH en-plano del anillo arom.
	547	def. del anillo en-el plano
393		Def. fuera-del-plano del anillo arom.
	231	str. de Ag-Cl

Abreviaciones: NR, espectro normal Raman; str. estiramiento; def, deformación; asym. asimétrico; wag. meneo; twist. torsión; rock. balanceo; arom. aromático.

#### 4.4.1.2. Detección de la DA mediante SERS en fluidos biológicos simulados

La detección de metabolitos mediante SERS en fluidos biológicos de pacientes es altamente deseable en ensayos clínicos, con miras a un diagnóstico rápido y certero de patologías. En este sentido, varios grupos de investigación se han enfocado en extender la espectroscopia SERS como una herramienta alternativa en el diagnóstico clínico. Sin embargo, aún se requieren múltiples trabajos en este campo. En este trabajo, se buscó también demostrar la viabilidad de detección de la DA y el conjugado 5-S-CysDA en medios complejos, para ello se emplearon fluidos biológicos simulados: orina sintética y líquido cefalorraquídeo sintético (LCR).

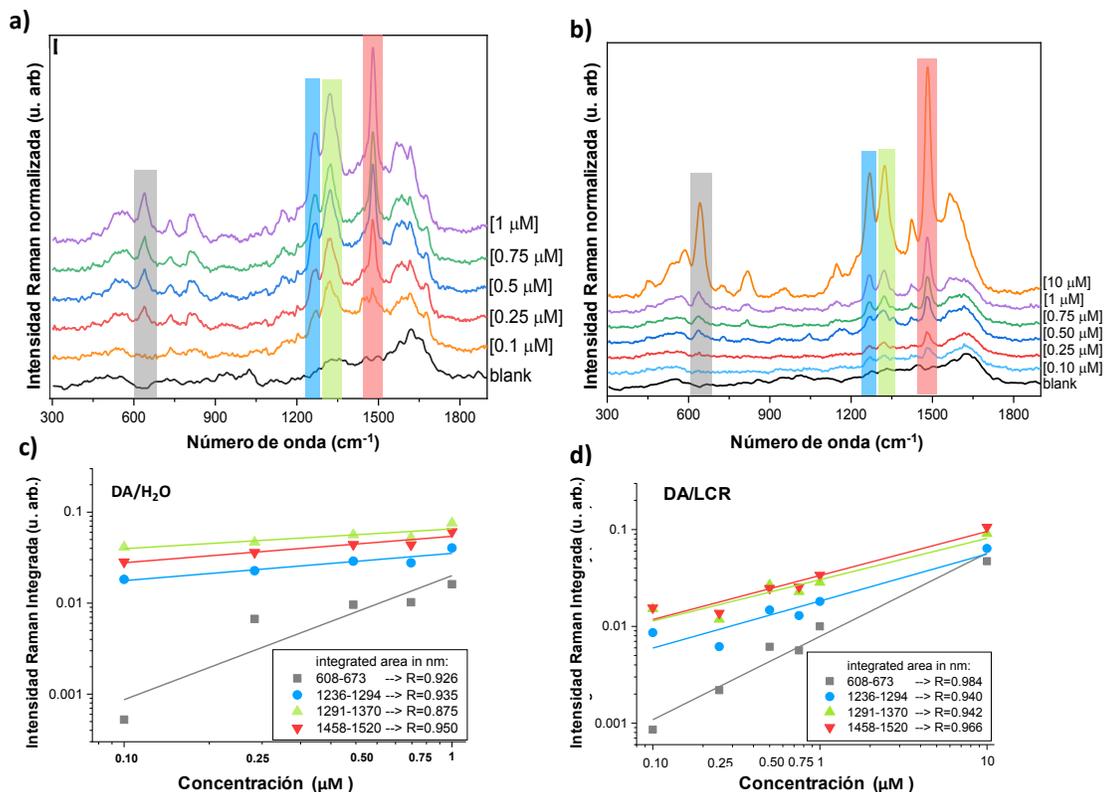
En las condiciones experimentales antes descritas la DA, además de ser detectada en agua ultrapura en presencia de una dispersión de AgNPs, también fue posible identificarla en el LCR pero no en orina sintética. La imposibilidad de detectar la DA mediante SERS en la orina sintética se atribuyó a la presencia de las moléculas de urea, ácido úrico y creatinina, las cuales se encuentran en altas concentraciones en el medio y compiten con las moléculas de DA por la

adsorción sobre la superficie de las Ag NPs; particularmente en este espectro la urea presentó una banda intensa en  $1002\text{ cm}^{-1}$ , tal como se describe en la sección posterior.

Los espectros SERS de DA en agua ultrapura con AgNPs dispersas y en LCR se presentan comparativamente en la **Figura 16 a, b**, mostrando la variación del perfil de bandas conforme se disminuye la concentración de DA de 1 a  $0.10\ \mu\text{M}$ . Se distingue que los espectros SERS de DA en agua y en LCR presentan bandas semejantes en las posiciones de sus número de onda. Sin embargo, es notable que DA al estar en un medio más complejo, como el LCR, algunas de sus bandas tienden a disminuir en intensidad o cambiar ligeramente en su posición de número de onda; por ejemplo las bandas comprendidas en la región  $1550\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$  y la banda en alrededor de  $730\text{ cm}^{-1}$ . Las diferencias anteriores podrían ser explicadas debido a la composición del medio en el LCR, en el cual la presencia de diferentes los tipos de sales pueden afectar las interacciones entre las Ag NPs y la DA, ya sea debilitando dichas interacciones superficiales o cambiando la orientación de la molécula de DA sobre la superficie de las Ag NPs [164]. En estas condiciones es más probable que la orientación de la molécula de DA sea alterada por efecto de la agregación de las Ag NPs, las cuales se agregan en arreglos limitadamente uniformes, dependiendo tanto de la concentración como del tipo y carga de los iones presentes en el medio. Sin embargo, pese a estas variaciones se distinguen cuatro bandas, las sombreadas en cada espectro y que pueden considerarse características, las cuales se mantienen sin cambio en sus posiciones de número de onda, lo cual permite identificar la presencia del analito cuando se varía su concentración en el medio. Por lo tanto, estas bandas pueden ser empleadas como indicadores de la presencia de DA y a su vez, ser empleadas para obtener relaciones analíticas de cuantificación del metabolito en el medio.

Las bandas más características de la DA en agua y en LCR, distinguibles por la disminución su intensidad en función de la concentración, se ubican en los intervalos de  $1458\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ ,  $1291\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ ,  $1250\text{-}1285\text{ cm}^{-1}$  y  $608\text{-}673\text{ cm}^{-1}$ , los cuales han sido sombreados en ambas figuras. En estas condiciones experimentales la DA puede ser identificada, mediante su perfil espectral SERS tanto en agua como en LCR con una concentración por debajo de  $0.10\ \mu\text{M}$ . Por otro lado, con la finalidad de establecer un método analítico para la detección cuantitativa de DA, se integró el área de cada una de las bandas seleccionadas en el espectro, que se obtuvieron de cada una de las diferentes concentraciones de DA. Se obtuvieron los valores estadísticos de linealidad en cada medio para determinar los valores de correlación en la recta del área integrada de cada banda en función de la concentración de DA. Las correlaciones del área integrada de las bandas respecto a la concentración y los valores de coeficiente de correlación linealidad (R) se muestran en las **Figuras 16 c,d**. Los resultados anteriores indican que la banda del intervalo  $1458\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$  es aquella que presenta el valor R de mayor linealidad en ambos medios. Sin embargo, la banda comprendida en el intervalo  $609\text{-}673\text{ cm}^{-1}$  en ambos medios es aquella que presenta la mayor sensibilidad, al tener un mayor valor de la pendiente (1.13 en agua y 0.86 en LCR), indicando que integra mejor el ancho de la banda, por intensidad, cuando la concentración de DA en el medio es menor. Por lo tanto, como una propuesta analítica, esta banda podría ser empleada para detectar la DA de forma cuantitativa en una muestra real, por ejemplo en LCR. Sin embargo, en estas condiciones experimentales el LOD ( $0.10\ \mu\text{M}$ ) se encuentra por arriba de la concentración de DA en LCR o

plasma, la cual se encuentra en el orden nM [9]. Trabajos posteriores que se enfoquen en diseñar arreglos de nanopartículas con respuesta específica para DA podrían mejorar considerablemente su sensibilidad de detección en muestras complejas.



**Figura 16.** Espectros SERS de dopamina (DA) adquiridos en agua ultrapura (a) y solución sintética de líquido cefalorraquídeo (LCR) (b). Los espectros se colectaron a diferentes concentraciones de DA desde 1 μM hasta 0.1 μM. Se señalan también las regiones en el espectro que contienen las bandas que permiten identificar la presencia de DA en todo el rango de concentraciones evaluadas. Estas bandas fueron empleadas para obtener los valores de correlación, al integrar el área de cada una de ellas respecto a la concentración de DA en agua (c) o en LCR (d). En cada gráfica se muestran también los valores del coeficiente de correlación lineal de cada intervalo espectral analizado.

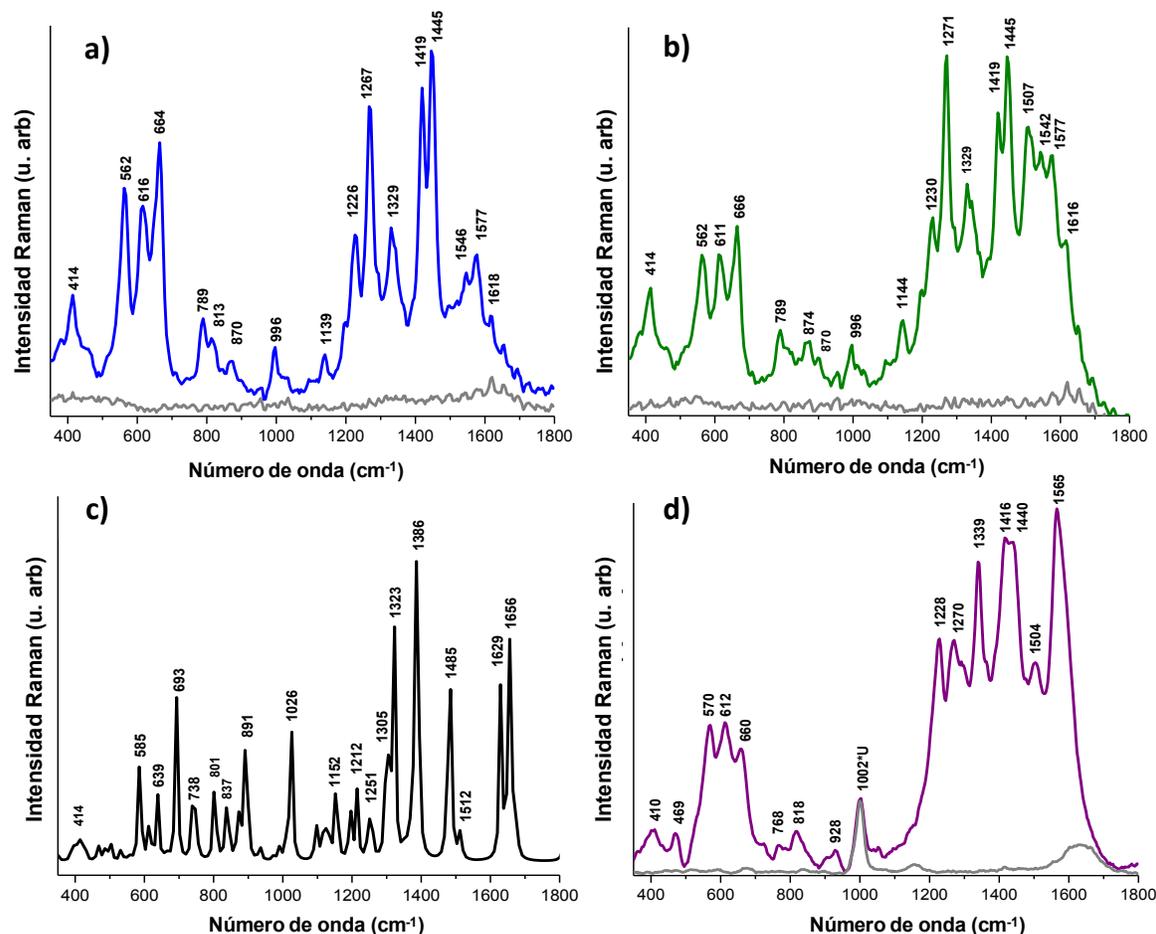
#### 4.4.2. Detección de 5-S-CysDA mediante SERS

La metodología experimental SERS antes descrita también fue aplicada para obtener el espectro SERS del conjugado 5-S-CysDA en un medio de dispersión con Ag NPs. En la literatura no existen reportes de un espectro teórico ni experimental Raman de la molécula, por lo que se implementaron varias estrategias para obtener el espectro Raman de referencia. En nuestras condiciones experimentales fue imposible obtener el espectro normal Raman del compuesto después de la síntesis química, dado que se obtenía únicamente una banda muy intensa de fluorescencia tanto en sólido como en medio acuoso. Una estrategia experimental para suprimir la intensa banda de fluorescencia y obtener su espectro Raman, consistió en emplear sustratos

grafénicos, como se discutirá en la sección posterior. Otra estrategia para obtener el espectro Raman de referencia y ser empleado de forma comparativa en los espectros SERS experimentales del conjugado, consistió en realizar cálculos computacionales, empleando la teoría funcional de la densidad (DFT, del inglés), que permitieran obtener las frecuencias de vibración calculadas mediante un espectro Raman teórico.

El espectro Raman calculado del 5-S-CysDA se muestra en la **Figura 16 c**, mostrando únicamente el intervalo del “fingerprint”, el cual contiene la mayor cantidad de bandas de los diferentes modos vibracionales. Cada una de las bandas calculadas pueden claramente asignarse a los diferentes modos vibracionales de la molécula, haciendo uso de tablas de modos vibracionales de la literatura y con los valores de frecuencia de los modos de vibración calculados de la estructura molecular del 5-S-CysDA. En este espectro, las bandas en las posiciones 1485, 1386, 1326, 693 y 639  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a modos vibracionales combinados del anillo aromático (C-C), los grupos amino ( $\text{NH}_3^+$ ), los grupos catecoles (C-OH) y los diversos modos de los estiramientos y deformaciones del enlace S-C en la posición 5 en el anillo aromático [165]. Estas bandas se espera que sean las más características en el espectro normal Raman de la molécula, lo cual permite corroborar la estructura molecular del conjugado 5-S-CysDA. Un análisis detallado de la asignación de las principales bandas señaladas en el espectro calculado se encuentra en la **Tabla 4**. A pesar de que en la simulación computacional no se incluyeron los parámetros experimentales, debido a las limitantes computacionales, el espectro Raman calculado es una estrategia de gran utilidad en aquellos experimentos donde se carece de un espectro de referencia en la literatura.

Por otro lado, el espectro experimental SERS del conjugado 5-S-Cys-DA a una concentración de  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  en medio de dispersión coloidal con Ag NPs se muestra comparativamente en la **Figura 16a**. Este espectro SERS experimental en comparación con el espectro Raman de referencia (calculado), presentan diferencias notables en la forma y posición de las bandas. En principio se distingue un ensanchamiento de las bandas, lo cual es atribuido a la suma conjunta de los modos vibracionales cercanos a la superficie de la Ag NPs, además de los efectos de interacción superficial en el medio acuoso; otros factores que contribuyen en la posición de las bandas puede ser atribuido al valor del pH, la forma de agregación de las Ag NPs y las orientaciones de la molécula de 5-S-CysDA sobre la superficie metálica; de forma semejante al espectro SERS de la DA en medio acuoso. Además, en la simulación computacional existen limitantes que permiten reproducir exactamente las mismas condiciones experimentales en el cálculo, lo cual conllevó a obtener bandas ligeramente desplazadas, en comparación con las bandas mostradas en el espectro experimental. Sin embargo, pese a estas variantes las bandas del espectro SERS experimental del 5-S-CysDA pueden ser asignadas tomando como referencia tanto el espectro calculado, como los espectros SERS experimentales de las moléculas de la DA y la L-Cys, las cuales se han descrito en varios trabajos en la literatura [159, 166]. En la **Tabla 4** se describe detalladamente en detalle la asignación de dichas bandas.



**Figura 17.** Comparación de los espectros Raman y SERS de 5-S-CysDA en la región de la huella dactilar “fingerprint”. a) Espectro SERS experimental de 5-S-CysDA ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) en dispersión coloidal de AgNPs; b) Espectro SERS de 5-S-CysDA ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) contenida en LCR simulado y en medio coloidal de dispersión con AgNPs; c) Espectro Raman calculado de 5-S-CysDA en fase gaseosa; teoría DFT, con funcional *B3LYP-D3(BJ)* con una base de *def2-TZVP* y; d) Espectro SERS de 5-S-CysDA ( $5 \times 10^{-6} \text{M}$ ) contenida en orina sintética y en medio coloidal de dispersión con AgNPs.

El análisis comparativo entre el espectro simulado Raman y el espectro experimental SERS permite identificar el origen de cada modo vibracional, lo cual permite entender el tipo de interacciones entre la molécula y la superficie de las Ag NPs en dichas condiciones experimentales. El estudio detallado de las bandas, intensidades y posición en el número de onda en el espectro, permite inferir que las moléculas de 5-S-CysDA se estabiliza con las Ag NPs a través de los siguientes tipo de interacciones preferenciales: puentes de hidrógeno entre el ácido carboxílico del residuo de L-Cys con los grupos citratos, provenientes del método de síntesis, y que se encuentran en la superficie de las Ag NPs; interacciones electrostáticas entre los grupos amino cargados positivamente de 5-S-CysDA con los grupos citratos superficiales cargados negativamente; y la interacción electrostática directa entre los grupos catecoles con la superficie metálica de la nanopartícula de plata en el medio coloidal.

**Tabla 4.** Asignación de las bandas de los espectros normal Raman calculado y SERS de 5-S-CysDA. Se describen también las bandas SERS adquiridas en los medios simulados.

Asignación Tentativa de Bandas	Espectro Raman Calculado (cm <sup>-1</sup> )	SERS 5-S-CysDA en Agua (cm <sup>-1</sup> )	SERS 5-S-CysDA en CSF-s (cm <sup>-1</sup> )	SERS 5-S-CysDA en Orina-s (cm <sup>-1</sup> )
NH <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> def.	1656	1656	1652	
C=C str. del anillo/ NH <sub>2</sub> scis./NH <sub>3</sub> def.	1629	1620	1616	
Anillo (Arom.) str./ OH def. del catecol		1581	1577	1565
C-C (Arom)/ C-O-H en-el-plano bend.		1546	1542	
C-C del anillo str./ OH def. catecol	1512	1497	1507	1504
Anillo def./ C-O-H en-el-plano def./NH <sub>2</sub> wag./N-C-H def.	1485	1447	1445	1440
C-C (Arom) str./C-O-H en-el-plano bend./COO <sup>-</sup> asym str.	1386	1419	1419	1416
CH wag./NH twi./ COO <sup>-</sup> str./ COH bend.	1323	1330	1329	1339
Respiración del anillo/CH (Arom) en-plano rock./ CCH bend.	1305	1270	1271	1291
CH <sub>2</sub> en-el-plano bend./ NH <sub>2</sub> twist.	1251	1229	1230	1270
CH <sub>2</sub> en-el-plane bend./C-O-H catecol bend./ CO str.	1215	1195	1199	1228
CH Anillo def./C-O-H def./C-N str.	1197			-
C-N str. / S-C-C-N twist./ C-O str.	1152	1136	1144	1143
S-C-C-N tors./ NH <sub>2</sub> bend.	1198	1030		
C-S-C (Arom) en-plano bend./ C-S-C-N (Arom) def./C-N str.	1026			1002-UREA
C-C (Arom) def./ N-C-H and H-C-H def./ C-OH catecol def.		994	996	
CH en-el-plano bend./ NH <sub>2</sub> wag./ C-C str. del esqueleto	891	952		
CH (Arom) wag./OH rock./ H-N-C en-el-plano def.	837	870	874	818
COO <sup>-</sup> bend./NH <sub>2</sub> wag./C-C-S def.	801	795	789	768
O-C-(Arom) y S-C-(Arom) anillo, fuera del plano def.	738	711		
C-S str. /Respiración de anillo debido a S/ C-COO <sup>-</sup> def.	693	664	666	660
COO <sup>-</sup> y S-C def. Anillo fuera del plano/ C-S str.	639	616	611	612
C-S-C def./Anillo fuera del plano def./ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> rock.	585	559	562	570
CCN def./COOH def./ C-S def.		463	459	469
Anillo (Arom) fuera del plano def.	414	412	41	410

Abreviaciones: str. estiramiento; def. deformación; asym. asimétrico; wag. meneo; twist. torsión; rock. balanceo; arom. aromático.

Los estudios detallados de los espectros Raman y SERS del conjugado 5-S-CysDA, así como una mayor descripción de las interacción de este metabolito con las nanopartículas metálicas se encuentran en el **Anexo 3**, correspondiente al artículo en proceso de publicación. El estudio a profundidad de los modos vibracionales que son mayormente amplificados en el espectro SERS, permite identificar a las bandas que son reproducibles en cada experimento y que son estables en su posición de número de onda, las cuales pueden ser empleadas como bandas "marcadores" para hacer estimaciones cuantitativas, tal como se describe en la sección posterior.

#### 4.4.2.1. Detección de 5-S-CysDA mediante SERS en fluidos biológicos simulados

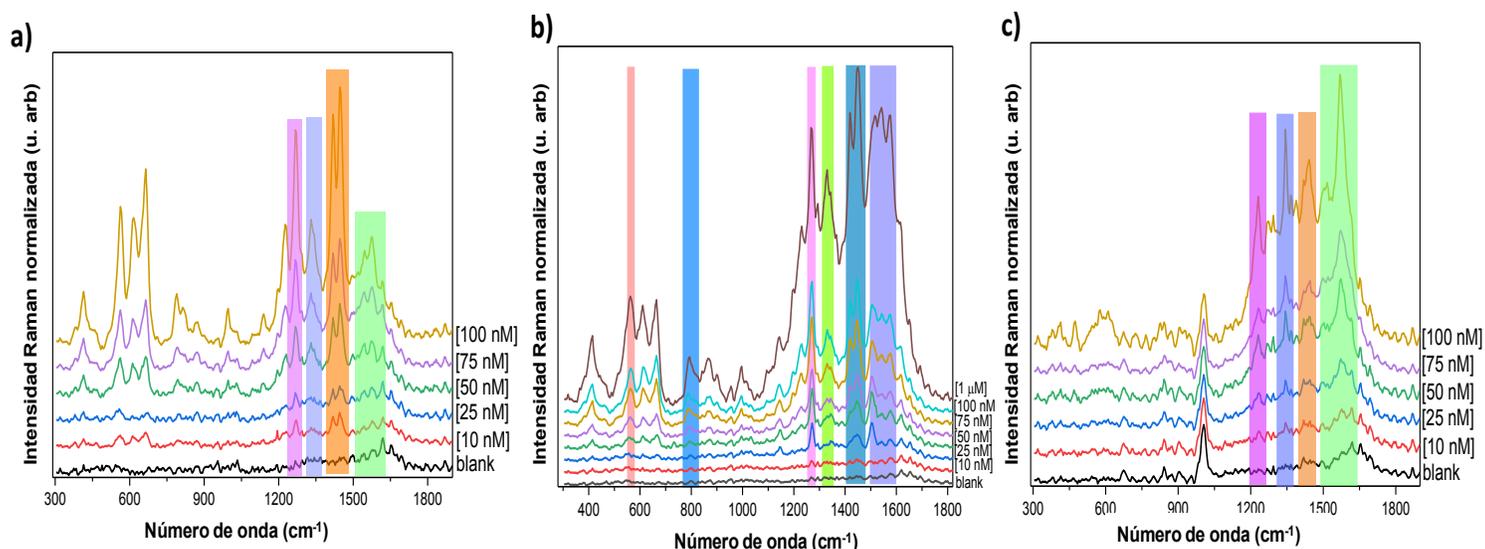
El conjugado 5-S-CysDA también, fue identificado mediante su espectro SERS en fluidos biológicos sintéticos; orina y LCR. En la figura **Figura 17 b** se muestra el espectro SERS del conjugado 5-S-CysDA distinguiendo que también es reproducible en los medios simulados, a pesar de presentar

algunas ligeras variaciones en la forma y posiciones de las bandas. Estas variaciones son de esperarse debido al incremento en concentración de las sales y otras moléculas presentes en los medios sintéticos, como se discutió anteriormente en el caso del SERS de la DA. Los espectros SERS de 5-S-CysDA en dispersión coloidal y en LCR presentan las mayores diferencias de bandas en el intervalo de 1500-1620  $\text{cm}^{-1}$ , en los cuales se distinguen la presencia de nuevas bandas, así como del incremento de intensidad de algunas existentes. El comportamiento anterior podría indicar que posiblemente se han formado una mayor cantidad de sitios "hotspots", induciendo una efectiva agregación de las AgNPs, favoreciendo una mayor interacción con las moléculas de 5-S-CysDA en la superficie metálica y genera una mayor amplificación de las bandas de los grupos funcionales más cercanos a estos sitios [167]. Incluso estas interacciones pueden estar amplificando modos vibracionales que no fueron perceptibles en el espectro SERS de la 5-S-CysDA adquirido en un medio sin el exceso de iones. Lo anterior permite explicar la notable diferencia en la intensidad de las bandas en el espectro SERS adquirido en LCR, respecto al del agua, a la misma concentración del analito. Por otro lado, la eficiencia de agregación de las Ag NPs se ve afectada por el tipo y carga de los iones en el medio; reportes en la literatura han comparado el efecto de diversas sales sobre la agregación de Ag NPs, con la finalidad de favorecer la eficiencia de amplificación de bandas en ensayos SERS [162]. Particularmente, los tipos de iones y sus concentraciones en el LCR son cercanos a los reportados como aquellos efectivos en la formación de sitios "hotspot" [168]. La agregación de las AgNPs podría también alterar la interacción y orientación de adsorción de las moléculas de 5-S-CysDA sobre la superficie metálica, lo cual afectaría las fuerzas de los enlaces en la molécula, viéndose reflejado tanto en el cambio en la posición del número de onda como en la intensidad de la vibración.

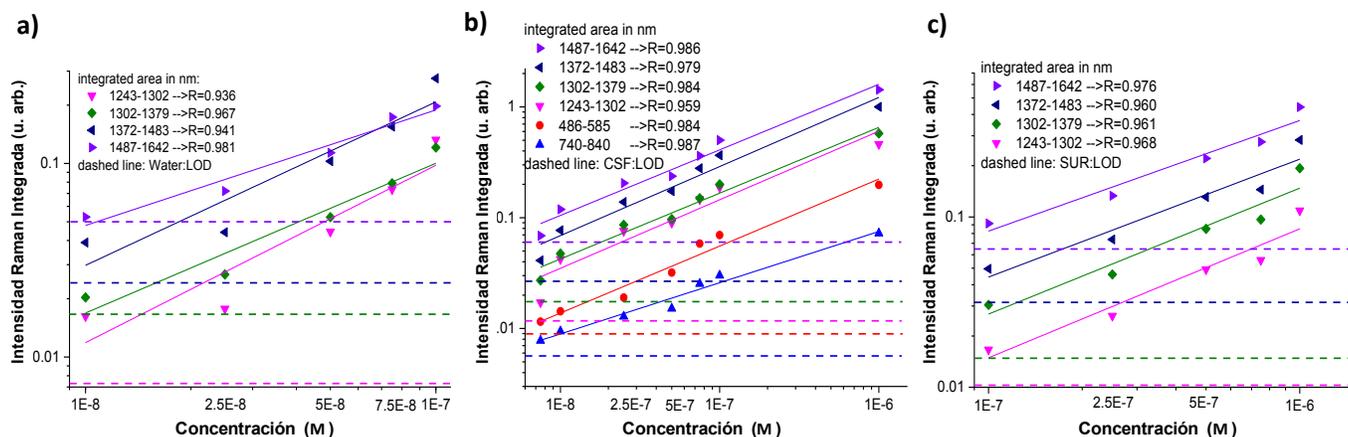
En la **Figura 17 d** se muestra el espectro SERS de 5-S-CysDA adquirido en la solución de orina sintético, en el cual se refleja un perfil de bandas muy semejante a los dos medios anteriores. Sin embargo, existen bandas más notables que han cambiado en posición del número de onda e intensidad. Por ejemplo la banda en 1565  $\text{cm}^{-1}$  se distingue más ancha y más intensa, en tanto que la banda en 1270  $\text{cm}^{-1}$  presenta una considerable disminución en intensidad. Los comportamientos anteriores pueden ser atribuidos al incremento de la concentración de sales y la presencia de otras moléculas en el medio, respecto a la composición del LCR artificial; por ejemplo la presencia de las moléculas de urea, presentando su banda característica en 1002  $\text{cm}^{-1}$ , conducen a alterar la adsorción de las moléculas de 5-S-CysDA, así como de crear una competencia de adsorción con la superficie metálica de la AgNP, lo cual limita la detección del conjugado a concentraciones menores de 50 nM. Por otro lado, reportes en la literatura han mostrado que el exceso de sales en el medio, como en el caso de la composición de la orina sintética, conducen a generar una saturación en la agregación de las Ag NPs, induciendo su rápida precipitación y posiblemente eliminen los sitios "hotspot" en el medio coloidal [169]. Lo anterior también permite explicar la limitada capacidad de detección SERS de 5-S-CysDA, a baja concentración y cuando se encuentra presente en un medio de mayor complejidad como en el caso de la orina sintética. Los resultados anteriores también sugieren que para una detección óptima del conjugado 5-S-CysDA mediante SERS, se debe realizar un pretratamiento de la muestra, en el caso de análisis de fluidos biológicos reales, por ejemplo en LCR, con la finalidad de reducir interferentes de matriz. En este sentido, la

implementación de cartuchos de extracción selectiva, como los empleados en el apartado anterior, podrían reducir la interferencia de componentes en muestras reales.

Los espectros SERS de 5-S-CysDA adquiridos de los diferentes medios (**Figura 18**) fueron tratados estadísticamente para obtener información cuantitativa de las bandas, en función de la concentración del metabolito, con la finalidad de establecer parámetros analíticos de detección y cuantificación del conjugado. Se seleccionaron las bandas Raman más representativas en cada espectro, con la característica de que fuera invariable en la posición del número de onda y que se permitiera distinguir su intensidad conforme se disminuye la concentración del analito; dichas bandas se han sombreado sobre los espectros en la **Figura 18**. En este análisis se seleccionaron al menos cuatro bandas como parámetro de sensibilidad, con la finalidad de comparar los valores de correlación entre ellas. Posteriormente, dichas bandas fueron integradas para obtener el valor de área bajo la curva, el cual fue graficado en función de la concentración molar de 5-S-CysDA en cada solución (**Figura 19**). Finalmente, se obtuvieron las relaciones estadísticas de linealidad de la curva, descrito por su coeficiente de correlación (R), la pendiente de la curva (parámetro de sensibilidad) y el valor de ordenada al origen. Estos datos se encuentran descritos en cada gráfica en la **Figura 19**, así como en el resumen comparativo de los valores estadísticos en la **Tabla 5**.



**Figura 18.** Espectros SERS de 5-S-CysDA en los diferentes medios analizados y a diferentes concentraciones. a) SERS de 5-S-CysDA obtenido en el medio de dispersión coloidal con Ag NPs; b) SERS de 5-S-CysDA disuelto en LCR sintético; y c) SERS de 5-S-CysDA disuelto en orina sintética. Se sombreado en color las bandas en el espectro que permiten mostrar el cambio de la intensidad, conforme se varía la concentración del conjugado en cada medio.



**Figura 19.** Correlación lineal de la integración de las bandas SERS previamente seleccionadas, respecto a la concentración del 5-S-CsyDA. a) En el medio acuoso de dispersión coloidal con Ag NPs; b) en LCR sintético y c) orina sintética. Se presentan los valores del coeficiente de correlación lineal para cada banda. Las líneas punteadas indican el límite de detección (LDD) de cada una de las bandas seleccionadas; el LDD fue calculado aplicando el criterio IUPAC; calculado como la señal del blanco más tres veces su desviación estándar.

**Tabla 5.** Resumen de los valores estadísticos de linealidad, la pendiente (parámetro de la sensibilidad) y el coeficiente de correlación lineal, resultado de la integración del área de las bandas más significativas en el espectro SERS del conjugado para cada medio analizado.

Medio	Banda (1/cm)	Ordenada al origen		Pendiente		Correlación (R <sup>2</sup> )
		Valor	Desv. est.	Valor	Desv. est.	
5-S-CysDA en Agua	1487-1642	3.45035	0.5049	0.59631	0.0681	0.9498
	1302-1379	4.41563	0.87609	0.77351	0.11816	0.91277
	1372-1483	5.22758	1.29541	0.84423	0.17472	0.84819
5-S-CysDA en CSF	740-840	1.64929	0.24414	0.46231	0.03327	0.9697
	1487-1642	3.755	0.33438	0.59182	0.04557	0.96545
	486-585	2.97649	0.35462	0.60466	0.04833	0.96285
5-S-CysDA en Orina Sintética	1487-1642	3.46517	0.53644	0.64974	0.08361	0.93689
	1243-1302	3.47484	0.7269	0.75742	0.1133	0.91613
	1302-1379	3.60693	0.78559	0.73961	0.12245	0.89869

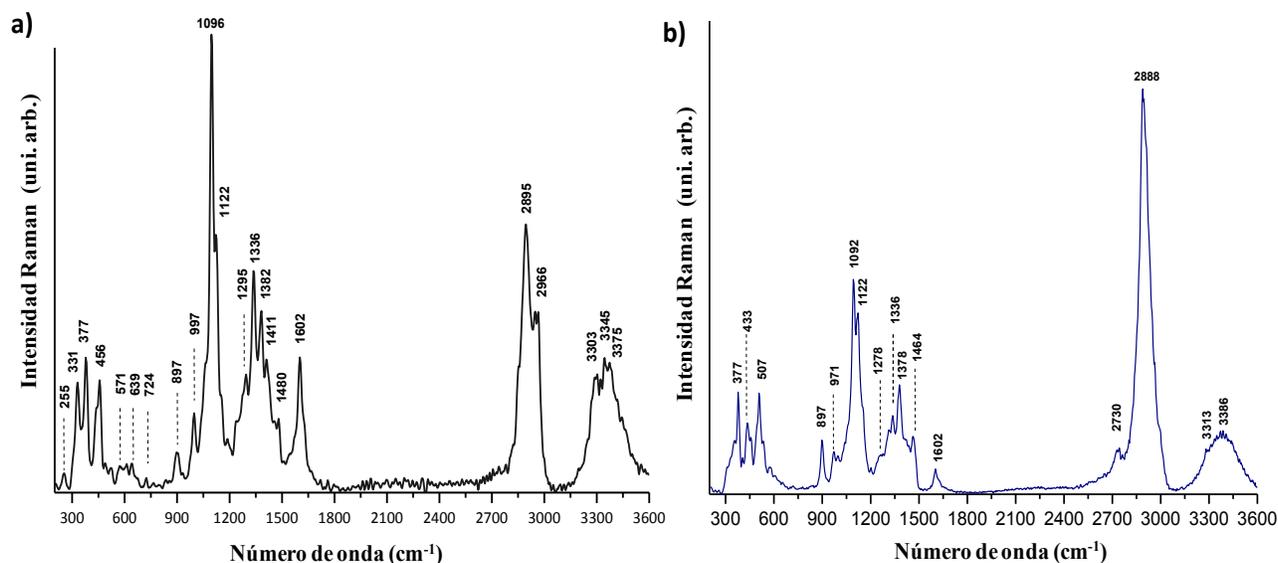
Los valores de los parámetros de linealidad en el análisis estadístico, obtenido en la **Figura 19**, indican que es posible seleccionar al menos tres bandas que muestran la presencia del 5-S-CysDA a bajas concentraciones, y son aquellas también que presentan los mayores valores de correlación lineal ( $R^2$ ) y de pendiente. En la **Tabla 5** se muestra el resumen de los valores estadísticos de la integración de las bandas con la mayor correlación en cada uno de los medios adquiridos, sus ordenadas al origen, pendientes y coeficientes de correlación lineal. Particularmente, la banda en el intervalo 1487-1642  $\text{cm}^{-1}$  es aquella que presenta un mejor valor de correlación lineal, más cercano a 1, y es distinguible en los tres medios, cuando se disminuye la concentración de 5-S-CysDA. Sin embargo, existen otras bandas que presentan un mayor valor de la pendiente, como el

criterio de sensibilidad, por ejemplo en el intervalo 1243-1302  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual permitirían hacer una detección del metabolito a menores concentraciones. Además, es importante también considerar que las bandas compendiadas en el intervalo 1300-1650  $\text{cm}^{-1}$  normalmente es donde se presenta la mayoría de los modos vibracionales, por lo que en este caso la selección de la banda en el intervalo 740-840  $\text{cm}^{-1}$  en el medio LCR, cumple los criterios de linealidad y puede ser diferenciada del resto de las bandas en el espectro SERS, lo cual facilitaría identificar, con mayor selectividad, la presencia del 5-S-CysDA. En el análisis anterior también se establecen los límites de detección (LDD) de acuerdo al criterio IUPAC: el LDD calculado como la señal del blanco más tres veces su desviación estándar. En este sentido, la banda en el intervalo 1243-1302  $\text{cm}^{-1}$  presenta un valor de LDD cercano a 10 nM en agua y en la orina sintética. Los parámetros analíticos aquí reportados podrían ser empleados para detectar sensiblemente el 5-S-CysDA mediante SERS en muestras de mayor complejidad, tal como en LCR, en las cuales el conjugado se ha reportado estar presente en una concentración del orden nM [9, 55]. Sin embargo, trabajos posteriores son requeridos con la finalidad de mejorar la selectividad del sistema nanoestructurado hacia el conjugado 5-S-CysDA. En este sentido, la funcionalización de las nanopartículas de plata con anticuerpos contra 5-S-CysDA podría ser un paso próximo a seguir. Por otro lado, estos resultados permiten demostrar la viabilidad de la espectroscopia SERS, como método alternativo a los métodos cromatográficos, en la detección sensible del 5-S-CysDA. Finalmente, mediante el análisis de las estrategias experimentales reportadas en la sección anterior, se logran resaltar las ventajas operacionales, respecto al tipo de preparación y manipulación de la muestra, así como en el tiempo de análisis, los cuales resultan ser más rápidos y con menor inversión de recursos, a diferencia de los métodos convencionales de cromatografía. Sin embargo, este es sólo uno de los primeros pasos en los que aún se requieren trabajos posteriores que permitan verificar la detección sensible y selectiva del conjugado 5-S-CysDA en muestras provenientes de pacientes. Detalles adicionales de la cuantificación analítica en la detección de 5-S-CysDA en los medios biológicos simulados, se puede consultar en **Anexo 3**, del artículo en proceso de publicación.

#### **4.5. Adsorción y detección de 5-S-CysDA en sustratos grafénicos**

##### **4.5.1. Apagamiento de fluorescencia de 5-S-CysDA en GO y detección por espectroscopia Raman**

Los materiales grafénicos tienen la característica de poseer una gran área superficial, y algunos de ellos como el óxido de grafeno (GO) y el óxido de grafeno reducido (rGO) contienen diversos grupos funcionales que pueden ser eficientemente aprovechados para interactuar con moléculas de interés biomédico, con la ventaja de preservar sus propiedades eléctricas y químicas de respuesta, que pueden ser empleadas en la respuesta sensible hacia la fabricación de biosensores. En ese sentido, como un paso previo para lograr dicho objetivo, en este trabajo se exploró la eficiencia del GO y el rGO para adsorber el conjugado 5-S-CysDA e identificar su presencia empleando la espectroscopia Raman.



**Figura 20.** Espectros Raman del conjugado 5-S-CysDA adsorbido sobre sustratos de óxido de grafeno (GO) (a) y óxido de grafeno reducido (rGO) (b) en un soporte de espejo de aluminio. Se indican las principales bandas de algunos de los modos vibracionales asignados a la molécula, los cuales se encuentran asignados a detalle en la Tabla 1 del Anexo 2.

En el caso del conjugado 5-S-CysDA después de ser sintetizado y purificado, se buscó obtener su espectro normal Raman en el sólido liofilizado. Sin embargo, únicamente se obtuvo una banda muy ancha e intensa, originada por la fluorescencia del compuesto cuando se excita a una longitud de onda de 532 nm. En este sentido, aprovechando las propiedades tanto del GO como del rGO para apagar la fluorescencia de moléculas adsorbidas en su superficie, se adsorbió el conjugado 5-S-CysDA sobre dichos sustratos. La fabricación de los soportes se realizó mediante el secado de gotas de GO o rGO a baja concentración sobre un espejo de aluminio, con la finalidad de evitar la formación de aglomerados de monocapas y multicapas de GO y rGO. El depósito de una solución del conjugado 5-S-CysDA sobre los sustratos, llevó a la formación de los sistemas 5-S-CysDA/GO/Al y 5-S-CysDA/rGO/Al. La adquisición de varios espectros puntuales Raman en la región depositada del conjugado sobre los sustratos grafénicos, permitió obtener un espectro normal Raman, sin la presencia de la banda de fluorescencia. El apagamiento de la fluorescencia permitió identificar con claridad la gran mayoría de bandas Raman en todo el intervalo espectral, tal como se muestra en la **Figura 20**.

Los espectros Raman adquiridos muestran bandas distinguibles tanto en la forma como en las posiciones del número de onda, semejante a los obtenidos en los espectros SERS y el obtenido mediante simulación computacional (**Figura 17**). La asignación detallada de las bandas obtenidas de este sistema, comparando con referencias especializadas de la literatura, se encuentran descritas en el contenido del artículo publicado derivado de este trabajo (**ver Anexo 2**) [143]. Los espectros Raman en ambos sustratos presentan gran semejanza en el perfil y número de onda de las bandas, lo que permite identificar la presencia de la molécula mediante su perfil espectral Raman. Además en ambos espectros es de destacar la poca o nula presencia de las bandas Raman

D ( $\sim 1345\text{ cm}^{-1}$ ) y G ( $\sim 1595\text{ cm}^{-1}$ ), características de estos sistemas grafénicos, lo cual beneficia para obtener un espectro Raman con mayor claridad y de menor distorsión de las bandas, a comparación de los espectros SERS antes presentados.

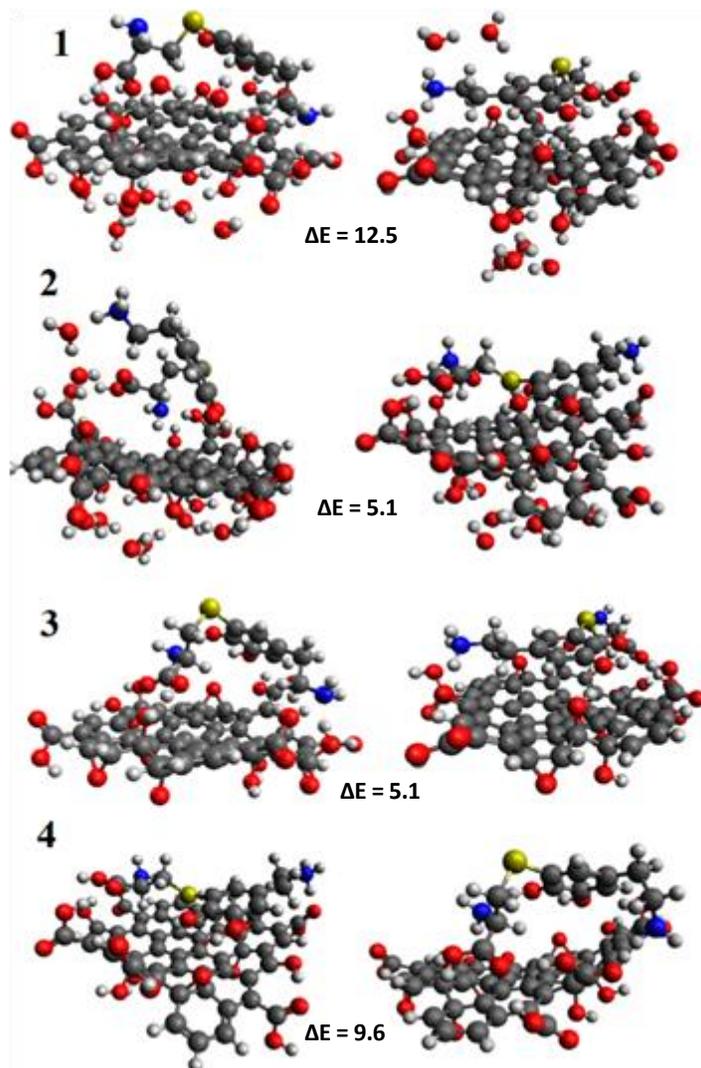
En ambos espectros en la **Figura 20** se distingue que las bandas más intensas y prominentes en la región el “fingerprint” son aquellas en las posiciones  $1060\text{ cm}^{-1}$  y  $1092\text{ cm}^{-1}$  en los sistemas GO y rGO, respectivamente. Estas bandas son atribuidas al modo vibracional de respiración del anillo aromático, cuando se encuentra unido covalentemente al átomo de azufre, este enlace genera una región de gran polarizabilidad en la molécula de 5-S-CysDA, debida a la aportación de los pares electrónicos libres del átomo de S, lo cual conduce a obtener una banda de gran intensidad de dicha vibración [170]. Las variaciones en la posición de ésta y otras bandas en los espectros comparativos de los sistemas GO y rGO (**Figuras 20 a, b**) pueden ser atribuidas a una o varias de los siguientes factores: i) el tipo, forma y estructuración de los sistemas grafénicos; por un lado en el caso de GO existe mayor presencia de grupos OH residuales, entre ellos hidroxilos, ácidos carboxílicos y epóxidos, los cuales pueden favorecer interacciones moleculares con el analito adsorbido, en tanto en el caso de rGO posee una menor cantidad de dichos grupos pero se favorecen los dominios aromáticos C-C tipo  $sp^2$ , los cuales interaccionarían preferencialmente mediante interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  con las moléculas adsorbidas; ii) la orientación y tipos de interacciones de la molécula con las superficies, determinado por el tipo y cantidad de grupos funcionales en la estructura molecular, los cuales establecerán diferentes tipos de interacciones inter e intramoleculares y conducirán a orientar de forma preferencial la molécula sobre la superficie, estas variaciones en conjunto se verán reflejadas en la posición de las bandas de los modos vibracionales en el espectro Raman; y iii) las condiciones experimentales durante la adsorción, en el cual el valor del pH y la presencia de moléculas de agua inducen a establecer una orientación e interacción preferencial en la superficie con los arreglos grafénicos [172].

Los factores anteriormente descritos conllevan a que bajo ciertas condiciones se genere el fenómeno de amplificación Raman por grafeno (GERS), cuando se incide una longitud de onda monocromática sobre la molécula adsorbida en el sustrato grafénico, llevando a amplificar favorablemente algunos de sus modos vibracionales [129]. En nuestros sistemas podrían estar ocurriendo tanto el apagamiento de la fluorescencia como la amplificación de algunos modos vibracionales mediante el GERS. Sin embargo, la posibilidad de concluir sobre el efecto que domina en estos experimentos, tan solo con la presencia de los espectros Raman, es limitada por lo que trabajos posteriores son requeridos en un análisis a mayor detalle de estos fenómenos superficiales con los materiales grafénicos, lo cual permitirá aprovechar las capacidades de fabricación de plataformas analíticas de detección.

#### **4.5.2. Estudio experimental y teórico de la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO**

La adsorción de moléculas sobre GO y otros materiales grafénicos, y el empleo de la espectroscopia Raman como herramienta de detección de dichas moléculas, continúa en un amplio campo de expansión. Estas herramientas podrán facilitar el diseñar sistemas de reconocimiento de analitos y que permitan la fabricación de biosensores. Sin embargo, en la

literatura existe poca información sobre los diversos fenómenos fisicoquímicos que participan en la interacción de las moléculas con el sustrato. Estudios a profundidad de estos fenómenos facilitará el diseño de dichas plataformas. Una extensión de este trabajo de tesis fue estudiar el tipo de interacciones que participan en la adsorción del conjugado 5-S-CysDA sobre el GO, en el sistema anteriormente caracterizado mediante espectroscopia Raman. Este estudio se realizó combinando estrategias experimentales y métodos de simulación computacional. Se emplearon varios métodos de cálculo y optimización con la finalidad de representar los sistemas que contienen: los átomos y sus arreglos en una laminilla de GO, la molécula protonada de 5-S-CysDA y varias moléculas de agua. Una representación de la configuración de las moléculas simuladas, después del cálculo computacional se muestra gráficamente en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Configuraciones estructurales de los modelos de óxido de grafeno, la molécula de 5-S-CysDA y moléculas de agua empleados en los cálculos energéticos. Se determinaron cuatro configuraciones de menor energía (1-4), en las cuales las estructuras de la derecha se determinaron ser las más estables. Las diferencias de energía ( $\Delta E$ ) entre cada configuración se reportan en kcal/mol [143].

Complementario a la simulación computacional, se empleó la espectroscopia FTIR para aportar información adicional sobre el tipo de interacciones, en las condiciones experimentales. Se realizaron análisis comparativos de las principales bandas en los espectros FTIR del conjugado 5-S-CysDA puro (Figura 9 b), del GO y de la mezcla entre ellos. Los espectros FTIR presentados de forma comparativa, así como la asignación detallada de sus bandas se encuentran en la Figura 3 del **Anexo 2**.

Los análisis comparativos teórico y experimental permiten entender las interacciones de tipo no-covalentes que son responsables de la adsorción de 5-S-CysDA sobre GO, en las cuales se determinó, mediante cálculos energéticos, que las principales interacciones corresponden los puentes de hidrógeno, preferencialmente del ácido carboxílico y grupo amino del conjugado con los grupos OH superficiales del GO. Además, otras interacciones que no son puente de hidrógeno; por ejemplo de tipo C...S, también participan en la estabilización de la molécula. Por otro lado, se determinó que las moléculas de agua intermoleculares incrementan la capacidad de adsorción de la molécula sobre el sustrato [172]. Un análisis detallado de este estudio se encuentra en el artículo publicado en **Anexo 2**, al final de este escrito derivado de este trabajo de tesis [143].

Los resultados que se obtuvieron de los análisis anteriores podrían eficientemente emplearse para la fabricación de los sustratos basados en materiales grafénicos y emplear a la espectroscopia Raman como una herramienta de detección del 5-S-CysDA. Trabajos a futuro en esta dirección permitirían desarrollar plataformas analíticas con alta sensibilidad para la detección de biomarcadores específicos de la EP y mejorar su diagnóstico clínico.

## 5. Conclusiones y Perspectivas

---

- ❖ Se realizó la síntesis química reproducible del conjugado 5-S-CysDA, el cual fue caracterizado mediante espectrometría de masa, y espectroscopias UV-Vis, FTIR y Raman. Los resultados de estas dos últimas técnicas eran inexistentes en la literatura, por lo que se aportaron datos adicionales en la caracterización de los modos vibracionales en la estructura química del conjugado.
- ❖ Se implementó un método robusto analítico para la detección conjunta de catecolaminas y derivados de DA oxidada, mediante el método de HPLC-MS. Se combinaron novedosas herramientas analíticas para incrementar la sensibilidad y selectividad en el método, tales como el uso de un cartucho de extracción en fase sólida (SPE) aportando selectividad de detección a los metabolitos DA, HVA, DOPAC y el conjugado 5-S-CysDA.
- ❖ El método analítico de HPLC-MS, permitió la detección conjunta de los compuestos: DA, 5-S-CysDA, HVA y DOPAC. Además, empleando este método se establecieron también los parámetros analíticos de cuantificación de dichos metabolitos, logrando ser cuantificados en un orden de  $1 \times 10^{-7}$  M en el método HPLC-MS. Se establecieron los criterios lineales de confianza para la detección sensible de los metabolitos en las muestras complejas en el modelo animal de ozono.
- ❖ El método analítico HPLC-MS desarrollado en este trabajo podría ser perfectamente viable para detectar los metabolitos antes descritos en fluidos complejos, tales como plasma, suero, orina o LCR, provenientes de otros modelos animales de neurodegeneración o de pacientes con EP.
- ❖ El conjugado DHBT-1, proveniente de la oxidación del conjugado 5-S-CysDA, presentó una limitada respuesta de detección en el método HPLC-MS, por lo que fue descartado de los análisis en el tejido cerebral. Por lo que, trabajos futuros sobre la reproducibilidad de la síntesis de este compuesto permitirán obtener sus patrones analíticos de referencia para que pueda ser cuantificado en el modelo animal.
- ❖ Se cuantificaron los compuestos DA, HVA y 5-S-CysDA en la sustancia nigra de ratas controles y de las expuestas durante 7, 15, 30, 60 y 90 días a bajas dosis de ozono. Se identificó la disminución de los niveles de DA y HVA, mientras que el 5-S-CysDA incrementó a mayor tiempo de exposición de las ratas al ozono. Estos valores han permitido correlacionar el efecto del estrés oxidativo, inducido por ozono, sobre la síntesis y metabolismo tanto enzimático como oxidativo de la DA la SN en el modelo animal de neurodegeneración progresiva.
- ❖ Los compuestos DA, HVA, DOPAC y 5-S-CysDA fueron cuantificados en el estriado de las ratas del modelo de ozono, mostrando tendencias semejantes con los valores obtenidos en la SN. Lo anterior ha permitido correlacionar el efecto del ozono, comparativamente tanto en estriado como en la SN, lo cual permitió estudiar la evolución de estos metabolitos en el modelo animal de ozono.

- ❖ Los valores cuantitativos de los metabolitos obtenidos en este trabajo han permitido correlacionar con mayor cercanía la evolución tanto de la formación como del metabolismo de la DA en el tiempo, siguiendo sus metabolitos de degradación enzimática (HVA y DOPAC) y oxidativa (5-S-CysDA). Este trabajo es el primero que muestra cuantitativamente la evolución de estos productos en un modelo animal, a tiempos largos de exposición de ozono, siendo éste el único factor de inducción exógeno.
- ❖ En este trabajo se refuerza también la propuesta de emplear al 5-S-CysDA como un potencial biomarcador y de aparición temprana en la neurodegeneración de la SN y el estriado, ya que en el modelo animal aquí estudiado se determinó que el incremento de su concentración ocurre posterior a los 30 días de exposición al ozono.
- ❖ Trabajos adicionales en lo que se cuantifique el conjugado 5-S-CysDA en modelos animales clásicos de la EP, por ejemplo en modelo de MPTP o 6-OH, permitirán entender los mecanismos en que dicho conjugado participa en la neurodegeneración en la SN.
- ❖ Los resultados aquí obtenidos ayudarán a reforzar los trabajos existentes en la literatura, referentes a la toxicidad del conjugado 5-S-CysDA, donde se ha argumentado que su formación y acumulación causa daños severos a las neuronas dopaminérgicas.
- ❖ Estos resultados podrían ayudar a explicar el daño neurodegenerativo en la SN y el estriado causado por el ozono, y también permitirán correlacionar los mecanismos celulares que podría estar ocurriendo en un paciente con EP ante condiciones de contaminación ambiental que causen estrés oxidativo.
- ❖ Trabajos posteriores en donde se realice la detección conjunta de otros metabolitos oxidados derivados de DA, tal como el aminocromo, el 5-6-indol quinona, la neuromelanina y la hidobenzotiacina del conjugado 5-S-CysDA (DHBT-1), ayudarán a explicar con mayor detalle el metabolismo de la DA y sus implicaciones en la EP.
- ❖ La espectroscopia SERS ha permitido la identificación de la molécula de la DA únicamente en presencia de una dispersión con Ag NPs y en LCR, alcanzando un límite de detección de 0.1  $\mu\text{M}$ . Los parámetros analíticos determinado mediante SERS, podrían implementarse en la detección de DA en muestras complejas. Sin embargo, trabajos adicionales en los que se mejore la sensibilidad de detección por este método permitirán su detección en muestras de pacientes, tal como en LCR, donde la DA se encuentra en concentración de orden nM.
- ❖ El conjugado 5-S-CysDA ha mostrado una buena respuesta de detección mediante SERS, el cual fue reproducible e identificado también en medios complejos simulados; tanto en orina sintética como en LCR sintético. Se lograron alcanzar límites de detección alrededor de 10 nM, y se establecieron los parámetros analíticos de cuantificación del conjugado, lo cual permitiría su aplicación de detección en muestras reales.
- ❖ La detección de estos y otros metabolitos puede ser optimizada mediante la modificación superficial de las nanopartículas metálicas, con la finalidad de proveer selectividad, y que permitan su detección en muestras complejas o aquellas provenientes de pacientes.
- ❖ En este trabajo se ha logrado demostrar que dos métodos analíticos alternativos (HPLC y SERS) permiten detectar y cuantificar el conjugado 5-S-CysDA en diferentes medios de complejidad. Lo cual apunta a que estos métodos podrían ser empleados para detectar sensitivamente este compuesto como un biomarcador de la EP.

- ❖ Las plataformas analíticas basadas en sustratos grafénicos han permitido apagar eficientemente la fluorescencia del conjugado 5-S-CysDA, permitiendo adquirir por primera vez el espectro Raman experimental de dicho conjugado.
- ❖ El análisis combinado teórico y experimental, en el estudio de las interacciones del conjugado 5-S-CysDA con GO, han facilitado identificar los tipos de interacciones fisicoquímicas que estabilizan la adsorción preferencial del conjugado sobre el sustrato.
- ❖ Este trabajo muestra que los materiales grafénicos, asistidos con espectroscopia Raman, podrían permitir desarrollar eficientes plataformas sensitivas para detectar el conjugado 5-S-CysDA y otros metabolitos de relevancia médica, con miras al desarrollo de biosensores que refuercen el diagnóstico clínico.

## 6. REFERENCIAS

---

- [1] De Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(6), 525-535.
- [2] Smith, Y., Wichmann, T., Factor, S. A., & DeLong, M. R. (2012). Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 213-246.
- [3] Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., & Wood, N. W. (2006). Understanding the molecular causes of Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine*, 12(11), 521-528.
- [4] Burbulla, L. F., Song, P., Mazzulli, J. R., Zampese, E., Wong, Y. C., Jeon, S. & Savas, J. N. (2017). Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*, 357(6357), 1255-1261.
- [5] Mor, D. E., Tsika, E., Mazzulli, J. R., Gould, N. S., Kim, H., Daniels, M. J., & Kalb, R. G. (2017). Dopamine induces soluble  $\alpha$ -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nature neuroscience*, 20(11), 1560.
- [6] Herrera, A., Munoz, P., Steinbusch, H. W., & Segura-Aguilar, J. (2017). Are dopamine oxidation metabolites involved in the loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system in Parkinson's disease?. *ACS chemical neuroscience*, 8(4), 702-711.
- [7] Rivas-Arancibia, S., Hernández-Zimbrón, L. F., Rodríguez-Martínez, E., Borgonio-Pérez, G., Velumani, V., & Durán-Bedolla, J. (2013). Chronic exposure to low doses of ozone produces a state of oxidative stress and blood-brain barrier damage in the hippocampus of rat. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(11), 24.
- [8] Rosengren, E., Linder-Eliasson, E., Carlsson, A., 1985. Detection of 5-S-cysteinyldopamine in human brain. *J. Neural Transm.* 63, 247-253.
- [9] Carlsson, A., Fornstedt, B., 1991b. Catechol metabolites in the cerebrospinal fluid as possible markers in the early diagnosis of Parkinson's disease. *Neurology* 41, 50-51 discussion 52.
- [10] Fornstedt, B., Bergh, I., Rosengren, E., & Carlsson, A. (1990). An improved HPLC-electrochemical detection method for measuring brain levels of 5-S-cysteinyldopamine, 5-S-cysteinylnl-3, 4-dihydroxyphenylalanine, and 5-S-cysteinylnl-3, 4-dihydroxyphenylacetic acid. *Journal of neurochemistry*, 54(2), 578-586.
- [11] Lee, S. J., Guan, Z., Xu, H., & Moskovits, M. (2007). Surface-enhanced Raman spectroscopy and nanogeometry: The plasmonic origin of SERS. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(49), 17985-17988.
- [12] Suvarnaphaet, P., & Pechprasarn, S. (2017). Graphene-based materials for biosensors: a review. *Sensors*, 17(10), 2161.
- [13] Wu, L., Chu, H. S., Koh, W. S., & Li, E. P. (2010). Highly sensitive graphene biosensors based on surface plasmon resonance. *Optics express*, 18(14), 14395-14400.

- [14] Shao, Y., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A., & Lin, Y. (2010). Graphene based electrochemical sensors and biosensors: a review. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 22(10), 1027-1036.
- [15] Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., Pringsheim, T., 2016. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 46,292-300.
- [16] Goldman, S. M. (2014). Environmental toxins and Parkinson's disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 54, 141-164.
- [17] Chade, A. R., Kasten, M., & Tanner, C. M. (2006). Nongenetic causes of Parkinson's disease. In *Parkinson's Disease and Related Disorders* (pp. 147-151). Springer, Vienna.
- [18] Shulman, J. M., De Jager, P. L., & Feany, M. B. (2011). Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 193-222.
- [19] Titova, N., Padmakumar, C., Lewis, S.J., Chaudhuri, K.R., 2017. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? *J. Neural Transm.* 124, 907-914.
- [20] Chaudhuri, K. R., Odin, P., Antonini, A., & Martinez-Martin, P. (2011). Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism & related disorders*, 17(10), 717-723.
- [21] Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C., & Rodriguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(S3), S548-S559.
- [22] Smith, Y., & Kieval, J. Z. (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, 23, S28-S33.
- [23] Villar-Pique, A., Lopes da Fonseca, T., Outeiro, T.F., 2016. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J. Neurochem.* 139(Suppl. 1), 240-255.
- [24] Chen, C., Turnbull, D.M., Reeve, A.K., 2019. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease-cause or consequence? *Biology* 8 pii: E38.
- [25] Monzani, E., Nicolis, S., Dell'Acqua, S., Capucciati, A., Bacchella, C., Zucca, F.A., Mosharov, E.V., Sulzer, D., Zecca, L., Casella, L., 2019. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 58, 6512-6527.
- [26] Segura-Aguilar, J., Paris, I., Muñoz, P., Ferrari, E., Zecca, L., & Zucca, F. A. (2014). Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 129(6), 898-915.
- [27] Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 34.
- [28] Vergo, S., Johansen, J.L., Leist, M., Lotharius, J., 2007. Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res.* 1185, 18-32.

- [29] Badillo-Ramírez, I., Saniger, J. M., & Rivas-Arancibia, S. (2019). 5-S-cysteinyl-dopamine a neurotoxic endogenous metabolite of dopamine: Implications for Parkinson's disease. *Neurochemistry International*, 104514.
- [30] Myöhänen, T.T., Schendzielorz, N., Männistö, P.T., 2010. Distribution of catechol-Omethyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J. Neurochem.* 113, 1632-1643.
- [31] Muñoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., Segura-Aguilar, J., 2012. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinson's Dis.* 2012, 920953.
- [32] Sulzer, D., Zecca, L., 2000. Intra-neuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox. Res.* 1, 181-195.
- [33] Sun, Y., Pham, A.N., Hare, D.J., Waite, T.D., 2018. Kinetic modeling of pH-dependent oxidation of dopamine by iron and its relevance to Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 12, 859.
- [34] Graumann, R., Paris, I., Martinez-Alvarado, P., Rumanque, P., Perez-Pastene, C., Cardenas, S. P., & Segura-Aguilar, J. (2002). Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. *Polish journal of pharmacology*, 54(6), 573-580.
- [35] Wakamatsu, K., Murase, T., Zucca, F. A., Zecca, L., & Ito, S. (2012). Biosynthetic pathway to neuromelanin and its aging process. *Pigment cell & melanoma research*, 25(6), 792-803.
- [36] Bisaglia, M., Soriano, M.E., Arduini, I., Mammi, S., Bubacco, L., 2010. Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 699706.
- [37] Bisaglia, M., Filograna, R., Beltramini, M., & Bubacco, L. (2014). Are dopamine derivatives implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease?. *Ageing research reviews*, 13, 107-114.
- [38] Bisaglia, M., Mammi, S., Bubacco, L., 2007. Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 282, 15597-15605.
- [39] Zucca, F. A., Segura-Aguilar, J., Ferrari, E., Muñoz, P., Paris, I., Sulzer, D., & Zecca, L. (2017). Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 155, 96-119.
- [40] Zeevalk, G.D., Razmpour, R., Bernard, L.P., 2008. Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomed. Pharmacother.* 62 236-24.
- [41] Jameson, G. N., Zhang, J., Jameson, R. F., & Linert, W. (2004). Kinetic evidence that cysteine reacts with dopaminoquinone via reversible adduct formation to yield 5-cysteinyl-dopamine: an important precursor of neuromelanin. *Organic & biomolecular chemistry*, 2(5), 777-782.
- [42] Zeevalk, G.D., Razmpour, R., Bernard, L.P., 2008. Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomed. Pharmacother.* 62 236-24.

- [43] Li, H., Shen, X. M., & Dryhurst, G. (1998). Brain Mitochondria Catalyze the Oxidation of 7-(2-Aminoethyl)-3, 4-Dihydro-5-Hydroxy-2H-1, 4-Benzothiazine-3-Carboxylic Acid (DHBT-1) to Intermediates that Irreversibly Inhibit Complex I and Scavenge Glutathione: Potential Relevance to the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Journal of neurochemistry*, 71(5), 2049-2062.
- [44] Mosca, L., Tempera, I., Lendaro, E., Di Francesco, L., & d'Erme, M. (2008). Characterization of catechol-thioether-induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research*, 86(4), 954-960.
- [45] Mosca, L., Lendaro, E., d'Erme, M., Marcellini, S., Moretti, S., & Rosei, M. A. (2006). 5-S-Cysteinyldopamine effect on the human dopaminergic neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Neurochemistry international*, 49(3), 262-269.
- [46] Vauzour, D., Pinto, J.T., Cooper, A.J., Spencer, J.P., 2014. The neurotoxicity of 5-S-cysteinyldopamine is mediated by the early activation of ERK1/2 followed by the subsequent activation of ASK-1/JNK1/2 pro-apoptotic signalling. *Biochem. J.* 463, 41-52.
- [47] Aureli, C., Cassano, T., Masci, A., Francioso, A., Martire, S., Cocciolo, A., Chichiarelli, S., Romano, A., Gaetani, S., Mancini, P., Fontana, M., d'Erme, M., Mosca, L., 2014. 5 Scysteinyldopamine neurotoxicity: influence on the expression of  $\alpha$ -synuclein and ERp57 in cellular and animal models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 92, 347-358.
- [48] Sidell, K. R., Olson, S. J., Ou, J. J., Zhang, Y., Amarnath, V., & Montine, T. J. (2001). Cysteine and mercapturate conjugates of oxidized dopamine are in human striatum but only the cysteine conjugate impedes dopamine trafficking in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry*, 79(3), 510-521.
- [49] Fornstedt, B., Rosengren, E., Carlsson, A., 1986. Occurrence and distribution of 5-S- cysteinylderivatives of dopamine, DOPA and DOPAC in the brains of eight mammalspecies. *Neuropharmacology* 25, 451-454.
- [50] Fornstedt, B., Brun, A., Rosengren, E., & Carlsson, A. (1989). The apparent autoxidation rate of catechols in dopamine-rich regions of human brains increases with the degree of depigmentation of substantia nigra. *Journal of Neural Transmission-Parkinson's Disease and Dementia Section*, 1(4), 279-295.
- [51] Goldstein, D.S., Holmes, C., Sharabi, Y., 2012. Cerebrospinal fluid biomarkers of centralcatecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain* 135, 1900-1913.
- [52] Cheng, F.C., Kuo, J.S., Chia, L.G., Dryhurst, G., 1996. Elevated 5-S- cysteinyldopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insights into the pathoetiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 103, 433-446.
- [53] Lloyd, K.G., Davidson, L., Hornykiewicz, O., 1975. The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 453-464.
- [54] Herbert, M. K., Kuiperij, H. B., Bloem, B. R., & Verbeek, M. M. (2013). Levels of HVA, 5-HIAA, and MHPG in the CSF of vascular parkinsonism compared to Parkinson's disease and controls. *Journal of neurology*, 260(12), 3129-3133.
- [55] Goldstein, D.S., Holmes, C., Sullivan, P., Jinsmaa, Y., Kopin, I.J., Sharabi, Y., 2016a. Elevated cerebrospinal fluid ratios of cysteinyldopamine/3,4-dihydroxyphenylacetic acid in parkinsonian synucleinopathies. *Park. Relat. Disord.* 31, 79-86.

- [56] Harvey, B. K., Richie, C. T., Hoffer, B. J., & Airavaara, M. (2011). Transgenic animal models of neurodegeneration based on human genetic studies. *Journal of neural transmission*, 118(1), 27-45.
- [57] Bello-Medina, P. C., Rodríguez-Martínez, E., Prado-Alcalá, R. A., & Rivas-Arancibia, S. (2019). Ozone pollution, oxidative stress, synaptic plasticity, and neurodegeneration. *Neurologia (Barcelona, Spain)*.
- [58] Block, M. L., & Calderón-Garcidueñas, L. (2009). Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends in neurosciences*, 32(9), 506-516.
- [59] Levesque, S., Surace, M. J., McDonald, J., & Block, M. L. (2011). Air pollution & the brain: subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*, 8 (1), 105.
- [60] Costa, L. G., Cole, T. B., Coburn, J., Chang, Y. C., Dao, K., & Roqué, P. J. (2017). Neurotoxicity of traffic-related air pollution. *Neurotoxicology*, 59, 133-139.
- [61] Croze, M. L., & Zimmer, L. (2018). Ozone atmospheric pollution and Alzheimer's disease: from epidemiological facts to molecular mechanisms. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(2), 503-522.
- [62] Rivas-Arancibia, S., Rodríguez-Martínez, E., Badillo-Ramírez, I., López-González, U., & Saniger, J. M. (2017). Structural changes of amyloid beta in hippocampus of rats exposed to ozone: A Raman spectroscopy study. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 137.
- [63] Rivas-Arancibia, S., Guevara-Guzmán, R., López-Vidal, Y., Rodríguez-Martínez, E., Zanardo-Gomes, M., Angoa-Pérez, M., & Raisman-Vozari, R. (2010). Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicological Sciences*, 113(1), 187-197.
- [64] Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martínez, C., Colin-Barenque, L., Kendrick, K. M., de la Riva, C., & Guevara-Guzmán, R. (2003). Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 74(4), 891-900.
- [65] Rivas-Arancibia, S., Zimbrón, L. F. H., Rodríguez-Martínez, E., Maldonado, P. D., Borgonio Pérez, G., & Sepúlveda-Parada, M. (2015). Oxidative stress-dependent changes in immune responses and cell death in the substantia nigra after ozone exposure in rat. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 65.
- [66] Jung, C. R., Lin, Y. T., & Hwang, B. F. (2015). Ozone, particulate matter, and newly diagnosed Alzheimer's disease: a population-based cohort study in Taiwan. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(2), 573-584.
- [67] Rivas-Arancibia, S., Hernández-Zimbrón, L. F., Rodríguez-Martínez, E., Borgonio-Pérez, G., Velumani, V., & Durán-Bedolla, J. (2013). Chronic exposure to low doses of ozone produces a state of oxidative stress and blood-brain barrier damage in the hippocampus of rat. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(11), 24.
- [68] Doty, R. L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 8(6), 329.
- [69] Pereyra-Muñoz, N., Rugerio-Vargas, C., Angoa-Pérez, M., Borgonio-Pérez, G., & Rivas-Arancibia, S. (2006). Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *Journal of chemical neuroanatomy*, 31(2), 114-123.
- [70] Moulton, P. V., & Yang, W. (2012). Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *Journal of environmental and public health*, 2012.

- [71] Liu, R., Young, M. T., Chen, J. C., Kaufman, J. D., & Chen, H. (2016). Ambient air pollution exposures and risk of Parkinson disease. *Environmental health perspectives*, 124(11), 1759-1765.
- [72] Melov, S. (2002). Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(11), 1395-1400.
- [73] Dorado-Martínez, C., Paredes-carbajal, C., Mascher, D., Borgonio-Pérez, G., & Rivas-arancibia, S. (2001). Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels, in rats. *International journal of neuroscience*, 108(3-4), 149-161.
- [74] Santiago-López, D., Bautista-Martinez, J. A., Reyes-Hernandez, C. I., Aguilar-Martinez, M., & Rivas-Arancibia, S. (2010). Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone. *Toxicology letters*, 197(3), 193-200.
- [75] Rivas-Arancibia, S., Zimbrón, L. F. H., Rodríguez-Martínez, E., Maldonado, P. D., Borgonio Pérez, G., & Sepúlveda-Parada, M. (2015). Oxidative stress-dependent changes in immune responses and cell death in the substantia nigra after ozone exposure in rat. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 65.
- [76] Reichmann, H. (2010). Clinical criteria for the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegenerative diseases*, 7(5), 284-290.
- [77] Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., & Pringsheim, T. (2016). The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, 46(4), 292-300.
- [78] Sharma, S., Moon, C. S., Khogali, A., Haidous, A., Chabenne, A., Ojo, C., & Ebadi, M. (2013). Biomarkers in Parkinson's disease (recent update). *Neurochemistry international*, 63(3), 201-229.
- [79] Ptolemy, A. S., & Rifai, N. (2010). What is a biomarker? Research investments and lack of clinical integration necessitate a review of biomarker terminology and validation schema. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 70 (sup242), 6-14.
- [80] Mollenhauer, B. (2014). Quantification of  $\alpha$ -synuclein in cerebrospinal fluid: How ideal is this biomarker for Parkinson's disease?. *Parkinsonism & related disorders*, 20, S76-S79.
- [81] Jiménez-Jiménez, F.J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., Agúndez, J.A., 2014. Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 369.
- [82] Andersen, A. D., Binzer, M., Stenager, E., & Gramsbergen, J. B. (2017). Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease—a systematic review. *Acta Neurologica Scandinavica*, 135(1), 34-56.
- [83] Delenclos, M., Jones, D. R., McLean, P. J., & Uitti, R. J. (2016). Biomarkers in Parkinson's disease: advances and strategies. *Parkinsonism & related disorders*, 22, S106-S110.
- [84] Stefani, A., Pierantozzi, M., Olivola, E., Galati, S., Cerroni, R., D'Angelo, V., & Liguori, C. (2017). Homovanillic acid in CSF of mild stage Parkinson's disease patients correlates with motor impairment. *Neurochemistry international*, 105, 58-63.
- [85] Romagnolo, A., Merola, A., Artusi, C.A., Rizzone, M.G., Zibetti, M., Lopiano, L., 2018. Levodopa-induced neuropathy: a systematic review. *Mov. Disord. Clin. Pract.* 6, 96-103.

- [86] Goldstein, D. S., Holmes, C., & Sharabi, Y. (2012). Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain*, 135(6), 1900-1913.
- [87] Christianson, C. C., Johnson, C. J., & Needham, S. R. (2013). The advantages of microflow LC-MS/MS compared with conventional HPLC-MS/MS for the analysis of methotrexate from human plasma. *Bioanalysis*, 5(11), 1387-1396.
- [88] Gussew, A., Rzanny, R., Güllmar, D., Scholle, H. C., & Reichenbach, J. R. (2011). 1H-MR spectroscopic detection of metabolic changes in pain processing brain regions in the presence of non-specific chronic low back pain. *Neuroimage*, 54(2), 1315-1323.
- [89] Singhai, P. P., & Ladhake, S. A. (2013). Brain tumor detection using marker based watershed segmentation from digital mr images. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE) ISSN*, 2278-3075.
- [90] Lazar, I. M., Trisiripisal, P., & Sarvaiya, H. A. (2006). Microfluidic liquid chromatography system for proteomic applications and biomarker screening. *Analytical chemistry*, 78(15), 5513-5524.
- [91] Frysinger, G. S., & Gaines, R. B. (2001). Separation and identification of petroleum biomarkers by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Separation Science*, 24(2), 87-96.
- [92] Yang, Z., & Wang, S. (2008). Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants. *Journal of immunological methods*, 336(2), 98-103.
- [93] Brown, M., Dunn, W. B., Dobson, P., Patel, Y., Winder, C. L., Francis-McIntyre, S. & Swainston, N. (2009). Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst*, 134(7), 1322-1332.
- [94] Hatano, T., Saiki, S., Okuzumi, A., Mohny, R. P., & Hattori, N. (2016). Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomic technologies. *J NeurolNeurosurg Psychiatry*, 87(3), 295-301.
- [95] Chalmers, J. M., Edwards, H. G., & Hargreaves, M. D. (2012). Vibrational spectroscopy techniques: basics and instrumentation. *Infrared and Raman spectroscopy in forensic science*, 2.
- [96] Lasch, P., & Kneipp, J. (2008). Biomedical vibrational spectroscopy. John Wiley & Sons.
- [97] urRehman, I., Movasaghi, Z., & Rehman, S. (2012). Vibrational spectroscopy for tissue analysis. CRC Press.
- [98] Griebel, M., Daffertshofer, M., Stroick, M., Syren, M., Ahmad-Nejad, P., Neumaier, M., ... & Fatar, M. (2007). Infrared spectroscopy: a new diagnostic tool in Alzheimer disease. *Neuroscience letters*, 420(1), 29-33.
- [99] Peuchant, E., Richard-Harston, S., Bourdel-Marchasson, I., Dartigues, J. F., Letenneur, L., Barberger-Gateau, P., ... & Daniel, J. Y. (2008). Infrared spectroscopy: a reagent-free method to distinguish Alzheimer's disease patients from normal-aging subjects. *Translational research*, 152(3), 103-112.
- [100] Schipper, H. M., Kwok, C. S., Rosendahl, S. M., Bandilla, D., Maes, O., Melmed, C & Burns, D. H. (2008). Spectroscopy of human plasma for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease.

- [101] Maiti, N. C., Apetri, M. M., Zagorski, M. G., Carey, P. R., & Anderson, V. E. (2004). Raman spectroscopic characterization of secondary structure in natively unfolded proteins:  $\alpha$ -synuclein. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(8), 2399-2408.
- [102] Flynn, J. D., McGlinchey, R. P., Walker, R. L., & Lee, J. C. (2018). Structural features of  $\alpha$ -synuclein amyloid fibrils revealed by Raman spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(3), 767-776.
- [103] Eberhardt, K., Stiebing, C., Matthäus, C., Schmitt, M., & Popp, J. (2015). Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. *Expert review of molecular diagnostics*, *15*(6), 773-787.
- [104] Pandey, P., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Prospects of nanomaterials in biosensors. *Analytical Letters*, *41*(2), 159-209.
- [105] Vo-Dinh, T., & Stokes, D. L. (2003). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for biomedical diagnostics. In *Biomedical Photonics Handbook* (pp. 1653-1692). CRC Press.
- [106] Kneipp, K., Kneipp, H., & Bohr, H. G. (2006). Single-molecule SERS spectroscopy. In *Surface-Enhanced Raman Scattering* (pp. 261-277). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [107] Huefner, A., Kuan, W. L., Barker, R. A., & Mahajan, S. (2013). Intracellular SERS nanoprobe for distinction of different neuronal cell types. *Nano letters*, *13*(6), 2463-2470.
- [108] Devitt, G., Howard, K., Mudher, A., & Mahajan, S. (2018). Raman spectroscopy: an emerging tool in neurodegenerative disease research and diagnosis. *ACS chemical neuroscience*, *9*(3), 404-420.
- [109] Chou, I. H., Benford, M., Beier, H. T., Coté, G. L., Wang, M., Jing, N., & Good, T. A. (2008). Nanofluidic biosensing for  $\beta$ -amyloid detection using surface enhanced Raman spectroscopy. *Nano letters*, *8*(6), 1729-1735.
- [110] Hao, J., Meng, X. (2017). Recent advances in SERS detection of perchlorate. *Front. Chem. Sci. Eng.* **11**, 448-464.
- [111] Ciou, S. H., Cao, Y. W., Huang, H. C., Su, D. Y., & Huang, C. L. (2009). SERS enhancement factors studies of silver nanoprisms and spherical nanoparticle colloids in the presence of bromide ions. *The Journal of Physical Chemistry C*, *113*(22), 9520-9525.
- [112] Shiohara, A., Wang, Y., & Liz-Marzán, L. M. (2014). Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *21*, 2-25.
- [113] Kneipp, K., Moskovits, M., & Kneipp, H. (Eds.). (2006). *Surface-enhanced Raman scattering: physics and applications* (Vol. 103). Springer Science & Business Media.
- [114] Cialla, D., Pollok, S., Steinbrücker, C., Weber, K., & Popp, J. (2014). SERS-based detection of biomolecules. *Nanophotonics*, *3*(6), 383-411.
- [115] McGlashen, M. L., Davis, K. L., & Morris, M. D. (1990). Surface-enhanced Raman scattering of dopamine at polymer-coated silver electrodes. *Analytical chemistry*, *62*(8), 846-849.
- [116] Tang, L., Li, S., Han, F., Liu, L., Xu, L., Ma, W., ... & Xu, C. (2015). SERS-active Au@Ag nanorod dimers for ultrasensitive dopamine detection. *Biosensors and Bioelectronics*, *71*, 7-12.

- [117] An, J.-H., El-Said, W. A., Yea, C.-H., Kim, T.-H., and Choi, J.-W. (2011) Surface-Enhanced Raman Scattering of Dopamine on Self-Assembled Gold Nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11, 4424- 4429.
- [118] Lussier, F., Brule, T., Bourque, M.-J., Ducrot, C., Trudeau, L.-E., and Masson, J.-F. (2017) Dynamic SERS nanosensor for neurotransmitter sensing near neurons. *Faraday Discuss.* 205: 387–407.
- [119] Yoo, J. M. (2020). Introduction of Graphene-Based Nanomaterials. In *Studies on Graphene-Based Nanomaterials for Biomedical Applications* (pp. 1-13). Springer, Singapore.
- [120] Bonanni, A., Loo, A. H., & Pumera, M. (2012). Graphene for impedimetric biosensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 12-21.
- [121] Chung, C., Kim, Y. K., Shin, D., Ryoo, S. R., Hong, B. H., & Min, D. H. (2013). Biomedical applications of graphene and graphene oxide. *Accounts of chemical research*, 46(10), 2211-2224.
- [122] Dimiev, A. M., & Eigler, S. (Eds.). (2016). *Graphene oxide: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons.
- [123] Kula, T., Bose, S., Khanra, P., Mishra, A. K., Kim, N. H., & Lee, J. H. (2011). Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosensors and bioelectronics*, 26(12), 4637-4648.
- [124] Huang, H., Li, P., Zhang, M., Yu, Y., Huang, Y., Gu, H. & Yang, Y. (2017). Graphene quantum dots for detecting monomeric amyloid peptides. *Nanoscale*, 9(16), 5044-5048.
- [125] Chae, M. S., Kim, J., Jeong, D., Kim, Y., Roh, J. H., Lee, S. M., & Kim, T. G. (2017). Enhancing surface functionality of reduced graphene oxide biosensors by oxygen plasma treatment for Alzheimer's disease diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 610-617.
- [126] Yue, H. Y., Huang, S., Chang, J., Heo, C., Yao, F., Adhikari, S. & Li, B. (2014). ZnO nanowire arrays on 3D hierarchical graphene foam: biomarker detection of Parkinson's disease. *ACS nano*, 8(2), 1639-1646.
- [127] Fan, K. L., Guo, Z. K., Geng, Z. G., Ge, J., Jiang, S. L., Hu, J. H., & Zhang, Q. (2013). How graphene oxide quenches fluorescence of rhodamine 6G. *Chinese Journal of Chemical Physics*, 26(3), 252-258.
- [128] Huang, S., Ling, X., Liang, L., Song, Y., Fang, W., Zhang, J., & Dresselhaus, M. S. (2015). Molecular selectivity of graphene-enhanced Raman scattering. *Nano letters*, 15(5), 2892-2901.
- [129] Zhang, N., Tong, L., & Zhang, J. (2016). Graphene-based enhanced Raman scattering toward analytical applications. *Chemistry of Materials*, 28(18), 6426-6435.
- [130] Feng, S., dos Santos, M. C., Carvalho, B. R., Lv, R., Li, Q., Fujisawa, K., & Pan, M. (2016). Ultrasensitive molecular sensor using N-doped graphene through enhanced Raman scattering. *Science advances*, 2(7), e1600322.
- [131] Chioccare, F., & Novellino, E. (1986). A convenient one step synthesis of 5-cystein-S-yl-dopa using ceric ammonium nitrate. *Synthetic Communications*, 16(8), 967-971.
- [132] Zhang, F., & Dryhurst, G. (1994). Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: new reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *Journal of medicinal chemistry*, 37(8), 1084-1098.

- [133] Whiting, M. J. (2009). Simultaneous measurement of urinary metanephrines and catecholamines by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Annals of clinical biochemistry*, 46(2), 129-136.
- [134] Bicker, J., Fortuna, A., Alves, G., & Falcao, A. (2013). Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples—a review. *Analytica chimica acta*, 768, 12-34.
- [135] Comisión de control analítico y ampliación de cobertura (CCAYAC). 2017. CCAYAC-CR-03/1: Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/194517/CCAYAC-CR03.pdf> (Consultado el 16 de junio de 2019).
- [136] Talwar, D., Williamson, C., McLaughlin, A., Gill, A., & O'Reilly, D. S. J. (2002). Extraction and separation of urinary catecholamines as their diphenyl boronate complexes using C18 solid-phase extraction sorbent and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 769(2), 341-349.
- [137] Côté, L. (2015). Determination of Urinary Catecholamines and Metanephrines in a single run. Agilent Technologies methods. (<https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/Determination%20of%20Urinary%20Catecholamines%20and%20Metanephrines%20in%20a%20Single%20Run.pdf> ).
- [138] Brandsteterova, E., Kubalec, P., Krajník, K., & Skacani, I. (1996). SPE-HPLC determination of catecholamines using an affinity principle. *Neoplasma*, 43(2), 107-112.
- [139] Lee, P. C., & Meisel, D. (1982). Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391-3395.
- [139] Yang, Y., Kim, S., & Chae, J. (2011). Separating and detecting Escherichia coli in a microfluidic channel for urinary tract infection applications. *Journal of microelectromechanical systems*, 20(4), 819-827.
- [140] Chauhan, N., & Pundir, C. S. (2011). An amperometric uric acid biosensor based on multiwalled carbon nanotube-gold nanoparticle composite. *Analytical biochemistry*, 413(2), 97-103.
- [141] Tamano, H., Nishio, R., Shakushi, Y., Sasaki, M., Osawa, M., & Takeda, A. (2017). In vitro and in vivo physiology of low nanomolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> in artificial cerebrospinal fluid. *Scientific reports*, 7(1), 1-7.
- [142] Zhang, Z., Chen, H., Xing, C., Guo, M., Xu, F., Wang, X., ... & Tang, J. (2011). Sodium citrate: a universal reducing agent for reduction/decoration of graphene oxide with Au nanoparticles. *Nano Research*, 4(6), 599-611.
- [143] Badillo-Ramírez, I., Landeros-Rivera, B., de la O-Cuevas, E., Vargas, R., Garza, J., & Saniger, J. M. (2019). Interaction of 5-S-cysteinyl-dopamine with graphene oxide: an experimental and theoretical study for the detection of a Parkinson's disease biomarker. *New Journal of Chemistry*, 43(40), 15861-15870.
- [144] Zhang, F., Dryhurst, G., 1995b. Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 398, 117-128.

- [145] Ratzer, C., Küpper, J., Spangenberg, D., & Schmitt, M. (2002). The structure of phenol in the S1-state determined by high resolution UV-spectroscopy. *Chemical Physics*, 283(1-2), 153-169.
- [146] Shen, X.-M., Dryhurst, G., 1996. Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's Disease. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 751-763.
- [147] Van Wart, H. E., & Scheraga, H. A. (1976). Raman spectra of cystine-related disulfides. Effect of rotational isomerism about carbon-sulfur bonds on sulfur-sulfur stretching frequencies. *The Journal of Physical Chemistry*, 80(16), 1812-1823.
- [148] Muzzi, C., Bertocci, E., Terzuoli, L., Porcelli, B., Ciari, I., Pagani, R., & Guerranti, R. (2008). Simultaneous determination of serum concentrations of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and  $\alpha$ -methyldopa by HPLC. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 62(4), 253-258.
- [149] Bentivoglio, M., & Morelli, M. (2005). Chapter I The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In *Handbook of chemical neuroanatomy* (Vol. 21, pp. 1-107). Elsevier.
- [150] Winner, B. M., Zhang, H., Farthing, M. M., Karchalla, L. M., Lookingland, K. J., & Goudreau, J. L. (2017). Metabolism of dopamine in nucleus accumbens astrocytes is preserved in aged mice exposed to MPTP. *Frontiers in aging neuroscience*, 9, 410.
- [151] Scatton, B., Rouquier, L., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1982). Dopamine deficiency in the cerebral cortex in Parkinson disease. *Neurology*, 32(9), 1039-1039.
- [152] Korf, J., van Praag, H. M., Schut, D., Nienhuis, R. J., & Lakke, J. P. (1974). Parkinson's disease and amine metabolites in cerebrospinal fluid: implications for L-Dopa therapy. *European neurology*, 12(5-6), 340-350
- [153] Roth, R. H., Murrin, L. C., & Walters, J. R. (1976). Central dopaminergic neurons: effects of alterations in impulse flow on the accumulation of dihydroxyphenylacetic acid. *European Journal of Pharmacology*, 36(1), 163-171.
- [154] Baier, M., Kandlbinder, A., Gollack, D., & DIETZ, K. J. (2005). Oxidative stress and ozone: perception, signalling and response. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1012-1020.
- [155] Spencer, J.P.E., Whiteman, M., Jenner, P., Halliwell, B., (2002). S-S-cysteinyl-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J. Neurochem.* 81, 122-129.
- [156] Drechsel, D. A., & Patel, M. (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(11), 1873-1886.
- [157] Khoo, T. K., Yarnall, A. J., Duncan, G. W., Coleman, S., O'Brien, J. T., Brooks, D. J., ... & Burn, D. J. (2013). The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology*, 80(3), 276-281.
- [158] Kowalchuk, W. K., Davis, K. L., & Morris, M. D. (1995). Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of iron-dopamine complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(1), 145-151.

- [159] Pande, S., Jana, S., Sinha, A. K., Sarkar, S., Basu, M., Pradhan, M., & Pal, T. (2009). Dopamine molecules on Au@Ag shell bimetallic nanocolloids: Fourier transform infrared, Raman, and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy study aided by density functional theory. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(17), 6989-7002.
- [160] Ciubuc, J. D., Bennet, K. E., Qiu, C., Alonzo, M., Durrer, W. G., & Manciu, F. S. (2017). Raman computational and experimental studies of dopamine detection. *Biosensors*, 7(4), 43.
- [161] Cabalo, J., Guicheteau, J. A., & Christesen, S. (2013). Toward understanding the influence of intermolecular interactions and molecular orientation on the chemical enhancement of SERS. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(37), 9028-9038.
- [162] Kvítek, L., Pucek, R., Panáček, A., Novotný, R., Hrbáč, J., & Zbořil, R. (2005). The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 15(10), 1099-1105.
- [163] Kneipp, K., Wang, Y., Dasari, R. R., & Feld, M. S. (1995). Near-infrared surface-enhanced Raman scattering (NIR-SERS) of neurotransmitters in colloidal silver solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 51(3), 481-487.
- [164] Michota, A., Kudelski, A., & Bukowska, J. (2001). Influence of electrolytes on the structure of cysteamine monolayer on silver studied by surface-enhanced Raman scattering. *Journal of Raman Spectroscopy*, 32(5), 345-350.
- [165] Pawlukojć, A., Leciejewicz, J., Ramirez-Cuesta, A. J., & Nowicka-Scheibe, J. (2005). L-cysteine: neutron spectroscopy, Raman, IR and ab initio study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(11-12), 2474-2481.
- [166] Diaz Fleming, G., Finnerty, J. J., Campos-Vallette, M., Célis, F., Aliaga, A. E., Fredes, C., & Koch, R. (2009). Experimental and theoretical Raman and surface-enhanced Raman scattering study of cysteine. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 40(6), 632-638.
- [167] Chen, T., Wang, H., Chen, G., Wang, Y., Feng, Y., Teo, W. S., ... & Chen, H. (2010). Hotspot-induced transformation of surface-enhanced Raman scattering fingerprints. *Acs Nano*, 4(6), 3087-3094.
- [168] Chan, M. Y., Leng, W., & Vikesland, P. J. (2018). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Characterization of Salt-Induced Aggregation of Gold Nanoparticles. *ChemPhysChem*, 19(1), 24-28.
- [169] Šileikaitė, A., Prosyčėvas, I., Puišo, J., Juraitis, A., & Guobienė, A. (2006). Analysis of silver nanoparticles produced by chemical reduction of silver salt solution. *Mater. Sci*, 12(4), 1392-1320.
- [170] Huang, Y., & Wu, G. (1989). Force constants and bond polarizabilities of thiocyanate ion adsorbed on the silver electrode as interpreted from the surface enhanced Raman scattering. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 45(2), 123-128.
- [171] Lian, B., De Luca, S., You, Y., Alwarappan, S., Yoshimura, M., Sahajwalla, V., ... & Joshi, R. K. (2018). Extraordinary water adsorption characteristics of graphene oxide. *Chemical science*, 9(22), 5106-5111.

[172] Ren, H., Kulkarni, D. D., Kodyath, R., Xu, W., Choi, I., & Tsukruk, V. V. (2014). Competitive adsorption of dopamine and rhodamine 6G on the surface of graphene oxide. *ACS applied materials & interfaces*, 6(4), 2459-2470.

## 7. ANEXOS

---

**ANEXO 1. Artículo de Revisión:** “5-S-cysteinyl-dopamine a neurotoxic endogenous metabolite of dopamine: Implications for Parkinson's disease. Badillo-Ramírez, I., Saniger, J. M., & Rivas-Arancibia, S. (2019). *Neurochemistry International*, 104514.”

**ANEXO 2. Artículo experimental:** “Interaction of 5-S-cysteinyl-dopamine with graphene oxide: an experimental and theoretical study for the detection of a Parkinson's disease biomarker. Badillo-Ramírez, I., Landeros-Rivera, B., de la O-Cuevas, E., Vargas, R., Garza, J., & Saniger, J. M. (2019), *New Journal of Chemistry*, 43(40), 15861-15870.”

**ANEXO 3. Artículo en proceso de publicación:** “SERS-based detection of 5-S-Cysteinyl-dopamine as a novel biomarker of Parkinson's disease in complex artificial biofluids. Badillo-Ramírez I, Mühlhig A, Saniger J.M, Cialla-May D and Popp J. *Analytical Chemistry*, 2019 [in process]”.

ANEXO 4. Datos de recuperación y recobro de metabolitos en método HPLC-MS

ANEXO 5. Valores estadísticos, one-way ANOVA, con prueba Kruskal-Wallis, de las concentraciones de los metabolitos en sustancia nigra y estriado del modelo animal de ozono.

## ANEXO 4. Datos de recuperación y recobro de metabolitos en método HPLC-MS

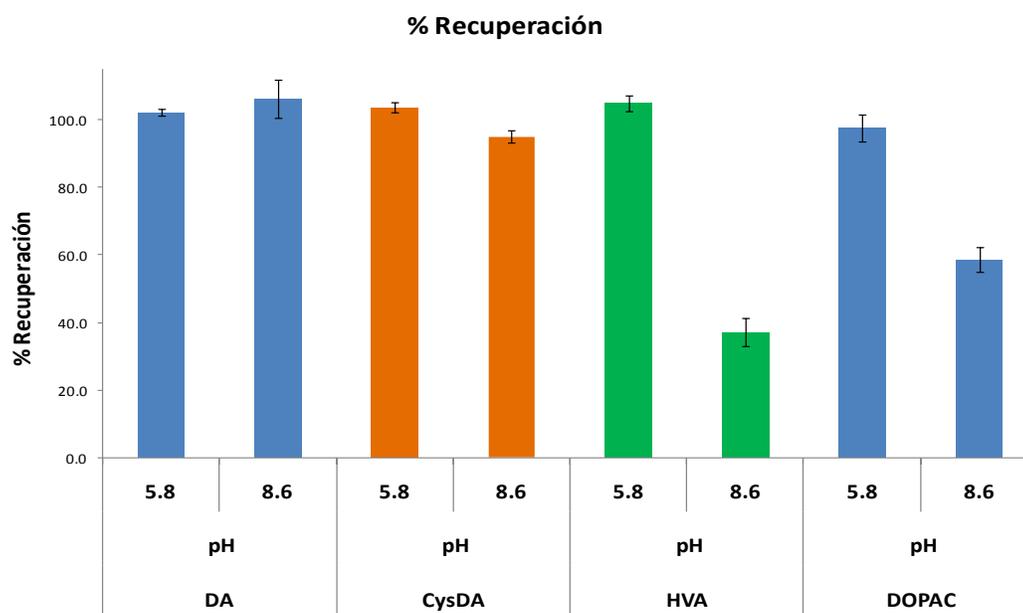
1. Calcular área relativa: Área analito eluido/Área de est. Interno eluido (AMDOPA)



2. Calcular conc. del analito eluido: ecuación de la recta de la curva de calibración \* la conc. del est. interno



3. Calcular % de recuperación: (Conc. del analito de partida/Conc. del analito eluido)\* 100%



**Figura 1.** Procedimiento del cálculo del porcentaje de recuperación de los metabolitos en el método HPLC-MS implementado. Se grafican los valores de varias repeticiones empleando dos valores de pH del buffer de fosfatos (pH 5.8 y 8.6) en el que la mezcla de metabolitos fue agregada al cartucho de extracción en fase sólida. Los metabolitos DA y 5-S-CysDA son recuperados con muy buena eficiencia en ambos valores de pH, en tanto HVA y DOPAC presentan una mejor eficiencia de recuperación a pH 5.8. Estos valores sugieren que mantener los metabolitos en el buffer de partida a pH 5.8 facilita su detección y cuantificación íntegra en el método HPLC-MS.

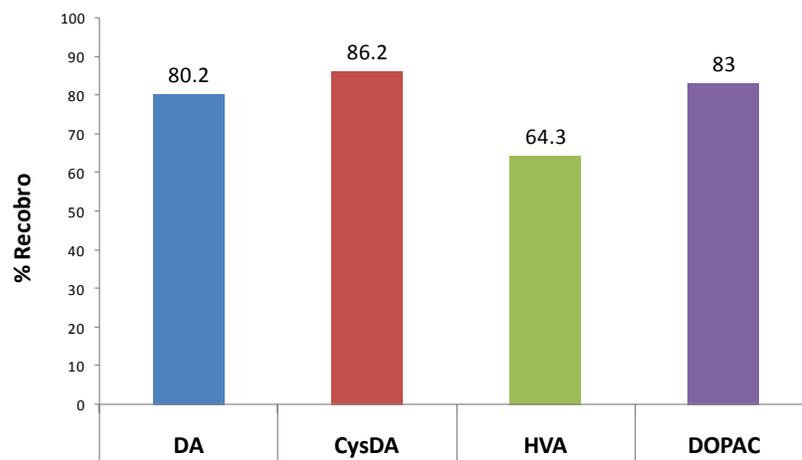
1. Homogeneizar cerebello + adicionar conc. conocida de mezcla de analitos (DA, HVA, DOPAC, CysDA)



2. Matriz compleja  
Cargar, lavar y eluir en cartucho SPE (condiciones optimizadas) → HPLC-Masas



3. Calcular% de recobro:  
(Calcular conc. Del analito eluido/Conc. Calculada del analito estándar)\*100%



**Figura 2.** Procedimiento del método y cálculo del porcentaje de recobro de los metabolitos en una mezcla compleja mediante el método HPLC-MS implementado. Se empleó tejido de cerebello, en el cual fueron adicionadas las mezclas de los metabolitos a concentración conocida. Los valores obtenidos se encuentran en los rangos de valores confiables (60-120%), para una concentración de  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ , de acuerdo a los criterios establecidos en CCAYAC, 2017 [73].

ANEXO 5. Valores estadísticos, one-way ANOVA, con prueba Kruskal-Wallis, de las concentraciones de los metabolitos en sustancia nigra y estriado del modelo animal de ozono

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	7.444	No	ns			
CTRL vs. 15	14.78	No	ns			
CTRL vs. 30	23.78	Yes	**			
CTRL vs. 60	35.33	Yes	****			
CTRL vs. 90	41.67	Yes	****			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	324.1	228.9	166.3	143.2	28.87	17.7
25% Percentile	434.3	246.1	174.5	148.5	48.69	24.46
Median	741.7	445.1	300.5	161.6	99.66	43.5
75% Percentile	757.3	469.4	352	210.4	108.7	54.61
Maximum	792.5	481.7	356.7	230.4	111.1	55.93
Mean	623.1	386.2	276.1	175.4	83.94	40.46
Std. Deviation	179	110.3	81.43	33.12	32.9	14.69
Std. Error of Mean	59.68	36.77	27.14	11.04	10.97	4.897

**DOPAMINA EN SN**

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	0	No	ns			
CTRL vs. 15	-15.5	No	ns			
CTRL vs. 30	-20.61	Yes	*			
CTRL vs. 60	-33.61	Yes	****			
CTRL vs. 90	-38.28	Yes	****			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	0	0	42.98	50.58	83.61	84.47
25% Percentile	0	0	43.17	52.39	84.89	90.93
Median	0	0	43.55	54.67	88.87	96.49
75% Percentile	0	0	69.99	80.51	94.01	98.69
Maximum	0	0	77.32	84.06	101.7	103.5
Mean	0	0	53.04	62.69	89.99	95.07
Std. Deviation	0	0	14.91	14.38	5.881	5.7
Std. Error of Mean	0	0	4.968	4.794	1.96	1.9

**5-S-CysDA EN SN**

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	6.889	No	ns			
CTRL vs. 15	14.33	No	ns			
CTRL vs. 30	23.89	Yes	**			
CTRL vs. 60	35.56	Yes	****			
CTRL vs. 90	41	Yes	****			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	42.51	23.43	16.99	9.565	4.499	2.622
25% Percentile	45.26	29.44	20.57	12.56	4.602	3.135
Median	126.1	71.88	36.73	13.91	6.965	4.413
75% Percentile	136.1	75.87	43.29	20.14	7.753	6.31
Maximum	152.1	76.73	45.01	25.03	7.825	6.531
Mean	102.9	57.76	33.49	15.89	6.368	4.735
Std. Deviation	45.04	23.16	11.11	5.156	1.525	1.565
Std. Error of Mean	15.01	7.721	3.703	1.719	0.5085	0.5217

**HVA EN SN**

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	3.556	No	ns			
CTRL vs. 15	7.778	No	ns			
CTRL vs. 30	14.67	No	ns			
CTRL vs. 60	32.44	Yes	****			
CTRL vs. 90	33.22	Yes	****			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	40.84	39.84	37	27.43	1.904	0
25% Percentile	52.23	44.11	39.48	31.37	2.695	0
Median	70.96	48.86	44.9	34.48	17.79	9.061
75% Percentile	188.9	170.4	122.5	90.44	24.16	28.23
Maximum	199.9	179	130.2	97.92	28.83	34.31
Mean	104.1	88.82	69.29	52.4	15.43	13.28
Std. Deviation	67.63	63.5	42	30.58	10.44	13.64
Std. Error of Mean	22.54	21.17	14	10.19	3.48	4.548

**DOPAMINA EN ESTRIADO**

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	-11.33	No	ns			
CTRL vs. 15	-25.78	Yes	**			
CTRL vs. 30	-32.11	Yes	****			
CTRL vs. 60	-14.78	No	ns			
CTRL vs. 90	-37.67	Yes	****			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	0	41.53	54.53	62.67	44.15	67.64
25% Percentile	0	45.19	56.03	65.52	47.07	72.84
Median	41.54	50.03	61.62	68.63	54.63	79.91
75% Percentile	46.27	59.75	83.12	88.47	66	89.36
Maximum	50.72	71.3	90.29	104.2	70.53	99.08
Mean	30.16	52.72	68.16	75.85	56.09	81.54
Std. Deviation	22.79	9.522	13.98	14.65	9.697	10.25
Std. Error of Mean	7.596	3.174	4.661	4.882	3.232	3.417

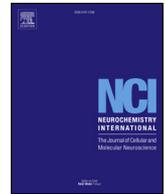
**5-S-CysDA EN ESTRIADO**

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	9	No	ns			
CTRL vs. 15	9.667	No	ns			
CTRL vs. 30	12.44	No	ns			
CTRL vs. 60	18.89	No	ns			
CTRL vs. 90	19	No	ns			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	6.388	0	1.923	1.51	0	0
25% Percentile	16.07	5.647	2.695	1.91	0	0
Median	95.38	48.29	49.07	46.69	22.61	17.44
75% Percentile	101.4	88.2	83.82	72.78	49.07	63.15
Maximum	111.1	100.1	88.18	83.86	60.22	64.98
Mean	68.48	48.4	45.29	41.38	24.94	27.09
Std. Deviation	43.24	41.24	35.99	32.8	23.21	28.54
Std. Error of Mean	14.41	13.75	12	10.93	7.737	9.514

**HVA EN ESTRIADO**

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary			
CTRL vs. 7	10.56	No	ns			
CTRL vs. 15	19.89	Yes	*			
CTRL vs. 30	26.33	Yes	**			
CTRL vs. 60	35.56	Yes	****			
CTRL vs. 90	42.67	Yes	****			
Number of values	9	9	9	9	9	9
Minimum	180.6	147.6	67.09	26.79	0	0
25% Percentile	182.1	159.5	76.63	37.17	0	0
Median	187.3	167.1	124.9	77.44	26.88	0
75% Percentile	225.3	172.3	166.4	131.6	78.01	10.57
Maximum	228.3	174.8	170	132.4	85.7	18.44
Mean	199.2	164.9	121.8	80.93	33.83	4.398
Std. Deviation	21.07	8.607	41.09	42.78	36.91	6.979
Std. Error of Mean	7.024	2.869	13.7	14.26	12.3	2.326

**DOPAC EN ESTRIADO**



## 5-S-cysteinyl-dopamine, a neurotoxic endogenous metabolite of dopamine: Implications for Parkinson's disease

Isidro Badillo-Ramírez<sup>a,b</sup>, José M. Saniger<sup>b,\*\*</sup>, Selva Rivas-Arancibia<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito externo S/N, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito externo S/N, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

5-S-Cysteinyl-dopamine  
Thio-catecholamines  
Parkinson's disease  
Dopamine oxidation  
Endogenous metabolite  
Neurodegeneration

### ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide and is characterized for being an idiopathic and multifactorial disease. Extensive research has been conducted to explain the origin of the disease, but it still remains elusive. It is well known that dopamine oxidation, through the endogenous formation of toxic metabolites, is a key process in the activation of a cascade of molecular events that leads to cellular death in the hallmark of PD. Thio-catecholamines, such as 5-S-cysteinyl-dopamine, 5-S-glutathionyl-dopamine and derived benzothiazines, are endogenous metabolites formed in the dopamine oxidative degradation pathway. Those metabolites have been shown to be highly toxic to neurons in the substantia nigra pars compacta, activating molecular mechanisms that ultimately lead to neuronal death. In this review we describe the origin, formation and the toxic effects of 5-S-cysteinyl-dopamine and its oxidative derivatives that cause death to dopaminergic neurons. Furthermore, we correlate the formation of those metabolites with the neurodegeneration progress in PD. In addition, we present the reported neuroprotective strategies of products that protect against the cellular damage of those thio-catecholamines. Finally, we discuss the advantages in the use of 5-S-cysteinyl-dopamine as a potential biomarker for PD.

### 1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease with the highest incidence worldwide in adults over 85 years old (Pringsheim et al., 2014; Hirsch et al., 2016). PD is characterized by motor and non-motor symptoms. Motor symptoms include postural instability, muscular rigidity, bradykinesia and resting tremor, while non-motor symptoms are characterized by cognitive and autonomic alterations (Titova et al., 2017; Schapira et al., 2017).

The pathology of PD is characterized by specific death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Neural loss is most likely due to the induced damage of the Lewy bodies, which are formed from the insoluble nucleation of misfolded alpha-synuclein (a-syn) protein in addition to the mitochondrial dysfunction (Goedert et al., 2013; Villar-Pique et al., 2016; Chen et al., 2019). The mitochondrial alteration is characterized by ATP depletion. This disrupts the storage of dopamine in vesicles, contributing to cytoplasmic formation of oxidized dopamine metabolites (Bisaglia et al., 2007; Bhattacharjee and Borah, 2016; Lotharius and Brundin, 2002a,b; Stokes

et al., 1999). Oxidized dopamine products, such as dopamine quinones (DA-Q), mediate neuromelanin formation. However, they can also induce dopaminergic neuronal damage, which initiates key molecular mechanisms in PD. Recent studies conducted with dopaminergic neurons from PD patients demonstrated that mitochondrial oxidative stress leads to dopamine oxidized accumulation (Burbulla et al., 2017; Mor et al., 2017). As seen in these studies, oxidized dopamine initiates a time-dependent cascade, inducing glucocerebrosidase enzymatic depletion, lysosomal dysfunction and increased misfolding aggregation of a-syn. These findings support that dopamine oxidation is a key factor that increases neural damage in the SNpc.

The oxidative metabolism of dopamine leads to the formation of dopamine quinone metabolites, such as the 3,4-dopamine-o-quinone, aminochrome and 5,6-indolequinone. Extensive research of these metabolites in cellular and animal models has revealed a specific neurotoxicity to dopaminergic neurons (Hastings et al., 1996; Goldstein et al., 2014; Bisaglia et al., 2007; 2010; Muñoz et al., 2012; Monzani et al., 2019). However, not all the oxidation of dopamine leads to the formation of the aforementioned dopamine quinone metabolites; the thio-

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jose.saniger@icat.unam.mx](mailto:jose.saniger@icat.unam.mx) (J.M. Saniger), [srivas@unam.mx](mailto:srivas@unam.mx) (S. Rivas-Arancibia).

catecholamines, which are characterized by a sulfur atom in their molecular structure, are also formed through the dopamine oxidative degradation pathway. Common thio-catecholamines include the 5-S-glutathionyl-dopamine (5-S-GSH-DA) and 5-S-cysteinyldopamine (5-S-Cys-DA) conjugates (Tse et al., 1976; Graham, 1978; Ito and Fujita, 1982). Several studies have confirmed the neurotoxicity of 5-S-Cys-DA along with its benzothiazines. However, the susceptibility and progression of neural dysfunction that is induced by those thio-catecholamines in PD are not well understood. In this review, we first present the endogenous route formation of 5-S-GSH-DA and 5-S-Cys-DA with its benzothiazines. Then we describe their neurotoxic damage related to the activation of characteristic molecular mechanisms found in PD. In addition, we present the reported neuroprotective strategies against the 5-S-Cys-DA toxicity. Finally, we discuss the advantage of using 5-S-Cys-DA as a potential biomarker in the diagnosis of Parkinson's disease.

## 2. Oxidative metabolism of dopamine: dopamine quinone and thio-catecholamine formation

Dopamine (DA) is synthesized in the dopaminergic neuron by the enzymatic action of tyrosine hydroxylase (TH) and aromatic amino acid decarboxylase (AADC). The amino acid tyrosine is hydroxylated by TH to form L-DOPA, which is further decarboxylated by AADC in the final formation of dopamine. (See Fig. 1. Reaction 1) (Meiser et al., 2013; Daubner et al., 2011). Immediately after the synthesis, the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT-2) internalizes DA inside the vesicle through an active transport mechanism (Vergo et al., 2007). The vesicle, which has an internal acidic pH, stabilizes and stores DA; then DA is transported and released into the synapse. After the release, dopamine transporters (DAT) in the nigrostriatal terminal, reuptake DA from the synaptic cleft into the neuron. Nevertheless, perturbations in both the storage and reuptake of DA, such as the presence of pesticides and

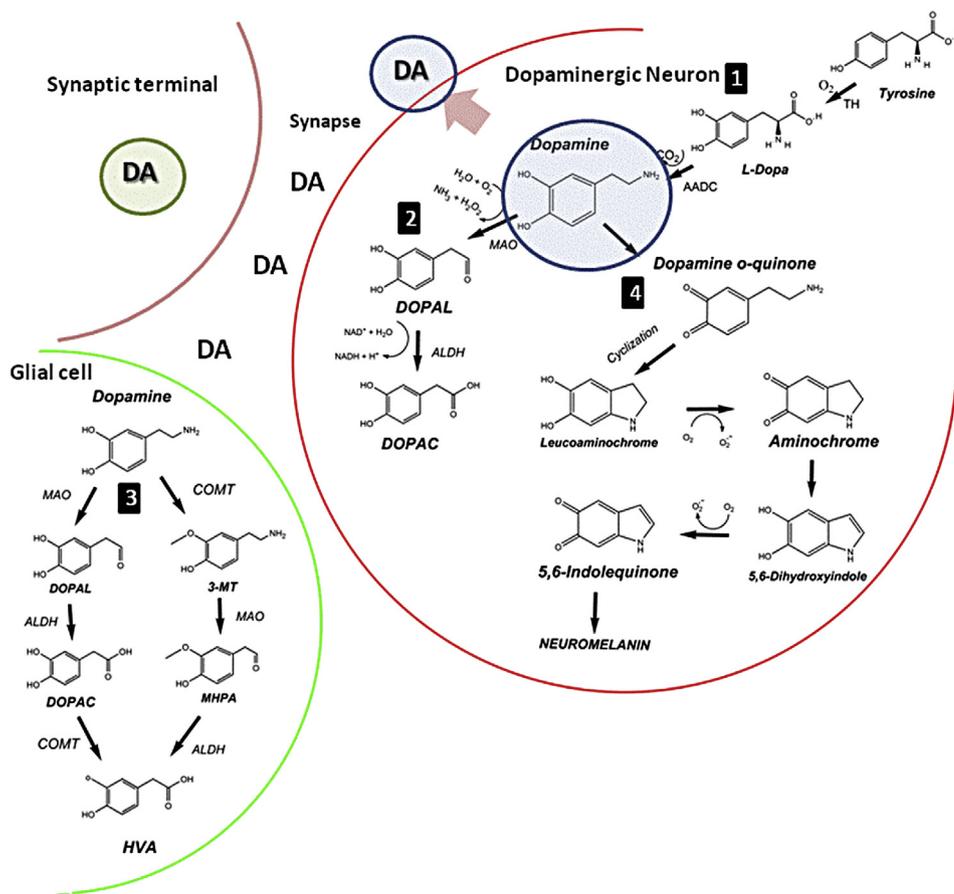
misfolded proteins, facilitates its cytoplasmic accumulation and further degradation (Mulvihill, 2019; Lotharius and Brundin, 2002a,b; Chedik et al., 2017). Free cytoplasmic DA is rapidly degraded through the enzymatic or oxidative pathway.

### 2.1. Enzymatic degradation of DA

DA degradation can take place in the dopaminergic neuron or in the surrounded glial cells, depending on where DA uptake occurs after the release. DA degradation inside the neuron is mediated by the enzymes monoamine oxidase (MAO) and aldehyde dehydrogenase (ALDH). MAO catalyzes the formation of DA into the intermediate product 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL), which is further oxidized by ALDH to form 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). Alternatively, DA degradation by glial cells leads to the formation of homovanillic acid (HVA) by two pathways: 1) MAO and ALDH convert DA into DOPAC, following the aforementioned enzymatic pathway, then DOPAC is converted into HVA by the enzyme catechol-o-methyltransferase (COMT); and 2) DA is metabolized into 3-methoxytyramine (3-MT) and 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetaldehyde (MHPA) by COMT and MAO, respectively; then ALDH converts MHPA into HVA. DOPAC and HVA are the main final metabolites in the DA enzymatic degradation (Eisenhofer et al., 2004; Yu et al., 2016; Myöhänen et al., 2010). (See Fig. 1. Reactions 2 and 3).

### 2.2. Oxidative degradation of DA

The oxidative DA pathway starts with the pH change from the synaptic vesicle (pH 5.4) to the cytoplasm (pH 7.4) and in the presence of molecular oxygen conditions, leading to the spontaneous oxidation of dopamine (Herlinger et al., 1995; Linert et al., 1996). Moreover, DA oxidation is catalyzed by the presence of metallic ions such as iron (III),



**Fig. 1.** Synthesis and metabolism of dopamine. Reaction 1. Enzymatic synthesis of DA, vesicular storage and release into the synapse. Reaction 2. Enzymatic degradation of DA inside the neuron to form DOPAL and finally DOPAC. Reaction 3. Enzymatic degradation of DA in glial cell to form HVA. Reaction 4. Oxidative degradation of DA through the formation of dopamine o-quinone, aminochrome, 5,6-indolequinone and neuromelanin. (Abbreviations: Aromatic amino acid decarboxylase (AADC); aldehyde dehydrogenase (ALDH); catechol-o-methyltransferase (COMT); monoamine oxidase (MAO); 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde (DOPAL); 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC); homovanillic acid (HVA); 3-methoxytyramine (3-MT); 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetaldehyde (MHPA) and tyrosine hydroxylase (TH)).

copper (II) and manganese (III), as well as by the action of enzymes, such as xanthine oxidase (XO), cytochrome P450 (CYP450), prostaglandin H synthase (PGHS) and lactoperoxidase (LPO) (Sun et al., 2018; Pham and Waite, 2014; Sulzer and Zecca, 2000; Muñoz et al., 2012). The first step in the DA oxidation pathway leads to the formation of the intermediate 3,4-dopamine-o-quinone, which is prone to intramolecular cyclization in the formation of aminochrome. The aminochrome product can be further oxidized to form 5,6-indolequinone (See Fig. 1. Reaction 4). Under physiological conditions, the aforementioned metabolites take part in the formation of neuromelanin, which is the final product in the DA oxidative pathway. The metabolites aminochrome and 5,6-indolequinone have been studied extensively in several *in vitro* and *in vivo* models, demonstrating their severe toxicity to dopaminergic neurons. This toxicity is thought to be the cause of many parkinsonian symptoms, as discussed by several researchers (Asanuma et al., 2004; Solano et al., 1999; Sulzer and Zecca, 2000; Yoshimoto et al., 2005; Goldstein et al., 2014). Such evidences indicate that the excessive production of dopamine quinones is related to the disruption of neuromelanin formation, and is partly responsible for the increase in the concentration of oxidized DA metabolites (Monzani et al., 2019).

### 2.3. Formation of 5-S-glutathionyl-dopamine and 5-S-cysteinyl-dopamine

The dopamine-o-quinone (DA-o-Q), the first product in the oxidative pathway of DA, is an electron deficient intermediate. It easily reacts with rich electron molecules, such as those containing a sulfur atom. The amino acid l-cysteine (l-cys) and the reduced glutathione (GSH) tripeptide are sulfur-containing molecules of high concentration in the brain (Zeevalk et al., 2008; Dringen, 2000). In the presence of l-cys, the aromatic ring of DA-o-Q reacts covalently with the sulfhydryl group of l-cys, resulting in the formation of three isomers: 2-S-cysteinyl-dopamine (2-S-Cys-DA), 5-S-cysteinyl-dopamine (5-S-Cys-DA) and 2,5-S-cysteinyl-dopamine (2,5-S-Cys-DA), where 5-S-Cys-DA is the most abundant (Jameson et al., 2004; Zhang and Dryhurst, 1994). The reaction between DA-o-Q and GSH leads to the formation of the 5-S-glutathionyl-dopamine (5-S-GSH-DA) conjugate, as the main product (Bisaglia et al., 2010) (See Fig. 2. Reaction 1). However, experimental studies have shown that 5-S-GSH-DA is rapidly catabolized by the enzymes gamma-glutamyl transferase (GGT) and dipeptidases, resulting in the formation of 5-S-Cys-DA (Allen et al., 2013; Dickinson and Forman, 2002). Furthermore, several studies have reported the increased activity of GGT in brain samples of PD patients, which might support its critical role in the conversion of 5-S-GSH-DA into 5-S-Cys-DA (Dagnino-Subiabre et al., 2000; Shen et al., 1996; Sagara et al., 1993).

### 2.4. Formation of benzothiazines of 5-S-cysteinyl-dopamine

The 5-S-Cys-DA conjugate is a molecule that is prone to fast oxidation into secondary products when exposed to superoxide anion ( $O_2^{\cdot -}$ ), metallic ions, and other oxidants. The oxidative pathway of 5-S-Cys-DA leads to the formation of an intermediate quinone of 5-S-cysteinyl-dopamine o-quinone (5-S-Cys-DA-o-Q), which is quickly converted into the bicyclic o-quinone imine through a condensation reaction. The aforementioned product is then reduced by a second molecule of 5-S-Cys-DA, resulting in the formation of the benzothiazine 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1). (Shen et al., 1997; Zhang and Dryhurst, 1995a; Shen and Dryhurst, 1996). (See Fig. 2, Reaction 2). Nevertheless, *in vitro* studies have shown that DHBT-1 is able to enter into further oxidative pathways, leading to the formation of oxidized benzothiazines, such as the 7-(2-aminoethyl)-5-hydroxy-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (BT-1) and 7-(2-aminoethyl)-5-hydroxy-1,4-benzothiazine (BT-2). However, both BT-1 and BT-2 are prone to further oxidation under a high oxidative environment to form derivative products (Shen et al., 1997; Zhang and Dryhurst, 1995b). (See Fig. 2, Reaction 3).

More recently, an alternative reaction of 5-S-Cys-DA with hypochlorite ( $OCl^-$ ) was described. Hypochlorite, which is formed in the reaction of chlorine ( $Cl_2$ ) with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and catalyzed by myeloperoxidases, reacts with 5-S-Cys-DA to form the conjugate hypochlorite-oxidized cysteinyl-dopamine (HOCD). The *in vitro* formation of HOCD increases the concentration of reactive oxygen species, yielding oxidative stress and severe toxic damage to dopaminergic neurons (Mehta et al., 2016) (See Fig. 2. Reaction 4).

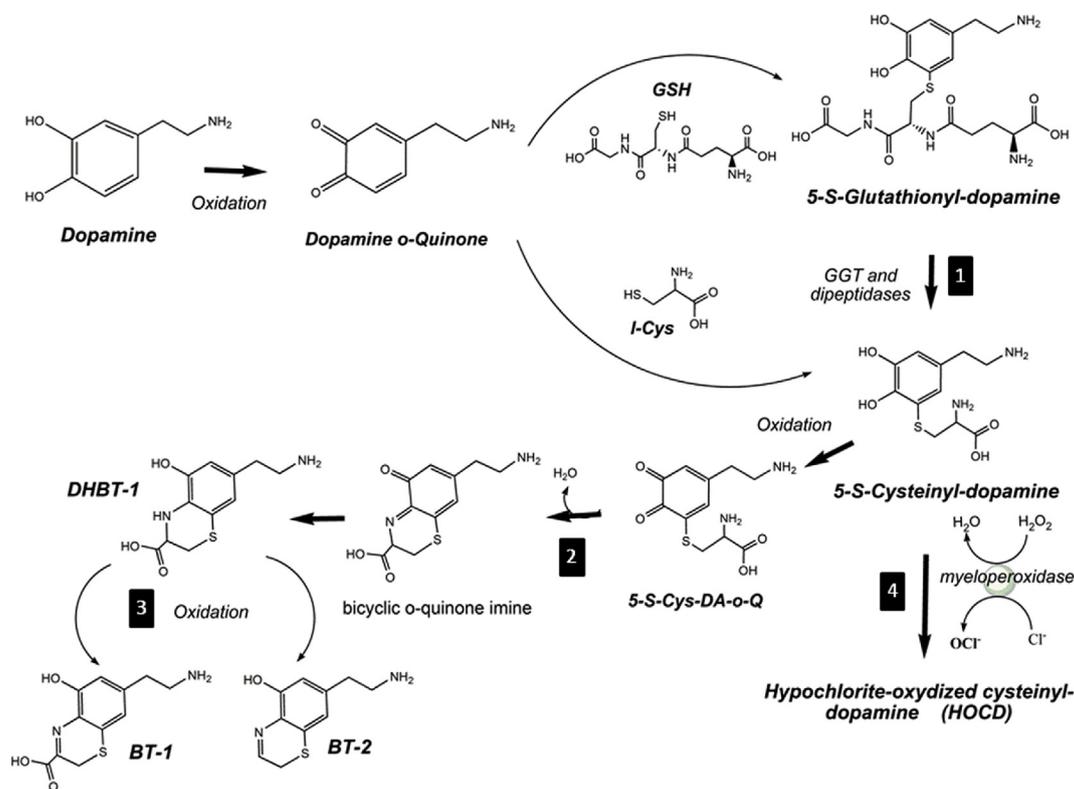
In the dopaminergic neuron, where the equilibrium redox is preserved, the 5-S-Cys-DA conjugate is normally formed at a very low concentration, which is also structurally part of neuromelanin (Sulzer et al., 2000). However, quantitative analysis of brain tissues of rich dopaminergic regions and in cerebrospinal fluid (CSF) of patients diagnosed with PD demonstrated significantly increased levels of 5-S-Cys-DA (Fornstedt and Carlsson, 1990; Fornstedt et al., 1990b). This finding supports the role of the diverged DA oxidative pathway in the endogenous formation of 5-S-Cys-DA. A possible explanation of the increased formation of 5-S-Cys-DA might be the disruption in the DA reuptake mechanism, which blocks the storage of the synaptic vesicle and leads to cytosolic accumulation of DA and its further oxidation (Mulvihill, 2019; Monzani et al., 2019; Caudle et al., 2007).

On the other hand, reduced glutathione (GSH), the most abundant antioxidant in brain cells, is found in physiological concentration at approximately 1–4 mM (Rae and Williams, 2017; Aoyama and Nakaki, 2013). However, extensive studies have found a marked reduction in the levels of both GSH and l-cysteine in patients with PD, which are likely to appear in the early stages of the disease and as it progresses (Rae and Williams, 2017; Smeyne and Smeyne, 2013; Müller and Muhlack, 2012; Sian et al., 1994). In addition, several studies have reported a similar *in vivo* discrepancy in the levels of reduced glutathione (GSH) against oxidized glutathione (GSSG). Nevertheless, in postmortem analysis of PD samples the GSH levels were considerable decreased, but not GSSG (Canals et al., 2001; Ibi et al., 1999; Jurma et al., 1997). Furthermore, in these studies the unbalanced GSH/GSSG ratio was accompanied by the increased activity of gamma-glutamyl transferase (GGT), the key enzyme to convert 5-S-GSH-DA into 5-S-Cys-DA (Chinta et al., 2006; Dauer and Przedborski, 2003; Sian et al., 1994). All of these findings indicate that the reduced intracellular levels of GSH and l-cys, are linked to the increased formation of conjugates with the dopamine-o-quinone intermediate in the oxidative DA pathway. Furthermore, the enhanced formation of the thio-catecholamines might be due to the presence of elevated cell oxidative stress (Graham et al., 1978). Moreover, the formation of 5-S-Cys-DA or 5-S-GSH-DA occurs at a very rapid constant rate (200/s) in comparison to the cyclic product formation of aminochrome and 5,6-indolequinone (formed at a slow constant rate of 0.15/s) (Tse et al., 1976; Bisaglia et al., 2010). Such evidence might indicate that in the pathophysiological course of PD, the thio-catecholamines 5-S-GSH-DA, 5-S-Cys-DA and DHBT-1 appear at the initial stages of the disease, while the cyclic dopamine quinones, aminochrome and 5,6-indolequinone, might be formed in mid- or advanced-stages.

## 3. The 5-S-Cys-DA conjugate and its derivative benzothiazines: implications for PD

Several studies have shown through *in vitro* and *in vivo* experiments that 5-S-Cys-DA and oxidized benzothiazines cause severe damage to dopaminergic neurons. The cellular damage caused by those thio-catecholamines is comparable to the neurotoxic effect produced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Langston, 2017; Lotharius and O'Malley, 2000; Hernandez-Baltazar et al., 2017). Several groups have described the participation of 5-S-Cys-DA and DHBT-1 in some characteristic PD molecular mechanisms, such as the following:

- i) **Mitochondrial dysfunction and oxidative stress.** It is well known



**Fig. 2.** Synthesis of thio-catecholamines and dihydrobenzothiazines. Reaction 1. Formation of 5-S-glutathionyl-dopamine (5-S-GSH-DA) and its enzymatic degradation to form 5-S-Cysteinyldopamine (5-S-Cys-DA). Reaction 2. Oxidation of 5-S-Cys-DA to form benzothiazine 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1). Reaction 3. formation of 7-(2-aminoethyl)-5-hydroxy-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (BT-1) and 7-(2-aminoethyl)-5-hydroxy-1,4-benzothiazine (BT-2). Reaction 4. Formation of hypochlorite-oxidized cysteinyldopamine (HOCD). (Abbreviations: glutathione (GSH); hypochlorite (OCl<sup>-</sup>); 5-S-Cysteinyldopamine-o-quinone (5-S-Cys-DA-o-Q) and gamma-glutamyl transferase (GGT)).

that oxidative stress and mitochondrial dysfunction are key factors of cellular damage in the physiology of PD (Nguyen et al., 2019; Subramaniam and Chesselet, 2013; Santiago-López et al., 2010). The role of 5-S-Cys-DA in neural damage through the mitochondrial dysfunction and enhanced oxidative stress has been well established. As Mosca and colleagues demonstrated by injecting in mice and in cellular incubation, 5-S-Cys-DA initiates the activation of a cascade of events when concentrated at the micromolar range. The mitochondrial activity is severely affected at the beginning of the exposure (Mosca et al., 2006). 5-S-Cys-DA is easily internalized within the cell, disturbing its homeostasis and causing: 1) Increased levels of reactive oxygen species, which induces protein carbonylation and lipid oxidation; 2) alteration of cytoplasmic calcium homeostasis, leading to depolarization and a decrease of the mitochondrial membrane potential; 3) reduction in the efficiency of the mitochondrial electron transport chain and; 4) a considerable reduction in the intracellular concentration of antioxidants superoxide dismutase (SOD) and GSH (Vauzour et al., 2014; Aureli et al., 2014). In addition, reported experiments have shown that 5-S-Cys-DA is able to suppress the mitochondrial activity through the inhibition of the respiratory complex I, leading to activate programmed cellular death mechanisms, such as the cytochrome *c* release and activation of caspases 3, 8 and 9. (Mosca et al., 2008, 2006; Spencer et al., 2002).

More recently, Vauzour and colleagues described the mechanism that takes part in the intracellular oxidation of 5-S-Cys-DA into DHBT-1, showing extensive cell damage in a dose time dependent pathological cascade (Vauzour et al., 2014). Under the first exposition time, 5-S-Cys-DA is internalized and intracellularly oxidized, leading to the activation of the extracellular-signal-regulated kinase 2 (ERK2) and the caspase 8,

key events in the initiation of programmed cellular death. Further oxidation of 5-S-Cys-DA activates secondary apoptotic mechanisms, such as the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1), the phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and c-Jun (Ser73), p38 and the caspases 3, 7 and 9. Nevertheless, the severe mitochondrial inhibition occurs after long exposition time; the conversion of 5-S-Cys-DA into DHBT-1 requires over 3 h to be completed. In support of the toxic role of DHBT-1 to mitochondria, Li and Dryhurst studied the toxic effect of DHBT-1 in cultured intact rat mitochondria (Li and Dryhurst, 2001). DHBT-1 toxicity starts with an easy diffusion into the mitochondrial membrane, leading to fast irreversible inhibition of the respiratory complex I with severe concomitant damage to mitochondrial complex IV, alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDHC) and pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) (Xin et al., 2000). In an elevated reactive oxygen species environment, DHBT-1 is prone to fast oxidation to form the dihydrobenzothiazines BT-1 and BT-2 (Li et al., 1998). Similar experiments show that BT-1 and BT-2 cause enhanced mitochondrial damage, in comparison to DHBT-1 (Li and Dryhurst, 1997).

ii) **Alpha-synuclein aggregation and stress of endoplasmic reticulum.** *In vivo* and *in vitro* experiments have shown the upregulation of  $\alpha$ -syn immediately after the exposition to 5-S-Cys-DA. The  $\alpha$ -syn upregulation was accompanied by the depletion in the expression of the protein Erp57, a key luminal protein that is responsive to endoplasmic reticulum (ER) stress. This induces the unfolded protein response (UPR) (Aureli et al., 2014). In addition, 5-S-Cys-DA plays an important role in the fibril formation of  $\alpha$ -syn by increasing its aggregation and cytoplasmic accumulation. This event is modulated in a time dependent process, but it is intensified under exacerbated intracellular oxidative stress (Zafar et al., 2006).

Several experiments support the notion that elevated oxidative stress in dopaminergic neurons may contribute to a-syn aggregation and vice versa, creating a vicious cycle and leading to increase the PD neurodegeneration (Mor et al., 2017; Wong and Krainc, 2017; Conway et al., 2001). Although the toxic damage of 5-S-Cys-DA has been described, it is unclear whether 5-S-Cys-DA or secondary dopamine oxidized derivatives are responsible for a-syn misfolding and aggregation.

Sidell and colleagues have shown that 5-S-Cys-DA interferes in the synaptic terminal DA reuptake of dopamine transporters, which increases the formation of dopamine quinone subproducts. This observation indicates that the vesicular traffic interference causes deleterious neurological activity (Sidell et al., 2001). Nevertheless, the inhibition mechanism of the DA vesicular reuptake by oxidized dopamine remains elusive. A possible explanation is the contribution of thio-catecholamines in the inhibition of dopamine transporters and through the formation of enzymatic adducts with VMAT-2. This could potentially drive DA oxidation into a vicious circle that results in the formation of endogenous thio-catecholamines induced by rapid DA oxidation (Caudle et al., 2007; Whitehead et al., 2001).

Related experiments have produced varying results. Some have demonstrated the impact of 5-S-Cys-DA on DNA, which induces oxidation to the purine and pyrimidine bases and causing oligonucleosomal DNA fragmentation (Mosca et al., 2006). These DNA abnormalities might lead to epigenetic changes, such as DNA methylation or histone modifications (Henderson-Smith et al., 2019; Cobos et al., 2018). A large body of evidence suggests that epigenetic modifications have a relevant impact on the etiology and progression of PD (van Heesbeen and Smidt, 2019; Navarro-Sánchez et al., 2018; Jakubowski and Labrie, 2017). A summary of the impacts of 5-S-Cys-DA and the dihydrobenzothiazines to dopaminergic neurons is graphically described in Fig. 3.

#### 4. Inhibition of the neurotoxic effects of 5-S-Cys-DA

Growing evidence has demonstrated the neuroprotective capacity of several compounds to slow down the cellular damage of oxidized dopamine metabolites. Some of the common products used for this aim are the N-acetylcysteine (NAC), GSH, ascorbic acid, taurine,

dithiothreitol, vitamin C, vitamin E and the Coenzyme Q10 (Carrera et al., 2018; Kita et al., 2014; Filograna et al., 2016; Figueroa-Méndez and Rivas-Arancibia, 2015). In addition, some polyphenolic compounds have been shown to provide effective neuroprotection to dopaminergic neurons by attenuating the mitochondrial dysfunction, reducing both the levels of oxidative stress and inflammatory responses, and inhibiting the fibril accumulation of a-syn (Kujawska and Jodnyis-Liebert, 2018; Jung and Kim, 2018; Magalingam et al., 2015).

Additional studies have shown that some natural polyphenols, both flavonoids and non-flavonoids, are able to prevent the formation of 5-S-Cys-DA and reduce its cell toxicity (Goldstein et al., 2016a,b; Cooper et al., 2008; Vauzour et al., 2007, 2010). Experiments in cultured cells have shown that (+)-catechin and caffeic acid avoid the formation of thio-catecholamines. The *in vitro* incubation of those polyphenols with tyrosinase and dopamine, and in the presence of L-cysteine, leads to oxidized polyphenols while blocking the oxidation of dopamine and forming non-toxic adducts of cysteinyl-polyphenols. Furthermore, the hesperetin, a flavanone, prevents the 5-S-Cys-DA formation by blocking the enzymatic action of tyrosinase, inhibiting the polyphenol adduct formation (Vauzour et al., 2007). In addition, a rich variety of polyphenolic compounds have also shown *in vitro* neuroprotective capacity. This includes compounds such as pelargonidin, quercetin, hesperetin, caffeic acid, p-Coumaric acid, hydroxyphenethyl alcohol, tyrosol, epicatechin and the 3'-o-methyl(-)-epicatechin. The pre-treatment of cortical neurons with those aforementioned polyphenols significantly reduces the toxic damage of 5-S-Cys-DA after its exposure (Vauzour et al., 2008, 2010). More recently, Goldstein and colleagues demonstrated the double *in vitro* neuroprotective effect of the 3,4-dihydroxyphenylethanol (DOPET), a phenolic compound found in olive oil and red wine. This compound reduces the toxicity of 5-S-Cys-DA (Goldstein et al., 2017, 2016) and DOPAL, which is a toxic intermediate metabolite in the metabolic dopamine pathway, and has also been linked to dopaminergic neuron death (Goldstein et al., 2014; Casida et al., 2014; Marchitti et al., 2007). The aforementioned evidence highlights the neuroprotection of natural polyphenols against the toxic endogenous formation of oxidized dopamine metabolites. These strategies shed light onto the neuroprotective capacity of such products, which may help advance the future development of clinical therapies in the treatment of patients with PD.

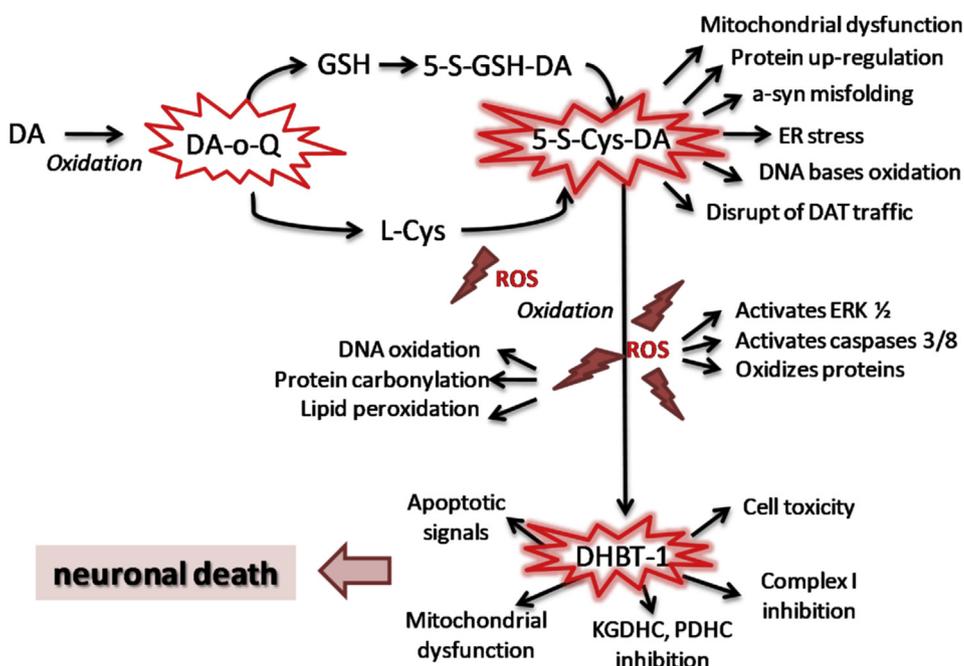


Fig. 3. Toxic effects of dopamine oxidation through the endogenous formation of dopamine-o-quinone, 5-S-cysteinyldopamine (5-S-Cys-DA) and 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1). Formation of 5-S-Cys-DA induces cell toxicity. The oxidation of 5-S-Cys-DA to form DHBT-1 enhances damage. These metabolites cause damage to dopaminergic neurons by inducing mitochondrial dysfunction, an increase in oxidative stress, protein and DNA damage, endoplasmic reticulum (ER) stress, and the activation of key apoptotic signals; this leads to neural death, which may contribute to the pathogenesis and progress of Parkinson's disease. (Abbreviations: reactive oxygen species (ROS); reduced glutathione (GSH); 5-S-gluthionyl-dopamine (5-S-GSH-DA); extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK 1/2); dopamine o-quinone (DA-o-Q); dopamine transporter (DAT); alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex (KGDHC); pyruvate dehydrogenase complex (PDHC); alpha-synuclein (a-syn)).

## 5. 5-S-Cys-DA as biomarker for PD diagnosis

Motor symptoms in PD are evident after the loss of 70% of dopaminergic neurons in the SNpc (Hirsch et al., 2016). This drawback reveals the urgent necessity to develop strategies for the detection of PD at early stages. Metabolites formed at the beginning of the disease, such as derivative dopamine products, could be used as biomarkers for the early diagnosis of PD. This could potentially provide an important means of differentiating PD from other pathologies that manifest in related parkinsonian syndromes (Parnetti et al., 2019; Yaping and Weidong, 2019).

Currently, there are several prospective biomarkers of high sensitivity and diagnostic potential for PD (Khodadadian et al., 2018; Maass et al., 2018; Delenclos et al., 2016). Six biomarker groups for PD diagnosis have been described: i) neurotransmitters, neuromodulators and related substances; ii) endogenous neurotoxins; iii) oxidative stress markers; iv) inflammatory and immunologic markers; v) growth and neurotrophic factors; and vi) protein biomolecules related to PD (Jiménez-Jiménez et al., 2014). Nevertheless, none of the thio-catecholamines previously described, have been included in these categories. Detection of metabolites coming from the endogenous metabolism of DA may provide an effective means towards identifying biomarkers for PD diagnosis.

Rosengren and colleagues first detected 5-S-Cys-DA in humans and other mammals (Rosengren et al., 1985; Fornstedt et al., 1986, 1990a). Through autopsies of the human brain they detected 5-S-Cys-DA and other thio-catecholamines in regions rich in dopamine. High levels of 5-S-Cys-DA were identified only in the caudate nucleus, putamen, globus pallidus and substantia nigra (SN); where the SN showed the highest concentration (Fornstedt and Carlsson, 1989). Notably, the quantification of 5-S-Cys-DA was considerably high in samples presenting high depigmentation in the SN (Fornstedt et al., 1990a). Furthermore, when comparing results between PD and non-PD patients, they found that the level of the ratio of 5-S-Cys-DA to DA was ten times higher in patients diagnosed with PD (Fornstedt and Carlsson, 1991; Fornstedt et al., 1990a). Increased levels of circulating 5-S-Cys-DA were also detected in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with PD (Carlsson and Fornstedt, 1991a; Fornstedt et al., 1990a). In that sense, Carlsson and Fornstedt suggested that measuring the 5-S-Cys-DA to DA ratio can be used as biomarker for the diagnosis of PD (Carlsson and Fornstedt, 1991b). However, the circulating levels of DA in the 5-S-Cys-DA/DA ratio hardly reflect the neurodegeneration state of the dopaminergic neuron in the SNpc. In addition, DA has rarely been considered to be a specific PD metabolite and its use as biomarker is contested. (Ishibashi et al., 2010; Sossi et al., 2002). On the other hand, clinical measurements in CSF samples of PD patients revealed a decreased total concentration of HVA, while the levels of the 5-S-Cys-DA to HVA ratio were considerably increased. This led researchers to hypothesize that the quantification of the 5-S-Cys-DA/HVA ratio could represent a better biomarker for PD (Cheng et al., 1996). However, the measurement of those metabolites was performed in patients diagnosed with PD several years after the study was first conducted. In addition, the patients were being treated with levodopa (L-DOPA). Actual levels of DA metabolites must be carefully examined. For example, in cases of levodopa treatment, L-DOPA can induce adverse effects, such as the levodopa-induced dyskinesia (LID). (Romagnolo et al., 2018; Rajabally and Martey, 2013). On the other hand, only measuring HVA in CSF can be misleading because it is not specific to the disease. As previously described, glial cells synthesize HVA; thus, the measurement of HVA hardly represents the real state of DA metabolism in the dopaminergic neuron (Lloyd et al., 1975).

Clinical trials by Goldstein and colleagues, which include analytic and neuroimaging studies, corroborate the use of 5-S-Cys-DA as a biomarker in the diagnosis of PD. This was demonstrated by measuring the levels of 5-S-Cys-DA and DOPAC in patients diagnosed with three different parkinsonian syndromes: PD, parkinsonian multiple system

atrophy (MSA-P) and pure autonomic failure (PAF). Quantitative detection of the ratio of 5-S-Cys-DA to DOPAC was more than doubled in patients with PD and MSA-P, while no significant changes were observed in patients with PAF (Goldstein et al., 2016a,b, 2012). These findings support the use of DOPAC and the ratio of 5-S-Cys-DA/DOPAC as biomarkers for PD diagnosis. Furthermore, DOPAC is a metabolite with a much higher specificity to the index of neural damage in the SNpc, while the 5-S-Cys-DA/DOPAC ratio indicates both the cytoplasmic oxidative state of DA and the endogenous thio-catecholamine formation in the progress of the disease. The findings from this research, as well as the identification of circulating antibodies against cysteinyl-catecholamines in PD patients, indicate the specificity of thio-catecholamines to PD (Salauze et al., 2005). Therefore, in the recent search for specific PD biomarkers, the combination of DA derived products, such as oxidized dopamine, 5-S-Cys-DA, DOPAC, aminochrome and 5,6-indolequinone, could be used for accurate diagnosis of PD.

## 6. Conclusions

Parkinson's disease is a multifactorial pathology, and its origin is still poorly understood. A common pathognomonic characteristic of this disease is the altered metabolism of dopamine in the dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. There is substantial evidence of the altered metabolism of DA in PD, which occurs through its enzymatic and oxidative pathways and results in the formation of endogenous toxic metabolites. These metabolites are responsible for cellular damage and death, as well as for activating several key molecular mechanisms in the pathology of PD. The 5-S-Cys-DA metabolite and its benzothiazine (DHBT-1) are thio-catecholamines of endogenous formation that induce severe damage to dopaminergic neurons. Neural damage by 5-S-Cys-DA and DHBT-1 is characterized by mitochondrial dysfunction and ATP depletion, increased oxidative stress, protein carbonylation and DNA damage, as well as the activation of apoptotic signals. Neuroprotective products, such as polyphenols, reduce cell toxicity of oxidized dopamine and thio-catecholamines, which could help to develop further therapies for PD patients. The hindrance in the prognosis of PD in an early stage and the difficulty to differentiate it from other parkinsonian syndromes has incentivized researchers to investigate the role of metabolites in PD prognosis. The 5-S-Cys-DA metabolite, present in brain tissues and biological fluids of PD patients, has shown a strong performance as a specific biomarker with the advantage of differentiating PD from other parkinsonian syndromes. Finally, future research in the study of combined metabolites from the enzymatic and oxidative pathway of DA, such as 5-S-Cys-DA, DOPAC, aminochrome and 5,6-indolequinone, might provide key information in the neurogenerative progress of PD.

## Conflicts of interest

Declarations of interest conflicts: none.

## Acknowledgments

I. B-R thanks to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant number 599497 for the PhD scholarship in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas-UNAM. I. B-R and JM. S thank to the support of the PAPIIT, grant number IN-111216, UNAM-DGAPA project, and S.R-A thanks to the support of the PAPIIT-IN-221417, UNAM-DGAPA project.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.104514>.

## References

- Allen, G.F., Ullah, Y., Hargreaves, I.P., Land, J.M., Heales, S.J., 2013. Dopamine but not l-dopa stimulates neural glutathione metabolism. Potential implications for Parkinson's and other dopamine deficiency states. *Neurochem. Int.* 62, 684–694.
- Aoyama, K., Nakaki, T., 2013. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 21021–21044.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., Diaz-Corrales, F.J., Ogawa, N., 2004. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced. *Acta Med. Okayama* 58, 221–233.
- Aureli, C., Cassano, T., Masci, A., Francioso, A., Martire, S., Cocciolo, A., Chichiarelli, S., Romano, A., Gaetani, S., Mancini, P., Fontana, M., d'Erme, M., Mosca, L., 2014. 5-S-cysteinyldopamine neurotoxicity: influence on the expression of  $\alpha$ -synuclein and ERp57 in cellular and animal models of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 92, 347–358.
- Bhattacharjee, N., Borah, A., 2016. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are the underlying events of dopaminergic neurodegeneration in homocysteine rat model of Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 10, 48–55.
- Bisaglia, M., Soriano, M.E., Arduini, I., Mammì, S., Bubacco, L., 2010. Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 699–706.
- Bisaglia, M., Mammì, S., Bubacco, L., 2007. Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine: analysis of the interactions with  $\alpha$ -synuclein. *J. Biol. Chem.* 282, 15597–15605.
- Burbulla, L.F., Song, P., Mazzulli, J.R., Zampese, E., Wong, Y.C., Jeon, S., Santos, D.P., Blanz, J., Obermaier, C.D., Strojny, C., Savas, J.N., Kiskinis, E., Zhuang, X., Krüger, R., Surmeier, D.J., Kraince, D., 2017. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science* 357, 1255–1261.
- Canals, S., Casarejos, M.J., de Bernardo, S., Rodríguez-Martín, E., Mena, M.A., 2001. Glutathione depletion switches nitric oxide neurotrophic effects to cell death in midbrain cultures: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 79, 1183–1195.
- Carlsson, A., Fornstedt, B., 1991b. Catechol metabolites in the cerebrospinal fluid as possible markers in the early diagnosis of Parkinson's disease. *Neurology* 41, 50–51 discussion 52.
- Carlsson, A., Fornstedt, B., 1991a. Possible mechanisms underlying the special vulnerability of dopaminergic neurons. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 136, 16–18.
- Carrera, I., Fernandez-Novoa, L., Sampedro, C., Tarasov, V.V., Aliev, G., Cacabelos, R., 2018. Dopaminergic neuroprotection with atremorine in Parkinson's disease. *Curr. Med. Chem.* 25, 5372–5388.
- Casida, J.E., Ford, B., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Cooney, A., Goldstein, D.S., 2014. Benomyl, aldehyde dehydrogenase, DOPAL, and the catecholaldehyde hypothesis for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 1359–1361.
- Caudle, W.M., Richardson, J.R., Wang, M.Z., Taylor, T.N., Guillot, T.S., McCormack, A.L., Colebrooke, R.E., Di Monte, D.A., Emson, P.C., Miller, G.W., 2007. Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J. Neurosci.* 27, 8138–8148.
- Chedik, L., Bruyere, A., Le Vee, M., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., Potin, S., Fardel, O., 2017. Inhibition of human drug transporter activities by the pyrethroid pesticides allethrin and tetramethrin. *PLoS One* 12, e0169480.
- Chen, C., Turnbull, D.M., Reeve, A.K., 2019. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease—cause or consequence? *Biology* 8 pii: E38.
- Cheng, F.C., Kuo, J.S., Chia, L.G., Dryhurst, G., 1996. Elevated 5-S-cysteinyldopamine/homovanillic acid ratio and reduced homovanillic acid in cerebrospinal fluid: possible markers for and potential insights into the pathoetiology of Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 103, 433–446.
- Chinta, S.J., Kumar, J.M., Zhang, H., Forman, H.J., Andersen, J.K., 2006. Up regulation of gamma-glutamyl transpeptidase activity following glutathione depletion has a compensatory rather than inhibitory effect on mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1557–1563.
- Cobos, S.N., Bennett, S.A., Torrente, M.P., 2018. The impact of histone post-translational modifications in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* S0925–4439, 30396–X.
- Conway, K.A., Rochet, J.C., Bieganski, R.M., Lansbury Jr., P.T., 2001. Kinetic stabilization of the  $\alpha$ -synuclein protofibril by a dopamine- $\alpha$ -synuclein adduct. *Science* 294, 1346–1349.
- Cooper, A.J., Pinto, J.T., Krasnikov, B.F., Niatsetskaya, Z.V., Han, Q., Li, J., Vauzour, D., Spencer, J.P., 2008. Substrate specificity of human glutamine transaminase K as an aminotransferase and as a cysteine S-conjugate beta-lyase. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 72–81.
- Dagnino-Subiabre, A., Cassels, B.K., Baez, S., Johansson, A.S., Mannervik, B., Segura-Aguilar, J., 2000. Glutathione transferase M2-2 catalyzes conjugation of dopamine and dopa o-quinones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 32–36.
- Daubner, S.C., Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- Delenclos, M., Jones, D.R., McLean, P.J., Uitti, R.J., 2016. Biomarkers in Parkinson's disease: advances and strategies. *Park. Relat. Disord.* 22 (Suppl. 1), S106–S110.
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1019–1026.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671.
- Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S., 2004. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.* 56, 331–349.
- Figuroa-Méndez, R., Rivas-Arancibia, S., 2015. Vitamin C in Health and Disease: its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front. Physiol.* 6, 397.
- Filograna, R., Beltramini, M., Bubacco, L., Bisaglia, M., 2016. Anti-oxidants in Parkinson's disease therapy: a critical point of view. *Curr. Neuropharmacol.* 14, 260–271.
- Fornstedt, B., Bergh, I., Rosengren, E., Carlsson, A., 1990a. An improved HPLC-electrochemical detection method for measuring brain levels of 5-S-cysteinyldopamine, 5-S-cysteinyldopamine, and 5-S-cysteinyldopamine. *J. Neurochem.* 54, 578–586.
- Fornstedt, B., Carlsson, A., 1989. A marked rise in 5-S-cysteinyldopamine levels in Guinea-pig striatum following reserpine treatment. *J. Neural Transm.* 76, 155–161.
- Fornstedt, B., Pileblad, E., Carlsson, A., 1990b. In vivo autooxidation of dopamine in Guinea pig striatum increases with age. *J. Neurochem.* 55, 655–659.
- Fornstedt, B., Rosengren, E., Carlsson, A., 1986. Occurrence and distribution of 5-S-cysteinyldopamine derivatives of dopamine, DOPA and DOPAC in the brains of eight mammalian species. *Neuropharmacology* 25, 451–454.
- Fornstedt, B., Carlsson, A., 1991. Effects of inhibition of monoamine oxidase on the levels of 5-S-cysteinyldopamine adducts of catechols in dopaminergic regions of the brain of the Guinea pig. *Neuropharmacology* 30, 463–468.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., Braak, H., 2013. 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 13–24.
- Goldstein, D.S., Holmes, C., Sharabi, Y., 2012. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain* 135, 1900–1913.
- Goldstein, D.S., Holmes, C., Sullivan, P., Jinsmaa, Y., Kopin, I.J., Sharabi, Y., 2016a. Elevated cerebrospinal fluid ratios of cysteinyl-dopamine/3,4-dihydroxyphenylacetic acid in parkinsonian synucleinopathies. *Park. Relat. Disord.* 31, 79–86.
- Goldstein, D.S., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Holmes, C., Kopin, I.J., Sharabi, Y., 2016b. 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol) mitigates the increase in spontaneous oxidation of dopamine during monoamine oxidase inhibition in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 41, 2173–2178.
- Goldstein, D.S., Jinsmaa, Y., Sullivan, P., Sharabi, Y., 2017. N-Acetylcysteine prevents the increase in spontaneous oxidation of dopamine during monoamine oxidase inhibition in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 42, 3289–3295.
- Goldstein, D.S., Kopin, I.J., Sharabi, Y., 2014. Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacol. Ther.* 144, 268–282.
- Graham, D.G., 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14, 633–643.
- Graham, D.G., Tiffany, S.M., Bell Jr., W.R., Gutknecht, W.F., 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol. Pharmacol.* 4, 644–653.
- Hastings, T.G., Lewis, D.A., Zigmond, M.J., 1996. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 1956–1961.
- Henderson-Smith, A., Fisch, K.M., Hua, J., Liu, G., Ricciardelli, E., Jepsen, K., Huentelman, M., Stalberg, G., Edland, S.D., Scherzer, C.R., Dunckley, T., Desplats, P., 2019. DNA methylation changes associated with Parkinson's disease progression: outcomes from the first longitudinal genome-wide methylation analysis in blood. *Epigenetics* 14, 365–382.
- Herlinger, E., Jameson, R.F., Linert, W., 1995. Spontaneous autooxidation of dopamine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 259–263.
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L.M., Villanueva-Olivo, A., 2017. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: novel findings in an older model. *Neurologia* 32, 533–539.
- Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., Pringsheim, T., 2016. The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 46, 292–300.
- Ibi, M., Sawada, H., Kume, T., Katsuki, H., Kaneko, S., Shimohama, S., Akaike, A., 1999. Depletion of intracellular glutathione increases susceptibility to nitric oxide in mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* 73, 1696–1703.
- Ishibashi, K., Kanemaru, K., Saito, Y., Murayama, S., Oda, K., Ishiwata, K., Mizusawa, H., Ishii, K., 2010. Cerebrospinal fluid metabolite and nigrostriatal dopaminergic function in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 122, 46–51.
- Ito, S., Fujita, K., 1982. Conjugation of dopa and 5-S-cysteinyldopa with cysteine mediated by superoxide radical. *Biochem. Pharmacol.* 31, 2887–2889.
- Jakubowski, J.L., Labrie, V., 2017. Epigenetic biomarkers for Parkinson's disease: from diagnostics to therapeutics. *J. Parkinson's Dis.* 7, 1–12.
- Jameson, G.N., Zhang, J., Jameson, R.F., Linert, W., 2004. Kinetic evidence that cysteine reacts with dopaminquinone via reversible adduct formation to yield 5-cysteinyldopamine: an important precursor of neuromelanin. *Org. Biomol. Chem.* 2, 777–782.
- Jiménez-Jiménez, F.J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., Agúndez, J.A., 2014. Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 369.
- Jung, U.J., Kim, S.R., 2018. Beneficial effects of flavonoids against Parkinson's disease. *J. Med. Food* 21, 421–432.
- Jurma, O.P., Hom, D.G., Andersen, J.K., 1997. Decreased glutathione results in calcium-mediated cell death in PC12. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 1055–1066.
- Khodadadian, A., Hemmati-Dinarvand, M., Kalantary-Charvadeh, A., Ghojati, A., Mazaheri, M., 2018. Candidate biomarkers for Parkinson's disease. *Biomed. Pharmacother.* 104, 699–704.
- Kita, T., Asanuma, M., Miyazaki, I., Takeshima, M., 2014. Protective effects of phytochemical antioxidants against neurotoxin-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 313–319.

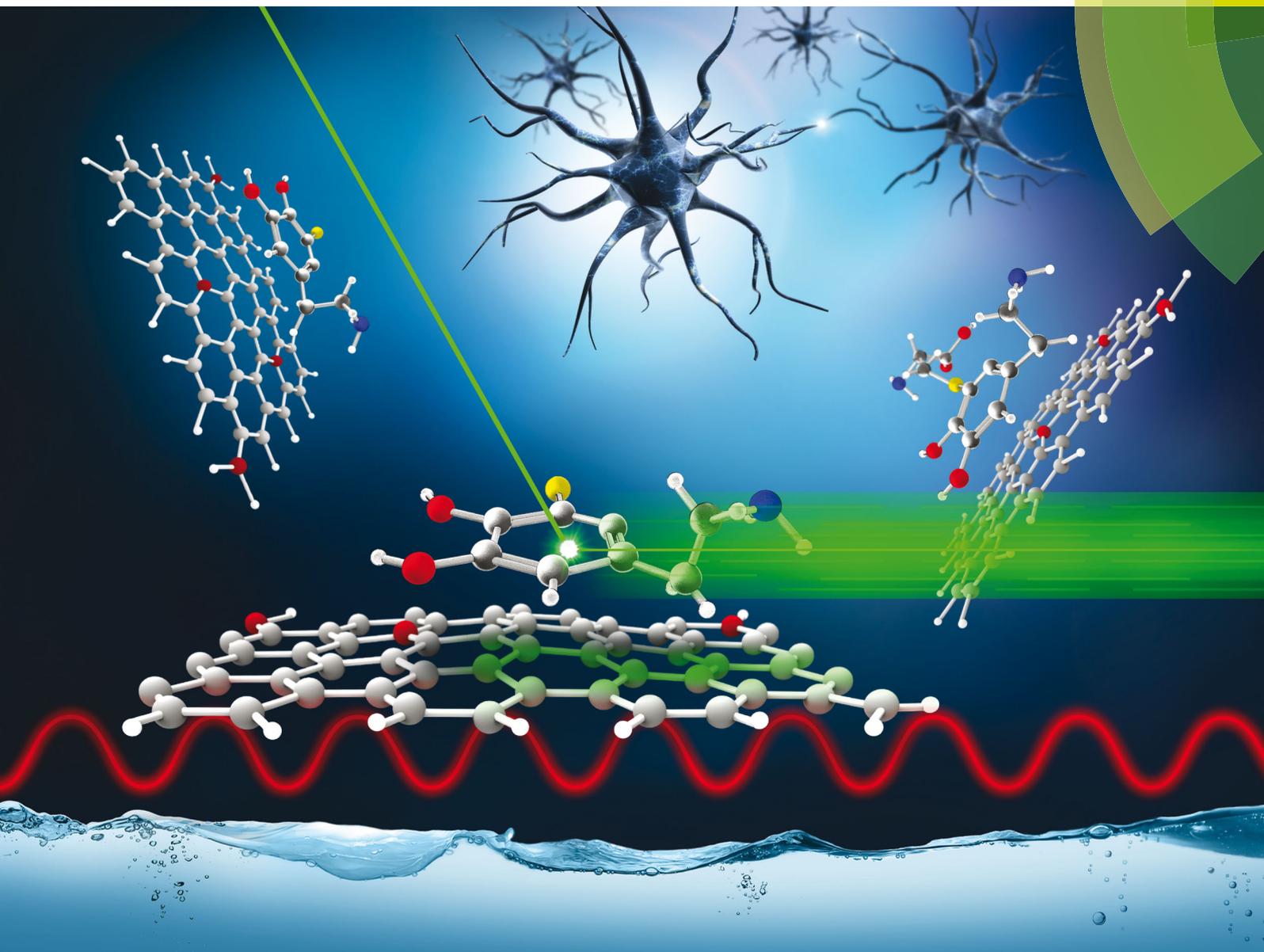
- Kujawska, M., Jodynis-Liebert, J., 2018. Polyphenols in Parkinson's disease: a systematic review of in vivo studies. *Nutrients* 10, E642.
- Langston, J.W., 2017. The MPTP story. *J. Parkinson's Dis.* 7, S11–S19.
- Li, H., Dryhurst, G., 2001. Oxidative metabolites of 5-S-cysteinyl-dopamine inhibit the pyruvate dehydrogenase complex. *J. Neural Transm.* 108, 1363–1374.
- Li, H., Dryhurst, G., 1997. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1): a putative nigral endotoxin of relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 69, 1530–1541.
- Li, H., Shen, X.M., Dryhurst, G., 1998. Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-carboxylic acid (DHBT-1) to intermediates that irreversibly inhibit complex I and scavenge glutathione: potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 71, 2049–2062.
- Linert, W., Herlinger, E., Jameson, R.F., Kienzl, E., Jellinger, K., Youdim, M.B., 1996. Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen - their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1316, 160–168.
- Lloyd, K.G., Davidson, L., Hornykiewicz, O., 1975. The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195, 453–464.
- Lotharius, J., Brundin, P., 2002a. Impaired dopamine storage resulting from  $\alpha$ -synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2395–2407.
- Lotharius, J., Brundin, P., 2002b. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 932–942.
- Lotharius, J., O'Malley, K.L., 2000. The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *J. Biol. Chem.* 275, 38581–38588.
- Maass, F., Schulz, I., Lingor, P., Mollenhauer, B., Bähr, M., 2018. Cerebrospinal fluid biomarker for Parkinson's disease: an overview. *Mol. Cell. Neurosci.* S1044–7431, 30352–X.
- Magalingam, K.B., Radhakrishnan, A.K., Haleagrahara, N., 2015. Protective mechanisms of flavonoids in Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 314560.
- Marchitti, S.A., Deitrich, R.A., Vasiliou, V., 2007. Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacol. Rev.* 59, 125–150.
- Mehta, N.J., Asmaro, K., Hermiz, D.J., Njus, M.M., Saleh, A.H., Beningo, K.A., Njus, D., 2016. Hypochlorite converts cysteinyl-dopamine into a cytotoxic product: a possible factor in Parkinson's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 101, 44–52.
- Meiser, J., Weindl, D., Hiller, K., 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* 11, 34.
- Monzani, E., Nicolis, S., Dell'Acqua, S., Capucciati, A., Bacchella, C., Zucca, F.A., Mosharov, E.V., Sulzer, D., Zecca, L., Casella, L., 2019. Dopamine, oxidative stress and protein-quinone modifications in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 58, 6512–6527.
- Mor, D.E., Tsika, E., Mazzulli, J.R., Gould, N.S., Kim, H., Daniels, M.J., Doshi, S., Gupta, P., Grossman, J.L., Tan, V.X., Kalb, R.G., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Wolfe, J.H., Ischiropoulos, H., 2017. Dopamine induces soluble  $\alpha$ -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nat. Neurosci.* 20, 1560–1568.
- Mosca, L., Lendaro, E., d'Erme, M., Marcellini, S., Moretti, S., Rosei, M.A., 2006. 5-S-Cysteinyl-dopamine effect on the human dopaminergic neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Neurochem. Int.* 49, 262–269.
- Mosca, L., Tempera, I., Lendaro, E., Di Francesco, L., D'Erme, M., 2008. Characterization of catechol-thioether-induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 86, 954–960.
- Müller, T., Muhlack, S., 2012. Cysteine decrease following acute Levodopa intake in patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 521, 37–39.
- Mulvihill, K.G., 2019. Presynaptic regulation of dopamine release: role of the DAT and VMAT2 transporters. *Neurochem. Int.* 122, 954–105.
- Muñoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I., Segura-Aguilar, J., 2012. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinson's Dis.* 2012, 920953.
- Myöhänen, T.T., Schendzielorz, N., Männistö, P.T., 2010. Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J. Neurochem.* 113, 1632–1643.
- Navarro-Sánchez, L., Águeda-Gómez, B., Aparicio, S., Pérez-Tur, J., 2018. Epigenetic study in Parkinson's disease: a pilot analysis of DNA methylation in candidate. *Cells* 7 pii: E150.
- Nguyen, M., Wong, Y.C., Ysselstein, D., Severino, A., Krainc, D., 2019. Synaptic, mitochondrial, and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 42, 140–149.
- Parnetti, L., Gaetani, L., Eusebi, P., Paciotti, S., Hansson, O., El-Agnaf, O., Mollenhauer, B., Blennow, K., Calabresi, P., 2019. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 18, 573–586.
- Pham, A.N., Waite, T.D., 2014. Cu (II)-catalyzed oxidation of dopamine in aqueous solutions: mechanism and kinetics. *J. Inorg. Biochem.* 137, 74–84.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T.D., 2014. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 29, 1583–1590.
- Rae, C.D., Williams, S.R., 2017. Glutathione in the human brain: review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* 529, 127–143.
- Rajabally, Y.A., Martey, J., 2013. Levodopa, vitamins, ageing and the neuropathy of Parkinson's disease. *J. Neurol.* 260, 2844–2848.
- Romagolo, A., Merola, A., Artusi, C.A., Rizzone, M.G., Zibetti, M., Lopiano, L., 2018. Levodopa-induced neuropathy: a systematic review. *Mov. Disord. Clin. Pract.* 6, 96–103.
- Rosengren, E., Linder-Eliasson, E., Carlsson, A., 1985. Detection of 5-S-cysteinyl-dopamine in human brain. *J. Neural Transm.* 63, 247–253.
- Sagara, J.I., Miura, K., Bannai, S., 1993. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J. Neurochem.* 61, 1672–1676.
- Salauze, L., van der Velden, C., Lagroye, I., Veyret, B., Geffard, M., 2005. Circulating antibodies to cysteinyl catecholamines in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease patients. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* 6, 226–233.
- Santiago-López, D., Bautista-Martínez, J.A., Reyes-Hernandez, C.I., Aguilar-Martínez, M., Rivas-Arancibia, S., 2010. Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone. *Toxicol. Lett.* 197, 193–200.
- Schapiro, A.H.V., Chaudhuri, K.R., Jenner, P., 2017. Non-motor features of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 435–450.
- Shen, X.-M., Dryhurst, G., 1996. Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's Disease. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 751–763.
- Shen, X.M., Xia, B., Wrona, M.Z., Dryhurst, G., 1996. Synthesis, redox properties, in vivo formation, and neurobehavioral effects of N-acetylcysteinyl conjugates of dopamine: possible metabolites of relevance to Parkinson's disease. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 1117–1126.
- Shen, X.M., Zhang, F., Dryhurst, G., 1997. Oxidation of dopamine in the presence of cysteine: characterization of new toxic products. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 147–155.
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P., Marsden, C.D., 1994. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 36, 356–361.
- Sidell, K.R., Olson, S.J., Ou, J.J., Zhang, Y., Amarnath, V., Montine, T.J., 2001. Cysteine and mercapturate conjugates of oxidized dopamine are in human striatum but only the cysteine conjugate impedes dopamine trafficking in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 79, 510–521.
- Smeyne, M., Smeyne, R.J., 2013. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 13–25.
- Solano, F., Hearing, V.J., García-Borrón, J.C., 1999. Neurotoxicity due to o-Quinones: neuromelanin formation and possible mechanisms for o-Quinone detoxification. *Neurotox. Res.* 1, 153–169.
- Sossi, V., de La Fuente-Fernandez, R., Holden, J.E., Doudet, D.J., McKenzie, J., Stoessl, A.J., Ruth, T.J., 2002. Increase in dopamine turnover occurs early in Parkinson's disease: evidence from a new modeling approach to PET 18 F-fluorodopa data. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 232–2399.
- Spencer, J.P.E., Whiteman, M., Jenner, P., Halliwell, B., 2002. 5-S-cysteinyl-conjugates of catecholamines induce cell damage, extensive DNA base modification and increases in caspase-3 activity in neurons. *J. Neurochem.* 81, 122–129.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G., Vrana, K.E., 1999. Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J. Neurosci. Res.* 55, 659–665.
- Subramaniam, S.R., Chesselet, M.F., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 106–107, 17–32.
- Sulzer, D., Bogulavsky, J., Larsen, K.E., Behr, G., Karatekin, E., Kleinman, M.H., Turro, N., Krantz, D., Edwards, R.H., Greene, L.A., Zecca, L., 2000. Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 11869–11874.
- Sulzer, D., Zecca, L., 2000. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox. Res.* 1, 181–195.
- Sun, Y., Pham, A.N., Hare, D.J., Waite, T.D., 2018. Kinetic modeling of pH-dependent oxidation of dopamine by iron and its relevance to Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 12, 859.
- Titova, N., Padmakumar, C., Lewis, S.J., Chaudhuri, K.R., 2017. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? *J. Neural Transm.* 124, 907–914.
- Tse, D.C., McCreery, R.L., Adams, R.N., 1976. Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J. Med. Chem.* 19, 37–40.
- van Heesbeen, H.J., Smidt, M.P., 2019. Entanglement of genetics and epigenetics in Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 13, 277.
- Vauzour, D., Corona, G., Spencer, J.P., 2010. Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 106–111.
- Vauzour, D., Pinto, J.T., Cooper, A.J., Spencer, J.P., 2014. The neurotoxicity of 5-S-cysteinyl-dopamine is mediated by the early activation of ERK1/2 followed by the subsequent activation of ASK-1/JNK1/2 pro-apoptotic signalling. *Biochem. J.* 463, 41–52.
- Vauzour, D., Ravaoli, G., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Angeloni, C., Spencer, J.P.E., 2008. Peroxynitrite induced formation of the neurotoxins 5-S-cysteinyl-dopamine and DHBT-1: implications for Parkinson's disease and protection by polyphenols. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 145–151.
- Vauzour, D., Vafeiadou, K., Spencer, J.P.E., 2007. Inhibition of the formation of the neurotoxin 5-S-cysteinyl-dopamine by polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 340–346.
- Vergo, S., Johansen, J.L., Leist, M., Lotharius, J., 2007. Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res.* 1185, 18–32.
- Villar-Pique, A., Lopes da Fonseca, T., Outeiro, T.F., 2016. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *J. Neurochem.* 139 (Suppl. 1), 240–255.
- Whitehead, R.E., Ferrer, J.V., Javitch, J.A., Justice, J.B., 2001. Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. *J. Neurochem.* 76, 1242–1251.
- Wong, Y.C., Krainc, D., 2017.  $\alpha$ -Synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 23, 1–13.
- Xin, W., Shen, X.M., Li, H., Dryhurst, G., 2000. Oxidative metabolites of 5-S-cysteinyl-norepinephrine are irreversible inhibitors of mitochondrial complex I and the alpha-ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase complexes: possible

- implications for neurodegenerative brain disorders. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 749–760.
- Yaping, S., Weidong, L., 2019. Recent advances and perspectives of metabolomics-based investigations in Parkinson's disease. *Mol. Neurodegener.* 14, 3.
- Yoshimoto, Y., Nakaso, K., Nakashima, K., 2005. L-DOPA and dopamine enhance the formation of aggregates under proteasome inhibition in PC12 cells. *FEBS Lett.* 579, 1197–1202.
- Yu, R.L., Tan, C.H., Lu, Y.C., Wu, R.M., 2016. Aldehyde dehydrogenase 2 is associated with cognitive functions in patients with Parkinson's disease. *Sci. Rep.* 6, 30424.
- Zafar, K.S., Siegel, D., Ross, D., 2006. Potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. *Mol. Pharmacol.* 70, 1079–1086.
- Zeevalk, G.D., Razmpour, R., Bernard, L.P., 2008. Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room? *Biomed. Pharmacother.* 62 236–24.
- Zhang, F., Dryhurst, G., 1994. Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine. *J. Med. Chem.* 37, 1084–1098.
- Zhang, F., Dryhurst, G., 1995a. Reactions of cysteine and cysteine derivatives with dopamine-o-quinone and further insights into the oxidation chemistry of 5-S-cysteinyl-dopamine: potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *Bioorg. Chem.* 23, 193–216.
- Zhang, F., Dryhurst, G., 1995b. Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 398, 117–128.

# NJC

New Journal of Chemistry  
rsc.li/njc

A journal for new directions in chemistry



ISSN 1144-0546



ROYAL SOCIETY  
OF CHEMISTRY

Celebrating  
IYPT 2019

PAPER

Isidro Badillo-Ramírez, Bruno Landeros-Rivera *et al.*  
Interaction of 5-S-cysteinyldopamine with graphene oxide:  
an experimental and theoretical study for the detection  
of a Parkinson's disease biomarker





Cite this: *New J. Chem.*, 2019, 43, 15861

# Interaction of 5-*S*-cysteinyl-dopamine with graphene oxide: an experimental and theoretical study for the detection of a Parkinson's disease biomarker†

Isidro Badillo-Ramírez,<sup>a</sup> Bruno Landeros-Rivera,<sup>\*b</sup> Emmanuel de la O-Cuevas,<sup>c</sup> Rubicelia Vargas,<sup>b</sup> Jorge Garza<sup>b</sup> and José M. Saniger<sup>a</sup>

5-*S*-Cysteinyl-dopamine (CysDA) is a metabolite from dopamine oxidation found in patients with Parkinson's disease (PD), and has been suggested to be a biomarker for PD diagnosis. Therefore, the development of methodologies for its detection and identification is a matter of continuous interest for clinical neurology. Graphene oxide (GO) is an efficient 2D material known for its molecular adsorption capabilities, which also improves the spectroscopic signal and quenches the fluorescence of molecules adsorbed on it. For this reason, in the present work we examine the interaction of CysDA with GO. First, we demonstrate that Raman spectroscopy is a viable alternative analytical approach for the identification of CysDA, particularly due to the capacity of GO to quench the molecular fluorescence of the analyte. In order to enhance the interaction of CysDA with GO and to improve the detection of CysDA by vibrational spectroscopy, we studied the physicochemical processes involved in the adsorption of CysDA on GO through methods of Fourier transform infrared spectroscopy and quantum chemistry. These combined strategies revealed a wide variety of molecular interactions involved in the adsorption process. The stabilization of CysDA with GO is achieved primarily by hydrogen bonds and polarization effects, with a minor role of dispersion forces. In addition, we found that solvent molecules strengthens the adsorption of CysDA over GO. This work is the first reported strategy, as an alternative approach to the standard chromatographic methods, in the detection of CysDA, based on GO enhanced vibrational spectroscopy. The combination of Raman spectroscopy with graphenic substrates paves new ground for the future development of selective analytical platforms, which may ultimately enhance the detection of CysDA as a biomarker for PD.

Received 20th July 2019,  
Accepted 9th September 2019

DOI: 10.1039/c9nj03781k

rsc.li/njc

## Introduction

The 5-*S*-cysteinyl-dopamine (CysDA) molecule, which is shown in Fig. 1a, is a catechol-thioether metabolite formed from the nucleophilic addition of the L-cysteine amino acid to the dopamine- $\alpha$ -quinone intermediate, the first product in the spontaneous oxidation of dopamine (DA). Substantial experimental evidence has shown the toxicity of CysDA to dopaminergic neurons in

the substantia nigra pars compacta (SNpc), which is the main region damaged in the pathophysiology of Parkinson's disease (PD).<sup>1–3</sup> In a recent report, we described the neurotoxic role of CysDA in cell neurodegeneration, which induces the pathogenesis and progress of PD.<sup>4</sup> The CysDA metabolite has been detected in human brain tissues and cerebrospinal fluid, with particularly high concentrations in biological samples of PD patients.<sup>5–7</sup> Therefore, the quantification of CysDA in biological fluids could be used as a biomarker to diagnose PD, as it has been proposed previously by some authors.<sup>4,8,9</sup> Detection and quantification of CysDA in fluids of PD patients has been carried out by conventional electrochemical and chromatographic analytical techniques, such as high-performance liquid chromatography (HPLC).<sup>10,11</sup> However, such analytical methods are expensive and require extensive time and complex preparation steps for analysis. In response, researchers are calling for the development of novel and complementary strategies to detect molecular biomarkers with similar HPLC sensitivity.

<sup>a</sup> Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior S/N, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, Mexico. E-mail: isidrobadillo@gmail.com

<sup>b</sup> División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, C. P. 09340, Ciudad de México, Mexico. E-mail: brunolanderos@hotmail.com

<sup>c</sup> Unidad Académica de Física de la Universidad Autónoma de Zacatecas, 98068 Zacatecas, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental methods and results; molecular structures and topological data. See DOI: 10.1039/c9nj03781k

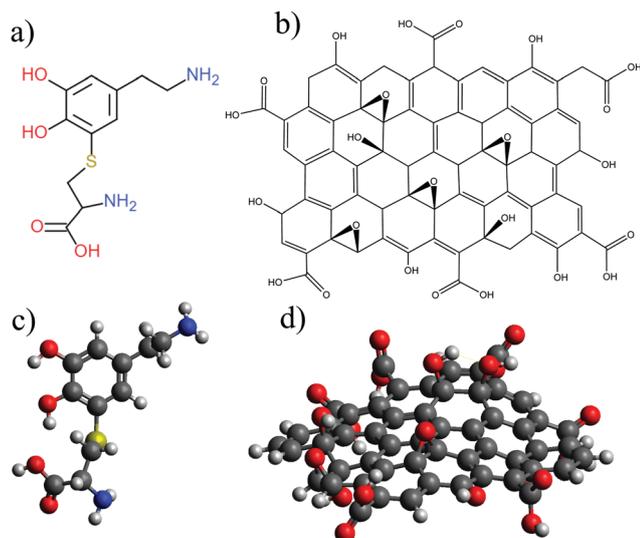


Fig. 1 Lewis structures of 5-S-cysteinyl-dopamine (a) and graphene oxide (b); molecular models of CysDA (c) and GO (d), used in the theoretical calculations in this work.

Raman spectroscopy presents a viable alternative approach for analytical detection because it provides a quick-response, high sensitivity, label-free and susceptibility to molecular identification through the spectral fingerprint.<sup>12,13</sup> However, in order to take advantage of the benefits of Raman spectroscopy, special attention has to be considered to increase the intrinsic low sensitivity of the Raman scattering and the interference of the fluorescence signal of biomolecules. For this purpose, the molecule under study is frequently adsorbed onto *ad hoc* nanostructured substrates, in order to enhance its Raman scattering cross-section and to quench the eventual fluorescence induced by the laser activation source of the Raman system. The scattering cross-section enhancement results in the increase of the Raman spectroscopy detection limit, even at the femtomolar level, greatly expanding the type and number of molecules that can be detected by this technique.<sup>14</sup>

The Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) approach is widely used to increase the Raman scattering signal and to quench the fluorescence of the adsorbed molecule. SERS is based on the adsorption of biomolecules onto noble metal nanoparticle arrays.<sup>15–17</sup> However, more recently, the adsorption of molecules onto graphenic substrates, in order to produce the Graphene Enhanced Raman Scattering (GERS) phenomena, is becoming an interesting alternative to SERS.<sup>18,19</sup> Despite the fact that the scattering enhancement factor in GERS is lower than in SERS, the GERS approach offers important operational advantages. For example GERS produces lower spectral distortion and lower instability of the adsorbed molecules, which results in a more reliable detection.<sup>20</sup>

Graphene derived materials such as pristine graphene (PG), graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO), have attracted attention to develop sensitive substrates. GERS supports have been designed for the detection of various molecules relevant for medical, biological, environmental and food research.<sup>21–25</sup>

GERS strategies have also proved successful for the detection of folic acid, a relevant biomarker of cancer. This has been accomplished through the use of a hybrid structure of graphene oxide with poly-diallyldimethyl ammonium chloride (GO-PDD) and silver nanoparticles (AgNP), leading to produce a linear response between 9 and 180 nM.<sup>26</sup> By combining drop-coating deposition Raman (DCDR) spectroscopy and graphene-enhanced Raman spectroscopy (GERS), the detection of human recombinant interleukin-6 was achieved in an order lower than 1 pg mL<sup>-1</sup>.<sup>27</sup> GO-nobel metal structures nanocomposites have also been designed for the detection of HIV-DNA in the order of fM concentration.<sup>28</sup>

The use of GO as substrate for GERS platforms has some advantages over pristine graphene, such as the ability of being dispersed in aqueous media or biological fluids. The presence of oxygenated functional groups over GO sheets, provide to it a wide possibility to form non-covalent interactions with the adsorbed biomolecule.<sup>29,30</sup> In addition, a deliberate selection of the oxygenated species in GO should give rise to a modulation of the molecule–substrate interaction, where the Raman spectral amplification or the quenching effect could be maximized.<sup>31</sup>

In this work, the CysDA conjugate was adsorbed on a solid GO substrate, in order to quench the previously observed fluorescence signal of the molecule, while minimizing its chemical destabilization and spectral distortion. This strategy has allowed to obtain, for the first time, a clearly assignable Raman spectrum of the CysDA conjugate. In addition, with the purpose of optimizing the interaction of CysDA with GO, in a way to improve the detection of CysDA by Raman spectroscopy, the physicochemical processes involved in the adsorption of CysDA on GO was studied by Fourier transform infrared spectroscopy and quantum chemistry methods. The aim of the theoretical analysis is to study the role of the oxygen functional groups of GO over the CysDA adsorption. The forces involved in the interaction between CysDA and GO were analyzed through quantum chemistry methods, leading to determine the preferential sites of interaction. For this purpose, we used the quantum theory of atoms in molecules<sup>32</sup> (QTAIM) and the non-covalent interaction index<sup>33</sup> (NCI), which are ideal methods for this type of analysis.<sup>34,35</sup> We employed density functional theory for the electronic structure computations due to the high number of atoms involved in the CysDA/GO complex, which forbid the use of correlation methods based on the wave-function. The use of QTAIM, NCI and DFT, along with other theoretical and experimental techniques, has been successfully applied to examine the interactions between a variety of biomolecules and some nanomaterials such as pristine, defected and oxidized graphene, as well as boron-nitride nanosheets.<sup>36–45</sup> The findings presented in this work constitute a step towards the development of Raman based selective analytical platforms for the sensitive detection of CysDA as a PD biomarker.

## Experimental

### Materials

Dopamine hydrochloride, ceric ammonium nitrate, L-cysteine, Dowex 50Wx2, Dowex 50Wx8 and sulphuric acid were purchased

from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Graphene oxide solution was obtained from Graphenea (San Sebastian, Spain).

### Synthesis of CysDA

CysDA was synthesized with slightly modifications from the first experimental reports.<sup>46,47</sup> In short, 20 millimoles of ceric ammonium nitrate (CAN) in 10 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 M were first added to 10 millimoles of dopamine hydrochloride, previously dissolved in 5 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 M. The mixture reaction was rapidly poured into a vigorously stirred solution of 20 millimoles of L-cysteine, dissolved in 5 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 M. A blue-green solution was obtained after the mixture, which was immediately passed through a column (2 × 40 cm) packed with Dowex 50Wx8 (H<sup>+</sup> form), equilibrated with deionized water. The column was washed with water and then eluted with HCl, 0.5 M to eliminate unreacted dopamine, which was followed spectrophotometrically at  $\lambda_{\max}$  280 nm. Then, elutions with HCl, 3 M followed by 4 M, gave a mixture of various cysteinyl-dopamine isomers: 2-S-cysteinyl-dopamine, 5-S-cysteinyl-dopamine and 2,5-S,S-dicysteinyl-dopamine. Eluted fractions from HCl 3 M and 4 M were combined and reduced to a small volume, and then passed through a column (2 × 40 cm) packed with Dowex 50Wx2, equilibrated with HCl 2 M. Further elutions were carried out with HCl, 2 M. Fractions were checked and followed spectrophotometrically to collect only those samples with the  $\lambda_{\max}$  at 254 nm and 292 nm, which is indicative that only 5-S-cysteinyl-dopamine was present. Finally, acidic solution was freeze-dried to obtain CysDA, as a pale brown residue. One part of the sample was stored at -20 °C to further spectroscopic characterization and the other part was dissolved in HCl, 10 mM for the GERS assay. The purity of the product was checked by reverse HPLC with spectrophotometric detection, showing only band absorptions at 254 nm and 292 nm, revealing no presence of unreacted dopamine or isomers (Fig. S1 in ESI†). In addition, the structural identity of the molecule was confirmed by electrospray ion mass spectrometry, giving a 273 *m/z* molecular ion mass.<sup>48</sup>

### GO characterization and preparation of GERS substrates

Commercial GO solution (4 mg mL<sup>-1</sup>) was first characterized by means of XPS, UV-vis, FTIR and Raman spectroscopies (Fig. S2–S4 in ESI†). Spectral profiles are in good agreement with literature. From the aqueous commercial GO, a stock solution of 100 ppm was prepared in deionized water and sonicated for one hour, then used for the substrate preparation. A solid support of aluminum mirror was used for the deposition of GO. A drop of 10  $\mu$ L of GO dispersion (100 ppm) was dropped over the metallic support and dried in a desiccator at room temperature. Finally, 3  $\mu$ L of CysDA, at concentration of 0.1 mM, in acidic water, was dropped over the prepared GO/Al support and then dried under the same conditions. After the deposition of CysDA over the dried GO, the substrate was completely covered by the CysDA solution, without the formation of patterns similar to the typical “coffee ring”, which usually tends to concentrate the analyte in some specific regions. Therefore, we assumed that there was no excess of

CysDA on the GO surface and the washing of the substrate was not a necessary requirement for Raman analysis.

### Raman spectroscopy and GERS assays

Raman spectra measurements were recorded with a WITec alpha300 R (WITec GmbH, Ulm, Germany), using a 672 lines per mm grating and 532 nm laser light excitation, originated from a Nd:YVO<sub>4</sub> green laser. The incident laser beam with a power of 3.56 mW was focused by a 100× objective, Zeiss, with 0.9 NA. First, in an attempt to obtain the normal Raman spectrum of CysDA, the freeze-dried compound was mounted over the aluminum mirror and several punctual spectra were recorded. However, sample hydration was very fast and an intense fluorescence signal covered the full Raman spectrum. In order to avoid that limitation, the prepared substrate of the CysDA/GO/Al system was analyzed. Five punctual Raman spectra were collected randomly in the middle zone of the dropped CysDA/GO complex. Spectra were acquired with 4 s integration time and 20 accumulations. Finally, spectra were cosmic ray removed, base line corrected and averaged for further band assignment.

### Fourier transform infrared spectroscopy assay

Fourier Transform Infrared (FTIR) analysis were made in a Nicolet iS50R Thermo Scientific spectrometer, equipped with an attenuated total reflectance (ATR) diamond crystal. A small amount of the freeze-dried CysDA was spread over the diamond crystal and covered to avoid hydration. Spectra acquisition were collected with 32 scans, 4 cm<sup>-1</sup> of spectral resolution, in the range of 500–3600 cm<sup>-1</sup>. GO characterization by FTIR was performed using a dried powder of GO, mounted over the diamond crystal and measured under the same aforementioned conditions. The study of the physicochemical interactions between GO and CysDA by means of FTIR spectroscopy was performed by mixing the dried powder of GO with the aqueous acidic CysDA to form a semi solid paste. The paste was spread over the diamond crystal and four IR spectra were collected under the same conditions. The working spectrum for each sample was the average of 4 recorded spectra.

### Theoretical methods

In order to study the biomolecule/substrate interactions, as well as the effect of residual solvent molecules, 5-S-cysteinyl-dopamine/graphene oxide (CysDA/GO) complex was analyzed and classified in four groups: (1) [CysDA/GO]·10H<sub>2</sub>O (decahydrate), (2) [CysDA<sup>+</sup>/GO]·10H<sub>2</sub>O (decahydrate), (3) CysDA/GO, and (4) CysDA<sup>+</sup>/GO. The potential energy surfaces of 1 and 2 were explored with the simulated annealing method by the ASCEC code,<sup>49</sup> computing the objective function with the PM7 method as implemented in MOPAC 2016.<sup>50,51</sup> An open conformer of the CysDA molecule was used, avoiding the contact between the amino group of the dopamine and the carboxyl group of the cysteine (Fig. 1c). In view of the fact that the terminal carboxylic groups of the GO sheets have a strong influence on its physical and chemical properties,<sup>38,52</sup> a finite model was chosen for this system (Fig. 1d). Emphasis was made

on the effect of the oxygenated functional groups; three epoxide, five hydroxyl and six carboxyl units were randomly added to a 16-carbon ring polycyclic aromatic hydrocarbon, where only two aromatic rings were conserved. It has been shown that this type of representations of graphene derivatives simulate correctly their main features related to its absorption capabilities.<sup>39,41,44,53</sup> The three lowest conformations of **1** and **2** were optimized at the B3LYP-D3/DZVP level of theory with the NWChem software.<sup>54</sup> Once optimized, all water molecules were removed, and the systems were re-optimized with the same procedure, obtaining in this way minimum conformations for **3** and **4**. We finally obtained twelve stable structures, three for each group. Additionally, interaction energies, along with their decomposition in electrostatic, polarization, dispersion and (Pauli) repulsion terms, of the water-free complexes were calculated using the CE-B3LYP/6-31G(d,p) approach with the Crystal Explorer package.<sup>55</sup> Finally, a QTAIM and NCI analysis were performed with a grid-based algorithm accelerated by GPUs.<sup>56</sup> Molecular graphs and NCI isosurfaces were drawn with VMD.<sup>57</sup>

## Results and discussion

### Raman spectra of CysDA adsorbed on GO substrate

The normal Raman spectrum of CysDA (see Fig. S5, ESI<sup>†</sup>), was recorded by deposition of freeze-dried CysDA onto the aluminum support. The spectrum is mainly dominated by a broad band, from the intrinsic fluorescence of the molecule, which hides most of the expected Raman bands but revealing only one band around 1015 cm<sup>-1</sup>. In order to overcome this limitation, the prepared CysDA/GO/Al system was analyzed by Raman spectroscopy. The corresponding Raman spectrum of the CysDA/GO complex is presented in Fig. 2. The spectrum exhibits a well-defined and resolved set of vibrational bands, without the interference of fluorescence. This demonstrates the quenching efficiency of the fluorescence of CysDA, when deposited onto the GO substrate.

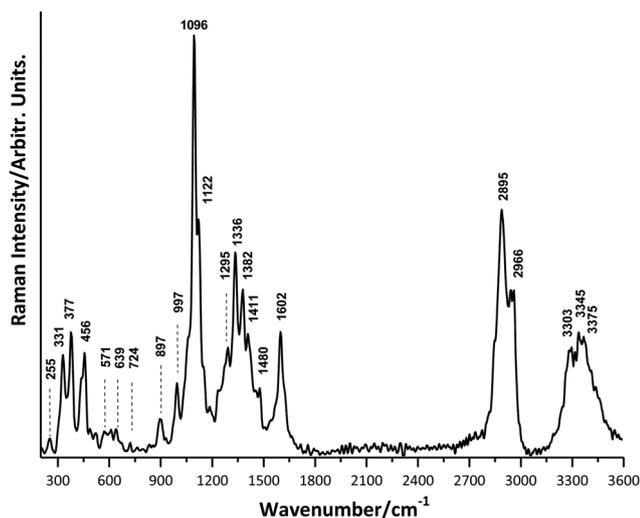


Fig. 2 Raman spectrum of CysDA adsorbed onto the GO/Al support with wavenumber identification bands.

It must be noted here that, at the best of our knowledge, this is the first time that a Raman spectrum of the CysDA conjugate is shown in literature. The band assignment of the full Raman signals were done based on the expected vibrational modes in literature of the CysDA functional groups.<sup>58–60</sup> Raman spectrum of CysDA/GO/Al system exhibits a broad but defined set of bands in the 3400–3300 cm<sup>-1</sup> region, typically from the symmetric and asymmetric N–H stretching vibrational modes. Defined bands at 2966 cm<sup>-1</sup> and 2895 cm<sup>-1</sup> are originated from the contribution of aliphatic C–H and CH<sub>2</sub> stretching modes. The strong and well defined band at 1605 cm<sup>-1</sup> is originated from the C=C aromatic ring stretching, with contribution of the protonated NH<sub>3</sub><sup>+</sup> asymmetric deformation. Region from 1500 cm<sup>-1</sup> to 1200 cm<sup>-1</sup> shows a broad and complex band, which is integrated by contribution in the deformation modes of NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, C–H and COOH, as well as the stretching modes of C–OH and C–N. The strongest and most conspicuous bands are in the 1150–1000 cm<sup>-1</sup> interval, which is dominated by the characteristic 1096 cm<sup>-1</sup> band, originated from the C=C aromatic ring breathing mode of the DA moiety when it is attached to a sulfur atom.<sup>61</sup> Bands in the 600–300 cm<sup>-1</sup> interval are contributions from the O–C–O, C–N–N, C–C–S and aromatic ring deformations, as well as the characteristic C–S stretching vibrational mode. Detailed band assignment is presented in Table 1.

Moreover, the quality of the Raman response of CysDA adsorbed over GO is reflected in the low contributions of the characteristic Raman bands of GO, D and G, at ~1345 cm<sup>-1</sup> and ~1595 cm<sup>-1</sup>, respectively.<sup>31</sup> Summarizing, a good quality Raman spectrum of CysDA is obtained when its acidic solution is deposited onto the GO/Al substrate, indicating that GO quenches the fluorescence of CysDA. This finding opens the

Table 1 Tentative band assignment of the wavenumber and vibrational Raman modes of the experimental CysDA/GO complex

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )	Tentative band assignment
255	Ring def./C–S–C bend.
311	C–C–S bend.
377	Skeletal vibr./O–C–O in-plane bend/CH def.
456	C–O in-plane def./ring out-of-plane
571	CH in-plane ring def.
639	C–S str./CO tors./aliphatic chain C–C def.
724	CH out-of-plane/ring. def.
897	O–H out-of-plane def. vibr./carboxylic acids
997	C–N str./NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> twist/ring. def.
1096	C=C–S ring breathing/C–O–C asym str.
1122	C–N str./NH twist./CH twist.
1295	CH twist./CH aromatic def./ring breathing
1336	OH scissoring/CH twisting/ring def.
1382	COOH bend/C–OH str.
1411	C–H def. due to sulfur/CH <sub>2</sub> def./COH bend.
1480	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> asym. def./CH scissoring
1602	C=C str. ring def./OH scissoring
2895	C–H <sub>2</sub> sym str.
2966	C–H <sub>2</sub> asym str.
3303	N–H <sub>2</sub> sym str./NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym str.
3345	N–H <sub>3</sub> <sup>+</sup> sym str.
3375	N–H <sub>2</sub> asym str.

Abbreviations: str. (stretching), def. (deformation), bend. (bending), twist. (twisting), tors. (torsion), vibr. (vibration), sym. (symmetric) and asym. (asymmetric).

possibility for further development of GO substrates, assisted Raman spectroscopy, for the detection and identification of this metabolite.

Nevertheless, to optimize the performance of the graphenic platform it is important to get additional information about the interaction of CysDA with GO. This information cannot be deduced solely from the data of the obtained experimental Raman spectrum. For this reason, we combined an experimental FTIR spectroscopic analysis with a detailed theoretical simulation of the CysDA/GO complex.

It should be noted that the chemical interactions between the CysDA and the GO are not the only parameters to be considered. In the present study, the surrounding aqueous and acidic media should also play an important role in the entire adsorption picture in the CysDA/GO system. The full environmental conditions are frequently omitted in literature, even when a detailed study by theoretical simulation of the system is performed.

### Chemical adsorption of CysDA on GO by FTIR spectroscopy and quantum chemical models

Due to the fact that FTIR spectral bands are not compromised by fluorescence interferences of the molecule under study, as is the case for Raman spectroscopy, it was possible to obtain the separated infrared spectra of the pure CysDA and the GO and compare them with the spectrum of the CysDA conjugate adsorbed on GO. In this way the changes of the corresponding band array could be correlate with the molecule/substrate interactions.

Nevertheless, the interpretation of the changes observed in those IR spectra is not straightforward. GO is not a stoichiometric compound, their sheets have a wide distribution size and they have not a homogeneous distribution of the oxygenated functional groups. The CysDA/GO system is neither a regular molecular cluster nor a really periodic system. Therefore, the probability that the CysDA was identically adsorbed onto GO, in all the cases and with the same intermolecular interactions is small. Therefore, CysDA adsorption on GO sheets should occurs following different adsorption modes and patterns. Hence the importance of the theoretical model, in order to provide a deeper insight about the possible kind of intermolecular interactions involved in the adsorption phenomena of the CysDA/GO system.

Fig. 3a shows the standard infrared spectrum of the lyophilized CysDA. Again, from the best of our knowledge, this is the first time that an experimental IR spectrum of CysDA is presented in literature. The assignment of the spectral bands was based on the information of classical table charts of IR vibrational modes.<sup>58,62</sup> The stretching vibrational modes of  $\text{NH}_3^+$ , OH, aromatic CH and aliphatic CH/CH<sub>2</sub> appearing at 3480  $\text{cm}^{-1}$ , 3438  $\text{cm}^{-1}$ , 3214  $\text{cm}^{-1}$ , and 3054  $\text{cm}^{-1}$ , respectively. The characteristic C=O stretching vibrational mode of the carboxylic acid is shown at 1731  $\text{cm}^{-1}$ . The double and intense bands at 1627  $\text{cm}^{-1}$  and 1612  $\text{cm}^{-1}$  are due to the C=C stretching mode of the benzene ring when the sulfur atom is adjacent to the catechol OH group. Bands at 1488  $\text{cm}^{-1}$  and 1348  $\text{cm}^{-1}$  are due to the O-H deformation and O-H bending modes of diol groups in the DA moiety, respectively.

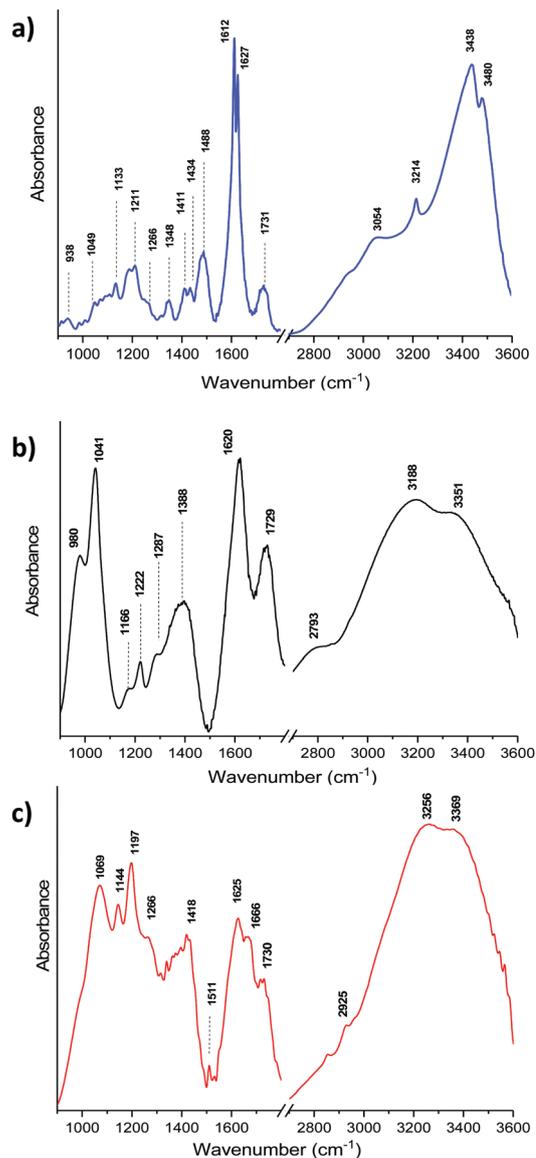


Fig. 3 FTIR spectra of (a) lyophilized CysDA, (b) GO and (c) CysDA/GO complex.

Bands at 1211  $\text{cm}^{-1}$  and 1133  $\text{cm}^{-1}$  are associated with the N-H in-plane bending and C-N stretching, respectively.<sup>63</sup> The fully detailed band assignment is presented in Table 2. These assignments are in agreement with the calculated vibrational frequencies of CysDA molecule, first presented by *Bagheri*, which was obtained by means of molecular simulation in gas phase.<sup>64</sup>

Fig. 3b shows the experimental IR spectrum of GO. The strong and broad bands between 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$  are due to stretching of O-H groups in GO, attached both at the edges or at the basal plane, forming a complex array of hydrogen bonds among neighboring GO sheets and with the remaining water molecules. Intense band at 1729  $\text{cm}^{-1}$  is due to the oxidized C=O carboxyl groups at the edges, while the broad band at 1620  $\text{cm}^{-1}$  is related to the C=C stretching mode of the remaining aromatic rings of non-oxidized graphitic domains.

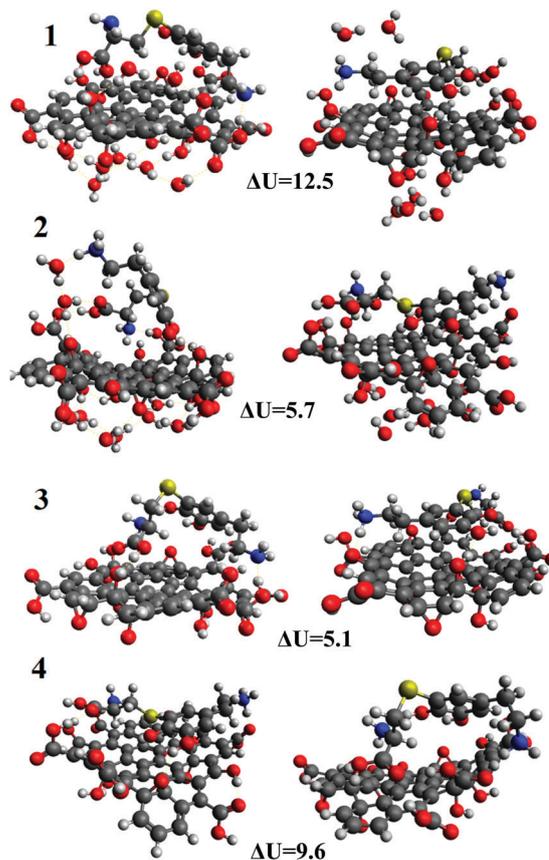
**Table 2** Tentative band assignment of the main FTIR spectral bands for CysDA, GO and the CysDA/GO complex

Wavenumber (cm <sup>-1</sup> )		GO	Tentative band assignment
CysDA	CysDA/GO		
938		980	Aliphatic. C–N str./NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> def.
		1041	C–O str. C–O str. of alkoxy
1049	1069		CH <sub>2</sub> twist. C–O str.
	1144	1166	O–C(O)–C str. of epoxy CH arom. def.
1133			NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> def./C–H arom. def.
1188			C–O str.
	1197		C–O–H out-of-plane bend. C–N str./CH <sub>2</sub> def.
1211		1222	C–O str. of epoxy/C=O def.
1266	1266		CH <sub>2</sub> def.
		1287	C–O str.
1348			O–H def./CH <sub>2</sub> def.
		1388	O–H in-plane bend.
1411	1418		C–O str./O–H def./–CH <sub>2</sub> CO– def.
1434			NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> in-plane bend/C–H def.
1488	1509		O–H def.
1612		1620	C=C str. of phenolic ring C=C str. of arom.
1627	1666		C=C str. of phenolic ring C=C str. arom./C=O str.
1731	1730	1729	C=O str.
3050	2925		CH <sub>2</sub> str. of aliphatic
		3182	O–H str.
3216	3264		NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> str.
3440	3360	3357	O–H str.
3481			N–H <sub>2</sub> str.

Abbreviations: str. (stretching), def. (deformation), bend. (bending), twist. (twisting), arom. (aromatic).

The broad band at 1388 cm<sup>-1</sup> corresponds to OH deformation groups located at the edges of GO sheets, and bands around 1287 cm<sup>-1</sup> are assigned to C–O stretching modes of surface internal epoxy groups, while bands between 1150 cm<sup>-1</sup> and 1250 cm<sup>-1</sup> are associated with random epoxy groups close to the edges. Finally, strong bands in the 950–1050 cm<sup>-1</sup> interval correspond to the C–O stretching modes of alkoxy groups.<sup>65–67</sup> The GO model described in the Experimental section (Fig. 1d) reasonably includes all those aforementioned functional groups, thus the model can be considered a close representative of the GO sample used in this work.

As mentioned above, the analysis of the interactions exhibited in the CysDA/GO structures found by our simulation is a good starting point for understanding the CysDA/GO FTIR experiment. The two most stable DFT optimized geometries of the complexes of groups 1, 2, 3 and 4 are depicted in Fig. 4. From the analysis of these structures, the following general trends can be deduced: the general equilibrium geometries of the CysDA/GO/H<sub>2</sub>O system [groups 1 and 2] shows that water molecules tend to gather together in cages in the opposite side of GO, and only one or two of them interact with GO and CysDA simultaneously. This behavior has been found before in other hydrated complexes.<sup>68,69</sup> However, when water molecules were removed [groups 3 and 4], the CysDA and GO molecules change their previous structures to get closer, indicating a considerable effect of the presence of solvent molecules in the corresponding conformation of the



**Fig. 4** Lower energy configurations of 1, 2, 3 and 4. The most stable structures are in the right column. Energy differences ( $\Delta E$ ) between each configuration are reported in kcal mol<sup>-1</sup>.

CysDA/GO complexes, particularly for those functional groups involved in the intermolecular hydrogen bonds formation. It is important to point out that a spontaneous proton transfer from a hydroxyl group of GO to the amine group of the dopamine moiety was found in the process of geometry optimization of the most stable structure of 1, indicating that carboxylic acids of GO and amine group in dopamine act as an acid–base conjugated pair in this system. This result gives further support to the proposal that under the acidic conditions of the experimental study, the CysDA should be found mostly in its protonated conformation, which also corroborates the previous results described in the experimental Raman and in the FTIR spectra.

Molecular graphs and NCI isosurfaces of the most stable structures of 1, 2, 3 and 4 are depicted in Fig. 5 and 6, respectively. Although the number and sort of interactions is variable in the twelve studied complexes, Fig. 5 and 6 are representative of the general tendencies. Several type of intermolecular contacts, related to the occurrence of bond critical points, were found and classified in two primary groups: hydrogen bonds (HB) and non-hydrogen bonds (NHB). The former can be subdivided in strong (O–H···O, O–H···N and N–H···O) and weak (C–H···O, C–H···C, O–H···C, O–H···S and N–H···C) hydrogen bonds.

Geometrical, topological and energetic criteria were used to classify the non-covalent interactions involved in all structures.

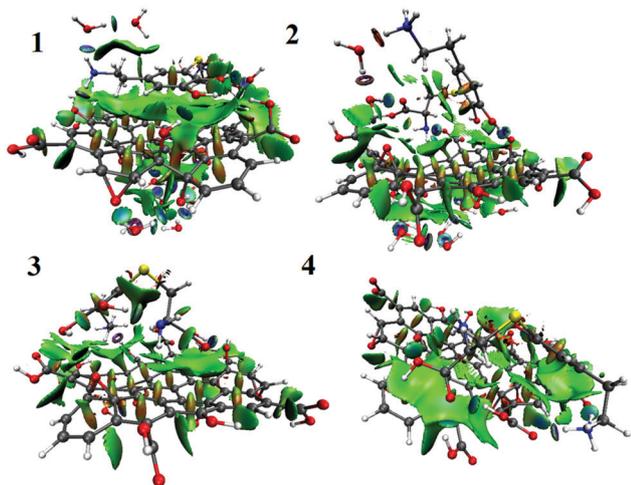


Fig. 5 NCI isosurfaces of the lowest energy conformers of **1**, **2**, **3** and **4** drawn at 0.5 a.u.

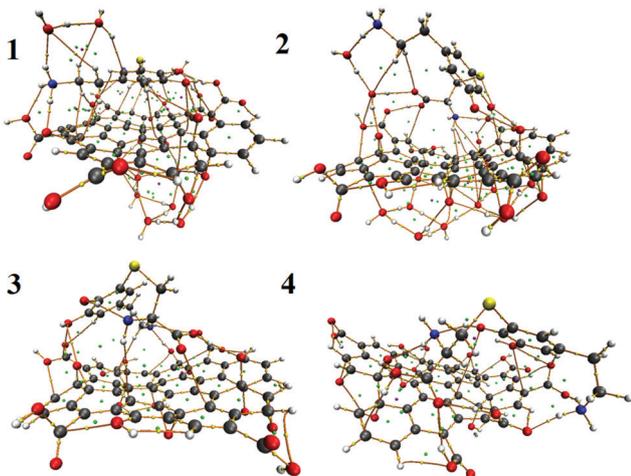


Fig. 6 Molecular graphs of the lowest energy structures of **1**, **2**, **3** and **4**. Critical and ring critical points are depicted in yellow and green colors, respectively. Bond paths are shown in orange.

In the NHB group, a variety of interactions, (whose origin and subclassification is still a matter of debate,<sup>70–79</sup>) were recognized ( $C\cdots C$ ,  $C\cdots O$ ,  $C\cdots N$ ,  $C\cdots S$ ,  $O\cdots O$ ,  $O\cdots N$ ,  $O\cdots S$  and  $H\cdots H$ ). Owing to scarce aromatic character of the GO model used in this work, the  $C\cdots C$  contacts cannot be considered as  $\pi\cdots\pi$  interactions. Except for one, the  $O\cdots S$  contact found in the group 2 structure, which is identified as a chalcogen bond, all the other NHB interactions possess a dispersive behavior, as can be noticed in the green extended irregular surfaces on Fig. 5. Therefore, the adsorption process is compromised between strong specific intermolecular interactions like HB, which usually have an electrostatic character, and NHB contacts related to dispersive effects.

This feasibility of forming HB in the CysDA/GO complexes causes significant modifications in the adsorption phenomenon with respect to processes encountered in biomolecule/graphene structures, where the adsorbates tend to be oriented parallel to the graphene layer and the interaction is predominantly dispersive.<sup>36–41</sup>

Table 3 Total interaction energies and their decomposition in electrostatic (Elec.), polarization (Pol.), dispersion (Disp.) and repulsion (Rep.) contributions of the three most stable complexes of **3** and **4**. All values are in kcal mol<sup>-1</sup>

Complex	Elec.	Pol.	Disp.	Rep.	Total
3a	-102.2	-21.9	-37.7	47.6	-114.3
3b	-44.4	-9.3	-24.5	32.9	-45.3
3c	-22.6	-6.3	-31.5	24.4	-36.0
4a	-66.5	-17.9	-36.3	52.8	-67.9
4b	-65.1	-15.8	-23.1	38.3	-65.7
4c	-56.0	-21.5	-30.6	44.4	-63.7

In contrast, in the **1**, **2**, **3** and **4** structures the CysDA molecule can be either parallel to the GO (distorted) plane or bent and attached to the edge of GO to form HB with the outer hydroxyl or carboxyl groups. With the purpose of quantifying the effect of the different non-covalent interactions in the CysDA/GO systems, the total interaction energies of the three most stable structures of **3** and **4** (named 3a–3c and 4a–4c, respectively), as well as the electrostatic, polarization, dispersion and repulsion components, were computed (see Table 3).

It is observed that the electrostatic contribution prevails over other energetic components whenever the CysDA bends to form HB. This term is particularly large for 3a due to the proton transfer. On the other hand, in the cases where the CysDA is extended over the GO surface, as in 3c, dispersion is the dominant effect. Polarization is more relevant for the protonated and the proton-transfer complexes, increasing the total interaction energies of these systems, in comparison with those of the neutral complexes. Although the repulsion follows the same trend that the total interaction energies, it does not seem to have a clear relation with the HB formation. The interaction energies for the protonated complexes (4a–c) are less sensitive to the geometrical structure.

From the preceding analysis it is clear that in most of the cases the predominant component of the interaction in the CysDA/GO complex is caused substantially by HB, which is in agreement with the experimental data.<sup>42</sup> This fact is expected to influence the IR spectrum profile of the CysDA/GO complex with respect to the isolated moieties (Fig. 3c). Indeed, the comparison of the corresponding IR spectrum shows that in the CysDA/GO system the maximum of the broad band of hydroxyl groups is red-shifted from 3351 cm<sup>-1</sup> in GO and 3438 cm<sup>-1</sup> in the CysDA to 3256 cm<sup>-1</sup> and 3369 cm<sup>-1</sup>, respectively. These changes are followed by the shifting of the OH bending vibrational band from 1348 cm<sup>-1</sup> in CysDA to 1418 cm<sup>-1</sup> in the CysDA/GO. In addition, the shifted and lower intensity of the band at 1488 cm<sup>-1</sup> in CysDA to 1511 cm<sup>-1</sup> in the complex, supports the strong interaction between OH diols of the DA moiety with superficial GO functional groups.<sup>80</sup> Moreover, remarkable band shifting is observed in the 1000–1200 cm<sup>-1</sup> region, coming from the contribution from superficial C–O stretching from alkoxy and epoxy groups in GO, as well as NH<sub>3</sub><sup>+</sup> deformation in CysDA. Those variations are consequence of the multiple hydrogen bonding interactions and also from the influence of dispersive interactions over the aforementioned

superficial functional groups in GO, such as C···O, C···N, O···O, O···N, and O···S.

On the other hand, experimental characteristic bands of the C=C benzene ring stretching at  $1612\text{ cm}^{-1}$  and  $1627\text{ cm}^{-1}$  in CysDA, suffer a strong shift to  $1666\text{ cm}^{-1}$  in the complex, which is accompanied by a minor shift from  $1620\text{ cm}^{-1}$  to  $1625\text{ cm}^{-1}$  in GO. Based on the results of the theoretical calculations, these changes can be associated with the weak O-H···C hydrogen bond formed between the hydroxylated groups of GO with the aromatic ring of CysDA (O-H··· $\pi$  interactions), which are expected to contribute to electrostatic and polarization interactions, along with C···C contacts (some of them related to  $\pi$ ··· $\pi$  interactions), which are governed by dispersion.

Finally, an additional way to examine the influence of each type of interaction is by analyzing the values of the electron density at the bond critical points ( $\rho_{\text{BCP}}$ ), as well as the application of the Espinosa–Molins–Lecomte (EML) approximation to estimate the relative strength of each hydrogen bond.<sup>81</sup> As can be seen in Table S1 (ESI<sup>†</sup>), the  $\rho_{\text{BCP}}$  is in most of the cases one order of magnitude larger for the HB, indicating that those prevail over NHB in the CysDA/GO complex stabilization, whether or not the CysDA is protonated. For the interaction energies calculated *via* the EML equation, a decreasing monotonic relation with  $\rho_{\text{BCP}}$  is observed (see Fig. 7). It can also be noted that some O-H···S contacts can be considered strong HB according to the energetic criteria, reaching up to  $-4.8\text{ kcal mol}^{-1}$ . Besides, some HB, particularly N-H···O contacts, can reach values as large as  $-25.7\text{ kcal mol}^{-1}$ , and can be separated into a very strong HB group. This result could explain the above-mentioned strong shifting in the  $1300\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$  IR region of the CysDA/GO complex, influenced by N-H in-plane bending and C–N stretching modes. The aforementioned outcome is also independent of the protonation state of CysDA. From Fig. 7 it is also clear that in the hydrated complexes the HB interaction, O-H···O, is enhanced.

Lastly, the classification of HB using the geometric criteria, which consists on analyzing the H···Y and X···Y distances ( $d_{\text{H}\cdots\text{Y}}$  and  $d_{\text{X}\cdots\text{Y}}$ ,<sup>82</sup> respectively, where X is the atom to which H is covalently bonded and Y is the atom forming the HB), as well as the X–H···Y angles ( $\theta$ ), reveals that the amount of strong HB contacts is slightly lower than that of the weak HB for the dehydrated complexes, but is larger for the former in the presence of water molecules. This result evidences an additional stabilization of solvent molecules in the CysDA/GO complexes (Fig. S6, ESI<sup>†</sup>). Those results, in agreement with the energetic and the FTIR analysis, allow us to conclude that hydrogen bonding between the CysDA and GO, either in the surface or on its edge, is the most important interaction contributing to the adsorption process in the CysDA/GO system.

In agreement with the aforementioned findings, there are some previous experimental studies of the interaction between GO and dopamine (DA) in aqueous media, concluding that DA strongly adsorbs on GO mainly by non-covalent interactions. Even the interaction between DA and GO was found stronger in comparison to that of rhodamine6 green (R6G) over GO, analyzed in the same study.<sup>83</sup> From this previous report, and

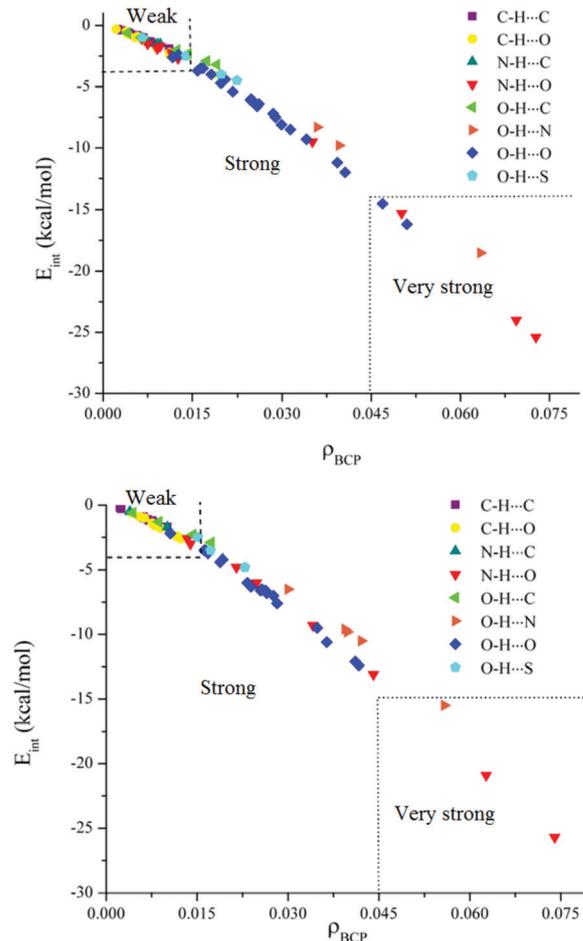


Fig. 7 Interaction energy (calculated *via* the EML equation) vs.  $\rho_{\text{BCP}}$  of the hydrated systems (top) and non-hydrated (bottom) systems.

taking into account that the CysDA molecule contains a DA moiety, a similar adsorption mechanism should be expected for CysDA over GO. The present work gives further elucidation of the adsorption process, which provides information for further design of a novel biosensor development, based on the detection of the CysDA metabolite.

## Conclusions

In this work we demonstrate that using graphene oxide (GO) as a substrate is a good strategy for the detection and identification of CysDA by Raman spectroscopy. The interaction of CysDA with GO leads to the quenching of the fluorescence of CysDA. This strategy lead to obtain, for the first time, the Raman spectrum of CysDA with well-resolved bands that can be fully assigned. The assignment of these bands is consistent with the molecular structure of CysDA, showing that the interaction with GO does not result in a noticeable perturbation of its normal vibration modes. The FTIR experimental spectra of CysDA, GO and CysDA/GO, combined with quantum chemistry methods provide a way to understand the non-covalent interactions that are responsible for the adsorption of CysDA over GO.

A wide variety of intermolecular interactions were found in the CysDA/GO system, classified as follow: hydrogen bonds (O–H···O, O–H···N, N–H···O, C–H···O, C–H···C, O, –H···C, O–H···S and N–H···C) and non-hydrogen bonds (C···C, C···O, C···N, C···S, O···O, O···N, O···S and H···H). Hydrogen bonds stabilize CysDA over GO by electrostatic and polarization effects, while the non-hydrogen bonds have a dispersive origin. The two types of interactions allow us to explain the main band shifting observed in the FTIR spectrum of the CysDA/GO complex, especially for the OH bending vibrational bands and the C=C aromatic stretching modes of the CysDA ring. Furthermore, solvent molecules enhance the adsorption of CysDA over GO. The strategy used in this work could be applied for a further development of substrates based on GO-assisted Raman spectroscopy for the detection of CysDA, as a biomarker for PD. Moreover, considering the findings in this work, we propose that the functionalization of the GO substrate with amine groups will further enhance the CysDA adsorption. Our group will continue to test this hypothesis, in the near future, with additional experimental and theoretical analyses.

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

Authors thank to the financial support to UNAM through the IN-111216 and IN-102917 PAPIIT-UNAM research projects. Financial support was also provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) through the project CONACYT 2014-Fronteras de la Ciencia-2016. Isidro Badillo-Ramírez is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and was supported by CONACYT (grant number 599497). EOC thanks to the support of CONACYT (grant number 619615). IBR, JMS and EOC, thank to the Laboratorio Universitario de Caracterización Espectroscópica, LUCE-ICAT-UNAM for the spectroscopic characterization of the samples and to Dr Selene R. Islas for the technical support. BLR, RV and JG thank to the facilities provided by the Laboratorio de Supercómputo y Visualización en Paralelo at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. BLR thanks to UAM for a postdoctoral fellowship.

## Notes and references

- F. Zhang and G. Dryhurst, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 1084.
- C. Aureli, T. Cassano, A. Masci, A. Francioso, S. Martire, A. Cociolo, S. Chichiarelli, A. Romano, S. Gaetani, P. Mancini, M. Fontana, M. d'Erme and L. Mosca, *J. Neurosci. Res.*, 2014, **92**, 347.
- J. P. E. Spencer, P. Jenner, S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden and B. Halliwell, *J. Neurochem.*, 1998, **71**, 2112.
- I. Badillo-Ramírez, J. M. Saniger and S. Rivas-Arancibia, *Neurochem. Int.*, 2019, **129**, 104514.
- E. Rosengren, E. Linder-Eliasson and A. Carlsson, *J. Neural Transm.*, 1985, **63**, 247.
- B. Fornstedt, A. Brun, E. Rosengren and A. Carlsson, *J. Neural Transm.*, 1989, **104**, 931.
- S. Ito, T. Kato and K. Fujita, *Chromatographia*, 1986, **21**, 645.
- F. C. Cheng, J. S. Kuo, L. G. Chia and G. Dryhurst, *J. Neural Transm.*, 1996, **103**, 433.
- A. Carlsson and B. Fornstedt, *Neurology*, 1991, **41**, 50.
- D. Vauzour, J. T. Pinto, A. J. Cooper and J. P. E. Spencer, *Biochem. J.*, 2014, **463**, 41.
- D. S. Goldstein, C. Holmes, P. Sullivan, Y. Jinsmaa, I. J. Kopin and Y. Sharabi, *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2016, **31**, 79.
- D. I. Ellis, D. P. Cowcher, L. Ashton, S. O'Hagan and R. Goodacre, *Analyst*, 2013, **138**, 3871.
- C. Krafft and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 699.
- H. J. Butler, S. W. Fogarty, J. G. Kerns, P. L. Martin-Hirsch, N. J. Fullwood and F. L. Martin, *Analyst*, 2015, **140**, 3090.
- F. Reil, U. Hohenester, J. R. Krenn and A. Leitner, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 4128.
- T. J. Moore, A. S. Moody, T. D. Payne, G. M. Sarabia, A. R. Daniel and B. Sharma, *Biosensors*, 2018, **8**, 1.
- J. A. Dieringer, A. D. McFarland, N. C. Shah, D. A. Stuart, A. V. Whitney, C. R. Yonzon, M. A. Young, X. Y. Zhang and R. P. Van Duyne, *Faraday Discuss.*, 2006, **132**, 9.
- X. Ling and J. Zhang, *Small*, 2010, **6**, 2020.
- S. Huang, X. Ling, L. Liang, Y. Song, W. Fang, J. Zhang, J. Kong, V. Meunier and M. S. Dresselhaus, *Nano Lett.*, 2015, **15**, 2892.
- P. G. Vianna, D. Grasseschi, G. K. B. Costa, I. C. S. Carvalho, S. H. Domingues, J. Fontana and C. J. S. De Matos, *ACS Photonics*, 2016, **3**, 1027.
- N. Zhang, L. Tong and J. Zhang, *Chem. Mater.*, 2016, **28**, 6426.
- Y. Li, L. L. Qu, D. W. Li, Q. X. Song, F. Fathi and Y. T. Long, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, **43**, 94.
- Y. Zhang, S. Liu, L. Wang, X. Qin, J. Tian, W. Lu, G. Chang and X. Sun, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 538.
- Y. Xie, Y. Li, L. Niu, H. Wang, H. Qian and W. Yao, *Talanta*, 2012, **100**, 32.
- J. Lee, J. Kim, S. Kim and D. H. Min, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2016, **105**, 275.
- W. Ren, Y. Fang and E. Wang, *ACS Nano*, 2011, **5**, 6425.
- E. de la O-Cuevas, I. Badillo-Ramírez, S. R. Islas, C. Araujo-Andrade and J. M. Saniger, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 12269.
- Z. Fan, R. Kanchanapally and P. C. Ray, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, **4**, 3813.
- B. Gupta, N. Kumar, K. Panda, V. Kanan and S. Joshi, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1.
- J. Dai, G. Wang, L. Ma and C. Wu, *J. Mater. Sci.*, 2015, **50**, 3895.
- H. Yang, H. Hu, Z. Ni, C. K. Poh, C. Cong, J. Lin and T. Yu, *Carbon*, 2013, **62**, 422.
- R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Clarendon Press, Oxford, 1990.
- E. R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sanchez, J. Contreras-Garcia, A. J. Cohen and W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 6498.

- 34 B. G. Oliveira, *Struct. Chem.*, 2014, **25**, 745.
- 35 R. Chaudret, B. de Courcy, J. Contreras-García, E. Gloaguen, A. Zehnacker-Rentien, M. Mons and J.-P. Piquemal, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 9876.
- 36 H. T. Larijani, M. D. Ganji and M. Jahanshahi, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 92843.
- 37 D. L. Carballeira, N. Ramos-Berdullas, I. Pérez-Juste, J. L. C. Fajín, M. N. D. Cordeiro and M. Mandado, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 15312.
- 38 S. J. Rodríguez, L. Makinistian and E. A. Albanesi, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2016, **705**, 012012.
- 39 P. Singla, M. Riyaz, S. Singhal and N. Goel, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 5597.
- 40 H. T. Larijani, M. Jahanshahi, M. D. Ganji and M. H. Kiani, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 1896.
- 41 R. Zhiani, *Appl. Surf. Sci.*, 2017, **409**, 35.
- 42 S. Pandit and M. De, *J. Phys. Chem. C*, 2017, **121**, 600.
- 43 D. Zhao, L. Li and J. Zhou, *Appl. Surf. Sci.*, 2018, **428**, 825.
- 44 J. Ebrahimi, M. G. Ahangari and M. Jahanshahi, *Appl. Surf. Sci.*, 2018, **440**, 778.
- 45 S. J. Rodríguez and E. A. Albanesi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2019, **21**, 597–606.
- 46 L. Mosca, I. Tempera, E. Lendaro, L. Di Francesco and M. D'Erme, *J. Neurosci. Res.*, 2008, **86**, 954.
- 47 F. Chioccare and E. Novellino, *Synth. Commun.*, 1986, **16**, 967.
- 48 F. Zhang and G. Dryhurst, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 1084.
- 49 J. J. P. Stewart, *J. Mol. Model.*, 2013, **19**, 1.
- 50 J. J. P. Stewart, *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 1990, **4**, 1.
- 51 MOPAC, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <https://OpenMOPAC.net>.
- 52 B. Konkena and S. Vasudevan, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 867.
- 53 Y. Ai, Y. Liu, W. Lan, J. Jin, J. Xing, Y. Zou, C. Zhao and X. Wang, *Chem. Eng. J.*, 2018, **343**, 460.
- 54 M. Valiev, E. J. Bylaska, N. Govind, K. Kowalski, T. P. Straatsma, H. J. J. van Dam, D. Wang, J. Nieplocha, E. Apra, T. L. Windus and W. A. de Jong, *Comput. Phys. Commun.*, 2010, **181**, 1477.
- 55 M. J. Turner, J. J. McKinnon, S. K. Wolff, D. J. Grimwood, P. R. Spackman, D. Jayatilaka and M. A. Spackman, *Crystal-Explorer17*, University of Western Australia, 2017, <http://hirshfeldsurface.net>.
- 56 R. Hernández-Esparza, S. Mejía-Chica, A. D. Zapata-Escobar, A. Guevara-García, A. Martínez-Melchor, J. M. Hernández-Pérez, R. Vargas and J. Garza, *J. Comput. Chem.*, 2014, **35**, 2272.
- 57 W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 33.
- 58 D. Lin-Vien, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, New York, 1991, p. 4225.
- 59 G. Varsanyi, *Assignments for Vibrational Spectra of Seven Hundred Benzene Derivatives*, Academia Kiado, Budapest, 1974.
- 60 S. S. Yi, K. Kim and M. S. Kim, *J. Raman Spectrosc.*, 1993, **24**, 213.
- 61 Y. J. Kwon, S. B. Lee, K. Kim and M. S. Kim, *J. Mol. Struct.*, 1994, **318**, 25.
- 62 L. J. Bellamy, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Springer, Netherlands, 1975.
- 63 A. Lagutschenkoy, J. Langer, G. Berden, J. Oomens and O. Dopfer, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 2815.
- 64 A. Bagheri Gh, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 2010, **24**, 227.
- 65 G. X. Wang, B. Wang, J. Park, J. Yang, X. P. Shen and J. Yao, *Carbon*, 2009, **47**, 68.
- 66 D. C. Marcano, D. V. Kosynkin, J. M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Z. Sun, A. Slesarev, L. B. Alemany, W. Lu and J. M. Tour, *ACS Nano*, 2010, **4**, 4806.
- 67 J. I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martínez-Alonso and J. M. D. Tascón, *Langmuir*, 2008, **24**, 10560.
- 68 J.-R. Salazar-Cano, A. Guevara-García, R. Vargas, A. Restrepo and J. Garza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, **18**, 23508.
- 69 E. García-Hernández, R. Flores-Moreno, Á. Vázquez-Mayagoitia, R. Vargas and J. Garza, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 965.
- 70 A. Sirohiwal, V. R. Hathwar, D. Dey, R. Regunathan and D. Chopra, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci., Cryst. Eng. Mater.*, 2017, **73**, 140–152.
- 71 A. M. Koochi, Z. Mahdaviifar and S. Noorizadeh, *Chemistry-Select*, 2017, **2**, 2713.
- 72 D. J. Pascoe, K. B. Ling and S. L. Cockcroft, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 15160.
- 73 K. T. Mahmudov, M. N. Kopylovich, M. F. C. G. da Silva and A. J. Pombeiro, *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 10121.
- 74 S. Sarkar, M. S. Pavan and T. G. Row, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 2330.
- 75 A. Bauzá, T. J. Mooibroek and A. Frontera, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 12317.
- 76 A. Bauzá, T. J. Mooibroek and A. Frontera, *Chem. Rec.*, 2016, **16**, 473.
- 77 A. J. Edwards, C. F. Mackenzie, P. R. Spackman, D. Jayatilaka and M. A. Spackman, *Faraday Discuss.*, 2017, **203**, 93.
- 78 G. Cavallo, P. Metrangolo, T. Pilati, G. Resnati and G. Terraneo, *Cryst. Growth Des.*, 2014, **14**, 2697.
- 79 J. S. Murray, P. Lane and P. Politzer, *J. Mol. Model.*, 2009, **15**, 723.
- 80 J. L. Chen, X. P. Yan, K. Meng and S. F. Wang, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 8787.
- 81 E. Espinosa, E. Molins and C. Lecomte, *Chem. Phys. Lett.*, 1998, **285**, 170.
- 82 G. R. Desiraju and S. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*, International Union of Crystallography Monographs on Crystallography, 2001.
- 83 H. Ren, D. D. Kulkarni, R. Kodiyath, W. Xu, I. Choi and V. V. Tsukruk, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 2459.