



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CuSO_4
EN CONTRA DE LA NITRACIÓN DE LA TH Y DEL
DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR MPP^+ COMO
MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD
DE PARKINSON EN LA RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

BIOL. MOISÉS RUBIO OSORNIO

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda.

México, D.F. a 26 de Octubre de 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por mantener sus puertas abiertas y por la oportunidad de realizar estudios doctorales de excelencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca con No. de registro 144225 otorgada para la realización de estudios de posgrado.

A DEGEP por el apoyo económico complementario.

A el Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo para la asistencia a congresos internacionales.

Agradezco especialmente al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda por su amigable y completa disponibilidad en la tutoría de la presente tesis y en general por su invaluable apoyo académico y confianza.

También agradezco al Dr. Abel Santamaría Del Angel y al Dr. Gabriel Roldán Roldán, miembros del Comité Tutoral, por sus muy valiosos e indispensables comentarios durante el desarrollo y elaboración de esta tesis.

Asimismo, agradezco al Honorable Jurado designado para la presentación del examen doctoral y revisor de la presente tesis, ya que en un momento dado cada uno de ellos han motivado en mí, aún sin saberlo, el progreso y el crecimiento en el maravilloso mundo de la ciencia.

DEDICATORIA.

*A Sofía, Regina, Leticia, Olivia y Raquel.
Mis hijas, mi esposa, mi madre y mi madrina.
A ellas que me aman y a quienes yo amo. Gracias!*

Agradezco a mis hermanos: Manuel, Gabriel, Miguel y desde luego a Carmen por su apoyo y compañía durante este proceso.

A mis viejos que ya se fueron, gracias Manuel, gracias Juan.

A todos los investigadores del Departamento de Neuroquímica por su valiosa colaboración en la realización de esta tesis y en especial al Dr. Sergio Montes por su amistad y su apoyo académico.

Es imposible citar a tantas personas que han promovido un ambiente de trabajo sin igual, como también lo es el citar a los amigos que son el motivo de mi cotidiana alegría. Sin embargo, mil gracias Refugio (indispensable), Alma, Mireya, Ana Erika, Mireya A., Jorge, Abel, Angel, Gerardo, Luz, Francis, Luis y todos aquellos que sin duda alguna llevo en mi corazón.

INDICE

| | Página. |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 7 |
| 1. Abstract..... | 9 |
| 2. Resumen..... | 11 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 4. ANTECEDENTES..... | 17 |
| 4.1. Breve Reseña Histórica..... | 17 |
| 4.2. Enfermedad de Parkinson Idiopática..... | 18 |
| 4.2.1. Epidemiología..... | 18 |
| 4.2.2. Manifestaciones Clínicas..... | 19 |
| 4.2.3. Anatomía de los Ganglios Basales..... | 19 |
| 4.2.4. Alteraciones Funcionales de los Ganglios Basales en la EP | 21 |
| 4.2.5. Neurotransmisión Dopaminérgica..... | 21 |
| 4.2.6. Tirosina Hidroxilasa..... | 22 |
| 4.2.7. Metabolismo de la DA..... | 23 |
| 4.3. Terapia Farmacológica..... | 24 |
| 4.4. Estrés Oxidativo en la EP..... | 25 |
| 4.4.1. Disfunción mitocondrial y formación de radicales libres..... | 26 |
| 4.4.2. Alteración del material genético mitocondrial en la EP..... | 27 |
| 4.4.3. Glutación..... | 28 |
| 4.4.4. Sobreproducción de Oxido Nítrico en la EP..... | 30 |
| 4.4.4.1. Sintetas del Oxido Nítrico..... | 31 |
| 4.4.4.1.1. Sintasa del Oxido Nítrico neuronal..... | 32 |
| 4.4.4.1.2. Sintasa del Oxido Nítrico inducible..... | 33 |
| 4.4.4.1.3. Sintasa del Oxido Nítrico endotelial..... | 33 |
| 4.5. Metales de transición en la EP..... | 36 |
| 4.6. α -Sinucleína..... | 41 |
| 5. MODELO EXPERIMENTAL DE LA EP | 42 |
| 5.1. El MPTP como modelo experimental de la EP..... | 42 |
| 5.2. Modelo experimental con MPP ⁺ | 43 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 5.2.1. | Radicales Libres por MPP ⁺ | 43 |
| 5.3. | Cambio en el contenido de metales de transición por MPP ⁺ | 45 |
| 5.4. | Modelo de la EP por 6-OHDA..... | 46 |
| 6. | IMPORTANCIA DEL COBRE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS..... | 49 |
| 6.1. | Metabolismo..... | 49 |
| 6.2. | Efecto del cobre en animales de experimentación..... | 52 |
| 6.3. | Efecto del cobre en humanos..... | 53 |
| 6.4. | Ingesta de cobre en humanos..... | 55 |
| 6.5. | El cobre en enfermedades neurodegenerativas..... | 56 |
| 6.5.1. | Enfermedad de Alzheimer | 56 |
| 6.5.2. | Enfermedad de Huntington..... | 58 |
| 6.5.3. | Esclerosis Lateral Amiotrófica..... | 58 |
| 6.5.4. | Enfermedad de Menkes..... | 60 |
| 6.5.5. | Enfermedad de Wilson..... | 60 |
| 6.5.6. | Aceruloplasminemia..... | 61 |
| 6.5.7. | Enfermedad de Parkinson..... | 62 |
| 7. | HIPÓTESIS..... | 65 |
| 8. | OBJETIVO GENERAL..... | 65 |
| 8.1. | Objetivos Particulares..... | 65 |
| 9. | MÉTODO..... | 66 |
| 10. | Análisis Estadístico..... | 72 |
| 11. | RESULTADOS..... | 73 |
| 12. | DISCUSIÓN..... | 89 |
| 13. | CONCLUSIONES..... | 99 |
| 14. | PERSPECTIVAS..... | 100 |
| 15. | REFERENCIAS..... | 102 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| ATP | Adenosil Trifosfato |
| ATP7A | ATPasa transportadora de cobre no específica |
| ATP7B | ATPasa transportadora de cobre en el hígado |
| BH ₄ | Tetrahidrobiopterina |
| Ca ²⁺ -CaM | Calcio-Calmodulina |
| CaM | Calmodulina |
| CE | Cuerpo Estriado |
| Cp | Ceruloplasmina |
| CTEM | Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial |
| Ctr1 | Transortador membranaral de cobre |
| Cu | Cobre |
| Cu ¹⁺ | Ion cuproso |
| Cu ²⁺ | Ion cuprico |
| CuSO ₄ | Sulfato de cobre |
| DDC | Dietil ditiocarbamato |
| DDC | L-DOPA descarboxilasa |
| DL ₅₀ | Dosis Letal 50 |
| DMT1 | Transportador de metales divalentes |
| EP | Enfermedad de Parkinson |
| FAD | Flavin Adenin Dinucleótido |
| Fe ²⁺ | Fierro ferroso |
| Fe ³⁺ | Fierro ferrico |
| FMN | Flavin Mononucleótido |
| GMPc | Guanina monofosfato cíclico |
| GPx | Glutation Peroxidasa |
| GSH | Glutation reducido |
| GSSG | Glutation oxidado |
| H ₂ O ₂ | Peroxido de Hidrogeno |
| Ireg1 | Ferroportina |
| L-DOPA | L-dihidroxifenilalanina |

| | |
|--|---|
| MPP ⁺ | 1-Metil-4-fenilpiridinio |
| MPTP | 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio |
| Na ₂ SO ₄ | Sulfato de sodio |
| NADPH | Nicotin Adenin Dinucleotido Fosfato |
| NMDAr | Receptor N-Metil-D-aspartato |
| NO [•] | Oxido Nítrico |
| NO ₂ -Y-TH | Tirosina Hidroxilasa nitrada |
| NSD 1015 | m-hidroxibenzilhidrazina |
| [•] O ₂ ⁻ | Superoxido |
| [•] OH | Radical Hidroxilo |
| ONOO ⁻ | Peroxinitrito |
| PDZ | Postsynaptic Density Protein-95/Discslarge Zo-1 |
| PKA | Cinasa dependiente de AMPc |
| PKC | Proteína Cinasa C |
| PL | Peroxidación lipídica |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SN | <i>Substantia Nigra</i> |
| SNpc | <i>Substantia Nigra pars compacta</i> |
| SOD | Superoxido Dismutasa |
| SOD-Cu,Zn | Superoxido Dismutasa dependiente de Cu,ZN |
| SOD-Mn | Superoxido Dismutasa dependiente de Mn |
| SON | Sintasa del Oxido Nítrico |
| SONc | Sintasa del Oxido Nítrico constitutiva |
| SONe | Sintasa del Oxido Nítrico endotelial |
| SONi | Sintasa del Oxido Nítrico inducible |
| SONn | Sintasa del Oxido Nítrico neuronal |
| TH | Tirosina Hidroxilasa |

1. Abstract.

In Parkinson's disease (PD) the decline in dopamine (DA) content has been considered to only derive after the loss of dopaminergic neurons of the *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc). However, the deficit of DA in the affected regions exceed the loss of dopaminergic neurons, suggesting that this alteration in the synthesis of DA appears before neuronal death. Recently, substantial evidence has been accumulated supporting the hypothesis that oxidative stress activates the cascade of events that lead to declines in DA content and the neuronal death in the PD. In the same way, striatal administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), the active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), reproduces the main biochemical characteristics of the PD. MPP⁺ intrastriatal injection overproduced nitric oxide (NO), superoxide anion ([•]O₂⁻) peroxynitrite (ONOO⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). H₂O₂ in the presence of iron ferrous produces hydroxyl radical ([•]OH). The overproduction of these reactive species increases oxidative and nitrosative stress, alteration of the dopaminergic neurotransmission and eventually neuronal death. On the other hand, copper is an essential micronutrient which is required as a prosthetic group of several enzymes that participate in the antioxidant system, such as ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD).

In the present work, in first instance, the effect of intraperitoneal (i.p.) administration of 10 mMol/Kg of CuSO₄, on the nitration of the tyrosine hydroxylase (TH) and their concomitant inactivation, induced six h later by an intrastriatal microinjection of 10 μg/8 μL of MPP⁺ in the rat, was evaluated. The copper (Cu) supplement administered 24 h before of the damage induced by MPP⁺, diminished nitration significantly as well as the inactivation of the TH, without displaying changes in the expression level of the protein in the different groups. In the same way, Cu treatment also prevented the dopamine-depleting effect of MPP⁺ injection. These results were accompanied by a significant (p<0.05) increment of enzymatic activity of the constitutive nitric oxide synthase (cNOS) caused by the MPP⁺ infusion which is counteracted by means of the Cu, whereas, the protein levels of the three isoforms of NOS remained unchanged. These results indicate that the effect of copper against MPP⁺-induced protein nitration and TH inactivation in the striatum of rat that may be mediated by a reduction of cNOS activity.

On the other hand, it was determined that the effect of the administration of 10 mMol/Kg of Cu upon the enzymatic activity of some Cu-dependent proteins, in the first place evaluating Cu effect over a temporal course of ferroxidase activity in the striatum of rat. Results indicated a significant increase (p<0.05) in the striatal ferroxidase activity after 12 h until 24 h in the animal group treated with the Cu supplement. These findings

correlated with the significant increase ($p < 0.05$) of ventral mesencephalic ferroxidase activity after 12 h, reaching maximum peak activity after 16 h ($p < 0.01$). This maximum peak activity was challenged by means of an MPP⁺ injection 10 μ g/8 μ L, and six hours later a significant ($p < 0.05$) decrease in the ferroxidase activity of both cerebral regions was identified. However, the group administered with copper and MPP⁺ did not show change in ferroxidase activity in relation to control group. The effect of the increase in the ferroxidase activity induced by Cu, was indirectly determined after evaluating the formation of lipidic fluorescent products induced by MPP⁺, showing a significant ($p < 0.01$) increase in the group treated with MPP⁺, whereas the group treated with Cu and MPP⁺, showed peroxidation levels similar to the control group.

The exposure of striatal tissue to MPP⁺ resulted in a significant decrease in copper/zinc superoxide dismutase (SOD-Cu,Zn) activity versus control group, which was reverted by copper supplement to basal levels. Manganese superoxide dismutase activity did not change in the different groups. Based on this observation we evaluated the effect of 10 mMol/Kg of Cu on oxidative damage induced by the injection of 10 μ g/8 μ L MPP⁺ by means of measuring of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels as well as their relation (GSH/GSSG) into the rat striatum. MPP⁺ infusion produced a significant decrease in GSH levels both on animals administered with Na₂SO₄ or CuSO₄ versus control group. Whereas, GSSG levels showed a significant ($p < 0.05$) increase in the animals treated with Na₂SO₄ and MPP⁺, nevertheless the group treated with Cu and MPP⁺ showed GSSG levels without changes in relation to control group. Consequently, relation of GSH/GSSG was significantly ($p < 0.01$) reduced in the group treated with MPP⁺, meanwhile the relation in the group of animals pretreated with Cu and MPP⁺ injection presented a partial recovery ($p < 0.05$). No changes were found in the Glutathion peroxidase (GPx) activity throughout the different groups.

In conclusion, the main contribution of the present work is based on the potential effect of the copper supplement over the deleterious effect induced by MPP⁺. Cu reduces both nitrosative and oxidative damage probably through regulation of the NOSc activity, as well as by means of an increase in both striatal and ventral mesencephalic ferroxidase activity. However, the possible participation of other Cu-dependant proteins should not be discarded since it can be playing an important role against MPP⁺-induced neurotoxicity.

2. Resumen.

En la enfermedad de Parkinson (EP) se considera que el decremento en el contenido de dopamina (DA) se presenta solamente después de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *Substantia Nigra pars compacta (SNpc)*. Sin embargo, el déficit de DA en las regiones afectadas excede significativamente la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, sugiriendo que la alteración en la síntesis de DA se presenta aún antes de la muerte neuronal. Recientemente, hay evidencia acumulada apoyando la hipótesis de que el estrés oxidante activa la cascada de eventos que conducen a la muerte neuronal en la EP. Asimismo, el 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺), el metabolito activo de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), reproduce las principales características bioquímicas de la EP. La administración del MPP⁺ genera una sobreproducción de óxido nítrico (NO), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxinitrito (ONOO[•]) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 en presencia de hierro ferroso (Fe^{2+}) da lugar a la producción del radical hidroxilo (OH^{\cdot}). La sobreproducción de estas especies reactivas da lugar a estrés oxidante y nitrosativo, alteración de la neurotransmisión dopaminérgica y eventualmente la muerte neuronal. Por otra parte, el cobre (Cu), un micronutriente esencial que es requerido como grupo prostético de varias enzimas que participan en el sistema de respuesta antioxidante, tales como la ceruloplasmina y la superóxido dismutasa (SOD). Este metal se encontrará disminuido en cerebros postmortem de enfermos de Parkinson y recientemente ha demostrado tener efecto en contra del daño neuronal dopaminérgico inducido por MPP⁺.

En el presente trabajo, se evaluó en primera instancia el efecto de la administración i.p. de 10 mMol/Kg de CuSO_4 , sobre la nitración de la tirosina hidroxilasa (TH) y la concomitante inactivación inducida seis horas después de la microinyección intraestriatal de 10 $\mu\text{g}/8\mu\text{L}$ de MPP⁺ en la rata. El suplemento de cobre administrado 24 horas antes de la lesión por MPP⁺ disminuyó significativamente tanto la nitración, como la inactivación de la TH, sin presentar cambios en el nivel de expresión de la proteína en los diferentes grupos. Del mismo modo, el suplemento de Cu previno la disminución del contenido de DA estriatal inducida por MPP⁺. Estos resultados se correlacionan con un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad sintasa del óxido nítrico dependiente de calcio (SONc) a causa de la infusión de MPP⁺, lo cual es contrarrestado por el pretratamiento con CuSO_4 . Ningún cambio fue observado en el nivel de expresión de las tres isoformas de la SON en los diferentes grupos. Estos resultados demuestran que el pretratamiento con el suplemento de CuSO_4 es capaz de disminuir el daño nitrosativo inducido por MPP⁺ por medio de una regulación en la actividad SONc.

Por otra parte, se determinó el efecto de la administración de 10mMol/Kg de CuSO_4 sobre la actividad enzimática de algunas proteínas dependientes de Cu, evaluando en primer lugar el efecto del suplemento de Cu en un curso temporal de actividad ferroxidasa en el CE de la rata. Los resultados indicaron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad ferroxidasa estriatal a partir de las 12 h y hasta las 24 h en el grupo de animales tratados con el suplemento de Cu. Estos hallazgos correlacionaron con el incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad ferroxidasa del mesencéfalo ventral a partir de las 12 h, alcanzando un pico máximo de actividad después de 16 h ($p < 0.01$). Posteriormente, se desafió este pico máximo de actividad por medio de la inyección de 10 $\mu\text{g}/8\mu\text{L}$ de MPP^+ , en donde 6 horas después se identificó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad ferroxidasa de ambas regiones cerebrales. No obstante, el grupo administrado con el suplemento de cobre más MPP^+ mostró una actividad ferroxidasa del orden del grupo control. El efecto del incremento en la actividad ferroxidasa inducido por la administración de Cu se evaluó indirectamente al medir la formación de productos lipídicos fluorescentes inducidos por MPP^+ , encontrándose que la administración del MPP^+ da lugar a un incremento significativo ($p < 0.01$) en la formación de productos lipídicos fluorescentes, mientras que en el grupo tratado con el suplemento de Cu más MPP^+ , la formación de productos lipídicos fluorescentes a nivel del grupo control.

La actividad SOD-Mn no presentó cambios en los diferentes grupos, mientras que la actividad SOD-Cu,Zn disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en el grupo tratado con MPP^+ en relación al grupo tratado con Cu más MPP^+ , en donde los niveles de la actividad permanecieron sin cambio respecto al grupo control. En términos de lo anterior, se determinó el efecto del suplemento de CuSO_4 sobre el daño oxidante inducido por MPP^+ sobre los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) así como su relación (GSH/GSSG) en el CE de la rata. Los niveles de GSH se encontraron disminuidos significativamente ($p < 0.05$) en el grupo tratado con Na_2SO_4 más MPP^+ como en el grupo tratado con CuSO_4 más MPP^+ . Por su parte, los niveles de GSSG se incrementaron significativamente ($p < 0.05$) en el grupo tratado con MPP^+ mientras que el grupo tratado con el suplemento de Cu más MPP^+ mostró niveles de GSSG del orden del grupo control. En consecuencia, la relación GSH/GSSG se encontró significativamente ($p < 0.01$) disminuída en el grupo tratado con MPP^+ , mientras que la relación GSH/GSSG en los animales tratados con el suplemento de Cu más MPP^+ presentaron una recuperación parcial ($p < 0.05$) en la relación GSH/GSSG. Ningún cambio fue encontrado en la actividad Glutacion Peroxidasa (GPx) de los diferentes grupos evaluados.

En conclusión, la principal aportación del presente trabajo está basada en el efecto del suplemento de CuSO_4 para contrarrestar las alteraciones neuroquímicas inducidas por MPP^+ al disminuir tanto el daño nitrosativo como el daño oxidante a través de la disminución en la actividad SONc, así como por el aumento en la actividad ferroxidasa estriatal y mesencéflica. Sin embargo, no se debe descartar la posible participación de otras proteínas dependientes de Cu que pueden estar jugando un papel importante en contra del daño ejercido por MPP^+ .

3. INTRODUCCIÓN.

En la actualidad la enfermedad de Parkinson (EP) es uno de los trastornos neurodegenerativos más comunes. Se considera que los trastornos clínicos que caracterizan a este padecimiento se presentan hasta que han degenerado más del 50% de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), lo cual trae como resultado una disminución en el contenido de dopamina (DA) en el cuerpo estriado (CE). No obstante, existe evidencia de que el contenido de DA en las células sobrevivientes disminuye aún antes de que se presente la muerte neuronal, a causa del decremento en la capacidad biosintética del neurotransmisor. La muerte neuronal en la EP idiopática como la falla en la biosíntesis de DA son debidos presumiblemente a una sobreproducción de radicales libres originados a partir de diversas fuentes. La acumulación de hierro en las neuronas pigmentadas de la SN, es entre otras, una fuente de formación de especies reactivas del oxígeno, lo cual en la actualidad es útil en el diagnóstico clínico para pacientes con EP idiopática, ya que presenta una especificidad del 96% y una sensibilidad del 91%, lo que permite discriminar entre pacientes con EP idiopática de aquellos con síndromes parkinsonianos atípicos, parálisis supranuclear progresiva y aquellos con atrofia de sistemas múltiple. La estrategia terapéutica más utilizada para el tratamiento de esta enfermedad es tan solo sintomatológica, por lo general a través de la coadministración de L-DOPA/carbidopa, la cual reduce su eficacia después de cinco años en promedio, por lo que en su momento se adoptan otras medidas farmacológicas que pueden contrarrestar las alteraciones del movimiento que aparecen después de la pérdida de la eficacia de la L-DOPA, ofreciendo a los pacientes una mejor calidad de vida. Sin embargo, sigue siendo imposible frenar la progresión de la enfermedad o restaurar aquellas funciones que se han perdido.

Las diversas estrategias para enfrentar una enfermedad de origen desconocido y que se hace evidente con varias alteraciones bioquímicas y neuroanatómicas una vez que esta se manifiesta, solo ha podido ser estudiada por medio del desarrollo de modelos experimentales de la enfermedad ya sea *in vivo* o *in vitro*, mismos que son generados por medio del uso de ciertas neurotoxinas. Es así, que existen diversos modelos experimentales capaces de reproducir las

principales características bioquímicas de la EP. En el presente trabajo se ha utilizado, con ligeras modificaciones a partir de ciertos reportes en la literatura, un excelente modelo experimental de la EP desarrollado en la rata por medio de una microinyección intraestriatal unilateral estereotáxica del metabolito 1-metil-4-feilpiridinio (MPP⁺), a través del cual ha sido posible reproducir las principales alteraciones bioquímicas similares a las observadas en la EP, haciendo también evidente que la neurotransmisión dopaminérgica es interrumpida antes de que sobrevenga la muerte neuronal.

Por otra parte y dada la necesidad de desarrollar alternativas terapéuticas que coadyuven con las ya utilizadas para contrarrestar las alteraciones bioquímicas antes expuestas en la EP, se ha considerado de importancia el estudio del efecto terapéutico del Cobre (Cu), ya que éste es un micronutriente esencial en la dieta que actúa como grupo prostético de varias proteínas involucradas en el metabolismo y en la respuesta antioxidante, tales como la superóxido dismutasa dependiente de cobre, citocromo c oxidasa, metalotioneína y la ceruloplasmina entre otras.

En términos de lo anterior, en el presente trabajo se ha evaluado el efecto de la administración aguda de Cu en la rata, bajo la hipótesis de que el suplemento de Cu es capaz de reducir tanto el daño oxidante y nitrosativo inducido por MPP⁺, a través de un aumento tanto en la respuesta antioxidante como en la actividad ferroxidasa. Por lo tanto, los objetivos planteados en el presente trabajo han sido inicialmente orientados hacia la determinación del efecto del Cu sobre el nivel de nitración de la tirosina hidroxilasa (TH) inducido por MPP⁺ en el CE de la rata. En segundo lugar, los objetivos de este trabajo se han dirigido a determinar la actividad de algunas proteínas dependientes de Cu y su posible participación en la disminución del daño oxidante inducido por MPP⁺ en el presente modelo.

Los hallazgos de este trabajo corroboran la utilidad del modelo de la EP en la rata para reproducir las principales características bioquímicas de la EP a través de la inyección intraestriatal de MPP⁺. Asimismo, se hace evidente que el Cu es capaz de contrarrestar el daño nitrosativo por medio de la reducción de la actividad sintasa del óxido nítrico dependiente de calcio (SONc) dando lugar a una

reducción de los niveles de nitración de la TH en el CE de la rata. Además, la administración del suplemento de Cu reduce también el daño oxidante inducido por el MPP⁺ a través de producir un incremento en la actividad de enzimas Cu-dependientes, disminuyendo el daño oxidante inducido por MPP⁺ al recuperar parcialmente los niveles de glutatión reducido.

4. ANTECEDENTES.

4.1. Breve Reseña Histórica.

La EP fue descrita por primera vez en 1817 por un médico inglés de nombre James Parkinson, quien la denominó como “*parálisis agitante*”. En 1872 Charcot y Vulpian después del análisis de pacientes con las mismas características completaron la descripción de la EP y decidieron nombrar a este padecimiento “Enfermedad de Parkinson” (Charcot y Vulpian, 1872). Para 1912 Lewy describe que en estos pacientes existen inclusiones en el citoplasma de la neuronas, demostrándose más tarde que las neuronas principalmente afectadas son las de la SN (Obeso *et al.*, 2002). Los hallazgos en la historia continuarían y en 1919 después de analizar 9 cerebros de pacientes con EP se encontró una disminución en el número de células de la SN (Tetriakoff, 1919). Fue hasta 1960 cuando Ehringer y Hornykiewics demostraron una disminución importante en el contenido del neurotransmisor dopamina (DA) de la vía nigroestriatal, lo cual fue posteriormente validado por numerosos estudios en relación con los trastornos del movimiento y la postura en pacientes con EP (Hornykiewics, 1996). Para el año de 1989 se reportó que la actividad del complejo I de la Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial (CTEM) se encuentra disminuída en pacientes con EP (Schapira *et al.*, 1990), lo cual genera una disminución en la síntesis de ATP e incrementa la formación de especies reactivas del oxígeno. En ese mismo año se reportó que existe una significativa reducción del contenido cerebral de GSH dentro de la SNpc, lo cual fue considerado como el primer indicador de estrés oxidativo en la EP, sugiriendo un concomitante incremento en la formación de ERO (Riederer *et al.*, 1989), sustentando así la hipótesis del estrés oxidante como causa de muerte neuronal en la EP. En 1998 Boll y col., reportaron la disminución en la actividad ferroxidasa plasmática en enfermos de Parkinson, lo cual correlacionaría con la acumulación de hierro en la SN, lo cual se ha convertido en el signo clínico más importante para el diagnóstico de la enfermedad con un 96% de especificidad y 91% de sensibilidad por medio de sonografía del parénquima cerebral que permite discriminar a la EP idiopática de aquellos síndromes parkinsonicos atípicos (Walter *et al.*, 2003).

4.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON IDIOPÁTICA

A grandes rasgos la EP idiopática es definida como una alteración neurodegenerativa que se caracteriza por un déficit del neurotransmisor DA, lo cual es consecuencia de la pérdida preferencial de las neuronas dopaminérgicas de la *SNpc* (Fahn, S. 1998). La EP no es clínicamente obvia sino hasta que se da la pérdida de un 50-60% de las neuronas dopaminérgicas de la *SNpc* que proyectan hacia el CE, dichas aferencias se ven disminuídas hasta en un 80% con una reducción en el contenido de DA estriatal del 80 y hasta del 90% (Blum, D. *et al.*, 2001).

4.2.1. Epidemiología.

Actualmente la EP es el segundo padecimiento neurodegenerativo de mayor frecuencia después de la enfermedad de Alzheimer y también ocupa el segundo lugar en los trastornos del movimiento después del temblor esencial. Se estima en general que la prevalencia de este desorden se incrementa con la edad y se considera que afecta a más del 1% de la población de 65 años en adelante. La edad media a la que esta alteración inicia es a los 60 años y tiene una duración promedio de 13 años desde sus primeras manifestaciones. Solo entre el 5 y el 10% de los casos la desarrollan antes de los 40 años (Blum *et al.*, 1993). La EP idiopática ocurre en todo el mundo con una incidencia preferencial en los hombres en comparación con las mujeres, siendo de 2:1, respectivamente. Se han reportado anualmente 114 casos por cada 100,000 habitantes mayores de 55 años incrementándose hasta 327 casos por cada 100,000 habitantes de 84 años (Baldereschi *et al.*, 2000). Países como Argentina y las islas Faraos en el norte de Europa presentan una alta prevalencia. En Europa, entre los países de mayor prevalencia se encuentran: Austria, República Checa, Francia, Alemania, Italia, Holanda, Portugal, España, Suiza e Inglaterra en donde se estima que la tasa de prevalencia cruda va desde 65.6 a 12.500 por cada 100,000 habitantes (von Campenhausen, 2005). Los datos de la prevalencia en la República de Argentina han indicado que se presentan hasta 657 enfermos con EP por cada 100,000 habitantes (Zhang y Roman, 1993). Países de baja prevalencia tales como los

asiáticos, africanos y en Cuba se reportan 15 enfermos de Parkinson por cada 100,000. Lo cual en Cuba se presenta predominantemente en la población blanca más que en la población de piel negra (Giroud, 2000).

4.2.2. Manifestaciones Clínicas.

La serie de cambios funcionales derivados a partir de la disminución del contenido de DA en la vía nigroestriatal, a causa de la degeneración nigral, trae como resultado notorios cambios en el movimiento, caracterizados por temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia y un subsiguiente trastorno de los reflejos posturales que dificultan la marcha (Fahn, S. 1989). En la EP idiopática, estos trastornos motores son frecuentemente acompañados por alteraciones no motoras tales como depresión, ansiedad, disfunción autonómica, trastornos de sueño y alteraciones cognitivas, las cuales se cree que resultan a partir de la combinación de la deficiencia de DA en la porción no motora del estriado y extensivamente a partir de los cambios patológicos progresivos en el tallo cerebral, tálamo y eventualmente la corteza cerebral (De long y Wichmann, 2007).

4.2.3. Anatomía de los Ganglios Basales.

La circuitería de los ganglios basales procesa las señales que fluyen a partir de la corteza, permitiendo la perfecta ejecución de los movimientos voluntarios. Esta tarea es ejecutada por una compleja red neuronal, la cual incluye a la corteza cerebral, la región motora del tálamo y los ganglios basales. La circuitería de los ganglios basales se encuentra interpuesta entre la corteza y el tálamo motor (figura 1). La principal tarea del circuito es la de procesar las señales que fluyen desde la corteza, para que una señal de salida regrese a la misma por medio del tálamo, para modular la ejecución de los movimientos (De long y Wichmann, 2007). Los ganglios basales están localizados en el telencéfalo basal y consisten en cinco núcleos interconectados: El núcleo caudado, el putamen, globo pálido, *substantia nigra* y núcleo subtálamico. Aunque el núcleo caudado y el putamen estén parcialmente separados por la capsula interna, varios puentes de células los conectan, pero ambos núcleos poseen características anatómicas y funcionales similares. Es así, que las dos estructuras son generalmente referidas como *corpus*

striatum o *striatum*. El CE, el principal núcleo de entrada, transmite el flujo de información proveniente de la corteza a los núcleos de salida, *substantia nigra pars reticulata* y al *globus pallidus medial*, así como al *globus pallidus lateral*, vía directa e indirecta, respectivamente (Kelly and Strick, 2004). Las dos vías se originan desde diferentes subgrupos de neuronas estriatales. En la vía directa, las neuronas GABAérgicas estriatales expresan receptores D₁, estas neuronas proyectan monosinápticamente a la *substantia nigra pars reticulata* y al *globus pallidus medial*. En la vía indirecta, el estriado alcanza el núcleo de salida por medio de una ruta más compleja. Un grupo de neuronas que expresan receptores D₂, proyectan al *globus pallidus lateral* el cual envía proyecciones GABAérgicas al núcleo subtálamico (Gerfen *et al.*, 1995). El núcleo subtálamico, recibe una vía glutamatérgica proveniente de la corteza y en turno, este núcleo está interconectado recíprocamente tanto con la *SNpc* como con el *globus pallidus lateral* y además envía sus eferentes glutamatérgicas al núcleo de salida, *globus pallidus medial* y *substantia nigra pars reticulata* (Blandini *et al.*, 2000).

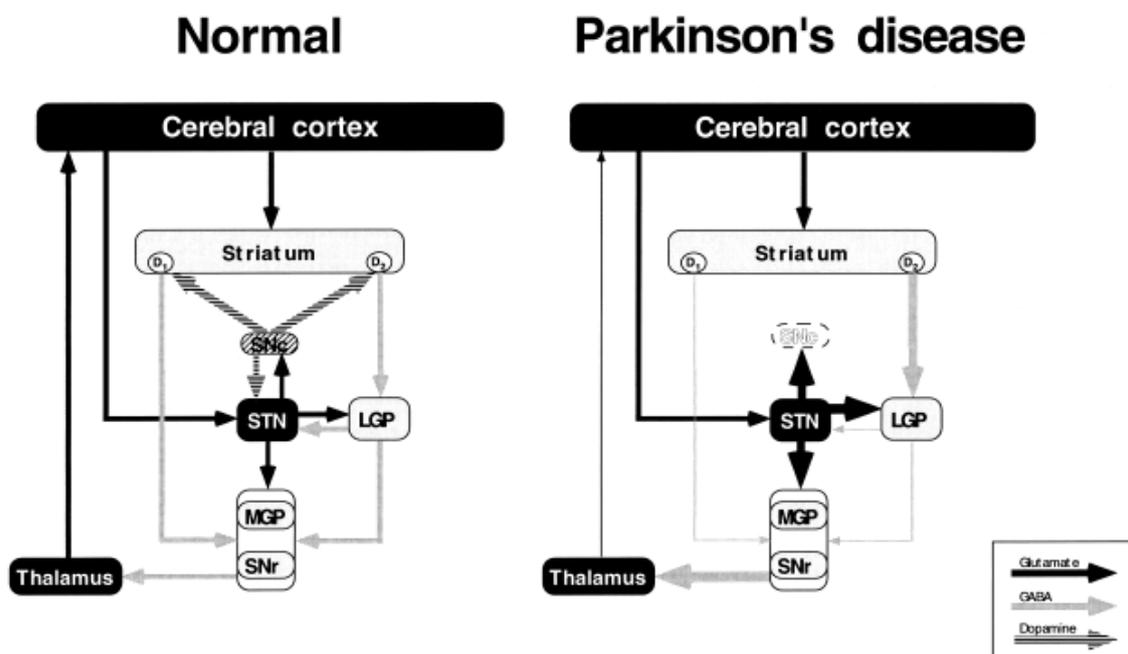


Figura 1. Cambios anatómicos y funcionales propuestos para la circuitería de los Ganglios Basales en la Enfermedad de Parkinson. Tomado de Blandini *et al.*, 2000. Prog Neurobiol. 62:63-88.

4.2.4. Alteraciones Funcionales de los Ganglios Basales en la EP.

En la EP, la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la *SNpc* dispara una cascada de cambios funcionales que afecta toda la red de los núcleos subcorticales. Parece ser que la alteración más importante afecta el núcleo de salida, *substantia nigra pars reticulata* y al *globus pallidus medial*, los cuales se tornan hiperactivos. Tal hiperactividad es sostenida por el incremento en la salida glutamatérgica que este núcleo de salida recibe a partir del núcleo subtálmico. Este fenómeno es debido a un decremento en el control inhibitorio ejercido sobre el núcleo subtálmico por el *globus pallidus lateral*, pero se sugiere que hay mecanismos adicionales o alternativos que pueden estar dando lugar a la hiperactividad (figura 1). Dada la invasión recíproca de la *SNpc* y el núcleo subtálmico, el déficit dopaminérgico puede influir directamente la actividad subtálmica. Además, el incremento excitatorio subtálmico puede estar sustentando la progresión del proceso degenerativo de la *SNpc* (Blandini *et al.*, 2000), siendo esta serie de cambios funcionales lo que deriva en desórdenes del movimiento, los mismos que como ya hemos mencionado representan a la serie de manifestaciones clínicas en la EP.

4.2.5. Neurotransmisión Dopaminérgica.

La DA es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC), la síntesis del neurotransmisor tiene lugar en las terminales dopaminérgicas en donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables de su síntesis (Bahena *et al.*, 2000). Se han descrito tres principales sistemas dopaminérgicos en el cerebro: El sistema nigro-estriatal, llamado sistema extrapiramidal, en donde los cuerpos neuronales se encuentran localizados en la *SN* proyectando hacia el CE. El sistema mesolímbico y mesocortical, que se origina en el área tegmental ventral del mesencéfalo proyectando hacia el estriado y estructuras límbicas. Además, se cuenta con el sistema de neurotransmisión dopaminérgica tuberuloinfundibular, con fibras relativamente cortas que nacen en el hipotálamo (núcleo arcuato y periventricular)

y terminan en la hipófisis (lóbulo intermedio) y la eminencia media (Brailowsky, 1995).

4.2.6. Tirosina Hidroxilasa.

La DA es sintetizada por la acción secuencial de la TH y la Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (DDC) (Cooper, J. *et al.*, 1996). La hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el paso de regulación en la síntesis de catecolaminas en el SNC (figura 2), en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de DA (Nagatsu *et al.*, 1964). La TH es un péptido de 498 aa. (60 kDa) presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas. La enzima es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno molecular como sustrato y tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido en posición meta para formar L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina). La TH requiere también de hierro en el centro catalítico para llevar a cabo su función (Nagatsu, 1981). Por otra parte, la DDC cataliza la remoción del grupo carboxilo a partir de la L-DOPA para formar DA. La DDC es dependiente de piridoxina, presenta una baja K_m y una alta V_{max} a la L-DOPA, así la L-DOPA endógena es eficientemente convertida a DA (Christenson *et al.*, 1970).

La TH nativa es un tetrámero de 4 monómeros idénticos, cada monómero aislado presenta actividad catalítica y por digestión proteolítica limitada. El dominio catalítico ha sido localizado entre el residuo leucina 188 y el residuo fenilalanina 456 hacia la región carboxilo terminal. La enzima en la rata contiene 17 residuos de tirosina y 15 de estos residuos de tirosina son encontrados en el dominio catalítico. En el humano se presentan 15 residuos de tirosina y 14 de ellos se encuentran dentro del dominio catalítico (Ara *et al.*, 1998). La TH es susceptible de inactivación por nitración de residuos de tirosina en el dominio catalítico (Blanchard-Fillion *et al.*, 2001). En la EP han sido reportados residuos de nitrotirosina libre y elevado nivel de proteínas nitradas (Good *et al.*, 1998).

La TH presenta hacia la región amino terminal varios residuos de serina en posición 8, 19, 31 y 40 (Xu *et al.*, 1998). La regulación de la TH por fosforilación es específica para cada uno de los residuos por medio de diferentes cinasas. El residuo de serina 8 se sabe que es fosforilado *in vitro* por una proteína cinasa

dependiente de ciclina; la serina 19 es fosforilada por la proteína cinasa II dependiente del complejo calcio-calmodulina y también por la proteína cinasa 2 dependiente de MAP-cinasa. La serina 31 es fosforilada por MAPK y el residuo de serina 40 es fosforilada por PKA y por PKC, este residuo de serina 40 fosforilado es indispensable para la activación de la TH, el cual aumenta considerablemente la K_i (Haavik y Toska, 1998).

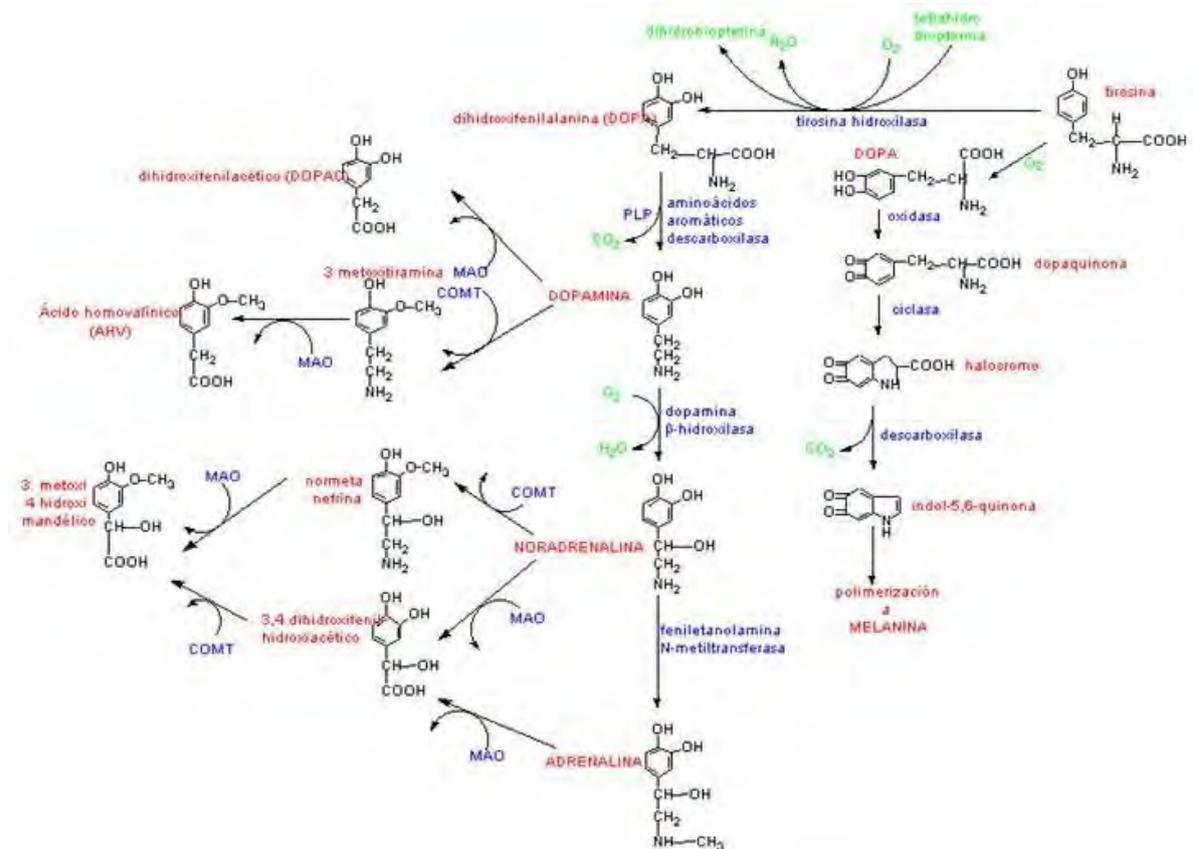


Figura 2. Representación esquemática de la síntesis y biotransformación de las catecolaminas. La hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el paso de regulación en la síntesis de catecolaminas. La TH es la enzima limitante de la síntesis de DA y del resto de las catecolaminas. Tomada a partir de www.psicobiol.net/imagenes/gifs/.

4.2.7. Metabolismo de la DA.

En cuanto a la degradación de la DA, se sabe que ésta, al ser recapturada es convertida por la enzima monoamino-oxidasa en ácido dihidroxi-fenilacético (DOPAC), en particular por la isoforma A (MAO-A), presente en el interior de la terminal nerviosa. Este es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). La

DA no capturada por la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO-B (figura 2.) (Cooper *et al.*, 1996).

Se considera en general que en la EP la disminución en los niveles de DA surge solamente a partir de la severa pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *SNpc*. Sin embargo, el déficit de DA en las regiones afectadas excede significativamente la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, sugiriendo que la síntesis de DA se encuentra disminuida antes de que se produzca la muerte neuronal (Ara *et al.*, 1998). Esta hipótesis es consistente con datos que han sido obtenidos a través de la extrapolación del decremento de DA estriatal a partir de tejido cerebral *postmortem* de humanos y también por medio del análisis matemático de la proyección de la progresión de la EP vista *in vivo* por medio de estudios de imagen en humanos, en donde se encuentran que el decline en el contenido de DA no corresponde con el grado de muerte neuronal (Morís *et al.*, 1998). La alteración en la neurotransmisión dopaminérgica en la vía nigroestriatal puede ser debida a la inactivación por nitración de la TH dado que el análisis de tejido *postmortem* revela un alto índice de TH nitrada y un alto contenido de residuos de tirosina libre nitrada (Good *et al.*, 1998). De tal forma que la eficiencia en la biosíntesis de la DA disminuye en las células remanentes antes de la muerte neuronal. Es así que podemos considerar esta alteración en la síntesis de DA como uno de los mecanismos inhibitorios más importantes, aun más que la posible deficiencia en la captura de L-tirosina, disponibilidad de BH₄, ineficiencia en la fosforilación de la TH o inhibición de la síntesis por producto final en el centro catalítico de la TH.

4.3. Terapia Farmacológica.

El principal tratamiento farmacológico de la EP se basa en el uso de un precursor de la DA, la L-DOPA ó bien agonistas dopaminérgicos. La L-DOPA es el estándar de oro en cuanto a la sintomatología y reduce en más del 50% los síntomas al principio de la enfermedad. Otro grupo importante de fármacos que se utilizan como tratamiento de inicio en la EP son los anticolinérgicos, los cuales promueven incremento en el nivel de DA por medio de la activación de receptores muscárinicos en el cerebro (Toulouse y Sullivan, 2008). En cuanto a la L-DOPA,

ésta atraviesa la barrera hematoencefálica y es captada por las neuronas dopaminérgicas remanentes o bien cualquier otra neurona aminérgica, las cuales la biotransforman a DA. Este precursor de la DA se coadministra a la par de la Carbidopa, un inhibidor de las descarboxilasas periféricas. El tratamiento con L-DOPA conduce a una pérdida de la eficacia del tratamiento así como a la aparición de efectos adversos severos después de un periodo promedio de administración de 5 años (Bahena *et al.*, 2000). Después de este tiempo se presenta una pérdida progresiva en la eficacia del fármaco (“wearing-off”) seguido de una fase en la que se observan periodos alternantes de respuesta adecuada y de falta de la respuesta a L-DOPA (periodos “on-off”). Entre los efectos adversos más importantes por el tratamiento crónico con L-DOPA se encuentra la discinesia tardía, que es observada entre el 60-80% de los pacientes. Las discinesias tardías se caracterizan por movimientos involuntarios e incontrolables de los músculos de la cara y de los miembros superiores e inferiores (Bahena *et al.*, 2000). La administración de agonistas dopaminérgicos selectivos, como la bromocriptina, el pramipexole, el ropirinole y la cabergolina, dirigidos a los receptores de la familia D₂, en combinación con L-DOPA parecen disminuir de manera significativa la aparición de discinesias tardías (Poewe, 1998).

Aunque la administración única de agonista D₂ ha sido empleada con relativo éxito, la opción más apropiada para la mayoría de los pacientes parece ser la administración inicial de L-DOPA/carbidopa a lo que puede adicionársele un agonista selectivo D₂ si se presentan discinesias. Sugiriéndose también que se requiere la activación conjunta de los receptores D₁ y D₂ para el adecuado efecto farmacológico en la EP (Bahena *et al.*, 2000).

4.4. Estrés Oxidativo en la EP.

A pesar de los avances en el conocimiento de los fenómenos neuroquímicos que subyacen a esta patología, la etiología de la EP permanece oscura, existiendo un creciente interés en el proceso de degeneración neuronal y en particular del estrés oxidativo. La sobreproducción de radicales libres que eventualmente da lugar a estrés tiene presumiblemente varias fuentes en etapas tempranas de la enfermedad y se dice que esto representa la patogénesis de la muerte neuronal.

Existen reportes en la literatura que indican que los enfermos de Parkinson presentan una reducción en la actividad de la CTEM (Mizuno *et al.*, 1998); decremento en los niveles de glutatión reducido (GSH) (Pearce *et al.*, 1997) con una concomitante reducción en la respuesta antioxidante; sobreproducción de óxido nítrico (ON) (Hunot *et al.*, 1996) a causa de la sobre expresión de la isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico (SON); incremento en el contenido total de hierro (Fe) y zinc (Zn^{2+}) y disminución en el contenido de cobre (Cu) y manganeso (Mn) (Dexter *et al.*, 1991). Esta serie de alteraciones manifiestas en la EP son potenciales fuentes de radicales libres o de una disminución en la respuesta antioxidante.

4.4.1. Disfunción mitocondrial y formación de radicales libres.

Estudios de Resonancia Magnética Espectroscópica en pacientes con EP mostraron un decremento cortical y subcortical del metabolismo de la glucosa (Eberling *et al.*, 1994) y un incremento del lactato cortical (Bowen *et al.*, 1995), lo cual sugiere alteraciones del metabolismo energético. En relación a esto se ha reportado una disminución hasta en un 40% en la actividad del Complejo I (NADH Ubiquinona oxido-reductasa) de la CTEM en plaquetas y músculo estriado de pacientes con EP (Schulz y Beal 1994) y a nivel central disminución del 30-40% en la actividad del Complejo I en la *SNpc* de cerebros *postmortem* con EP (Schapira *et al.*, 1990). Esta alteración es un factor de daño oxidante, ya que da lugar a un desacople a lo largo de la CTEM causando un incremento en la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), tales como el radical superóxido ($\bullet O_2^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Beal, 1995), este último aunque no es un radical es una especie química potencialmente peligrosa. Durante la fosforilación oxidativa mitocondrial el oxígeno molecular (O_2) sufre una reducción tetravalente a agua y la concomitantemente producción de ATP, pero del 1-5% del oxígeno se fuga a lo largo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial causando la formación de ERO, las cuales causan daño oxidativo a macromoléculas celulares, tales como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Beal, 1995). La fuente fisiológica más importante de $\bullet O_2^-$ en la célula es la mitocondria la cual produce de 2-3 nanomoles de $\bullet O_2^-$ /min/mg de proteína (Beal, 2000), ya que en caso de una

reducción univalente no catalítica del O_2 , se da lugar a la producción excesiva del radical $\cdot O_2^-$ y de intermediarios tóxicos que deben ser detoxificados por mecanismos protectivos endógenos y de esta forma prevenir el daño al tejido. Se estima que la disfunción mitocondrial en la EP produce siete veces más radicales que en condiciones normales, producción que supera la respuesta antioxidante (Calabrese *et al.*, 2001). El radical $\cdot O_2^-$ a pesar de que tiene un patrón de reacción más restringido que el radical hidroxilo ($\cdot OH$), reacciona principalmente con proteínas que contienen metales de transición, alterando su función catalítica (Gutteridge, 1994). La disminución en la producción de energía en forma de ATP da lugar a una reducción en el potencial de membrana mitocondrial el cual es acompañado de alteraciones en el amortiguamiento del calcio (Ca^{2+}) provocando así la apertura del poro de permeabilidad transitoria, proceso que conduce a la muerte neuronal por apoptosis (Beal, 2000). Asimismo, ha sido observada una disminución en la inmunoreactividad del Complejo I, mientras que el resto de las subunidades de la CTEM se encuentran sin cambios (Hattori, 1991).

4.4.2. Alteración del ADN mitocondrial en la EP.

El decremento en la cantidad y en la actividad del Complejo I de la CTEM de la vía nigroestriatal en enfermos de Parkinson está bien establecido en la literatura, pero la primera causa de este decremento no es conocido. Esta condición sugiere la presencia de un componente genético o medioambiental. Las mitocondrias poseen varias copias de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular, consistiendo cada una de 16,569 pares de bases. Siete de las 41 subunidades totales que constituyen al Complejo I mitocondrial son codificados por el ADN mitocondrial (ADNmt) (Anderson *et al.*, 1981). Se han encontrado deleciones de 5-kb a partir del análisis del ADNmt proveniente de tejido *postmortem* de pacientes con EP, aunque el mecanismo para esta deleción no ha sido aun dilucidado, se ha mostrado que este tipo de deleciones incrementa con el envejecimiento normal del cerebro (Ikebe *et al.*, 1990). También, han sido reportadas deleciones y mutaciones múltiples en el tejido proveniente de enfermos de Parkinson, por lo tanto, la deleción de 5 kb se presenta solo como la punta del iceberg y la acumulación de deleciones del ADNmt puede ser uno de los factores que contribuyen fuertemente a la muerte

neuronal nigral. Asimismo, ocho de cada diez pacientes tienen al menos una mutación puntual en una de las subunidades del Complejo I en las regiones no conservadas del ADNmt, lo cual al parecer no debería de tener consecuencias, sin embargo, aquellas mutaciones presentan efectos significativos sobre la estructura secundaria de las proteínas. (Mizuno *et al.*, 1998). A pesar de que los mecanismos de las delecciones múltiples en el ADNmt, como aquellos de las mutaciones puntuales, aun no han sido dilucidados se considera que el estrés oxidativo dentro de la mitocondria puede tornar al ADNmt más susceptible a las delecciones, la razón de esto es una alta tasa de mutación en el ADNmt, en relación al ADN nuclear, a causa de la ausencia de una cubierta de histonas para el ADNmt, un pobre sistema de reparación de daño para el ADNmt, una alta tasa de recambio del ADNmt y la alta tasa de error de la polimerasa γ (responsable de la replicación del ADNmt), todas estas son condiciones inherentes al ADNmt, lo cual pueden tornarlo más susceptible al daño por radicales libres (Mizuno *et al.*, 1998).

4.3. Glutación.

Otro hallazgo significativo en la EP es el decremento en los niveles de GSH, que representa uno de los defectos bioquímicos tempranos más importantes en la EP (Perry *et al.*, 1986). El GSH es un tripéptido constituido por glutamato, cisteína y glicina (γ -L-glu-L-cis-gli), es el compuesto tiol intracelular no proteico más abundante, éste también está presente como glutatión disulfuro u oxidado (GSSG) (figura 3) (Sies, 1999).

En general la SN tiene bajos niveles de GSH cuando es comparado con otras regiones del cerebro. Las variaciones en los niveles de GSH en las diferentes regiones cerebrales demuestran un contenido diferencial de los niveles GSH: Corteza > cerebelo > hipocampo > estriado > SN (Kang *et al.*, 1999). Sin embargo, los niveles de GSH se encuentran reducidos en la SN y no se encuentran disminuidos en otras áreas del cerebro de los enfermos de Parkinson y tampoco están disminuidos en otras enfermedades neurodegenerativas, con excepción de pacientes con presencia de Cuerpos de Lewis quienes se creen son casos preclínicos de EP (Dexter *et al.*, 1994).

Como es bien sabido el GSH detoxifica a la neurona de H_2O_2 , esta función la ejecuta también la enzima catalasa, no obstante, los niveles de esta proteína son extremadamente bajos en el cerebro, en consecuencia el GSH representa el mayor sistema de defensa antioxidante en el cerebro (Blum *et al.*, 2001).

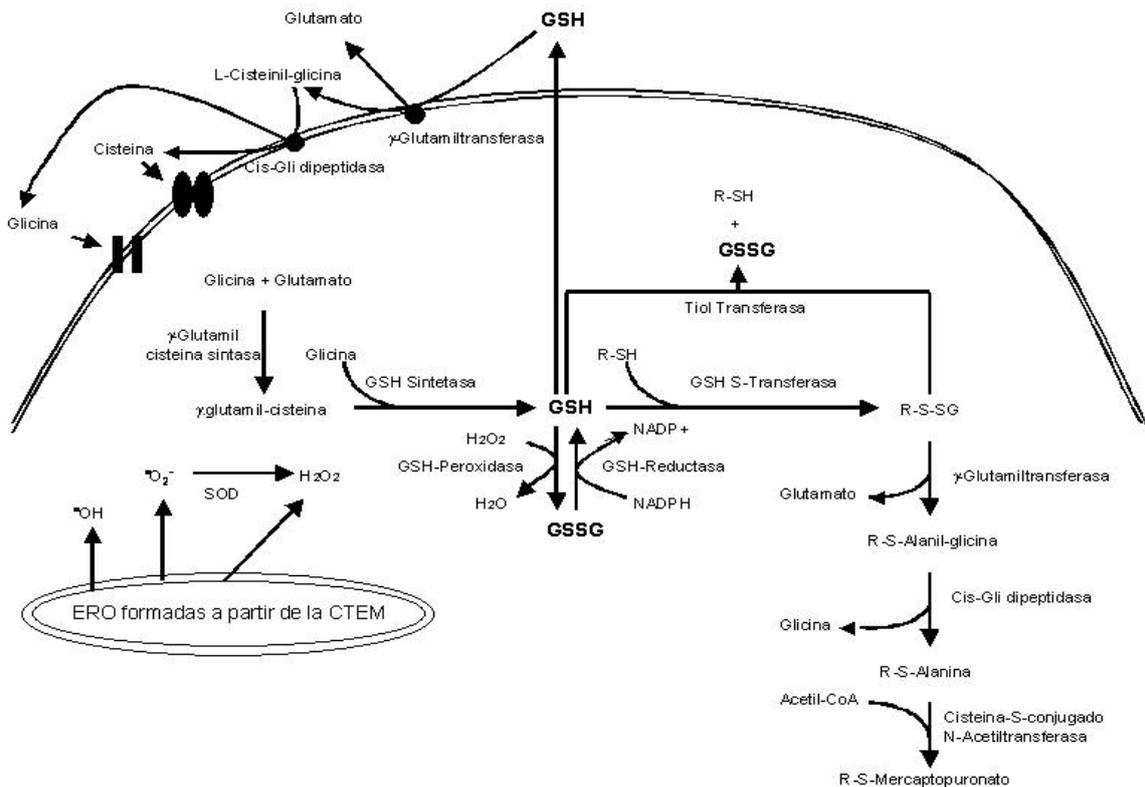


FIGURA 3. La presente figura ilustra las diferentes vías involucradas en el metabolismo del GSH. El GSH es sintetizado *de novo* en el citoplasma a partir de los amino ácidos que lo constituyen en un par de reacciones. El H_2O_2 producido en la mitocondria es detoxificado por la conversión del GSH a GSSG. El GSH que es secretado hacia el exterior celular es degradado a sus amino ácidos constituyentes, los cuales pueden ser tomados para la síntesis *de novo* del tripeptido. Esta figura se construyó a partir de Bharath *et al.*, 2002.

La alteración en la detoxificación de H_2O_2 dependiente de GSH puede ser debido, en primera instancia al aumento en el recambio de DA, lo cual incrementa la producción basal de H_2O_2 disminuyendo así el stock de GSH (Riederer *et al.*, 1989). Asimismo, se debe considerar el incremento en la producción de H_2O_2 a causa de la dismutación del radical $^{\bullet}O_2^-$ sobreproducido por la disfunción mitocondrial (Calabrese *et al.*, 2001), sin hacer a un lado el incremento en la producción de H_2O_2 a causa del metabolismo oxidativo de la monoamino oxidasa y por la auto oxidación de la DA (Gerlach *et al.*, 1994), todo lo cual en conjunto convierte al sistema nigroestriatal en un sistema más vulnerable al daño oxidativo.

La relación entre glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) disminuye durante la degeneración neuronal, favoreciendo la formación de radicales libres. Además, las neuronas nigrales contienen neuromelanina que puede unir hierro ferroso (Fe^{2+}) y liberar hierro férrico (Fe^{3+}), el Fe^{2+} reacciona con H_2O_2 mediante la reacción de Fenton dando lugar a la formación del radical $\cdot\text{OH}$ altamente reactivo (Bharath *et al.*, 2002). Por otra parte, la disminución de GSH es el primer indicador de estrés oxidativo durante la progresión de la EP. A pesar de que el GSH no es el único antioxidante disminuido en la EP, la magnitud en la disminución del GSH se presenta en paralelo a la severidad de la enfermedad y ocurre previo a la aparición de otros marcadores de la enfermedad de Parkinson incluyendo la disminución en la actividad del Complejo I de la CTEM (Jenner P. 1993). La disminución temprana en los niveles de GSH nigral no es explicable por el incremento de la oxidación del GSH a GSSG, dado que el nivel de ambos se encuentra disminuido. También, se han encontrado alteraciones en la actividad de la enzima γ -glutamil cisteina sintasa (γ -GCS), responsable del primer paso en la síntesis del GSH (figura 3). Esta pérdida de GSH tiene otra posible explicación, ya que existe un incremento en la actividad de la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT), enzima unida a la membrana celular que inicia la degradación extracelular de GSH (figura 3), lo cual resulta en el incremento en la remoción tanto del GSH como del GSSG (Sian *et al.*, 1994). El daño oxidativo vía la disminución de GSH puede también acelerar la agregación de proteínas deficientes, conduciendo a la muerte neuronal dopaminérgica de la SN por alteración de la vía ubiquitina-proteosoma de degradación de proteínas (Bharath *et al.*, 2002).

4.4. Sobreproducción de Oxido Nítrico en la EP.

Un buen número de estudios proveen evidencias de sobreproducción de NO en el cerebro de enfermos de Parkinson, lo que representa una fuente más de radicales libres. El NO es formado durante la conversión de la L-Arginina a L-Citrulina por la acción de la sintasa del oxido nítrico (SON) (Knowles y Moncada, 1994). El NO es un gas biológicamente activo, con una vida media de pocos segundos y se produce en casi todos los tipos celulares del organismo, siendo considerado un radical libre porque tiene un electrón desapareado, por si mismo, tiene baja

reactividad y baja toxicidad, se sabe también que participa como mensajero intra y extracelular (Moncada *et al.*, 1991). El NO es una molécula pequeña de 30 daltons sin polaridad y penetra fácilmente a través de las membranas neuronales y difunde a las neuronas adyacentes (Garthwaite and Boulton, 1995). El NO participa en la neurotransmisión del sistema nervioso central (SNC) y periférico (Bredt *et al.*, 1991), interactúa con el motivo hemo de la guanilato ciclasa soluble y la activa para producir guanina monofosfato cíclico (GMPc) y también actúa en la citotoxicidad mediada por ciertos tipos celulares (macrófagos y neutrófilos) (Bredt *et al.*, 1990). Cuando el NO es sintetizado en forma excesiva, produce muerte neuronal por varios mecanismos. Se han estimado valores basales de la concentración de NO en el SNC adulto de 4-5 μM , pero cuando las concentraciones alcanzan valores de 15-40 μM , se observa un efecto citotóxico en diferentes modelos experimentales (Lowenstein and Snyder, 1992). Una sobreproducción de esta índole puede provenir de células de la glia activada presentes en la *SNpc* en degeneración de enfermos de Parkinson, que producen NO y citocinas (Hunot *et al.*, 1996).

4.4.1. Sintetasas del Óxido Nítrico.

En la formación del NO (Figura 4) participa una familia de isoenzimas llamadas sintetasas del óxido nítrico (SON). Se conocen tres distintas isoformas de la SON: SON neural (SONn) o SON-1 (Bredt and Snyder, 1990; Bredt *et al.*, 1991), SON inducible (SONi) o SON-2 (Xie *et al.*, 1992) y SON endotelial (SONe) o SON-3 (Lamas *et al.*, 1992).

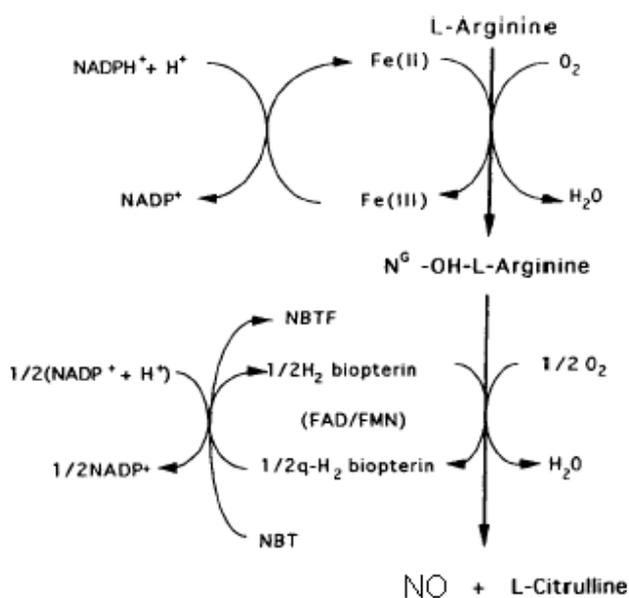


Figura 4. La presente figura ilustra el mecanismo propuesto por Gerlach *et al* en 1994 (J Neurochem. 63:793-807) para la acción catalítica de la SON. La compleja reacción involucra la utilización de una serie de cofactores entre los que se encuentra al complejo Ca²⁺-CaM, para que se lleve a cabo la reacción de la SON, la cual produce NO y L-Citrulina a partir del amino ácido L-Arginina.

Las SON consisten de dos dominios catalíticos: El dominio oxigenasa N-terminal y el dominio reductasa C-terminal. El dominio oxigenasa contiene un dominio de unión a L-Arg, un grupo hemo y un sitio de unión a BH₄, mientras que el dominio reductasa tiene sitios de unión para flavin adenin dinucleótido (FAD), flavin mononucleótido (FMN) y nicotin adenin dinucleotido fosfato (NADPH). Estos dos sitios catalíticos son conectados por un sitio de unión a calcio-Calmodulina (Ca²⁺-CaM). Estos dos dominios catalíticos median la transferencia de electrones desde el NADPH a el hierro de sitio hemo permitiendo la producción de NO vía la desaminación oxidativa de la L-arg a L-cit (figura 4). La BH₄ es importante en el proceso de transferencia de electrones y participa en la conformación homodimerica de las sintasas del óxido nítrico (Panda *et al.*, 2002). Asimismo, existen varias secuencias consenso, en las tres diferentes isoformas de la SON, los cuales son sitios para fosforilación por protein cinasas. La fosforilación de las tres isoformas de la SON es un mecanismo de regulación de su actividad. La fosforilación ha sido asociada tanto con la activación como con la inactivación de la proteína. Las cinasas que las fosforilan son: Proteína Cinasa C (PKC), proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), proteína cinasa dependiente del complejo calcio-calmodulina y la proteína cinasa dependiente de GMPc (Dawson *et al.*, 1993), así mismo y como otro mecanismo de regulación aparece el efecto contrario de desfosforilación que es a través de la calcineurina, la cual, en su acción de fosfatasa activa a la SONn (Morioca *et al.*, 1998).

4.4.1.1. Sintasa del Óxido Nítrico neuronal.

La SONn fue aislada del cerebro de rata en donde se expresa en forma constitutiva, por lo que también se le conoce como forma neuronal (Bredt *et al.*, 1991). La isoenzima neuronal en humanos, está codificada en el cromosoma 12 y tiene un peso molecular de 155 kDa. Se expresa en distintos tipos de neuronas en el SNC, así como en terminales noradrenérgicas y colinérgicas que inervan al músculo liso y algunos otros tejidos (Kavya *et al.*, 2006). En el cerebro la SONn se encuentra acoplada a un subtipo de receptor para glutamato, N-Metil-D-aspartato (NMDA). La activación del receptor resulta en un influjo de iones de calcio y la activación de la SONn vía la unión del complejo Ca²⁺-CaM. La enzima fue

primeramente aislada como una proteína soluble, pero estudios recientes demostraron que existe una pequeña parte asociada a la membrana celular interna a través de un dominio específico en la región amino terminal (Grenwood *et al.*, 1997). Posteriormente se identificó que la SONn consta de el dominio PDZ (postsynaptic density protein-95 (PSD-95)/Discs large Zo-1), el cual es responsable de la interacción con otras proteínas que también contienen el dominio PDZ, este dominio es el pivote en el anclaje de la proteína SONn al NMDAr, en virtud de lo cual la proteína SONn se encuentra unida a la membrana y a otros compartimentos citoplásmicos (Jelen *et al.*, 2003).

4.4.1.2. Sintasa del Óxido Nítrico inducible.

La SONi es una proteína citosólica con un peso molecular de 130 kDa y es codificada por el cromosoma 17 en humanos, usualmente la proteína no se encuentra presente en las células bajo condiciones fisiológicas normales, pero se expresa varias horas después de una estimulación de la célula por señales inflamatorias, como citocinas (Bloch *et al.*, 1995). La clave de la inducción en la expresión de la SONi parece ser la activación del factor de transcripción NFκB. Se tienen reportes que 2 horas después del estímulo existe un aumento en la cantidad de la enzima (Hemmens y Meyer, 1998). Una de las principales características bioquímicas de la SONi es su habilidad para unir CaM a concentraciones bajas de calcio (30nM). El calcio intracelular está normalmente por encima de este nivel, por esta razón la SONi es independiente de calcio y no es regulada por señales que induzcan un incremento en las concentraciones de calcio (Grenwood *et al.*, 1997). Esta enzima se describió inicialmente en macrófagos, pero ahora se sabe que está presente en múltiples tejidos como las células endoteliales, células de músculo liso, la microglia y en astrocitos. La SONi es elevada en el cerebro de EP (Hunot *et al.*, 1996).

4.4.1.3. Sintasa del Óxido Nítrico endotelial.

El gen de la SONE se encuentra solo como una copia haploide en el cromosoma 7 en humanos y tiene un peso molecular de 134 kDa (Kavya *et al.*, 2006), la cual se expresa fundamentalmente en las células endoteliales y requiere de la presencia

del complejo Ca^{2+} -CaM para activarse (Greenwood *et al.*, 1997). Al parecer la SONE está unida a la membrana celular interna y se ha localizado en el aparato de Golgi. Durante su maduración sufre modificaciones en la región amino terminal (miristilación y palmitoilación) que le permiten mantenerse unida a la membrana (Kavya *et al.*, 2006). Son poco conocidas las señales de regulación, pero se ha visto que la SONE se expresa constitutivamente al igual que la SONn. Varios factores extrínsecos y citocinas regulan la expresión de la SONE. $\text{TNF}\alpha$ regula a la baja, mientras que el $\text{IFN-}\alpha/\beta$ y el lipopolisacárido sobre regulan la expresión de la SONE, al igual que el estrógeno en células endoteliales humanas. También se sabe que tanto el estrés como el ejercicio crónico incrementan la expresión de la SONE (Kavya *et al.*, 2006). Agentes agonistas de receptores de las células que la contienen parecen modular su fosforilación, así como la unión de ácidos grasos acilados en el dominio amino terminal, que resultan en una translocación de la proteína y sus cambios en la actividad de sus propiedades bioquímicas (Greenwood *et al.*, 1997).

Estudios en cerebros *postmortem*, hallazgos clínicos y también evidencias a partir de modelos experimentales sugieren la participación del NO en la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en EP (Kavya *et al.*, 2006). Altos niveles de expresión de las diferentes isoformas de la SON han sido observados en la región nigroestriatal y ganglios basales de cerebros *postmortem* con EP (Hunot *et al.*, 1996). Asimismo, se ha determinado una intensa gliosis reactiva con la sobre expresión de la SONi en la *substantia nigra* de cerebros *postmortem* con la enfermedad de Parkinson (Youdim *et al.*, 1997). El sitio predominante de expresión de la SONi en humanos son los astrocitos más que en la microglia. Dicha inmunoreactividad astrogliar de la SONi es reportada a partir de cerebros *postmortem* de pacientes parkinsonianos (Hunot *et al.*, 1996). La determinación del incremento de nitratos en el líquido cefalorraquídeo de enfermos de Parkinson refleja un incremento en la formación de NO en el SNC, indicando una alteración en los niveles de L-arg y de L-cit en el líquido cefalorraquídeo de enfermos de Parkinson (Molina *et al.*, 1996). Un incremento significativo en el contenido de nitratos en leucocitos polimorfonucleares se han reportado a partir de enfermos de Parkinson en comparación a pacientes control. Subsecuentemente,

fue reportado un incremento de 10 veces en la expresión del RNAm de la SONn en 5 de 7 pacientes con EP (Kavya *et al.*, 2006).

Algunos tejidos son rutinariamente expuestos a altas concentraciones de NO más que a radicales del oxígeno. Además, algunas condiciones patológicas pueden estimular la forma inducible de la SON en algún tipo de tejido, lo cual amplifica la tasa de síntesis de NO hasta mil veces (Beckman *et al.*, 1994). La elevación de los niveles de NO, más la producción de $\cdot\text{O}_2^-$, reaccionan rápidamente para dar lugar a la formación de una especie química altamente reactiva, el anión peroxinitrito (ONOO^-) (Huie y Padjama, 1993). Macrófagos y neutrófilos activados pueden producir NO y $\cdot\text{O}_2^-$ a velocidades similares. Se ha demostrado que esencialmente todo el NO producido en macrófagos alveolares de rata, activados con ester de forbol es convertido a ONOO^- (Beckman *et al.*, 1994). El ONOO^- no es un radical libre a causa de que los electrones no apareados en el NO y en el $\cdot\text{O}_2^-$ se combinan para formar un enlace N—O y dar lugar al ONOO^- . Durante su descomposición a pH fisiológico, el peroxinitrito puede producir algunos de los oxidantes conocidos en sistemas biológicos, iniciando reacciones características de radical hidroxilo, ion nitronium y dióxido de nitrógeno. La inusual estabilidad del ONOO^- contribuye a su toxicidad, ya que le permite difundirse lejos de su sitio de formación. A nivel experimental los resultados son fuertemente influenciados por pH, particularmente en el rango neutral, así como de la composición del buffer, temperatura y catálisis con metales de transición. Los productos pueden incluir derivados nitrosilados (R—NO) y nitrados (R—NO^2) así como productos de oxidación más tradicionales (tales como residuos aromáticos hidroxilados). Es crítico reconocer que algunos de los productos formados después del ataque por ONOO^- son diferentes de aquellos productos que resultan a partir de un simple ataque por medio del radical hidroxilo (Beckman *et al.*, 1994).

El ONOO^- es considerado como un factor causante del daño neuronal dopaminérgico en la EP (Przedborski *et al.*, 1996). El ONOO^- es capaz de producir una reacción espontánea con los metales de transición de las metaloproteínas en los centros hierro-azufre de considerable número de enzimas (Molina *et al.*, 1996). El ONOO^- puede conducir a la oxidación de proteína, lípidos o DNA; un índice de formación de ONOO^- son los residuos de tirosina libre nitrada y elevadas proteínas

nitrosiladas (Good *et al.*, 1998). Es así que alteraciones en el estatus del NO han sido observadas para ser un importante indicador de daño en los pacientes de Parkinson (Kavya *et al.*, 2006).

4.5. Metales de Transición en la EP.

Existen reportes en la literatura que hacen evidentes ciertas alteraciones en el contenido de algunos metales de transición en los ganglios basales y en el LCR provenientes tanto del tejido de cerebros *postmortem* como de pacientes con EP, respectivamente. En primera instancia se ha reportado un incremento en el contenido de Cu en el LCR de pacientes con EP, lo cual fue identificado a partir de ensayos de espectrofotometría de absorción atómica, en donde los niveles en el contenido de Cu se encontró significativamente más alto en 24 pacientes evaluados con EP, en relación a los resultados arrojados por el grupo control (Pall *et al.*, 1987). Asimismo, la diferencia de la capacidad *in vitro* del Cu para dañar DNA, medido mediante el ensayo de fenantrolina-cobre, en donde los niveles del cromóforo (fenantrolina-Cu) cuantificado fluorimétricamente, fue mayor que el grupo control y la alta concentración de fenantrolina-Cu correlacionó con la enfermedad y con la tasa de progresión de la misma. Es así, que en base a estos resultados, este grupo señaló un potencial daño oxidativo del Cu, no obstante, indicaron que su ensayo acuoso estándar de fenantrolina-Cu tiene menor efecto oxidativo sobre el DNA que el Cu contenido en el LCR atribuyendo el efecto a algún otro componente en el LCR, el cual debe de estar coparticipando con el Cu para ejercer el efecto oxidativo ya mencionado. Este grupo sugirió que dicho componente puede ser el H₂O₂, el cual es esencial para la catálisis de degradación del DNA por fenantrolina-Cu, ya que la interacción del Cu con el H₂O₂, vía la química de Fenton, resulta en la producción del radical •OH. Sin embargo, este proceso *in vitro* no tiene ninguna relevancia dado que está interacción en el LCR no resultó clara en este trabajo. Dos años más tarde, se reportó un significativo incremento en los niveles totales de hierro en la SN, lo cual indica un factor de daño que podría ser la causa de la excesiva formación de ERO y que conduce a la muerte neuronal dopaminérgica en enfermos de Parkinson. Los niveles de Fe, Cu, Zn, Mn y Pb fueron evaluados y se encontró que el contenido

total de hierro de cerebros *postmortem* comparados con tejido control de la misma edad presentaron un incremento del 31-35% de Fe en la SN y un decremento del 29% del metal en el *globus pallidus* a partir de cerebros de enfermos de Parkinson. Ningún cambio fue encontrado en el contenido de hierro en ninguna otra área del cerebro (Dexter *et al.*, 1989). Los niveles de Cu en la SN de cerebros de enfermos de Parkinson presentaron una disminución del 34-45%, sin ninguna diferencia en otra región cerebral. En relación al Zn, los niveles se incrementaron en la SN de enfermos de Parkinson en 50-54% y también en 18-35% en el núcleo caudado y en el putamen lateral. En cuanto a los niveles de Mn y Pb no se encontraron cambios en las áreas de los cerebros parkinsonianos estudiados cuando fueron comparados con el control, excepto por un pequeño decremento del 20% en el contenido de Mn en el putamen (Dexter *et al.*, 1991). Así mismo, fueron medidos los niveles de Fe unidos a la ferritina por medio de radioinmunoensayo en donde existió una disminución generalizada de la inmureactividad cerebral de la ferritina, principalmente en la SN. En conclusión, se han reportado para la EP niveles de Fe total aumentados, disminución del contenido de ferritina, decremento en los niveles de Cu e incremento del Zn en la SN de enfermos de Parkinson. Posteriormente y con el objetivo de dilucidar si los cambios de Cu en suero son capaces de incrementar el riesgo en el desarrollo de la EP se midieron los niveles de Cu en suero de 39 pacientes con EP, en donde el respectivo cónyuge de cada uno de los pacientes fungió como control. Los niveles de Cu medidos por medio de espectrofotometría de absorción atómica fueron medidos sin encontrar diferencias significativas entre los dos grupos. Los niveles de Cu en suero y el cociente Cu/Cp correlacionó significativamente con la edad, pero no con la edad de inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad, ni con los estadios en la escala Hoen y Yahr, además dichos valores no correlacionaron con la edad del grupo control, en consecuencia, los autores consideran que los resultados de su estudio sugieren que el contenido de Cu en suero no juega ningún rol importante como factor de riesgo en la EP (Jiménez *et al.*, 1992). Años más tarde, este mismo grupo reportó los niveles de Fe, Cu, Mn y Zn de 37 pacientes con la EP, los cuales fueron comparados con 37 controles (a los que se les ensayó punción lumbar, por la sospecha de una hemorragia subaracnoidea o

bien de tumor cerebral, pero sin enfermedad neurodegenerativa alguna). Los resultados de este trabajo no revelaron diferencia significativa en los niveles de los metales de transición entre los enfermos de Parkinson y el grupo control (Jiménez *et al.*, 1998). Los valores de los diferentes metales determinados en LCR no correlacionaron con la edad, edad de inicio y duración de la enfermedad, con excepción en los niveles de Cu, los cuales sí correlacionaron con la duración de la enfermedad. Esto en primera instancia, revela que existe en la literatura resultados controversiales en relación a los niveles de Cu en LCR y de su papel potencial como un factor causante de daño oxidativo en la EP (Jiménez *et al.*, 1998). En este mismo año, otro grupo trabajo bajo la hipótesis de que la actividad ferroxidasa de la Cp dependiente de Cu se encuentra disminuida en el LCR de pacientes con enfermedad de Parkinson, se investigó el posible vínculo entre las disminuidas concentraciones de Cu reportadas previamente en tejido cerebral y el incremento del metal en el LCR de enfermos de Parkinson. El estudio de la evaluación del contenido de Cu medido por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito y de la actividad ferroxidasa en LCR medida por espectrofotometría UV/visible fue dirigido a 35 pacientes no tratados, 14 tratados con L-DOPA y 26 pacientes controles (Boll *et al.*, 1998). Los resultados revelaron una significativa reducción del 40% en la actividad ferroxidasa en LCR y disminución significativa en el contenido de Cu de pacientes no tratados en relación a los pacientes controles y a los tratados con L-DOPA y se encontró también que la fracción de Cu ligada a Cp en pacientes no tratados está inversamente relacionada al estadio clínico de la enfermedad. La reducida actividad ferroxidasa en pacientes no tratados puede relacionarse al incremento en los depósitos de hierro observado en los ganglios basales de sujetos con EP. El incremento en el Cu libre y en el Cu total en LCR puede explicarse por el decremento en la habilidad de las cuproproteínas para unir el metal, en particular a la Cp (Boll *et al.*, 1998). El reporte de la disminución en la relación Cu/ferroxidasa que correlaciona con la progresión de la enfermedad en este trabajo sugiere un incremento directo en la concentración de Cu no unido a Cp en LCR de pacientes no tratados, lo que indica la ya señalada disminución en la actividad ferroxidasa, la cual a su vez puede ser

la responsable de la formación del depósito de Fe en la SN de enfermos de Parkinson.

Más tarde, el incremento en el contenido de Fe, determinado a través de una medición planimétrica del área hiperecogénica evaluado por medio de sonografía del parénquima cerebral, es utilizado como una herramienta de diagnóstico clínico para pacientes con Parkinson idiopático y permite discriminar entre pacientes con Parkinson idiopático de aquellos con síndromes parkinsonianos atípicos, parálisis supranuclear progresiva y de aquellos con atrofia múltiple sistémica con una especificidad del 96% y una sensibilidad del 91% (Walter *et al.*, 2003). Es así que un número de investigaciones proveen evidencias de la contribución del Fe en la SN sobre la producción de estrés oxidativo, ya que la interacción del Fe con el H_2O_2 y con la neuromelanina de esta región modifican de forma reversible el estado redox del hierro entre su estado reducido y oxidado (Fe^{2+} y Fe^{3+} , respectivamente), con la resultante formación del radical $\bullet OH$ y la resultante inducción de peroxidación lipídica (Gerlach *et al.*, 1994). Sin embargo, la pregunta de que si el incremento en los niveles de Fe de la SN en la EP es la causa primera de la neurodegeneración en un subgrupo de casos con la EP o si la acumulación de Fe ocurre como un epifenómeno de la enfermedad permanece aun sin contestar.

Recientemente, se han reportado mutaciones y polimorfismos de genes codificando para proteínas involucradas en el metabolismo del Fe, las cuales han sido ligadas a desórdenes en los ganglios basales, en individuos afectados que presentan un cuadro clínico típico de EP (Berg *et al.*, 1991), en quienes también se detectaron variaciones en la secuencia de la Cp. Asimismo, 176 pacientes con EP y 180 sujetos controles, de quienes se examinaron previamente los cambios en la señal hiperecogénica para el Fe en la SN a través de sonografía del parénquima cerebral, fueron examinados por posibles mutaciones en el gen de la Cp, detectándose cinco nuevas variaciones sin sentido en la secuencia de la Cp. Una de estas, I63T, se encontró solo en un paciente. Una variación conocida (D554E) fue asociada significativamente con EP y con un incremento en la señal hiperecogénica para niveles de Fe en la SN. Además, una tercera variación en la secuencia fue identificada (R793H), la cual segrega con la señal de ultrasonido

para niveles de Fe incrementados en pacientes y en sujetos control. Indicando que la detección de variaciones en la secuencia en un solo paciente con EP o bien si está asociado con un marcador de ultrasonido para niveles de Fe incrementados en la SN, así como la presencia de inmuoreactividad de la Cp en los cuerpos de Lewy subrayan un papel sospechoso de la Cp en la patogénesis de la EP (Hochstrasser *et al.*, 2004). Más adelante, fue estudiado el efecto de estas mutaciones sin sentido en la biosíntesis de la holo-Cp en experimentos hechos en cultivos celulares. En donde se encontró una relevancia funcional para las mutaciones I63T y D544E de la Cp (Hochstrasser *et al.*, 2005). *In vivo*, a partir del suero de un paciente heteroalélico que presentaba la variante I63T se encontraron tan solo la mitad de la concentración normal para la Cp y una reducida actividad ferroxidasa. En cultivos celulares, la isoforma de la Cp I63T ligada a glicosilfosfatidilinositol se retuvo en el retículo endoplásmico de células de riñón de embrión humano. Asimismo, el polimorfismo D544E resultó en una significativa reducción en los niveles de la Cp en suero así como una reducida actividad ferroxidasa y se identificó un significativo incremento en la expresión de apo-Cp.

Estos estudios indican que la actividad ferroxidasa de la Cp alterada puede ser un factor de vulnerabilidad para estrés oxidativo inducido por hierro en la EP (Hochstrasser *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la expresión del gen de la Cp se presenta en células gliales que rodean a neuronas específicas de la SN y de otros tejidos en los ganglios basales. La observación de que la Cp es expresada en el SNC y que su alteración afecta la homeostasis del Fe en los ganglios basales es consistente con la deficiencia heredada de esta proteína definida como aceruloplasminemia (Harris *et al.*, 1995), lo que sugiere un rol directo de la ausencia de esta proteína, ya que es asociada tanto con la disminución de la actividad ferroxidasa, acumulación del Fe cerebral y en la degeneración de los ganglios basales (Harris *et al.*, 1998).

Asimismo, se sustenta la idea de que la enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo asociado a metales, pues se ha reportado que los niveles de Cu^{2+} sustancialmente más bajos, son efectivos en acelerar la agregación de α -sinucleína, en donde el Cu promueve la nucleación pero no la fase de crecimiento de la agregación neurofibrilar, sugiriendo que la α -sinucleína

unida a Cu es más propensa a promover la nucleación que la proteína no unida (Rasia *et al.*, 2005). En este caso, la metalobiología del Cu permanece en discusión por el análisis comparativo con otras proteínas que usan Cu y que están involucradas en desordenes neurodegenerativos.

4.6. α -Sinucleína.

En la EP la pérdida de las células dopaminérgicas es asociada con la presencia de inclusiones intraneuronales eosinofílicas compuestas de neurofilamentos y ubiquitina llamados cuerpos de Lewy (Tetriakoff, 1919). La presencia de los cuerpos de Lewy no está restringida a el SNC, ya que también son observados en el SNP de pacientes parkinsónicos y en otros desordenes degenerativos, tal como la enfermedad de cuerpos de Lewy y ELA (Blum *et al.*, 2001). Protofibrillas de α -sinucleína inician la formación de las inclusiones dando lugar a los cuerpos de Lewy, en donde posteriormente se van uniendo otros componentes del sistema de degradación proteosomal. La α -sinucleína es una proteína fosforilada que se encuentra en las neuronas, siendo más abundante en la zona presináptica. La zona amino terminal, con repeticiones de hasta seis veces de un motivo estructural, es en donde se han localizado las variantes familiares de la enfermedad. La zona carboxilo terminal puede existir en forma glicosilada y es denominada como α -Sp22. Esta proteína puede formar fibrillas o protofibrillas y su sobreexpresión en *Drosophila* produce la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en las moscas de edad avanzada y pierden paralelamente su capacidad de volar (Masliah y Hashimoto, 2002). La α -sinucleína en su forma glicosilada es sustrato para la parkina, que la acopla a la ubiquitina para ser degradada. Por el contrario, la forma no glicosilada de la α -sinucleína es funcional. De forma general, las proteínas estructurales glicosiladas en el citoplasma son indicativas de vejes en la estructura proteica. En la EP, la α -sinucleína aparece en los cuerpos de Lewy preferentemente sin glicosilar en la zona interna. La α -sinucleína es codificada por el gen park1, este gen se encuentra localizado en el cromosoma 4, se transmite de forma autosómica dominante, con aparición temprana de los síntomas y desarrollo rápido de la enfermedad (Obeso *et al.*, 2002).

Evidencia acumulada implica a la α -sinucleína en la EP, en donde se han identificado mutaciones puntuales, duplicación y triplicación del locus en las formas familiares. La abundancia de la α -sinucleína en los cuerpos de Lewy y la neurodegeneración resulta del incremento en la expresión de la α -sinucleína en múltiples modelos animales (Masliah y Hashimoto, 2002). La expresión de α -sinucleína en células de levadura resulta en una toxicidad dosis-dependiente. Varios factores de esta toxicidad incluyen producción de ERO, peroxidación de lípidos y defectos en el tráfico vesicular, los cuales son reminiscencias de toxicidad por α -sinucleína (Outeiro y Lindquist, 2003).

5. MODELO EXPERIMENTAL DE LA EP.

5.1. Modelo experimental de la EP por MPTP.

En 1979 un grupo de jóvenes californianos adictos a un derivado fentanil sintético desarrolló un parkinsonismo irreversible, positivo a L-DOPA (Davis *et al.*, 1979). El análisis de esta droga sintética indicó que contenía alrededor del 3% de MPTP (Langston *et al.*, 1983). La identificación de esta toxina neuronal específica, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), ha sido reportada por reproducir virtualmente todos los cambios clásicos conductuales, cognitivos, bioquímicos e histológicos que ocurren en la EP tanto en humanos (Davis *et al.*, 1979) como en primates no humanos (Langston *et al.*, 1983). En consecuencia, se ha considerado al MPTP como una poderosa droga que induce degeneración nigral en animales y ha sido mostrada para inducir síntomas tipo Parkinson en varias especies animales incluyendo ratas, ratones, perros, gatos y primates no humanos (Blum *et al.*, 2001). Algunos estudios han demostrado que los roedores, especialmente los ratones de la cepa C57/Black, son los más susceptibles al efecto neurotóxico del MPTP y son los que mejor reproducen las principales características bioquímicas de la EP, siendo útiles como modelo animal en esta enfermedad (Heikkila *et al.*, 1984). Los efectos neurotóxicos del MPTP se deben a que esta molécula es altamente lipofílica y capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. El MPTP es biotransformado en los astrocitos por la enzima MAO-B, dando lugar al metabolito activo, el ion 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) (Kopin, 1992).

5.2. Modelo experimental de la EP por MPP⁺.

El MPP⁺ es una molécula polar y a diferencia de su precursor éste no puede cruzar libremente las membranas celulares, por lo que depende de acarreadores presentes en la membrana plasmática. El MPP⁺ presenta una alta afinidad por el transportador de DA en la terminal presináptica de las neuronas dopaminérgicas. El MPP⁺ puede ser secuestrado por los transportadores vesiculares de monoaminas y almacenado dentro de las vesículas sinápticas, además es capaz de interactuar y ser acumulado por la neuromelanina, retrasando en ambos casos su efecto neurotóxico (Kopin, 1992), finalmente el MPP⁺ libre en el citoplasma entra en la mitocondria por un mecanismo dependiente de energía (Blum *et al.*, 2001). El potencial neurotóxico del MPP⁺ se basa en su capacidad para inhibir al Complejo I de la CTEM y dar lugar a sobreproducción de radicales libres (Siegel *et al.*, 1999). Por otra parte, también se han reportado alteraciones en el Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial y daño directo al DNA (Buu, 1993). La alteración en la CTEM altera la fosforilación oxidativa dando lugar a disminución en los niveles de ATP (Blum *et al.*, 2001), lo cual, en turno puede conducir a la despolarización neuronal parcial, activación de receptores NMDA dependientes de voltaje y a la muerte neuronal excitotóxica (Ikonomidou y Turski, 1996)

5.2.1. Radicales Libres por MPP⁺.

La activación de los receptores NMDA da lugar a la entrada de Ca²⁺ en el interior celular estimulando la actividad de la SON dependiente de Ca²⁺, el cual se une a calmodulina formando un complejo que actúa como cofactor de la SONc (Bredt y Snyder, 1990). La sobreproducción de NO[•], a partir de la SON, en presencia del radical [•]O₂⁻ conduce a la formación, como ya se ha mencionado, de una especie química altamente reactiva, el peroxinitrito ONOO⁻ (Przedborski *et al.*, 1996); así, la inhibición específica de la isoforma neuronal de la SON por 7-Nitroindazol protege en contra de la neurotoxicidad inducida por el MPTP en ratones (Schulz *et al.*, 1995). Así mismo, la neurotoxina administrada a ratones de la cepa C57/Black da lugar a daño selectivo por nitración del centro catalítico de la TH (Ara *et al.*, 1998) y una disminución significativa en los niveles de DA. La TH es un blanco

para la nitración de residuos de tirosina inducida por ONOO^- (figura 5). La nitración de un residuo de tirosina en el centro catalítico de esta enzima es suficiente para alterar su actividad catalítica (Ara *et al.*, 1998).

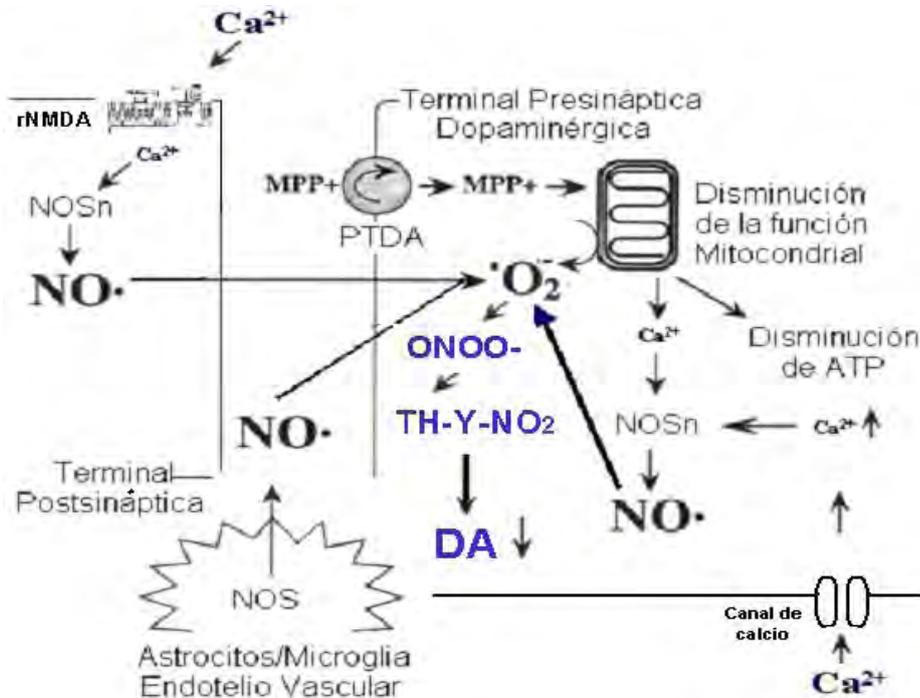


Figura 5. Esquema del daño neuronal dopaminérgico inducido por MPP^+ en el CE de la rata. El MPP^+ es transportado al interior de la terminal presináptica por medio del transportador de DA (PTDA). El MPP^+ inhibe proteínas de la CTEM en la mitocondria interfiriendo con la síntesis de ATP e induciendo una sobreproducción del radical $^{\bullet}\text{O}_2$. El incremento de Ca^{2+} activa a la NOSn dando lugar a una sobreproducción de NO^{\bullet} que en su reacción con $^{\bullet}\text{O}_2$ produce ONOO^- , el cual da lugar a una reacción espontánea con el Fe^{2+} del centro catalítico de la TH, lo cual resulta en la nitración del residuo 423 de tirosina y la concomitante inactivación de la proteína. La inactivación de la TH por ONOO^- reduce el contenido de DA. Modificado a partir de Przedborski *et al.*, 1995.

La inactivación de la TH comienza con la reacción espontánea del metal del centro catalítico (Fe^{2+}) con el ONOO^- y la resultante nitración del residuo 423 de tirosina, siendo además modificados por nitración, pero en menor grado, los residuos de tirosina 428 y 432 (Blanchard-Fillion *et al.*, 2001), la nitración de cualquiera de estos residuos de tirosina es suficiente para la inactivación de la proteína. El ONOO^- es considerado como un factor causante del daño neuronal dopaminérgico en la EP (Przedborski *et al.*, 1996). Un índice de formación de ONOO^- tanto en el modelo con MPP^+ de la EP como en la EP, son los residuos de nitrotirosina libre y elevado nivel de proteínas nitradas (Good *et al.*, 1998). El decline en el nivel de

DA se ha considerado que surge solamente a partir de la severa pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *SNpc* que proyectan sus aferencias hacia el CE (Ara *et al.*, 1998). Sin embargo, el déficit de DA en las regiones afectadas excede significativamente la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Pakkenberg *et al.*, 1991) sugiriendo que la síntesis de DA es disminuida antes de la muerte celular (Ara *et al.*, 1998), lo cual es demostrado por medio de la administración sistémica de MPTP en *Macaca fascicularis*, que dio lugar a la identificación del tiempo umbral de aparición de los síntomas parkinsonianos, en donde dicha conducta correlaciona con la disminución en el contenido de DA, no así con la inmunoreactividad para la TH ni con el grado de muerte neuronal dopaminérgica (Bezard *et al.*, 2001). La nitración de la TH, que da lugar a la inactivación de la enzima, después de la administración de MPTP, no se presenta en ratones transgénicos que sobreexpresan la enzima SOD-Cu,Zn; soportando así, un rol crítico para la formación del radical $\cdot\text{O}_2^-$ en la nitración de residuos de tirosina (Ara *et al.*, 1998). Asimismo, el efecto neurodegenerativo del MPP⁺ en el CE de ratones C57/Black, da lugar a un incremento en la formación de productos lipídicos fluorescentes, lo cual está íntimamente asociado con la sobreproducción de radicales libres (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001). Por otra parte, la inflamación cerebral inducida por medio de la inyección intracerebroventricular de lipopolisacárido incrementa el daño estriatal inducido por la administración intraestriatal de MPP⁺ en la rata (Goralski y Renton, 2004).

5.3. Cambio en el contenido de metales de transición por MPP⁺.

En cuanto a el efecto del MPP⁺ sobre el contenido de algunos metales de transición, se ha reportado que la administración sistémica de MPTP da lugar a una disminución significativa en los niveles de cobre y manganeso, tanto en el CE como en el meencéfalo de ratones C57/Black (Ríos *et al.*, 1995). Asimismo, se ha reportado un incremento en los niveles de hierro libre y de desferrioxamina en la *SNpc* de *M. fascicularis* a causa de la administración sistémica de MPTP (Mochizuki *et al.*, 1994), este efecto del MPTP ha sido contrarrestado por medio de la administración de un quelante de hierro. El MPTP también incrementa la expresión del receptor a transferrina y el transportador para lactoferrina (Blum *et*

al., 2001). Por el contrario, recientemente, se ha reportado el efecto neuroprotector de la administración del CuSO₄ contra la neurotoxicidad del MPP⁺ en ratones C57/Black, al bloquear la lipoperoxidación estriatal y preservar los niveles de DA en esta región cerebral. El efecto del CuSO₄ sugiere que su función puede estar relacionada con mecanismos de activación o síntesis de enzimas cobre-dependientes responsables de la defensa celular en contra del MPP⁺ (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001). Además, el análisis de la participación de la SOD, en la neuroprotección ejercida por el CuSO₄ contra la neurotoxicidad del MPP⁺, revela que el tratamiento con cobre a ratones C57/Black da lugar a un incremento de hasta siete veces en la actividad de la SOD manganeso-dependiente, puede ser la responsable de la neuroprotección en contra del daño por MPP⁺ (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001a).

5.4. MODELO DE LA EP POR 6-OHDA.

La 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) es una de las toxinas más utilizadas experimentalmente en modelos de degeneración nigral *in vitro* como *in vivo*. La 6-OHDA es un análogo hidroxilado del neurotransmisor DA. La 6-OHDA no atraviesa la barrera hematoencefálica. La generación de una lesión neuronal central solo puede ser activada después de la administración intracerebral (inyección intracisternal, intraventricular o directamente dentro del parénquima cerebral). En modelos experimentales de la EP la 6-OHDA es inyectada preferencialmente dentro del CE, la SN o en el paquete axonal mesencefálico ascendente, destruyendo las células dopaminérgicas nigrales y disminuyendo el contenido de DA en el CE, reproduciendo de esta forma las características responsables de las alteraciones del movimiento en la EP (Blum *et al.*, 2001).

Interesantemente, existen algunas evidencias de que la 6-OHDA puede ser considerada como una neurotoxina endógena (Maruyama, 1999). De hecho, varios estudios han reportado la presencia de 6-OHDA tanto en rata y en cerebro de humano, así como de pacientes con EP tratados con L-DOPA (Andrew *et al.*, 1993). Como ya se ha comentado, las neuronas dopaminérgicas nigrales contienen niveles elevados de DA, H₂O₂ y Fe libre. Una reacción no enzimática de

estos elementos posiblemente conduzca a la formación de 6-OHDA (Jellinger *et al.*, 1995).

Se ha sugerido que la 6-OHDA induce lesión dopaminérgica estriatal vía la sobre producción H_2O_2 y radicales $\cdot OH$ derivado. Lo cual es explicado por el efecto protector que ejercen los antioxidantes en contra de la toxicidad de 6-OHDA (Blum *et al.*, 2000). La generación de ERO puede incrementarse a partir de dos mecanismos denominados como deaminación por medio de la acción de MAO o auto-oxidación, la cual es iniciada y/o amplificada por fierro en la reacción de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + \cdot OH + Fe^{3+}$).

Se ha sugerido que la especificidad de 6-OHDA hacia las células catecolaminérgicas se debe a que esta es capturada por medio del transportadores específicos, lo cual está basado en la analogía estructural de la 6-OHDA con la DA y la noradrenalina. Además, la acumulación específica de esta toxina en las células catecolaminérgicas y el efecto de los inhibidores de la recaptura de catecolaminas en contra de la acción neurotoxica de la 6-OHDA indican en conjunto la especificidad de la molécula. Sin embargo, estas evidencias son cuestionadas por el hecho de que esta toxina no requiere entrar al interior de la célula para ejercer su efecto dañino (Blum *et al.*, 2001). En cultivos de células mesencefálicas, la toxicidad de 6-OHDA no es selectiva de neuronas dopaminérgicas (Lotharius *et al.*, 1999). Asimismo, se ha reportado que varias líneas celulares carentes de transportadores para catecolaminas son dañadas por 6-OHDA. El uso de potentes bloqueadores del transportador para catecolaminas como disipramina, imipramina y cocaína no previenen la citotoxicidad de 6-OHDA (Abad *et al.*, 1995).

Por otra parte, la toxicidad de 6-OHDA en contra de células de neuroblastoma SY5Y no fueron acompañados por una reducción en la producción de ATP, reducción en el cociente ATP/ADP y reducción del contenido celular de NAD^+ (Storch *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la inhibición de la respiración mitocondrial no es el principal mecanismo subyacente a la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA. Sin embargo, esta toxina induce un colapso en el potencial de membrana mitocondrial dependiente de ERO (Lotharius *et al.*, 1999), lo cual también puede conducir a defectos en la vesiculación de la DA,

incrementándose los niveles intracitoplásmicos de DA, lo que incrementa la formación de H_2O_2 mediante la auto-oxidación de la DA, eventos que en conjunto producen la muerte neuronal.

Existe una gran variedad de modelos de degeneración neuronal dopaminérgica además de los que ya se han citado en este apartado aunque con menor especificidad, sin embargo han sido útiles para el estudio de los trastornos presentes en los enfermos de Parkinson. Estos han sido desarrollados tanto en cultivos celulares como en animales. Dichos modelos han sido generados a partir de cierta manipulación genética o farmacológica. A grandes rasgos, entre los modelos producidos por medio de estrategias moleculares se encuentran los cultivos de células híbridas "cybrids", construidas a partir de células de neuroblastoma (SH-SY5Y) carentes de DNA mitocondrial pero con DNA mitocondrial proveniente de plaquetas de pacientes con EP, el cual da lugar a células con actividad del Complejo I de la CTEM disminuida, reproduciendo los principales trastornos metabólicos presentes en la EP. Otro tipo de manipulación genética ha dado lugar a un modelo animal de la EP por medio de la sobreexpresión de la α -sinucleína lo cual da lugar a la formación de cuerpos de Lewi. Asimismo, se ha generado otro modelo a partir de la sobreexpresión de la parkina (PARK2), ambos produciendo además de trastornos metabólicos una sobre producción de radicales libres.

En cuanto a los modelos farmacológicos, además de los modelos de la EP inducidos por MPP⁺ y 6-OHDA se han desarrollado algunos otros, entre los que se cuenta con el inducido por la microinyección nigral de Fe^{2+} , capaz de generar alteraciones neuroquímicas, histológicas y conductuales. Otro modelo más ha sido aquel generado a partir de la administración de reserpina, un inhibidor del transportador vesicular de monoaminas, el cual disminuye el contenido de DA. Otros modelos se han desarrollado al utilizar anfetamina y algunos análogos como la metanfetamina, moléculas capaces de inhibir el transporte de DA y una reducción en la neurotransmisión dopaminérgica así como la muerte neuronal. También existen modelos generados mediante el uso de pesticidas como el paraquat, capaz de inhibir el complejo I de la CTEM, u otros por medio del uso de CO_2 , cianuro, Mn y DA, los cuales son capaces de sobre producir radicales libre.

6. IMPORTANCIA DEL COBRE EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.

El cobre es el elemento número 29 y el primero del grupo IB de la Tabla periódica, exhibe cuatro estados de oxidación: Cobre metálico (Cu^0), ion cuproso (Cu^{1+}), ion cuprico (Cu^{2+}) y ion de cobre trivalente (Cu^{3+}). La configuración electrónica de la forma metálica (Cu^0) es $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4p^1$. Los estados de oxidación común son la forma Cu^{1+} ($3d^{10}$) o la forma Cu^{2+} ($3d^9$). La química del Cu, especialmente en sistemas biológicos, es profundamente afectada por el estado electrónico de oxidación. El fácil recambio entre los estados de oxidación pone a éste elemento con propiedades redox las cuales pueden ser de naturaleza esencial o deletérea para los sistemas biológicos. El Cu está presente en la naturaleza en una gran variedad de sales minerales y compuestos orgánicos y en forma metálica (Cotton y Wilkinson, 1989). El estado de oxidación más importante en la naturaleza y ambientes acuosos es el Cu^{2+} . Cualquier ion Cu^{1+} presente en el medio es rápidamente oxidado por cualquier agente oxidante o estabilizado por la formación de complejos. Los iones Cu^{2+} se unen preferencialmente vía el oxígeno a ligandos inorgánicos tales como el H_2O , OH^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , etc. y a ligandos orgánicos vía grupos fenólicos y carboxílicos. Así, al menos todo el cobre en muestras naturales es acomplejado con compuestos orgánicos. Algunos componentes cúpricos y complejos son solubles en agua y tienen un característico color agua-azul-verde (Cotton y Wilkinson, 1989).

6.1. Metabolismo del Cobre.

La homeostasis del cobre obedece al doble carácter del elemento, esencial y tóxico. El carácter esencial se deriva de su incorporación específica a un gran número de proteínas con actividad catalítica y estructural. En los mamíferos se conservan las rutas celulares de absorción, incorporación a las proteínas y de exportación del cobre, siendo al parecer reguladas por el propio metal (Linder y Hazegh-Azam, 1996). El cobre se absorbe fundamentalmente a través del tracto gastrointestinal, lo cual probablemente ocurre primeramente en el duodeno. Se absorbe del 40% al 60% del cobre procedente de los alimentos, mientras que el resto se excreta a través de las heces, este proceso puede ser perturbado por

otros factores nutricionales, tales como alta captura de zinc, hierro o ácido ascórbico. Una vez que el metal ha atravesado la membrana basolateral, pasa al fluido intersticial y es transportado, unido a la albúmina en el plasma sanguíneo, hasta el hígado (Linder *et al.*, 1998).

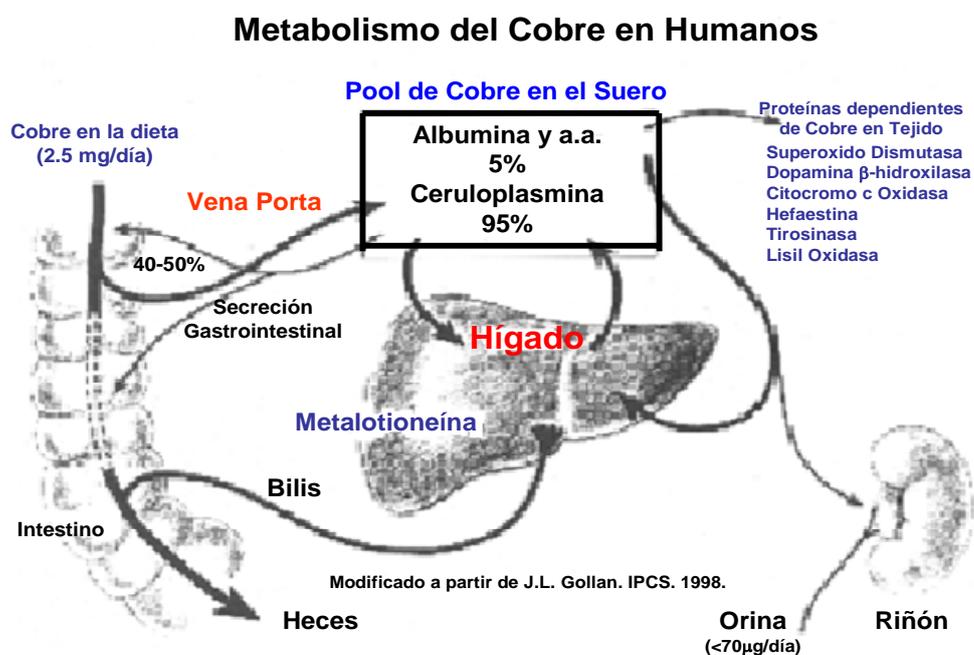


Figura 6. Metabolismo del Cu en humanos. El Cu a partir de la dieta es absorbido en el intestino y transportado principalmente al hígado, el cual representa el principal órgano en la homeostasis del metal. Modificada a partir de J. L. Gollan (IPCS, 1998).

El hígado es el órgano fundamental para la homeostasis del cobre. El proceso de distribución del cobre puede ser dividido en tres fases: La primera es el transporte que va a los hepatocitos y en menor proporción a los riñones, la segunda se presenta en los hepatocitos al incorporar el cobre dentro de algunas proteínas y por último el transporte del cobre al resto de los tejidos (Sternlieb, 1990). Es así que este metal se reparte entre la excreción a través de la bilis y la incorporación a proteínas intracelulares y extracelulares. El transporte del cobre hasta los tejidos periféricos se realiza a través del plasma, unido a la albúmina, a la Cp, transcureína o bien en complejos de bajo peso molecular. Finalmente, la mayor parte del cobre llevado de regreso nuevamente al hígado, sin embargo no se sabe

que es lo que pasa con claridad (figura 6). Probablemente la Cp, la albúmina y la transcurreína están involucradas en este proceso (Linder *et al.*, 1998).

A nivel intracelular, el cobre en los mamíferos es transportado dentro de la célula por el transportador Ctr1, una proteína multimérica, saturable de alta afinidad que actúa como una permeasa específica para metal (Schlief y Gitlin, 2006), Ctr1 entrega el cobre dentro de la célula y una vez internalizado el metal se une rápidamente a proteínas chaperonas intracelulares (Petris *et al.*, 2003). La entrega del cobre a sus cuproenzimas blanco depende de un elegante sistema de las metalochaperonas, por ejemplo, Atox1 entrega el cobre en la vía secretoria y ahí se ancla tanto con la ATPasa transportadora de cobre ATP7B en el hígado y ATP7A en otras células, a través de una interacción proteína-proteína, insertando el cobre dentro del sitio activo de la cuproenzima o proteína transportadora (Figura 7). Atox1 interactúa con ATP7B en el hepatocito y también es requerida para la excreción biliar del exceso de cobre, en concierto con la chaperona Murr1, la ausencia de Murr1 se haya ligada a la toxicosis de cobre canina, Atox1 también participa en la entrega de cobre para la síntesis de holo-Cp plasmática (Prohaska and Gybina, 2004). En adición a su actividad de chaperona, se sabe que Atox1 se encuentra expresada en altos niveles en las neuronas y pueden proteger a la neurona a partir del estrés oxidativo (Kelner *et al.*, 2000). ATP7A no es expresada en hepatocitos, pero es importante en neuronas y astrocitos, así cuando las células son expuestas a un incremento en los niveles de cobre ATP7A mueve el cobre desde el transgolgi hacia la membrana plasmática para el eflujo de cobre. En otros tejidos ATP7A dirige el acoplamiento del cobre a partir de la red transgolgi a las proteínas dopamina β -monooxigenasa, peptidilglicina α -amidantín monooxigenasa, lisil oxidasa, tirosinasa y hefaestina, dependiendo del tipo celular (Prohaska and Gybina, 2004). La chaperona de cobre para la SOD-Cu,Zn recluta cobre en el citoplasma en donde interactúa formando un heterodimero con SOD-Cu,Zn para facilitar la transferencia de cobre, la carencia de esta chaperona disminuye la actividad SOD-Cu,Zn (Field *et al.*, 2002). Asimismo, esta chaperona recluta cobre hasta el espacio intermitocondrial (Prohaska and Gybina, 2004). Del mismo modo Cox17 que se encuentra tanto en el citoplasma como en el espacio intermembranal en la mitocondria. Esta chaperona es requerida para el

funcionamiento de la citocromo c oxidasa, esta chaperona entrega el cobre en la mitocondria en donde llega hasta la citocromo c oxidasa vía las chaperonas Cox11, Sco1 y Sco2 que actúan en el espacio intermembranal en la mitocondria (Carr and Winge, 2003). También pueden existir otras chaperonas que recluten cobre hacia las metaloproteínas (Prohaska and Gybina, 2004).

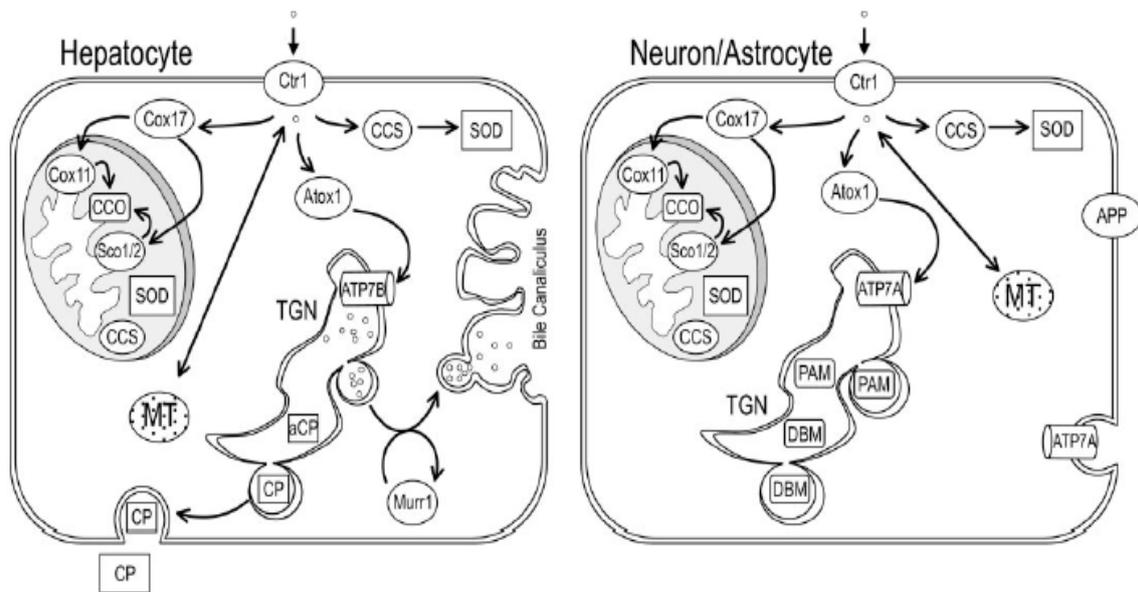


Figura 7. El Cu presenta una fina regulación intracelular a través de mecanismos de transporte y almacenamiento, la cual es llevada a cabo por proteínas chaperonas y proteínas de almacenamiento. El Cu es distribuido e incorporado a proteínas Cu-dependientes por medio de elegantes mecanismos de acoplamiento proteína-proteína. Tomado de Prohaska J. and Gybina A. (2004) J Nutr. 134:1003-1006.

6.2. Efecto del cobre en animales de experimentación.

La toxicidad de una dosis oral única de cobre varía enormemente entre las especies (dosis letal 50 (DL₅₀) de 15-1664 mg de Cu/kg de peso corporal). Las sales más solubles de cobre (sulfato de cobre (II) y cloruro de cobre (II)) son generalmente más tóxicas que las menos solubles (hidróxido de Cu²⁺ y óxido de Cu²⁺) (IPCS, 1998). La muerte aparece tras la aparición de hemorragia gástrica, taquicardia, hipotensión, crisis hemolítica, convulsiones y parálisis. Se han reportado valores de la DL₅₀ de exposición cutánea >1124 y >2058 mg de Cu/kg de peso corporal en ratas y conejos, respectivamente. La DL₅₀ por inhalación (tiempo de exposición no especificado) fue mayor a 1303 mg de Cu/kg de peso corporal en conejos y en los cobayos expuestos a concentraciones de 1.3 mg de

Cu/m³ observándose insuficiencia respiratoria durante una hora (IPCS, 1998). Las ratas que recibieron 305 mg de Cu/kg al día por vía oral con los alimentos en forma de sulfato de cobre (CuSO₄) durante 15 días mostraron alteraciones de la bioquímica sanguínea y datos hematológicos (particularmente anemia), efectos secundarios en el hígado, riñón y en los pulmones (Hébert *et al.*, 1993). Los efectos fueron cualitativamente semejantes a los de otros compuestos de cobre y en otras especies. La dosis sin efectos observados fue de 23 mg de Cu/kg de peso corporal al día (Hébert *et al.*, 1993). Sin embargo, las ovejas son particularmente sensibles, y dosis repetidas de 1.5-7.5 mg de Cu/kg de peso corporal al día en forma de sulfato de cobre o acetato de cobre producen lesiones hepáticas, crisis hemolítica y por último la muerte (IPCS, 1998). La exposición prolongada de ratas y ratones no pone de manifiesto signos evidentes de toxicidad, salvo una reducción del crecimiento relacionada con la dosis tras la ingestión de 138 mg de Cu/kg de peso corporal al día en ratas y 1000 mg de Cu/kg de peso corporal al día en ratones (Hébert *et al.*, 1993). La dosis sin efectos adversos observados fue de 17 mg de Cu/kg de peso corporal al día en ratas y de 44 y 126 mg de Cu/kg de peso corporal al día en ratones machos y hembras, respectivamente; presentando tan solo inflamación del hígado y degeneración del epitelio tubular del riñón (Hébert *et al.*, 1993).

Los estudios de toxicidad en etapa reproductiva y durante el desarrollo son limitados. Se ha observado cierta degeneración testicular y una reducción del peso corporal y de los órganos al nacer en ratones tratadas con dosis superiores a 27 mg de Cu/kg de peso corporal al día durante períodos prolongados de tiempo y efectos fetotóxicos y malformaciones con concentraciones altas (>80 mg de Cu/kg de peso corporal al día) (Lecyk, 1980). El sulfato de cobre no fue mutagénico en valoraciones realizadas en bacterias (Marzin y Phi, 1985). Sin embargo, se ha observado un aumento, relacionado con la dosis, en la síntesis de ADN no programado en hepatocitos de rata. Asimismo, por medio de un ensayo de micronúcleo, un estudio ha puesto de manifiesto un aumento significativo de fracturas cromosómicas con la dosis intravenosa más alta (1.7 mg de Cu/kg de peso corporal al día) (Agarwal *et al.*, 1990) pero en otro estudio realizado con dosis intravenosa de hasta 5.1 mg de Cu/kg de peso corporal al día no se observó

ningún efecto en la rata (Tinwell y Ashby, 1990). Los estudios de neurotoxicidad no han puesto de manifiesto efectos en el comportamiento, pero se han notificado cambios neuroquímicos tras la administración oral de 20-40 mg de Cu/kg de peso corporal al día. En un número limitado de estudios de inmunotoxicidad se ha observado un trastorno de la función inmunitaria humoral y mediada por células en ratones después de la ingesta oral con agua de bebida de 10 mg de Cu/kg de peso corporal al día (IPCS, 1998).

Por otra parte, otros estudios muestran que la restricción de cobre en la dieta de animales de experimentación desarrolla una ausencia de holo-Cp circulante y son incapaces de liberar hierro del tejido al plasma (Harris *et al.*, 1998). El cobre en animales administrados con dietilditiocarbamato, un agente quelante de cobre, incrementa la susceptibilidad al daño oxidativo y muerte neuronal causado por el MPTP (Miller *et al.*, 1991). Por esta razón, la carencia de cobre puede conducir a una desventaja para las neuronas en su defensa en contra del estrés oxidante (Hartmann y Evenson, 1992).

6.3. Efectos del cobre en humanos.

Tal como ya se ha comentado el cobre es un elemento esencial y hay efectos perjudiciales para la salud relacionados tanto con su deficiencia como con su exceso. La deficiencia de cobre está asociada con anemia, neutropenia y anomalías óseas, pero la deficiencia clínicamente manifiesta es relativamente poco frecuente en el humano (Williams, 1983). Se han reportado efectos a partir de una exposición única tras la ingestión oral con fines suicidas o accidentales consistentes con sabor metálico, dolor epigástrico, dolor de cabeza, náuseas, desvanecimiento, vómito y diarrea, taquicardia, dificultad respiratoria, anemia hemolítica, hematuria, hemorragia gastrointestinal masiva, insuficiencia hepática, renal y eventualmente la muerte (Jantsch *et al.*, 1985). También se han observado efectos gastrointestinales por ingestión única o repetida de agua de bebida con altas concentraciones de cobre y se ha presentado insuficiencia hepática tras la ingestión crónica (Knobeloch *et al.*, 1994; O'Donohue *et al.*, 1993). La exposición cutánea no se ha asociado con la toxicidad sistémica, pero el cobre puede inducir respuestas alérgicas en personas sensibles (Hackel *et al.*, 1991). Existen reportes

de casos de fiebre en los fundidores debido a la inhalación de elevadas concentraciones de el aire en el ambiente de trabajo y aunque se han atribuido otros efectos respiratorios a la exposición o mezclas que contenían cobre (por ejemplo: caldos bórdeles, extracción y fundición), no se ha demostrado tal efecto para cobre (Armstrong *et al.*, 1983). Los trabajadores aparentemente expuestos a concentraciones elevadas en el aire, que dan lugar a una ingesta estimada de 200 mg de Cu/día mostraron signos que parecían indicar una intoxicación por cobre (por ejemplo, concentraciones elevadas de cobre en el suero y hepatomegalia) (Suciu *et al.*, 1981). Se han descrito varios grupos en los cuales los trastornos aparentes de la homeostasis del cobre producen una sensibilidad mayor al déficit o al exceso de cobre en la población general. La cirrosis infantil india y la toxicosis idiopática por cobre son enfermedades relacionadas con el exceso de cobre que pueden estar asociadas con una sensibilidad al cobre de base genética, aunque esto no se ha demostrado de manera inequívoca (Sethi *et al.*, 1993; Gormally *et al.*, 1994). Otros grupos potencialmente sensibles al exceso de cobre son los pacientes sometidos a hemodiálisis y aquellas personas con enfermedades hepáticas crónicas. Los grupos con riesgo de deficiencia de cobre incluyen a los niños pequeños (en particular los recién nacidos de bajo peso al nacer-prematuros, aquellos niños que se están recuperando de una malnutrición y los niños alimentados exclusivamente con leche de vaca), personas con síndrome de mala absorción (por ejemplo enfermos con enfermedad celíaca y fibrosis quística) y los pacientes totalmente dependientes de una nutrición parenteral (International Programme on Chemical Safety, 1998).

6.4. Ingesta de cobre en humanos.

Para las personas sanas no expuestas ocupacionalmente al cobre o no expuestas a alguna otra fuente, la vía principal de exposición es la oral. La ingesta diaria media con los alimentos oscila en las personas adultas entre 0.9 y 2.2 mg (Trumbo *et al.*, 2001). En la mayoría de los estudios se ha encontrado que los valores de la ingesta se sitúan en el extremo inferior del intervalo. La variación refleja los diferentes hábitos alimentarios, así como las distintas prácticas agrícolas y la preparación de alimentos utilizadas en todo el mundo (Muller *et al.*, 1996). En

algunos casos, el agua potable puede contribuir a un aumento importante del valor total de la ingesta diaria de cobre, sobre todo en hogares con aguas corrosivas y tuberías de cobre. En los hogares sin tuberías de cobre o con aguas no corrosivas, la ingesta de cobre a partir del agua potable raramente supera 0.1 mg/día, aunque puede haber valores superiores a unos pocos mg al día a causa de la distribución de agua corrosiva a través de tuberías de cobre. En general la ingesta diaria de cobre por vía oral (alimentos más agua potable) oscila entre 1 y 2 mg/día, aunque ocasionalmente puede alcanzar un valor superior a 5 mg/día (Scheinberg y Sternlieb, 1994). Las restante ingesta de cobre (inhalación y cutánea) son insignificantes en comparación con la vía oral. La inhalación añade 0.3-2.0 $\mu\text{g}/\text{día}$ procedente del polvo y del humo (Drummond *et al.*, 1986). Las mujeres que utilizan DIU están expuestas sólo a 80 μg o menos de cobre al día a partir de esta fuente (Kjaer *et al.*, 1993).

6.5. El Cobre en Enfermedades Neurodegenerativas

El Cu es un micronutriente que juega un rol crítico en la bioquímica de todos los organismos aeróbicos (Culotta y Gitlin, 1999). Éste actúa como el grupo prostético de varias proteínas antioxidantes y su deficiencia está asociada con varias enfermedades neurológicas (Prohaska, 1997). El cobre es requerido para la actividad catalítica de enzimas que juegan un papel importante en enfermedades neurodegenerativas (Culotta y Gitlin, 1999), incluyendo como ya se ha comentado a la tirosinasa para la síntesis de melanina, citocromo c oxidasa (Complejo IV) de la CTEM, en la defensa antioxidante por medio de la actividad de la enzima superóxido dismutasa-Cu,Zn (SOD-Cu,Zn), en la actividad de la dopamina β -hidroxilasa para la síntesis de catecolaminas y en la Cp para la homeostasis cerebral del hierro (Waggoner *et al.*, 1999).

6.5.1. Enfermedad Alzheimer

En el caso de la enfermedad de Alzheimer (EA) están involucrados varios factores. Este desorden se caracteriza por demencia senil, un progresivo decline de las funciones cognitivas y pérdida de la memoria (Kelley y Petersen, 2007). La EA se caracteriza por la presencia de placas seniles, formadas principalmente por el

péptido beta amiloide (β A) de localización extracelular y también por las denominadas marañas neurofibrilares, una alterada colocación intracelular de la proteína Tau (Jellinger y Bancher, 1998). Las evidencias a partir de estudios genéticos y bioquímicos apoyan la idea de que la acumulación de los agregados insolubles de β A constituye uno de los principales componentes en la patogénesis de la enfermedad y de sus subsecuentes eventos (Eckman y Eckman, 2007). Un creciente cuerpo de evidencias ha sido publicado en relación al papel de los metales en la EA, especialmente en relación a metales con actividad redox, sugiriendo que los metales pueden estar involucrados en la mayoría de los eventos que subyacen a la patogénesis y a la progresión de esta alteración neurológica. A pesar de que los metales de transición han sido involucrados en el funcionamiento del sistema de defensa antioxidante intracelular, dichos metales también han sido asociados a estrés oxidativo, tanto por sí mismo o a través de modificaciones en las proteínas (Rivera-Mancía *et al.*, 2009). La asociación entre β A y metales de transición tales como el hierro y el cobre pueden conducir a la generación de H_2O_2 exacerbando el daño oxidativo (Huang *et al.*, 1999). El cobre es implicado en el procesamiento alterado de la proteína precursora amiloide (APP) y en la subsiguiente agregación de la β A (Barnham *et al.*, 2004), ya que altas concentraciones de este metal han sido encontradas en las placas amiloides (Lovell *et al.*, 1998); esto puede ser considerado que las β As involucrados en la patogénesis de la EA muestran una alta afinidad por Cu. El cobre unido a la placa β A posiblemente promueve la toxicidad de β A por medio de la formación de H_2O_2 y la subsiguiente generación de radicales libres a través de la reacción de Fenton (Huang *et al.*, 1999). Este efecto puede involucrar la reducción del ion cuprico por β A, ocurriendo consecuentemente una cascada de eventos relacionados a estrés oxidativo y la muerte neuronal subsiguiente (Rivera-Mancía *et al.*, 2009), lo cual correlaciona con reportes previos que indican que la β A inhibe el complejo citocromo c oxidasa de la CTEM, esta inhibición se incrementa en la presencia de iones cobre, requiriendo aproximadamente 0.75 moles del metal por mol del polipéptido para poder inhibir a la citocromo c oxidasa y para promover la agregación del péptido (Crouch *et al.*, 2005).

6.5.2. Enfermedad de Huntington

En la enfermedad de Huntington (EH), desorden neurodegenerativo hereditario autosómico predominantemente caracterizado por deterioro motor, cognitivo y psiquiátrico progresivo, causado por la expansión del trinucleótido repetido CAG, que se localiza dentro del primer exón del gen que codifica para la proteína huntingtina (Fox *et al.*, 2007). El repetido CAG produce una larga secuencia de poliglutamina lo que le da una conformación inusual, lo cual se hipotetiza produce la toxicidad celular, sospechándose además que la agregación de la huntingtina forma cuerpos de inclusión con otras proteínas (Grünewald y Beal, 1999). La muerte neuronal y la atrofia cerebral en pacientes con EH ocurre principalmente en el núcleo caudado y en el putamen, aunque también puede presentarse en otras regiones tales como la corteza, tálamo, globo pálido y cerebelo (Rivera-Mancía *et al.*, 2009). En estos pacientes se ha encontrado tanto decremento como incremento en los niveles cerebrales de cobre en relación a pacientes controles (Fox *et al.*, 2007). Recientemente, se ha reportado que las concentraciones de cobre libre en el LCR están asociados con el estadio clínico y el tiempo después del inicio de la enfermedad (Boll *et al.*, 2008). Consistente con la interacción entre el cobre y la βA (Huang *et al.*, 1999), Fox *et al.*, en el año 2007 encontraron que este metal promueve la agregación de la huntingtina e interactúa con residuos de histidina en la región amino terminal de la proteína. Asimismo, este grupo propone que la disminuida actividad lactato deshidrogenasa en enfermos de Huntington es debido, al menos en parte, a la inhibición enzimática mediada por el cobre conduciendo posiblemente a la neurodegeneración (Fox *et al.*, 2007).

6.5.3. Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), es una enfermedad neurodegenerativa de origen etiológico desconocido, manifestándose clínicamente por debilidad muscular progresiva, fatiga de los músculos afectados con signos piramidales y caracterizada por la progresiva pérdida de neuronas motoras de las astas anteriores en la médula espinal, bulbo y corteza (Siciliano *et al.*, 2007). Aunque en la mayoría de los casos como ya se menciona la etiología de la enfermedad es desconocida, aproximadamente 10% de los casos de ELA es familiar y de estos

cerca del 20% son debidos a una herencia autosomal dominante, presentando mutaciones en el gen que codifica para la proteína citosólica SOD-Cu,Zn (Rosen *et al.*, 1993). La enzima homodimerica SOD-Cu,Zn es altamente conservada, contiene un átomo de cobre y uno de zinc por subunidad. Esta enzima cataliza la dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ a H_2O_2 vía la reducción y la oxidación del ion de cobre unido (Fridovich, 1995). Aunque la patofisiología de la degeneración neuronal en la ELA no es clara, algunas evidencias implican incremento en la actividad generadora de radicales libres asociada con el cobre unido a la SOD-Cu,Zn mutante (Beckman *et al.*, 1993). La presencia de elevados niveles de nitrotirosina en los estadios tempranos de la fisiopatología celular así como la acumulación de la SOD formando agregados dentro de las neuronas motoras sugieren que las propiedades aberrantes de esta enzima resulta en la enfermedad por interrupción del transporte axonal (Bruijn *et al.*, 1998). Dado que la SOD contiene Cu y Zn, los niveles alterados de estos metales han sido asociados a la patología de la ELA. En pacientes con este desorden, se han reportado niveles de Cu en el LCR y en el suero, presentando bajos niveles en relación al control (Boll *et al.* 2008). Los cambios en el contenido de Cu en la médula espinal pueden ser explicados, al menos en parte, por la regulación a la baja del gen *atp7b*, el cual codifica para la ATPasa transportadora de cobre en ratones transgénicos SOD-Cu,Zn (Olsen *et al.*, 2001). Los niveles alterados de Cu y Zn puede ser la consecuencia de cambios estructurales en la SOD. La herencia autosomal dominante de la SOD-Cu,Zn puede ser dividida en dos grupos de acuerdo al contenido de su metal (Hayward *et al.*, 2002) y de la posición específica de la mutación. Un creciente cuerpo de evidencias sugieren que la estabilidad de la SOD-Cu,Zn depende de su estado de unión al metal. Algunas hipótesis sostienen que el balance entre el funcionamiento normal y el toxico de la SOD-Cu,Zn depende de la unión del Zn en el sitio activo de la enzima (Martyshkin *et al.*, 2003); modelos experimentales han mostrado que en ausencia de Zn, la reacción normal catalítica de la SOD-Cu,Zn corre a la inversa y produce ERO (Estévez *et al.*, 1999). La SOD-Cu,Zn que ha sido oxidativamente inactivada por la reacción con H_2O_2 pierde su afinidad por Cu y consecuentemente la proteína es más propensa a agregarse que la proteína no dañada (Goto *et al.*, 1998), sugiriendo que la ganancia en la función toxica de la

SOD-Cu,Zn en la ELA puede estar relacionada a la inhabilidad para activar o para mantener el estado de la proteína asociada al metal (Banci *et al.*, 2007).

6.5.4. Enfermedad de Menkes

La enfermedad de Menkes, es un desorden recesivo heredado ligado al cromosoma X, dando lugar a factores clínicos pleiotropicos, incluyendo pelo peculiar, problemas en el desarrollo y severa neurodegeneración cerebelar en la infancia temprana. El gen de la enfermedad de Menkes codifica para un miembro de una familia de proteínas ATPasa tipo-P transportadoras de cationes (Menkes, 1997). La pérdida de la función de la proteína en individuos afectados resulta en la falla del transporte de cobre a través de la placenta, tracto gastrointestinal y barrera hematoencefálica y una resultante deficiencia en el desarrollo del feto. Estos hallazgos clínicos y patológicos están presentes en el nacimiento, revelando que el cobre es esencial para el crecimiento prenatal y del desarrollo del SNC. Los factores clínicos de esta enfermedad surgen a partir de la deficiente actividad de cuproenzimas esenciales tales como la lisil oxidasa, la cual forma parte del tejido conectivo y da anormalidades. Mientras que la mayoría de los síntomas y de los signos pueden ser explicados por la pérdida de la actividad de la Cp, citocromo c oxidasa, dopamina β -hidroxilasa, peptidilglicina α -amidatin oxigenasa, SOD-Cu,Zn y tirosinasa, los mecanismos que participan en la degeneración cerebral y cerebelar permanecen desconocidos implicando la existencia de aún más cuproenzimas no identificadas, las cuales juegan un papel esencial en el crecimiento neuronal y en la diferenciación en el desarrollo del feto humano (Waggoner *et al.*, 1999).

6.5.5. Enfermedad de Wilson

Asimismo, la enfermedad de Wilson, desorden autosomal recesivo caracterizado por cirrosis hepática y degeneración neuronal, debido a una marcada alteración en la excreción biliar del cobre. En esta enfermedad la acumulación del cobre en los ganglios basales resulta en degeneración cavitaria, gliosis y pérdida neuronal, lo cual es responsable de los factores neurológicos en donde se incluyen síntomas parkinsónicos, temblor y distonía. La alteración psiquiátrica es también un factor

prominente de la enfermedad de Wilson y puede incluir conducta anormal, cambios de la personalidad, depresión y esquizofrenia (Akil *et al.*, 1991). Los mecanismos por los cuales la acumulación de cobre cerebral conduce a estos síntomas psiquiátricos permanecen desconocidos pero son de interés a causa de la prevalencia de tales síntomas en la población general. El gen responsable de la enfermedad de Wilson codifica para una ATPasa transportadora de cationes tipo-P, con un 55% de identidad en la secuencia de amino ácidos al gen de la enfermedad de Menkes (Tanzi *et al.*, 1993), la alteración de la función de la ATPasa resulta en la acumulación del cobre en el citoplasma de los hepatocitos con una resultante necrosis celular y fuga del cobre al plasma. Este exceso del cobre es tomado por tejido extrahepático, incluyendo los ganglios basales y el limbo de la cornea en donde el metal es visible como los anillos de la enfermedad de Kayser-Fleischer (Waggoner *et al.*, 1999).

6.5.6. Aceruloplasmina

Por otra parte, se sabe que la Cp es una abundante proteína del suero, la cual contiene el 95% de cobre presente en el plasma sanguíneo. Esta proteína, como ya sabemos es una ferroxidasa la cual utiliza el cobre para oxidar al hierro por medio de un simple paso. La Cp es sintetizada como una holoproteína con seis átomos de cobre incorporados durante su biosíntesis (Sato y Gitlin, 1991). La disponibilidad del cobre no afecta la velocidad de síntesis o la secreción de la apoceruloplasmina, sin embargo éste metal es crítico para la estabilidad de la proteína y cualquier deficiencia en la incorporación de cobre durante la biosíntesis resulta en la secreción de una apoproteína inestable, la cual es rápidamente degradada en el plasma (Harris *et al.*, 1998). Animales deficientes de cobre sugieren que la Cp juega un rol crítico en la movilización del hierro desde el parénquima, así como la oxidación del hierro previo a su incorporación dentro de la transferrina en el plasma (Gitlin, 1998). El soporte para la Cp como una ferroxidasa esencial viene de estudios a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, en donde se demostró que la alta afinidad en la captura del hierro en estos organismos es dependiente de la Fet3, una oxidasa multicobre homóloga a la Cp (Askwith *et al.*, 1994). Recientemente, el papel de la Cp en el transporte del hierro

en mamíferos ha sido confirmada por la caracterización de la anemia ligada al sexo en ratones, en donde se reveló la presencia de una segunda oxidasa multicobre denominada hephaestina, la cual presumiblemente juega una función de ferroxidasa crítica para el transporte de hierro en el intestino (Vulpe *et al.*, 1999).

La ausencia de Cp del suero, denominado como aceruloplasminemia, es consistente con una marcada acumulación del hierro en el parénquima cerebral en asociación con diabetes, degeneración de la retina y alteración de los ganglios basales (Morita *et al.*, 1995). El análisis de la concentración de Cp en el suero de los miembros de una familia afectada reveló la variedad hereditaria autosomal recesiva, y estudios de genética molecular identificaron mutaciones heredadas específicas en el gen de la Cp (Harris *et al.*, 1995). Los síntomas clínicos predominantes en pacientes con aceruloplasminemia son neurológicos e incluye distonía, disartría y demencia subcortical como resultado de la progresiva degeneración de los ganglios basales. Resultados de resonancia magnética de imagen revelaron un incremento en el contenido de hierro en los ganglios basales y el tejido cerebral reveló acumulación abundante de hierro en la microglía y en neuronas, así como una selectiva pérdida neuronal (Morita *et al.*, 1995). Esta implicación única del SNC distingue a la aceruloplasminemia de otras enfermedades relacionadas con la pérdida de la homeostasis del hierro y sugiere que la Cp dependiente de cobre, juega un papel esencial en el metabolismo cerebral del hierro.

6.5.7. Enfermedad de Parkinson

A pesar de que ya hemos comentado en este trabajo acerca de los primeros reportes relacionados con las alteraciones en el contenido de los metales de transición en el tejido cerebral y en el LCR de enfermos de Parkinson, es conveniente en este apartado hacer mención acerca de algunos reportes relacionados a factores medioambientales que han sido implicados con la enfermedad (Barlow *et al.*, 2007; Jankovic, 2005). La exposición ocupacional a metales de transición, especialmente a Fe y Cu, ha sido propuesta como un riesgo para el desarrollo de la EP (Gorell *et al.*, 2004). Varios estudios apoyan el papel de la acumulación cerebral de los metales de transición en la fisiopatología de la EP,

lo cual puede ser independiente de la exposición medioambiental, sugiriendo que el control de la homeostasis de los metales es alterado en la EP. Un análisis multivariado demuestra que la exposición ocupacional tanto a Pb como a Cu durante 20 años o más incrementa significativamente el riesgo para contraer la EP, sin embargo, la exposición a Cu solo y la EP no alcanzan significancia estadística (Gorell *et al.*, 2004). Así, la exposición a Cu permanece para ser determinada en su asociación con la EP tal por estar dependiendo de la exposición simultánea con otros factores de riesgo. Por lo contrario, la deficiencia de Cu puede conducir a disfunción nigroestriatal, dado que las ratas con dietas deficientes de Cu durante la gestación y la lactancia muestran un contenido reducido de DA estriatal (Sun y O'Dell, 1992) en donde el potencial neurotóxico de la acumulación de Fe ha sido consistentemente reportado, mientras que en el caso del Cu, tal como ya se ha comentado, no es concluyente.

En el presente trabajo se ha descrito que la EP, además de estar asociada con una serie de cambios neuropatológicos y metabólicos, ésta ha sido reportada como una alteración neurodegenerativa asociada a metales. Dicha alteración neuroquímica da lugar a una sobreproducción de radicales libres, lo cual reduce la neurotransmisión dopaminérgica aún antes de que se presente la muerte neuronal. Esta alteración ha sido explicada tanto en cerebros *postmortem* de EP como en modelos experimentales mediante la identificación tanto de residuos de tirosina libre nitrados como por la presencia de proteínas nitrosiladas. Asimismo, la administración de MPP⁺, el metabolito activo de la neurotoxina inductora de Parkinson MPTP, ha demostrado reproducir las principales características bioquímicas de la EP. La administración sistémica de MPTP en primates da lugar a un incremento significativo en el contenido de Fe en la SN y a la expresión fenotípica de la enfermedad. Asimismo, el MPTP disminuye el contenido de Cu y Mn en tejido estriatal de ratones C57/Black, lo cual puede deberse a una disminución en la expresión de transportadores de metales divalentes. También, hemos comentado que la administración de MPP⁺ induce la inactivación por nitración de la TH, a causa de la reacción del ONOO⁻ con el Fe²⁺ del centro catalítico de la enzima, dando lugar preferencialmente a la nitración del residuo de tirosina 423.

Por otra parte, el Cu, un micronutriente esencial que juega un papel crítico en la bioquímica de los organismos, actúa como grupo prostético de varias proteínas que participan en el metabolismo y en la respuesta antioxidante. Este metal recientemente ha sido evaluado tanto en modelos experimentales de la EP como en modelos de la EH. La administración de Cu ha demostrado efectos benéficos en contra de las alteraciones inducidas por el MPP⁺. No obstante, aún no ha sido esclarecido con precisión el mecanismo de acción por medio del cual el Cu contrarresta el efecto neurotóxico de la toxina.

7. HIPÓTESIS

El cobre puede disminuir tanto la nitración de la TH como el daño oxidativo inducido por la infusión de MPP⁺ en el CE de la rata inhibiendo la sobreproducción de NO e incrementando la actividad de proteínas dependientes de cobre.

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del cobre en la protección del daño inducido por el MPP⁺ en el cuerpo estriado de la rata y el mecanismo bioquímico asociado.

8.1. Objetivos particulares.

Determinar el efecto de la administración CuSO₄ sobre la disminución de la actividad enzimática de la TH, su nivel de nitración y la disminución en el contenido de DA inducidos por la microinyección estereotaxica de MPP⁺ en el CE de la rata.

Determinar el efecto de la administración CuSO₄ en contra del incremento en la producción de NO a partir del aumento en la actividad de SON inducido por la infusión de MPP⁺ en el CE de la rata.

Caracterizar el mecanismo de acción del CuSO₄ en contra del daño oxidante inducido por MPP⁺ en el CE de la rata a través de la posible participación de enzimas cobre-dependientes involucradas en la respuesta antioxidante y su efecto sobre el contenido de GSH.

9. MÉTODO.

Animales, pretratamiento de CuSO₄ ó Na₂SO₄ y administración de MPP⁺.

Todos los ensayos experimentales se llevaron a cabo con ratas Wistar macho de 250 a 280 g. La exposición de los animales a Na₂SO₄ (grupo control) ó CuSO₄ se realizó por medio de la administración *intra peritoneal* (i.p.) de 10 mMol/kg de cada una de las sales. Después de 24 y 16 horas los animales se sometieron a una microinyección *intra estriatal* (i.e.) extereotaxica de 10 µg de MPP⁺ disueltos en 8 µL de solución salina (de acuerdo al atlas estereotaxico de Watson y Paxinos, 1998), con coordenadas extereotaxicas en relación a Bregma de: 0.5 mm anterior, -3.0 mm lateral y -4.5 mm ventral a la dura. Seis horas después los animales se sacrificaron por decapitación, el cerebro fue removido y el cuerpo estriado disecado sobre hielo (Glowinski and Iversen, 1966) conservándose brevemente en congelación a -70° C hasta su análisis.

Determinación de los niveles de Dopamina Estriatal por HPLC. La medición del contenido de DA estriatal se hizo por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a detección electroquímica (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001). Seis horas después de la lesión con MPP⁺ el cuerpo estriado fue disecado y posteriormente sonicado en una solución (1:10 w/v) de metabisulfito de sodio 1 M. El homogenizado se centrifugó a 4,000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante fue analizado por HPLC (columna Alltech 100 x 4.5 mm), bomba Perkin-Elmer LC-250, detector electroquímico Metrohm (mod. 641-VA) y un integrador Hewlett-Packard 3396-II. Los datos son colectados y procesados por interpolación en la curva estándar construida previamente para DA. Los resultados son expresados como µg de DA por gramo de tejido húmedo.

Determinación de la Actividad Tirosina Hidroxilasa. La actividad TH estriatal fue evaluada por la medición de la acumulación de L-DOPA después de la administración sistémica de m-hidroxibenzilhidrazina dihidrocloride (NSD1015, Sigam-Aldrich, Steinheim, Austria) un inhibidor centralmente activo de la L-DOPA descarboxilasa (DDC) (Gutierrez-Reyes y Ríos, 1998). Treinta minutos previos a

que los animales fueran sacrificados se les administro por vía sistémica 100 mg/kg de 3-hidroxibenzilhidrazina. Enseguida el cerebro fue removido y el cuerpo estriado disecado sobre hielo, el cual se homogenizo en una solución (1:10 w/v) de metabisulfito de sodio-ácido perclórico (1 M, 0.1% w/v). El homogenizado fue centrifugado a 4,000 x g durante 10 min. y el contenido de L-DOPA en el sobrenadante fue analizado por HPLC (columna Alltech 100 x 4.5 mm), bomba Perkin-Elmer LC-250, detector electroquímico Metrohm (mod. 641-VA) y un integrador Hewlett-Packard 3396-II. La curva de calibración se construyo para L-DOPA y la concentración de las muestras fue determinada por interpolación en la curva estándar. Los resultados son expresados como μg de L-DOPA por gramo de tejido húmedo.

Detección de Tirosina Hidroxilasa y de NO₂-Y-TH por Western Blot. El cuerpo estriado se homogenizo en un sistema vidrio-teflón, 6-7X, 3 segundos en frío, en 250 μL de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 0.1 mM de EDTA, 0.1 mM de EGTA, 0.1% de β -mercaptoetanol a pH 7.5) más un cocktail de inhibidores de proteasas (100 μM de leupeptina, 1mM de fenilmetilsulfonil fluoride, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de inhibidor de tripsina soybean y 0.1% v/v de Nonidet P-40). El contenido de proteínas se cuantifico por el método de Lowry *et al.* Volúmenes correspondientes a 50 μg de proteína se mezclaron con volúmenes equivalentes de buffer de muestra, los cuales se cargaron en cada uno de los pozos y se separaron por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) en presencia de un marcador de peso molecular de 5-250 kDa (Precision Plus Protein, Dual Color Standards. Cat. No. 161-0374. Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron en una membrana PVDF (Amersham Biosciences), la cual fue bloqueada en una solución PBS con leche en polvo libre de grasas al 5% y Tween 20 al 0.05%. En seguida la membrana se incubo durante toda la noche a 4°C con un Ab específico anti-nitrotirosina (Zymed, San Francisco, Cal. U.S.A. Cat. 32.1900) (NO₂-Y) en dilución 1:1000. Posteriormente, la membrana se incubo durante 1.5 hrs. con un Ab-sec de cabra anti-IgG de ratón (1:2000) en PBS (Secondary antibody. Lab. Zymed. Cat. 62-6620) conjugado a peroxidasa de rábano. Después las bandas inmunoreactivas en la membrana se incubaron con un substrato químiolumincente

(Luminol reagent. Cat. sc-2048. Santa Cruz. CA 95060 USA), y se visualizaron por exposición en una placa fotográfica (Kodak Biomax Light Film). En la mayoría de los casos las membranas se desnudaron y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-TH (1:2000) (Monoclonal Mause anti-Tirosina Hidroxilasa. Lab. Zymed Cat. No. 32-2100) en PBS durante toda la noche. Así mismo, las membranas fueron desafiadas con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina en una dilución final de 1:300 durante toda la noche. En ambos casos las membranas fueron después incubadas durante 1.5 hrs. a temperatura ambiente con un Ab-sec de cabra anti-IgG de ratón (1:2000) conjugado a peroxidasa de rábano en PBS. Las imágenes conseguidas en las placas fueron digitalizadas y el análisis densitométrico se realizó usando el programa Imagej (Versión 1.34s by SONY). Los resultados densitométricos del nivel de nitración de la TH se normalizó a partir del nivel de expresión de la TH y los resultados obtenidos de la TH fueron normalizados en relación a la señal de la β -actina. Los resultados son presentados en unidades arbitrarias de densidad óptica.

Detección de tres isoformas de la Sintasa del Oxido Nítrico (SON) por Western blot. 50 microgramos de proteína a partir de cada grupo fueron utilizados para el análisis de las tres isoformas de la SON. La inmunodetección fue realizada usando anticuerpos primarios específicos en contra de cada una de las isoformas de la SON: Anticuerpo monoclonal de ratón anti-SON neuronal (Santa Cruz Biotechnology, 1:500); anticuerpo policlonal de conejo anti-SON inducible (Santa Cruz Biotechnology, 1:300); y anticuerpo anti-SON endotelial (Santa Cruz Biotechnology, 1:300). Los híbridos fueron visualizados utilizando un sustrato quimioluminiscente (Perkin-Elmer, Boston, MA), realizándose enseguida el análisis densitométrico.

Actividad de la Sintasa del Oxido Nítrico. El tejido fue homogenizado bajo el esquema antes descrito. Se toman alícuotas y se cuantifica el contenido total de proteína por el método de Lowry *et al.* La actividad de la SON se midió en base a la conversión de la L-Arginina a NO y L-Citrulina (Pérez-Severiano, *et al.*, 2002). Volúmenes conteniendo 500 μ g de proteína se incubaron durante 30 min. a 37° C

en presencia de 10 μM de L-Arginina-HCl, 1 mM de NADPH, 100 nM de cadmodulina, 30 μM de BH_4 , 2.5 mM de CaCl_2 y 0.2 μCi de L-Arginina $^{[3]\text{H}}$ (Amersham) en un volumen máximo para cada reacción de 100 μL . Las reacciones fueron frenadas en frío por la adición de 1 ml de buffer conteniendo 2 mM de EGTA, 2 mM de EDTA, 20 mM de HEPES a pH 5.5. Para evaluar la actividad de la SON inducible la mezcla de reacción se realizó en presencia de EGTA sin la adición de CaCl_2 . La mezcla de reacción fue introducida en una columna de resina de intercambio catiónico (Dowes-50W) que fue previamente equilibrada por el flujo de 1 ml de buffer de paro a través de la misma. Esta columna retiene la L-Arginina $^{[3]\text{H}}$ y permite que la L-Citrulina $^{[3]\text{H}}$ fluya a través de la columna. Las cantidades de L-Citrulina marcada se miden usando un contador de centelleo Beckman LS6500. Los resultados son expresados en ng de L-Citrulina producidos en 500 μg de proteína durante 30 minutos.

Actividad Ferroxidasa. La actividad ferroxidasa de la Cp fue determinada a partir de la estrategia experimental reportada por Boll *et al* 2008. El tejido estriatal y el tejido mesencefálico fue disecado a los 30 min., 2, 4, 8, 12,16 y 24 h, cuidadosamente pesado, homogenizado en buffer de acetatos (1:12, w/v) y centrifugado a 3000 x g durante 5 min. Después de 5 min de incubación a 30° C fueron adicionados 400 μL de sulfato de amonio ferroso 0.01 M e incubado durante 5 min más a la misma temperatura. La mezcla de reacción fue frenada por la adición de 0.8 ml de ácido perclórico 1.25 M. En seguida las muestras fueron centrifugadas 3,000 x g durante 5 min y 1 ml del sobrenadante fue colectado y adicionado con un ml de una solución de tiocianato de sodio 0.5 M. La formación del complejo tiocianato-Fe(III) fue monitoreado a 450 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-6. Los resultados son expresados como μmol de tiocianato-Fe(III) por min por ml.

Peroxidación Lipídica. El ensayo de formación de productos lipofluorescentes fue monitoreado en el cuerpo estriado de la rata usando la técnica descrita por Santamaría *et al* en el 2003. Las muestras de tejido estriatal fueron homogenizadas en 2.2 ml de solución salina. Alícuotas de un ml por duplicado del

homogenizado fueron adicionadas con 4 ml de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v), enseguida, en tubos a cubierto de la luz, la mezcla fue agitada vigorosamente durante 10 seg. y conservada en hielo durante 30 min. para permitir la separación de la fases. La fase acuosa (sobrenadante) fue desechada y 2 ml de la fase cloroformica fue transferida a una celda de cuarzo y adicionada con 200 μ L de metanol. La fluorescencia fue medida en un espectrofotómetro de luminiscencia LS50B Perkin-Elmer a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro fue ajustada a 140 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina (100 μ g/1 ml) preparado en una solución de ácido sulfúrico 0.05 M previo a la medición de las muestras. Los resultados son expresados como unidades de fluorescencia por μ g de proteína.

Actividad Superoxido Dismutasa (SOD). La actividad SOD fue ensayada en muestras de tejido estriatal por el método Xantina/Xantina Oxidasa (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001a). El tejido estriatal fue homogenizado en un buffer que consiste de 20 mM de bicarbonato de sodio, 0.02% de triton X-100, pH 10.2. Así, 50 μ L fueron vertidos en 2.85 ml de la mezcla de reacción consistiendo de 10 μ M de azida de sodio, 100 μ M de xantina, 10 μ L de citocromo C reducido, y 1 mM de EDTA en 20 mM de bicarbonato de sodio, 0.02% de triton X-100, pH 10.2. El ensayo de actividad SOD total fue realizado al incubar la mezcla durante 5 min a 37° C, siendo iniciado por la adición de 50 μ L de una solución de xantina oxidasa en EDTA 0.1 mM. Así mismo, 50 μ L de una solución de 5 mM de cianuro de sodio fue adicionado para inhibir selectivamente la actividad de la SOD-Cu/Zn, en consecuencia la reacción en la mezcla reflejó la actividad SOD-Mn. La diferencia de la actividad SOD total y la actividad SOD-Mn revelo los resultados de la actividad SOD-Cu/Zn. Los ensayos fueron monitoreados cada 30 seg. durante 5 min tomando en cuenta las diferentes lecturas en la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Lambda 20 Perkin-Elmer. Los resultados son expresados como Unidades Internacionales de Actividad SOD por μ g de proteína.

Determinación de Glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG). El contenido de GSH y GSSG fue cuantificado conforme a Pérez-Severiano *et al* 2004. En

breve, el tejido estriatal se homogenizo en 1200 μL de FEDTA (fosfato de sodio monobásico 0.1 M y EDTA 0.005 M) más 320 μL de H_3PO_4 al 25%. Enseguida 1 ml del homogenado se centrifugo a 4,000 x g durante 30 min a 4° C y 250 μL del sobrenadante por duplicado fueron mezclados con 2250 μL de FEDTA y agitado vigorosamente durante 5 seg. Se tomaron 600 μL de la mezcla y se añadieron 1300 μL de FEDTA más 100 μL de orto-ftalaldehído (OPT), se mezcló y se dejo reposar a temperatura ambiente durante 15 min exactamente. La fluorescencia fue medida en un espectrómetro de luminiscencia (LS50B Perkin-Elmer) a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. La concentración de GSH en las muestras fue determinada por interpolación en la curva estándar y expresados como μg de GSH por gramo de tejido húmedo. Así mismo, para determinar GSSG en la muestra se tomaron 250 μL del sobrenadante y se mezclaron con 100 μL de NEM (N-etilmaleimida) 0.04 M dejándose reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron 2150 μL de NaOH 0.1 N y se mezcló. Posteriormente, se tomaron 600 μL de la mezcla y se le adicionaron 1300 μL de NaOH 0.1 N más 100 μL de OPT, se mezcló perfectamente y se dejo reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente la fluorescencia fue medida en un espectrofluorómetro de luminiscencia (LS50B Perkin-Elmer) a 350 nm de excitación y 420 de emisión. La concentración GSSG en las muestras fue determinada por interpolación en la curva estándar y son expresados como μg de GSSG por gramo de tejido húmedo.

Actividad Glutación Peroxidasa. El tejido estriatal fue homogenizado en buffer (1:10 w/v) de fosfato de sodio 0.40 M (pH 7.0). 100 μL del homogenizado fueron adicionados con 1 ml de GSH 2 mM, 1 ml EDTA 0.04 mM y 0.50 ml de NaN_3 0.01 M (para inhibir a la catalasa). La mezcla de reacción se incubo a 37° C durante 5 min. Enseguida se adicionó 1 ml de H_2O_2 1.25 mM (precalentado a 37° C) y se incubó a 37° C durante 45 min. A 1 ml de mezcla de reacción se le adicionaron 4 ml de una solución de precipitación de ácido metafosfórico (1.67 g de ácido metafosfórico glacial, 0.2 g de EDTA y 30 g de NaCl en 100 ml de H_2O). Las muestras se centrifugaron a 3,000 x g durante 10 min. Entonces, el GSH fue

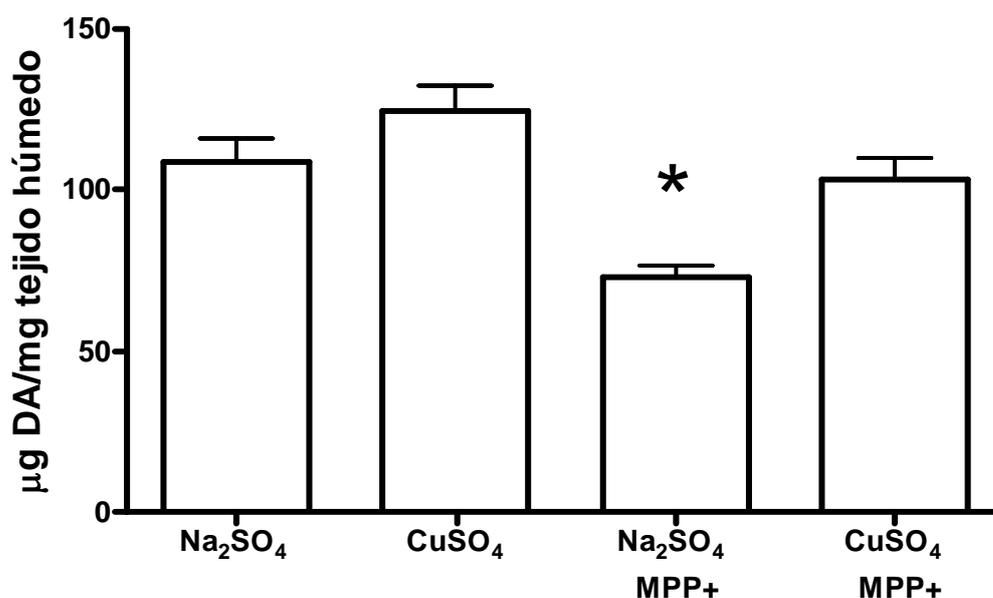
determinado al mezclar 2 ml de sobrenadante con 2.0 ml de Na_2HPO_4 0.4 M y 1 ml de DTNB y 2 min después se analizaron por espectrofotometría UV/Vis a 512 nm (espectrómetro Beckman DU-6). Los resultados de la actividad GPx fueron expresados como μmol GSH oxidado por g de tejido húmedo en un minuto. Un blanco con H_2O fue acarreado en paralelo a través de la incubación de las muestra ya que la oxidación no enzimática del GSH por H_2O_2 ocurre durante la incubación. Tanto la reacción enzimática y la no enzimática procedieron a velocidades directamente proporcional a la concentración de GSH, ya que un plot del logaritmo de la concentración contra el tiempo de reacción fue lineal tanto con la adición y sin la adición de la fuente de enzima. Una unidad de actividad enzimática fue convenientemente definida como el decremento en el logaritmo de la concentración de GSH de 0.001 por minuto siendo después sustraído el decremento en el logaritmo de la concentración de GSH por minuto de la reacción no enzimática (Hafeman *et al.*, 1974).

10. Análisis Estadístico.

Todos los resultados obtenidos a partir de cada una de las diferentes estrategias experimentales aplicadas en este trabajo fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. En el caso del curso temporal de actividad ferroxidasa los resultados se sometieron a una prueba ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnet.

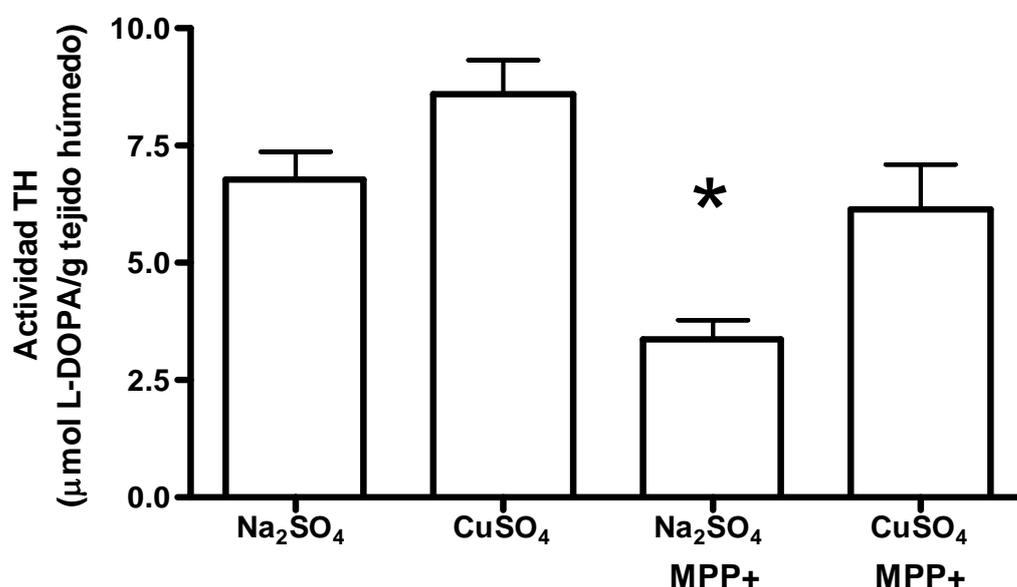
11. RESULTADOS

Contenido de DA estriatal. El grupo de animales administrado vía i.p. con Na_2SO_4 e intraestriatalmente con solución salina fue considerado como el grupo control. Los niveles basales de DA fueron de $109.1 \pm 7.06 \mu\text{g/g}$ de tejido húmedo (100%). El pretratamiento con CuSO_4 no afectó significativamente los niveles de DA estriatal ($124.6 \pm 7.9 \mu\text{g/g}$ de tejido húmedo; 114.2% vs control). En contraste, se observó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en las concentraciones de DA ($72.93 \pm 3.5 \mu\text{g/g}$ de tejido húmedo; 66.84% vs control) a causa de la microinyección intraestriatal de $10 \mu\text{g}/8 \mu\text{L}$ de MPP^+ , mientras que el pretratamiento con 10.0 mg/kg de CuSO_4 a ratas tratadas con MPP^+ produjo una recuperación del contenido de DA ($103.2 \pm 6.79 \mu\text{g/g}$ de tejido húmedo; 94.59% vs control) (Grafica 1).



Grafica 1. Efecto de la administración de 10 mMol/kg de CuSO_4 sobre el contenido de DA estriatal en el modelo de MPP^+ en la rata. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de 5-7 animales por grupo. Las diferencias entre los diferentes grupos en el contenido de DA se consideraron estadísticamente significativas (*) $p < 0.05$ a partir del grupo control, mostrando diferencias solo en el grupo tratado con Na_2SO_4 y MPP^+ . ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

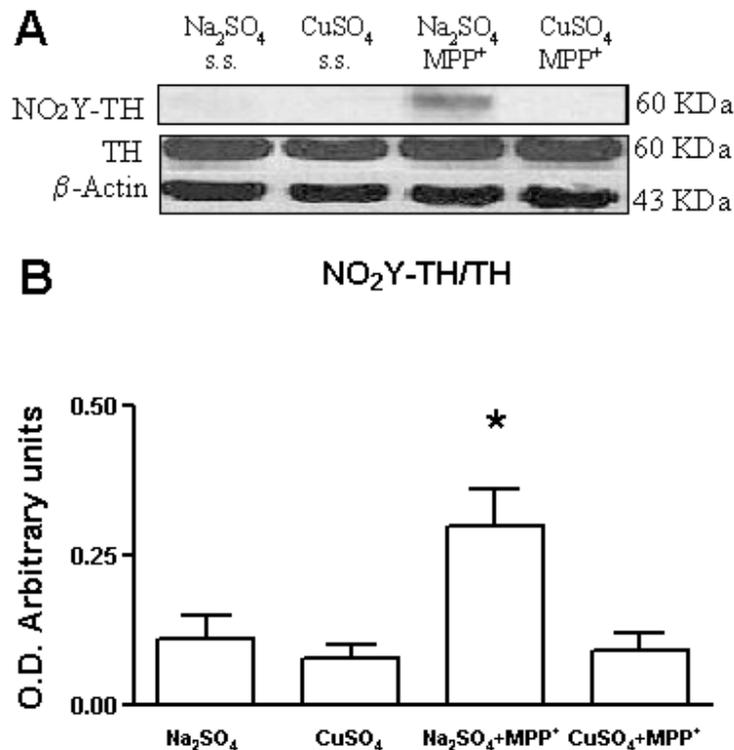
Actividad Tirosona Hidroxilasa. El nivel de L-DOPA estriatal en animales tratados con 10 mMol/kg Na_2SO_4 ó 10 mMol/kg de CuSO_4 24 h antes de la microinyección de 8 μL de solución salina fue considerada como los niveles basales de actividad TH (6.79 ± 0.59 y 7.50 ± 0.73 μg de L-DOPA/g de tejido húmedo, respectivamente). Así mismo, la microinyección de MPP^+ causó un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la actividad TH (3.38 ± 0.39 μg de L-DOPA/g de tejido húmedo) en relación al grupo control. Sin embargo, la administración del suplemento de CuSO_4 al grupo de ratas tratadas con MPP^+ previno la reducción en la actividad TH al preservar los niveles de L-DOPA (6.13 ± 0.96 μg de L-DOPA/g de tejido húmedo) al nivel del grupo control (Grafica 2)



Grafica 2. Efecto del cobre sobre la actividad TH en el modelo de MPP^+ . La actividad TH fue ensayada por medio de la administración de 3-hidroxibenzilhidrazina 30 min previos al análisis del contenido de L-DOPA. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de 5-7 ensayos independientes por grupo. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$) en el grupo tratado con Na_2SO_4 más MPP^+ . ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

Nitración y nivel de expresión de la TH. Seis hrs. después de la infusión de $10 \mu\text{g}/8 \mu\text{L}$ de MPP^+ se detectó un incremento estadísticamente significativo del nivel de nitración de la TH (60 kDa), tal como fue revelado por el uso de un anticuerpo monoclonal específico para 3-nitrotirosina. El pretratamiento de 10 mMol/kg de cobre disminuyó significativamente la inmunorreactividad asociada

con la nitración de la TH, previniendo de este modo el nivel de nitración inducido por MPP⁺ (Grafica 3A).



Grafica 3. Efecto de 10 mMol/Kg de Cu sobre el nivel de nitración y expresión de la TH en el modelo de MPP⁺. (A) Western blot de los niveles de nitración de residuos de tirosina en la TH (NO₂-Y-TH), evaluado por medio de la inmunoreactividad con un anticuerpo anti-3-nitrotirosina. Los niveles de nitración de la TH (60kD) fueron normalizados en relación al nivel de expresión de la TH. La señal de la expresión de la TH fue normalizada en relación a la señal de la expresión de la β -actina. (B) Análisis densitométrico de la relación en la expresión de residuos de tirosina nitrados entre la expresión de la TH (NO₂Y/TH) en el tejido estriatal. Cada barra representa la media \pm el E.S. de 5 animales por grupo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas (*) $p < 0.05$ a partir del grupo tratado con MPP⁺. ANOVA seguida de Tukey.

El grado de nitración de la TH fue normalizado en relación a la expresión de la TH (Grafica 3B). Para evaluar el efecto de la intervención quirúrgica sobre el nivel de nitración de la TH se dispuso de tres ratas sham y además, un grupo de ratas sin ningún tipo de tratamiento (naïve) fue analizado (n=3). Ni los animales sham ni los naïve presentaron valores de nitración diferentes de aquellos obtenidos a partir del grupo control (datos no mostrados). Por otra parte, el análisis densitométrico de la TH en el tejido estriatal a partir de cada uno de los diferentes grupos estudiados permaneció sin cambios. El grado de expresión fue normalizado en relación a la expresión de la β -actina (43 KDa), la cual fue utilizada como control de carga.

Expresión estriatal de la SON. Los resultados del análisis densitométrico del nivel de expresión de la SONn (155 KDa), SONi (126 KDa) y de la SONE (145 KDa) revelaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. El grado de expresión fue normalizado en relación a la expresión de la β -actina (Tabla I).

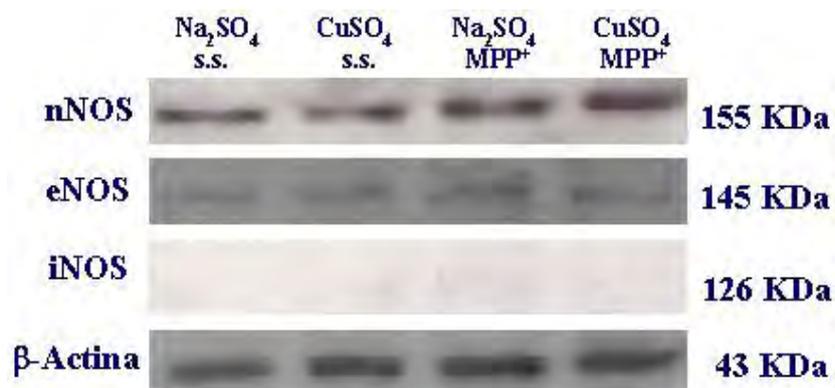


Figura 8. Western blot del nivel de expresión de la SONn, SONi y SONE en tejido de estriatal de ratas tratadas con Na₂SO₄, CuSO₄ (i.p.) y MPP⁺ (i.e.). El ensayo se realizó seis horas después de la lesión intraestriatal por MPP⁺ a través del uso de anticuerpos dirigidos en contra de cada una de las diferentes isoformas de la SON. El análisis densitométrico de la media \pm el E.S. de la expresión de 4 experimentos independientes no reveló diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ninguna de las 3 isoformas cuando se normalizó en relación de la señal de la β -actina. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

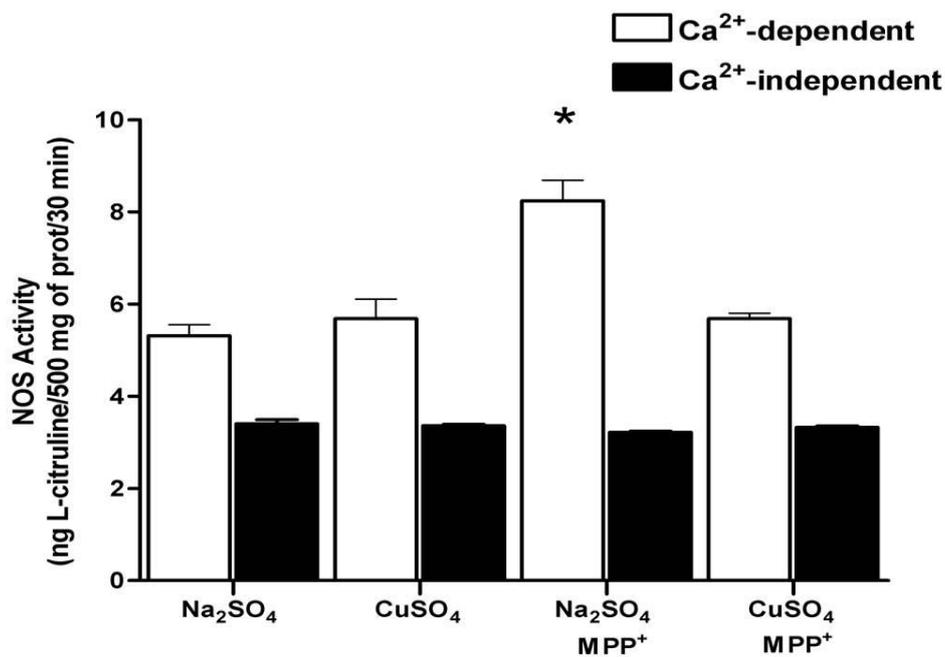
Tabla No. 1. Resultados del análisis densitométrico de la expresión estriatal de las tres isoformas de la SON a partir de los diferentes grupo.

| Tratamiento | Densidad Óptica / Unidades Arbitrarias | | |
|--|--|------------------|-----------------|
| | SONn | SONi | SONe |
| Na ₂ SO ₄ i.p. + salina i.s. | 0.58 \pm 0.05 | 0.03 \pm 0.007 | 0.43 \pm 0.09 |
| CuSO ₄ i.p. + salina i.s. | 0.69 \pm 0.08 | 0.04 \pm 0.006 | 0.47 \pm 0.11 |
| Na ₂ SO ₄ i.p. + MPP ⁺ i.s. | 0.73 \pm 0.07 | 0.06 \pm 0.022 | 0.58 \pm 0.11 |
| CuSO ₄ i.p. + MPP ⁺ i.s. | 0.61 \pm 0.05 | 0.06 \pm 0.025 | 0.56 \pm 0.10 |

El análisis de la inmunoreactividad fue hecho a partir de muestras de tejido estriatal seis horas después del daño inducido por MPP⁺. El nivel de expresión de las tres diferentes isoformas de la SON fue normalizado en relación a la expresión de la β -actina.

Actividad Estriatal de la SON. La actividad estriatal de la SON fue medida también seis horas después de la infusión de MPP⁺. La actividad de las isoformas de la SON dependientes de Ca²⁺ más la actividad de la SON independiente de Ca²⁺ fueron consideradas como la actividad SON total a través de cada uno de los

diferentes grupos. Los animales del grupo control administrados con 10 mMol/kg de Na₂SO₄ (i.p.) y solución salina (i.e.) fue considerado con actividad SON basal (8.71 ± 0.248, ng de L-Citruline/500 mg proteína/30 min; 100%). El tratamiento con el suplemento de 10 mMol/kg de CuSO₄ más solución salina no modificó la actividad basal de SON estriatal (8.54 ± 0.39; 97.14% vs control). Sin embargo, La actividad SON fue significativamente incrementada en el tejido estriatal del grupo de ratas tratadas con MPP⁺ (11.46 ± 0.45; 130% vs control), mientras que el suplemento de CuSO₄ administrado a ratas tratadas con MPP⁺ preservó la actividad SON total (9.0 ± 0.09; 102% vs control) a nivel del grupo control (Grafica 4).



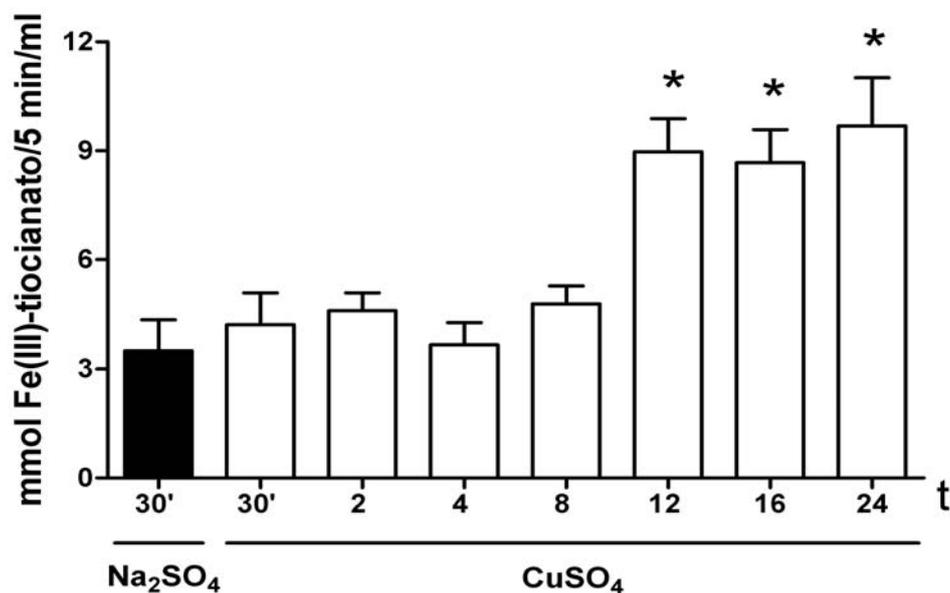
Grafica 4. Actividad estriatal de la actividad dependiente de Ca²⁺ e independiente Ca²⁺ de la sintasa del óxido nítrico en el presente modelo. Los resultados son expresados como la media ± el E.S. de 5-7 animales por grupo. Los resultados expresados en ng de L-citrulina en 500 mg de proteína durante 30 min revelaron un incremento significativos (*) p < 0.05 en la actividad SON dependiente de Ca²⁺ en el grupo tratado con Na₂SO₄ y MPP⁺ con respecto al grupo tratado con Na₂SO₄. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

Para separar la actividad SON independiente de calcio fueron realizadas incubaciones en presencia de 1.0 mM de EGTA sin la adición de CaCl₂. La actividad independiente de calcio en el tejido estriatal permaneció sin cambios a partir de los diferentes grupos estudiados. Los resultados fueron consistentes con

los niveles basales observados en el grupo tratado con 2.5 mg/kg de Na₂SO₄ (3.40 ± 0.08 ng L-Citruline/500 mg protein/30 min. 100%).

La diferencia entre la actividad SON total y la actividad SON independiente de calcio resulto en la actividad SON dependiente de calcio o constitutiva. El grupo de animales tratado con sulfato de sodio revelo los niveles basales de actividad SON constitutiva (5.31 ± 0.24, ng L-Citruline/500 mg proteína/30min.; 100%), mostrándose sin cambios significativos en el grupo de ratas pretratado con cobre (5.68 ± 0.42; 106% vs control), mientras que el grupo de animales tratado con Na₂SO₄ más MPP⁺ presentaron niveles de actividad SON (8.23 ± 0.45; 155% vs control) significativamente incrementados (p<0.05). Sin embargo, el suplemento de cobre disminuyó a niveles basales el incremento en la actividad SON inducido por el MPP⁺ (5.63 ± 0.11; 106% vs control) a valores del orden del grupo control (Grafica 4).

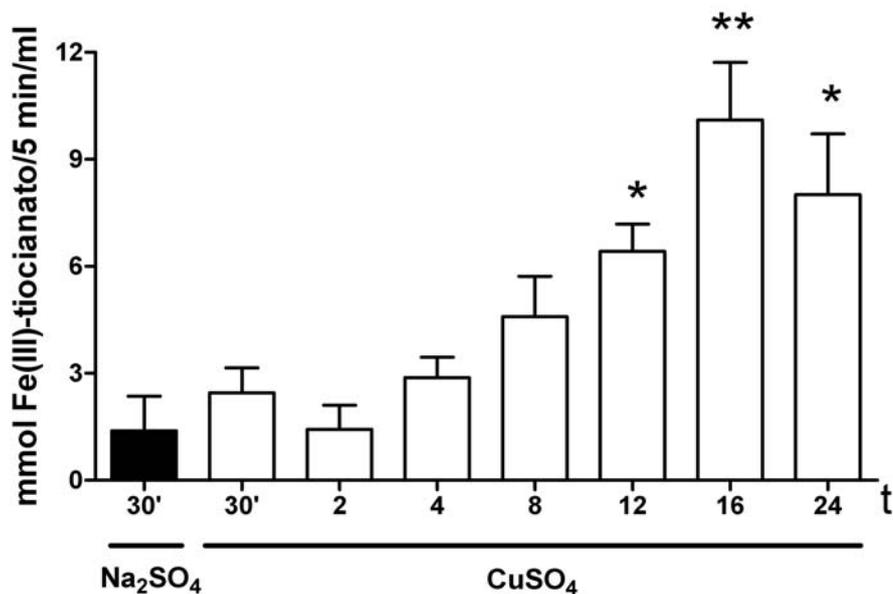
Efecto de la administración de CuSO₄ sobre el curso temporal de la actividad ferroxidasa en el CE de la rata. Después de la administración i.p. de 10 mMol/Kg



Grafica 5. Efecto del cobre sobre el curso temporal de la actividad ferroxidasa en el CE de la rata. Cada barra representa la media ± E.S. de 3-4 animales por grupo, expresados en mMol Fe(III)-tiocianato/5min/ml, mostrando un incremento significativo (*) p<0.05 después de 12, 16 y 24 h en la actividad ferroxidasa en relación al grupo tratado con Na₂SO₄. ANOVA seguida de una prueba de Dunnet.

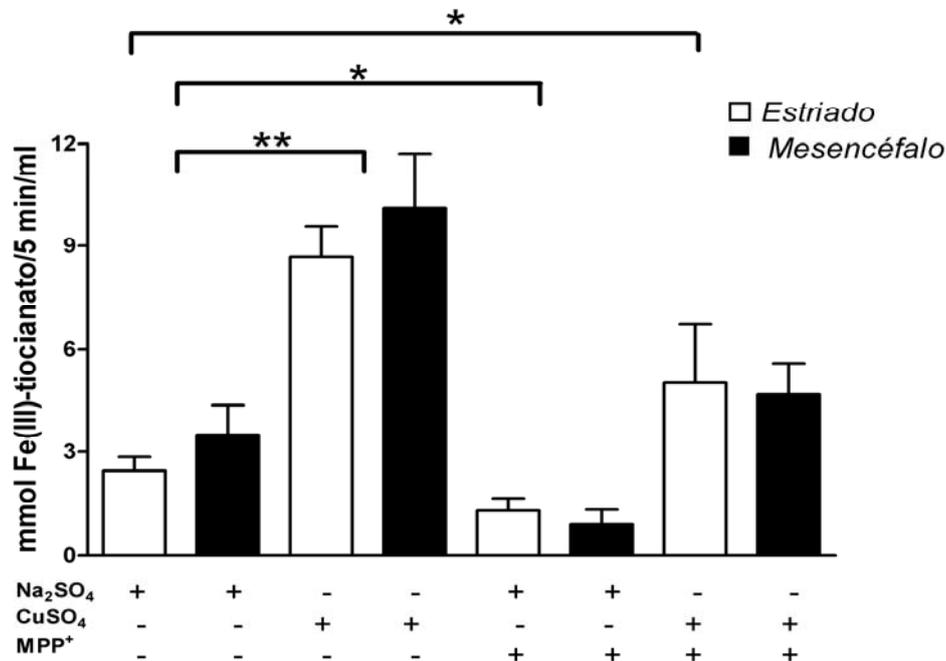
de CuSO_4 se midió la actividad ferroxidasa estriatal, monitoreada a partir de 6-8 ensayos independientes después de: 30 min, 2, 4, 8, 12, 16 y 24 h. Los resultados expresados en mMol del complejo Fe^{3+} -tiocianato indican un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad ferroxidasa estriatal después de 12 h (8.97 ± 0.9), 16 h (8.66 ± 0.9) y 24 h (9.6 ± 1.3) cuando fueron comparados con el grupo de animales tratados con Na_2SO_4 (3.5 ± 0.8) durante 30 min (Grafica 5).

Efecto de la administración de CuSO_4 sobre el curso temporal de la actividad ferroxidasa en el Mesencéfalo ventral de la rata. Estos hallazgos se correlacionaron con un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad ferroxidasa del mesencéfalo ventral después de 12 h (6.4 ± 0.7), alcanzando un pico máximo de actividad ($p < 0.01$) a las 16 h (10.1 ± 1.6), mostrando también un incremento significativo ($p < 0.05$) después de 24 h (8.0 ± 1.7) (Grafica 6).



Grafica 6. Efecto del cobre sobre el curso temporal de la actividad ferroxidasa en el mesencéfalo ventral de la rata. Cada barra representa la media \pm E.S. de 5 animales por grupo, mostrando un incremento significativo (*) $p < 0.05$ a las 12 y 24 h y un pico máximo de actividad (**) $p < 0.01$ después de 16 h en comparación al grupo tratado con Na_2SO_4 . ANOVA seguida de una prueba de Dunnet.

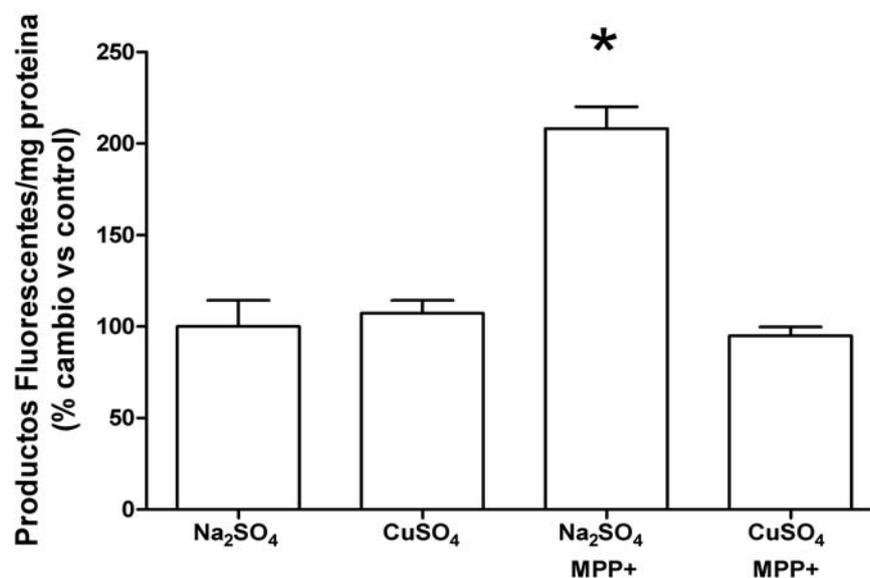
Efecto de la infusión de MPP⁺ sobre el incremento en la actividad ferroxidasa del CE en la rata. El pico máximo de actividad ferroxidasa tanto del mesencéfalo (10.1 ± 1.6) como en el CE (8.66 ± 0.9), detectado 16 h después de la administración de cobre fue desafiado por medio de la inyección intraestriatal de $10\mu\text{g}/8\mu\text{L}$ de MPP⁺. Seis h después de la lesión con MPP⁺ se identificó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la actividad ferroxidasa tanto en el CE como en el mesencéfalo (1.28 ± 0.3 y 0.88 ± 0.4 , respectivamente) en relación a los grupos controles de tejido estriatal y mesencefálico (2.45 ± 0.7 y 3.5 ± 0.8 , respectivamente).



Grafica 7. Efecto de la lesión por MPP⁺ en contra del incremento en la actividad ferroxidasa inducido por la administración de cobre. Cada una de las barras blancas representan la media \pm E.S. de 5 ensayos independientes por grupo, mostrando un incremento significativo (**) $p < 0.01$ en el grupo tratado con Cu y una disminución significativa (*) $p < 0.05$ en el grupo tratado con Na₂SO₄ más MPP⁺. El grupo de muestras del tejido estriatal tratado con cobre más MPP⁺ muestra un incremento significativo (*) $p < 0.05$ en relación al control y al control de daño. ANOVA seguido de una prueba de Tukey. La actividad ferroxidasa mesencefálica en barras negras ilustra cambios significativos del orden de los observados en tejido estriatal a partir de 5 ensayos independientes. Sin embargo, no alcanza diferencia significativa cuando es comparado el grupo pretratado con cobre más MPP⁺ en relación al grupo control. ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

Interesantemente, el grupo administrado con el suplemento de cobre más MPP⁺ mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad ferroxidasa estriatal (5.0 ± 1.2) en comparación con el grupo control, sin mostrar cambios en la actividad del tejido mesencefálico (4.6 ± 0.9) en relación al control (Grafica 7).

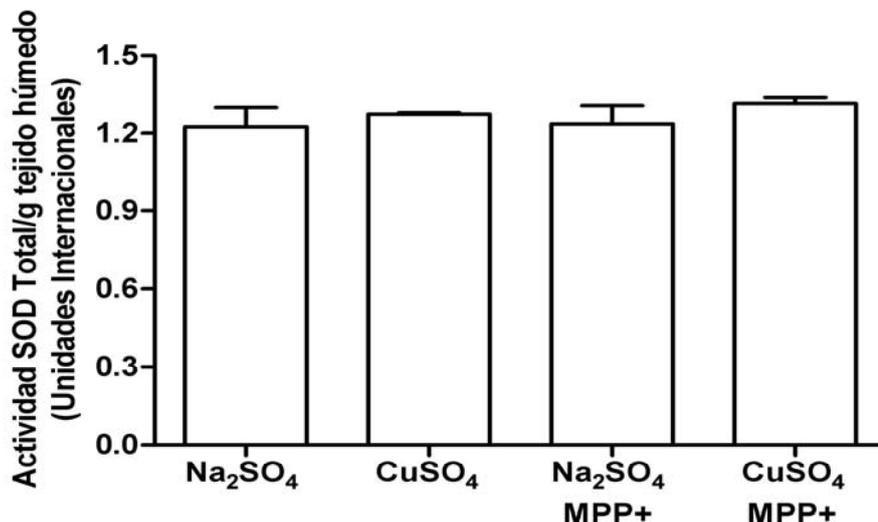
Peroxidación lipídica estriatal. En términos de lo anterior, 16 horas después de la administración i.p. de 10 mMol/kg de CuSO₄ fue determinada la formación de productos lipídicos fluorescentes, después de seis horas de la infusión de 10 μg/8 μL de MPP⁺. Seis horas después de la infusión de 10 μg/8 μL de MPP⁺ la formación de productos lipídicos fluorescentes detectados a partir de ratas tratadas con Na₂SO₄ más solución salina (i.e.) fueron considerados como los niveles basales de fluorescencia igual a 38.3 ± 5.5 Unidades de Fluorescencia (UFR) por mg de proteína (100%). La administración del suplemento de CuSO₄ no produjo ningún incremento en la formación estriatal de productos lipídicos fluorescentes (41.1 ± 2.9 UFR/mg de proteína; 107.25% vs control) (Grafica 8).



Grafica 8. Efecto del cobre sobre la formación de productos lipídicos fluorescentes inducidos por MPP⁺. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de seis animales por grupo, ilustrados como el porcentaje de cambio respecto al grupo control. Los resultados revelan un incremento significativo (* $p < 0.05$) a partir del grupo tratado con Na₂SO₄ más MPP⁺. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

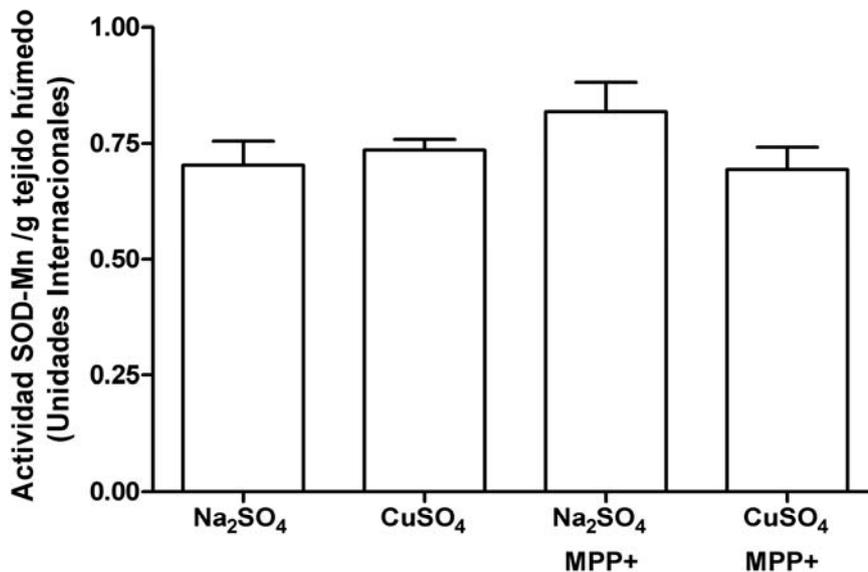
Por otra parte, el grupo de animales lesionados por medio de la infusión intraestriatal de MPP⁺ produjo un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) de 79.7 ± 9.4 UFR/mg de proteína (208.11% vs control). Sin embargo, la preadministración de CuSO₄ en animales tratados con MPP⁺ ejerció un efecto neuroprotector al reducir a niveles basales la formación de productos lipídicos fluorescentes (36.3 ± 1.8 UFR/mg de proteína; 94.86% vs control).

Actividad SOD total en el CE de la rata en el presente modelo. Los resultados obtenidos a partir de la actividad estriatal de la SOD no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Los resultados de la actividad SOD expresados en unidades internacionales por gramo de tejido húmedo (UI/g tejido húmedo) 16 horas después de la administración de cobre y 6 horas después de la administración de s.s. o MPP⁺ no produjeron ningún cambio en la actividad total de la SOD (Grafica 9).



Grafica 9. Efecto del cobre sobre la actividad SOD total en el modelo MPP⁺. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de 5-9 ensayos independiente por grupo, los cuales son representados en Unidades Internacionales de actividad SOD. Los resultados no muestran diferencias entre los diferentes grupos. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

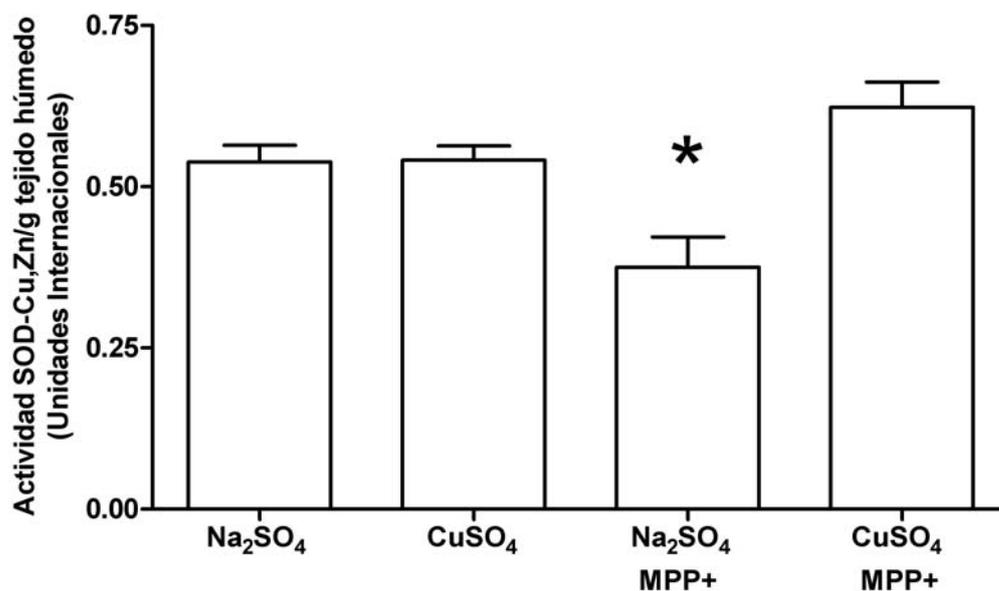
La adición de cianuro de sodio, previo al monitoreo de cada una de las muestras no presento cambios en la actividad SOD-Mn (Grafica 10). Los valores de la actividad enzimática SOD-Cu,Zn resultan de la diferencia entre los valores de la actividad SOD total y los de la actividad SOD-Mn.



Grafica 10. Efecto del cobre sobre la actividad SOD-Mn en el modelo MPP⁺. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de 5-9 ensayos independiente por grupo, los cuales son graficados en Unidades Internacionales de actividad SOD. Los resultados no muestran diferencias estadísticas entre los diferentes grupos. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

La administración de Na₂SO₄ seguida de la inyección intraestriatal de s.s. se consideraron niveles basales de actividad SOD-Cu,Zn (0.53 ± 0.02 UI/g tejido húmedo), el grupo pretratado con cobre (0.54 ± 0.02 UI/g) no presento diferencias significativas respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo tratado con Na₂SO₄ más MPP⁺ presentó una disminución significativa ($p < 0.05$) en los niveles de actividad SOD-Cu,Zn (0.42 ± 0.03 UI/g tejido húmedo) en relación al resto de los grupos. El grupo pretratado con Cu, 16 horas previas a la lesión con MPP⁺ no

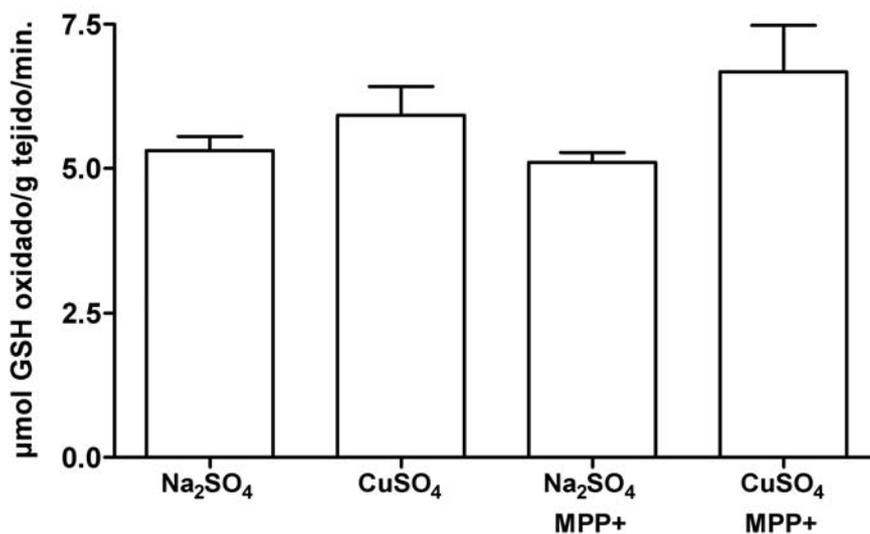
presento diferencias significativas en la actividad SOD-Cu,Zn (0.62 ± 0.03 UI/g tejido húmedo) en relación al control (Grafica 11).



Grafica 11. Efecto del cobre sobre la actividad SOD-Cu,Zn en el modelo MPP⁺. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de 5-9 ensayos independiente por grupo, los cuales son representados en UI de actividad SOD. Los resultados muestran una disminución significativa (*) $p < 0.05$ a partir del grupo tratado con Na₂SO₄ más MPP⁺. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

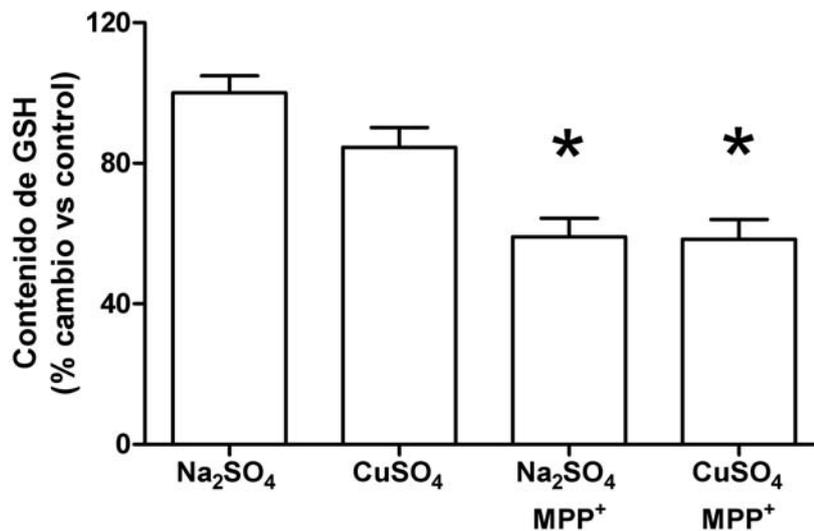
Actividad GPx. Los resultados del efecto del CuSO₄ sobre la actividad GPx en el presente modelo son expresados como μ mol GSH oxidado por g de tejido húmedo por minuto. En primera instancia se obtuvieron los valores báscles a partir del grupo de animales tratados vía i.p. con Na₂SO₄ y dieciséis horas después con 8 μ L de s.s. intraestriatal, el cual fue considerado como el grupo control (5.31 ± 0.24), asimismo, se obtuvieron valores a partir del grupo administrado con CuSO₄, el cual, no presento diferencias significativas en relación al grupo control (5.92 ± 0.49). Del mismo modo, los animales tratados con Na₂SO₄ más MPP⁺ presentaron valores del orden del grupo control (5.10 ± 0.17). Por último, se obtuvieron resultados a partir del grupo tratado con el suplemento de CuSO₄ más MPP⁺ (6.67

± 0.80), los cuales a pesar de mostrar un evidente incremento no alcanzó diferencias estadísticas significativas (Grafica 12).



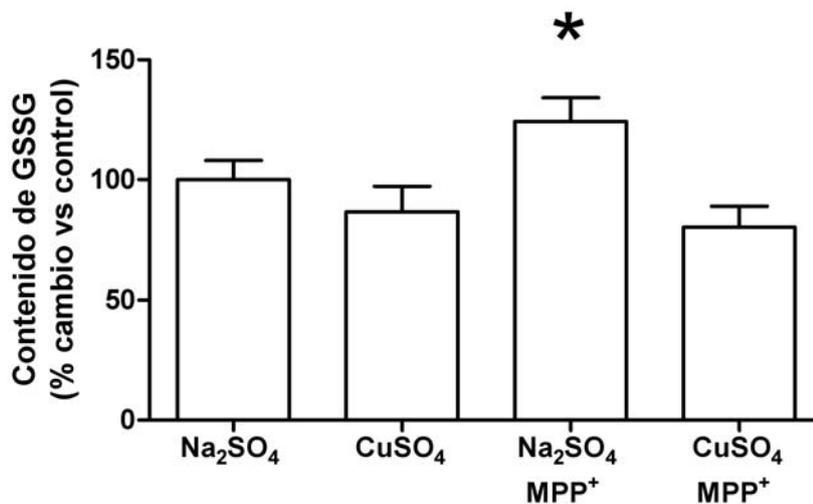
Grafica 12. Efecto del cobre sobre la actividad GPx en el modelo MPP⁺. Los resultados son expresados como la media \pm el E.S. de 5 animales por grupo, los cuales son graficados en μmol de GSH oxidado por g de tejido por min. Los resultados no muestran diferencias estadísticas entre los diferentes grupos. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

Niveles estriatales de GSH en el presente modelo. Todos los resultados de la cuantificación de los niveles de GSH son expresados como el porcentaje de cambio en relación al grupo control (100%), tratado con Na₂SO₄ por vía i.p. más s.s. intraestriatal. Los valores del grupo tratado con CuSO₄ más s.s. (89.5 ± 5.5) no representan ninguna diferencia significativa en relación al grupo control. Por su parte, el grupo tratado con Na₂SO₄ más MPP⁺ disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de GSH (59.0 ± 5.2). Del mismo modo, el grupo pretratado con CuSO₄ más MPP⁺ presentó niveles de GSH (58.39 ± 5.6) significativamente ($p < 0.05$) disminuidos en relación al grupo control (Grafica 13).



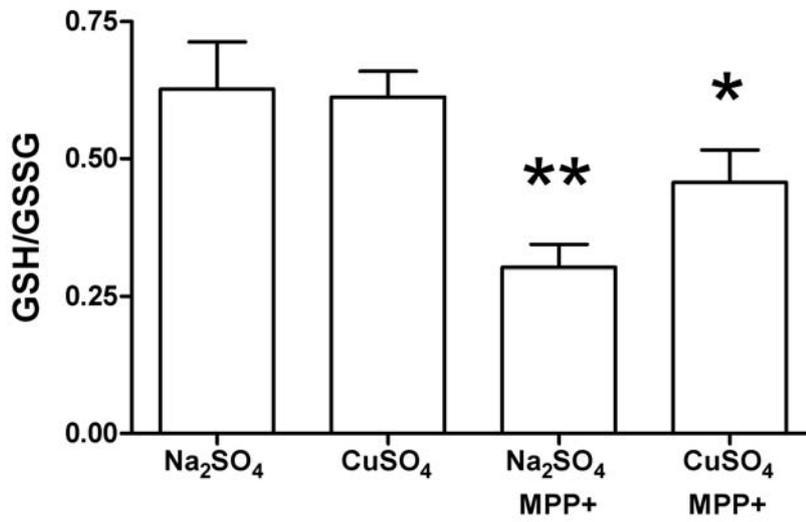
Grafica 13. Niveles de GSH en el modelo MPP⁺. Los niveles de GSH son representados como la media \pm el E.S. del porcentaje de cambio versus el grupo control de 6-7 animales por grupo. Los resultados muestran una disminución significativa (*) $p < 0.05$ en ambos grupos de animales lesionados con MPP⁺. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

Efecto del cobre sobre el incremento en el contenido de GSSG inducido por MPP⁺. La cuantificación del contenido de GSSG reveló un incremento significativo ($p < 0.05$) de GSSG ($124.2\% \pm 9.9$) en el grupo tratado i.p. con Na₂SO₄ más MPP⁺ vía intraestriatal en comparación con el grupo control ($100\% \pm 8.0$) tratado con Na₂SO₄ y s.s. Los grupos pretratados con cobre más Na₂SO₄ y MPP⁺ no presentaron diferencias en el contenido de GSSG ($86.59\% \pm 10.6$, $80.1\% \pm 8.7$, respectivamente) (Grafica 14).



Grafica 14. Efecto del suplemento de cobre sobre los Niveles de GSSG en el modelo MPP⁺. Los niveles de GSSG son representados como la media \pm el E.S. del porcentaje de cambio respecto al grupo control de 6 ensayos independientes por grupo. Los resultados muestran un incremento significativo (*) $p < 0.05$ en el grupo tratado con MPP⁺. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

Efecto del suplemento de cobre en la relación GSH/GSSG en el modelo de MPP⁺. Los resultados presentan una significativa ($p < 0.01$) disminución en el cociente GSH/GSSG del grupo tratado con Na₂SO₄ y MPP⁺ (0.3 ± 0.04 , ratio) en comparación al grupo control (0.62 ± 0.08 , ratio). El grupo tratado con el suplemento de cobre más MPP⁺ muestra una diferencia estadística ($p < 0.05$) en el cociente GSH/GSSG (0.45 ± 0.05 , ratio en relación al grupo control, lo cual representa una recuperación parcial en el cociente GSH/GSSG. El grupo tratado con cobre más s.s. no presenta diferencias en el cociente GSH/GSSG (0.61 ± 0.04 , ratio) en relación al grupo control (Grafica 15).



Grafica 15. Efecto del suplemento de cobre en la relación GSH/GSSG en el modelo MPP⁺. El cociente del GSH y del GSSG (GSH/GSSG) son representados como la media \pm el E.S. 6 ensayos independientes por grupo. Los resultados muestran una disminución significativa (**) $p < 0.01$ en el grupo tratado con MPP⁺ y una recuperación parcial en el grupo pretratado con Cu más MPP⁺, (*) $p < 0.05$. ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

12. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se evaluó el papel del suplemento de cobre sobre las alteraciones neuroquímicas asociadas al sistema dopaminérgico en el CE de la rata, 6 horas después de la infusión intraestriatal de MPP⁺. El Cu es un importante componente de la dieta y es esencial para el desarrollo animal y humano (Olivares y Uauy, 1996). El Cu está involucrado en varios procesos metabólicos y también es requerido como grupo prostético para la actividad de algunas enzimas que participan en el sistema de defensa antioxidante, como la SOD-Cu,Zn (Hartmann y Evenson, 1992). Actualmente, se ha demostrado el efecto neuroprotector del pretratamiento de Cu contra la neurotoxicidad del MPP⁺ en un modelo experimental de la EP inducido en ratones de la cepa C57/black (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001a), sugiriendo que la administración de cobre puede activar o inducir la síntesis de proteínas dependientes de cobre responsables de la defensa celular en contra del daño inducido por MPP⁺, sin embargo, el mecanismo de acción del cobre en contra del daño neuronal dopaminérgico inducido por MPP⁺ no es claro.

La inactivación de la TH y la falla en la síntesis de DA es un evento temprano en el proceso neurotóxico del MPP⁺ (Nagatsu, 1990). Han sido descritas tres distintas fases en cuanto a la actividad y el contenido de la TH después de la administración de MPP⁺: En la fase temprana, minutos después de la administración de MPP⁺, hay un decremento en la actividad TH sin cambios en la concentración de la proteína. La pérdida de la actividad en esta fase es atribuida a la inhibición de la fosforilación de la enzima. En la fase intermedia, tres horas después de la exposición a MPP⁺, se caracteriza nuevamente por una disminución en la actividad de la enzima sin cambios en la concentración de la enzima, pero en este caso, el decremento de la actividad TH está ligado a una inactivación de la enzima por nitración de residuos de tirosina. En la última fase, la cual ocurre seis horas después de la inyección de MPP⁺, tanto la actividad TH así como el contenido de la proteína se ven significativamente disminuidos (Nagatsu, 1990; Ara *et al.*, 1998). En el presente estudio, fue observado un decaimiento de los niveles de DA, seis horas después de la inyección de MPP⁺, esta disminución fue

acompañada por una pérdida en la actividad TH sin reducción en la señal de la proteína en el estriado, lo cual correlacionó con la señal correspondiente a la nitración de la proteína inducida por MPP⁺ (figura 2).

La presencia de proteínas nitradas corresponde a la presencia de un agente nitrante después del daño por MPP⁺. La infusión intraestriatal de MPP⁺ estimula la producción del radical $\cdot\text{O}_2^-$ (Schulz *et al.*, 1997), esta molécula reactiva, reacciona con una extremada velocidad con el radical NO \cdot para producir al ion ONOO $^-$, el cual en su momento promueve la nitración de residuos de proteínas (Blanchard-Fillion *et al.*, 2001). La TH es un blanco selectivo para la nitración de residuos de tirosina. La nitración de al menos un residuo de tirosina dentro del dominio catalítico de la TH es suficiente para alterar su actividad catalítica (Ara *et al.*, 1998). Interesantemente, en este trabajo encontramos que 10 mMol/Kg del suplemento de cobre reduce la nitración de proteínas, preservándose tanto el contenido de DA como la actividad TH, es así que se considera que la proteína nitrada de 60 kDa identificada por Western blot seguramente corresponde a la TH.

Por otra parte, la administración intraestriatal de MPP⁺ incremento la actividad SON dependiente de calcio, tal y como ha sido demostrado previamente (Schulz *et al.*, 1995). La administración de cobre más MPP⁺ en la rata previno el incremento de la actividad SONc. Russell *et al.* (1997) mostró previamente que la SONn juega un papel importante en la neurotoxicidad que induce el MPP⁺ en ratones carentes tanto del gen de la SONn o del gen de la SONE. Tanto el volumen de lesión estriatal así como la degeneración en la SN fueron atenuados significativamente en ratones mutantes para la SONn pero no en aquellos que carecían de la SONE, indicando que el daño neuronal dopaminérgico involucra la activación de la SONn. La inhibición de la SONn por 7-nitroindazole, un inhibidor específico de la SONn, protege en contra de la neurotoxicidad inducida por MPTP (Schulz *et al.*, 1995). Diversos estudios sugieren que el NO \cdot contribuye a la muerte celular seguido de la activación de receptores NMDA en cultivos de células corticales, hipocámpales y en neuronas estriatales (Vlachová *et al.*, 1996). Los iones de cobre han sido involucrados en funciones neurofisiológicas a causa de que ellos pueden ser liberados desde la terminal nerviosa, influyendo al sistema de neurotransmisión neuronal (Trombly and Shepherd, 1996) y modulando a los

receptores para glutamato en neuronas hipocampales (Schlief *et al.*, 2005). En este sentido el cobre puede estar actuando a través de modular la actividad de los receptores para NMDA, un posible mecanismo es que los iones de cobre libre sean capaces de antagonizar la respuesta mediada por los NMDAr, sugiriendo también que el cobre puede actuar sobre un sitio de unión extracelular del complejo canal-receptor NMDA, probablemente sobre el sitio modulador redox (Santamaría *et al.*, 2003) inhibiendo el influjo de calcio y de esta forma impidiendo la activación SON dependiente de calcio. Además, el cobre puede estar actuando a diferente nivel, específicamente sobre la actividad SON, esta visión está basada en estudios que demuestran que la SONn ha sido inhibida después de la captura del cobre, revelado por medio de el decremento de los niveles de GMPc intracelular en cultivo de células C6. Asimismo, experimentos *in vitro* demuestran que el cobre bloquea selectivamente la actividad catalítica de la SONn, pero no de la SONi, sugiriendo que la presencia de un sitio de unión putativo a cobre localizado entre el grupo hemo y la interfase del dimero con unión en los residuos de His125, Tyr491, Asp460 y en el grupo carbonilo de la cadena principal de la Met120 (Colasanti *et al.*, 2000). Sin embargo, no es posible hacer a un lado la posibilidad de que la administración aguda de cobre pueda estar inhibiendo a el transportador de DA de la misma forma en que ha sido reportado para la administración aguda de manganeso (Chen *et al.*, 2006) previniendo de esta forma el acceso del MPP⁺ dentro de la neurona y así interfiriendo con la toxicidad del MPP⁺ a este nivel (figura 6).

Es así, que los resultados del presente trabajo, en su primera parte, sugieren que el cobre es capaz de disminuir el daño ejercido por MPP⁺ como modelo de la EP en la rata, posiblemente por medio de una reducción en la actividad SONn dependiente de Ca²⁺, lo cual puede estar inhibiendo o modulando la formación de agentes nitrantes, disminuyendo así el nivel de nitración de la TH.

Como segunda parte de este trabajo, se evaluó el efecto de la administración de 10 mMol/Kg de cobre sobre la actividad de algunas proteínas dependientes de cobre en la rata. Los objetivos de esta segunda parte se derivan de la visión que supone que el efecto del cobre en contra del incremento en los niveles de nitración de la TH inducidos por MPP⁺ a través de una inhibición o

modulación en la sobreproducción del NO no tendría porque ser la única causa del efecto de la administración de cobre. En términos de lo anterior y bajo la hipótesis de que el cobre podría también estar actuando río arriba en relación al fenómeno ya descrito, se consideró que el cobre es capaz de ejercer cierto cambio en la actividad de enzimas dependientes de Cu. Por lo tanto, en esta segunda etapa se determinó evaluar el efecto del tratamiento del suplemento de Cu sobre el curso temporal de la actividad ferroxidasa en el tejido estriatal de la rata.

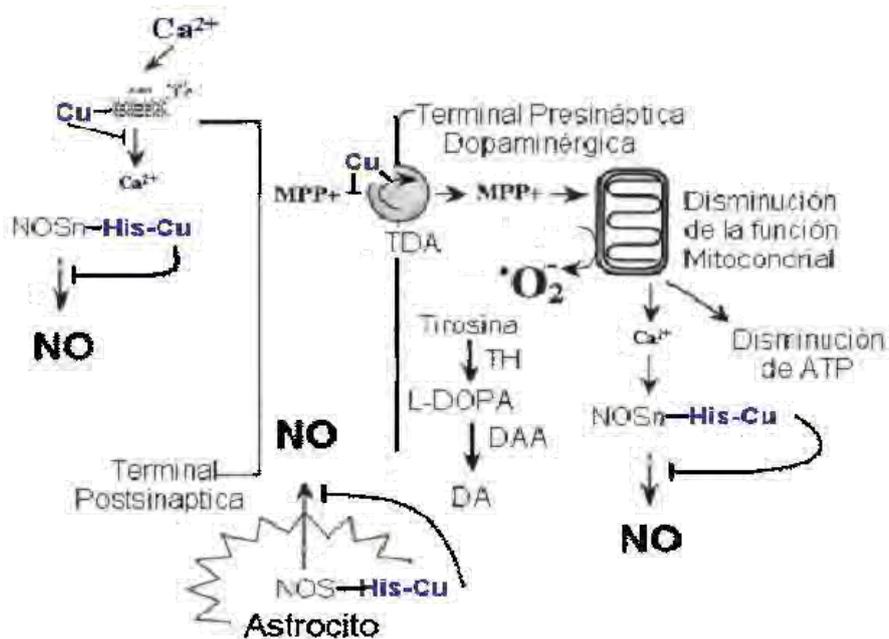


Figura 9. Efecto de la administración de CuSO₄ en contra del daño neuronal dopaminérgico inducido por MPP⁺. El cobre disminuye el daño por MPP⁺ posiblemente a tres diferentes niveles: Inhibición de la SONc por medio de la unión del cobre al residuo 125 de histidina. Modulación de la actividad del receptor NMDA a través de la unión del cobre en el sitio redox del receptor; o bien, por una inhibición del transportador de DA (PTDA), lo cual inhibe el paso de MPP⁺ e impide que la neurotoxina ejerza su efecto deletéreo. Modificado a partir de Przedborski *et al.*, 1995.

Los resultados del presente trabajo mostraron un incremento en la actividad ferroxidasa estriatal después de la administración del suplemento de sulfato de cobre, con un incremento a partir de las 12 h, dicho incremento se mantiene hasta las 24 h, lo cual es consistente con reportes en la literatura que indican que la administración de cobre produce un incremento en la actividad ferroxidasa I (IPCS, 1998), dicho incremento es sustentado por resultados obtenidos a partir de la administración del suplemento de cobre (12 mg/Kg/día) en ratas que reportan un

incremento en la actividad ferroxidasa y un efecto neuroprotector en contra del daño inducido por tetratiomolybdato (Lyubimov *et al.*, 2004). Asimismo, 20 nM de Cu^{2+} induce la expresión de la Cp en cultivos de células hepáticas (Das *et al.*, 2007) y el secuestro de este metal produce el efecto contrario (De Domenico *et al.*, 2007). El secuestro de cobre puede conducir a la acumulación de hierro intracelular por decremento de la expresión de ferroportina. Probablemente, el mecanismo que subyace a este efecto involucra la actividad Cp mediada por cobre, ya que la ferroportina está ausente en la membrana plasmática de los astrocitos de animales knockout para Cp. Esta interacción es debida a la actividad ferroxidasa de la Cp, ya que esta actividad en la membrana plasmática reduce la concentración extracelular de Fe^{2+} conduciendo a una incrementada expresión de ferroportina para compensar la disminución de Fe^{2+} por el incremento en su eflujo (De Domenico *et al.*, 2007).

El incremento en la actividad ferroxidasa a causa del suplemento de cobre puede deberse a modificaciones en la vida media de la Cp. La vida media de la holo-Cp es de 16 horas, mientras que la vida media de la apo-Cp es de 4 h (Sato y Gitlin, 1991). Una vez que se optimiza la síntesis de la holo-Cp en respuesta a el incremento de Cu, la suma de holo-Cp al pool preexistente de holo-Cp, trae como resultado un incremento neto en la actividad ferroxidasa probablemente por medio de un incremento en la eficacia para sintetizar holo-Cp como consecuencia en la biodisponibilidad del cobre, sin que el incremento en la biodisponibilidad del Cu tenga que modificar la expresión de la Cp (Gitlin *et al.*, 1992). Por su parte, la infusión intraestriatal de MPP^+ dio lugar a una disminución en la actividad ferroxidasa cuando fue comparado con los niveles de actividad del grupo control, tanto en el CE como en el mesencéfalo, produciendo el mismo efecto en el grupo tratado previamente con sulfato de cobre, ya que a pesar de que este último presenta diferencias significativas en la actividad ferroxidasa en el tejido estriatal en relación al control, la administración de MPP^+ contrarrestó el incremento en la actividad ferroxidasa. Estos resultados encuentran sustento en reportes previos que indican que la administración de MPTP en ratones disminuye el contenido de Cu y Mn a partir de varias regiones cerebrales (Ríos *et al.*, 1995), probablemente a causa de la disminución en la expresión de transportadores de metales divalentes

(Gitler *et al.*, 2009). Estos resultados son los primeros que describen una disminución en la actividad ferroxidasa inducida por MPP⁺, no obstante, son consistentes con el incremento en el contenido de hierro en la SN de primates administrados con MPTP por vía sistémica (Mochizuki *et al.*, 1994), lo cual se presenta como un reflejo de la disminución en la actividad ferroxidasa, la cual permite la movilización del hierro del tejido cerebral a tejidos periféricos (Osaki y Johnson, 1969). El Fe²⁺ se oxida por la acción ferroxidasa de la Cp a Fe³⁺ y es así reconocido y transportado por la transferrina en el plasma (Harris *et al.*, 1998). Por lo tanto, consideramos que el daño neuronal producido por el MPP⁺ reduce la eficacia del transporte de cobre y su incorporación a las proteínas dependientes de este metal, lo cual trae como resultado la disminución en la actividad enzimática. Por otra parte, estos resultados muestran un incremento significativo en la formación de productos lipídicos fluorescente a causa de la infusión de MPP⁺, debido a la sobreproducción de especies reactivas tal como ha sido reportado previamente (Blum *et al.*, 2001), reduciéndose el daño a niveles basales a causa de la preadministración de Cu más MPP⁺. Esto encuentra una posible explicación en el incremento en la actividad ferroxidasa después de 16 h de la administración del suplemento de Cu. Primero, el incremento en la actividad ferroxidasa puede estar incrementando la movilización del hierro y por otra parte, puede mantener al pool de hierro remanente en estado oxidado (figura 7), lo que disminuye la formación de productos lipídicos fluorescentes a causa de cierta restricción en la química de Fenton (Beal, 1995). El cobre modula el transporte de Fe²⁺, a través de reducir la captura del mismo, posiblemente a través del transportador DMT1 descrito en neuronas (Arredondo y Núñez, 2005). La expresión disminuida de DMT1 está asociada a la sobrevivencia seguida de la sobrecarga de hierro (Aguirre *et al.*, 2005), de tal forma que el efecto del cobre está basado en la inhibición de la captura del hierro. Asimismo, tanto la administración oral como la intracerebroventricular de cobre son neuroprotectoras en contra de la degeneración dopaminérgica, la administración oral de cobre puede conducir a este efecto por disminución de los niveles de hierro, ya que el cobre puede estar compitiendo con el hierro por la absorción intestinal disminuyendo así el contenido de hierro cerebral. La modulación del transporte de hierro a través de la ferroportina

Por otra parte, en este trabajo se ha encontrado una disminución significativa en la actividad SOD-Cu,Zn a causa de la lesión intraestriatal de MPP⁺, siendo contrarrestado, por medio del pretratamiento con el suplemento de Cu, a niveles del grupo control. La actividad SOD-Mn no mostró cambios a través de los diferentes grupos. Esta disminución en la actividad SOD-Cu,Zn se correlaciona con el incremento en la formación de productos lipídicos fluorescentes. Sin embargo, esto no puede ser concluyente dado que nuestros resultados encuentran cierta inconsistencia con reportes previos (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001b). La administración de cobre a ratones conduce a un incremento de hasta siete veces más en la actividad enzimática de la SOD-Mn en relación al grupo control, en donde la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno ocurre algunas veces más rápido que en animales tratados con cobre y MPP⁺ que en los tratados con sulfato de sodio y MPP⁺, lo cual puede ser explicado por la diferencia en los tiempos a los cuales se midió la actividad SOD en uno y otro modelo. No obstante, estos resultados de la actividad SOD encuentran similitud con aquellos reportados por Santamaría y col., en 2003, quienes reportan que el cobre preserva la actividad de la SOD-Cu,Zn después del daño inducido por ácido quinolínico en el CE de la rata en un modelo de la enfermedad de Huntington. Asimismo, existen reportes que indican que ratones C57/Black que sobre expresan la SOD-Cu,Zn no sufren daño a causa de la administración de MPTP (Ara *et al.*, 1998) haciendo evidente por una parte la participación de esta enzima en la neuroprotección en contra del daño inducido por MPP⁺ y por la otra parte se hace evidente la participación del daño oxidativo mediado por el radical [•]O₂⁻, el cual es sobreproducido por la acción neurotóxica del MPP⁺.

Una vez identificado el incremento en la actividad ferroxidasa a causa del suplemento de Cu y la preservación de la actividad SOD-Cu,Zn en respuesta al daño producido por MPP⁺, dirigimos nuestro trabajo hacia la determinación del efecto del Cu en contra del daño oxidativo inducido por MPP⁺ en el estriado de la rata a través de la cuantificación del contenido de GSH y GSSG. Tanto el GSH como el GSSG son considerados como los biomarcadores más comunes de daño oxidante intracelular (Bharath *et al.*, 2002). La administración de MPP⁺ causa una sobreproducción del radical [•]O₂⁻ y H₂O₂ por medio de la inhibición directa del

complejo I mitocondrial con una concomitante disminución en la síntesis de ATP (Blum *et al.*, 2000), lo cual reduce la actividad biosintética de la GSH sintetasa. Del mismo modo, nuestros resultados indican una disminución en el contenido de GSH a causa de la infusión de MPP⁺ cuando los animales fueron preadministrados tanto con sulfato de sodio como con sulfato de cobre, lo que pone de manifiesto cierta falta de efecto del Cu en contra del daño oxidativo inducido por MPP⁺. No obstante, el incremento del 25% en el contenido de GSSG en el grupo tratado con sodio más MPP⁺ marcó diferencias significativas en comparación con el grupo control y con el grupo pretratado con el suplemento de cobre más MPP⁺, de tal forma que como resultado de estos cambios encontramos una disminución en la relación GSH/GSSG, lo que nos muestra un cambio hacia un ambiente redox más oxidado en el grupo tratado con sulfato de sodio y MPP⁺, lo cual es consistente con resultados obtenidos a partir de cultivos celulares (Drechsel *et al.*, 2007). La relación GSH/GSSG sufre una recuperación parcial en el grupo suplementado con Cu más MPP⁺, lo que hace de estos resultados los primeros en indicar que el suplemento de cobre produce una recuperación parcial al daño inducido por MPP⁺ y es en términos de esto capaz de contrarrestar el ambiente celular oxidativo generado por la lesión con MPP⁺. Estos resultados pueden ser explicados por reportes que indican que la administración de 10 mg Cu/Kg en la rata disminuye de forma transitoria la actividad de la GSH S-transferasa (IPCS, 1998), disminuyendo de esta forma el metabolismo del GSH por esta vía. Además, tenemos en cuenta que estos resultados presumen la producción de niveles incrementados de H₂O₂ que por acción de la GPx disminuye el pool de GSH e incrementa el de GSSG, pasando de un ambiente redox estable a un ambiente más oxidado (Bharath *et al.*, 2002), sin embargo, en este trabajo no encontramos cambios en la actividad GPx entre los diferentes tratamientos, lo que indica que la recuperación parcial a causa del Cu en el cociente GSH/GSSG puede deberse a que el cobre está regulando la actividad de la GSH S-transferasa (IPCS, 1998) o bien, puede deberse a la preservación de ciertos mecanismos determinados por la presencia del cobre que estén dando lugar a el mantenimiento en la eficacia de la síntesis de GSH, no obstante, se carece de reportes en la literatura que faciliten la interpretación del efecto del cobre sobre los niveles de GSH en este modelo, de tal

forma que será necesario establecer objetivos encaminados a el estudio del efecto del cobre sobre la actividad de las proteínas involucradas en la síntesis y el metabolismo del GSH.

En términos generales, el presente trabajo muestra el efecto del cobre en contra de la nitración de la TH y además un evidente incremento en la actividad ferroxidasa dependiente lo cual, al parecer es una de las responsables en disminuir el daño oxidativo inducido por MPP⁺. Estas características recuerdan aquellas observadas en la EP y es conveniente hacer constar que no existen hasta la fecha pruebas terapéuticas que intenten contrarrestar la acumulación del fierro en enfermos de Parkinson. Esto sugiere que la restricción de fierro en la dieta puede ser benéfica en la EP, tal y como ha sido en modelos experimentales (Levenson *et al.*, 2004), así como el suplemento de cobre que incrementa la actividad ferroxidasa. Es posible que un simple mecanismo de acción no sea suficiente para detener la progresión de enfermedades complejas tales como la EP. Sin embargo, como se ha demostrado en el presente trabajo, la administración del suplemento de cobre en la rata dio lugar a un incremento en la actividad ferroxidasa tanto del CE como del mesencéfalo ventral, lo cual ofrece una alternativa terapéutica que puede ser empleada para disminuir o interrumpir la acumulación del fierro en la SN de los enfermos de Parkinson y con ello probablemente sea posible disminuir el deterioro causado en la enfermedad, prolongando el periodo de duración de la misma y mejorando la calidad de vida del paciente. Asimismo, es posible que la administración del suplemento de Cu sea utilizado como terapia preventiva en aquellos adultos con antecedentes familiares de Parkinson o sin ellos. Puede ser dirigida en quienes se identifique un incremento en los niveles de fierro en la SN a través de sonografía del parénquima cerebral. Por lo tanto, resulta necesario profundizar en la investigación básica y clínica para conocer todos los efectos que ejerce la administración del suplemento de cobre y su posible beneficio. Asimismo, resulta interesante el efecto del cobre demostrado en este trabajo, ya que puede ser útil también para generar estrategias terapéuticas dirigidas en contra de los radicales libres, incrementando la actividad enzimática de proteínas encargadas de la respuesta antioxidante tales como la SOD-Cu,Zn u otras capaces de atrapar radicales libres como la Cp.

13. CONCLUSIONES.

- Los resultados del presente trabajo demuestran que el suplemento de 10 mMol/Kg de CuSO₄ es capaz de reducir la nitración de la TH inducida por MPP⁺ asociado a una disminución en la actividad SONc.
- La administración de 10 mMol/Kg de CuSO₄ incrementa significativamente la actividad ferroxidasa en el CE y mesencéfalo ventral de la rata.
- La infusión intraestriatal de MPP⁺ reduce la actividad de proteínas dependientes de Cu, tales como la actividad SOD-Cu,Zn en el CE y la actividad ferroxidasa tanto en el CE y en el mesencéfalo ventral de la rata.
- El suplemento de Cu protege en contra del daño inducido por MPP⁺ sobre las proteínas Cu-dependientes analizadas en este trabajo y disminuye la formación de productos lipídicos fluorescentes producidos por la infusión de MPP⁺.
- La administración de 10 mMol/Kg de Cu reduce el daño oxidativo inducido por MPP⁺ al restablecer parcialmente la relación GSH/GSSG.

14. PERSPECTIVAS.

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis la principal aportación del presente trabajo está basada en el efecto del suplemento de CuSO_4 para contrarrestar las alteraciones neuroquímicas inducidas por MPP^+ disminuyendo tanto el daño nitrosativo como el daño oxidante a través de la disminución de la actividad SONc como por el aumento en la actividad ferroxidasa estriatal y mesencefálica. Sin embargo, no es posible descartar la posible participación de otras proteínas dependientes de Cu, que pueden estar jugando un papel importante en contra del daño ejercido por MPP^+ , de tal forma que las perspectivas del presente trabajo son orientadas a el estudio del transportador lisosomal para metales divalentes ATP13A2 (PARK9), el cual ha sido recientemente identificado como causa de Parkinson de inicio temprano. La expresión del RNAm de esta proteína se encuentra sobrerregulada en pacientes con Parkinson idiopático. Este transportador es parte de una interacción altamente conservada que incluye a la α -sinucleína y a la toxicidad por Mn. La sobreexpresión del transportador ATP13A2 en modelos animales de la EP protege a la neurona de la degeneración inducida por la exposición a altas concentraciones de Mn. Por otra parte, trabajos en nuestro laboratorio demuestran que el daño inducido por MPP^+ incluye una disminución en el contenido de Cu y Mn del tejido cerebral de roedores. De tal forma, consideramos que en el modelo experimental de la EP, el transportador ATP13A2 relocaliza a la membrana celular a causa del daño neuronal inducido por MPP^+ , liberando el Cu y el Mn al espacio extracelular disminuyendo la actividad de enzimas antioxidantes dependientes de Cu y Mn. Asimismo, creemos que la administración aguda de Cu puede sobreexpresar el transportador ATP13A2 reduciendo el daño a causa de la infusión por MPP^+ . En consecuencia, los objetivos de futuros estudios están dirigidos a evaluar el efecto de la microinyección intraestriatal esterotáxica de MPP^+ sobre el transportador ATP13A2 en el tejido cerebral de la rata. Así como la identificación del efecto de la administración de Cu sobre la expresión del transportador ATP13A2.

Los parámetros a evaluar serán tanto histológicos como moleculares para identificar y localizar el transportador ATP13A2 por medio del análisis inmunohistoquímico por fluorescencia, lo cual puede ser corroborado por un análisis semicuantitativo por Western blot para evidenciar los posibles cambios en la expresión del transportador ATP13A2. El efecto del Cu como del MPP⁺ sobre el nivel de expresión del transportador se evaluará por medio de PCR en tiempo real. y no debe faltar la cuantificación del contenido de Cu y Mn.

De tal forma que los resultados de esta perspectiva deben explicar la participación del transportador ATP13A2 en el modelo experimental de la EP inducido por MPP⁺ y en la neuroprotección ejercida por la administración de Cu en contra del daño inducido por MPP⁺. Del mismo modo, esta propuesta pretende identificar la participación del transportador ATP13A2 en el presente modelo y extrapolar los resultados de esta investigación como base de una futura investigación clínica en enfermos de Parkinson, haciendo evidentes nuevos blancos terapéuticos y el posible uso del Cu como terapia coadyuvante en enfermos de Parkinson.

15. REFERENCIAS.

- Abad F., Maroto R., Lopez M., Sanchez-García P. and García A. (1995) Pharmacological protection against the cytotoxicity of 6-hydroxydopamine and H₂O₂ in chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.* 293:55-64.
 - Agarwal K., Sharma A. and Talukder G. (1990) Clastogenic effect of copper sulphate on the bone marrow chromosomes of mice in vivo. *Mutat Res.* 243:1-6.
 - Aguirre P., Mena N., Tapia V., Arredondo M. and Núñez M. (2005) Iron homeostasis in neuronal cells: a role for IREG1. *BMC Neurosci.* 6:3
 - Aigner E., Theurl I., Haufe H., Seifert M., Hohla F., Scharinger L., Stickel F., Mourlane F., Weiss G. and Datz C. (2008) Copper availability contributes to iron perturbations in human nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 135:680-688.
 - Akil M., Schwartz J., Dutchak D., Yuzbasiyas-Gurkan V. and Brewer G. (1991) The psychiatric presentations of Wilson's disease. *J Neuropsychol Clin Neurosci.* 3:377-382.
 - Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, and Ríos C. (2001a) Participation of manganese-superoxide dismutase in the neuroprotection exerted by copper sulfate against 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Brain Res Bulletin.* 55:277-279.
 - Alcaraz-Zubeldia M, Rojas P, Boll C. and Ríos C. (2001) Neuroprotective Effect of Acute and Chronic Administration of Copper (II) Sulfate Against MPP⁺ Neurotoxicity in mice. *Neurochem Res.* 26:61-66.
 - Andersen K., Frim M., Isacson O., Beal F. and Breakefield O. (1994) Elevation of neuronal MAO-B activity in a transgenic mouse model does not increase sensitivity to the neurotoxin MPTP. *Brain Res.* 656:108-114.
 - Anderson S., Bankier T. and Barrell G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 90:457-465.
- Andrew R., Watson D., Best S., Midgley J., Wenlong H. and Petty R. (1993) The determination of hydroxydopamine and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem Res.* 18:1175-1177.
- Armstrong C., Moore L., Hackler R., Miller G. Stroube R. (1983) An outbreak of metal fume fever: Diagnostic use of urinary copper and zinc determinations. *J Occup Med.* 25:886-888.
 - Ara J., Przedborski S., Naini B., Jakson-Lewis and Ischiropoulos, H. (1998) Inactivation de tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxyntirite

and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7659-7663.

- Arredondo M. and Núñez M. (2005) Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med.* 26:313-327.
- Askwith C., Eide D., VanHo A., Bernard P., Li L. and Kaplan J. (1994) The FET3 gene of *S. Cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell.* 76:403-410.
- Auclair S., Feillet-Coudray C., Coudray C., Schneider S., Muckenthaler M. and Mazur A. (2006) Mild copper deficiency alters gene expression of proteins involved in iron metabolism. *Blood Cells Mol Dis.* 36:15-20.
- Bahena-Trujillo R., Flores G. y Arias-Montaña J. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed.* 11:39-60.
- Baldereschi M., Di Carlo A., Roca W., Vanni., Maggi S., Perissinotto E. and Inzitari D. (2000) Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA working group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology.* 55:1358-1363.
- Banci L., Bertini I., Durazo A., Girotto S., Gralla E., Martinelli M., Valentine J., Vieru M. and Whitelegge J. (2007) Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: a possible general mechanism for familial ALS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:11263-11267.
- Barlow B., Cory-Slecht D., Richfield E. and Thiruchelvam M. (2007) The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of a neurodegenerative disorder. *Reprod Toxicol.* 23:457-470.
- Barnham K., Masters C. and Bush A. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov.* 3:205-214.
- Beal F. (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *TINS.* 23:298-304.
- Beal F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 38:357-366.
- Beckman J., Carson M., Smith C. and Koppenol W. (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature.* 364:584.
- Beckman J., Chen J., Ischiropoulos H. and Crow J. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Met Enzymol.* 233:229-240.

- Berg D., Gerlach M., Youdim M., Double K., Zecca L., Riederer P. and Becker G. (1991) Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 79:225-236.
- Bezard E., Dovero S., Prunier C., Ravenscroft P., Chalon S., Guilloteau D., Crossman A., Bioulac B., Brotchie J. and Gross C. (2001) Relationship between the appearance of Symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned Macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 21:6853-6861.
- Bharath S., Hsu M., Kaur D., Rajagopalan S. and Andersen J. K. (2002) Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 64:1037-1048.
- Blanchard-Fillion B., Souza J., Friel T., Jiang G., Vrana K., Sharov V., Barrón L., Schöneich C., Quijano C., Alvarez B., Radi R., Przedborski S., Gayani F., Horwitz J. and Ischiropoulos H. (2001) Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J. Biol Chem* 276 (49):46017-23.
- Blandini F., Nappi G., Tassorelli C. and Martignoni E. (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's. *Prog Neurobiol.* 62:63-88.
- Bloch K., Wolfram D., Brown J. and Bloch D. (1995) Three members of the nitric oxide synthase II gene family (NOS2A, NOS2B and NOS2C) colocalize to human chromosome 17. *Genomics.* 27:526-530.
- Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A., Sadoul R. and Verna M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog in Neurobiol.* 65:135-172.
- Boll C., Alcaraz-Zubeldia M., Montes S. and Ríos C. (2009) Free copper, ferroxidase and SOD1 activities and NO_x content in the CFS. A different marker profile in four neurodegenerative disease. *Neurochem Res.* 28 January (Epub ahead of print).
- Boll, M., Sotelo, J. Otero, E., Alcaraz, M. and Ríos, C. (1999) Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Let.* 265: 155-158.
- Bowen B.C., Block R.E., Sanchez-Ramos J. (1995) Proton MR spectroscopy of the brain in 14 patients with Parkinson disease. *Am. J. Neuroradiol.* 16:61-68.
- Brailowsky S. (1995) *Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología. La Ciencia desde México.* Fondo de Cultura Económica. Pp: 355.
- Bredt, D. and Snyder, S. (1990) Isolation of oxide nitric synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 87:682-685.

- Bredt, D., Hwang, P. and Snyder, S. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347:768-770.
- Bredt, D., Hwang, P., Glatt, C., Lowenstein, C., Reed, R., Snyder, S. (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 351:714-718.
- Bruijn L., Houseweart M., Kato S., Anderson K. and Cleveland D. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281:1851-1854.
- Buu, N. T. 1993. Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium y dopamine in the mouse brain cell nuclei. *J. Neurochem*. 61:1557-1560.
- Calabrese V., Scapagnini G., Giuffrida S., Bates. and Clark J. (2001) Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: Relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res*. 26:739-764.
- Carr H. and Winge D. (2003) Assembly of cytochrome c oxidase and embryonic development. *Mol Cell Biol*. 22:7614-7621.
- Charcot J and Vulpian A. (1872) Cinquieme lecon: De la paralysie agitante. In Bourneville, ed. *Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la Salpetriere*. Paris, A Delahaye.
- Christenson, J. G. *et al.*, Preparation and properties of homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch. Biochem. Biophys*. 1970. 141:356-367.
- Cooper JR, Bloom FE, RH. *The biochemical basis of neuropharmacology*. 7th. Ed. New York/ Oxford, Oxford University Press, 1996: 293-351.
- Cotton F. y Wilkinson G. (1989) *Advanced inorganic chemistry*. New York, John Wiley and Sons Ltd. Pp 755-775.
- Crouch P., Blake R., Duce J., Ciccotosto G., Li Q., Barnham K., Curtain C., Cherny R., Cappai R., Dyrks T. and Trounce I. (2005) Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *J Neurosci*. 25: 672-679.
- Culotta, V. C., and Gitlin, J. D. (1999). *Disorders of copper transport. The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill.
- Das D., Tapryal N., Goswami S., Fox P. and Mukhopadhyay C. (2007) Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cells by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. *Biochem J*. 402:135-141.

- Davis G., Williams A., Markey S., Ebert M., Caine E., Reichert C. and Kopin I. (1979) Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psych Res.* 1:249-254
- Dawson, T., Steiner, J., Dawson VI, Uhl, G. and Snyder, S. 1993. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 90:9808-9812.
- De Domenico I., Ward D., Bonaccorsi di Patti M., Jeong S., David S., Musci G. and Kaplan J. (2007) Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* 26:2823-2831.
- DeLong M. and Wichmann T. (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64:20-24.
- Dexter D., Carayon A., Javoy-Agid F., Wells F., Daniel S., Lees A., Jenner P. and Marsden C. (1991) Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 114:1953-1975.
- Dexter D., Sia J., Rose S., Hindmarsh J., Mann V., Cooper J., Wells F., Daniel S., Lees A. and Schapira A. (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individual with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol.* 35:38-44.
- Drechsel D., Liang L. and Patel M. (2007) 1-Methyl-4-Phenylpyridinium-induced alterations in glutathione status in immortalized rat dopaminergic neurons. *Toxicol Appl Farmacol.* 220:341-348.
- Drummond J., Aranyi C., Schiff L., Fenters J. Graham J. (1986) Comparative study of various methods used for determining health effects of inhaled sulfates. *Environ Res.* 41:514-528.
- Eberling J., Richardson B. and Reed B. (1994) Cortical glucose metabolism in Parkinson's disease without dementia. *Neurobiol. Aging.* 15:329-335.
- Eckman C. and Eckman E. (2007) An update on the amyloid hypothesis. *Neurol Clin.* 25:669-682.
- Estévez A., Crow J., Sampson J., Reiter C. Zhuang Y., Richardson G., Tarpey M., Barbeito L. and Beckman J. (1999) Induction of nitric oxide-dependent apoptosis by zinc-deficient superoxide dismutase. *Science.* 286:2498-2500.
- Fahn, S. (1989) in Cecil's Textbook of Medicine, eds. Wyngarden, J. B. & Smith, L.H., Jr. (Saunders, Philadelphia), p 2143-2147.

- Fahn, S., Clarence-Smith, K. E., Chase, T. N (1998) Parkinson's disease: neurodegenerative mechanisms and neuroprotective interventions report of a workshop. *Mov Disord.* 13:759-67.
- Field L., Luk E. and Cullota V. (2002) Copper chaperones: personal scouts for metals ions. *J Bioenerg Biomembr.* 34:373-379.
- Fox J., Kama J., Lieberman G., Chopra R., Dorsey K., Chopra V., Volitakis I., Cherny R., Bush A. and Hersch S. (2007) Mechanism of copper mediated Huntington's disease progression. *PLoS ONE.* 2:1-12.
- Fridovich I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64:97-112.
- Garthwaite, J. and Boulton, C. (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 57:683-706.
- Gerfen C., Keefe K. and Gauda E. (1995) D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2- dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci.* 15:8167-8176.
- Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P. and Youdim M. B. (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem.* 63:1609-1623.
- Giroud B., Collado-Mesa F. and Esteban E. (2000) Prevalence of Parkinson disease in an urbana area of the Ciudad de La Habana providence, Cuba. Door-to-door population study. *Neurología.* 15:269-273.
- Gitler A., Chesi A., Geddie M., Caldwell K., Cooper A. and Lindquist S. (2009) α -Synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manhanese toxicity. *Nat Genet.* 41:308-315.
- Gitlin J. (1998) Aceruloplasminemia. *Pediatr Res.* 44:271-276.
- Glowinski J, and Iversen 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.* 1966. 13:655-669.
- Good, P., Hsu, A., Werner, P., Perl, D. and Olanow, C. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neurophatol Exp Neurol.* 1998; 57: 338-342.
- Goralski K. and Renton K. (2004) Brain inflammation enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium–evoked neurotoxicity in rats. *Toxicol and Appl Pharmacol.* 196:381-389.

- Gorell, J.M., Peterson, E.L., Rybicki, B.A., Johnson, C.C., 2004. Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 217, 169-174.
- Gormally S., Baker A., Portmann B., Miwat A. and Drumm B. (1994) High water copper content associated with Indian childhood cirrhosis in European children. *Gastroenterol.* 106:A900 (abstract).
- Goto J., Gralla E., Valentine J. and Cabelli D. (1998) Reactions of hydrogen peroxide with familial amyotrophic lateral sclerosis mutant human copper-zinc superoxide dismutases studied by pulse radiolysis. *J Biol Chem.* 273:30104-30109.
- Greenwood, M., Guo, Y. and Kumar, U. 1997. Distribution of protein inhibitor of neural nitric oxide synthase in rat brain. *J Biol. Chem.* 238:617-621.
- Grünewald T. and Beal F. (1999) Bioenergetics in Huntington's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 893:203-213.
- Gutiérrez-Reyes E, Albores A, and Ríos C. (1998) Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology.* 131:145-154.
- Gutteridge J. (1994) Hydroxyl radicals, iron, oxidative stress and neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 17:201-213.
- Haavik J. and Toska K. (1998) Tyrosine Hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 16:285-309.
- Hackel H., Miller K., Elsner P. Burg G. (1991) Unusual combined sensitization to palladium and other metals. *Cont Dermat.* 24:131-132.
- Hafeman D., Sunde R., and Hoekstra (1974) Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 104:580-587.
- Harris Z., Takahasshi Y., Miyajima H., Serizawa M. and Gitlin J. (1995) Aceruloplasminemia: Molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Nat Acad Sci USA.* 92:2539-2543.
- Harris, Z. L., Klomp, W. J. and Gitlin, J. (1998) Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 67:972S-7S.
- Hartmann, H. A. and Evenson, M.A. (1992) Deficiency of copper can cause Neural Degeneration. *Med. Hypot.* 38:75-85.
- Hattori N. (1991) Immunohistochemical studies on complexes I, II, III and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 30:563-571.

- Hayward L., Rodriguez J., Kim J., Tiwari A., Goto J., Cabelli D., Valentine J. and Brown R. Jr. (2002) Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 277:15923-15931.
- Hébert C., Elwell M., Travlos G., Fitz C. and Bucher J. (1993) Subchronic Toxicity of cupric sulfate administered in drinking water and feed to rats and mice. *Fund Appl Toxicol.* 21:461-475.
- Heikkila R., Cabbat F., Manzino L. and Duvoisin R. (1984) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology.* 23:711-713.
- Hemmens, B. and Mayer, B. (1998) Enzymology of nitric oxide synthase. *Methods Mol Biol.* 100:1-32.
- Hochstrasser H., Bauer P., Walter U., Behnke S., Becker G. and Berg D. (2004) Ceruloplasmine gene variations and substantia nigra hyperechogenicity in Parkinson disease. *Neurol.* 63:1912-1917.
- Hochstrasser H., Tomiuk J., Walter U., Behnke S., Spiegel J., Krüger R, Becker G., Riess O. and Berg D. (2005) Funcional relevance of ceruloplasmine mutations in Parkinson's Disease. *FASEB J.* 19:1851-1853.
- Hornykiewicz O. (1996) Dopamine (3-hidroxytryamine) and brain function. *Pharmacol Rev.* 18:925-964.
- Huang X., Atwood C., Hartshorn M., Multhaup G., Goldstein L., Scarpa R., Cuajungco M., Gray D., Lim J., Moir R., Tanzi R. and Bush A. (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry.* 38:7609-7616.
- Huie, R.E. and Padjama, S.C. 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18:195-199.
- Hunot S., Boissiere F., Faucheux B., Brugg B., Mouatt-Prigent A., Agid Y. and Hirsch E. (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 72:355-63.
- Ikebe S., Tanaka M. and Ohno K. (1990) Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum in Parkinson's disease and senescence. *Biochem. Biophys Res Commun.* 170:1044-1048.
- Ikonomidou C. and Turski L. (1996) Excitotoxicity and neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol.* 8:487-497.

- International Programme on Chemical Safety (1998) Environmental Health Criteria 200. Copper. pp. 360.
- Jankovic, J. (2005) Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology*. 64:2021-2028.
- Jantsch W., Kulig K. and Rumack B. (1985) Massive copper sulfate ingestion resulting in hepatotoxicity. *J Toxicol Clin Toxicol*. 22:585-588.
- Jelen F., Oleksy K., Simietana J. and Otlewski J. (2003) PDZ domain-common players in the cell signaling. *Acta Biochem Pol*. 50:985-1017.
- Jellinger K., Linert L., Kienzl E., Herlinger E. and Youdim M. (1995) Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*. 46:297-314.
- Jellinger K. and Bancher C. (1998) Neuropathology of Alzheimer's disease a critical update. *J Neural Transm Suppl*. 54:77-95.
- Jenner P. and Olanow C. (1998) Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 44:72s-84s.
- Jenner P. (1993) Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*. 146:6-13.
- Jiménez-Jiménez F., Fernández-Calle P., Martínez-Vanaclocha M. and Codoceo R. (1992) Serum levels of zinc and copper in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 112:30-33.
- Jiménez-Jiménez F., Molina J., Aguilar M., Meseguer I., Mateos-Vega M., Zurdo M. and Martínez-Para M. (1998) Cerebrospinal fluid levels of transition metal in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transmisión*. 105:497-505.
- Kang Y., Viswanath V., Jha N., Qiao X., Mo J.Q. and Andersen J.K. (1999) Brain gamma-glutamyl cysteine synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional-specific enzyme activities and glutathione levels. *J Neurosci Res*. 58:436-441.
- Kavya R., Saluja R., Singh S. And Dikshit M. (2006) Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*. 15:280-294.
- Kelner G., Lee M., Clark M., Maciejewski D., McGrath D., Rabizaden S. Maki R. (2000) The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. *J Biol Chem*. 275:580-584.

- Kelley B. and Petersen R. (2007) Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin.* 25:577-609.
 - Kelly R. and Strick P. (2004) Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex: use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog Brain Res.* 143:449-459
 - Kjaer A., Laursen K., Thormann L., Borggaard O. and Lebech P., (1993) Copper release from copper intrauterine devices removed after up to 8 years of use. *Contraception.* 47:349-358.
 - Knobloch L., Ziarnik M., Howard J., Theis D., Farmer D., Anderson H. Proctor M. (1994) Gastrointestinal upsets associated with ingestion of copper-contaminated water. *Environ Health Perspect.* 102:958-961.
 - Knowles R. and Moncada S. (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J.* 298:249-258.
 - Kopin, I.J. 1992. Features of the dopaminergic neurotoxin MPTP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 648:96-104.
 - Lamas S., Marsden P., Li G., Tempst P. and Michel T. (1992) Endothelial nitric oxide synthase molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:6348-6352.
 - Langston J., Ballard P., Tetrud J. and Irwin L. (1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science.* 219:979-980.
 - Lecyk M. (1980) Toxicity of CuSO₄ in mice embryonic development. *Zool Pol.* 28:101-105.
 - Levenson C., Cutler R., Ladenheim B., Cadet J., Hare J. and Mattson M. (2004) Role of dietary iron restriction in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 190:506-514.
 - Linder McC. and Hazegh-Azam M. (1996) Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 63:797s-811s.
 - Linder McC., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R. and Lomeli N. (1998) Copper transport. *Am J Clin Nutr.* 67:965s-971s.
- Lotharius J., Dugan L. and O'Malley K. (1999) Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 19:1284-1293.

- Lovell M., Robertson J., Teesdale W., Campbell J. and Markesbery W. (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci.* 158, 47-52.
 - Lowenstein, C. and Snyder, S. (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell.* 70:705-707.
 - Lowry O, Rosebrough N, Farr A *et al* (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 - Lyubimov A., Smith J., Rousselle S., Mercieca M., Tomaszewski J., Smith A. and Levine B. (2004) The effects of tetrathiomolybdate (TTM, NSC-714598) and copper supplementation on fertility and early embryonic development in rats. *Reproduc Toxicol.* 19:223-233.
- Masliah E. and Hashimoto M. (2002) Development of new treatment for Parkinson's disease in transgenic animal model: A role for β -Synuclein. *Neurotoxicology.* 23:461-468.
- Martyshkin D., Mirov S., Zhuang Y., Crow J., Ermilov V. and Beckman J. (2003) Fluorescence assay for monitoring Zn-deficient superoxide dismutase in vitro. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 59:3165-3175.
 - Marzin D. and Phi H. (1985) Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium* TA 102. *Mutat Res.* 155:49-51.
 - Menkes D. (1997) Hazardous drugs in developing countries. *BMJ.* 315:1557-1558.
 - Miller, D. B., Reinhard, J. F., Daniels, A. J. and O'Callaghan, J. P. (1991) Diethyldithiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 57:541-549.
 - Mizuno Y., Yoshino H., Ikebe S., Hattori N. and Kondo T. (1998) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Ann Neurol.* 44:s99-s109.
 - Mochizuki H., Imai H., Endo K., Yokomizo K., Murata Y., Hattori N. and Mizuno Y. (1994) Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurosc Lett.* 168:251-253.
 - Molina J., Jimenez-Jimenez F., Navarro J., Vargas C., Gomez P. and Arenas J. (1996) Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 93:123-126.
 - Moncada, S., Palmer, R. and Higgs, E. 1991. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142.

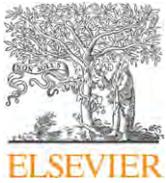
- Morioka, M., Hamada, J., Ushio, Y. and Miyamoto, E. 1998. Potential role of calcineurina for brain ischemia and traumatic injury. *Prog Neurobiol.* 58:1-30.
 - Morita H., Ikeda S., Yamamoto K., Morita S., Yoshida K., Nomoto S., Kato M. and Yanagisawa N., (1995) Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: A clinicopathological study of a Japanese family. *Ann Neurol.* 37:646-656.
 - Morrish P., Sawle G. and Brooks D. (1996) An $\{^{18}\text{F}\}$ dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain.* 119:585-591.
 - Muller T., Feichtinger H., Berger H. and Muller W. (1996) Endemic Tyrolean infantile cirrhosis: an ecogenetic disorder. *Lancet.* 347:877-880.
 - Nagatsu T, Biopterin cofactor and regulation of monoamine-synthesizing mono-oxygenase. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2: 276-9.
 - Nagatsu T, Levitt M, Uderfriend S. Tyrosine hydroxylase : the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*1964; 239:2910-7.
 - Obeso J., Rodríguez-Oroz M. and Zamarbide I. (2002) Enfermedad de Parkinson. Perspectivas. Capitulo 6. Enfermedades neurodegenerativas. Editado por Farmaindustria, Editores Segovia de Arana J. y Mora Teruel F. pag:71-83.
 - O'Donohue J., Reid M., Varghese A., Portmann B. and William R. (1993) Case report: Micronodular cirrhosis and acute liver failure due to chronic copper self-intoxication. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 5:561-562.
 - Olsen M., Roberds S., Ellerbrock B., Fleck T., McKinley D. and Gurney M. (2001) Disease mechanisms revealed by transcription profiling in SOD1-G93A transgenic mouse spinal cord. *Ann Neurol.* 50:730-40.
 - Osaki, S. and Johnson, D. Mobilization of liver iron by ferroxidase (ceruloplasmin). *J Biol Chem.* 1969; 244: 5757-58.
- Outeiro F. and Lindquist S. (2003) Yeast cell provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology. *Science.* 302:1772-1775.
- Pakkenberg, B., Muller, A., Gundersen, H., Mouritzen, A. and Pakkenberg, H. 1991. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J. Neurol. Neurosury. Psychiatry.* 54:30-33.
 - Pall H., Williams A., Blake D., Lunec J. and Hall M. (1987) Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in Parkinson's disease. *Lancet.* 1:238-241.

- Panda K., Rosenfeld R., Ghosh S., Meade A., Getzoff E. and Stuehr D. (2002) Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II and III. *J. Biol. Chem.* 277:31020-31030.
- Paxinos G, and Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Acad Press.
- Pearce, R., Owen, A. and Daniel, S. (1997) Alteration in the distribution of the glutathione in the substantia nigra of Parkinson's disease. *J Neurol Transm*; 104: 661-667.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, and Ríos C (1998) Nitric Oxide Synthase prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res.* 23(10):1297--1302.
- Pérez-Severiano F, Santamaría A, Ríos C, and Segovia J. (2004) Increased formation of reactive oxygen species, but no changes in glutathione peroxidase activity, in striata of mice transgenic for the Huntington's disease mutation. *Neurochem Res.* 29(4):729--733.
- Perry T.L. and Yong V.W. (1986) Ideopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett.* 67:269-274.
- Petris M., Smith K., Lee J. and Thiele D. (2003) Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem.* 278:9639-9646.
- Poewe W. (1998) Should treatment of Parkinson's disease be started with a dopamine agonist? *Neurology.* 50:s19-s22.
- Prohaska J. and Gybina A. (2004) Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr.* 134:1003-1006.
- Prohaska, J. R. (1991) Changes in cu,zn-Superoxide-Dismutasa Cytochrome c Oxidase, Glutathione Peroxidase and Glutathione Transferase activities in Copper-Deficient mice and rats. *J. Nutr.* 121:355-363.
- Prohaska, J. R. (1997) Neurochemical roles of copper as an antioxidant or prooxidant. In: Connor, J.R., ed. *Metals and oxidative damage in neurological disease*. New York: Plenum Pres. 57-75.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Yokoyama R., Shibata T., Dawson V. and Dawson T. (1996) Role of neural nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4565-4571.

- Rasia R., Bertocini C., Marsh D., Hoyer W., Cherny D., Zweckstetter M., Griesinger C., Jovin T. and Fernández C. (2005) Structural characterization of copper(II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 102:4294-4299.
- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W., Reynolds, G., Hebenstreit, G. and Youdim, M. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 52:515-520.
- Ríos 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.
- Rivera-Mancía S., Ríos C., Pérez-Neri I. and Montes S. (2009) Copper and iron related mechanisms in neurodegenerative diseases: New therapeutic opportunities. In press.
- Rosen D., Siddique T., Patterson D., Horvitz H. and Brown R. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362:59-62.
- Santamaría A, Flores-Escartín A, Martínez J, and Ríos C. (2003) Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: Contribution of antioxidant systems. *Free Radical Biology and Medicine.* 35(4):418-427.
- Sato M. and Gitlin J. (1991) Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem.* 266:5128-5134.
- Schapira, A., Cooper, J., Dexter, D. and Marsden, C. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54:823-827.
- Scheinberg I. and Sternlieb I. (1994) Is non-Indian childhood cirrhosis caused by excess dietary copper? *Lancet.* 344:1002-1004.
- Schielf M. and Gitlin J. (2006) Copper Homeostasis in the CNS. *Mol Neurobiol.* 33:81-90.
- Schulz J.B. and Beal M.F. (1994) Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 7:333.
- Schulz B., Matthews R., Muqit M., Browne S. and Beal F. (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.* 64:936-939.
- Sethi S., Grover S., and Khodaskar M. (1993) Role copper in Indian childhood cirrhosis. *Ann Trop Paediatr.* 13:3-6.

- Sian J., Dexter D.T., Lees A.J., Daniel S.E., Jenner P. and Marsden C.D. (1994) Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 36:356-361.
- Siciliano G., Piazza S., Carlesi C., Del Corona A., Franzini M., Pompella A., Malvaldi G., Mancuso M., Paolicchi A. and Murri L. (2007) Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 254:575-580.
- Siegel, G. *et al.*, 1998. 6^a Ed. Basic Neurochemistry. Lippincott-Raven. pp. 1183.
- Sies H. (1999) Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27:916-921.
- Sternlieb I. (1990) Copper and the liver. *Gastroenterology.* 78:1615-1628.
- Storch A., Kaftan A., Burkhardt K. and Schwarz J. (2000) 6-hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *J Neural Transm.* 107:281-93.
- Suci L., Prodan L., Lazas V., Ilea E., Cocirla A., Olinici L., Paduraru A., Zagrenau O., Lengyel P., Gyrfi L. And Andrau D. (1981) Research on copper poisoning. *Med Lav.* 3:190-197.
- Sun S. and O'Dell B. (1992) Low copper status of rats affects polyunsaturated fatty acid composition of brain phospholipids, unrelated to neuropathology. *J Nutr.* 122:65-73.
- Tanzi R., Petrukhin K., Chernov I., Pellequer J., Wasco W. and Romano D. (1993) The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet.* 5:344-350.
- Tetriakoff C. (1919) Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de sommering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Paris. Thesis.
- Tinwell H. and Ashby J. (1990) Inactivity of copper sulphate in a mouse bone-marrow micronucleus assay. *Mutat Res.* 245:223-226.
- Toulouse A. and Sullivan A. (2008) Progress in Parkinson's disease-Where do we stand? *Prog Neurobiol.* Doi:10.1016/j.pneurobio.2008.05.003.
- Trumbo P., Yates A., Schlicker S. and Poos, M. (2001) Dietary references intakes: Vitamina A, K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. *J Am Diet Assoc.* 101:294-301.

- von Campenhausen S., Borschein B., Wick R., Bötzel K., Sampaio C., Poewe W., Oertel W., Berger K. and Dodel R. (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* 15:473-490.
- Vulpe C., Yien-Ming K., Murphy T., Lex C., Askwith C., Libina N., Gitschier J. and Anderson G. (1999) Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat Genet.* 21:195-199.
- Waggoner, D., Bartnikas, T. and Gitlin, D. (1999) The role of Copper in Neurodegenerative Disease. *Neurobiol Dis.* 6:221-230.
- Walter U., Niehaus L., Probst T., Benecke R., Meyer B. and Dressler D. (2003) Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes. *Neurol.* 60:74-77.
- Williams D. (1983) Copper deficiency in humans. *Semin Hematol*, 20:118-128.
- Xie, Q. and Nathan, C. 1992. Cloning and Characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 256:225-228.
- Xu Z., Lew Y., Harada K., Aman K., Goldstein M., Deutch W., Haycock J. and Hokfelt T. (1998) Immunohistochemical studies on phosphorylation of tyrosine hydroxylase in central catecholamine neurons using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Neuroscience.* 82:727-738.
- Youdim M. and Riederer P. (1997) Understanding Parkinson's disease. *Sci. Am.* 276:52-59.
- Zhang Z. and Roman G. (1993) Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an update review. *Neuroepidemiology.* 12:195-208.



Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP⁺ in rats

M. Rubio-Osornio^a, S. Montes^a, F. Pérez-Severiano^a, P. Aguilera^b, E. Floriano-Sánchez^c,
A. Monroy-Noyola^d, C. Rubio^a, C. Ríos^{a,*}

^a Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez", Insurgentes Sur 3877, La Fama, México, D.F., C.P. 14269, Mexico

^b Departamento de Patología Vascular Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", México D.F., Mexico

^c Departamento de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., Mexico

^d Laboratorio de Neuroprotección, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 August 2008

Received in revised form 20 January 2009

Accepted 22 January 2009

Available online 6 February 2009

Keywords:

Copper

MPP⁺

Tyrosine hydroxylase

Proteins nitration

Nitric oxide synthase

ABSTRACT

Striatal administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), the active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), causes nigrostriatal dopaminergic pathway damage similar to that observed in Parkinson's disease. Copper acts as a prosthetic group of several antioxidant enzymes and recent data show that copper attenuated MPP⁺-evoked neurotoxicity. We evaluated the effect of copper (as a supplement) upon proteins nitration (60 kDa) and tyrosine hydroxylase (TH) inactivation induced by MPP⁺ (10 μg/8 μL) injection into the rat striatum. Copper pretreatment (10 μmol/kg i.p.) prevented both MPP⁺-induced proteins nitration and TH inactivation. Copper treatment also prevented the dopamine-depleting effect of MPP⁺ injection. Those results were accompanied by a significant reduction of enzymatic activity of the constitutive nitric oxide synthase (cNOS), whereas, the protein levels of the three isoforms of NOS remained unchanged. Results indicate that the effect of copper against MPP⁺-induced proteins nitration and TH inactivation in the striatum of rat may be mediated by a reduction of cNOS activity.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

Parkinson's disease (PD) is a frequent neurodegenerative disorder characterized by the loss of pigmented dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* with subsequent striatal dopamine deficiency (Hochstrasser et al., 2005). The decline in dopamine content has been thought to derive solely from the severe loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway. However, the dopamine deficit in the affected regions of the brain significantly exceeds the loss of dopaminergic neurons, suggesting that dopamine synthesis could be impaired before cellular demise (Ara et al., 1998). Tyrosine hydroxylase (60 kDa) (TH; EC 1.14.16.2) is the rate-limiting enzyme for dopamine synthesis (Kobayashi and Nagatsu, 2005). The loss of ability to synthesize dopamine is an important step in the development of PD. The early loss of TH activity followed by a decline in the TH protein is thought to contribute to the dopamine deficiency and phenotypic expression in PD and the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydrophenylpyridine (MPTP) rodent model of PD (Nagatsu, 1990). TH is modified by nitration after exposure of mice to MPTP. The temporal association of tyrosine nitration with further

inactivation *in vitro* suggests that this covalent post-translational modification is responsible for the *in vivo* loss of TH function (Ara et al., 1998). The neurotoxic effects of MPTP are thought to be due to its metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), which is selectively taken up by the high-affinity dopamine uptake system and is subsequently accumulated within mitochondria of dopaminergic neurons, where it disrupts oxidative phosphorylation by inhibiting complex I of mitochondrial electron transport chain. The interruption of oxidative phosphorylation results in decreased levels of ATP (Blum et al., 2001), which in turn may lead to partial neuronal depolarization and secondary activation of voltage-dependent NMDA receptors, and excitotoxic neuronal cell death (Ikonomidou and Turski, 1996). The entry of calcium through NMDA receptor channels into cells stimulates nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.13.39) activity by its binding to calmodulin, a cofactor for NOS (Bredt and Snyder, 1990). Furthermore, nitric oxide (NO·) may react with superoxide anion radical (•O₂⁻) to generate peroxynitrite (ONOO⁻) (Quijano et al., 2001), which in turn promotes nitration of tyrosine (Blanchard-Fillion et al., 2001).

On the other hand, copper is considered an essential transition metal that plays a critical role in the biochemistry of the nervous system, functioning as an enzymatic prosthetic group in pathways for cellular respiration, catecholamine biosynthesis, iron oxidation

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56063822x2006; fax: +52 55 54240808.

E-mail address: crios@correo.xoc.uam.mx (C. Ríos).

and antioxidant defense (Cullota and Gitlin, 2001). Furthermore, it has been reported that copper acts as a modulator of neuronal transmission and that the release of copper from neurons may regulate NMDA receptor activity (Schlief and Gitlin, 2006). 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 (Miller et al., 1991). Our group had previously showed the neuroprotective effect of both acute and chronic administration of copper sulfate against MPP⁺-induced neurotoxicity (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001a) and a significant increase of manganese-dependent superoxide dismutase (SOD; 1.15.1.1) activity in mice (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001b), suggesting that the load of copper could be responsible for neuroprotection against damage elicited by superoxide radical.

The primary objective of the present study was to determine the possible effect of copper administration upon nitrosative damage of proteins and TH inactivation evoked by a single unilateral intrastriatal injection of MPP⁺ as a model of Parkinson's disease in the rat brain. Our secondary objective was to determine the effect of copper on NOS expression and activity in the present model.

1. Experimental procedures

1.1. Animals

Male Wistar rats (250–280 g body weight) were used throughout the study. Animals were housed in acrylic box cages and placed in room under constant conditions of temperature, humidity and lighting (12 h light/dark cycles) and provided with a standard commercial rat chow diet and water *ad libitum*. Rats were administered with a single intraperitoneal (i.p.) dose of CuSO₄ 10 μmol/kg corresponding to 2.5 mg/kg of CuSO₄·5H₂O (Santamaría et al., 2003). The control group was treated with an equimolar dose of Na₂SO₄. Sodium sulfate solution was used to control for the possible effect of sulfate ions on the end-points measured (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001a).

1.2. Intrastriatal administration of MPP⁺

Twenty four hours after either CuSO₄ or Na₂SO₄ pretreatment, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and 15 min later, infused for 5 min with a single intrastriatal (i.s.) stereotaxic microinjection of MPP⁺ iodide (10 μg/8 μL) (Sigma–RBI, St. Louis, MO, U.S.A.) dissolved in sterile saline and injected at the following stereotaxic coordinates: 0.5 mm anterior to bregma, –3.0 mm lateral to bregma and –4.5 mm ventral to the dura (Paxinos and Watson, 1998) in the right striatum. Control animals were administered i.p. with either Na₂SO₄ or CuSO₄ and i.s., with 8 μL sterile saline. Animals from all groups were sacrificed by decapitation 6 h after MPP⁺ administration and both their striata were dissected out according to Glowinski and Iversen (1966), and stored at –70 °C until utilization.

1.3. Striatal dopamine levels measurement

HPLC with electrochemical detection was used to measure striatal levels of DA, as described previously (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001a). Samples obtained 6 h after the MPP⁺ injection were sonicated into 10 volumes of perchloric acid–sodium metabisulfite solution (1 M, 0.1%, w/v), centrifuged at 10,000 × g for 10 min and supernatants were analyzed. Data were collected and processed by interpolation into a standard curve. Results are expressed as μg of DA per gram of wet tissue weight.

1.4. TH activity

Striatal TH activity was assayed by measuring the accumulation of L-DOPA after the systemic administration of a centrally active inhibitor of DOPA decarboxylase (DDC; EC 4.1.1.28) 3-hydroxybenzylhydrazine dihydrochloride (MP Biomedicals, OH, USA), as described by Gutiérrez-Reyes et al. (1998). Briefly, 30 min prior killing animals they received a systemic administration of 3-hydroxybenzylhydrazine (100 mg/kg). Brains were then removed and the striatal tissue from all groups was dissected out on ice, homogenized in ten volumes of perchloric acid–sodium metabisulfite solution (1 M, 0.1%, w/v) and centrifuged at 10,000 × g for 10 min. The content of L-DOPA was then analyzed by HPLC-EC (column Alltech 100 mm × 4.5 mm) using a Perkin-Elmer pump LC-250, a Metrohm electrochemical detector (mod. 641-VA) and a Hewlett-Packard 3396-II integrator. Calibration curves were constructed for L-DOPA and the samples concentrations were calculated by interpolation into a standard curve.

1.5. SDS-PAGE and Western blot of proteins nitration and TH detection

Striatal tissue from all groups was homogenized in 380 μL of buffer (50 mM Tris–HCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% β-mercaptoethanol, pH 7.5) containing a cocktail of protease inhibitors (100 μM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μg/mL aprotinin, 10 μg/mL soybean trypsin inhibitor) and 0.1% (v/v) Nonidet NP-40. Protein content in the homogenates were determined according to Lowry et al. (1957). Western blots were carried out using 50 μg of protein per lane on 10% SDS–polyacrylamide gel and transferred onto Hybond polyvinylidene fluoride membrane (PVDF, Amersham, UK). After that, the PVDF membrane was blocked in PBS containing 5% skim milk and 0.05% Tween 20 for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with monoclonal antibodies against nitrotyrosine and against tyrosine hydroxylase (Zymed) at a final dilution of 1:1000 and 1:2000, respectively. After incubation with primary antibodies, membranes were washed and incubated with the secondary goat anti-mouse peroxidase-labeled antibody (Zymed) diluted 1:2000 in the blocking solution for 1 h at room temperature. Blots were extensively washed and bands were identified by chemiluminescence using the ECL detection system (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and then exposed to film (Kodak BioMax XAR Film, Rochester, NY). Blots were stripped and as a control β-actin levels were determined by using a monoclonal antibody at a final dilution 1:300 (García-Tovar et al., 2002). Images from films were analyzed by standard densitometry procedures analysis performance using the Image J 4.0 System (Sony). Densitometry results of nitrotyrosine were normalized to TH control and in turn, TH was normalized to β-actin. Data are expressed as normalized optical density (OD) arbitrary units.

1.6. Striatal nitric oxide synthase activity

NOS activity was measured based on the stoichiometric conversion of L-arginine to NO and L-citrulline (Bredt and Snyder, 1990), with slight modifications as extensively described (Pérez-Severiano et al., 1998). Briefly, we used the same homogenized samples that were employed for the SDS-PAGE and Western blot measurements. A volume of homogenized tissue containing 500 μg of protein was incubated for 30 minutes at 37 °C in the presence of 10 μM L-arginine–HCl, 0.2 μCi [³H]-L-arginine, 1 mM NADPH, 100 nM calmodulin, 2.5 mM CaCl₂, and 30 μM tetrahydrobiopterine. To assay the activity of inducible Ca²⁺-independent NOS, the incubation was performed in the presence of 0.1 mM EGTA and 0.1 mM EDTA without CaCl₂ added. Reactions were stopped by adding a buffer containing 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH 5.5. The reaction mixture was applied onto a 1 mL column of cation interchange resin (Dowex-50W), which had been previously equilibrated with stop buffer. This column retains labeled arginine and allows [³H]-L-citrulline to elute through the column. [³H]-L-citrulline was quantified using a Beckman LS6500 scintillation counter. Results were expressed as ng [³H]-L-citrulline/500 μg of protein per 30 min.

1.7. Statistics

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by the Tukey's test for multiple comparisons. Values *p* < 0.05 were considered of statistical significance.

2. Results

2.1. Striatal DA content

The group of animals administered intraperitoneally with Na₂SO₄ and intrastrially with sterile saline was considered as the control group. Levels of DA in this group were 109.1 ± 7.06 μg/g wet tissue (100%). The pretreatment with CuSO₄ produced no effect on striatal DA levels (124.6 ± 7.9 μg/g wet tissue; 114.2% vs. control). In contrast, after injection of MPP⁺ (10 μg/8 μL), a significant decrease (*p* < 0.05) was found in DA concentrations (72.93 ± 3.5 μg/g wet tissue; 66.84% vs. control). Whereas the pretreatment with 10 μmol/kg of CuSO₄ to MPP⁺-treated rats produced a significant preservation of DA content (103.2 ± 6.79 μg/g wet tissue; 94.59% vs. control) (Fig. 1).

2.2. TH activity

L-DOPA accumulation in striatum of animals administered i.p. with Na₂SO₄ (10 μmol/kg) and 8 μL intrastriatal saline solution was 6.79 ± 0.59 μg/g wet tissue. Copper pretreatment slightly increased L-DOPA (7.50 ± 0.73 μg/g wet tissue) without reaching statistical significance. MPP⁺-injection to rats caused a marked decrease of TH activity, 3.38 ± 0.39 μg/g wet tissue (*p* < 0.05)

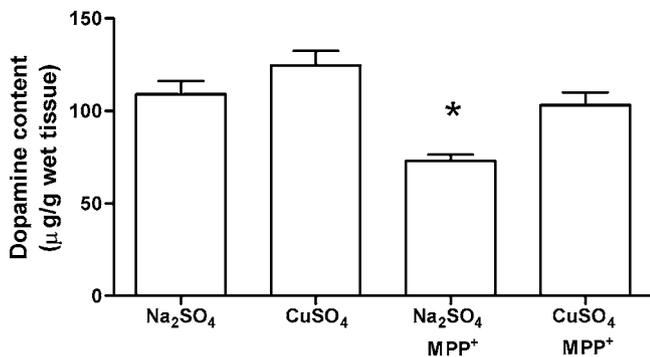


Fig. 1. Effect of 10 µmol/kg of CuSO₄ on striatal dopamine content on MPP⁺ rat model. Results are expressed as mean ± S.E.M. of 5–7 animals per group. **p* < 0.05 in dopamine content from MPP⁺-treated group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

compared to control groups, as shown in Fig. 2. However, administration of CuSO₄ to MPP⁺-treated rat, prevented TH activity reduction (6.13 ± 0.96 µg/g wet tissue) to control values. Striatal L-DOPA levels in sham rats without 3-hydroxybenzylhydrazine, did not show detectable levels of L-DOPA (data not shown).

2.3. 60 kDa protein nitration and TH expression

Six hours after intrastriatal MPP⁺ (10 µg/8 µL) injection, an increased signal corresponding to proteins nitration at 60 kDa was observed (Fig. 3A). Copper (10 µmol/kg) pretreatment statistically diminished the immunoreactivity associated with the nitration of this protein, thus, preventing MPP⁺-induced nitration. To evaluate the effect of surgical manipulation upon proteins nitration of sham operated rats, three animals were operated and nitration of proteins was measured. Moreover, one group (*n* = 3) of naïve-to-treatment rats was also analyzed. Neither sham nor naïve animals presented values of nitration different from those of the Na₂SO₄ control group (data not shown). Densitometry analysis of TH from all groups studied remained unchanged in the striatal tissue. Densitometry analysis of proteins nitrated in all groups is shown in Fig. 3B.

2.4. Striatal nitric oxide synthase expression

Results of the immunoblot signals corresponding to nNOS, iNOS and eNOS proteins did not show statistical differences among experimental groups (data not shown).

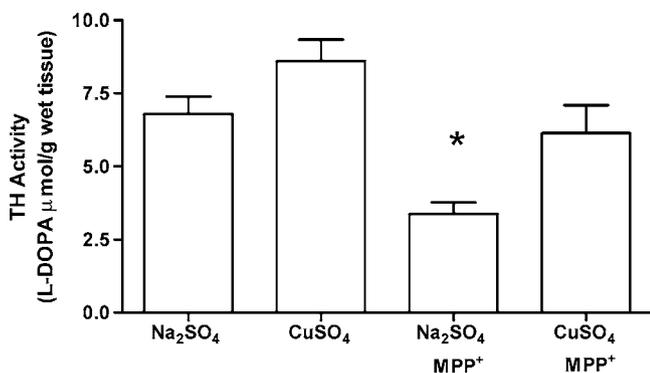


Fig. 2. Copper effect on tyrosine hydroxylase activity on MPP⁺ rat model. The TH activity was assayed by treating with 3-hydroxybenzylhydrazine 30 min previous to L-DOPA analysis. Results are expressed as mean ± S.E.M. of 5–7 animals per group. **p* < 0.05 in L-DOPA content from MPP⁺-treated group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

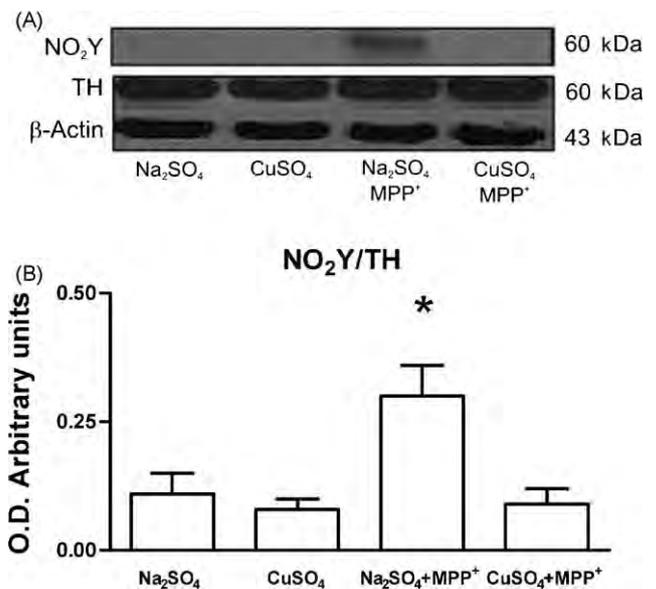


Fig. 3. Copper (10 µmol/kg) effect upon proteins nitration level and TH expression on MPP⁺-induced striatal neurotoxicity. (A) Representative Western blot of nitration of tyrosine residues (NO₂Y) was evaluated by immunoreactivity with the anti-3-nitrotyrosine antibodies. Nitration levels of proteins of 60 kDa was normalized with respect to TH expression. The TH signal was normalized with β-actin. (B) Densitometric analysis of NO₂Y/TH expression ratio in striatal tissue. Each bar represents mean ± S.E.M. of 5 animals per group. **p* < 0.05 significantly different from copper-treated groups and control group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

2.5. Striatal nitric oxide synthase activity

Enzymatic activity of striatal NOS was also assayed 6 h after MPP⁺ injection. The sodium sulfate-treated group showed levels of Ca²⁺-dependent NOS activity (constitutive nitric oxide synthase, cNOS) (5.31 ± 0.24 ng L-citrulline/500 µg protein/30 min 100%), similar to those of the copper pretreated group (5.68 ± 0.42 ; 106% vs. control). However, NOS activity was found increased (8.23 ± 0.45 ; 155% vs. control; *p* < 0.05) in the MPP⁺-treated group. Pretreatment with copper attenuated this effect of MPP⁺ on Ca²⁺-dependent NOS activity (5.633 ± 0.11 ; 106% vs. control). Calcium-independent NOS activity remained unchanged in the striatal tissue from all groups studied and no statistical differences were found among groups (Fig. 4).

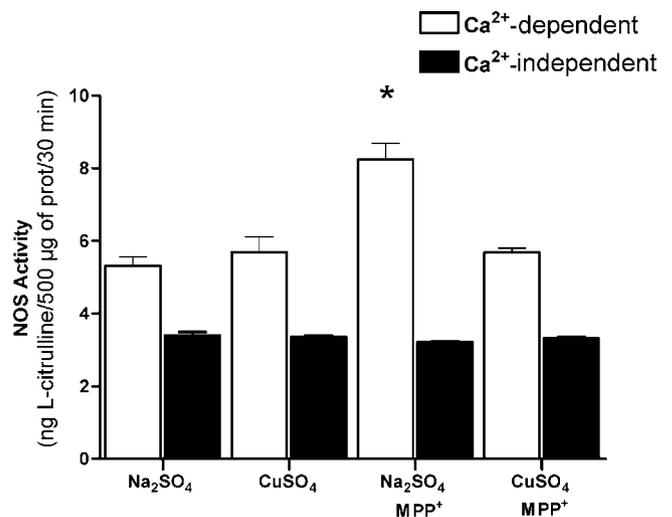


Fig. 4. Striatal activity of Ca²⁺-dependent and -independent nitric oxide synthase. Results are expressed as mean ± S.E.M. of 5–7 animals per experimental group. **p* < 0.05 in ng of L-citrulline produced from MPP⁺-treated group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

3. Discussion

In the present study, we evaluated the role of copper supplement upon dopaminergic neuronal damage in the rat corpus striatum 6 h after MPP⁺ intra-striatal injection. Copper is an important dietary component as it is essential for human and animal development (Olivares and Uauy, 1996). Copper is involved in several metabolic processes and it is also required as a prosthetic group for the activity of some enzymes functioning on relevant antioxidant defense systems, such as Cu, Zn-SOD (Hartmann and Evenson, 1992). Likewise, it has been demonstrated a neuroprotective effect of copper on MPP⁺-induced neuronal damage in mouse model of PD (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001b), suggesting that copper administration may activate or induce the synthesis of copper-dependent proteins responsible for cellular defense against MPP⁺ insult.

TH inactivation and thus dopamine synthesis failure is an early event in MPP⁺ neurotoxic process as a model of PD (Nagatsu, 1990). Three distinct phases have been described for TH activity and TH content after MPP⁺ administration: In the early phase, minutes after MPP⁺ administration, there is a decreased TH activity without changes in the TH protein concentration. The loss of TH activity in this phase is attributed to the inhibition of the enzyme phosphorylation. The middle phase, after 3 h of exposure to MPP⁺, is again characterized by decreased TH activity without changes in the TH protein levels; but in this case, the decreased TH activity is linked to an inactivation of the enzyme by tyrosine nitration. The late phase, in which both TH activity and TH protein content are significantly decreased, occurs 6 h after MPP⁺ administration (Nagatsu, 1990; Ara et al., 1998). In the present study, 6 h after striatal MPP⁺-injection, a decline of dopamine levels was observed; this marker was accompanied by a loss in TH activity without a decrease in the striatum TH protein signal which correlate with MPP⁺-induced signal of nitrated proteins.

The presence of proteins nitrated implies the formation of a nitrating agent after MPP⁺ insult. Intra-striatal administration of MPP⁺ stimulate the production of the [•]O₂⁻ anion radical (Schulz et al., 1997), this reactive molecule reacts at an extremely fast rate with the NO[•] radical to produce OONO⁻ ion, which in turn promotes nitration of tyrosine residues (Blanchard-Fillion et al., 2001). TH is a selective target for peroxynitrite-induced tyrosine nitration. Nitration of a single tyrosine residue within TH catalytic domain appears to be sufficient to impair its catalytic activity (Ara et al., 1998). Interestingly, in this work we found that 10 μmol/kg of copper supplement reduced protein nitration while preserving both DA content and TH activity, then, it is possible that protein nitrated at 60 kDa might correspond to nitrated TH. In a previous work (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001b) we reported that copper administration in mice leads to increased Mn-SOD activity by as much as sevenfold vs. control group. Thus, it is possible that the dismutation of superoxide to hydrogen peroxide and oxygen occurs many times faster in copper-treated animals than in MPP⁺-treated rats, explaining the reduced protein nitration in the latter group. However, those results were obtained in mice and the present work was carried out in rats, so it is difficult to translate the previous results to the present experiments. We have also found that copper supplement to rats is able to induce the activity of the Cu, Zn-SOD (Santamaría et al., 2003). In any case a reduction of the [•]O₂⁻ formation after copper administration is expected.

On the other hand, MPP⁺ striatal injection raised Ca²⁺-dependent NOS activity, as it has been previously demonstrated (Schulz et al., 1995). Copper administration to MPP⁺-treated rats prevented the increase of Ca²⁺-dependent NOS activity. Russell et al. (1997) previously showed that nNOS plays an important role in MPP⁺ neurotoxicity in mutant mice lacking either the nNOS gene

or the eNOS gene. Both striatal lesion volume and *substantia nigra* degeneration were significantly attenuated in the nNOS mutant mice but not in the eNOS mutant mice, indicating that neuronal dopaminergic damage involves nNOS activation. Inhibition of nNOS by 7-nitroindazole protects against MPTP-neurotoxicity in mice (Schulz et al., 1995). Several other studies suggest that NO[•] contributes to cell death following activation of NMDA receptors in cultured cortical, hippocampal, and striatal neurons (Vlachová et al., 1996). Copper ions have been involved in neurophysiological functions because they can be released from nerve terminals, influencing neuronal transmitter systems (Trombly and Shepherd, 1996) and modulating glutamate receptors in hippocampal neurons (Schlief et al., 2005). In this regard, copper could be acting by modulating NMDAR activity, a possible mechanism is that free copper ions are able to antagonize the responses mediated by NMDAR, also suggesting that copper may act on an extracellular binding site of the NMDA receptor-channel complex, probably a redox modulatory site (Vlachová et al., 1996) inhibiting calcium influx and thus inhibiting Ca²⁺-dependent NOS activation. In addition, copper could be acting at a different level, specifically on NOS activity, this assumption is based on studies showing that nNOS was inhibited after copper uptake, as revealed by the decrease of basal intracellular cGMP levels in C6 cell culture. Furthermore, *in vitro* experiments showed that copper selectively blocked the catalytic activity of nNOS, but not of iNOS, suggesting the presence of a putative copper-binding site located between the heme group and the dimmer interface, with a binding at His125, Tyr491, Asp460 residues and the main chain carbonyl group of Met 120 of the protein (Colasanti et al., 2000). However, we cannot rule out the possibility that acute copper administration could inhibit the dopamine transporter protein in the same manner as it has been reported for acute manganese administration (Chen et al., 2006) preventing MPP⁺ access into the neurons and thus interfering with MPP⁺ toxicity at this level.

In conclusion, results from the present work suggest that copper may exert a protective effect in the MPP⁺ model of PD possibly by a reduction in Ca²⁺-dependent NOS activity, which in turn inhibit nitrating agent formation and then diminish TH nitration level.

Acknowledgments

We are grateful to Dr Gabriel Roldán for his valuable comments. This study was partially supported by CONACYT 51541. Rubio-Osornio, M. is fellowship CONACYT (144225). The authors thanks to the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Alcaraz-Zubeldia, M., Rojas, P., Boll, C., Ríos, C., 2001a. Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP⁺ neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* 26, 61–66.
- Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., Ríos, C., 2001b. Participation of manganese-superoxide dismutase in the neuroprotection exerted by copper sulfate against 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Brain Res. Bull.* 55, 277–279.
- Ara, J., Przedborski, S., Naini, A., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R., Ischiropoulos, H., 1998. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 7659–7663.
- Blanchard-Fillion, B., Souza, J.-M., Friel, T., Jiang, G.-C., Vrana, K., Sharov, V., Barrón, L., Schöneich, C., Quijano, C., Alvarez, B., Radi, R., Przedborski, S., Fernando, G.-S., Horwitz, J., Ischiropoulos, H., 2001. Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 276, 46017–46023.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.-L., Sadoul, R., Verna, J.-M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 65, 135–172.
- Bredt, D.-S., Snyder, S.-H., 1990. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 682–685.

- Chen, M., Lee, J., McGlothlan, J., Furukawa, E., Adams, R., Alexander, M., Wong, D., Guilarte, T., 2006. Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in the non-human primate striatum. *Neurotoxicology* 27, 229–236.
- Colasanti, M., Persichini, T., Venturini, G., Polticelli, F., Musci, G., 2000. Modulation of the nitric oxide pathway by copper in glial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 776–782.
- Cullota, V.-C., Gitlin, J.-D., 2001. The disorders of copper transport. In: Scriver, C.-R., Beaudet, A.-L., Sly, W.-S., Valle, D. (Eds.), *The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3. McGraw-Hill, New York, pp. 3105–3126.
- García-Tovar, C.-G., Luna, J., Mena, R., Soto-Zárate, C.-I., Cortés, R., Pérez, A., León-Avila, G., Mornet, D., Rendón, A., Hernández, J.-M., 2002. Dystrophin isoform Dp71 is present in lamellipodia and focal complexes in human astrocytoma cell U-373 MG. *Acta Histochem.* 104, 245–254.
- Glowinski, J., Iversen, 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.
- Gutiérrez-Reyes, E.-Y., Albores, A., Ríos, C., 1998. Increase of striatal dopamine release by cadmium in nursing rats and its prevention by dexamethasone-induced metallothionein. *Toxicology* 131, 145–154.
- Hartmann, H.-A., Evenson, M.-A., 1992. Deficiency of copper can cause neuronal degeneration. *Med. Hypot.* 38, 75–85.
- Hochstrasser, H., Tomiuk, J., Walter, U., Behnke, S., Spiegel, J., Krüger, R., Riess, O., Berg, D., 2005. Functional relevance of ceruloplasmin mutations in Parkinson's disease. *FASEB J.* 19, 1851–1863.
- Ikonomidou, C., Turski, L., 1996. Neurodegenerative disorders: clues from glutamate and energy metabolism. *Crit. Rev. Neurobiol.* 10, 239–263.
- Kobayashi, K., Nagatsu, T., 2005. Molecular genetics of tyrosine 3-monooxygenase and inherited disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 267–270.
- Lowry, O.-H., Rosebrough, N.-J., Farr, A.-L., Randall, R.-J., 1957. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Miller, D.-B., Reinhard Jr., J.-F., Daniels, A.-J., O'Callaghan, J.-P., 1991. Diethyldithiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 57, 541–549.
- Nagatsu, T., 1990. Change of tyrosine hydroxylase in the Parkinsonian brain and in the brain of MPTP-treated mice as revealed by homospesific activity. *Neurochem. Res.* 15, 425–429.
- Olivares, M., Uauy, R., 1996. Copper as an essential nutrient. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 791S–796S.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Acad. Press, New York.
- Pérez-Severiano, F., Escalante, B., Ríos, C., 1998. Nitric oxide synthase prevents acute quinolinic acid-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 23, 1297–1302.
- Quijano, C., Hernández-Saavedra, D., Castro, L., McCord, J.-M., Freeman, B.-A., Radi, R., 2001. Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J. Biol. Chem.* 276, 11631–11638.
- Russell, T.-M., Beal, M.-F., Fallon, J., Fedorchak, K., Huang, P.-L., Fishman, M.-C., Hyman, B.-T., 1997. MPP⁺-induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 4, 114–121.
- Santamaría, A., Flores-Escartín, A., Martínez, J., Osorio, L., Galván-Arzate, S., Ríos, C., 2003. Copper blocks quinolinic acid neurotoxicity in rats: contribution of antioxidant systems. *Free Rad. Biol. Med.* 35, 418–427.
- Schlieff, M.-L., Craig, A.-M., Gitlin, J.-D., 2005. NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 25, 239–246.
- Schlieff, M.-L., Gitlin, J.-D., 2006. Copper homeostasis in the CNS: a novel link between the NMDA receptor and copper homeostasis in the hippocampus. *Mol. Neurobiol.* 33, 81–90.
- Schulz, J.-B., Matthews, R.-T., Klockgether, T., Dichgans, J., Beal, M.-F., 1997. The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol. Cell. Biochem.* 174, 193–197.
- Schulz, J.-B., Matthews, R.-T., Muqit, M.-M., Browne, S.-E., Beal, M.-F., 1995. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.* 64, 936–939.
- Trombly, P.-Q., Shepherd, G.-M., 1996. Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons. *J. Neurophysiol.* 76, 2536–2546.
- Vlachová, V., Zemková, H., Vyklícký Jr., L., 1996. Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 8, 2257–2264.