



**INSTITUTO NACIONAL DE
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA
MANUEL VELASCO SUAREZ**
Departamento de Neuroquímica



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**
Posgrado en Medicina

**BIOMARCADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO
EN 4 ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS.
ESPECIFICIDAD Y CORRELACIÓN CON LA EXPLORACIÓN
CLINIMÉTRICA**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
M. en C. Marie-Catherine Boll Woehrlen**

**Tutor:
Luis Camilo Rios Castañeda**

Septiembre 2005

m346204



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis esta dedicada a mi querido esposo
Fernando Chico Ponce de León
Quien siempre me alentó en todo lo que anhelo
Sin su apoyo no hubiera realizado este trabajo.

Agradezco infinitamente al Dr. Camilo Rios quien me permitio formar parte de su
equipo de trabajo y me brinda desde 1996 consejos valiosos, su confianza
y un apoyo incondicional.
Ha sido un ejemplo con sus conocimientos.
Es el inspirador y asesor del presente trabajo.

Agradezco igualmente al Dr. Julio Sotelo quien hace varios años me orientó hacia
la investigación. Fue tutor de mi trabajo de maestría y es el actual director de mi
alma mater el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
"Manuel Velasco Suárez"

Agradezco a la Dra. Elisa Alonso, miembro del Comité Tutorial.
La admiro desde mi residencia por su organización y claridad.
Tengo el honor de colaborar en algunos trabajos con su equipo de Neurogenética.

Agradezco igualmente a la Dra. Teresa Corona, miembro del Comité Tutorial.
En varias ocasiones me brindo su apoyo.
Por sus valiosos consejos y su amistad

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ma. Catherine Ball

Wachrup

FECHA: 2 junio 2005

FIRMA: [Firma]

GRACIAS

**Vaya mi especial agradecimiento a todos los integrantes del
jurado para los exámenes de candidatura y de grado
quienes aceptaron gentilmente juzgar mi trabajo y ayudarme con sus
atinadas observaciones.**

Dr. J. Miguel Cervantes Alfaro

Dra. Victoria Chagoya Hazas de Sánchez

Dra. Teresa Corona Vázquez

Dr. René R. Drucker Colín

Dr. J. Efrén Israel Grijalva Otero

Dra. Ana María López Colomé

Dr. Sergio Ponce de León

Dra. Selva Rivas Arancibia

Dra. María Sitges Berrondo

Dr. Julio Sotelo M.

**A mis colegas los neurólogos del
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
quienes se empeñan en mantener el nivel de excelencia de la Institución**

**A mis compañeros investigadores del Departamento de Neuroquímica
que tuvieron una participación importante en el presente trabajo:**

Mireya Alcaraz-Zubeldia

Sergio Montes

Camilo Rios

**A mis otros amigos Investigadores de Neuroquímica,
Neuropsicofarmacología, Neuroinmunología, Nutrición, Morfología,
Neuropatología, Neurotoxicología , Neurogenética, Neuropsicología,
Psicología experimental, Laboratorio de aminoácidos excitatorios,
Laboratorio de Sustancia Reticular, Laboratorio de Neurofisiología,
Investigación clínica.**

INDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	8
1) La enfermedad de Parkinson	8
2) La enfermedad de Alzheimer	11
3) La enfermedad de Huntington	12
4) La esclerosis lateral amiotrófica	14
5) Teorías patogénicas de la neurodegeneración	16
a) Los radicales libres	
b) La inhibición energética	19
c) La excitotoxicidad	
d) La superóxido dismutasa	20
e) La ceruloplasmina	22
f) Papel de la oxidación en la patología neurodegenerativa.	24
OBJETIVOS y METAS	26
HIPOTESIS	27
METODOLOGÍA	28
1) Evaluación clínica: criterios diagnóstico	29
2) Evaluación clínica: clinimetría	36
3) Mediciones de los marcadores	51
4) Análisis estadístico	58
5) Consideraciones éticas	59

RESULTADOS	
1) Datos socio-demográficos y clínicos de la serie de pacientes	62
2) Resultado de la medición de los marcadores	67
DISCUSION	75
CONCLUSION	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ARTÍCULOS PUBLICADOS	94

INDICE DE ABREVIATURAS

AD	Enfermedad de Alzheimer
ALS o ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
APP	Proteína precursor del amiloide
ATP	Trifosfato de adenosina
ADN	Acido desoxiribonucleico
CP	Ceruloplasmina (ferroxidase)
Cu	Cobre
Da	Peso molecular en Dalton
EC-SOD o SOD ₃	Forma extracelular de la SOD
EE	Error estándar del promedio
EEG	Electroencefalograma
e NOS	Forma endotelial de sintasa del óxido nítrico
FO	Examen del fondo de ojo
Glu	Glutamato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HD	Enfermedad de Huntington
IMAO-B	Inhibidor de la monoamina-oxidasa del tipo B
QUIN	Acido quilolínico (neurotóxico)
LCR	Líquido cefalorraquideo
MAO	Enzima monoamina-oxidasa
MDA	Malondialdehido
M.E.	Microscopia electrónica

MMSE	Minimental State Examination (examen breve del estado mental)
MNI	Motoneurona inferior
MNS	Motoneurona superior (piramidal)
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinium, metabolito activo de la MPTP
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NCC	neurocisticercosis
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
NOS	Sintasa de óxido nítrico
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH ⁻	Radial hidroxilo
ONOO ⁻	peroxinitrito
PL	Punción lumbar
Rc	Receptor
SOD 1	Superóxido-dismutasa , forma dependiente de Cu/Zn
SNC	Sistema nervioso central
SNG	Sonda naso-gástrica
UHDRS	Unified Huntington Disease rating scale (escala unificada de evaluación de la enfermedad de Huntington)
UI ó IU	Unidad Internacional
UPDRS	Unified Parkinson Disease rating scale (escala unificada de evaluación de la enfermedad de Parkinson)
X/XO	Xantine/Xantine oxidasa
Zn	zinc

RESUMEN.

Fundamentos: Existen múltiples evidencias en la literatura del papel del estrés oxidativo, de la falla mitocondrial y de la excitotoxicidad como mecanismos de muerte neuronal en la patología neurodegenerativa. La sobreproducción de radicales libres y la deficiencia de los mecanismos de defensa que constituye el llamado estrés oxidativo pueden ser causa o consecuencia de las otras fallas neuronales y se caracteriza por cambios bioquímicos cuantificables tanto en tejido *post mortem* como *in vivo* mediante técnicas de neuroimagen o bioquímicas especialmente en líquido cefalorraquídeo (LCR).

Objetivo: Cuantificar en muestras de LCR de pacientes con una de las 4 enfermedades neurodegenerativas más frecuentes en nuestro medio, los productos de la peroxidación lipídica y de otras reacciones oxidativas, así como la actividad de proteínas antioxidantes y correlacionar estos marcadores con el estado clínico de cada enfermedad, después de conocer los valores normales y buscar el mejor indicador de neurodegeneración para cada padecimiento.

Métodos: Se estableció durante 2 años el registro de los pacientes de nuevo diagnóstico del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS" con enfermedades de Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Se propuso a todos aquellos que cumplieran con los criterios establecidos, entrar en un protocolo clínico y bioquímico con punción lumbar (PL). Se seleccionó igualmente un grupo control formado por sujetos pareados por edad y género y con una indicación de PL. Se eliminaron de la base de datos a todos los LCR con células (más de 5/c) o con proteinorraquia aumentada. Las alícuotas de LCR se congelaron a -80°C hasta su análisis. Se determinaron los productos de lipoperoxidación con espectrofotometría de fluorescencia, los nitritos+nitratos por cromatografía de líquidos, las actividades ferroxidasa y superóxido-dismutasa (SOD) con técnicas enzimáticas, el cobre libre por absorción atómica después de microfiltración.

Resultados: Todos los marcadores presentaron cambios:

- 1) Los metabolitos estables nitratos+nitritos se encontraron significativamente aumentados en las 4 enfermedades neurodegenerativas y los productos de lipoperoxidación en tres (no se encontró aumento significativo en la ELA)
- 2) Los productos de lipoperoxidación y los nitratos se relacionaron con el tiempo de evolución y la gravedad clínica en todas las entidades.
- 3) La disminución de la actividad enzimática de la SOD dependiente de Cu/Zn caracterizó las 4 enfermedades mientras la baja actividad ferroxidasa asociada con la ceruloplasmina cerebral caracterizó las enfermedades de Parkinson y de Huntington y no la ELA.
- 4) En la ELA, la baja actividad SOD se relacionó con la evolución clínica.
- 5) Finalmente encontramos que el cobre libre es un indicador de evolución que se encuentra significativamente aumentado en la enfermedad de Parkinson en la cual valores altos de este marcador son específicos de la enfermedad.

Conclusión:

El presente trabajo aporta nuevas evidencias de un incremento de reacciones oxidativas concomitantes con la falla de algunas proteínas antioxidantes en la patología neurodegenerativa. La ferroxidasa y el cobre no unido a proteína, con valores normales en la ELA, se encuentran significativamente alterados en las 3 otras enfermedades. En la ELA encontramos evidencias de un papel preponderante del óxido nítrico y de la deficiente actividad SOD.

ABSTRACT:

Background.- Scientific literature, in particular of the 90's, provides a wealth of evidence on the important role of oxidative stress, failure of energy production by mitochondria and excitotoxicity as the main mechanisms of neuronal death in degenerative diseases. Overproduction of free radicals and increasing lack of antioxidant defenses, which together make up the oxidative stress, could be a cause as well as a consequence of the other mechanisms and are the source of biochemical changes that can be measured in vivo in blood or in the cerebrospinal fluid (CSF).

Objective.- To quantify lipoperoxidation and other oxidative products as well as the activity of antioxidant enzymes in CSF samples from patients with neurodegenerative diseases in order to establish the relationship between those markers and clinical stages of each disease after identifying normal values in control subjects, and to find the better marker of neurodegeneration for each disease.

Methods.- In the course of 2 years, we recorded data from all new patients at INNN MVS with a diagnosis of either one of the 4 most frequent neurodegenerative disease in our Institute: Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), Huntington's disease (HD) and lateral amyotrophic sclerosis (ALS). All patients fulfilling the inclusion criteria were asked for their authorization to undergo clinical studies and biochemical assays using lumbar puncture. A control group composed of age -and gender-paired subjects scheduled for lumbar puncture was also selected. Subjects with abnormal cell counts and the presence of increased protein concentration in CSF were removed from the database. CSF Aliquots were stored at -80°C before undertaking biochemical measurements. Fluorescent lipoperoxidation products, nitrites+nitrates concentration reflecting nitric oxide production, superoxide dismutase activity, ferroxidase (ceruloplasmin) activity and finely copper ion production, reflecting lack of protein-bound copper, were performed.

Results.- All biomarkers evidenced significant changes:

- 1) Nitrates were increased in the 4 degenerative diseases and lipoperoxidation products in 3 (excepting ALS).
- 2) Products of lipoperoxidation and nitrates were correlated with evolution and severity of each the 4 degenerative diseases.
- 3) A slightly decreased Cu/Zn SOD activity characterized the 4 diseases and a significantly decreased ferroxidase activity was found in PD, HD and AD, agreeing with findings of iron deposition in these pathological entities.
- 4) In ALS, a decreased SOD activity was related to clinical evolution.
- 5) Free copper was found to be increased in CSF of PD, HD and AD and appeared to be a good biomarker of PD.

Conclusion.- The present work provides new evidence of increased oxidative activity accompanying lack of some proteins with antioxidant activity in neurodegenerative pathology. Our main results were: lack of ferroxidase activity, of brain ceruloplasmin, and the increased copper ion concentration in CSF of PD, HD and AD whereas these biomarkers provide a different pattern in ALS.

INTRODUCCION:

La etiología de las enfermedades degenerativas del Sistema Nervioso Central es aún desconocida. Sin embargo, los recientes avances de la investigación neuroquímica en particular, ponen en evidencia el papel de la falla energética (Di Mauro 1993; Beal y col. 1998; 1999; 2000; Schon y Manfredi 2003), de la excitotoxicidad mediada por glutamato (Rothstein 1992; Price 1999) y del daño oxidativo (Rojas 1993; Ischiropoulos y Beckman 2003) como mecanismos de la muerte neuronal que caracteriza estas enfermedades. Existe una compleja interacción entre estos 3 principales mecanismos. Un metabolismo energético deficiente, acompañado de una reducción de las concentraciones de ATP lleva a la depolarización neuronal, la cual produce liberación de amino-ácidos excitatorios (principalmente el glutamato) y a su vez a la activación de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA) induciendo un aumento del ión calcio (Ca^{2+}) intracelular. La mitocondria, principal amortiguador del Ca^{2+} intracelular cuando se han sobrepasado las posibilidades de retículo endoplásmico, también puede generar más radicales libres en caso de desequilibrio, lo que repercute sobre el DNA mitocondrial y las enzimas de la cadena respiratoria. Hay evidencias experimentales del exceso de producción de radicales libres, o daño oxidante acelerado, en las enfermedades de Huntington (Ross 1997), Alzheimer (Multhaup 1997), Parkinson (Jenner 1996) y la esclerosis lateral amiotrófica (Brooke 1996). Las expectativas de nuevos tratamientos de dichas enfermedades incluyen a los antagonistas de receptores a aminoácidos excitatorios, al uso de factores tróficos y a los mecanismos protectores contra los radicales libres (Beal 2001).

ANTECEDENTES:

1) La enfermedad de Parkinson:

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

La forma idiopática o enfermedad de Parkinson es probablemente la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en México. Su diagnóstico es clínico y su confirmación es anatomopatológica (Hughes 1992), macroscópicamente con la despigmentación de la sustancia negra y microscópicamente con los depósitos de hierro en dicho núcleo y la presencia de cuerpos de inclusión citoplásmicos, los cuerpos de Lewy.

La causa de la degeneración de las células dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson es todavía desconocida. En el estado actual del conocimiento se pueden mencionar factores ambientales, como los generadores de reacciones oxidativas, que llevan a la muerte neuronal en pacientes con alguna predisposición genética a ser más susceptibles a las neurotoxinas ambientales (Hertzman 1990). Esta hipótesis se sustenta en que, agentes tóxicos, tales como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y el plaguicida, paraquat, inducen la producción de radicales libres inestables que interactúan con los lípidos poliinsaturados de las

membranas, y llevan a la muerte neuronal específica de las células de la sustancia negra, tal como ocurre en el Parkinson idiopático (Jenner y col. 1992). Algunos estudios *post mortem* han revelado un incremento en los niveles de peroxidación de lípidos, lo cual ha sido asociado a un incremento en los niveles de hierro en la *substantia nigra pars compacta* (Dexter y col. 1989). Además se ha observado un incremento en la relación de Fe (II) a Fe (III), que es de 2:1 en los cerebros normales con respecto a un 1:2 evaluado para los cerebros de pacientes con Parkinson (Sofic 1988). Estas alteraciones podrían facilitar la participación del hierro en reacciones de óxido-reducción, favoreciendo la sobreproducción de radicales libres y la muerte neuronal. Alteraciones de diversos sistemas de defensa han podido ser observados tales como una disminución en el contenido de glutatión reducido (GSH) (Jenner 1992), y alteraciones de enzimas antioxidantes. Un ejemplo de estas enzimas es la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), cuya actividad se encuentra elevada, quizás como respuesta al estrés oxidante (Saggu 1989).

ESTUDIOS EN MODELOS EXPERIMENTALES:

Fue en 1982 que se describió un brote de parkinsonismo agudo en jóvenes californianos adictos a la heroína. Esto permitió descubrir los efectos del análogo sintético de la meperidina: el MPTP que reproduce sorprendentemente los síntomas del Parkinson. La administración parenteral de esta neurotoxina en primates no humanos permitió estudiar el comportamiento de los animales el cual fue similar al de los humanos con enfermedad de Parkinson así como la afección neuropatológica de la sustancia negra (Langston y col. 1984). Este mismo año se descubrió el metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) de la MPTP y el bloqueo de la biotransformación de MPTP en MPP⁺ al añadir inhibidores de la monoamino-oxidasa tipo B a un medio compuesto de fracciones mitocondriales incubadas (Tetrud y Langston 1992).

Se concluyó que la MAO-B cerebral es responsable de la conversión de MPTP en MPP+ y poco después varios equipos sometieron estos modelos de Parkinson a tratamientos inhibidores de la enzima tales como la pargilina y la selegilina. Este último IMAO-B no solamente protege contra la toxicidad de la MPTP, sino que también fue utilizado en los 70's en sujetos con enfermedad de Parkinson en Europa. El estudio clínico longitudinal DATATOP demostró en 1987 la eficacia de la selegilina en estadios iniciales de la enfermedad de Parkinson, retardando significativamente el requerimiento de levodopa y se propuso atribuir a este fármaco un papel de neuroprotección ya que al inhibir la degradación de las monoaminas, disminuye la producción de los radicales libres formados por este catabolismo. A la fecha no se pudo demostrar aún el efecto neuroprotector de ningún fármaco en los pacientes.

BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

- **La historia familiar** en pacientes con enfermedad de Parkinson revela un caso de temblor en un pariente de primer o segundo grado en el rango de 6 a 26% mientras en controles sanos este rango es de 1 a 14%. El estudio se basa en la revisión de 9 series (Foltynie y col. 2002)
- **Los estudios en gemelos** mostraron una concordancia clínica relativamente baja, de 16%, en gemelos monozigotos y de 11% en dizigotos.
Mediante la tomografía por emisión de positrones (PET) se midió una reducción de la recaptura de la 18 F-dopa, como marcador preclínico del Parkinson, en un estudio de seguimiento de 4 años. La concordancia fue de 75% de los casos en gemelos monozigotos y de 22% en dizigotos.
- **Los estudios de ligamento** revelaron 8 mutaciones en las formas familiares estudiadas. El primer locus identificado fue el de la PARK 1 que codifica para la α -sinucleína, el mayor componente de los cuerpos de Lewy. La PARK 2 es una mutación característica de una forma juvenil sin

cuerpos de Lewy. Existen otras formas con cuerpos de Lewy en los *loci* PARK 3, 4 y 5.

- **La herencia mitocondrial** también se evocó. Si un gran número de mutaciones en el DNA mitocondrial han sido encontradas en los pacientes con enfermedad de Parkinson, comparado con el DNA mitocondrial de controles sanos, curiosamente no se encontraron mutaciones en el complejo I cuya deficiencia es ampliamente conocida en la enfermedad. La disfunción mitocondrial es otro mecanismo de estrés oxidativo por la generación de un excedente de radicales libres.
- **La interacción genético-ambiental** es probablemente un mecanismo muy importante de la enfermedad. Se encontró un riesgo significativamente incrementado en el grupo con genotipo de bajos metabolizadores CYP2D6 combinado con exposición a solventes. El riesgo de desarrollar el Parkinson con demencia se encontró en los bajos metabolizadores CYP2D6 expuestos a pesticidas. La pérdida del efecto protector del tabaco y un riesgo significativamente aumentado de desarrollar enfermedad de Parkinson fue descrito en pacientes fumadores con el genotipo GSTM1*0 de la enzima desintoxicante (Polymeropoulos 2003).

2) La enfermedad de Alzheimer:

La enfermedad de Alzheimer es la segunda enfermedad neurodegenerativa en México y la más frecuente en Estados Unidos y Europa. Ocasiona una demencia progresiva que se revela en la segunda mitad de la vida. En los E.U., la demencia de tipo Alzheimer afecta 5 a 10% de la población de más de 50 años y hasta el 50% de los sujetos de más de 85 años. Poco se sabe de su causa, sin embargo el déficit colinérgico en la corteza cerebral y otras áreas del cerebro esta ampliamente descrito (Rogers 1998). El diagnóstico es patológico y reporta atrofia

cortical con placas amiloides y degeneración neurofibrilar. Existen evidencias de daño oxidativo y se han reportado anomalías mitocondriales ultraestructurales, metabólicas y de las enzimas mitocondriales. (Blas 1993). Se ha demostrado el efecto protector de los estrógenos (Mc Geer 1996) y el beneficio del tratamiento sintomático con anticolinesterásicos (Rogers 1998; Morris 1998).

Esta enfermedad ha sido asociada con la presencia de marañas neurofibrilares y placas neuríticas que, a su vez se cree que son generadas como resultado de un procesamiento anormal de las diferentes isoformas de la proteína tau (Kondo y col.1988), así como de la proteína β -A4 (Masters y col. 1985), respectivamente. Estudios recientes de marcadores biológicos se han enfocado específicamente en el análisis en el LCR de los niveles de la proteína asociada a microtúbulos *tau* y de la proteína β -amiloidea terminando en el aminoácido 42 ($A\beta$ 42) encontrando disminuida la $A\beta$ 42 mientras los niveles de *tau* están aumentados. Sin embargo, un aumento de *tau* en LCR también se encuentra en encefalitis, enfermedad vascular cerebral, hipoxia cerebral y demencias de otro tipo (frontotemporal y degeneración cortico-basal). Por lo tanto se propuso enfocar este estudio a epítopes fosforilados de la tau que son característicos de la enfermedad de Alzheimer. Itoh y colaboradores en 2001 encontraron que la *tau* fosforilada en la serina 199 es altamente específica (85.2%) de enfermedad de Alzheimer (y con sensibilidad de 85%).

Por otra parte el genotipo de la apolipoproteína E y particularmente el alelo ϵ 4 se ha asociado con el riesgo de presentar una enfermedad de Alzheimer particularmente en las formas homocigotas (Nussbaum y Ellis 2003)

3) La enfermedad de Huntington.

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo hereditario: autosómico dominante caracterizado por movimientos anormales (esencialmente la corea), deterioro cognoscitivo y síntomas psiquiátricos. La edad de inicio tiene un promedio de 35 años y la muerte ocurre entre 10 y 20 años después de las

primeras manifestaciones clínicas. La mutación responsable de esta patología consiste en una expansión de repetidos tripletes CAG que codifican por una poliglutamina anormal de función todavía desconocida. El polimorfismo de la expansión de los repetidos CAG (Fig. 1) explica el fenómeno de anticipación observado en la enfermedad. Alonso y colaboradores (1997) estudiaron en la población mexicana el número de repetidos CAG en el gen de la huntingtina (el rango normal siendo de 13 a 32 con mayor frecuencia de 18 repetidos) y el de la población de pacientes con enfermedad de Huntington atendida hasta entonces en el servicio de neurogenética con un rango de 37 a 86 siendo 42 el número de repetidos más frecuente en estos enfermos.

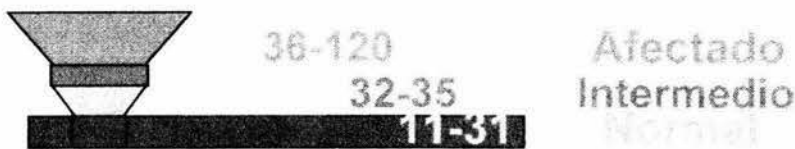


Fig.1. Expansión de trinucleótidos en el gen de la huntingtina.

La patología involucra una disfunción y muerte neuronal selectiva en ganglios basales, esencialmente el cuerpo estriado con la corteza cerebral, el cerebelo y el tallo cerebral. Recientemente se han descrito *post mortem*, cuerpos de inclusión en núcleos de neuronas corticales y estriales compatibles con productos de degradación de la huntingtina por capsasa 3 (Ross 1997). Efectivamente, las proteínas con repetidos de glutamina pueden ser asociadas a anomalías metabólicas, estructurales del citoesqueleto, anomalías del transporte vesicular y de la señal de transducción (como la activación de la NADPH oxidasa que genera la producción de radicales superóxido). La relación entre la enfermedad y la excitotoxicidad se sustenta en que la administración de ácido quinolínico, un agonista de los receptores al NMDA así como otros receptores glutamatérgicos

reproducen la patología descrita en el Huntington en modelos murinos (Santamaría y cols. 1995). El compromiso del metabolismo neuronal se traduce en un aumento de las concentraciones de lactato en ganglios basales y corteza cerebral, y estudios *post mortem* revelaron un déficit de los complejos mitocondriales II,III y IV en la enfermedad (Ross 1997). Finalmente se demostró recientemente en microscopía electrónica que la huntingtina mutada se localiza en las membranas mitocondriales de las neuronas las cuales se caracterizan por un más bajo potencial de membrana y una despolarización con niveles más bajos de Ca^{2+} que las mitocondrias normales (Schon 2003). Estos hallazgos se reproducen en los modelos transgénicos donde se estudió igualmente la interacción debilitada entre la expansión poliglutamínica anormal y la proteína Hip-1 ocasionando una señal proapoptótica reclutando la procaspasa 8.

4) La esclerosis lateral amiotrófica.

La esclerosis lateral amiotrófica (ó ELA) consiste en un deterioro crónico progresivo de las neuronas motoras tanto superior (tracto piramidal) como inferior (motoneurona bulbar y del cuerno anterior de la médula espinal). Produce una debilidad muscular asociada a espasticidad, hiperreflexia y Babinski (síndrome de motoneurona superior) así como flacidez, atrofia muscular (Fig. 2) fasciculaciones e hiporeflexia de predominio distal (síndrome de motoneurona inferior). Los déficits son estrictamente motores y la patología se inicia comúnmente en la sexta década de la vida y lleva a la muerte entre 3 a 5 años después por broncoaspiración ó parálisis respiratoria (Brooks 1996). Recientemente se han descubierto anticuerpos contra canales de Ca^{2+} de tipo L en la mayoría de los pacientes con ELA (Rothstein 1991) y en la forma familiar de la enfermedad, que afecta al 8% de los casos, una mutación en el gen de la SOD de tipo 1 (Rosen 1993) que no ha sido identificado en la forma esporádica. Existe una acumulación de

neurofilamentos en los axones proximales del cuerno anterior de la médula (Hirano 1998). La estrategia terapéutica actual se basa en la combinación de fármacos tales como el topiramato, la lamotrigina y el riluzole, que entre sus mecanismos bloquean la liberación del glutamato, y de antioxidantes. El riluzole es a la fecha el único fármaco habiendo demostrado un beneficio clínicamente significativo en la ELA. Retarda el deceso de los pacientes de 3 a 6 meses (Bensimon y col.1996).

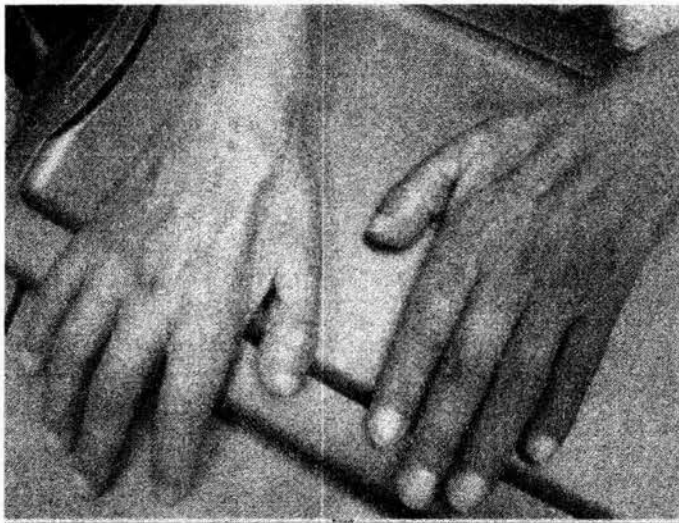


Fig. 2. Manos de un paciente con ELA donde se aprecian la amiotrofia tenar e interosea y la asimetría de la afección.

5) Teorías patogénicas de las enfermedades neurodegenerativas:

a) El estrés oxidativo

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

LOS RADICALES LIBRES (RL):

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

- El anión superóxido. $\cdot\text{O}_2^-$ Es el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular. El radical libre superóxido es poco reactivo por sí mismo y no causa daño directo serio. Sin embargo, en presencia del óxido nítrico (NO, el radical más difusible en el organismo) se produce el peroxinitrito (ONOO.-) muy dañino a nivel celular. Se ha demostrado que el 7-nitroindazol (7-NI) un

inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NOS) protege contra la neurotoxicidad de la MPTP (Przedborski 1996).

- El peróxido de hidrógeno H_2O_2 , aunque no es un radical libre, puede ser formado por dismutación de anión superóxido o ser producto de la reducción bivalente de oxígeno. La adición de un segundo electrón forma entonces el “agua oxigenada”.
- El óxido nítrico NO, es un mensajero biológico del SNC especial ya que es un RL en forma de gas que no se almacena en las vesículas sinápticas. Es sintetizado por la NOS a partir de la L-arginina y atraviesa las terminales nerviosas por difusión simple (Moncada 1988). Existen 3 isoformas de la NOS: la neuronal, la forma endotelial antes llamada factor relajante de endotelio y la forma inducible. El pericarion de motoneuronas en la ELA es inmunoreactivo a las NOSn y a NOSe lo que traduce una expresión de éstas enzimas en las células propensas a la degeneración (Kashiwado y col. 2002).
- Como el óxido nítrico reacciona con O_2^- 3 veces más rápido que la superóxido dismutasa (SOD), el NO es la única biomolécula capaz de competir con la SOD para disponer del O_2^- . El NO y el O_2^- pueden ser considerados como un arma química cuando mezclados forman el peroxinitrito.
- Por otra parte, los metales de transición como el hierro y el cobre, son catalizadores de las reacciones oxidativas (Prohaska 1987, Youdim y col. 1990, Boll y col. 1996). Citamos como ejemplo la reacción de Fenton, generadora del radical hidróxilo: $\cdot OH$ aparentemente implicado en el daño neuronal ocasionado en la enfermedad de Parkinson:



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



El estrés oxidativo iniciado por el hierro parece jugar un papel primordial como mecanismo de muerte neuronal en el cerebro parkinsonico, lo que se apoya en los hallazgos de los modelos experimentales (Rojas y Rios 1993) . Se sabe que el hierro se acumula en la sustancia negra de los pacientes con Parkinson y en otros núcleos basales en atrofas multisistémicas y enfermedad de Huntington, como ha sido demostrado tanto en estudios *post mortem* como *in vivo*, mediante imágenes de resonancia magnética, aprovechando el efecto paramagnético (Fig.3) de estos depósitos (Dexter y col. 1991, Boll 1996).

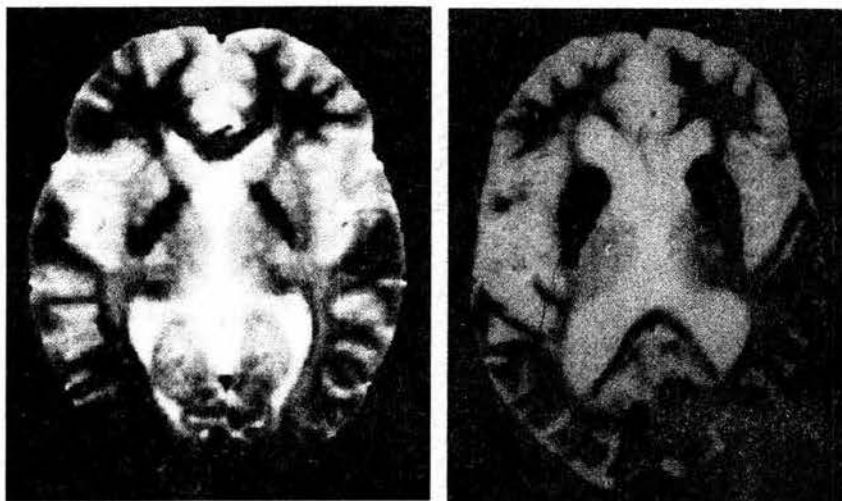


Fig.3. Corte axial del encéfalo a nivel del estriado. Mediante IRM 3 Tesla en secuencia T2. Se observa el trofismo normal de las estructuras en un sujeto normal (izquierda) mientras una importante atrofia subcortical se observa así como los depósitos metálicos en el área estriatal en un sujeto con enfermedad de Huntington (derecha).

Otros metales oxidantes, como el manganeso, producen parkinsonismo, por lo que se ha implicado a los diversos metales en la fisiopatogénesis de esta enfermedad. El cobre aumentado en su forma libre en el LCR en el Parkinson (Pall 1987) se ha relacionado con una disminución de la actividad enzimática de la ceruloplasmina del SNC (Boll y col. 1999) .

b) La inhibición energética

El metabolismo energético de la neurona es totalmente dependiente del metabolismo de la glucosa. El producto final de la glucólisis, el piruvato entra por difusión en la mitocondria, produce energía directamente o por medio de precursores para el ciclo de los ácidos tricarboxilos y las fosforilaciones oxidativas. La regulación del metabolismo energético de la neurona se basa en el cambio energético (especialmente la producción de ATP), la necesidad de precursores anabólicos y los requerimientos de glucosa y oxígeno. El mantenimiento del potencial de membrana depende de la función adecuada de la ATPasa Na^+/K^+ cuyo funcionamiento es altamente dependiente de la producción de ATP, de manera que una falla energética llega a cambiar el potencial de membrana, a liberar el bloqueo del receptor (Rc) al NMDA (por el Mg) y ocasiona una activación facilitada del receptor por el glutamato. En el modelo experimental de Parkinson con inyecciones estereotáxicas de MPP⁺, el metabolito tóxico de la MPTP, existe una inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial que conlleva a una reducción significativa de los niveles de ATP en los ratones (Greene1996).

c) La excitotoxicidad

La excitotoxicidad mediada por falla energética consiste en la activación del Rc al NMDA y la entrada del Ca^{2+} en la neurona ocasionando su destrucción. La destrucción selectiva de las células dopaminérgicas en el modelo MPTP de Parkinson esta disminuida por la inyección simultánea de diversos antagonistas al NMDA (Greene 1996).

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio más abundante del sistema nervioso central . Se une a las 3 clases de receptores:

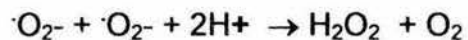
1. los metabotrópicos (mGluR)
2. los activados por el agonista N-methyl-D aspartato (NMDA) regulados por diferentes ligandos endógenos: glutamato, glicina, poliaminas, Mg^+ , Zn^{2+} y H^+ .

3. Los activados por el ácido propiónico α -amino 3 hidroxil-5-metil-4-isoxazol (AMPA)/ kainato(KA)

La excitotoxicidad mediada por los receptores de glutamato ha sido implicada en la muerte neuronal en la isquemia, los traumatismos, la hipoglucemia y la epilepsia así como en las 4 enfermedades neurodegenerativas que proponemos estudiar. En estas últimas patologías una leve ó lenta excitotoxicidad puede ocurrir por las anomalías de los aminoácidos excitatorios o el déficit en el metabolismo energético. El modelo experimental de Huntington con ácido quinolínico, un agonista del receptor al NMDA, es precisamente un modelo de excitotoxicidad. Dentro de las consecuencias del aumento del Ca^{2+} intracelular se ha demostrado la activación de diversas enzimas como las proteasas, las fosfolipasas, las endonucleasas (Choit 1995), y la NOS (Beal 1993). La elevada concentración de Ca^{2+} inicia la cascada de activación de las proteína-cinasas, altera el metabolismo energético y ocasiona la generación de un exceso de radicales libres de oxígeno.

d) La superóxido-dismutasa (SOD) en las enfermedades neurodegenerativas.

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

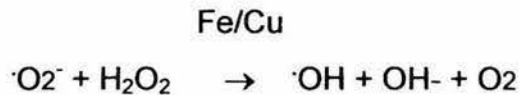


Ambas clases son llamadas superóxido-dismutasas (SOD). Una de ellas es un homodimero de peso molecular 32,000 compuesto de 2 subunidades que contienen una mol de cobre y zinc (Cu/Zn-SOD), anteriormente llamada cerebrocupreina.

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

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

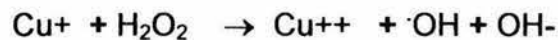
Reacción de Haber-Weiss:



La reacción de Fenton:



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



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



La esclerosis lateral amiotrófica es otra enfermedad neurodegenerativa, en este caso de la motoneurona, en el cerebro, el tallo cerebral y en el cuerno anterior de la médula espinal. 10% de los casos se transmiten con herencia dominante (forma familiar de la enfermedad). De estos casos, el 20% se asocia con una mutación en el gen que codifica para la Cu/Zn-SOD ó SOD1, el homodimero de 153 aminoácidos con un canal cargado positivamente. Este sitio activo que contiene el cobre, atrae a los radicales superóxidos para convertirlos en peróxido de hidrógeno como lo hacen la catalasa y la glutatión-peroxidasa. Existen dos reportes en la literatura, de una disminución de la actividad SOD1 en CSF en la esclerosis lateral amiotrófica (Brown 1995). Los posibles mecanismos de muerte neuronal en este padecimiento son:

- una disminución de la afinidad de la proteína mutante para Cu y Zn

- la nitración de la tirosina ($SO+NO \rightarrow ONOO$)
- formación de radicales libres hidróxilo ($\cdot OH$)
- apoptosis o muerte celular programada genéticamente.

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

En la sustancia negra de un paciente con la EP existe una disminución del glutatión reducido, así como una deficiencia esencialmente del complejo I mitocondrial mientras la concentración de MnSOD mitocondrial esta aumentada. Se supone también que existe un efecto de la disminución del glutatión sobre la SOD (Seaton 1996).

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

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

e) La ceruloplasmina (CP)

La ceruloplasmina es una α_2 glucoproteína de peso molecular 132000 Da. que contiene el 95% del cobre encontrado en el plasma de los vertebrados. Fue aislada por primera vez en 1948 por Holmberg y Laurell en el suero de puerco y llamada ceruloplasmina por su color azul cielo. Este mismo año se demostró que la degeneración hepato-lenticular o enfermedad de Wilson se debe a un exceso de acumulo de cobre. El estudio de estos casos con hipoceruloplasminemia familiar demostró que la baja concentración de CP no ocasiona la enfermedad pero se debe a una falla de la excreción biliar de Cu. Posteriormente se identifico a un gen mutado en la enfermedad de Wilson que codifica para una ATPasa transportadora de Cu expresada en los hepatocitos. Pero el cobre no afecta la tasa de síntesis o de secreción de la apoCP sino que existe una falla de incorporación de Cu que

deja la proteína inestable y carente de actividad ferroxidasa. A raíz de años de secuenciación y clonación del gen de la CP, no se aclara todavía su papel funcional. El descubrimiento de la actividad ferroxidasa de la CP sugirió un papel en la movilización del ión férrico por la transferina. Esta hipótesis se corroboró en animales deficientes en Cu ante una anemia que no responde al Fe pero si a la administración de CP.

Su producción se ve estimulada por la inflamación sistémica, los estrógenos y el estrés oxidativo al que ayuda a controlar (Prohaska 1987, Milne y col. 1993, Solomons 1988). Su concentración sérica obtenida por radioinmunoensayo (RIA) tiene valores entre 277 y 377 mg/L lo que corresponde a 1.8 a 2.5 mmol/L (Harrison). Poco se ha estudiado esta proteína en el LCR donde sus concentraciones obtenidas por inmunoelectroforesis (Tabla 1) se han reportado de 1 mg/L en promedio en 55 casos .

Tabla 1. Concentraciones de Cu y CP según Fishmann (1992).

	CONCENTRACIÓN SERICA	EN L.C.R
COBRE	760-1800 µg/L	6-35 µg/L
CERULOPLASMINA	150-600 mg/L	0.8-2 mg/L

La deficiencia en apoceruloplasmina descrita en una familia japonesa en 1987, se caracteriza clínicamente por blefaroespasma, degeneración de la retina y radiológicamente por importantes depósitos de hierro en los ganglios basales. Posteriormente se describe una mutación en el gen de la CP de pacientes con aceruloplasminemia, nueva entidad nosológica ahora con definición molecular y ocasionando falla en el transporte de hierro y expresión fenotípica en ganglios basales. (Harris y col., 1995). La entidad se asocia con la degeneración de los ganglios basales y el acúmulo de hierro cerebral (Morita y col. 1995). La CP posee una actividad ferroxidasa que convierte el Fe⁺⁺ en Fe⁺⁺⁺. Esta última forma

(férica) es movilizada por la transferrina (Linder 1991). Los depósitos excesivos de hierro en los ganglios basales particularmente notables en la enfermedad de Huntington y los síndromes de Parkinson plus, podrían relacionarse con una disminución en la concentración o en la actividad enzimática de la CP. En 1997 se demostró la síntesis de CP a nivel cerebral (Patel y col.)

f) Papel de la oxidación en la patología neurodegenerativa.

El sistema nervioso en general está rico en lípidos poliinsaturados y en hierro. (Halliwell, 1992). El alto contenido lipídico del tejido nervioso junto con la importante actividad metabólica, normalmente aeróbica, le confiere una gran susceptibilidad al daño oxidante (Dawson y Dawson, 1996). El alto nivel de hierro cerebral probablemente esencial durante el desarrollo, traduce también un daño celular cerebral y la liberación de hierro iónico, catalizador de reacciones produciendo especies reactivas de oxígeno (Gerlach y col. 1994).

Existen evidencias consistentes del papel del estrés oxidativo en las más importantes enfermedades degenerativas del SNC como en el Parkinson (Ebadí y col. 1996), el Alzheimer (DeDeyn 1998, Markesbery y Carmen 1999, Behl 1999) la esclerosis lateral amiotrófica (Boll 2003) así como en EVC, en traumatismos y en epilepsia (Coyle y Puttfarcken 1993).

Una disminución de actividad de enzimas antioxidantes se evidenció en el Parkinson (Fahn y Cohen 1992, Boll y col.1999) mientras el estrés oxidante traducido en peroxidación lipídica y en oxidación de las bases del ADN fue constatada en 1996 por Jenner. Resultados similares fueron publicados en el Alzheimer (Retz y col.1998) y en la enfermedad de Huntington (Borlongan y col. 1996) así como en la ELA tanto familiar como esporádica con evidencia del aumento de proteínas oxidadas y oxidación del ADN (Ferrante y col.1997). Se ha también sugerido que el Alzheimer se puede asociar con la dieta y que una dieta rica en antioxidantes disminuye el riesgo de padecerlo (Grant 1997).

Un gran número de estudios *in vitro* mostraron que los antioxidantes, tanto endógenos como exógenos (llevados por la dieta) pueden proteger el tejido nervioso contra el daño oxidante. El ácido úrico, un antioxidante endógeno, previene la degeneración neuronal en las ratas, tanto *in vivo* como *in vitro*, así como de diferentes tipos de estrés como en la isquemia, la exposición a alta dosis de glutamato y al compuesto tóxico cianido (Yu y col.1998). La vitamina E protege las neuronas de las ratas sometidas a hipoxia-reperfusión de oxígeno contra la apoptosis (Tagami y col.1998). Un estudio similar realizado por el mismo equipo muestra que la vitamina E protege también a la neurona contra los radicales libres de nitrógeno. Tanto la vitamina E como el beta-caroteno previene el daño oxidante de las neuronas por exposición al etanol (Mitchell y col.1999). En un modelo experimental de disfunción neurovascular de origen diabética, el beta-caroteno resultó ser el mejor protector seguido por las vitaminas E y C (Cotter y col. 1995).

Muchos estudios clínicos comprobaron la utilidad de suplementar la dieta en antioxidantes liposolubles. Un reporte de S. Fahn en 1991 demuestra que la evolución de la enfermedad de Parkinson tratada con levodopa es detenida 2.5 años en los pacientes que tomaron altas dosis de vitaminas C y E sintéticas. Otro estudio muestra que altas dosis de vitamina E elevan significativamente los niveles plasmáticos pero no la concentración en el líquido céfalorraquídeo (Pappert y col. 1996). Otro artículo reporta que las altas dosis de vitamina E ocasionan una elevación de las concentraciones en el LCR y posiblemente de la vitamina E cerebral (Vatassery y col. 1998). Recientemente, se encontró que la proteína responsable de la recaptura de vitamina E esta presente en las células cerebrales de pacientes con deficiencia vitamínica y enfermedades asociadas con el estrés oxidativo (Copp y col. 1999). En un estudio Holandés se demostró que el riesgo de padecer enfermedad de Parkinson disminuye en los sujetos cuya dieta es alta en antioxidantes (de Rijk y col. 1997). El mismo grupo estudió la asociación entre

dieta baja en beta-caroteno y deterioro cognoscitivo en un grupo de sujetos de 55 a 95 años de edad.

Un estudio austriaco reveló una asociación entre la concentración sérica de vitamina E y la función cognoscitiva en adultos de 50 a 75 años de edad. Dicha asociación no fue significativa con diferentes xantinas, alfa y beta-caroteno, retinol, gama-tocoferol y ascorbato. En pacientes con Parkinson se encontró un menor consumo de beta-caroteno y vitamina C (Hellenbrand 1996). Finalmente, el 20% de los casos familiares de ELA que se asocian con una mutación en el gen de la cobre/Zn. SOD, y numerosos estudios en modelos transgénicos, se evidenció un daño neuronal importante que puede ser prevenido por pequeñas moléculas antioxidantes tales como el tripéptido glutatión y la vitamina E (Ghadge y col. 1997).

OBJETIVOS Y METAS:

El estudio tiene como objetivo principal el mostrar la implicación de los radicales libres, del cobre como metal de transición, y de la deficiencia en actividad protectora de la ferroxidasa CP y de la SOD en 4 enfermedades caracterizadas por la presencia de reacciones oxidativas responsables de la muerte neuronal. El cobre tiene un papel en la activación de varias proteínas enzimáticas; algunas, como la citocromo c oxidasa (COX), deficientes en la enfermedad de Parkinson, otras tales como la SOD, poco estudiadas. Nos interesaremos particularmente en la ceruloplasmina (CP), principal transportador de cobre que tiene también una actividad enzimática ferroxidasa. Su síntesis en el SNC representa una protección contra los radicales libres y favorece la movilización del hierro cerebral.

La medición en el LCR de los productos de la peroxidación lipídica, de los nitritos y nitratos, de la actividad enzimática de la SOD y de la CP y de la concentración de metal ión (no fijado a proteínas), se considera como un perfil

representativo del estado del estrés oxidativo y de las defensas antioxidantes en el SNC.

Después de comparar nuestros resultados con los valores normales en el LCR de los controles pareados, buscamos correlacionar estas variables biológicas con la rapidez de evolución y el estadio clínico en las 4 enfermedades neurodegenerativas y tratamos de buscar un punto de corte o un valor que sea indicador de cada patología.

La meta es llegar a medir rutinariamente estos potenciales marcadores clínico-pronósticos de la patología neurodegenerativa.

HIPOTESIS:

- 1) Los productos fluorescentes de la peroxidación lipídica son aumentados en el LCR en las enfermedades neurodegenerativas
- 2) Los nitritos y nitratos así como el cobre iónico son elevados en las enfermedades neurodegenerativas
- 3) Existe una disminución de la actividad enzimática de dos proteínas protectoras contra el daño oxidativo, la CP y la SOD
- 4) Los hallazgos biológicos encontrados en las enfermedades neurodegenerativas se correlacionan con la gravedad clínica.

METODOLOGIA:

Se realizó un estudio clínico-básico de casos y controles donde se cuantificaron productos de la peroxidación lipídica, formación de radicales libres, metales de transición y actividades enzimáticas de la CP y de la SOD en el LCR de pacientes con enfermedades degenerativas del SNC y en sujetos controles de la misma edad. En los pacientes que presentan alguna de las enfermedades degenerativas a estudiar, se aplicó el día de la PL, una valoración clinimétrica con el fin de correlacionar estos datos con las variables biológicas.

Por lo tanto, es un estudio:

- transversal,
- observacional,
- descriptivo y comparativo,
- prospectivo (en cuanto a la recolección de los datos)

En la tabla 2 se resumen los criterios para el diagnóstico en cada entidad.

Tabla 2.

Criterios empleados para el diagnóstico de las 4 enfermedades neurodegenerativas estudiadas.

Tipo de patología	Criterios diagnósticos	Referencias
Enfermedad de Parkinson	<ul style="list-style-type: none"> • Asociación de un temblor de reposo con acinesia y rigidez, asimetría y/o otros síntomas de Parkinson • Un estudio de neuroimagen descartando lesión vascular, tumoral ó infecciosa. 	Jenner 1992 Hughes y el UK Brain Bank 1992 *
Enfermedad de Alzheimer	<ul style="list-style-type: none"> • Criterios de la NIH de "probable Alzheimer" • Criterios de "demencia tipo Alzheimer" del DSM IV • Criterios de la NINCDS-ADRDA de "probable enfermedad de Alzheimer" 	NIH 1987 APA (DSMIV)1994 NINCDS-ADRDA 1984 *
Enfermedad de Huntington	<ul style="list-style-type: none"> • Clínicamente con corea y deterioro funcional • Confirmada genéticamente con diagnóstico molecular • IRM con atrofia estriatal 	Huntington Disease Collaborative Group 1993
E.L.A	<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de motoneurona en 3 ó más territorios • VCN con resultados compatibles con neuropatía axonal • EMG con denervación activa • IRM descartando anomalía de la unión cranio-cervical 	Brooke 1996 Criterios de "El Escorial" *

* Detallados a continuación.

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE ENFERMEDAD DE PARKINSON SEGÚN HUGHES 1992.

1a ETAPA:

- Síndrome parkinsoniano reuniendo bradicinesia con al menos uno de los 3 síntomas siguientes:
- Rigidez
- Temblor de reposo de 4 a 6 Hz
- Inestabilidad postural no atáxica

2a ETAPA:

Exclusión de otros diagnósticos y síntomas atípicos:

- Crisis oculógiras
- Estabilidad prolongada o signos estrictamente unilaterales después de 3 años de evolución.
- Parálisis supranuclear de la mirada
- Signos cerebelosos
- Disautonomía severa precoz
- Demencia severa precoz con problemas de lenguaje, de la memoria y apraxia
- Signo de Babinski
- Respuesta negativa a dosis suficientes de levodopa.

Ausencia de etiología a favor de un diagnóstico diferente de la EP:

- Antecedentes de EVC con progresión escalonada de los síntomas
- Traumatismos craneales repetidos

- Antecedente de encefalitis viral
- Tratamiento con neurolépticos al inicio de los síntomas
- Existencia de más de dos casos de EP en la familia
- Tumor cerebral o hidrocefalia diagnosticados
- Exposición a MPTP

3a ETAPA:

Criterios de diagnóstico positivo de la enfermedad de Parkinson:

(3 o más son necesarios)

- Inicio unilateral
- Presencia del temblor de reposo
- Agravación progresiva
- Asimetría persistente con un síntoma del lado afectado mostrando respuesta al tratamiento con levodopa (mejoría de 70 a 100%)
- Respuesta positiva a la levodopa durante 5 años ó más
- Evolución clínica de 10 años o más.

CRITERIOS DE LA **NINCDS-ADRAS** * PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

(* Por sus siglas en inglés "**NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL AND COMMUNICATIVE DISORDERS AND STROKE**" y "**ALZHEIMER'S AND RELATED DISORDERS ASSOCIACION**")

1. Criterios para el diagnostico clínico de enfermedad de Alzheimer probable:
 - a. Demencia establecida por examen clínico y documentada por el *Mini.Mental State Exam*, la *Blessed Dementia Rating Scale* u otro estudio de tamisaje del estado mental y confirmada con pruebas neuropsicológicas.
 - b. Déficit en dos ó más áreas de la cognición
 - c. Agravación progresiva de la memoria y otras funciones cognoscitivas
 - d. Estado de conciencia normal
 - e. Edad de 40 a 90 años (con mayor frecuencia arriba de 65 años)
 - f. Ausencia de desorden sistémico u otra patología cerebral que podría por si misma explicar el deterioro progresivo de la memoria y la cognición

2. Argumentos a favor del diagnostico de enfermedad de Alzheimer probable:
 - a. Deterioro progresivo de funciones específicas de la cognición como afasia, apraxia o agnosia
 - b. Afección de las actividades de la vida diaria y del comportamiento
 - c. Antecedentes familiares de desordenes similares especialmente en caso de confirmación neuropatológica
 - d. Resultados de laboratorios:
 - (1) Punción lumbar con estudio citoquímico estándar normal
 - (2) Patrón EEG normal ó con cambios inespecíficos tales como actividad lenta difusa ó generalizada
 - (3) Evidencia de atrofia cerebral progresiva documentada con estudios de neuroimagen seriados

3. Ausencia de criterio de demencia vascular según el HIS (a continuación).

CITERIOS DE EXCLUSIÓN DE DEMENCIA VASCULAR SEGÚN EL HACHINSKI ISCHEMIC SCORE (HIS)

1.- Inicio abrupto	1p
2.- Curso escalonado	1p
3.- Fluctuaciones clínicas	1p
4.- Confusión nocturna	1p
5.- Conservación de la personalidad	1p
6.- Depresión	1p
7. Quejas somáticas	
8.- EVC ó enfermedad de pequeños vasos documentado por IRM	2p
9.- Labilidad emocional	2p
10.- HTA	1p
11.- Historia de infarto	2p
12.- Arterioesclerosis	2p
13.- Déficit focal	2p

Cuando se alcanzan 7 puntos o más el paciente se excluye del estudio por tener sospecha de demencia multi-infarto (también llamada demencia "vascular").

Una meta-análisis del HIS (Moroney y col. 1997) en demencias con diagnóstico neuropatológico demostró que la escala permite diferenciar claramente la demencia vascular de la enfermedad de Alzheimer.

En el presente estudio también se excluyen las demencias mixtas (que tienen criterios de demencia vascular y de Alzheimer).

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE ELA.

El diagnóstico de ELA requiere la presencia de las siguientes características:

- Signos clínicos de síndrome de MNI (pérdida de fuerza muscular, amiotrofia.)
- Afección de MNI por electrofisiología (afección axonal , denervación activa)
- Signos clínicos de MNS (piramidales)
- Curso progresivo
- Más de una región afectada
- Ausencia de otro proceso (neurológico o neuropático)
- Sin otro proceso diagnosticado por neuroimagen

Los criterios que permiten acertar el diagnóstico se resumen en la tabla 3

Tabla 3.

Criterios de EL ESCORIAL.
FEDERACION MUNDIAL DE NEUROLOGIA.

ELA DEFINIDA	Presencia de MNS y MNI en región bulbar y al menos 2 regiones espinales Ó Presencia de MNS y MNI en 3 regiones espinales
ELA PROBABLE	MNS y MNI en al menos 2 regiones Algunos signos de MNS rostrales a los de MNI
ELA POSIBLE	MNS y MNI en una sola región Solo MNS en 2 o más regiones Signos de MNI rostrales a los de MNS
ELA SOSPECHOSA	Solo MNI en 2 o más regiones

PARA LA SELECCIÓN DE LOS PACIENTES SE CONSIDERARON:

Criterios de inclusión:

- enfermedad diagnosticada con los criterios anteriormente descritos
- edad de 30 a 70 años
- consentimiento informado

Criterios de exclusión:

- patología tumoral, vascular ó inflamatoria
- tratamiento esteroide, antioxidante, levodopa , gabaérgico, antiexcitotóxico
- contraindicación para la P.L.

Para el grupo control:

- los mismos criterios a excepción de padecer alguna enfermedad neurodegenerativa.

Criterios de eliminación:

- Aquellos casos con anomalía del LCR: inflamación, contaminación, neuroinfección.

PRINCIPALES VARIABLES CLÍNICAS:

1.- Eventuales factores de riesgo :

edad, género, tabaquismo, antecedentes familiares, medio rural.

2.- Clinimetría fina y escala de 5 grados de gravedad para cada enfermedad.

3.- Rapidez de evolución: se establecerá la relación entre el puntaje clinimétrico y el tiempo de evolución de la sintomatología.

PRUEBAS CLINICAS

Tabla 4 .

Principales escalas clinimétricas empleadas para la evaluación de los pacientes con enfermedad neurodegenerativa.

	Escalas	Referencias
Enfermedad de Parkinson	Hoehn y Yahr U.P.D.R.S.	Hoehn & Yahr 1967 Fahn 1987
Enfermedad de Alzheimer	M.M.S.E C.D.R	Folstein 1975 Dooneief 1996 Rogers 1998
Enfermedad de Huntington	U.H.D.R.S	Huntington Study Group 1996
E.L.A.	ALS functional Rating Scale.	Brooks 1996 Herndon 1997

Las escalas están detalladas a continuación

ESCALA UNIFICADA DE EVALUACION DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON (UPDRS)

I. ESTADO MENTAL, COMPORTAMIENTO Y ESTADO DE ANIMO (En la semana previa)

1. ALTERACIÓN DEL INTELLECTO:

0. Ninguna.
1. Leve, falta de memoria evidente, con recuerdo parcial de los acontecimientos, sin otras dificultades.
2. Pérdida moderada de la memoria, con desorientación y dificultad moderada para la resolución de problemas más complejos. Alteración funcional discreta, pero evidente en el hogar con necesidad de recordarle ocasionalmente las cosas.
3. Pérdida grave de memoria con desorientación temporal y, con frecuencia, espacial. La capacidad para resolver problemas está muy alterada.
4. Pérdida grave de memoria, conservando solamente la orientación personal. Incapacidad para elaborar juicios y resolver problemas. Requiere mucha ayuda para mantener el cuidado personal. No se puede quedar solo.

2. TRASTORNO DEL PENSAMIENTO (Por demencia o intoxicación de fármacos):

0. No hay.
1. Ensueños vividos
2. Alucinaciones "benignas" conservando la capacidad de discernir.
3. Alucinaciones o delirios de ocasionales a frecuentes. Sin capacidad de discernir. Pueden interferir con las actividades diarias.
4. Alucinaciones o delirios persistentes o psicosis florida. Incapaz de cuidar de sí mismo.

3. DEPRESIÓN:

0. No hay.
1. Periodos de tristeza o sentimientos de culpa mayores de lo normal, aunque nunca mantenidos durante días o semanas.
2. Depresión mantenida (1 semana o más).
3. Depresión mantenida con síntomas vegetativos (insomnio, anorexia, pérdida de peso, pérdida de interés).
4. Depresión mantenida, con síntomas vegetativos y pensamientos o intento de suicidio.

4. MOTIVACIÓN-INICIATIVA:

0. Normal.
1. Menos pujante de lo habitual; más pasivo.
2. Pérdida de iniciativa o desinterés en cuanto a actividades opcionales (no rutinarias).
3. Pérdida de iniciativa o desinterés en las actividades de cada día (rutinarias).
4. Aislado, apartado; pérdida total de la motivación.

**PUNTUACIÓN TOTAL
SUBESCALA I**

pts

II. ACTIVIDADES DE LA VIDA DIARIA.

(Determinar en on / off)

5. LENGUAJE

0. Normal.
1. Discretamente alterado. No hay dificultad para entender.
2. Moderadamente alterado. A veces hay que pedirle que repita algo.
3. Muy alterado. Hay que pedirle con frecuencia que repita.
4. Ininteligible la mayor parte del tiempo.

6. SALIVACIÓN

0. Normal.
1. Exceso de saliva en la boca, discreto pero evidente; puede haber babeo durante la noche.
2. Moderado exceso de saliva; puede haber mínimo babeo.
3. Marcado exceso de saliva con cierto grado de babeo.
4. Marcado babeo; requiere constantemente gasa o pañuelo.

7. DEGLUCIÓN

0. Normal.
1. Rara vez se atraganta.
2. Se atraganta ocasionalmente.
3. Requiere dieta blanda.
4. Requiere alimentación por sonda nasogástrica o gastrostomía.

8. ESCRITURA

0. Normal.
1. Discretamente lenta o pequeña.
2. Moderadamente lenta o pequeña; todas las palabras son legibles.
3. Muy alterada; no son legibles todas las palabras.
4. La mayoría de las palabras son legibles.

9. CORTAR ALIMENTOS Y MANEJAR CUBIERTOS

0. Normal.
1. Algo lento y torpe, pero no necesita ayuda.
2. Puede cortar la mayoría de los alimentos, aunque con torpeza y lentitud; necesita cierta ayuda.
3. Le tienen que cortar los alimentos, pero aún puede alimentarse con lentitud.
4. Necesita ser alimentado.

10. VESTIDO

0. Normal.
1. Algo lento, pero no requiere ayuda.
2. Requiere ayuda en ocasiones para abotonarse, introducir los brazos por las mangas.
3. Requiere bastante ayuda, puede hacer algunas cosas solo.
4. Incapacitado.

11. HIGIENE

- 0. Normal.
- 1. Algo lento, pero no necesita ayuda.
- 2. Necesita ayuda para ducharse o bañarse, o es muy lento en las actividades higiénicas.
- 3. Requiere ayuda para lavarse, cepillarse los dientes, peinarse, ir al retrete.
- 4. Sonda de Foley u otras ayudas mecánicas.

12. DAR VUELTAS EN LA CAMA Y AJUSTARSE LA ROPA DE CAMA.

- 0. Normal.
- 1. Algo lento y torpe, pero no precisa ayuda.
- 2. Puede volverse solo o ajustar las sábanas, pero con gran dificultad.
- 3. Puede iniciar la acción, pero no puede volverse o ajustar las sábanas solo.
- 4. Incapacitado.

13. CAIDAS (Sin relación con el fenómeno de “congelación”)

- 0. Ninguna.
- 1. Rara vez.
- 2. Se cae ocasionalmente (menos de una vez al día).
- 3. Se cae un promedio de una vez al día.
- 4. se cae más de una vez al día.

14. “CONGELACIÓN” AL CAMINAR

- 0. No hay.
- 1. Rara vez aparece “congelación” al caminar, puede haber titubeo al inicio.
- 2. “Congelación” ocasional al caminar.
- 3. “Congelación” frecuente. A veces se cae por causa de este fenómeno.
- 4. Caídas frecuentes por “congelación”.

15. CAMINAR

- 0. Normal.
- 1. Leve dificultad. Puede no balancear los brazos o puede tender a arrastrar las piernas.
- 2. Dificultad moderada, pero requiere poca o ninguna ayuda.
- 3. Trastorno grave de la marcha que requiere ayuda.
- 4. No puede caminar, incluso con ayuda.

16. TEMBLOR

- 0. Ausente.
- 1. Discreto; infrecuentemente presente. No resulta molesto para el paciente.
- 2. Moderado; molesto para el paciente.
- 3. Intenso; interfiere con muchas actividades.
- 4. Marcado; interfiere la mayoría de las actividades.

17. SÍNTOMAS SENSORIALES RELACIONADOS CON EL PARKINSONISMO

- 0. Normal.
- 1. Ocasionalmente tiene entumecimiento, hormigueo o dolorimiento discreto.
- 2. Con frecuencia tiene entumecimiento, hormigueo o dolorimiento discreto; no resulta penoso.
- 3. Frecuentes sensaciones dolorosas.
- 4. Dolor extremo.

III. EXPLORACIÓN DE ASPECTOS MOTORES

18. LENGUAJE

0. Normal.
1. Pérdida discreta de expresión, dicción y/o volumen.
2. Monótono: farfullado, pero comprensible; moderadamente alterado.
3. Muy alterado, difícil de comprender.
4. Ininteligible.

19. EXPRESIÓN FACIAL

0. Normal.
1. Mínima hipomimia; podría ser una cara inexpresiva ("cara de póker") normal.
2. Disminución discreta, pero claramente anormal, de la expresión facial.
3. Hipomimia moderada; labios separados la mayor parte del tiempo.
4. Cara "de máscara" o expresión fija con pérdida acusada o completa de la expresión facial; labios separados más de 6 mm.

20. TEMBLOR DE REPOSO EN MIEMBROS SUPERIORES (DER, IZQ) y CARA

0. Ausente.
1. Discreto e infrecuentemente presente.
2. Discreto en amplitud y persistente, o de amplitud moderada pero presente sólo de forma intermitente.
3. De amplitud moderada y presente la mayor parte del tiempo.
4. De gran amplitud y presente la mayor parte del tiempo.

21. TEMBLOR DE REPOSO EN MIEMBROS INFERIORES

0. Ausente.
1. Discreto e infrecuentemente presente.
2. Discreto en amplitud y persistente, o de amplitud moderada pero presente sólo de forma intermitente.
3. De amplitud moderada y presente la mayor parte del tiempo.
4. De gran amplitud y presente la mayor parte del tiempo.

22. TEMBLOR DE ACCIÓN O POSTURAL DE LAS MANOS (DER- IZQ)

0. Ausente.
1. Leve; presente con la acción.
2. De amplitud moderada; presente con la acción.
3. De amplitud moderada al mantener la postura en el aire; así como con la acción.
4. De gran amplitud; interfiere la alimentación.

23. RIGIDEZ AXIAL (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado).

0. Ausente.
1. Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.
2. Discreta a moderada.

3. Intenso pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.
4. Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.

24. RIGIDEZ EN MMSS (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado. No considerar la rigidez “en rueda dentada”).

0. Ausente.
1. Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.
2. Discreta a moderada.
3. Intenso pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.
4. Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.

25. RIGIDEZ EN MMII (Valorada según el movimiento pasivo de las grandes articulaciones, con el paciente relajado y sentado. No considerar la rigidez “en rueda dentada”).

0. Ausente.
1. Discreta o detectable solamente cuando se activa por movimientos en espejo o de otro tipo.
2. Discreta a moderada.
3. Intenso pero se consigue con facilidad el movimiento en toda su amplitud.
4. Muy intensa; la amplitud del movimiento se logra con dificultad.

26. GOLPETEO DE LOS DEDOS (El paciente golpea el pulgar con el índice en rápida sucesión y con la mayor amplitud posible; realizar con cada mano por separado).

0. Normal (>15/5 segundos).
1. Enlentecimiento discreto y/o reducción de la amplitud (11-14/5 segundos).
2. Moderadamente alterado. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento (7-10/5 segundos).
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento (3-6/5 segundos).
4. Apenas puede realizar la acción (0-2/5 segundos).

27. MOVIMIENTOS ALTERNANTES CON LAS MANOS (El paciente abre y cierra las manos en rápida sucesión con la mayor amplitud posible).

0. Normal.
1. Discreto enlentecimiento y/o reducción de la amplitud.
2. Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento.
4. Apenas puede realizarlos.

28. MOVIMIENTOS RAPIDOS ALTERNANTES DE MMSS (Movimientos de pronación-supinación de las manos, en sentido vertical, con la mayor amplitud posible y simultáneamente con ambas manos).

0. Normal.
1. Discreto enlentecimiento y/o reducción de la amplitud.

2. Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento.
4. Apenas puede realizarlos.

29. AGILIDAD CON LOS MMII (El paciente golpea con el talón en rápida sucesión levantando el pie entero del suelo; la amplitud del movimiento debe ser alrededor de 7.5 cm).

0. Normal.
1. Discreto entrecimiento y/o reducción de la amplitud.
2. Alteración moderada. Fatigoso de manera evidente y precoz. Puede haber detenciones ocasionales en el movimiento.
3. Muy alterado. Frecuentes titubeos al iniciar los movimientos o detenciones mientras se realiza el movimiento.
4. Apenas puede realizarlos.

30. LEVANTARSE DE LA SILLA (El paciente intenta levantarse de una silla de madera o metal de respaldo recto, con los brazos cruzados ante el pecho).

0. Normal.
1. Lento, o puede necesitar más de un intento.
2. Tiene que impulsarse con los brazos en la silla.
3. Tiende a caer hacia atrás y puede tener que intentarlo más de una vez, pero puede conseguirlo sin ayuda.
4. Incapaz de levantarse sin ayuda.

31. POSTURA.

0. Erecta normal.
1. Postura no muy erecta, discretamente encorvada; podía ser normal en una persona mayor.
2. Postura moderadamente encorvada, claramente anormal. Puede inclinarse discretamente a un lado.
3. Postura muy encorvada, con cifosis. Puede inclinarse moderadamente a un lado.
4. Flexión marcada con alteración postural extrema.

32. MARCHA.

0. Normal.
1. Camina lentamente; puede arrastrar los pies, con pasos cortos, pero sin festinación ni propulsión.
2. Camina con dificultad, pero no requiere ayuda o muy escasa. Puede haber festinación, pasos cortos o propulsión.
3. Trastornos graves de la marcha que requieren ayuda.
4. No puede caminar, incluso con ayuda.

33. ESTABILIDAD POSTURAL (Respuesta al desplazamiento súbito posterior producido por un tirón de los hombros mientras el paciente permanece en bipedestación con los ojos abiertos y los pies discretamente separados; el paciente está avisado).

0. Normal.
1. Retropulsión, pero se recupera sin ayuda.
2. Ausencia de respuesta postural; se caería si no le sujetara el examinador.
3. Muy inestable; tiende a perder el equilibrio espontáneamente.
4. Incapaz de permanecer en pie sin ayuda.

34. BRADIQUINESIA E HIPOQUINESIA (Combina lentitud, titubeo, disminución del braceo, pequeña amplitud y pobreza de movimiento en general).

0. No hay.
1. Mínima lentitud que da al movimiento un carácter deliberado; podría ser normal en algunas personas. Amplitud posiblemente reducida.
2. Lentitud y pobreza de movimientos, en grado leve, que es claramente anormal. Como alternativa, cierto grado de reducción de amplitud.
3. Lentitud, pobreza o pequeña amplitud de movimientos moderada.
4. Lentitud, pobreza o pequeña amplitud de movimientos marcada.

**PUNTUACIÓN TOTAL
SUBESCALA III**

pts

ESCALA DE HOEHN y YAHR MODIFICADA de la ENFERMEDAD DE PARKINSON.

LAM - 001343

MODIFIED HOEHN AND YAHR SCALE

The same rater is to complete this form whenever scale is administered.

STAGE	MODIFIED HOEHN AND YAHR SCALE Indicate the patient's Parkinson stage by checking one box below.
0	<input type="checkbox"/> No signs of disease
1	<input checked="" type="checkbox"/> Unilateral disease
1.5	<input type="checkbox"/> Unilateral plus axial involvement
2	<input type="checkbox"/> Bilateral disease, without impairment of balance
2.5	<input type="checkbox"/> Mild bilateral disease, with recovery on pull test
3	<input type="checkbox"/> Mild to moderate bilateral disease; needs assistance to prevent falling on pull test; physically independent
4	<input type="checkbox"/> Severe disability; still able to walk or stand unassisted
5	<input type="checkbox"/> Wheelchair bound or bedridden unless aided

MINI-MENTAL EXAMINATION

Record the total points from the Mini-Mental Examination worksheet: 30

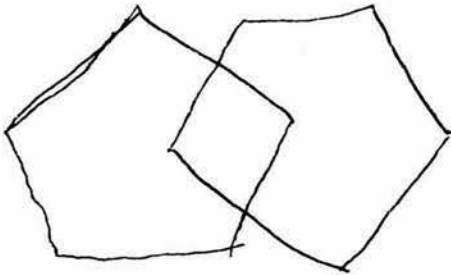
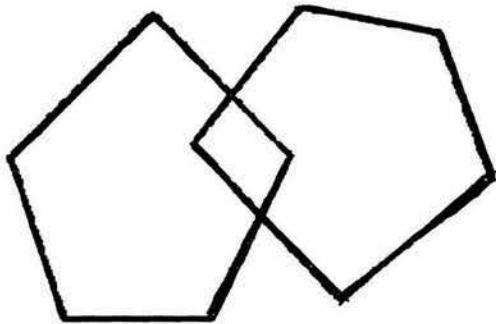
LAW 17/07/03

HOJA DE TRABAJO DEL EXAMEN MINI-MENTAL – (Continuación)
“A CONTINUACION ME GUSTARIA HACERLE ALGUNAS PREGUNTAS PARA EVALUAR SU MEMORIA Y
CONCENTRACION. ALGUNAS DE ELLAS PUEDEN SER FACILES Y OTRAS PUEDEN SER DIFICILES.”

PREGUNTA	PUNTOS	CALIFICACION	TOTAL
<p>ATENCION Y CALCULO: [5]</p> <p>12. SERIES DE SIETES</p> <p>Reste 7 de 100, luego reste 7 a la respuesta que obtenga y continúe restando 7 hasta que yo le diga que se detenga.</p> <p>Si es necesario, puede modificar la frase para que se comprenda mejor la instrucción. Por ejemplo, “Quítele 7 a 100” es una alternativa aceptable.</p> <p>Si el sujeto no puede recordar una respuesta que dió (es decir, el número del que tiene que restar “7”), está permitido recordársela. El primer error en la resta se corrige, pero los errores subsiguientes no se corrigen. Para los sujetos que estén confundidos, dé cada instrucción por separado. Diga: “Reste [quítele] 7 a 100”. Si la respuesta es correcta, diga: “Ahora réstele 7 a esa cantidad”. Repita esto después de cada resta y continúe como está descrito. Si es evidente que el sujeto no puede hacer la resta, suspenda el ejercicio después de la segunda respuesta incorrecta.</p> <p>OTORGUE 1 PUNTO POR CADA RESTA CORRECTA HASTA UN MAXIMO DE 5:</p> <p style="text-align: center;">_ _ _ _ _</p>	[5]	5	5
<p>¿“CUALES FUERON LOS TRES OBJETOS QUE LE PEDI QUE RECORDARA?”</p> <p>13. PELOTA _____ [3]</p> <p>14. BANDERA _____</p> <p>15. ARBOL _____</p>	[3]	3	3
<p>LENGUAJE</p> <p>16. (MUESTRE SU RELOJ) ¿Cómo se llama esto? _____ [1]</p> <p>17. (MUESTRE UN LAPIZ) ¿Cómo se llama esto? _____ [1]</p> <p>18. Quiero que repita la siguiente frase: (LA FRASE ES): “El flan tiene frutillas y frambuesas _____ [1] <u>PERMITA UN SOLO INTENTO</u></p> <p>19. Lea lo que dice esta hoja, después haga lo que dice: (LA HOJA DICE): “CIERRE LOS OJOS” _____ [1] <u>PERMITA UN SOLO INTENTO</u></p> <p>20. Le voy a dar una hoja de papel. Cuando lo haga, tome el papel con su mano izquierda, dóblelo por la mitad con ambas manos . MANO IZQUIERDA y ponga el papel en el suelo. POR LA MITAD, EN EL SUELO [3] Lea todo el enunciado, después entregue el papel. NO REPITA LAS INTRUCCIONES NI LO GUIE. (OTORGUE 1 PUNTO POR CADA PASO CORRECTO).</p> <p>21. Escriba cualquier oración completa en la hoja de papel. [1]</p> <p>22. Aquí tiene un dibujo. Por favor, copie el dibujo en la misma hoja. Califique como correcto si las figuras de cinco lados se juntan para formar una figura de cuatro lados y si todos los ángulos de la figura de cinco lados están conservados. [1]</p>	[1] [1] [1] [3] [1]	1 1 1 3 1	9
PUNTAJE TOTAL			30

LAM 17/07/03

CIERRE LOS OJOS



Mi casa me gusta mucho
Mi colonia es tranquila

Escala motora de la UHDRS

-SEGUIMIENTO OCULAR (horizontal y vertical)

0. completo
1. con sacudidas
2. interrumpido durante su curso
3. curso incompleto
4. no lo puede realizar

-MOVIMIENTOS SACADICOS: INICIACION (vertical y horizontal)

0. normal
1. latencia aumentada
2. con parpadeo ó movimiento de la cabeza
3. persistencia de los movimientos cefálicos
4. no puede iniciar las sacadas

-VELOCIDAD DE SACADAS (horizontales y verticales)

0. normal
1. discreta lentitud
2. moderada lentitud
3. lentitud severa
4. no completa el curso

-DISARTRIA

0. no hay
1. ligera, no necesita repetir
2. se tiene que repetir para ser entendido
3. generalmente incomprensible
4. mutismo

-PROTRUSION DE LA LENGUA(completa)

0. la puede mantener 10 segundos
1. no puede mantenerla 10 seg.
2. no más de 5 seg.
3. no puede protruir la completamente
4. no más allá que los labios

-DISTONÍA PREDOMINANTE (tronco ó miembros)

0. ausente
1. discreta, intermitente
2. leve, frecuente ó moderada, intermitente
3. moderada y frecuente
4. marcada, prolongada

-COREA PREDOMINANTE (en cara, lengua, tronco ó extremidades)

0. ausente
1. discreta, intermitente
2. leve, frecuente ó moderada, intermitente
3. moderada y frecuente
4. marcada, prolongada

-RETROPULSIÓN POR EMPUJÓN

0. normal
1. recupera espontáneamente el equilibrio
2. tiene que ser detenido sino: cae
3. tiende a caer espontáneamente
4. no se mantiene parado

-GOLPES CON LOS DEDOS (mano derecha e izquierda)

0. normal ≥ 15 por 5 seg.
1. discreta lentitud ó reducción de amplitud (11-14/ 5seg)
2. impedimento moderado con fatiga precoz ó paros (7-10/ 5seg)
3. impedimento severo al inicio ó parando el curso (3 a 6/5seg)
4. no lo realiza

-PRONACIÓN-SUPINACIÓN (mano derecha e izquierda)

0. normal
1. lentitud discreta y/ó irregularidad
2. lentitud moderada e irregularidad
3. severa lentitud e irregularidad
4. no lo realiza

-LURIA (puño- mano- palma)

0. ≥ 4 en 10 seg. continuos
1. <4 en 10 seg. continuos
2. ≥ 4 por 10 seg. discontinuo
3. <4 por 10 seg. discontinuo
4. no lo realiza

-RIGIDEZ EN MIEMBROS (derecho e izquierdo)

0. ausente
1. discreta
2. moderada
3. severa
4. severa con reducción de amplitud

-BRADICINESIA

0. no hay
1. lentitud discreta
2. lentitud clara
3. lentitud moderada
4. latencia larga de movimiento

-MARCHA

0. normal
1. base ancha y/ó lentitud
2. base ancha y dificultad
3. camina con ayuda
4. no puede caminar

-TANDEM

0. 10 pasos normales
1. 1 a 3 desviaciones
2. más de 3 desviaciones en 10 pasos
3. no completa los 10 pasos
4. no lo realiza

La Escala Unificada de la Enfermedad de Huntington (UHDRS)
 comprende 4 dominios y evalúa la traducción clínica de la enfermedad y la capacidad funcional.

Cognición

Fluidez verbal
 Prueba de Symbol digit
 Prueba de interferencia de Stroop

Comportamiento

Severidad

Frecuencia

0 nula
 1 dudoso
 2 leve, a veces
 3 moderada, frecuentemente
 4 severo y casi siempre o siempre

- TRISTEZA
- SENTIMIENTO DE CULPA
- ANGUSTIA
- PENSAMIENTOS SUICIDOS
- AGRESIVIDAD
- IRRITABILIDAD
- IDEAS OBSESIVAS
- COMPULSIONES
- IDEAS DELIRANTES
- ALUCINACIONES

Estado funcional

Actividad laboral lucrativa
 Manejo de la contabilidad mensual
 Cuida niños solo
 Maneja auto
 Hace su comida
 Telefonea
 Se viste solo
 Viaja solo en transportes públicos
 Se baña solo
 Va al baño solo

Capacidad de lucro
 Compras sin ayuda
 Compras sencillas
 Asea su casa
 Lava su ropa
 Toma su medicina solo
 Se alimenta solo
 Camina en el vecindario
 Se peina solo
 Se levanta solo de su cama

Independencia

80%: ayuda para la contabilidad

20%: mutismo

ESCALA FUNCIONAL DE ELA

LENGUAJE	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- inteligible cuando se le pide repetir 1.- vocalización parcial 0.- no emite lenguaje
SALIVACION	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- hipersalivación detectable 2.- hipersialorrea diurna 1.- escurrimiento de saliva 0.- requiere pañuelo ó trapo constantemente
DEGLUCION	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- cambio de consistencia de la dieta 1.- requiere suplementación por SNG 0.- nutrición por gastrostomía o parenteral
ESCRITURA	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- no completamente legible 1.- capaz de sostener la pluma pero no de escribir 0.- incapaz de sostener pluma
USO DE USTENSILIOS Y ESCRITURA (PACIENTE CON GASTROSTOMIA)	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- requiere poca ayuda (<i>grandes dificultades</i>) 1.- no corta alimentos pero es capaz de llevarlos a la boca (<i>posibilidades minimas</i>) 0.- requiere ser alimentado (<i>imposible</i>)
VESTIR Y ASEARSE	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- requiere asistencia intermitente 1.- con asistencia 0.- imposible
VOLTEARSE EN LA CAMA Y AJUSTAR LAS COBIJAS	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- requiere asistencia intermitente 1.- con asistencia 0.- imposible
CAMINAR	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- camina con ayuda 1.- movimientos de piernas no ambulatorios 0.- ningún movimiento en piernas
SUBIR ESCALERAS	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables 2.- fatiga y desequilibrio 1.- requiere ayuda 0.- imposible
RESPIRACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> 4.- normal 3.- dificultades detectables con esfuerzos 2.- corta respiración al reposo 1.- asistencia respiratoria intermitente (nocturna) 0.- requiere ventilador

ANALISIS DE LABORATORIO:

Tabla 5.

Técnicas analíticas empleadas en la medición de cada marcador en el LCR.

Medición	Técnica	Referencias
Productos fluorescentes de la peroxidación lipídica	Espectroscopia de fluorescencia	Triggs & Willmore 1984 Moore 1998 De Zwart 1999
Nitratos y Nitritos	HPLC	Rizzo 1998 Zecca 1998
Actividad S.O.D.	enzimática/ espectroscopia	Misra 1972
Actividad ferroxidasa de la CP	enzimática/ espectroscopia	Arnaud 1988 Tanabe 1984
Cobre libre	Absorción atómica Filtración de proteínas.	Pall 1987 Sin Ref.

1. El ensayo de peroxidación lipídica:

La presencia de productos fluorescentes en el LCR es un índice sólido de la peroxidación lipídica en el SNC. Adaptamos la técnica descrita por Triggs & Willmore (1984) para tejido homogenizado y LCR realizando algunas modificaciones.

A las alícuotas de 500 μ l de LCR se añaden 4ml de una mezcla de cloroformo-metalol 2:1 en tubos de vidrio protegidos de la luz. Se agita suavemente durante 2 minutos antes de centrifugar a 10 000 RPM durante 10 minutos. La fase líquida superior se aspira hasta llegar a una fina nata. Se remueve delicadamente la nata para extraer 2.5 ml de la fase orgánica y colocarlos en tubos limpios. Se mezcla con 1mL de agua. Se agita suavemente por un minuto y se coloca el tubo en hielo durante 15 minutos. Posteriormente, se aspiran las fases superiores y se coloca 1mL de fase orgánica en una celda de cuarzo con 1mL de metanol.

La fluorescencia se mide mediante un espectrofotómetro Perkin Elmer LS50B de luminiscencia ajustado a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del aparato se ajusta a 140 unidades de fluorescencia con una solución de quinina 0.1mg/L en ácido sulfúrico 0.05M. El resultado se expresa en UF/mL.

2. Técnica de medición de Nitritos y nitratos por HPLC

Fue inspirada de Zecca et al. 1997 y adaptada para su aplicación con nuestro equipo de laboratorio (Boll y col. 2003) a saber:

FASE MOBIL: Octylamine 6.54ml /L llevado a pH 6.4 con H₂SO₄.

Soluciones estándares:

NaNO ₂	NaNO ₃
PM:68.999	PM:84.99
Stock de 5mM:	
0.01725g/50ml	0.021225g/50ml

CURVA:

5 µM	corresponde a	50 µl	de stock en 50ml
20 µM		200 µl	de stock en 50ml
40 µM		400 µl	de stock en 50ml
80 µM		800 µl	de stock en 50ml
160 µM		1600 µl	de stock en 50ml

PASO 1 :

Colocar la fase con flujo 1.2 progresión 0.8 presión de 180 a 400 BAR hasta La estabilización de la bomba

PASO 2:

El detector electroquímico a 228nm / sensibilidad 0.01/ tiempo de respuesta: 2000

PASO 3:

Calibración del integrador: Chart speed 0.5 atenuación 16, PTeval: menos de1000

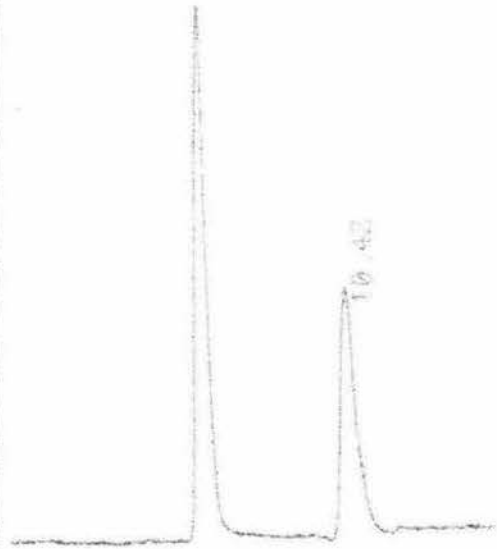
Se inyecta 75 µl de LCR filtrado y diluido 1X3

TIEMPO DE CORRIDA: 14 minutos

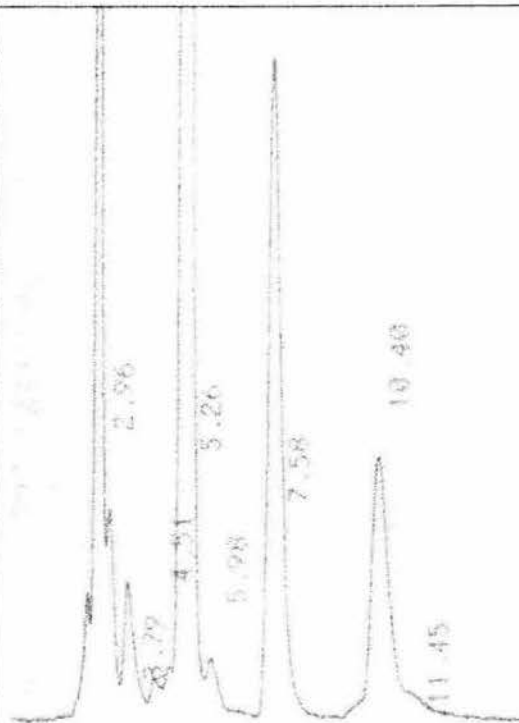
Los resultados se expresan en área bajo la curva antes de ser convertidos en concentración.

(Cromatogramas típicos en página siguiente)

Cromatograma con solución estándar
de 160 μMol de Na NO_2 (pico de la
izquierda)
y 160 μMol de Na NO_3 (derecha)



Cromatograma de LCR de un paciente
con enfermedad de Parkinson en donde se
aprecia un importante pico de nitratos en el
tiempo 10.40



3. Actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina

Esta técnica enzimática previamente descrita en suero de conejo por Arnaud y Tanabe (1988) ha sido aplicada y validada en nuestro departamento para realizar mediciones en el LCR (Boll y col, 1999).

La reacción se fundamenta en la propiedad de la ceruloplasmina de transformar Fe^{++} en Fe^{+++}

100 μ l de LCR se añaden a

200 μ l de solución amortiguadora de acetato (0.3M, pH 6).

Se deja en incubación 5 minutos a 30°C

100 μ l de sulfato ferroso de amonio 0.01M

preparados al instante con agua desoxigenada con gas nitrógeno

se añaden a la mezcla

Después de una nueva incubación de 5 minutos a 30°C

Se bloquea la reacción con 200 μ l de ácido perclórico 1.25M

Las muestras se centrifugan 3 min a 10 000 x g.

El hierro férrico producido por la reacción se determina añadiendo el mismo volumen de una solución de tiocianato de amonio 0.5M

El complejo rojizo Tiocianato-Fe (III) se determina mediante un espectrofotómetro Lambda 2000 monitoreado a 450nm

4. La actividad de la Cu/Zn SOD:

Una muestra de 50 μl de LCR se coloca en una mezcla de xantina y citocromo. Al adicionar una segunda solución que contiene xantine-oxidasa se puede medir la capacidad de inhibición de la xantine-oxidasa. Esta inhibición refleja la actividad SOD del LCR. La técnica esta descrita con detalles en Boll y col. (2003).

5. Mediciones de cobre total y cobre ión en el LCR:

Estas mediciones se realizan mediante absorción atómica en horno de grafito como descrito anteriormente (Boll y col.1999).

Para obtener el cobre ión (no unido a proteínas), se coloca una muestra de 400 μl de LCR en un dispositivo especial para centrifugación Microcon centrifugal device (Millipore Corporation)YM-3 compuesto de una membrana hidrófila de celulosa regenerada, no adherible, anisotrófico capaz de separar moléculas de un peso molecular de 3000 Da.

Después de una centrifugación a 14000g durante 70 minutos en una centrifugadora equipada de un sistema de refrigeración 5417R Eppendorf centrifuge, obtenemos 300 μl de LCR filtrado en donde la concentración de cobre se mide directamente por absorción atómica.

Materiales:

a) Equipo:

Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 3110, con horno de grafito P-E modelo HGA-600 y automuestreador AS-60.

Espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer Lambda 2000.

Cromatógrafo de Líquidos, columnas y fases.

Equipo básico de laboratorio: balanza analítica, potenciómetro, centrifuga refrigerada, ultra-centrifuga, refrigeradores y congeladores para almacenamiento de muestras.

tubos de plástico (5 alíquotas de 1cc para cada LCR) , Ependorff , pipetas.

Material de computación pentium IBM con Windows , paquetes Excel, y SPSS, con conexión a la red Internet .

b) Reactivos:

Acido nítrico, ácido perclórico, agua desionizada, antioxidantes (mercaptoetanol, metadisulfito), EDTA, Sulfato ferroso de amonio, tiocianato, epinefrina, metanol de las marcas E.Merck y Mallinckordt

Para la fabricación de soluciones amortiguadoras (buffers): glicina, acetatos, carbonato de sodio, fosfato de potasio de la marca Sigma Chemical CG.

para curvas de calibración: Estándares de cobre 1000ppm , SOD-1 Sigma-sulfato férrico, nitrito y nitrato.

Análisis estadístico:

El tamaño de muestra de 25 sujetos en cada grupo se calculó con base en un estudio comparativo de actividad ferroxidasa que se realizó anteriormente (Boll 1999) conociendo la desviación estándar de esta variable en el LCR, queriendo detectar una diferencia del 30%, con un error alfa de 5% y un poder de 80%.

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

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

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

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

Se realizó un análisis de regresión logística tomando como variable dependiente el diagnóstico de caso o de control. (Feinstein 1996)

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

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete *SPSS 10.0 for Windows*.

Consideraciones éticas:

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado (ver carta anexada) para la realización de las manipulaciones y la consulta de neurología como parte del estudio. Los controles tienen una indicación para la realización de una PL. y de misma manera firman su consentimiento para que se les tome una muestra de 5 cc de LCR que servirá eventualmente de control en caso de ser normal.

La PL se realiza únicamente si el FO es normal y si la raquiomanometría inicial es entre 12 y 20 cm de H₂O.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIROLOGÍA

MANUEL VELASCO SUÁREZ

Tel: 56063822 ext: 2005
bollneur@servidor.unam.mx

México D.F., a

La Dra. M.C.Boll y el Dr. Camilo Rios del departamento de neuroquímica lo(a) invitan a participar en un protocolo de investigación titulado "**Biomarcadores de estrés oxidante en 4 enfermedades neurodegenerativas. Especificidad y correlación con la exploración clinimétrica.**" debido a que Usted padece una de las enfermedades estudiadas y /o responde a los criterios de inclusión en caso de aceptar darnos su consentimiento para participar.

Le pedimos que lea detenidamente los rubros que a continuación presentamos:

Confidencialidad: si acepta participar es necesario que sepa que su información es confidencial y que nadie que no este inscrito en este proyecto tiene acceso a la misma.

Objetivo: Cuantificar en muestras de LCR (líquido cefalo-raquídeo) de pacientes con una de las 4 enfermedades neurodegenerativas más frecuentes en nuestro medio, los productos de la peroxidación lipídica y de otras reacciones oxidativas, así como la actividad de proteínas antioxidantes y correlacionar estos marcadores con el estado clínico (la gravedad) de cada enfermedad.

Procedimientos: Se estableció durante 2 años el registro de los nuevos pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS" con diagnóstico de enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Se propone a todos aquellos que no padecen otra enfermedad o impedimento para desplazarse, entrar en este protocolo que comprende un examen clínico y una punción lumbar de 5 mL el mismo día. Se

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (continuación)

selecciona igualmente a un grupo control formado de sujetos de misma edad y género y con una indicación de una PL.

Beneficios para los pacientes. El participar al estudio les permite beneficiar de una exploración neurológica , de una revisión de su expediente y de sus análisis (y si necesario de una receta médica) en forma gratuita.

Riesgos para los pacientes. Son básicamente los riesgos de la punción lumbar la cual será realizada en las mejores condiciones , por un neurólogo entrenado (de manera que se reduce considerablemente la posibilidad de dolor ó molestias), asistido de una enfermera, en el laboratorio de análisis clínicas equipado de camillas planas. Se recomendará a los pacientes de permanecer en posición horizontal durante media hora después del procedimiento para evitar el riesgo de cefalea post-punción que ocurre en el 1.4% de los casos cuando se introduce aire por la aguja de punción. Recomendamos a los pacientes traer un desayuno con alguna bebida.

Su participación es **voluntaria** y su decisión no afectará de ninguna manera su atención en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Identificación de los investigadores :

figura en el membrete de la carta

Si surgen dudas ó comentarios, favor de comunicarse

Nombre, firma y teléfono

El paciente

Testigo 1

Testigo 2

Médico responsable

RESULTADOS

Se estudio un total de 137 pacientes, 9 de ellos fueron excluidos *a posteriori* del estudio por haber presentado reacciones positivas a NCC y/o LCR inflamatorio. Un paciente control presentó una seropositividad para HIV y otros 6 casos fueron eliminados por mal almacenamiento de sus muestras de LCR.

1) DATOS DESCRIPTIVOS DE LA SERIE:

La muestra final de pacientes esta representada en la tabla 6. En la tabla 7 se presentan los diagnósticos de los pacientes controles.

Tabla 6.

Tamaño de la muestra de pacientes en cada grupo.

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	control	41	33.9	33.9	33.9
	ALS	27	22.3	22.3	56.2
	HD	23	19.0	19.0	75.2
	AD	8	6.6	6.6	81.8
	PD	22	18.2	18.2	100.0
	Total	121	100.0	100.0	

Se adoptaron las abreviaturas usuales de las enfermedades en inglés a saber: ALS=ELA, HD= enfermedad de Huntington, AD= enfermedad de Alzheimer, PD=enfermedad de Parkinson.

Tabla 7.

Diagnóstico de los sujetos controles.

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Curado de NCC	1	.8	.8	71.9
Cefalea tensional	1	.8	.8	72.7
Cefalea	1	.8	.8	73.6
Cefalea 5 años después de NCC	1	.8	.8	74.4
Cefalea HTA	1	.8	.8	75.2
Cefalea con rigidez de nuca	1	.8	.8	76.0
Crisis única	1	.8	.8	76.9
Depresión	1	.8	.8	77.7
Disartría	1	.8	.8	78.5
Dolor ocular	1	.8	.8	79.3
Epilepsia controlada	1	.8	.8	80.2
Epilepsia controlada	1	.8	.8	81.0
Epilepsia criptogenica	1	.8	.8	81.8
Fistula de LCR	1	.8	.8	82.6
Glaucoma	1	.8	.8	83.5
Henia discal	1	.8	.8	84.3
Hidrocefalia normotensa	1	.8	.8	85.1
Hidro normo	1	.8	.8	86.0
Hipoglucemia	1	.8	.8	86.8
Migraña con aura	1	.8	.8	87.6
Neuropatía con anemia.malabsorsió	1	.8	.8	88.4
Oftalmoparesia	1	.8	.8	89.3
Pseudocrisis	1	.8	.8	90.1
PseudoT.cerebri	1	.8	.8	90.9
Quiste coloidal no compresivo -	1	.8	.8	91.7
Secuelas de mielitis	1	.8	.8	92.6
Seudotumor cerebri	1	.8	.8	93.4
Síncope	1	.8	.8	94.2
Síncope vaso vagal	1	.8	.8	95.0
Siringomielia	1	.8	.8	95.9
Sx conversivo	1	.8	.8	96.7
Tensional	1	.8	.8	97.5
Tr Obsesivo Compul	1	.8	.8	98.3
Tr visual+equilibrio	1	.8	.8	99.2
Tr x angustia	1	.8	.8	100.0

Los diagnósticos fueron establecidos después de una revisión exhaustiva.

Para obtener la muestra de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, se llevo acabo el registro de los pacientes atendidos en la consulta externa durante 2 años. Nos llamó la atención la escasez de casos con diagnóstico de "Alzheimer probable". De 40 sujetos con demencia, únicamente 10 cumplían criterios diagnósticos y 8 pudieron finalmente ser incluidos. En el mismo tiempo atendimos a 128 pacientes con Parkinson, 27 con ELA y más de 40 con enfermedad de Huntington: Este último dato se explica por la actividad importante del servicio de neurogenética donde se refieren todos los casos del país para diagnóstico molecular.

El último registro de consultas de primera vez en la consulta externa del INNN correspondientes al primer semestre del 2004 figura en la tabla 8.

Tabla 8.

Registro de pacientes acudiendo por primera vez del 1 enero al 30 junio 2004

Epilepsia	n=188	Malformaciones vasculares	n=39
Adenomas de hipófisis	n=110	Neoplasias del SNC	n=34
EVC	n=110	Demencias	n=33
Parkinson	n= 71		
Parálisis faciales	n= 61	Total de las CE 1ra vez	N=1668

CE: Consulta Externa del INNN /SSA

La repartición por genero de la muestra de pacientes (Fig.4) esta relativamente equilibrada aunque en el grupo Parkinson predominan significativamente los hombres.

Estos resultados son congruentes con un estudio que realizamos anteriormente (Boll y col.1999) en el cual obtuvimos una predominancia significativa de varones con enfermedad de Parkinson.

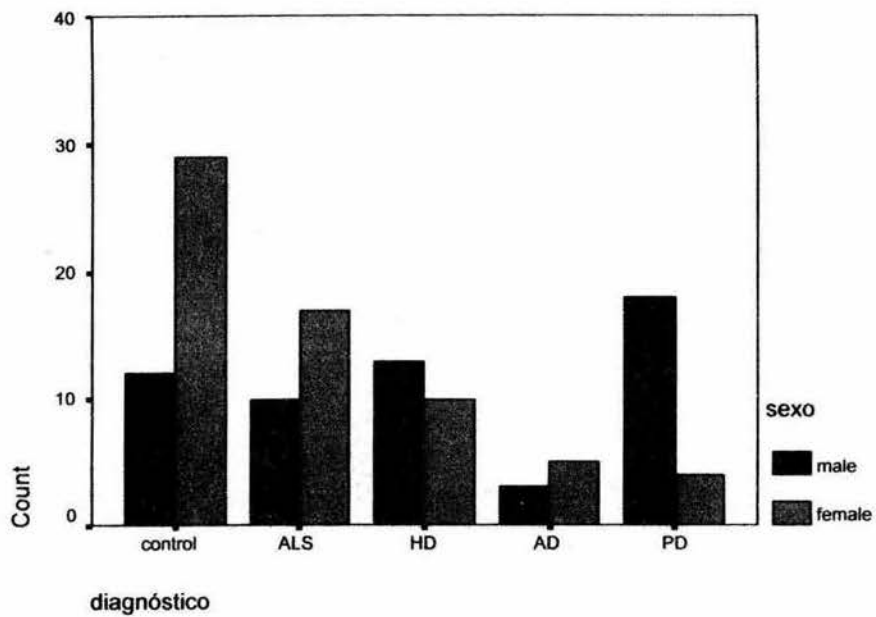


Fig.4. Repartición por género de la muestra de pacientes.

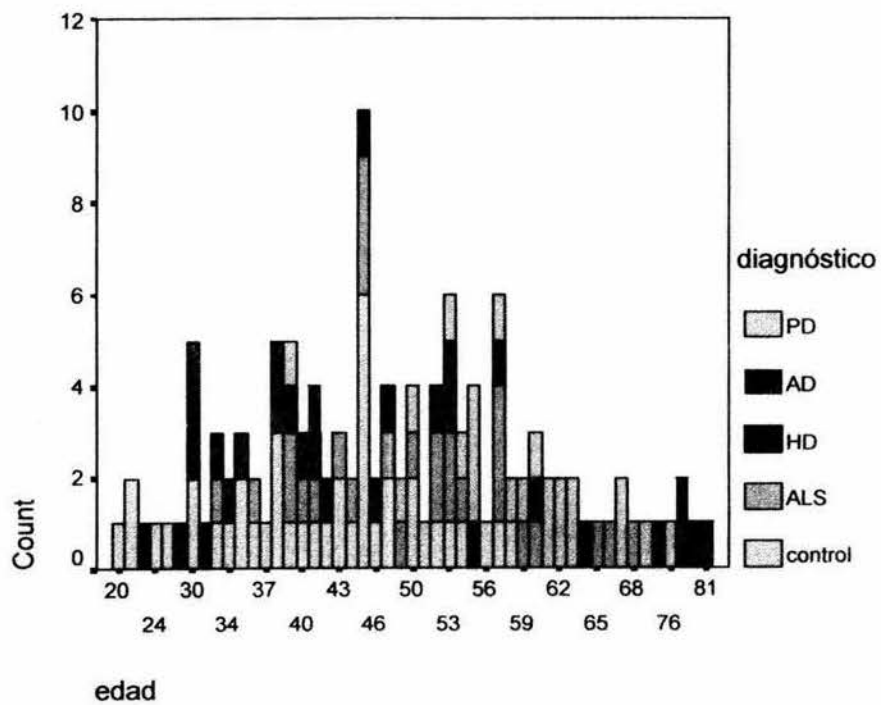


Fig. 5. Frecuencia por edad (años) de los pacientes incluidos en este estudio.

La repartición por edad que se indica gráficamente en la figura 5 es similar en los grupos: control, ELA y enfermedad de Huntington (HD) mientras se encuentra significativamente más elevada en el grupo Parkinson ($p=0.04$) y Alzheimer ($p=0.001$). Si bien existe esta diferencia, la comparación es adecuada ya que el grupo control fue cuidadosamente compuesto, representado por sujetos de las 4 décadas estudiadas y siendo un buen reflejo de la población adulta..

La gravedad clínica expresada en puntaje clinimétrico se relaciona respectivamente con cada índice neuroquímico. Destacan los siguientes resultados:

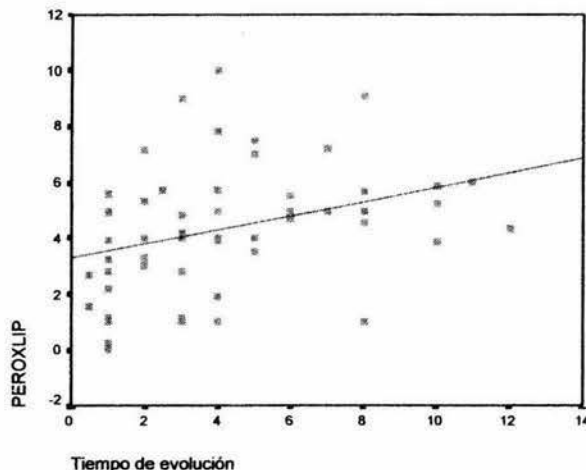


Fig. 6. Correlación entre el tiempo de evolución (años) de las enfermedades degenerativas y los niveles de lipoperoxidación (UF)
CC=0.339, $p=0.012$

El **tiempo de evolución** se relaciona significativamente con la peroxidación lipídica (Fig 6). Esta misma variable tiene correlación positiva y significativa con todas las escalas clinimétricas, por ejemplo con el MMSE en pacientes con demencia ($p=0.002$) y con la escala funcional de ELA ($p=0.01$).

También se relaciona, y de manera más dramática, con el nivel de Cu libre en el LCR ($p=0.009$).

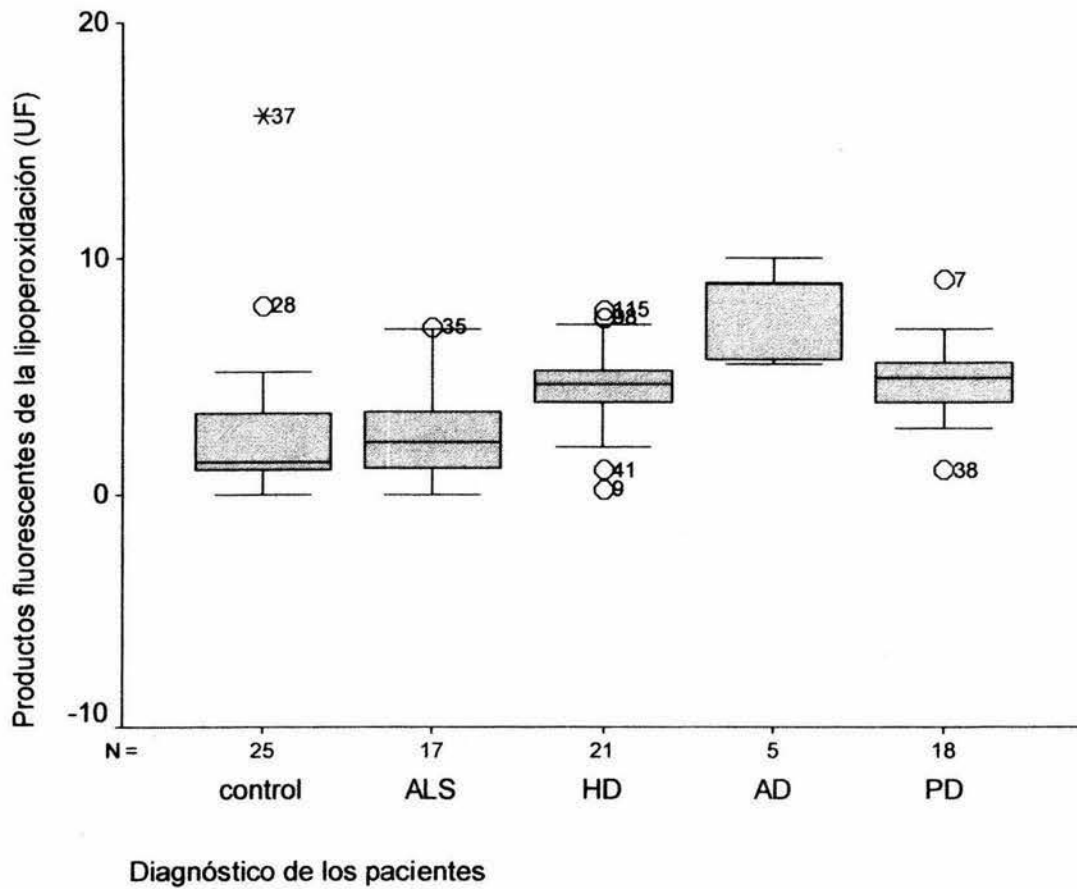


Fig.7. Niveles de productos fluorescentes de la peroxidación lipídica en LCR de los 5 grupos de pacientes.

La peroxidación lipídica expresada mediante sus productos fluorescentes en el LCR se encuentra elevada en las enfermedades en Huntington ($p=0.09$), Parkinson ($p=0.08$) y Alzheimer ($p=0.001$) con el siguiente resultado del ANOVA:

Productos fluorescentes de la lipoperoxidación (UF)					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	146.027	4	36.507	5.962	.000
Within Groups	495.982	81	6.123		
Total	642.008	85			

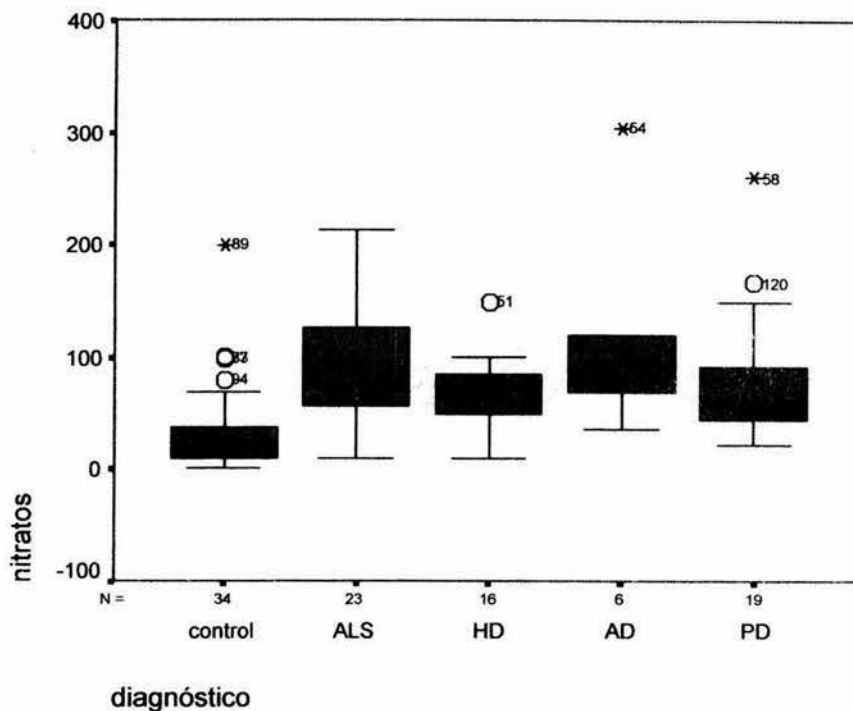


Fig.8: Concentración de nitratos en micromol por litro en los diferentes grupos.

La técnica de HPLC con detección electroquímica, para medir las concentraciones de nitritos y nitratos en LCR, fue montada en el laboratorio de neuroquímica en 2002 . Se basa en el método descrito por Zecca y col. en 1998.

Obtuvimos con algunas modificaciones presentadas previamente cromatogramas bien definidos con concentraciones tan bajas como de 5 micromolar.

Los nitratos que representan generalmente la suma de nitritos+nitratos (Boll y col 2003) se encuentran significativamente elevados en el LCR en las 4 enfermedades neurodegenerativas estudiadas. Notamos estos resultados sensiblemente más elevados en la ELA y la enfermedad de Alzheimer (Fig.8).

Los 2 marcadores anteriormente estudiados fueron también medidos en casos de neuroinfección (generalmente neurocisticercosis) donde se encuentran dramáticamente más aumentados (Fig 9.)

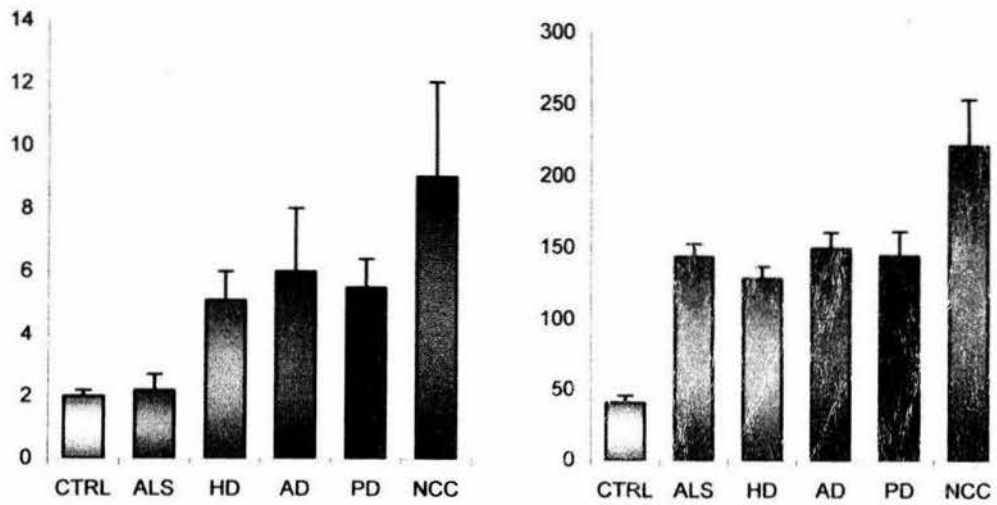


Fig. 9. Promedio y EE de la **peroxidación lipídica** (izq.) y de los **valores de nitratos** (der.) en el LCR de sujetos sujetos sanos (controles), con ELA, Huntington, Alzheimer (AD), Parkinson (PD) y neurocisticercosis (NCC).

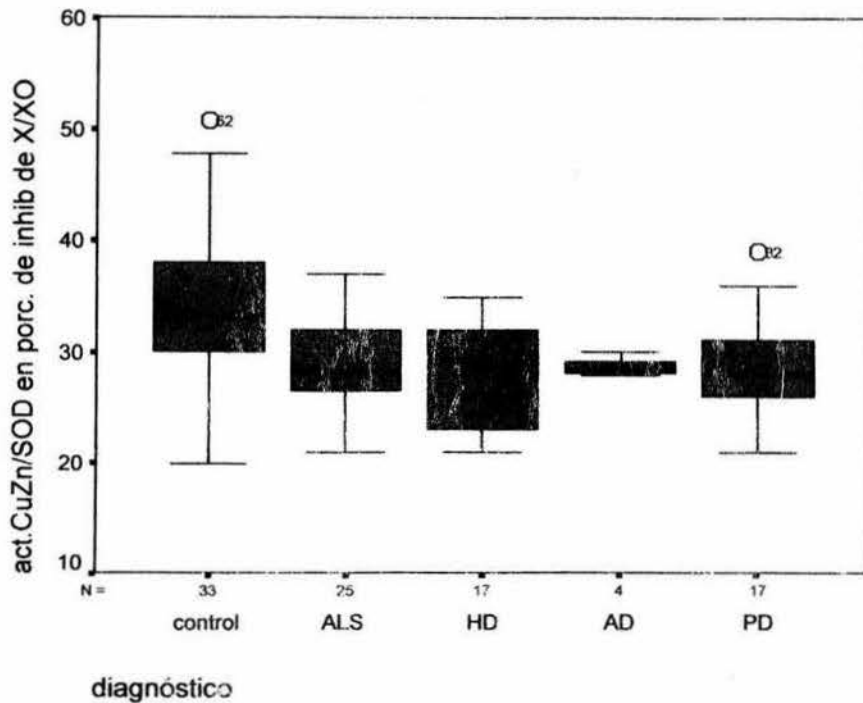


Fig.10: Actividad Cu/ZnSOD medida por inhibición de la xantina/xantina-oxidasa.

Notamos (fig.10) una leve disminución de la actividad SOD en todas las enfermedades neurodegenerativas. Únicamente obtuvimos una diferencia con significancia limítrofe.

Como datos descriptivos obtuvimos en la totalidad de los pacientes de esta serie un rango de 22-51, un promedio de 30.85 con una moda de 28% (1UI corresponde a 50% de inhibición). Encontramos esta actividad con correlación negativa con la edad de los pacientes ($p=0.003$) y otra correlación significativa con el daño axonal en la ELA (Boll y col. 2003). En un trabajo anterior, encontramos la actividad SOD levemente disminuida en la enfermedad de Parkinson no tratada con levodopa mientras estaba significativamente aumentada bajo tratamiento con L-DOPA (Fig.11). La técnica empleada se basó en la propiedad de la enzima para inhibir la autoxidación de la norepinefrina. En el presente trabajo se usó la técnica de la X/XO más precisa y específica de la SOD, aunque en un ensayo intermedio verificamos la concordancia entre los resultados con las dos técnicas empleadas en 20 muestras y encontrando una correlación significativa de $p=0.04$.

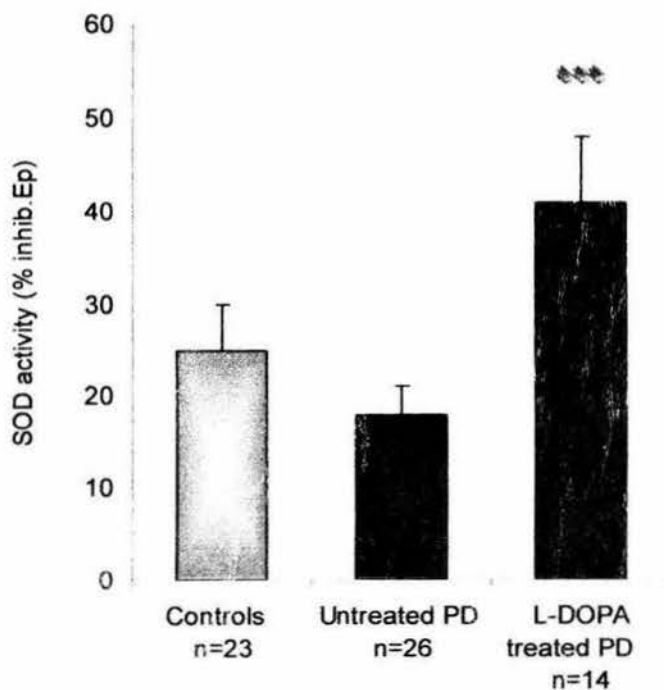


Fig. 11. Actividad SOD en LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson

A continuación presentamos la gráfica de boxplot de la **actividad ferroxidasa** en los 5 grupos. Se encuentra significativamente disminuida en las enfermedades de Parkinson, Huntington y Alzheimer (también caracterizadas por depósitos de hierro en las estructuras afectadas). La ferroxidasa en su casi-totalidad representada por la ceruloplasmina cerebral se encarga de movilizar el hierro cerebral además de ser un potente antioxidante en presencia de exceso de RL.

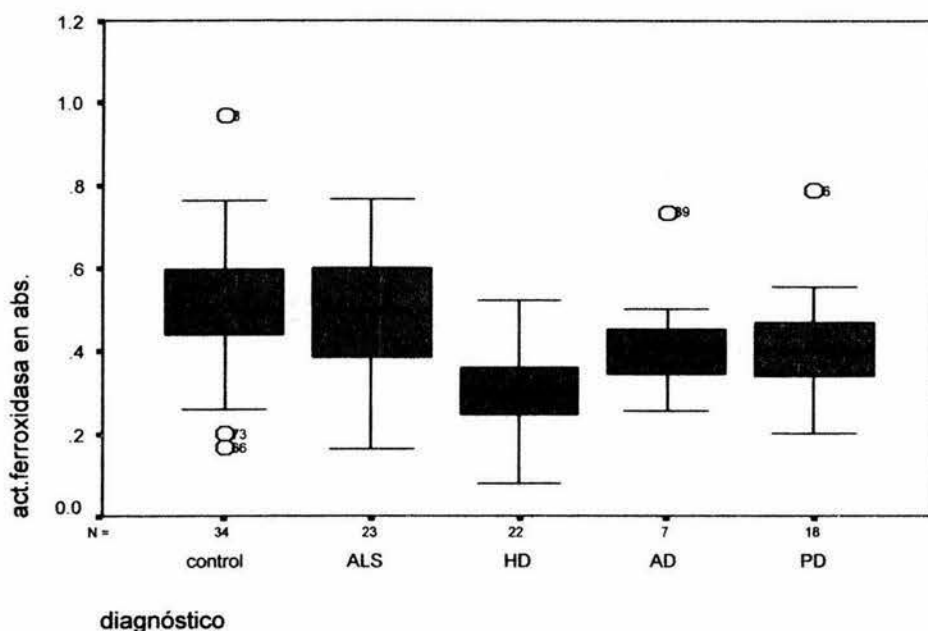


Fig. 12. Actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina en los 5 grupos de pacientes.

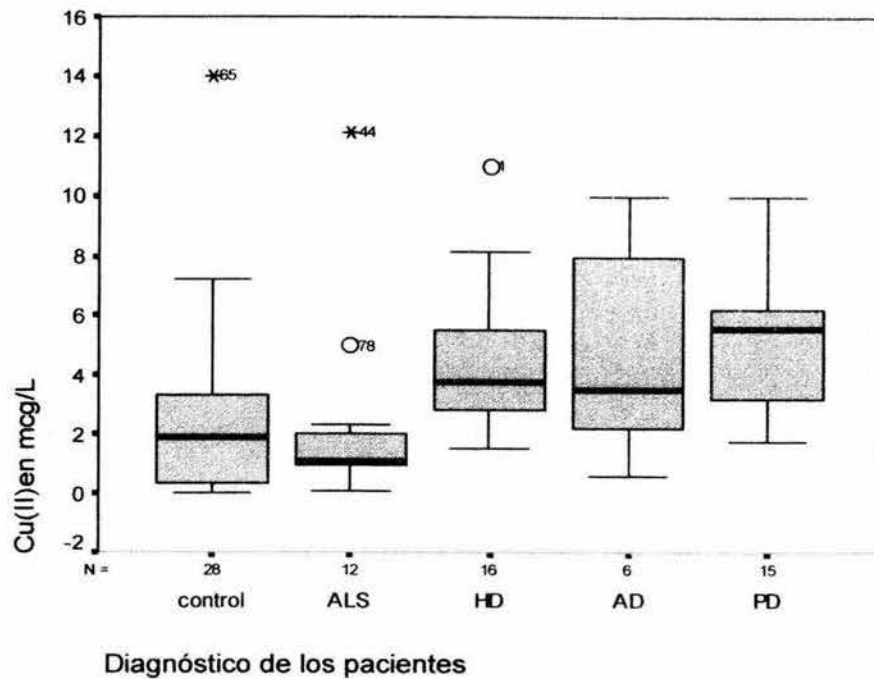


Fig.13. Representación en boxplot de la concentración de cobre iónico expresado en $\mu\text{g/L}$ en los cinco grupos estudiados.

Ante la visible elevación de la concentración de Cu libre en el LCR de los pacientes con Huntington, Alzheimer y Parkinson, se realizó un análisis ANOVA, para encontrar una diferencia significativa en “al menos un grupo” (Tabla 9) y se completó con una prueba de Tukey (Tabla 10).

Los resultados fueron que el grupo de LCR de pacientes con Parkinson (PD) se caracteriza por un nivel significativamente elevado de cobre libre .

Tabla 9.

Resultado del análisis multivariado de los resultados de cobre iónico en los 5 grupos de pacientes.

CULIBRE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	131.851	4	32.963	3.502	.011
Within Groups	677.637	72	9.412		
Total	809.489	76			

El ANOVA resulto significativo con $p=0.011$ señalando diferencia significativa de al menos un grupo. Se completó el estudio con una prueba de Tukey para identificar a los grupos significativamente diferentes.

Tabla 10.

Comparaciones múltiples tomando como variable dependiente: CuLIBRE

Tukey HSD

(I) diagnóstico	(J) diagnóstico	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	ALS	.1011	1.0585	1.000	-2.8607	3.0630
	HD	-1.8907	.9614	.293	-4.5810	.7995
	AD	-2.1794	1.3801	.515	-6.0411	1.6824
	PD	-3.1652	.9816	.016	-5.9119	-.4185
ALS	control	-.1011	1.0585	1.000	-3.0630	2.8607
	HD	-1.9919	1.1715	.440	-5.2700	1.2863
	AD	-2.2805	1.5339	.574	-6.5726	2.0116
	PD	-3.2663	1.1882	.057	-6.5910	5.832E-02
HD	control	1.8907	.9614	.293	-.7995	4.5810
	ALS	1.9919	1.1715	.440	-1.2863	5.2700
	AD	-.2886	1.4686	1.000	-4.3980	3.8208
	PD	-1.2745	1.1026	.776	-4.3596	1.8107
AD	control	2.1794	1.3801	.515	-1.6824	6.0411
	ALS	2.2805	1.5339	.574	-2.0116	6.5726
	HD	.2886	1.4686	1.000	-3.8208	4.3980
	PD	-.9858	1.4819	.963	-5.1324	3.1607
PD	control	3.1652	.9816	.016	.4185	5.9119
	ALS	3.2663	1.1882	.057	-5.8319E-02	6.5910
	HD	1.2745	1.1026	.776	-1.8107	4.3596
	AD	.9858	1.4819	.963	-3.1607	5.1324

The mean difference is significant at the .05 level.

Analizando el resultado de cobre libre en los diferentes grupos de pacientes, Se encontró una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo Parkinson ($p=0.016$).

La diferencia encontrada en la prueba de ANOVA se debe a la elevación significativa del cobre libre en la enfermedad de Parkinson que retamos como marcador de esta enfermedad. Cu libre tiene una sensibilidad de 75 % y una

especificidad de 84% con base en la curva ROC y el punto de corte es de 3.2 μg Cu /L de LCR.

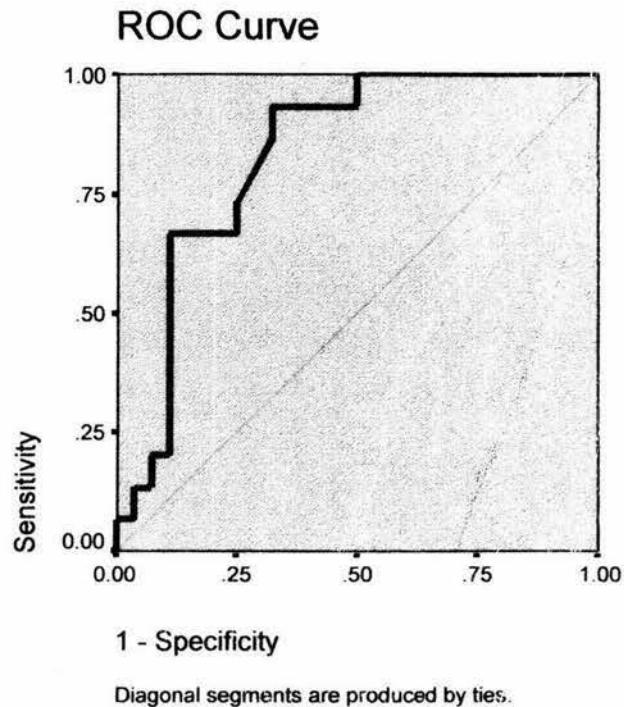


Fig. 14. Curva ROC con la variable cobre libre en pacientes con Parkinson versus controles con área bajo la curva significativa ($p < 0.001$)

Test Result Variable(s): CuLIBRE

Area	Std. Error	Asymptotic Sig.	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
.833	.062	.000	.712	.955

Under the nonparametric assumption

El punto de corte de concentración de cobre libre arriba de 3.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ tiene una especificidad de .84 y una sensibilidad de .75 para el diagnóstico de enfermedad de Parkinson. Esta medición podría ser útil en casos clínicamente dudosos.

DISCUSION:

Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno han sido ampliamente reconocidas como moléculas de señalización intracelular e implicadas en procesos fisiológicos, en la expresión génica, en la diferenciación celular y en la activación inmune (Ishropoulos 2003). Sin embargo, una producción continua de estas especies puede ocasionar estrés oxidativo llevando al daño y a la muerte celular. El SNC es particularmente susceptible de ser dañado debido a su alto consumo de oxígeno y la alta tasa de reacciones oxidativas en un medio particularmente rico en lípidos poliinsaturados. En la actualidad, el estrés oxidativo ha sido implicado en la patogénesis de la neurodegeneración en todas sus formas clínicas. Algunos marcadores han sido estudiados en tejido cerebral humano *post mortem* en particular la relación GSH/GSSH alterada en la enfermedad de Parkinson (Jenner 1992) y la demostración, en la enfermedad de Alzheimer, de la elevación del DNA oxidado, de proteínas oxidadas, y de productos de lipoperoxidación en regiones caracterizadas por la presencia de placas seniles y marañas neurofibrilares (Klein 2003).

Nuestros resultados tienen la originalidad de estar enfocados en marcadores que reflejan la situación *in vivo*. Los productos fluorescentes de la lipoperoxidación detectables en el LCR se encuentran significativamente aumentados en 3 de las enfermedades pero resultaron normales en la ELA sugiriendo un tipo de mecanismo de muerte neuronal diferente en esta enfermedad. Por otra parte estos productos fueron encontrados muy elevados en el LCR en procesos neuroinfecciosos y hace considerar la lipoperoxidación como parte de un perfil oxidativo que carece de especificidad.

Asimismo, los nitritos+nitratos, representados casi exclusivamente por los nitratos, están significativamente elevados en las 4 enfermedades señalando una sobre-producción de NO., especialmente en la ELA. De manera general, la

lipoperoxidación y los nitratos reflejan un estrés oxidante que existe igualmente en otras patologías y es mucho más importante en las neuroinfecciones. Lo pudimos constatar al medir estas variables en 8 alícuotas de LCR inflamatorio, que fueron a posteriori eliminados de la base de datos, con valores de LPO y Nitratos significativamente más elevados que en las otras muestras.

Los estudios *in vivo* en pacientes con estas enfermedades son escasos y de los marcadores enzimáticos medidos en el presente trabajo únicamente tenemos antecedente de la medición de actividad SOD con técnica de *spin echo* la cual fue encontrada reducida en AD pero no en Parkinson (DeDeyn 2001). En un trabajo anterior postulamos la hipótesis de una deficiencia de actividad de la SOD como posible mecanismo de la enfermedad de Parkinson, cuando encontramos esta baja actividad en los casos no tratados con L-DOPA, mientras estaba dramáticamente aumentada en los pacientes tratados por L-DOPA. Este hallazgo puede interpretarse como una respuesta al estrés oxidativo ocasionado por el catabolismo de la monoamina (DA).

La actividad ferroxidasa, función enzimática de la ceruloplasmina cerebral, no fue diferente en la ELA que en controles mientras estaba significativamente disminuida en las 3 otras enfermedades. En la enfermedad de Parkinson se corroboró esta reducción de actividad en los sujetos no tratados con L-DOPA que ya se había encontrado previamente en otra serie de pacientes (Boll y col.1999). En pacientes con EH esta diferencia se presentó aún mayor y en acuerdo con una deficiencia de una proteína unida a cobre, antioxidante y que moviliza el hierro cerebral. Cabe resaltar que la EH se caracteriza por importantes depósitos de hierro en el cuerpo estriado y la enfermedad de Alzheimer por estos en las regiones corticales caracterizadas por las alteraciones neuro-patológicas típicas. En este trabajo sobresale una falla y/o una carencia en proteínas antioxidantes y transportadoras de metales. El papel de la ceruloplasmina cerebral es primordial. Recordemos la descripción de la aceruloplasminemia en familias japonesas (Harris 1996). Esta entidad nosológica se caracteriza por afección neurológica

extrapiramidal y retiniana y abundantes depósitos de hierro. Posteriormente se identificó y se caracterizó molecularmente a la ceruloplasmina cerebral sintetizada por astrocitos y neuronas (Patel y col.1997, 2001). El papel específico de esta proteína ha sido recientemente demostrado en ratones deficientes $Cp^{-/-}$ en los cuales además de los problemas motores, diferentes estructuras estudiadas del SNC presentan incremento de la peroxidación lipídica y de los depósitos de hierro (Patel y col. 2002). En cultivos celulares $Cp^{-/-}$ además de los anteriores hallazgos se demostró una susceptibilidad particular de las neuronas a la exposición a H_2O_2 (3 a 10 veces menos viables que los astrocitos).

La síntesis de las proteínas antioxidantes Cp y SOD aumenta en respuesta al estrés y a su vez la pérdida neuronal, la falla energética o las anomalías de la señalización citoplasmática pueden producir disminución de su producción (Ischiropoulos y Beckman 2003).

La elevación de cobre libre en el LCR de los pacientes con estas enfermedades fue corroborada después de usar una técnica de microfiltración novedosa y muy confiable. A pesar del pequeño tamaño de muestra este marcador tiene una especificidad de 0.84 para en diagnóstico de Parkinson idiopático cuando la concentración de cobre ión está $> 3.2 \mu\text{g/L}$.

Los resultados de este trabajo nos hacen resaltar el papel importante del cobre y de las proteínas unidas al cobre en la homeostasis de las neuronas que se degeneran en las enfermedades EP, HD y AD, y que podemos plasmar en el siguiente diagrama (Fig. 15).

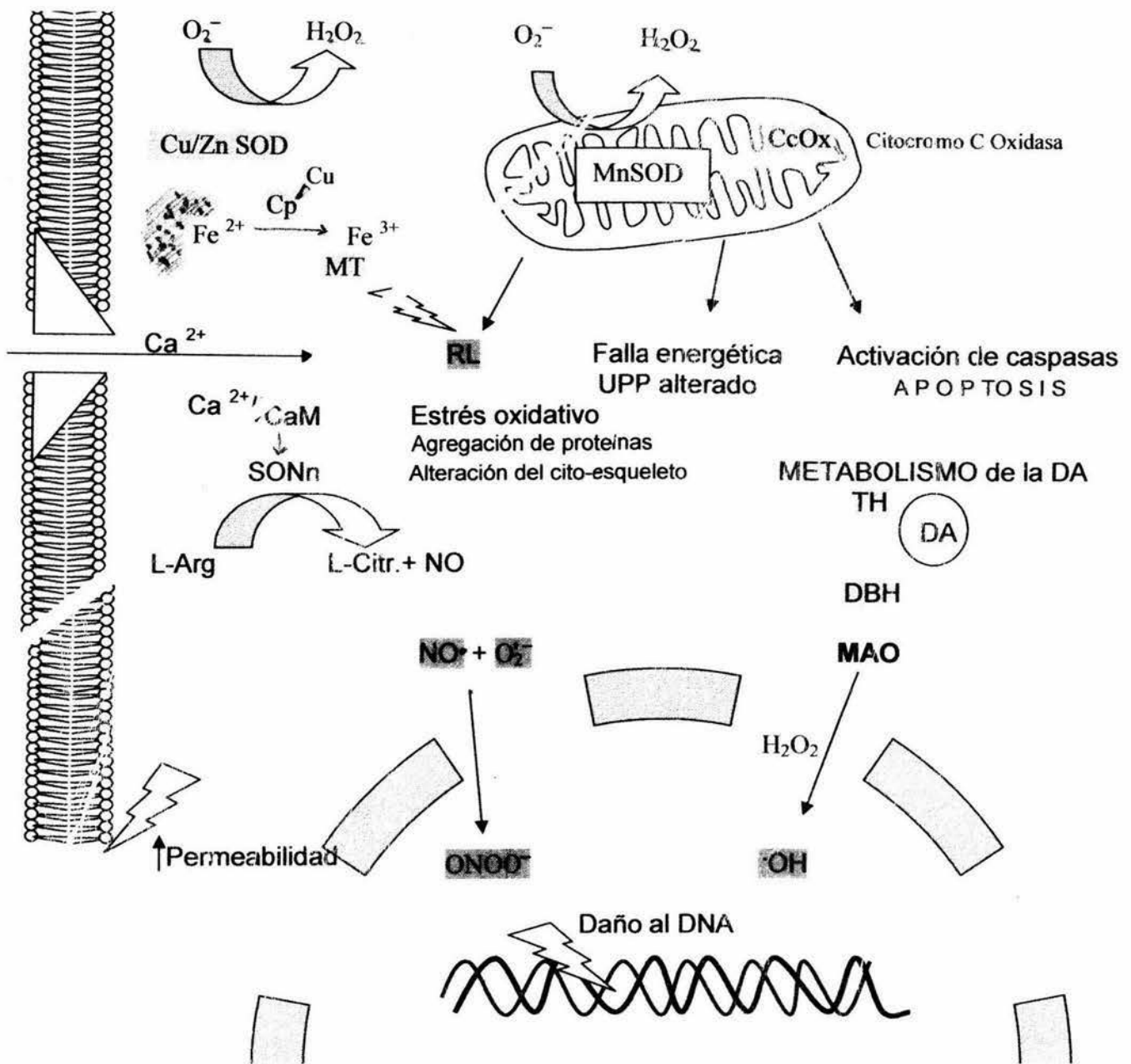


Fig 15.: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UNA NEURONA DONDE FIGURAN LAS INTERVENCIONES DEL COBRE Y DE LAS CUPROPROTEÍNAS.

RL radical libre, cuproproteínas, CaM: calmodulina, SONn: sintasa de oxido nítrico neuronal, DA: dopamina, L-Arg: L-arginina, L-Citr.: L-Citrulina, Cp: ceruloplasmina, MT: metalotioneína UPP: sistema ubiquitina-proteasoma, MnSOD: superoxido dismutasa dependiente de Mn TH: tirosina hidroxilasa, DBH: DA beta hidroxilasa, MAO: monoamina oxidasa.

La disminución de la actividad enzimática y de la retención de cobre también podría responder a la síntesis de proteínas alteradas.

En la inmensa información que provee el reciente mapeo del genoma humano y las bases de datos accesibles por internet tal como PDP u OMIN (Online Mendelian Inherence in Men) donde se nombra, se localiza y se matricula a los genes, todavía se sabe poco de las proteínas funcionalmente alteradas (por mutaciones) en las enfermedades neurodegenerativas. Si bien sus formas mutadas se relacionan con agregados de neurofilamentos anormales se desconocen las funciones de la huntingtina, de la alfasinucleína, de la presenilina o la proteína *tau* entre otras. El entender la naturaleza exacta de estas enfermedades abarca el conocer la estructura de las proteínas involucradas, en los mecanismos y sitios de acción, surgiendo el nuevo campo de la medicina molecular llamado proteómicos. Como ejemplo reciente de hallazgo en la esclerosis lateral amiotrófica se evidenció la expresión de una variante anormal de NOSn en las motoneuronas (Phul y col. 2000).

En la actualidad múltiples aplicaciones terapéuticas resultan del entendimiento parcial de algunos mecanismos patogenéticos de la neurodegeneración. Los antioxidantes se recomiendan ampliamente desde los 90's en todas las enfermedades degenerativas del SNC (Jenner y col. 1996, Behl 1999, www.astaxanthin.org/neurodisease.htm, www.infonutrition.org/vitamines/e.html). Se extienden las indicaciones de varias medicaciones antiexcitotóxicas a diferentes niveles tales como el topiramato y la memantina en estas enfermedades, se experimentan medicaciones pro-energéticas como la coenzima Q10 y se ensaya actualmente inhibidores de caspasas como la minociclina en la EH tratando finalmente de detener la muerte neuronal por apoptosis (Chen y col. 2000).

En nuestro laboratorio demostramos que la administración de sulfato de cobre II protege contra la neurotoxicidad del oxidante MPP+ en modelos murinos de la EP (Alcaraz-Zubeldia y col. 2001) y contra la excitotoxicidad provocada por QUIN (Santamaría y col. 2004), trabajos fundamentados en la falla de proteínas que fijan el cobre, tanto en el modelo experimental como en la enfermedad de Parkinson. También se estudio el estrés oxidante en modelos transgénicos de Huntington (Segovia y Pérez-Severiano 2002) así como en la intoxicación con QUIN corroborando el efecto antagonista del NMDA del cobre previamente estudiado (Vlachova1996, Weiser 1996). El presente trabajo consiste también en una base para ensayar el sulfato de Cu(II) en los pacientes con enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington además de sustentar el uso de medicaciones antioxidantes de diferentes tipos.

CONCLUSIONES

En conclusión este trabajo aporta nuevas evidencias de la existencia del estrés oxidante en las 4 enfermedades neurodegenerativas estudiadas. Además señala mecanismos diferentes siendo los productos fluorescentes de la peroxidación lipídica elevados en un 288% en la enfermedad de Alzheimer y 180% en las de Parkinson y Huntington mientras tienen un rango normal en la ELA donde en cambio, se evidenció el aumento de producción de NO y por lo tanto de nitratos concomitante con una deficiente actividad SOD aún en la forma esporádica (Boll 2003).

Los nitratos a su vez se encuentran elevados en las 4 patologías.

La actividad de la Cu/Zn SOD se encuentra disminuida en las 4 enfermedades pero sin alcanzar significancia estadística.

No encontramos diferencia entre los géneros en ningún marcador.

Probablemente los resultados más relevantes consisten en la evidencia de una reducida actividad ferroxidasa y de la presencia de cobre libre en las enfermedades caracterizadas por depósitos de hierro en las áreas de neurodegeneración. Los valores de cobre libre obtenidos mediante una fórmula matemática en el trabajo publicado en 1999 se corroboran en el presente.

Estos resultados nos permiten especular en cuanto a la falla de proteínas que se unen al cobre, que por una parte son importantes antioxidantes, y por otra, movilizan el hierro cerebral. Un tratamiento con sulfato de Cu(II) ya demostró ser protector en modelos experimentales y próximamente podría ser ensayado en pacientes.

BIBLIOGRAFIA

- Alonso ME, Yescas P, Cisneros B, Martinez C, Silva G, Ochoa A, Montanez C. Analysis of the (CAG)_n repeat causing Huntington's disease in a Mexican population. *Clin Genetics* 1997 51:225-230.
- Alcaraz-Zubeldia M, Rojas P, Boll C, Rios C. Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP⁺ neurotoxicity in mice. *Neurochem Res* 2001 Jan;26(1):59-64.
- ALS CNTF Treatment Study Phase I-II Study Group. 1996. The ALS Functional Rating Scale: Assessment of activities of daily living in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 53:141-147.
- Arnaud Ph, Gianazza E, Miribel L. Study of acute-phase reactants *Methods in Enzymology* 1988;163 (40): 441-448.
- Aschner M. The functional significance of brain metallothioneins *FASEB J.*1996; 10(10):1129-1136.
- American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV) Washington APA Press 1994 ,4th Edit.
- Beal M.F. Aging, Energy, and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases *Ann Neurol* 1995; 38:357-366.
- Behl C Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection. *Int J Vitam Nutr Res.* 1999 May;69(3):213-9.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. and the ALS/Riluzole Study Group. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 1994; 330:585-591.
- Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., and Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals *Life Sci* .1999; 65(18):1865-74.
- Blass J. Pathophysiology of the Alzheimer's syndrome *Neurology* 1993;43 (suppl 4): S25-38.
- Boll MC. Otero E, Corona T.. *La enfermedad extrapiramidal y su traducción en I.R.M.* In: Parkinson, Enfoque al Futuro, Fondo de Cultura Económica/U.N.A.M, México, 1996 1ra Ed.pp 127-146.

- Boll, MC, Sotelo J, Otero E, Alcaraz-Zubeldia M, Rios C. Reduced ferroxidase activity in the CSF from patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 1999; 265:155-158.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia, M, Montes S, Murillo-Bonilla JM, Rios C. Raised nitrates level and low SOD activity in the CSF in sporadic ALS. *Neurochem Res* 2003; 28(5):699-703.
- Borlongan CV, Kanning K, Poulos SG, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. Free radical damage and oxidative stress in Huntington's disease. *J Fla Med Assoc*. 1996 May;83(5):335-41.
- Bredt, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res*. 1999;31(6):577-96.
- Brooke MH, Diagnosis criteria in clinical trials *Neurology*1996 (suppl 2):S67-70.
- Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical Limits of Amyotrophic Lateral Sclerosis" workshop contributors. *J. Neurol. Sci* 1994; 124 (suppl):96-107.
- Brooks BR. Test protocol development : Further preliminary experience with the effect of TRH in ALS *Muscle Nerve* 1985; 8: 460-65.
- Brooks BR. Natural history of ALS: Symptoms, strength, pulmonary function, and disability *Neurology* 1996; 47(suppl 2). S71-S82.
- Brown RH Superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis: model for gain and function *Current Biology* 1995, 5: 841-846
- Ceballos I, Lafon M, Javoy-Agid F, et al. Superoxide dismutase and Parkinson's disease. *Lancet* 1990 ; 335: 1035.
- Cohen G. Enzymatic/Nonenzymatic Sources of Oxyradicals and Regulation of Antioxidant Defenses *Annals New York Academy of Sciences* 1994:8-14
- Cohen O, Kohen R, Lavon E et al. Serum Cu/Zn superoxide dismutase activity is reduced in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients *J Neurol Sci* 1996; 143: 118-120

- Coyle, J.T., and Putterfarken, P. Oxidation stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993;146: 354-360.
- Crapo, J.D., McCord, J.M., and Fridowich, I. Preparation and Assay of Superoxide Dismutases. *Meth. Enzymology*. 1978; 53:382-393.
- Crowe A. & Morgan, E.H. Iron and Copper Interact During their Uptake and Deposition in the Brain and Other Organs of Developing Rats Exposed to Dietary Excess of the two Metals. *J. Nutr.*, 1996, 126: 183-194.
- Chan P.H, Yang G.Y, Chen S.F. et al. Cold-induced Brain Edema and Infarction Are Reduced in Transgenic Mice Overexpressing CuZn-Superoxide Dismutase *Ann Neurol* 1991; 29:482-486.
- Chen M, Ona VO, Li M et al. Minocycline inhibits caspase 1 and caspase 3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Med* 2000;6(7):797-801.
- Daly L.E et al. Sample size formulae In: Interpretation and Uses of Medical Statistics Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991 4th Ed.: 426-27.
- De Deyn PP, Hiramatsu M, Borggreve F, Goeman J, D'Hooge R, Saerens J, Mori A. Superoxide dismutase activity in cerebrospinal fluid of patients with dementia and some other neurological disorders. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1998 Mar;12(1):26-32.
- Deng, H-X., Hentati, A., Tainer, J.A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E.D., Hu, P., Herzfeldt, B., Roos, R.P. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science*, 261:1047-1051.
- De Rijk MC, Breteler MM, den Breeijen JH, Launer LJ, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A. Dietary antioxidants and Parkinson disease. The Rotterdam Study. *Arch Neurol*. 1997 Jun;54(6):762-5.
- De Zwart LL, Meerman JHN, Comandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage. Application in experimental animals and in humans *Free Rad Biol& Med* 1999; 26: 202-226.
- Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F. et al. Alterations in the Levels of Iron, Ferritin, and Other Trace Metals in Parkinson's Disease and Other Neurodegenerative Diseases Affecting the Basal Ganglia. *Brain*, 1991, 114: 1953-1975.

- Di Matteo V, Esposito E. Methods for determination of nitrite by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr* 1997, 789: 213-219.
- Dimauro S. Mitochondrial Involvement in Parkinson's Disease. *Neurology*, 1993; 43: 2170-2172.
- Dooneief G, Marder K, Tang MX, Stern Y. The Clinical Dementia Rating Scale: community-based validation of "profound" and "terminal" stages *Neurology* 1996;46: 1746-49.
- Fahn S. and members of the UPDRS Development Committee (1987) *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*. En: Recent Developments in Parkinson's Disease, McMillan Florham Park, N.J., 1987; Vol. II, pp. 153-163.
- Feinstein AR. An additional Basic Science for Clinical Medicine: IV The Development of Clinimetrics *Ann Int. Med* 1983; 99:843-848.
- Feinstein AR. Multivariable Analysis Yale University Press 1996. 613pp.
- Feinstein AR. Clinimetrics. London: Yale University Press, 1987.
- Fishmann R.A. Cerebrospinal fluid in Diseases of the Nervous System (1992) WB Saunders Company Philadelphia second Edition p197.
- Flohé, L., and Ötting, F. 1984. Superoxide Dismutase Assays. *Meth. Enzymology*. 105: 93-104.
- Foltynie T, Sawcer S, Brayne C, Barker RA. The genetic basis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Oct;73(4):363-70.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR, "Mini- mental state": A Practical method for grading the cognitive state of subjects for the clinician *J Psychiatr Res* 1975;12:189-198.
- Gerlach M., Ben Shachar D, Riederer P, Youdim BH. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 1994;(63) 3: 793-807.
- Glanz SA Primer of Biostatistics McGraw-Hill N-Y 1981 4^oEdition; 473pp.

- Greene JG, Greenamyre JT Bioenergetics and excitotoxicity: the weak excitotoxic hypothesis In: Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease 1996, Academic Press London, Olanow, Jenner & Youdim Eds. 224 pp.
- Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems *TIBS* 1990; 15: 129-135.
- Hageman JJ, Bast A, Vermeulen NPE. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects *Chem Biol Interactions* 1992; 82:243-293.
- Harris Z.L., Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, McGilwray R.T.A, Gitlin J.D. Aceruloplasminemia: Molecular Characterization of this disorder of iron metabolism *Proc Natl Acad Sci* 1995 (92): 2539-2543.
- Harrison TR. in Principes de Médecine Interne 1988 Flammarion Paris 4^eedition: p2119.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine* Clarendon Press Oxford 1985.
- Hartard C, Weisner B, Dieu C, Kunze K Wilson's disease with cerebral manifestation: monitoring therapy by CSF copper concentration *J Neurol* 1993 ; 241: 101-107.
- Hartmann, H.A. & Everson, M.A. Deficiency of Copper Can Cause Neuronal Degeneration. *Medical Hypotheses*, 1992; 38: 75-85.
- Herndon R.M. Handbook of Neurologic Rating Scales Demos Vermande Edit.,New York, 1997, 266 pp.
- Hertzman, C. Parkinson's Disease: Case-Control Study of Occupational and Environmental Risk Factors. *Am. J. Int. Med.*, 1990, 17: 349-356.
- Hoehn, M. & Yahr, M. Parkinsonism: Onset, Progression and Mortality. *Neurology*, 1967: 422-427.
- Hughes AJ, Ben-Shlomo Y, Daniel SE, Lees AJ. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. 1992. *Neurology*. 2001 Nov;57(10 Suppl 3):S34-8.
- Huntington Disease Collaborative Group: A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; 72: 971-983.

- Huntington Study Group . Unified Huntington's Disease Rating Scale: Reliability and consistency. *Mov.Disorders* 1996; 11(2): 136-142.
- Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest.* 2003 Jan;111(2):163-9.
- Itoh N, Arai H, Urakami K *et al.* Large-Scale, Multicenter Study of Cerebrospinal Fluid Tau Protein Phosphorylated at Serine 199 for the Antemortem Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Ann Neurol* 2001;50:150-156.
- Jenner P, Schapira AH, Marsden D, New insights into the cause of Parkinson's disease *Neurology*, 1992; 42: 2241-2250.
- Jenner P. Olanow C.W. Pathological evidence for oxidative stress in Parkinson's disease and related degenerative disorders. In:Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease, London, 1996, Academic Press 224pp.
- Kashiwado K, Yoshiyama Y, Arai K, Hattori T. Expression of nitric oxide synthases in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002 Jan;26(1):163-7.
- Kessler, I.I. Diamond E.L. Epidemiologic Studies in Parkinson's Disease: I.-Smoking and Parkinson's Disease: A survey and Explanatory Hypothesis. *Am. J. Epidemiol.*, 1971; 94: 16-25.
- Klein J A, Ackerman S.L. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2003;111:785-793.
- Klomp LW, Farhangrazi ZF, Dugan LL, Gitlin JD. Ceruloplasmin Gene Expression in the Murine Central Nervous System *J Clin Invest* 1996 (98) 1: 207-215.
- Langston J, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett.* 1984 Jul 13;48(1):87-92.
- Lazo J.S, Kondo Y, Dellapiazza D *et al.* Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I & II genes *J.Biol.Chem* 1995; 270: 5506-10.
- Linder M.C. Azegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996;63:797S-811S.

- Loeffler D.A, LeWitt P.A, Jumeau P.L. Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 1996; 265-274.
- Markesbery WR. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 1999 Dec;56(12):1449-52
- Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Berger HG, Morris SM, Bruckner UB . Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate and S-nitrosothiols. *Nitric oxide: Biol and Chem* 1997,1:177-189.
- McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG, Arthritis and antiinflammatorius agents as possible protectiv factors for Alzheimer's disease *Neurology*1996;47:425-32.
- Misra H.P. Fridovich I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem*, 1972,(247)10: 3170-3175.
- Miyajima H, Takahashi Y, Serizawa M, Kaneko E, Gitlin J.D. Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia *Free Radical Biology & Medicine* 1996 (20)5:757-760.
- Mizuta E. & Kuno S. Effects of D-Penicillamine on Pharmacokinetics of Levodopa in Parkinson's Disease. *Clin. Neuropharmacol.*, 1993, 16 (5): 448-450.
- Moore K, Roberts LJ. Measurement of lipid peroxidation *Free Rad Res* 1998; 28: 659-671.
- Morita H, Ikeda S, Yamamoto K, Morita S, Yoshida K, Nomoto S, Kato M, Yanagisawa N. Hereditary Ceruloplasmin Deficiency with Hemosiderosis: A Clinicopathological Study of a Japanese Family *Ann Neurol* 1995; 37:646-656.
- Moroney JT, Bagiella E, Desmond DW, Hachinski VC, Molsa PK, Gustafson L, Brun A, Fischer P, Erkinjuntti T, Rosen W, Paik MC, Tatemichi TK. Meta-analysis of the Hachinski Ischemic Score in pathologically verified dementias. *Neurology* 1997 Oct;49(4):1096-105
- Morris JC, Cyrrus PA, Orazem J, Mas J, Bieber F, Ruzicka BB, Gulanski B. Metrifonate benefits cognitive, behavioral and global function in patients with Alzheimer's disease *Neurology* 1998,50: 1222-1230.

- Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A , et al. Reactive Oxygen Species and Alzheimer's Disease *Biochem Pharmacol* 1997 (54)5: 533-539
- Nakagawa Hattori, Y. et al. Is Parkinson's Disease a Mitochondrial Disorder? *Jour. Neurol. Sci.*, 1992; 107: 29-33.
- NIH Consensus Development panel on the differential diagnosis of dementing diseases *JAMA* 1997;258:3411-6.
- National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS)-Alzheimer Disease and Related Disorders Association (ADRDA) *Neurology* 1994;31:134-44.
- Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 1997;6(10):1687-91.
- Olanow CW, Drayer B. Magnetic resonance imaging studies of iron distribution in Parkinson's disease and aging. *Arch Neurol* 1988; 45:809
- Olivares M & Uauy R Copper as an essential nutrient *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 791S- 6S.
- Pajovic S, Saicic ZC, Spasic MB et al. Effects of progesterone and estradiol benzoate on superoxide dismutase activity in the brain of male rats *Experientia*,1996;52: 221-224.
- Pall H.S., Blake D.R., Gutteridge J.R, Williams A.C, Lunec J, Taylor A. Raised Cerebrospinal-fluid Copper Concentration in Parkinson's Disease. *Lancet*, 1987, ii: 238-241.
- Pappert EJ, Tangney CC, Goetz CG, Ling ZD, Lipton JW, Stebbins GT, Carvey PM. Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients: dose-response study and correlations with plasma levels. *Neurology.* 1996 Oct;47(4):1037-42.
- Patel BN, David S, A novel glycosylphosphatidylinositol anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes *J Biol Chem* 1997;272:32.
- Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julien JP, David S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6578-86.

- Phul RK, Shaw PJ, Ince PG, Smith ME. Expression of nitric oxide synthase isoforms in spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2000 Sep;1(4):259-67.
- Price, D., L. 1999. New order from neurological disorders. *Nature* 399 (suppl):A3-A5.
- Prohaska JR. Functions of Trace Elements in Brain Metabolism. *Physiol. Rev.*, 1987, 67: 858-901.
- Przedborski S, Donaldson D, Jakowec M, et al. Brain Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase Activities in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39:158-165.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U et al, Chronic Levodopa Administration Alters Cerebral Mitochondrial Respiratory Chain Activity *Ann Neurol* 1993; 34: 715-723.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokohama R. et al. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induced dopaminergic neurotoxicity *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1996,(93): 4565-4571.
- Retz W, Gsell W, Munch G, Rosler M, Riederer P.Vitamin E and other antioxidants in neuroprotection.*Int J Vitam Nutr Res.* 1999 May;69(3):213-9.
- Rios C, Alvarez-Vega R, Rojas P. Depletion of Copper and Manganese in Brain After MPTP Treatment of Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 1995, 76: 1-5.
- Rizzo V, Montalbetti L, Rozza AL, Bolzani W, Porta C, Balduzzi E, Scoglio E, Moratti R. Nitrite/nitrate balance during photoinduced cerebral ischemia in the rat determined by high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection. *J.Chromatogr.* 1998:798:103-108.
- Rogers SL, Doody RS, Mohs RC, Friedhoff LT. Donepezil improves cognitive and global function in Alzheimer disease *Arch Intern Med*, 1998 (158): 1021-1031.
- Rojas P, Rios C. Metallothionein Inducers Protects Against 1Methyl-4Phenyl-1,2,3,6,Tetrahydro-Pyridine Neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.*, 1997; (22)1: 17-22.

- Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati A., Donaldson, D., Goto, J., and O'Regan J.P. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familiar amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993; 362:59-62.
- Ross CA, Margolis RL, Rosenblatt A, Ranen NG, Becher W, Aylward E. Huntington disease and the related disorder, dentatorubral-pallidolysian atrophy (DRPLA) *Medicine* 1997; 76: 305-338.
- Rothstein JP, Martin LJ, Kuncl RW, Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in ALS *N Engl J Med* 1992, 22:1464-68.
- Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, J., and Kuncl J.W. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38:73-84.
- Saggu H., Cooksey J., Dexter D, Wells FR, Lees A, Jenner P, Marsden CD. A selective Increase in Particulate Superoxide Dismutase Activity in Parkinsonian Substantia Nigra. *J. Neurochem.* 1989,53: 692-97.
- Santamaria A, Rios C, Solis-Hernandez F, Ordaz Moreno L, Kravsov A Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacol.* 1997,35 (1):23-26.
- Santamaria A, Flores-Escartin A, Martinez JC, Osorio L, Galvan-Arzate S, Chaverri JP, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Jimenez-Capdeville ME, Manjarrez J, Rios C. Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Radic Biol Med.* 2003 Aug 15;35(4):418-27.
- Sato M, Bremner I. Oxygen Free Radicals and Metallothionein Free radicals. *Biol. & Med.*, 1993, 14: 325-337.
- Schapira AHV. *et al.* Mitochondrial Complex I, Deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 1990; 54: 823-827.
- Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest.* 2003 Feb;111(3):303-12.
- Segovia J. and Pérez-Severiano F. Oxidative damage in Huntington's disease. *Methods in molecular biology* 2002 vol 277 :321-334

- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP and Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 1995; 20:185-199.
- Siegel G, Agranoff B *et al.* Basic Neurochemistry Lippincott-Raven Philadelphia 1999 6th Ed.1183pp.
- Sorenson JR, Bis (3,5 diisopropylsalicylate) copper II, a Potent Radioprotectant with Superoxide Dismutase Mimetic Activity *J. Med. Chem* 1984 27: 1747-1749.
- Sotomatsu ,A. Nakano, M Hirai S.. Phospholipid Peroxydation Induced by the Catechol-Fe⁺⁺⁺(Cu⁺⁺) Complex: A possible Mechanism of Nigrostriatal Cell Damage. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990; 283 (2): 334-341.
- Southorn PA, Powis G, Free radicals in medicine. I: Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc.* 1988, 63 (4): 381-389. Stocchi F, Olanow CW. Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials.*Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S87-97
- Stocchi F, Olanow CW. Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials.*Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S87-97
- Swain JA, Darley-USmar V, Gutteridge JM. Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis *FEBS letters* 1994; 342: 49-52.
- Tagami M, Yamagata K, Ikeda K, Nara Y, Fujino H, Kubota A, Numano F, Yamori Y. Vitamin E prevents apoptosis in cortical neurons during hypoxia and oxygen reperfusion. *Lab Invest.* 1998 Nov;78(11):1415-29.
- Tanabe S., Shiori T, Murakami K & Imanari T. A new Method for Assay of Ferroxidase Activity and its application to Human and Rabbit sera. *Chem Pharm Bull* 1984, 32(10): 4029-4035.
- Thayer JR, Huffaker RC. Determination of nitrate and nitrite by high-pressure liquid chromatography: comparison with other methods for nitrate determination *Analytical Biochem* 1980; 102:110-119.
- Triggs WJ, Willmore LJ. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J Neurochem* 1984; 42: 976-980.

- Tsikas D, Fuchs I, Gutzki FM, Frolich JC. Measurement of nitrite and nitrate in plasma, serum and urine of humans by high-performance liquid chromatography, the Griess assay, chemiluminescence and gas chromatography-mass spectrometry: interferences by biogenic amines and N-nitro-L arginine analogs *J. Chromatogr.* 1998;715: 441-444.
- Tretud JW, Langston JW. Protective and preventive therapeutic strategies: monoamine oxidase inhibitors. *Neurologic Clinics* 1992; 10(2): 541-552.
- Urakami K, Sato K, Okada A. et al. Cu,Zn superoxide dismutase in patients with dementia of Alzheimer type *Acta Neurol. Scand* 1995; 91: 165-168.
- Vatassery GT, Fahn S, Kuskowski MA. Alpha tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. Parkinson Study Group. *Neurology*. 1998 Jun;50(6):1900-1902.
- Vlachova V, Zemkova H, Vyklicky L Jr. Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*. 1996 Nov;8(11):2257-64.
- Weiser T, Wienrich M. The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res*. 1996 Dec 2;742(1-2):211-8.
- Whiteman M, Kaur H, Halliwell B Protection against peroxynitrite dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by some anti-inflammatory drugs and by the antibiotic tetracycline. *Ann Rheum Dis* 1996;55:383-387.
- Youdim, M.B.H., Ben Shachar D., Yehuda S & Riederer P. The role of Iron in the Basal Ganglion. *Advances in Neurology*, 1990, 53: 155-162.
- Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *J Neurosci Res*. 1998 Sep 1;53(5):613-25.
- Zecca L, Fariello RG, Galimberti M, Racagni G, Ambrosini A. Changes in nitric oxide metabolite levels in stimulated substantia nigra neurons. *Neuroreport* 1997(8): 2121- 25.
- Zecca, L., Rosati, M., Renella, R., Galimberti, M., Ambrosini, A., and Fariello, R.G. Nitrite and nitrate levels in cerebrospinal fluid of normal subjects *J. Neural Transm* 1998: 105: 627-633.

Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease

Marie-Catherine Boll^a, Julio Sotelo^b, Enrique Otero^b, Mireya Alcaraz-Zubeldia^c, Camilo Rios^{c,*}

^aDepartment of Neurology, National Institute of Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suarez', Mexico, Mexico

^bDepartment of Neuroimmunology, National Institute of Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suarez', Mexico, Mexico

^cDepartment of Neurochemistry, National Institute of Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suarez', Mexico, Mexico

Received 28 December 1998; received in revised form 25 February 1999; accepted 25 February 1999

Abstract

Recent evidence suggest the implication of transition metals leading to overproduction of free radicals as a possible causal factor in the death of nigral cells associated to Parkinson's disease (PD). Iron depots in the basal ganglia of PD patients have been described; in addition, contents of nigral copper have been found decreased, while its concentration in cerebrospinal fluid (CSF) is raised, particularly the free form of the metal. To search for a possible link between altered copper concentrations and PD, we advanced the hypothesis that ferroxidase activity of ceruloplasmin is decreased in the CSF of PD patients. We studied 35 untreated PD patients, 14 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-treated PD patients and 26 controls. Both CSF ferroxidase activity and CSF copper content were measured and correlated with the clinical stage of the disease. We found that untreated PD patients had a significant reduction of 40% in CSF ferroxidase while CSF copper was slightly increased as compared with both the values in L-DOPA-treated PD patients and controls. We also found that the fraction of copper linked to ferroxidase in untreated PD is inversely related to the clinical stage of the disease. © 1999 Published by Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ferroxidase activity; Cerebrospinal fluid; Ceruloplasmin; Parkinson's disease; Iron; Copper

Oxidative stress seems to play an important role in nigrostriatal cell death associated to Parkinson's disease (PD), as it has been shown both in the experimental models of the illness [18] and in human Parkinson's cases [4]. For instance, glutathione (an antioxidant defense against free radicals) is diminished in the substantia nigra of PD patients [10], while iron, a transition metal involved in the initiation of free radicals via the Fenton reaction, is increased in PD basal ganglia [4,6,10,14]. Copper ions can similarly react to produce hydroxyl radicals. It has been reported that nigral concentrations of copper are reduced in the brain of PD patients [4], while free (low-molecular-weight) copper has been found raised in cerebrospinal fluid (CSF) [15]. In the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) model of PD, copper concentrations in basal ganglia are decreased [17]. Paradoxically, copper is essential for antioxidant functions bound to proteins such as ceruloplasmin (CP), superoxide dismutase and metallothioneins, however, it acts as a

pro-oxidant in its free, ionized form. All reports relating copper with PD are in agreement with a reduced ability of the brain cuproproteins to retain the metal and would explain the release of copper into the extra-cellular space in its free form.

The main copper protein in blood, CP, is expressed in the central nervous system [16] and seems to be involved in the control of oxidative stress [8]. The hereditary deficiency of this protein in aceruloplasminemia [7] is associated to both basal ganglia degeneration and iron brain accumulation [12,13]. This late consequence is probably a result of the decreased ferroxidase activity of CP, that transforms Fe(II) into Fe(III), facilitating mobilization of the ferric form by transferrin.

The aim of this study was to seek alterations in the homeostasis of copper ion in PD patients by measuring ferroxidase activity directly related to copper bound to CP, and total copper concentrations in the same CSF sample.

New cases of untreated PD, admitted during a period of 18 months to the Movement Disorders Clinic of our Institute, were asked to participate in this study ($n = 35$). An

* Corresponding author. Fax: + 52-5-606-2282.

E-mail address: camilorc@fournier.facmed.unam.mx (C. Rios)

Table 1
Clinical variables^a

Variables	Controls (n = 26)	Untreated PD (n = 35)	L-DOPA treated PD (n = 14)	P-value
Age	58.7 (2.37)	62.8 (1.6)	57.6 (2.27)	NS
Male	46%	71%	50%	NS
Rural	24%	67% ^b	30%	0.0027
Evolution time		4.7 years (0.66)	6.64 (1.1)	NS
Hoehn and Yahr stage		2.11	2.29	NS
UPDRS daily activity		17.63 (1.37)	19.5 (1.9) ^c	NS
UPDRS motor scale		29.02 (1.62)	29.21 (2.61) ^c	NS

^a Results are expressed as means, standard error of the mean (SEM), proportions and statistical significance of the difference between the three groups. PD, Parkinson's disease; UPDRS, Unified Parkinson's disease rating scale; NS, non-significant.

^b Different from controls and L-DOPA treated patients; χ^2 test.

^c Before L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) intake.

additional group of 14 PD patients treated with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (>6 months with >400 mg, daily) at the moment of admission, was selected at random to search for possible changes of copper status as a consequence of chronic medication. The control group consisted of 26 ambulatory patients with no neurodegenerative disease known (for instance from the ophthalmologic clinic, or from myelography for radicular syndrome). The same inclusion criteria was applied to each group: age between 39 and 79 years, written informed consent before undergoing the study, computed tomography or magnetic resonance images without evident cerebral lesion, total proteins and cells in the CSF within the normal range, and the subjects were not receiving any antioxidant, antimetabolic or

immunosuppressant treatment. General and neurologic examination of each patient were carried out in addition to comprehensive laboratory studies. All patients with PD were scored with the Hoehn and Yahr scale and the Unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS) [5,9].

CSF samples were separated into two aliquots: 2 ml for cytochemical analysis, and 2 ml were collected in plastic tubes previously washed with nitric acid solution to avoid external contamination with metals, to measure total copper and ferroxidase activity. The aliquots were stored frozen until assayed. Total CSF copper concentrations were measured using a Perkin-Elmer 3110 atomic absorption spectrophotometer with an HGA-500 graphite furnace and AS-60 auto-sampler, applying optimized conditions for copper analysis [17]. The ferroxidase activity of CP was measured as described by Arnaud [1] and Tanabe [20]. In brief: CSF aliquots of 100 μ l were mixed with 200 μ l of acetate buffer (0.3 M, pH 6). After incubation at 30°C for 5 min, 100 μ l of freshly prepared 0.01 M ammonium ferrous sulfate solution were added. Samples were then incubated for 5 more min at the same temperature. The reaction mixture was stopped by addition of 200 μ l of 1.25 M perchloric acid. Samples were centrifuged for 3 min at 10 000 \times g. Ferric iron produced by ferroxidase activity was determined by adding the same volume of 0.5 M ammonium thiocyanate solution to the incubation mixture. The red thiocyanate-Fe(III) complex was monitored at 450 nm in a Beckman DU-spectrophotometer. With this technique, a coefficient of variation lower than 7% was obtained for between-days assay of CSF samples. To test the reliability of ferroxidase activity assay, 10 samples of serum taken from normal donors, were also assayed as described and values ranged (0.24–0.37 μ mol Fe (III)/min per ml); results similar to those described by Tanabe et al. [20].

As ferroxidase activity data were not symmetrically distributed, we used non-parametric tests (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, χ^2 tests and Spearman correlation) to compare groups and find correlations. For all other measurements, parametric analyses were made.

We studied 35 new cases of untreated PD and 14 PD patients under L-DOPA treatment. Mean age and gender

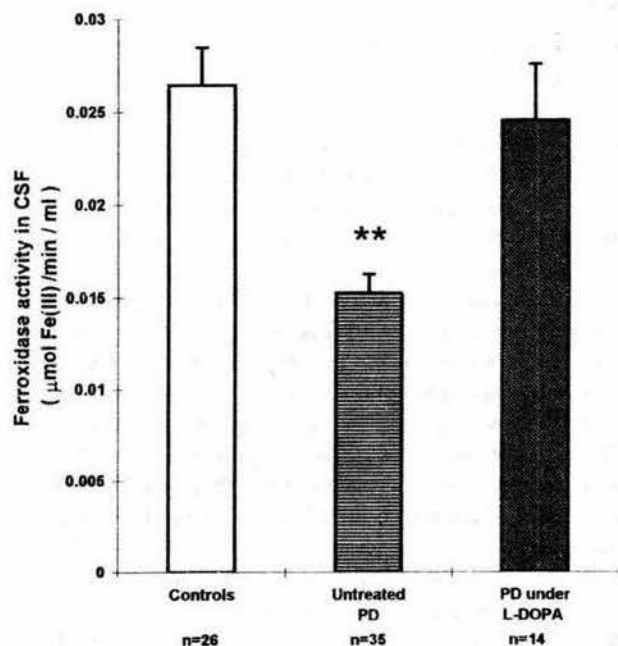


Fig. 1. Ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid (CSF) of PD patients and controls. **Different from controls and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-treated PD patients, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney test to compare with controls.

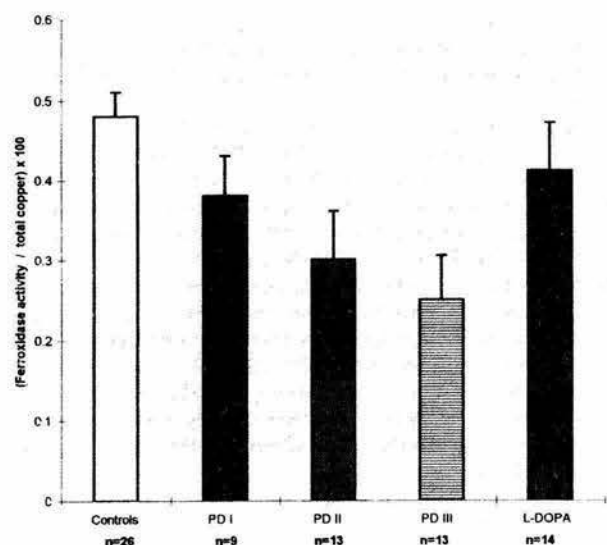


Fig. 2. Ratio of Ferroxidase activity/total copper in cerebrospinal fluid (CSF). Results are means plus one standard error of the mean (SEM) in controls, untreated PD subjects with Hoehn and Yahr stage I (PD I), stage II (PD II) and stage III (PD III) [9] and those treated with L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Units of ferroxidase activity: $\mu\text{mol Fe (III)}/\text{min per ml}$. Units of total copper: $\mu\text{g/l}$. The ratio was correlated with the clinical stages 0, I, II, III in untreated patients, $P = 0.027$, Spearman $\rho = -0.25$.

frequency were not significantly different among groups, but the proportion of rural subjects versus urban inhabitants was significantly higher in the untreated PD group than in the other groups studied (Table 1). The evolution time of the disease in the untreated and treated PD groups was not significantly different, and so was the number of patients in each stage of the Hoehn and Yahr scale, and the mean value of the motor scale of the UPDRS [5] before treatment among groups of PD patients. In our hands, CSF ferroxidase activity in controls was 11.6 times lower on average than serum activity. It was significantly lower in the group of untreated PD subjects as compared to both the L-DOPA treated PD and the controls (Fig. 1). As no differences in CSF ferroxidase activity were found between Hoehn and Yahr values I, II and III, data in PD patients were pooled in a single bar in Fig. 1. L-DOPA treated patients did not show any difference with control's CSF ferroxidase activity.

Total copper in CSF showed a mean of $4.65 \mu\text{g/l}$ (± 2.77 SD) in controls, while 5.04 ± 3.89 in the untreated group and 4.21 ± 3.12 in the L-DOPA group, showing no statistically significant difference between groups. However, the ratio of ferroxidase activity/total copper was found to be significantly correlated ($P = 0.027$, Spearman's coefficient $\rho = -0.248$) with the clinical stage of the disease, in the group of untreated PD patients (Fig. 2).

In conclusion, the enzymatic activity (ferroxidase activity) of ceruloplasmin was significantly reduced in untreated PD and this might be related to the raised iron depots observed in basal ganglia of Parkinson subjects. Both total copper and ionic free copper have been reported elevated in

CSF of untreated PD patients by Pall et al. [15] and this could be explained by a decreased ability of cuproproteins to bind the metal. In our study, total CSF Cu concentrations were only slightly increased in the untreated PD, while ferroxidase/Cu ratio was significantly correlated with the progression of the disease, suggesting an increased concentration of copper unbound to ceruloplasmin in the CSF of untreated PD subjects. In the presence of L-DOPA, copper ions can form complexes with the catecholamine that accelerate the intake of the metal by the cells [2,3]. This might explain the restoration of the normal values of ceruloplasmin activity in PD patients treated with this drug, as the protein is synthesized intracellularly by the brain [16], so is the maintenance of the oxidative process associated with the degradation of catecholamines [19]. As CSF ferroxidase activity was found decreased in untreated PD patients at the initial stage of the disease (Hoehn and Yahr stage I) [9], we can conceive that this decrease is preexistent to the symptomatology appearance, thus, our data suggest that diminished ferroxidase activity could be related to the development of PD. Loeffler et al. [11] reported increased ceruloplasmin concentrations in PD brain regions post-mortem. This increase may be a consequence of the medication of subjects, as many of them were under L-DOPA treatment.

- Arnaud, Ph., Gianazza, E. and Miribel, L., Study of acute-phase reactants. *Methods Enzymol.*, 163 (1988) 441–448.
- Bonnet, J.J., Benmansour, S., Amejki-Chab, N. and Costentin, J., Effect of $\text{CH}_3\text{-HgCl}$ and several transition metals on the dopamine neuronal carrier. *Eur. J. Pharmacol.*, 266 (1994) 87–97.
- Crowe, A. and Morgan, E.H., Iron and copper interact during their uptake and deposition in the brain and other organs of developing rats exposed to dietary excess of the two metals. *J. Nutr.*, 126 (1996) 183–194.
- Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P. and Marsden, C.D., Alterations in the levels of iron, ferritin, and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*, 114 (1991) 1953–1975.
- Fahn, S. and members of the UPDRS Development Committee, Unified Parkinson's Disease Rating Scale. *Recent Developments in Parkinson's Disease*, Vol. II, McMillan, NJ, 1987, pp. 153–163.
- Gerlach, M., Ben Shachar, D., Riederer, P. and Youdim, B.H., Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.*, 63 (1994) 793–807.
- Harris, Z.L., Takahashi, Y., Miyajima, H., Serizawa, M., McGillivray, R.T.A. and Gitlin, J.D., Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 (1995) 2539–2543.
- Hartmann, H.A. and Everson, M.A., Deficiency of copper can cause neuronal degeneration. *Med. Hypoth.*, 38 (1992) 75–85.
- Hoehn, M.M. and Yahr, M.D., Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*, 17 (1967) 422–427.
- Jenner, P., Schapira, A.H. and Marsden, D., New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*, 42 (1992) 2241–2250.
- Loeffler, D.A., LeWitt, P.A., Jumeau, P.L., Sima, A.A.F.,

- Nguyen, H.U., DeMaggio, A.J., Brickman, C.M., Brewer, G.J., Dick, R.D., Troyer, M.D. and Kanaley, L., Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res.*, 738 (1996) 265–274.
- [12] Miyajima, H., Takahashi, Y., Serizawa, M., Kaneko, E. and Gitlin, J.D., Increased plasma lipid peroxidation in patients with aceruloplasminemia. *Free Rad. Biol. Med.*, 20 (1996) 757–760.
- [13] Morita, H., Ikeda, S., Yamamoto, K., Morita, S., Yoshida, K., Nomoto, S., Kato, M. and Yanagisawa, N., Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann. Neurol.*, 37 (1995) 646–656.
- [14] Olanow, C.W. and Drayer, B., Magnetic resonance imaging studies of iron distribution in Parkinson's disease and aging. *Arch. Neurol.*, 45 (1988) 809.
- [15] Pall, H.S., Blake, D.R., Gutteridge, J.R., Williams, A.C., Lunec, J. and Taylor, A., Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in Parkinson's disease. *Lancet*, 2 (1987) 238–241.
- [16] Patel, B.N. and Davis, S., A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 20185–20190.
- [17] Rios, C., Alvarez-Vega, R. and Rojas, P., Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 76 (1995) 348–352.
- [18] Rojas, P. and Rios, C., Increased striatal lipid peroxidation after intracerebro ventricular MPP+ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 72 (1993) 364–368.
- [19] Sotomatsu, A., Nakano, M. and Hirai, S., Phospholipid peroxidation induced by the catechol-Fe³⁺ (Cu²⁺) complex: a possible mechanism of nigrostriatal cell damage. *Arch. Biochem. Biophys.*, 283 (1990) 334–341.
- [20] Tanabe, S., Shiori, T., Murakami, K. and Imanari, T., A new method for assay of ferroxidase activity and its application to human and rabbit sera. *Chem. Pharm. Bull.*, 32 (1984) 4029–4035.

Neuroprotective Effect of Acute and Chronic Administration of Copper (II) Sulfate against MPP⁺ Neurotoxicity in Mice

Mireya Alcaraz-Zubeldia,¹ Patricia Rojas,² Catherine Boll,¹ and Camilo Ríos^{1,3}

(Accepted October 24, 2000)

Neurodegenerative effects of MPP⁺, the main metabolite of MPTP include dopamine (DA) depletion and enhanced lipid peroxidation (LPO) in mice striata, both associated to free radicals overproduction. Since copper is related to several antioxidant enzymes, we tested its neuroprotective effect against MPP⁺-induced neurotoxicity (20 µg/3 µl). CuSO₄ pretreatment was administered by either acute (2.5 mg/kg, i.p) or chronic (350 or 700 mg/l doses through drinking water, for 30 days) schemes. Acute administration blocked MPP⁺-induced striatal LPO only when administered 16 or 24 hours before MPP⁺, and prevented the DA-depleting effect only at 24 hours. Chronic CuSO₄ prevented the LPO increase, and blocked the DA depletion only at the higher dose used (700 mg/l). Neuroprotective effect of CuSO₄ was dependent on the dose and the time of pretreatment, which suggest that this lag could be related with mechanisms of activation or synthesis of copper-dependent proteins responsible of cellular defense against MPP⁺.

KEY WORDS: Copper; MPP⁺; free radicals; dopamine; Parkinson's Disease; lipid peroxidation.

INTRODUCTION

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) administration to mice and non-human primates is the most widely used model of Parkinson's disease (PD) consequences, as it produces effects resembling the neurochemical and neuropathological features of the disease (1). It has been established that toxic effects of MPTP are produced by its final active metabolite, the 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺). These MPP⁺-induced effects include striatal biochem-

ical alterations, such as increased lipid peroxidation (LPO), a process related to the reactive oxygen species overproduction, and dopamine (DA) depletion, associated with the loss of dopaminergic neurons accompanying the neuronal death (2). A depletion of striatal copper content has also been reported after MPTP administration to mice (3). Copper acts as the prosthetic group of several neuroprotective proteins such as the copper/zinc-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) and ceruloplasmin (Cp) enzymes, which depend on copper availability to be functional and to have an optimal activity (4). Other copper-dependent enzymes could also be affected by copper deficiency (5). In regard with copper and MPTP neurotoxicity, it has been reported that animals administered with the copper chelating agent diethyldithiocarbamate (DDC) are more susceptible to the oxidative damage and neuronal death caused by MPTP (6). For this reason, lacking of copper could lead to a disadvantage for neurons in their defense against oxidative stress (7).

¹ Department of Neurochemistry.

² Laboratory of Neurotoxicology, National Institute of Neurology & Neurosurgery, "Manuel Velasco Suárez" Ave. Insurgentes Sur, No. 3877, Mexico City 14269, D.F., México.

³ Address reprint requests to: Camilo Ríos, Department of Neurochemistry, National Institute of Neurology & Neurosurgery, Ave. Insurgentes Sur No. 3877, México City 14269, D.F., México. Tel: (525) 606-40-40; Fax: (525) 528-00-95; E-mail: camilorc@intersky.com

According to reports in the literature, transgenic mice that over-express the Cu-Zn superoxide dismutase gene are resistant to the development of MPTP-induced damage (8). In the case of Cp, a protective effect against radiation-induced damage has been reported (9); while its ferroxidase activity improves the iron management, detoxifying brain from ferrous ions, inducers of hydroxyl radicals' overproduction through the well-known Fenton's reaction (10).

In agreement with a putative role of copper-dependent enzymes in neuroprotection against free radicals overproduction and the copper depletion accompanying MPTP action, we hypothesized that a copper supplementation might restore the copper-dependent defense mechanisms which in turn may prevent neuronal death associated to MPP⁺ neurotoxicity in mice. In this study, we supplemented mice with copper sulfate either chronic or acutely administered, as an strategy to protect striatal neurons from the neurotoxic effects exerted by the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of MPP⁺, the toxic metabolite of MPTP.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals, Copper Pretreatment, and MPP⁺ Administration (20 µg/3 µl). All experiments were conducted on male C57 Black adult mice weighing 25-30 g. They were fed *ad libitum* with a standard rodent Purina Chow. For acute exposure to CuSO₄, animals were administered with a single i.p. dose of either CuSO₄ (2.5 mg/Kg) or saline solution (11). Dopaminergic damage was experimentally produced by the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of 20 µg/3 µl of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺ iodine, from RBI, the toxic metabolite of MPTP), according to Rojas and Ríos (2), to mice at either 0.5, 8, 16, or 24 hours after the CuSO₄ pretreatment. For chronic copper (II) sulfate pretreatment, mice received a solution containing either 350 or 700 mg/L of CuSO₄ dissolved in deionized water as their drinking water. These doses have been used in nutritional studies as a copper supplement for rodents (12). Control animals were given deionized water containing sodium sulfate at the same molar concentration of sulfate present in the respective CuSO₄ solution.

Striatal Lipid Peroxidation Assay. Lipid fluorescence products formation as an index of LPO were monitored in the *corpora striata* of mice using the technique described by Triggs & Willmore (13), two hours after MPP⁺ administration (20 µg/3 µl). Mice were killed by decapitation and their *striata* were dissected out, carefully weighed and homogenized in 2.5 ml of deionized water. One-milliliter aliquots of the homogenate were then separated in glass tubes and added with 4 ml of a chloroform-methanol 2:1 mixture. Tubes were capped, gently mixed for 2 minutes and then placed on ice for 30 min to allow phase separation. Aqueous phase was discarded and 1 ml of the chloroformic layer was then transferred into a quartz cuvette and 0.1 ml of methanol was added. Fluorescence was measured in a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrophotometer at 370 nm of excitation and 430 nm of emission. Sensitivity of the spectrophotometer was adjusted to 140 fluorescence units with a

0.1 mg/l quinine standard, prepared in 0.05 M aqueous sulfuric acid solution, prior to the measurement of the samples. Results were expressed as fluorescence units per gram of wet tissue per ml of extraction read. All samples were run in duplicate.

Analysis of Striatal Dopamine Content. Mice brains were removed quickly and their *corpora striata* were dissected out upon ice as described by Glowinski and Iversen (14). An aliquot (500 µl) of perchloric acid-sodium metabisulfite solution (0.1% w/v) was added to the tissue and homogenized. Samples were then centrifuged at 4,000 g for 10 min and the supernatants were kept at -70°C until analyzed. Striatal content of DA was analyzed using an HPLC system (LC 250 Perkin Elmer) with a Metrohm 641-electrochemical detector and a Hewlett-Packard 3396-II integrator (11). Calibration curves were constructed for dopamine and the concentrations were obtained by interpolation in the standard curve. An Alltech Associates, Inc. (Deerfield, IL) adsorbosphere catecholamine analytical column of 100 × 4.8 mm with 3 µm of particle size was used. The mobile phase was prepared with phosphate buffer (pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulfate, 0.1 mM EDTA, and 15% (v/v) of methanol. The results were expressed as µg of dopamine per gram of wet tissue.

Measurement of Striatal and Midbrain Copper Contents. Copper contents in midbrain and striatum were measured as previously described (3). Striatal tissue samples were added with 500 µl of HNO₃ (Suprapur, Merck) and then digested in a shaking water bath at 60°C for 30 minutes, as described by Bonilla (15). After digestion, copper content was measured in a Perkin-Elmer 3110 Atomic Absorption Spectrophotometer equipped with an HGA-600 graphite furnace and an AS-60 autosampler, using previously reported operating conditions (16). Results were expressed as µg of copper per gram of wet tissue or percent of change versus control.

Serum Transaminase Activity (ALT/GPT). In order to test if copper is reaching liver in high amounts possibly hepatotoxic to animals after the chronic treatment, ALT/GPT (alanine transaminase/glutamic pyruvic transaminase) activity was measured in serum samples taken by cardiac puncture of mice either at 24 h (for the analysis of samples of animals receiving acute administration) or 30 days (for the same analysis in groups receiving chronic administrations) after the CuSO₄ treatment. ALT/GPT was measured using a commercial Kit by Stanbio Laboratory Inc. (2930 East Houston Street, San Antonio Texas 78202, USA) and monitored in a Lambda-20 Perkin Elmer UV/VIS Spectrophotometer. Results were expressed as International Units per Liter (I.U./L).

Data Analysis. Results were statistically analyzed by two-way ANOVA followed by the Tukey's test for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered of statistical significance.

RESULTS

Striatal Lipid Peroxidation. Striatal lipid-soluble fluorescent products were measured at four different pretreatment times (0.5, 8, 16 and 24 h after MPP⁺ injection) in the acute CuSO₄ schedule. Results of these experiments are shown in Fig. 1. Striatal LPO was enhanced 2 h after MPP⁺ administration by 173% as compared to control values. In the group of mice receiving CuSO₄ as a pretreatment 30 min before MPP⁺, no preventive effect was observed as compared to the MPP⁺

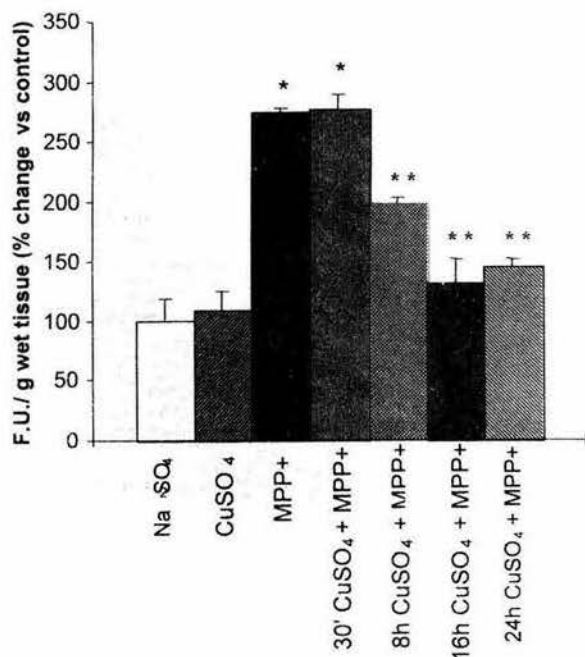


Fig. 1. Striatal lipid peroxidation (LPO) as the percentage of change of lipid-soluble fluorescence products formation against control 2 hours after MPP⁺ i.c.v. administration (20 μ g/3 μ l). Mice were pretreated acutely with a single i.p. copper sulfate injection (2.5 mg/Kg) at either 0.5, and 8, 16, or 24h. Results are expressed as mean \pm SEM of n = 4–6 mice per group. *Statistically different from control group, **Statistically different from MPP⁺ group, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

group. In contrast, those groups receiving the copper administration 8 to 24h prior to the neurotoxin injection, showed a significant decrease of LPO as compared to MPP⁺ group values (–37% for the 8 h group and a complete prevention in the case of both 16 and 24 h groups) when compared to the group intoxicated with MPP⁺ alone. When CuSO₄ pretreatment was applied in a chronic schedule of administration at two different doses (350 and 700 mg/l of CuSO₄), LPO was blocked only with the highest dose employed (Fig. 2).

Striatal Dopamine Content. Striatal dopamine concentrations were measured 24 h after MPP⁺ administration. Results showed that the acute CuSO₄ pretreatment protected mice against the dopamine-depletory effect of MPP⁺ only when administered 24 h before the neurotoxicant (Fig. 3). With the 16 h CuSO₄ pretreatment only a slight prevention (MPP⁺: 3.40 \pm 0.13 μ g/g of tissue weight vs Cu/MPP⁺: 50.8 \pm 0.47 μ g/g tissue weight; Control: 10.2 \pm 0.6 μ g/g of tissue weight) of 16% was achieved against MPP⁺ effect, and no protection was obtained with shorter times of pretreatment (data not shown).

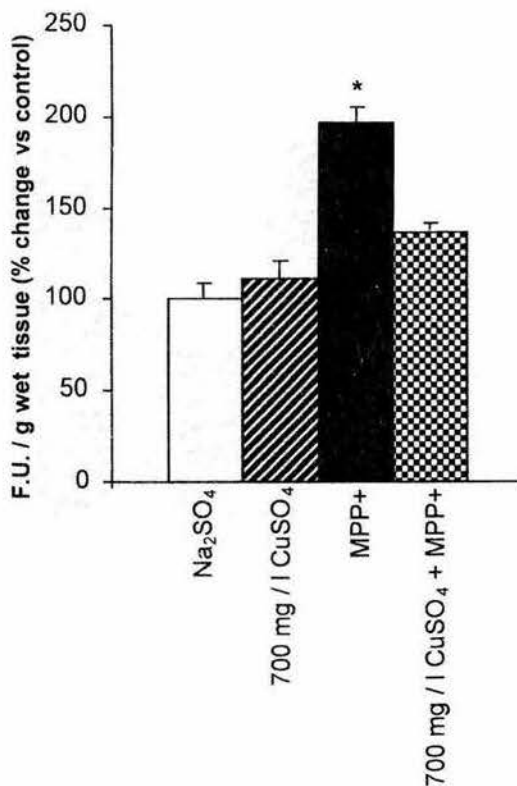


Fig. 2. Striatal LPO, as the percentage of change of lipid-soluble fluorescence products formation against control 2 hours after MPP⁺ i.c.v. administration (20 μ g/3 μ l). Mice were chronically administered for 30 days with a copper sulfate solution (700 mg/l) through their drinking water, before MPP⁺ (20 μ g/3 μ l) or saline solution i.c.v. administration. Results are expressed as mean \pm SEM of n = 4–5 mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

Chronic administration of CuSO₄ was also completely preventive of the dopamine-depletory effect of MPP⁺ (Control: 13.19 \pm 1.23 μ g/g of tissue weight vs MPP⁺/Cu: 12.56 \pm 1.31 μ g/g of tissue weight), only at the highest dose employed (700 mg/l of CuSO₄). Results of those experiments are shown in Fig. 4.

Striatal and Midbrain Copper Contents. Striatal and midbrain copper concentrations measured 24 hours after MPP⁺ administration in the groups of animals submitted to the chronic schedule of CuSO₄ pretreatment are shown in Fig. 5 and 6, respectively. Striatal copper depletion induced by MPP⁺ administration reached a 53.5% decrease (MPP⁺: 5.22 \pm .68 μ g of copper/g. of tissue weight), as compared to the control group values (9.77 \pm 0.64 μ g of copper/g of tissue weight). Midbrain tissue showed a depletion of 54 percent (MPP⁺: 1.81 \pm 0.30 μ g of copper/g of tissue weight vs Control: 3.89 \pm 0.31 μ g of copper/g

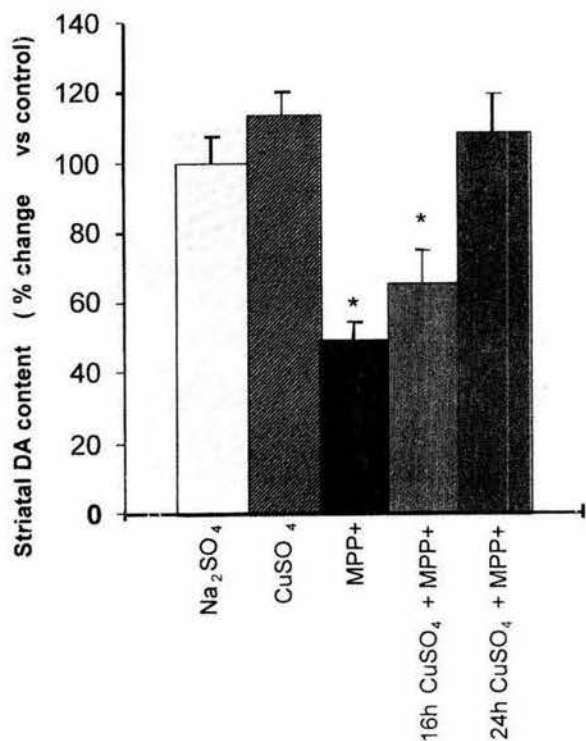


Fig. 3. Striatal dopamine content of mice acutely administered with a single dose of CuSO₄ (2.5 mg/kg; i.p.) either at 16 or 24 hours before MPP⁺ or saline solution i.c.v. administration (20 µg/3 µl). Dopamine content was measured 24 hours after MPP⁺ administration. Results are mean ± SEM of n = 4–6 mice per group. *Statistically different from all other groups. ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

tissue weight). In both brain regions, copper levels in MPP⁺-untreated mice receiving the copper pretreatment showed that the metal has been accumulated in comparison with control animals. This copper status probably represents the striatal copper content at the moment of MPP⁺ i.c.v. administration. All mice treated with MPP⁺ showed the copper-induced depletory effect of the neurotoxicant in spite of the copper sulfate pretreatment with the exception of the higher CuSO₄ dose (700 mg/l) in midbrain tissue. In this brain region a slight decrease of only 30% of copper content was observed as compared with control values (Control: 3.89 ± 0.31 µg of copper/g of tissue weight vs Cu/MPP⁺: 2.722 ± 0.30 µg of copper/g of tissue weight) (Fig. 6).

Serum Transaminases Activity. In order to assess whether or not the administration of acute or chronic CuSO₄ was causing hepatic alterations in mice treated with CuSO₄, we measured the serum ALT/GPT activity. Results of these measurements are shown in Table I. ALT/GPT activity, remained below the values consid-

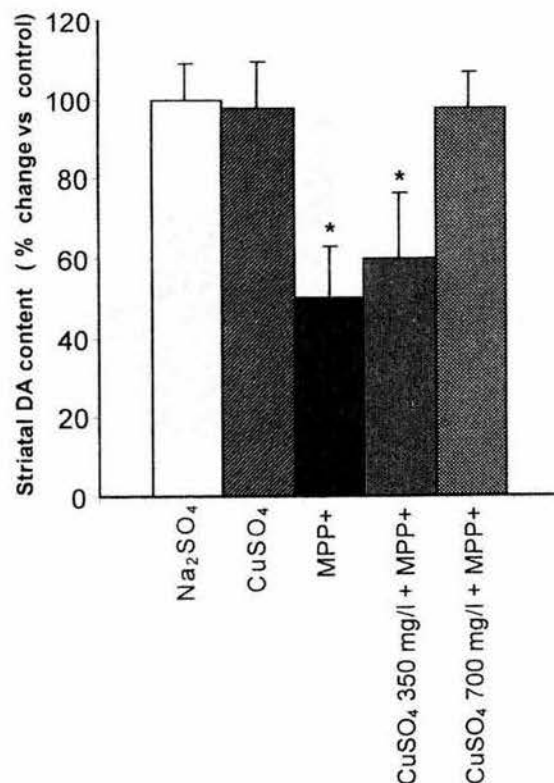


Fig. 4. Striatal dopamine content mice chronically administered for 30 days with a copper sulfate (700 mg/l) solution, through their drinking water, before MPP⁺ (20 µg/3 µl) or saline solution i.c.v. administration. Dopamine content was measured 24 hours after MPP⁺ administration. Results are expressed as mean ± SEM of n = 6–8 mice per group. *Statistically different from all other groups. ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

ered as indication of hepatic damage (0 to 20 IU/l) in all the groups tested.

DISCUSSION

Copper is considered an important dietary element since it is essential for human and animal development (17). Copper deficiency has been related to neuronal degeneration in an inherited human condition known as Menke's disease (18). Moreover, basal ganglia degeneration is observed in those patients with hereditary aceruloplasminemia, lacking of the main plasma copper protein, ceruloplasmin (19). Recently, evidences have been accumulated showing that copper participates in the control of free radicals overproduction as the prosthetic group of important enzymes such as superoxide dismutase, as for example, in its ability to protect animals against cell damage caused by radiation injury (9).

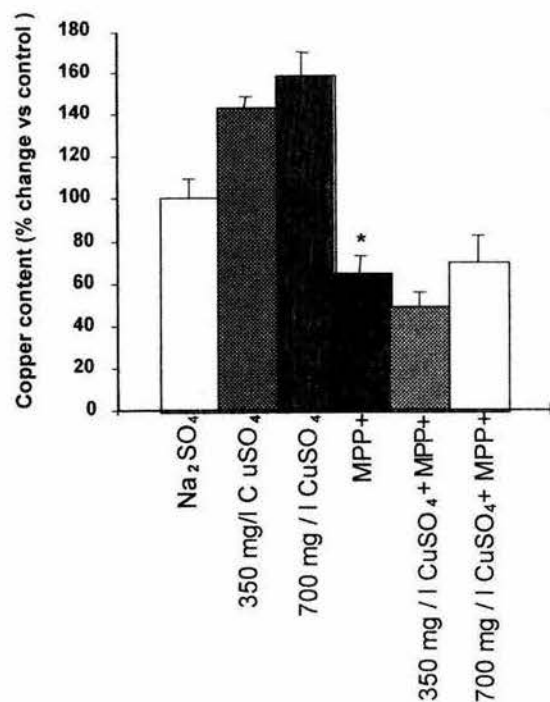


Fig. 5. Striatal copper content as the percentage of change against control after MPP⁺ i.c.v. administration (20 µg/3 µl). Mice were chronically administered for 30 days with a copper sulfate solution (700 mg/l) through their drinking water, before MPP⁺ (20 µg/3 µl) or saline solution i.c.v. administration. Copper was measured 24 h after MPP⁺ administration. Results are expressed as mean ± SEM of n = 6–8 mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

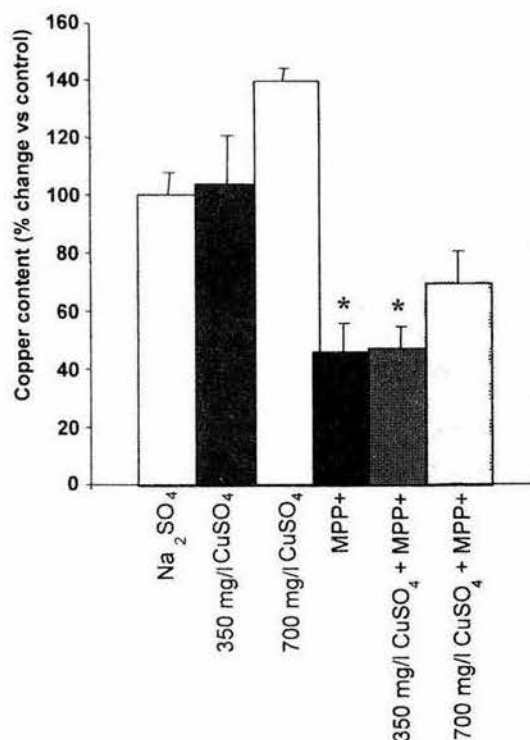


Fig. 6. Midbrain copper content as the percentage of change against control after MPP⁺ i.c.v. administration (20 µg/3 µl). Mice were chronically administered for 30 days with a copper sulfate solution (700 mg/l) through their drinking water, before MPP⁺ (20 µg/3 µl) or saline solution i.c.v. administration. Copper was measured 24 h after MPP⁺ administration. Results are mean ± SEM of n = 6–8 mice per group. *Statistically different from all other groups, ANOVA followed by Tukey's test, p < 0.05.

Our results showed that acute copper administration at both 16 and 24 h before MPP⁺ administration was able to block the MPP⁺-induced LPO. This pretreatment was also preventive against the striatal dopamine depletion caused by the MPP⁺ administration only when copper sulfate pretreatment was administered 24 hours prior to MPP⁺. These results suggest that copper needs to be incorporated into a protective process with a delayed effect, perhaps in the form of cuproprotein synthesis and up regulation (19). The inability of copper to protect cells from MPP⁺-induced dopamine depletion at 16 hours, compared with the results derived from LPO measurements, suggest that the 16 h pretreatment allows protection against oxidative stress, but it was not enough to induce neuroprotection against dopaminergic cells loss. An alternative explanation is that LPO, as a gross index of free radicals overproduction, is giving a "false negative" on what is occurring at sub-cellular level. For example, in mitochondria, with free radical's overproduction.

The best scheme resembling the daily copper intake of mammals is the chronic administration employed in this study as a copper supplement in nutrition experiments (12). Results from our experiments showed

Table I. Alanine Transaminase Activity of the Experimental Groups of C57 Black Mice Pretreated (Chronically or Acutely) with CuSO₄ (or Na₂SO₄ as a Control for Sulfate)

GROUP	ALT/GPT (U/L)
CONTROL	6.939 ± 0.36
Acute Na ₂ SO ₄	7.296 ± 0.14
Chronic Na ₂ SO ₄	9.232 ± 0.81
Acute CuSO ₄	9.406 ± 1.05
Chronic CuSO ₄	11.131 ± 1.58

Serum alanine transaminase activity (ALT/GPT) measured in C57Black male mice (25–30 g weight) administered either acutely or chronically with a 2.5 mg/Kg (i.p.) or 700 mg/ml (in drinking water) doses of CuSO₄ (or Na₂SO₄) solutions, respectively. Transaminase was measured 24 h after the Na₂SO₄/CuSO₄ administration (n = 6).

that chronic administration of copper sulfate was able to protect neurons from MPP⁺-induced dopamine depletion, only at the highest dose used (700 mg/l). Besides, this dose also protected striatal tissue from the oxidative damage caused by MPP⁺. It is important to remark that transaminase levels did not reach levels considered harmful to mice neither at the acute nor at the chronic schemes of copper administration.

The raised copper contents in the brain regions involved in MPP⁺ damage at the moment of the administration of the neurotoxicant indicates that copper is been delivered to the cells of those regions in sufficient amounts to prevent the neurotoxicity exerted by the metabolite.

Taken together, all these findings showed that copper sulfate administration is able to prevent MPP⁺-induced striatal neurotoxicity, as measured by dopamine depletion and LPO enhancement. Results also support the hypothesis of a relationship between brain copper status, and the susceptibility to free radical's induced striatal damage caused by MPP⁺ administration. This is particularly important since alterations of copper status, such as reduced nigral copper content and reduced cerebrospinal fluid ceruloplasmin ferroxidase activity have been reported in Parkinson's disease patients (16,20). Further experiments are needed to explain why copper is been depleted from striatal and midbrain tissue after MPP⁺ administration, however, the role of down-regulation or direct damage of copper chelating proteins, such as metallothioneins (21), has been suggested as an explanation for this copper loss. If brain tissue is enriched with copper, in the form of protein-bound metal, at the moment of MPP⁺ delivery, the damaging consequences of copper deficiency could be prevented.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by CONACYT grant No. 26504-M

REFERENCES

- Langston, J. W. 1985. MPTP neurotoxicity I: An overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci.* 36:201-206.
- Rojas, P. and Rios, C. 1993. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP⁺ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.* 72:364-368.
- Rios, C., Alvarez-Vega, R., and Rojas, P. 1995. Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76:348-352.
- Linder, M. C. 1991. Nutrition and metabolism of the major minerals. *in* Linder, M. C. ed. *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*. Second Edition.
- Prohaska, J. R. 1991. Changes in Cu, Zn-Superoxide Dismutase, Cytochrome c Oxidase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Transferase Activities in Copper-Deficient mice and rats. *J. Nutr.* 121:355-363.
- Miller, D. B., Reinhard, J. F., Daniels, A. J., and O'Callaghan, J. P. 1991. Diethylthiocarbamate potentiates the neurotoxicity of *in vivo* 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of *in vitro* 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 57:541-549.
- Hartmann, H. A. and Evenson, M. A. 1992. Deficiency of Copper can cause Neuronal Degeneration. *Med. Hypot.* 38:75-85.
- Przedborski, S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Simonetti, S., Stanley, F., Carlson, E., Epstein, C. J., and Cadet, J. L. 1992. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12:1658-1667.
- Sorenson, J. R. J., Soderberg, L. S. F., and Chang, L. W. 1995. Radiation protection and radiation recovery with essential metalloelement chelates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210:191-204.
- Linder, M. C. and Hazegh-Azam, M. 1996. Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:797S-811S.
- Rojas, P., Alvarez-Vega, R., and Rios, C. 1996. Copper supplementation blocks 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in mice. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:222.
- Crowe, A. and Morgan, E. H. 1996. Iron and Copper Interact during Their Uptake and Deposition in the Brain and Other Organs of Developing Rats Exposed to Dietary Excess of the Two Metals. *J. Nutr.* 126:183-194.
- Triggs, W. J. and Willmore, L. J. 1984. *In vivo* lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J. Neurochem.* 42:976-979.
- Glowinski, J. and Iversen, L. L. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of ³H-Norepinephrine, ³H-Dopamine and ³H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13:655-669.
- Bonilla, E. 1978. Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of manganese in rat brain and other tissues. *Clin. Chem.* 24:471-474.
- Boll, M.-C., Sotelo, J., Otero, E., Alcaraz-Zubeldia, M., and Rios, C. 1999. Reduced Ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 265:155-158.
- Olivares, M. and Uauy, R. 1996. Copper as an essential nutrient. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:791S-796S.
- Iwata, M., Irano, A., and French, J. H. 1979. Degeneration of the cerebellar system in X-chromosome-linked copper malabsorption. *Ann. Neurol.* 5:542-549.
- Prohaska, J. R. and Bailey, W. R. 1994. Regional specificity in alterations of rat brain copper and catecholamines following perinatal copper deficiency. *J. Neurochem.* 63:1551-1557.
- Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F. R., Daniel, S. E., Lees, A. J., Jenner, P., and Marsden, C. D. 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin, and other trace metals in Parkinson's disease and other degenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114:1953-1975.
- Rojas, P., Hidalgo, J., Ebadi, M., and Rios, C. 2000. Changes of MT I y II proteins in the brain after 1-methyl-4-phenylpyridinium administration in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol and Biol. Psychiat.* 24:144-154.

Raised Nitrate Concentration and Low SOD Activity in the CSF of Sporadic ALS Patients

Marie-Catherine Boll,^{1,2} Mireya Alcaraz-Zubeldia,¹ Sergio Montes,¹ Luis Murillo-Bonilla,² and Camilo Rios^{1,3}

(Accepted September 5, 2002)

To determine whether or not the occurrence of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (sALS) is associated with both excess nitric oxide (NO) metabolites and decreased protective superoxide dismutase (SOD) activity in the cerebrospinal fluid (CSF), we measured nitrate concentration and SOD activity in the CSF of sALS patients and in age- and gender-matched controls. We found stable NO metabolite levels to be significantly higher and SOD activity lower in the CSF of sALS patients. In addition, SOD showed a negative correlation with motor neuron axonal damage expressed as the amplitude of motor action potentials in upper limbs. Our results provide new evidence in vivo suggesting that NO products and SOD activity play a role in oxidant/antioxidant imbalance in sporadic ALS.

KEY WORDS: ALS; CSF; nitric oxide; SOD activity.

INTRODUCTION

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive motor neuron disease showing striking similarities with other neurodegenerative disorders such as Parkinson's, Huntington's, and Alzheimer's diseases. All of these diseases are associated with selective neuronal damage, aberrant neurofilament expression, energetic failure indexes, and oxidative stress (1). The results of several studies also suggest that glutamate and nitric oxide (NO) are involved in the pathogenesis of ALS. Glutamate (Glu), the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system (CNS), probably plays a preponderant role in neuronal death,

because increased Glu concentrations have been found both in the extracellular space and in the cerebrospinal fluid (CSF) of sporadic ALS (sALS) patients (2) and patients with severe course ALS (3). This pathophysiological mechanism is consistent with dysfunction of the Glu transporters GTL-1 and EAAT2 (2) and the consequent overstimulation of glutamate receptors as the *primum movens* for the excitotoxicity cascade. Among the metabolites produced by this cascade, nitric oxide is a very reactive and short-living free radical capable of inactivating the glutamate transporter (4), and excessive glutamate concentrations activate the constitutive neuronal NO synthase (nNOS), which is calcium dependent (5). Further evidence was provided from a controlled clinical trial in which riluzole, a drug that has been shown to inhibit the release of glutamate from presynaptic nerve terminals, among other mechanisms of action (6,7), proved to be the only drug that can in fact increase survival of ALS patients (8).

On the other hand, superoxide dismutase (SOD) detoxifies superoxide anions to yield molecular hydrogen peroxide. SOD catalyzes the first step in the active oxygen species scavenging system (9), protecting cells

¹ Department of Neurochemistry.

² Department of Neurology, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez," Insurgentes Sur 3877, Mexico City 14269 DF, Mexico.

³ Address reprint requests to: Camilo Rios, Department of Neurochemistry, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez," Insurgentes Sur 3877, Mexico City 14269 DF, Mexico. Tel: +52 5 578 80 36; Fax: + 52 5 528 00 95; E-mail: crios@cueyatl.uam.mx

against dangerous levels of superoxide free radical ($O_2^{\cdot-}$). In the presence of excess NO, the superoxide radical generates one of the most deleterious species: peroxynitrite, via the reaction: $O_2^{\cdot-} + NO \rightarrow ONOO^-$. The peroxynitrite anion ($ONOO^-$) causes DNA damage and inhibits mitochondrial function, which could in turn lead to excessive free radical formation.

Two of the three known isoforms of SOD are Cu/Zn dependent: SOD1 (cytosolic) and SOD3 (extracellular). SOD1 gene mutations are known to be responsible for approximately 20% of the familiar ALS forms (10,11), and this progressive motoneuron disease and ALS-specific histopathological findings (neurofilaments) can be very accurately reproduced in rodent transgenic models expressing the mutated human SOD1 gene (12). However, there are no reports showing SOD enzyme alterations in sporadic ALS. Therefore we decided to simultaneously analyze NO and SOD biomarkers in the CSF of new ALS cases admitted to our Hospital.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

All patients complying with El Escorial criteria of definite ALS (13) and with electromyography and integral neuroconduction studies supporting the diagnosis (Lambert's criteria) (13) were asked to participate in the study. Craniovertebral junction anomalies were ruled out by MRI in all cases, and none of the patients were on antioxidant or antiglutamatergic treatment at the moment of the lumbar puncture (LP). Twenty-eight patients with no history of CNS degenerative disorders, but having an indication for LP or myelography with high probabilities of yielding normal results (e.g., uninfected CSF rhinorrhea, cervical or lumbar discopathy, psychomotor agitation without encephalitis, treated pseudotumor cerebri) were included as controls. After obtaining written informed consent, the patients were interviewed and submitted to a thorough clinical examination; a lumbar puncture was then performed. The data collected included demographic items, risk factors, electrophysiological variables, and the ALS functional rating scale score (14). We previously validated a Spanish version of this scale, finding perfect discriminative capability (between healthy individuals and ALS patients) and good reproducibility with an interrater correlation coefficient of 0.96. CSF samples from ALS patients and controls were immediately analyzed in the clinical laboratory to measure protein and glucose concentrations and confirm the absence of cells and a negative ELISA reaction for cysticercosis (the most frequent neuroinfection in Mexico). Two 1-ml aliquots were stored in plastic tubes at -80°C until the biochemical analysis was performed. CSF samples containing more than 5 cells/field were eliminated and the corresponding case deleted from the database. Nitrate concentrations were measured by reverse phase chromatography coupled with UV detection, as described elsewhere (15) with few modifications. In brief, the solvent delivery system (Isocratic Perkin-Elmer LC 250 Pump) was adjusted to 1.2 ml/min flow. A Lichrosorb RP-18 .5- μ column with 250 mm length was employed. The detector (Perkin-Elmer LC95 UV/visible spectrophotometer) was operated at 228 nm. The mobile phase consisted of 5 mM octylamine

aqueous solution adjusted to pH 6.4 with sulfuric acid. Calibration curves for NO_2^- were constructed at 5, 20, 40, 80, and 160 $\mu\text{mol/L}$ concentrations. 25 μl of filtered CSF was diluted in 50 μl of mobile phase before the injection of 50 μl to the system.

Cu/Zn-SOD activity was measured spectrophotometrically as first reported by Crapo et al. (16), with minor modifications to achieve optimal sensitivity (17,18). Calibration curves for assessing reliability of SOD activity assay were performed using standards of known concentrations of bovine Cu/Zn-SOD purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fifty microliters of CSF were added to 2.9 ml of a solution containing 10 μM of sodium azide, 100 μM of xanthine, 10 μM of reduced cytochrome c and 1 mM EDTA in 20 mM of sodium bicarbonate and 0.02% Triton X-100, pH 10.2. The enzymatic assay was started by the addition of 50 μl of a solution of xanthine-oxidase 3.4 mg/ml in EDTA 0.1 mM, which induces superoxide production. Changes in absorbance of cytochrome c were monitored every minute at 550 nm with a Perkin-Elmer Lambda 20 double-beam spectrophotometer. One unit of SOD activity was defined as that amount of enzyme that decreases the reduction rate of cytochrome c by 50%, as described elsewhere (18).

Information from the individual data collection forms was stored on a computerized database to be further analyzed with SPSS 10.0 for Windows statistical software. The distribution of categorical variables was analyzed separately in each group of patients. We especially looked for clinical-biological correlations and differences among groups. Statistical significance was considered when $P < 0.05$, as generally stated.

RESULTS

Twenty-four new cases of ALS were admitted to the INNyN over an 18-month period. All cases were considered as sporadic based on family history. Six of these patients refused to sign an informed consent form, so a total of 18 sALS patients and 28 control subjects were included for the analyses. Nine control subjects were eliminated *a posteriori* because they showed inflammatory CSF.

The overall clinical data are shown in Table I. Initial symptoms were bulbar in 16.6% of cases and affected upper extremities in 55.5%. The mean ALS functional rating scale score was 26.9 ± 8.5 . No patients had a gastrostomy at the time of the study. The mean duration of the disease was 25.8 ± 27 months.

Some risk factors were identified: intensive physical activity and a long history of drinking well water (implying rural residence and exposure to heavy metals) were significant risk factors previously described by other authors (19). In addition, allergies or atopies were significantly more frequent in the ALS group than in controls with a prevalence ratio of 5.25, never described before.

CSF analysis revealed traces of nitrites and very high concentrations of nitrates, which were significantly

Table I. Clinical Characteristics of ALS Patients and Control Subjects

Variable	ALS patients n = 18	Control subjects n = 19	Association measurement
Age (years)	49.16 ± 10	45.42 ± 8.42	NS
Gender (M/F)	6/12	5/14	NS
ALS form at onset bulbar/limb	3/15		
Disease progression (months)	25.8 ± 27		
Well water consumption (Y/N)	8/10	2/17	OR = 1.84 (95% CI = 1.03–3.6)
Organophosphate pesticide exposure (Y/N)	2/16	1/18	NS
Multiple trauma	4/14	3/16	NS
Dysthyroidism	2	0	NS
Allergies	5	1	PR = 5.27
ALS functional rating Scale	26.9 ± 8.5	40	

Note: OR = odds ratio; PR = prevalence ratio; NS = non significant.

higher in ALS patients (102 μmol/L) than in controls (33.1 μmol/L, P = 0.0001). Moreover, SOD activity was lower in the CSF of ALS patients (0.573 IU) than in controls (0.665 IU, P = 0.05) (Fig. 1). Additionally, we found a significant correlation between reduced SOD activity and the duration of the disease (Spearman's rho coefficient = -0.57, P = 0.03). Neuroconduction studies showed that the amplitude of motor action potentials in upper limbs (particularly in the ulnar nerve), correlated significantly with the duration of the disease and with SOD activity (Fig. 2). SOD activity and NO metabolite concentrations showed no significant correlation with ALS onset or different clinical forms. The correlation coefficient between the two biological markers was rho = -0.21, P = 0.07.

DISCUSSION

Our results are consistent with disturbed oxidant/antioxidant balance in the pathogenesis of sALS, where NO overproduction and decreased SOD defense activity seem to be particularly involved. All cases included in the study were considered as sporadic because of negative family history for ALS. Because SOD1 screening is not routinely practiced, the remote possibility of misdiagnosis of a de novo mutation should be considered. This is unlikely, however, because only 6%–15% of ALS cases are familial and SOD1 mutations would be expected to be found in only 10%–20% of those (11).

Previous studies *in vitro* revealed that chronic low-level exposure to Glu increases the formation of NO in embryonic spinal cell cultures (20). In the same study, superoxide anions were found to be involved in glutamate-induced toxicity, which was attenuated by SOD/catalase, whereas long-acting NO donors were found to enhance the damage to motor neurons selectively and NOS inhibitors attenuated this toxicity. Our results *in vivo* are in agreement with those findings. The most significant finding was the 2.48-fold increase of CSF nitrate levels in sALS patients as compared to controls. In a recent report including six ALS cases, CSF nitrites + nitrates were significantly increased in both genders while serum nitrites + nitrates were increased in male patients, suggesting that NO is involved in the pathogenesis of ALS in a sexually dimorphic manner (21). In our study we found CSF nitrates to be significantly increased in female ALS

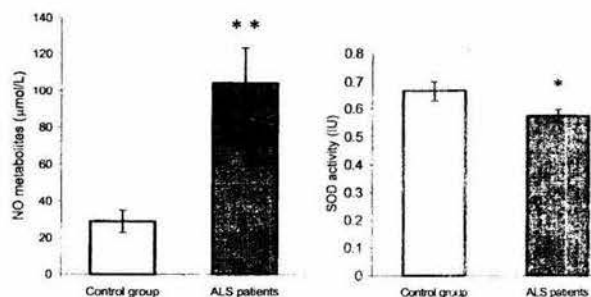


Fig. 1. Nitrate concentration expressed as μmol/L (left) and SOD activity expressed as IU in 50 μl of CSF (right) in 19 controls and 18 ALS subjects. Results are mean ± 1 SEM. **P < 0.001 and *P < 0.05 Mann Whitney's test.

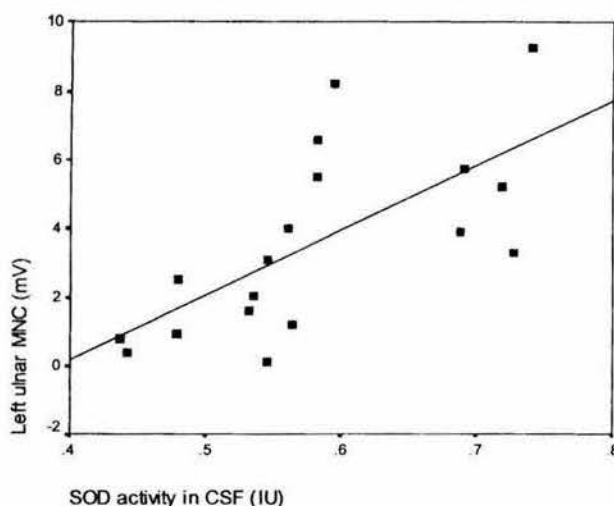


Fig. 2. Correlation between SOD activity expressed as IU in 50 μ l of CSF and motor potential amplitudes in the left ulnar nerve of the 18 ALS patients. Spearman's rho coefficient = 0.87 P = 0.002.

patients (\bar{x} = 102 μ mol/L, P = 0.0001) and slightly but not significantly increased in male ALS patients as compared to gender-matched controls, (\bar{x} = 68 μ mol/L, P = 0.08).

To our knowledge, plasma and urine nitrates do not reflect CNS-produced NO, but rather the peripheral metabolism of L-arginine (22). In the present study, nitrites were generally undetected in CSF, with the exception of a few aliquots with less than 3 μ mol/L. We suspect that nitrites were oxidized into nitrates as occurs with the standard solution after prolonged storing in refrigeration.

We observed a slightly lower CSF-SOD activity in ALS patients as compared to control. All the enzyme activity measured here was cyanide sensitive (totally inhibited by a 2-mM sodium cyanide solution) and thus corresponded to the Cu/Zn isoform. Jacobsson et al. recently determined that Cu/Zn-SOD accounts for approximately 75% of the SOD activity measured in CSF, while extracellular SOD accounts for 25% and Mn-SOD for less than 5% in the CSF from both ALS patients and controls (23). In contrast to our results, two contemporary studies (23,24) reported no significant differences in SOD activity in the CSF of ALS patients and controls. The authors, however, do not refer whether or not their patients had previously received antioxidant or antiglutamatergic treatment, which could be potential confounding factors. In the present study, the measurements were practiced in acellular CSF obtained from recently diagnosed and untreated patients. Antioxidant and antiglutamatergic treatments were begun after the

LP. An additional difference with previous studies is the age of patients, because in our study they are relatively younger, and a significant correlation of SOD activity and age has been described in ALS patients (23).

In spite of the well-known importance of SOD activity in the production of superoxide and more reactive oxygen free radicals, we found no significant correlation between increased oxidized NO stable metabolite levels and decreased SOD activity in our ALS patients. The distribution of CSF nitrate concentrations is very wide, whereas the SOD enzymatic reaction is expressed in a very narrow range. This narrow distribution may explain the difficulty to obtain a statistically significant difference between ALS patients and controls. In spite of this, SOD activity seems to be a good ALS progression marker, correlating significantly with the duration of the disease in months (Spearman coefficient = -0.57, P = 0.03) and with the amplitude in ulnar and median motor neuroconduction studies (P < 0.05).

We are particularly interested in the involvement of copper and copper enzymes such as SOD in neurodegenerative diseases. In a previous study we found that the brain ceruloplasmin ferroxidase activity was significantly decreased in the CSF of Parkinson's disease patients as compared to controls (25). We analyzed the activity of this enzyme in ALS patients, but found no significant differences with controls nor any correlation with SOD activity (data not shown). This suggests that among copper-dependent enzymes, SOD is specifically involved in the pathogenesis of ALS.

The present results support the idea of a redox imbalance in sALS with an important role of NO and a low copper/zinc-dependent SOD activity associated with the progression of the disease. Terminal NO metabolites are clearly increased in the CSF of ALS patients. However, the role of SOD activity in the pathogenesis of ALS remains to be further elucidated. We found that SOD activity was significantly lower in sALS patients than in controls. However, we must analyze all factors exerting influence on enzyme activity, such as different types of stress, medications, age of the patients, etc, and whether the measured enzyme activity correlates with the progression time and the clinical form of the untreated disease.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Estela Rodríguez Arreguín, nurse, for her invaluable assistance in carrying out the procedures with the subjects of our study.

REFERENCES

1. Price, D. L. 1999. New order from neurological disorders. *Nature* 399 (supp):A3-A5.
2. Shaw, P. J., Forrest V., Ince, P. G., Richardson, J. P., and Wastell, H. J. 1995. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: Elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 20:185-199.
3. Niebroj-Dobosz, I. and Janik, P. 1999. Aminoacids acting as transmitters in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Acta Neurol. Scand.* 100:6-11.
4. Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, J., and Kuncl J. W. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 38:73-84.
5. Coyle, J. T. and Putterfarken, P. 1993. Oxidation stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science.* 146:354-360.
6. Shaw, P. J. and Ince, P. G. 1997. Glutamate, excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 244(suppl 2):S3-S14.
7. Xu, L., Enyeart, J. A., and Enyeart, J. J. 2001. Neuroprotective agent riluzole dramatically slows inactivation of Kv1.4 potassium channels by a voltage-dependent oxidative mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299:227-237.
8. Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V., and the ALS/Riluzole Study Group. 1994. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 330:585-591.
9. Bergendi, L., Benes, L., Duracková, Z., and Ferencik, M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65:1865-1874.
10. Deng, H.-X., Hentati, A., Tainer, J. A., Iqbal, Z., Cayabyab, A., Hung, W. Y., Getzoff, E. D., Hu, P., Herzfeldt, B., and Roos, R. P. 1993. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science* 261:1047-1051.
11. Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., and O'Regan J. P. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase are associated with familiar amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
12. Ripps, M. E., Huntley, G. W., Hof, P. R., Morrison, J. H., and Gordon, J. W. 1995. Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:689-693.
13. Brooks, B. R. 1994. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis: Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical Limits of Amyotrophic Lateral Sclerosis" workshop contributors. *J. Neurol. Sci.* 124 (suppl):96-107.
14. ALS CNTF Treatment Study Phase I-II Study Group. 1996. The ALS Functional Rating Scale: Assessment of activities of daily living in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 53:141-147.
15. Zecca, L., Rosati, M., Renella, R., Galimberti, M., Ambrosini, A., and Fariello, R. G. 1998. Nitrite and nitrate levels in cerebrospinal fluid of normal subjects. *J. Neural. Transm.* 105: 627-633.
16. Crapo, J. D., McCord, J. M., and Fridovich, I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 53:382-393.
17. Schwartz, P. J., Reaume, A., Scott, R., and Coyle, J. T. 1998. Effects of over and under-expression of Cu,Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brain Res.* 789:32-39.
18. Flohé, L. and Ötting, F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105:93-104.
19. Kurtzke, J. F. and Beebe, G. W. 1980. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: A case control comparison based on ALS deaths. *Neurology* 30:453-462.
20. Urushitani, M., Shimohama, S., Kihara, T., Sawada, H., Akaike, A., Ibi, M., Inoue, R., Kitamura, Y., Taniguchi, A., and Kimura, J. 1998. Mechanism of selective motor neuronal death after exposure of spinal cord to glutamate: Involvement of glutamate-induced nitric oxide in motor neuron toxicity and nonmotor neuron protection. *Ann. Neurol.* 44:796-807.
21. Taskiran, D., Sagduyu, A., Yuceyar, N., Kutay, F. Z., and Pogun, S. 2000. Increased cerebrospinal fluid and serum nitrite and nitrate levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Int. J. Neurosci.* 101:65-72.
22. Bredt, D. S. 1999. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Radic. Res.* 31:577-596.
23. Jacobsson, J., Jonsson, P. A., Andersen, P. M., Forsgren, L., and Marklund, S. L. 2001. Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and without CuZn-superoxide dismutase mutations. *Brain* 124:1461-1466.
24. Torsdottir, G., Kristinsson, J., Gudmundsson, G., Sneadal, J., and Johannesson, T. 2000. Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD) in amyotrophic lateral sclerosis. *Pharmacol. Toxicol.* 87:126-130.
25. Boll, M. C., Sotelo, J., Otero, E., Alcaraz-Zubeldia, M., and Rios, C. 1999. Reduced ferroxidase activity in the CSF from patients with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 265:155-158.