



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE IMÁGENES PET CON $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ Y $[^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$
EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON SUPLEMENTADOS CON
COBRE**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

CARLOS ANTONIO GÓMEZ PERALTA

TUTOR PRINCIPAL
DR. MIGUEL ÁNGEL ÁVILA RÓDRIGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. HÉCTOR ALVA SÁNCHEZ
INSTITUTO DE FÍSICA

DR. SARAEL ALCATEUR SOLORZANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CIUDAD DE MÉXICO; ABRIL 2020



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.

A mi madre,
Rosa Linda Peralta García[†]

Agradecimientos institucionales

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.
- A los programas DGAPA-PAPIIT IT202518, CONACYT APN-2017-4837 y 233815, y el Organismo Internacional de Energía Atómica CRP F22067 RC20569, por el apoyo para la realización de esta investigación.
- Al personal de la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón de la Facultad de Medicina por la producción y control de calidad de los radiofármacos utilizados: Fernando Trejo, Gabriela Contreras, Héctor Gama, Armando Flores, Adolfo Zárate, Rubén Tecuapetla, Ulises Rabadán y Efraín Zamora.
- Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM, por los recursos otorgados para asistir al LXI Congreso Nacional de Física; Puebla, Puebla del 7 al 12 de octubre 2018.
- A la Unidad Radiofarmacia-Ciclotrón de la Facultad de Medicina por los recursos otorgados para asistir al XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedad de Biología y Medicina Nuclear; Lima, Perú, del 13 al 16 de noviembre del 2019.

Índice General

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Marco teórico | 4 |
| 2.1 Medicina nuclear | 4 |
| 2.2 Enfermedad de Parkinson | 6 |
| 2.2.1 Generalidades del cerebro humano | 6 |
| 2.2.2 Enfermedad de Parkinson | 7 |
| 2.2.2 Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson | 8 |
| 2.2.3 Medicina nuclear en la Enfermedad de Parkinson | 9 |
| 2.3 El cobre en la Enfermedad de Parkinson | 11 |
| 2.3.1 El cobre sistémico | 11 |
| 2.3.2 El cobre en el cerebro | 13 |
| 2.4 Radionúclidos de cobre | 15 |
| 3. Metodología Experimental | 17 |
| 3.1 Producción de radiofármaco ^{18}F -6-Fluorodopamina | 17 |
| 3.2 Producción del radionúclido ^{64}Cu | 17 |
| 3.3 Estudios PET/CT | 19 |
| 3.4 Biodistribución sistémica de ^{64}Cu en pacientes con EP | 22 |
| 3.5 Procesamiento de imágenes cerebrales | 24 |
| 3.6 Análisis Estadístico | 26 |
| 4. Resultados y Discusión | 29 |
| 4.1 Producción de Cu-64 | 29 |
| 4.2 Biodistribución sistémica de ^{64}Cu en pacientes con EP | 30 |
| 4.3 Diagnóstico usando ^{18}F -6-Fluorodopamina | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4 Biodistribución cerebral de ^{64}Cu | 38 |
| 4.5 Análisis de imágenes post-suplementación | 42 |
| 4.5.1 Imágenes de ^{64}Cu | 42 |
| 4.5.2 Progresión de la EP con ^{18}F -6-Fluorodopamina | 48 |
| 4.6 Correlación Cu-64 y ^{18}F -6-Fluorodopamina en la EP | 51 |
| | |
| 5. Conclusiones | 53 |
| | |
| Anexos | 55 |
| A. Prueba t de student para dos muestras | 55 |
| B. Imágenes Cu-64 | 57 |
| | |
| REFERENCIAS | 60 |

Capítulo 1

Introducción

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una condición crónica asociada a la edad y es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, afectando entre una o dos personas de cada mil. Hasta la fecha en México no se cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia e incidencia de la enfermedad de Parkinson (Cervantes-Arriaga et al., 2013). Clínicamente, la patología se caracteriza por cuatro síntomas: temblores en reposo, rigidez muscular, lentitud en los movimientos y cambios en la postura. Este trastorno del movimiento se caracteriza por la pérdida crónica y progresiva de las neuronas productoras de dopamina. Estas células se localizan en la *substantia nigra pars compacta* y proyectan sus axones a regiones como el caudado y putamen (Montes et al., 2014); como consecuencia de la muerte celular y la disminución en los niveles de dopamina se desarrollan los síntomas motores observados en los pacientes con Parkinson.

Las causas de este trastorno siguen siendo inciertas. La muerte celular en el trastorno es atribuida a una cascada de eventos que incluyen la disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y la agregación de proteínas α -sinucleína. En los últimos años ha crecido el apoyo a la hipótesis de que los cambios en el metabolismo de algunos metales conllevan al desarrollo de distintas enfermedades neurodegenerativas. Particularmente, el cobre ha tomado gran interés en el estudio de la enfermedad de Parkinson. Este biometal se encuentra en forma libre o ligado a proteínas de forma intracelular y juega un papel importante en diversos procesos biológicos. En los procesos neurológicos el cobre está relacionado con la regulación de enzimas cobre-dependientes, las cuales están implicadas en un papel neuroprotector de las células dopaminérgicas, por lo que la suplementación

de cobre en la dieta de los pacientes podría ser una alternativa de tratamiento para esta enfermedad. La ingesta de cobre en forma aguda, como crónica, ha demostrado bloquear la peroxidación de lípidos, incrementar la dopamina estriatal y activar proteínas cobre-dependientes (Davies, 2013). Sin embargo, a la fecha no existe un análisis *in vivo* de la distribución del cobre en el cerebro de los pacientes para evaluar las zonas de captación y la efectividad del tratamiento.

La Tomografía por Emisión de Positrones (PET), es una modalidad de imagen molecular que permite visualizar procesos celulares *in vivo* relacionadas a un gran número de patologías oncológicas, cardiológicas y neurológicas. La técnica se basa en la administración de un radiofármaco, compuesto por una molécula de interés biológico y un radionúclido emisor de positrones que permite la obtención de una imagen funcional del proceso fisiológico bajo estudio.

En particular, el radiofármaco ^{18}F -6-Fluorodopamina se ha utilizado como radiofármaco estándar para evaluar la integridad de las células dopaminérgicas presinápticas, lo que permite el diagnóstico de la EP y el estudio de su evolución. En los últimos años ha crecido el interés del uso de radiofármacos marcados con radionúclidos metálicos, especialmente aquellos con isótopos de cobre (Cu) (Ávila-Rodríguez y MacQuarrie, 2014), que debido a los positrones y electrones Auger emitidos posee gran interés terapéutico.

Este proyecto de investigación posee la novedad de ser el primero en utilizar imágenes PET de Cu-64 para evaluar la distribución cerebral de cobre en el ser humano, encontrar las regiones cerebrales con una homeostasis alterada de este metal en la enfermedad de Parkinson y evaluar el efecto de la suplementación con cobre en la progresión de la enfermedad usando ^{18}F -6-Fluorodopamina.

Objetivo General:

Evaluar la distribución cerebral de cobre en sujetos sanos y con enfermedad de Parkinson, con base en la biodistribución cerebral el isótopo ^{64}Cu en su forma química de cloruro (CuCl_2), en el cerebro de los pacientes con EP.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la biodistribución sistémica de cobre en sujetos con Enfermedad de Parkinson.
2. Evaluar la biodistribución cerebral de cobre en sujetos normales y pacientes con Parkinson.
3. Hacer un corregistro de imágenes PET con un atlas de resonancia magnética para la segmentación automatizada del cerebro.
4. Comparar la captación de ^{64}Cu antes y después de un tratamiento con sulfato de cobre en pacientes con Enfermedad de Parkinson.
5. Evaluar la progresión de la EP en sujetos suplementados con sulfato de cobre usando imágenes de ^{18}F -6-Fluorodopamina.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1 Medicina nuclear

La medicina nuclear es una ciencia y práctica clínica basada en la administración de un trazador radiactivo o radiofármaco con el fin de obtener información diagnóstica de forma no invasiva sobre el estado de una patología por medio de una imagen funcional. Un radiofármaco es una sustancia química formada por una molécula de interés biológico (que determinará la vía metabólica para su distribución en el cuerpo humano) y un núcleo radiactivo (que permite examinar la distribución del radiofármaco por medio la detección de la radiación emitida) (Kowalsky 2004). La elección adecuada del radionúclido para aplicaciones radiofarmacéuticas es de gran importancia debido a diferentes factores. La vida media del radionúclido debe permitir la suficiente captación y producir suficientes emisiones para obtener imágenes de buen contraste.

Existen dos modalidades de imagen en medicina nuclear: la Tomografía por Emisión de Fotón Único (SPECT, por sus siglas en inglés), que utiliza radionúclidos que se transforman por decaimiento gamma y la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), la cual utiliza núcleos radiactivos que decaen emitiendo positrones, la antipartícula del electrón. Al interactuar el positrón con un electrón dentro del cuerpo del paciente, ocurre un evento de aniquilación en el que la materia de estas dos partículas se transforma en dos fotones gamma de 511 keV colineales si se aniquilan en reposo (Bailey 2014). La detección en coincidencia de los fotones emitidos en distintos ángulos permite la obtención de una imagen tomográfica para el estudio de un proceso fisiológico *in vivo*. La imagen PET ofrece una alta sensibilidad junto con una gran resolución espacial y temporal sobre otras técnicas de imagen que permiten un diagnóstico de un proceso fisiológico.

En los últimos años, el uso de la imagen PET se ha vuelto indispensable en el diagnóstico de pacientes oncológicos al permitir detectar de manera visual regiones de captación inusual del radiofármaco. Sin embargo, el poder de la técnica recae en su naturaleza cuantitativa. La imagen PET puede ser utilizada en el seguimiento de la respuesta a un tratamiento, determinar la viabilidad de receptores afines a un ligando o para evaluar la farmacocinética y farmacodinamia en las pruebas de desarrollo de nuevos medicamentos (Kowalsky 2004).

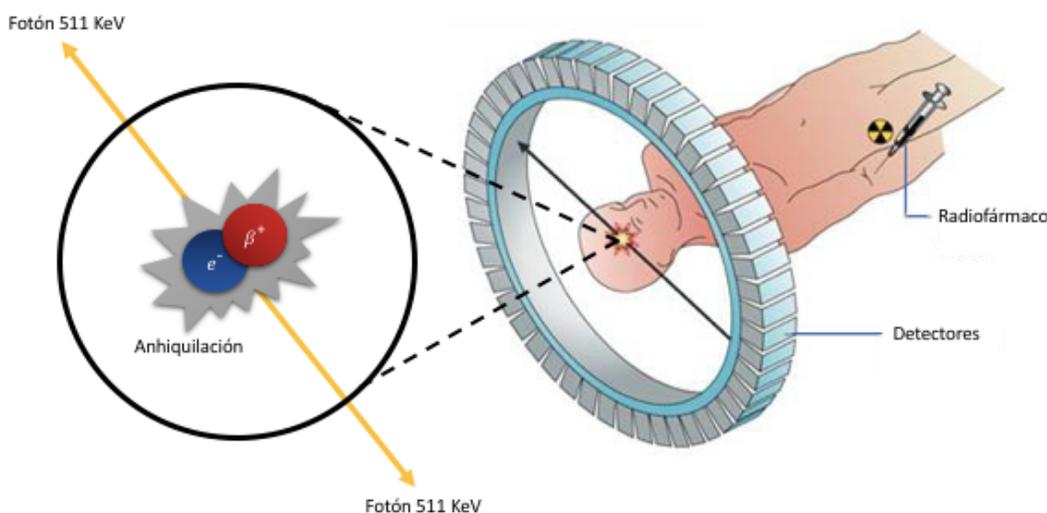


Figura 1: Principio físico de la Tomografía por Emisión de Positrones.

El estudio de un proceso fisiológico requiere de trazadores específicos involucrados en el proceso a investigar. Por ejemplo, ^{18}F -FDG es utilizado para evaluar el metabolismo de glucosa, mientras ^{11}C -Raclopride permite evaluar los receptores post-sinápticos de dopamina D_2 y ^{18}F -Timidina es un marcador para evaluar la proliferación celular (Kowalsky 2004).

En neurología, la especificidad de la técnica ha permitido el desarrollo de ligandos radiomarcados que permiten el estudio de diversos neuroreceptores, extendiendo el

conocimiento sobre las funciones realizadas por el cerebro humano de una forma no invasiva y brindando información sobre su fisiología (Kowalsky 2004).

2.2 Enfermedad de Parkinson

2.2.1 Generalidades del cerebro humano

El cerebro es el centro de control de las sensaciones, toma de decisiones y acciones, su función es ejercer control sobre los demás órganos del cuerpo humano por medio de impulsos nerviosos (Tortora y Derrickson, 2006). La unidad básica funcional del cerebro es la neurona, célula especializada en la transmisión de impulsos nerviosos.

La neurona está compuesta por un cuerpo o soma celular del cual parten miles de pequeñas terminaciones denominadas dendritas y algunas terminaciones de mayor longitud denominadas axones. La comunicación entre dos neuronas se denomina sinapsis y se realiza por medio de neurotransmisores. Un neurotransmisor es una sustancia química que se transporta por medio de los axones y es recibida por medio de las dendritas, produciendo una respuesta que puede ser excitatoria o inhibidora (Tortora y Derrickson, 2006).

La observación a simple vista distingue dos zonas de tejido en el cerebro. Por un lado, una zona de color oscuro denominada sustancia gris, formada por el cuerpo neuronal y por otro lado, una región más clara denominada sustancia blanca, compuesta por los axones mielinizados. En el ser humano adulto, el cerebro representa aproximadamente el 2% del peso total del cuerpo pero requiere hasta el 20% del oxígeno y glucosa que se consumen (Tortora y Derrickson, 2006). El transporte de nutrientes se realiza por medio del líquido cefalorraquídeo, el cual protege al cerebro de daños físicos y químicos.

2.2.2 Enfermedad de Parkinson

Los trastornos neurológicos son un grupo de enfermedades que afectan el sistema nervioso central y periférico debido a anormalidades estructurales o bioquímicas. Dentro

de este grupo de afecciones neurológicas se encuentra la Enfermedad de Parkinson (EP), considerada la segunda enfermedad de este grupo con mayor prevalencia a nivel mundial. La prevalencia de la enfermedad oscila entre 1-2 personas por cada mil, siendo una condición que aumenta su probabilidad de incidencia con la edad. Se estima que el 1% de la población mayor de 60 años sufre de esta condición, mientras que la enfermedad se manifiesta en menos de un 4% de la población menor a 50 años (Tysnes y Storstein, 2017).

La EP compromete tanto funciones motoras y no motoras. Dentro de las manifestaciones motoras se encuentran los síntomas cardinales de la enfermedad: temblor en reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural. Al menos un 90% de los pacientes con EP presentan otros síntomas como depresión, demencia, alucinaciones, trastornos del sueño y pérdida olfativa. El diagnóstico es realizado por un médico neurólogo basado en la observación de al menos dos de los síntomas clave; sin embargo, existe entre un 10-25% de error diagnóstico cuando este no es realizado por un experto en trastornos del movimiento (Cervantes-Arriaga et al., 2013).

Una escala válida para la detección y evolución de la enfermedad de Parkinson es la Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS). Esta prueba clínica pondera el estadio de la enfermedad por medio de cuatro sub-escalas: 1) estado mental, comportamiento y estado de ánimo, 2) actividades de la vida diaria, 3) exploración de aspectos motores y 4) complicaciones con la terapia. UPDRS es el estándar utilizado a nivel mundial para medir la evolución de la enfermedad y la respuesta de los pacientes con EP en distintos ensayos clínicos en busca de nuevos tratamientos.

Los tratamientos para la EP consisten en disminuir los síntomas motores e incluyen la neurocirugía, la cual busca intervenir en el circuito de los ganglios basales con el fin de disminuir los síntomas causados por el declive de dopamina y normalizar la actividad basal de la red ganglionar (Di Matteo, 2007).

2.2.1 Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson

La característica principal de la enfermedad de Parkinson es la pérdida selectiva de neuronas productoras de dopamina (DA). DA es un neurotransmisor involucrado en funciones cognitivas, motivacionales, neuroendocrinas y el control motor.

La dopamina es el neurotransmisor principal en la vía nigroestriatal y es producido en la *substantia nigra* (SN) para ser enviado por medio de sus axones al estriado dorsal. El número de células de la SN se ve reducido con la edad, sin embargo, la manifestación de la EP inicia cuando la pérdida neuronal alcanza un 80% de las células dopaminérgicas de la SN (Rivera-Mancía et al., 2010).

Los receptores de dopamina en el cerebro son clasificados en dos familias denominadas D1 y D2. Los receptores D1 se expresan en diversas estructuras del cerebro tales como el hipocampo, la amígdala, el bulbo olfatorio y la *substantia nigra pars compacta*. Por otro lado, los receptores D2 son quienes estimulan la locomoción (Hisahara y Shimohama, 2011) y se encuentran principalmente expresados en la glándula pituitaria y los ganglios basales.

Las neuronas productoras de DA poseen una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo debido al alto metabolismo de oxígeno, bajos niveles en antioxidantes y altas concentraciones de hierro y otras biomoléculas. El fallo en el ciclo respiratorio realizado en las mitocondrias de la SN aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y genera una caída en la producción de ATP, llevando a la célula a una muerte programada (Przedborski, 2005; Di Matteo, 2007). La ausencia de dopamina en los ganglios basales repercute en la aparición de los síntomas motores en la EP.

La administración farmacológica de precursores de dopamina, como el caso de Levopa, ha sido probada como tratamiento en la EP. El uso de fármacos en los primeros estadios de la enfermedad resulta en una reducción de los síntomas motores, sin embargo, la

terapia prolongada y los ajustes en la dosificación resultan en la reaparición de los problemas motores (Hisahara y Shimohama, 2011). La EP no es curable hoy en día.

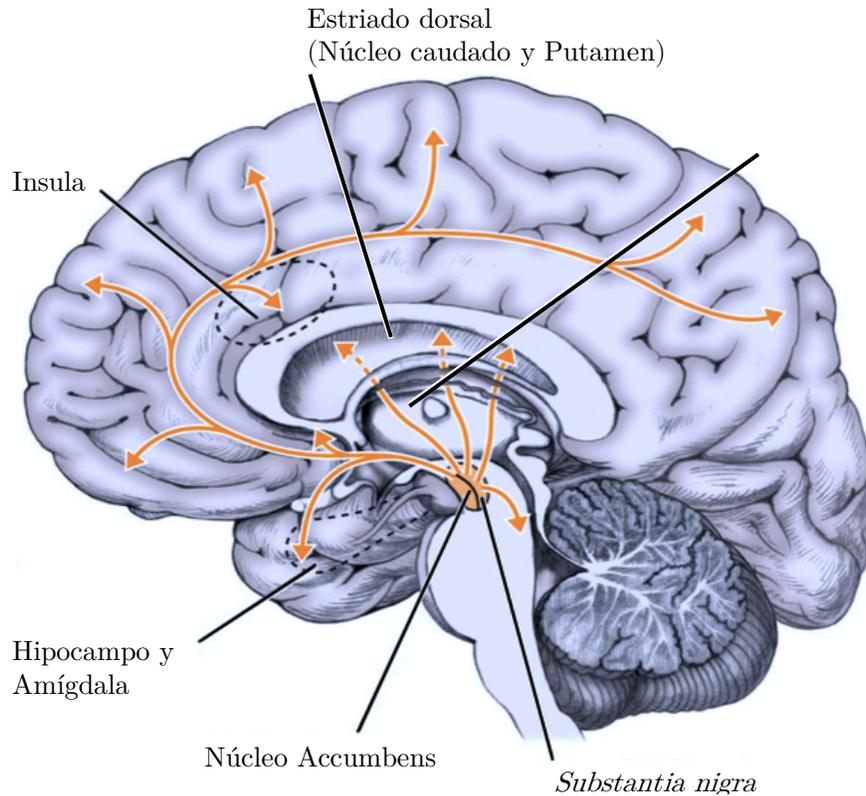


Figura 2: Vías de proyección de la Substantia nigra.

2.2.2 Medicina nuclear en la EP

La imagen molecular por PET permite estudiar el sistema dopaminérgico por medio del radiofármaco ^{18}F -6-Fluorodopamina (^{18}F -DOPA), el cual es administrado vía intravenosa y captado por los receptores dopaminérgicos en los ganglios basales. ^{18}F -DOPA es una molécula análoga al precursor de dopamina L-DOPA, por lo que las imágenes PET de su distribución proveen un indicador *in vivo* de la función e integridad de las terminales dopaminérgicas presinápticas (Tai y Piccini, 2004), permitiendo evaluar la síntesis, almacenamiento y recambio de la dopamina en la neurona.

La depleción dopaminérgica de la vía nigroestriatal (Fig. 2) es un rasgo característico de la EP. Los pacientes con este padecimiento muestran un patrón característico en la pérdida de la actividad dopaminérgica. La EP se caracteriza por una progresión rápida del declive dopaminérgico en el putamen, que tiene un gradiente posterior a anterior y una asimetría de lado a lado entre las estructuras del estriado menos afectadas y más afectadas (Fig.3). A medida que la enfermedad avanza, la progresión de la hipofunción dopaminérgica se vuelve más lenta, y aunque se mantiene el gradiente, el grado de asimetría disminuye (Politis, 2014).

El cociente estriado-occipital (SOR, por sus siglas en inglés) se define como el cociente de la concentración de actividad medida en una región de interés (ROI) que limita el estriado dorsal (putamen y/o núcleo caudado) entre la concentración de actividad medida en una región que no posee receptores dopaminérgicos, como es la corteza occipital. El uso de SOR en la cuantificación de ^{18}F -DOPA en el estriado ha permitido estimar la progresión de la EP. Para el núcleo caudado, la pérdida dopaminérgica anual es aproximadamente del 5.9%, mientras para el putamen anterior y posterior del 8.3% y 10.3% respectivamente (Nurmi et al., 2006).

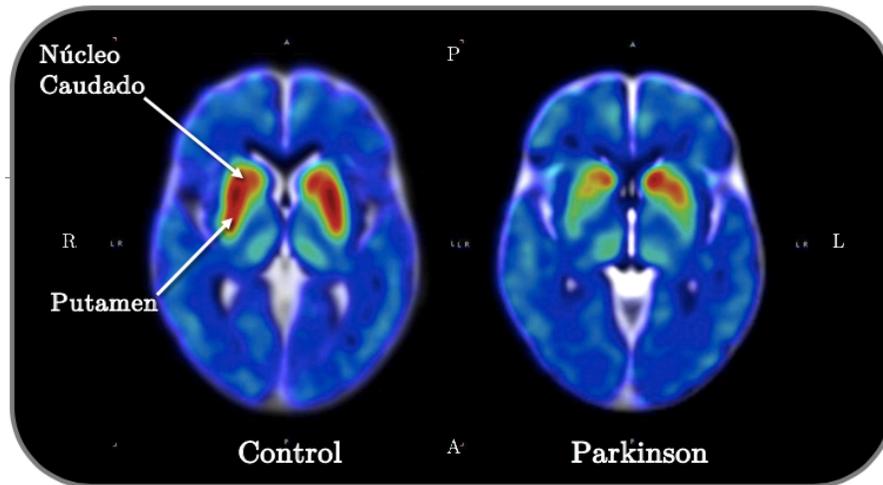


Figura 3: Biodistribución cerebral de ^{18}F -DOPA en un voluntario sano (control) y un paciente con Enfermedad de Parkinson.

2.3 El cobre en la enfermedad de Parkinson

Los llamados metales de transición como el hierro, zinc, manganeso y cobre juegan un papel importante en distintos procesos fisiológicos. Estos metales actúan como cofactores de enzimas para regular actividades celulares como transporte de electrones, reacciones de oxidación, síntesis de neurotransmisores, metabolismo de lípidos, etc. La deficiencia o aumento de estos metales ha sido relacionada con distintos trastornos neurológicos (Rivera-Mancía et al., 2010).

En los últimos años, la investigación sobre la fisiopatología de la EP ha ligado el trastorno a una ruptura en la homeostasis del cobre en el cuerpo humano, causando la muerte celular que caracteriza a la enfermedad (Rivera-Mancía et al., 2010). El estudio de cobre como biometal es una alternativa para entender la fisiopatología de la EP.

2.3.1 El cobre sistémico

El ser humano adquiere este biometal por medio de la dieta, típicamente la ingesta diaria de cobre es entre 2 a 5 mg (Roberts y Sakar, 2008; Davies, 2013; Scheiber et al., 2014), y es debido al consumo de carnes, legumbres y mariscos, principalmente. La recomendación diaria de ingesta de cobre es 0.9 mg/d (Manto, 2014) y el exceso de cobre en el ser humano es regulado por la excreción, predominantemente por la vía hepatobiliar. Los órganos con mayor concentración de cobre son el hígado, el cerebro, los riñones y el corazón.

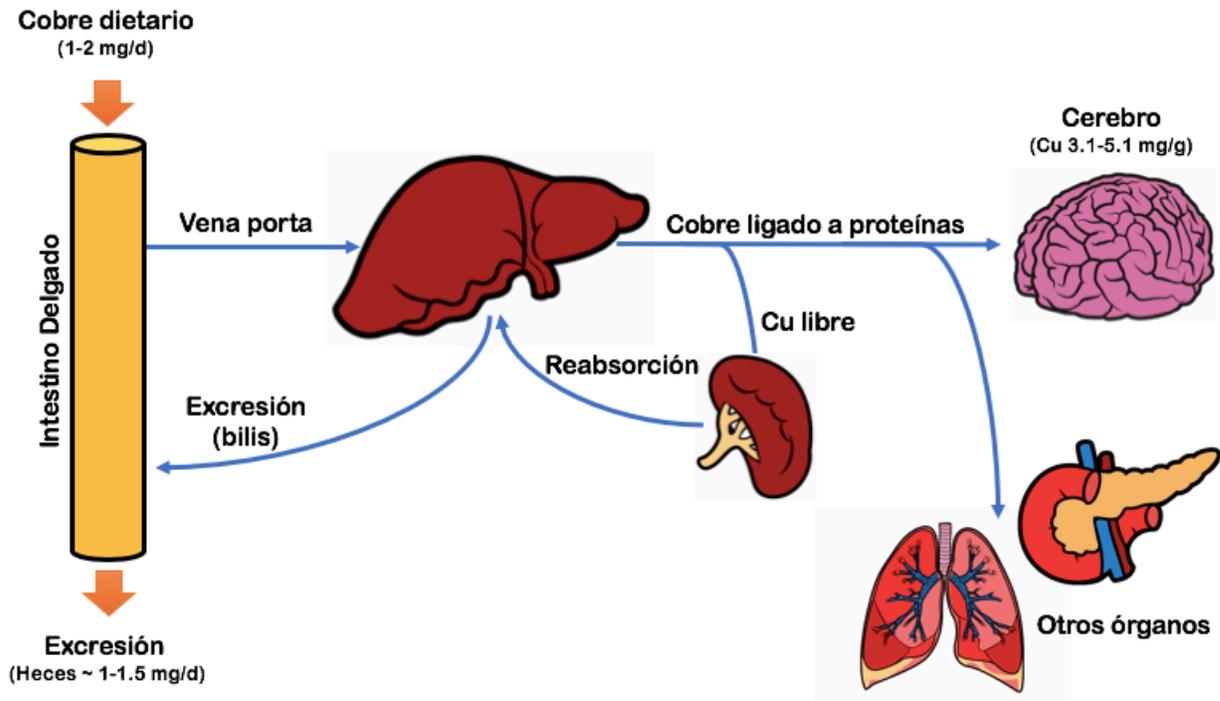


Figura 4: Metabolismo del Cobre en el ser humano

El cobre dietario es absorbido principalmente en el duodeno y yeyuno, para ser transportado principalmente a los riñones e hígado. La captación celular de cobre ocurre mediante el transportador humano de cobre hCTR1 que se expresa en la membrana plasmática de las células. Una vez absorbido, el metal se adhiere a varios aminoácidos para su transporte como son la albumina, histidina y la ceruloplasmina. Debido a una débil unión a estos complejos, el cobre libre es filtrado por los riñones para su reabsorción, mientras que el cobre excretado en bilis no es disponible para su reabsorción. Los niveles totales de cobre a nivel celular son la suma del Cu libre y Cu unido a proteínas (Manto, 2014).

Los estados de oxidación Cu^{2+} y Cu^+ le permiten la participación en múltiples reacciones de óxido-reducción, así como la generación de radicales libres. El cobre libre es un catalizador de las reacciones de Fenton: $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{OH}^- + \text{OH}$ (Manto, 2014; Rivera-Mancía et al., 2010). Un aumento de cobre libre repercute en la generación de radicales libres y un potencial daño a nivel celular.

El cobre ligado a proteínas como la albumina e histidina es distribuido al hígado vía la vena porta para su recirculación, mientras el cobre ligado a ceruloplasmina es transportado en sangre a otras regiones del cuerpo humano.

2.3.2 El cobre en cerebro

El sistema nervioso central absorbe sus nutrientes y otras macromoléculas vía la barrera hematoencefálica. La ceruloplasmina y albumina de la sangre son encargadas de entregar el cobre a esta barrera para su internalización en las células neuronales.

La concentración de cobre en cerebro oscila entre 3.1-5.1 mg/g de tejido cerebral húmedo y la distribución del metal es heterogénea dentro de este órgano (Scheiber et al., 2014, Manto 2014), siendo las regiones con mayor presencia de cobre la SN, el cerebelo y el hipocampo. Una vez internalizado en las células neuronales puede ser almacenado por proteínas dependientes de cobre o incorporado como catalizador y cofactor de múltiples enzimas para el desarrollo neurológico.

Las proteínas chaperonas dependientes de cobre son las responsables de reconocer el cobre y dirigirlo a los sitios intracelulares de interés como la mitocondria y el aparato del Golgi. ATOX1 es responsable del transporte de Cu al aparato de Golgi y su posterior excreción, COX17 es una chaperona encargada de la internalización del cobre en la mitocondria y en el citoplasma, CCS se encarga de insertar el cobre en la enzima Cu-Zn SOD (Zheng y Monnot, 2012), la cual posee un papel antioxidante al reducir las especies reactivas de oxígeno. Modificar la homeostasis normal de cobre altera la función de las enzimas cobre-dependientes desencadenando trastornos neurológicos.

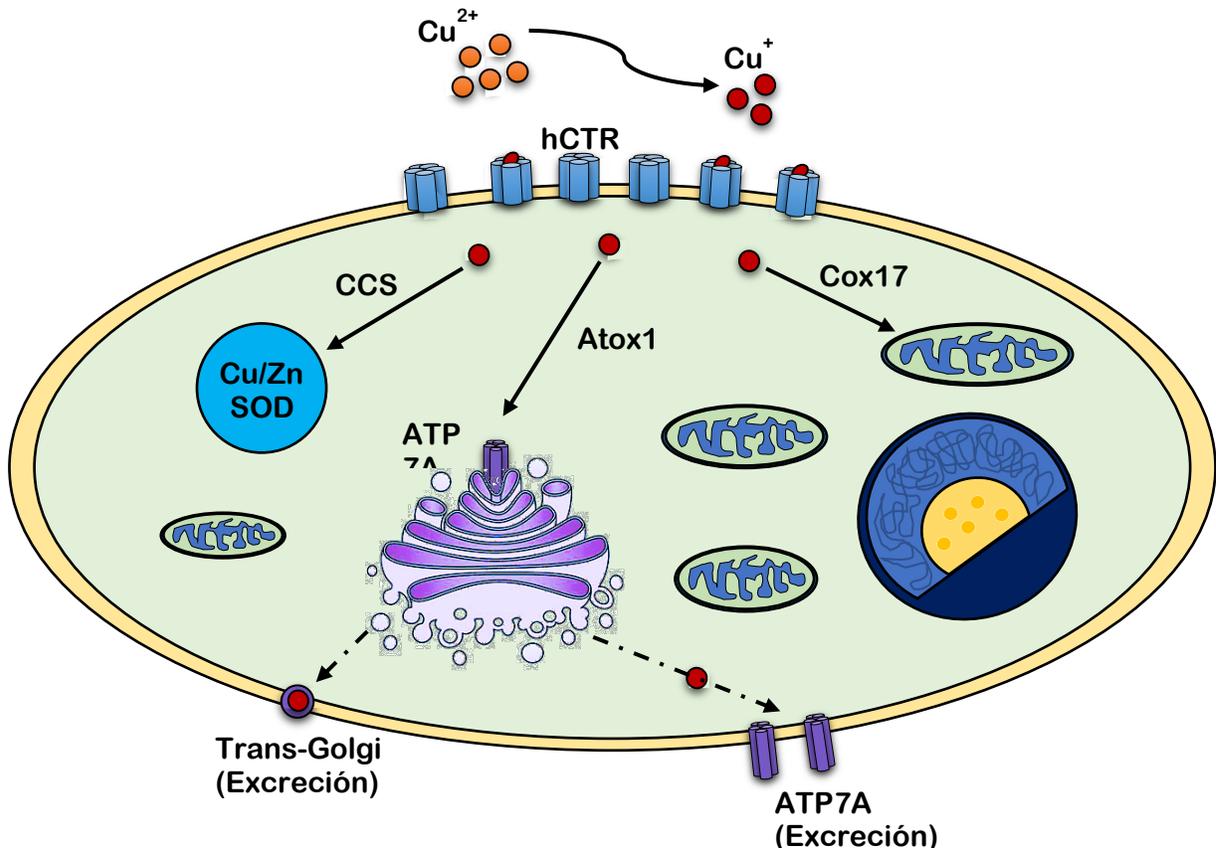


Figura 5: Homeostasis del cobre a nivel celular

Los mecanismos que involucran la captación, uso y almacenamiento de cobre en el cerebro están relacionados con la muerte neuronal. El cobre ha sido implicado en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson al encontrar concentraciones anormales de este metal en el cerebro de los pacientes con este trastorno. Los análisis *post mortem* de los tejidos cerebrales de pacientes con EP revelan altos niveles en la concentración de aluminio, zinc y hierro en la *substantia nigra* comparada con sujetos control (Popescu et al., 2009), mientras la concentración total de cobre presenta una reducción en su contenido.

Particularmente, la concentración de hierro (Fe) es hasta 40% más alta comparada con un sujeto sano en las terminales dopaminérgicas de la vía nigroestriatal. La síntesis de dopamina se ve alterada por las concentraciones del hierro en la SN, limitando la producción del neurotransmisor al asociarse con la enzima tirosina hidroxilasa. La

acumulación de Fe conduce a la muerte neuronal por el estrés oxidativo y el aumento de especies reactivas de oxígeno (Rivera-Mancía et al., 2010).

Las proteínas dependientes de cobre poseen un papel importante en el metabolismo del Fe, al permitir su oxidación para facilitar su transporte. La absorción de Fe compite con la absorción intestinal del cobre, por lo que una dieta reducida en cobre conduce a la acumulación de Fe y al aumento de los efectos neurotóxicos de este metal (Rivera-Mancía, 2010), por lo que la suplementación con cobre se presenta como una alternativa neuroprotectora ante el declive dopaminérgico.

Las pruebas clínicas que estudian la suplementación de cobre en la EP (Montes et al., 2014; Davies et al., 2016), han demostrado que la suplementación tanto aguda, como crónica, ha mejorado las funciones motoras y cognitivas de los pacientes, mientras en modelos animales se ha logrado disminuir la muerte celular al mejorar el metabolismo de biometales (Bhattacharyya y Dixit, 2011). Estos resultados han conducido a estudiar el efecto antioxidante del cobre como suplementación en los pacientes con EP.

2.4 Radionúclidos de cobre

El gran reto de los radionúclidos convencionales para PET recae en su corta vida media (2-110 minutos). La síntesis química de radiofármacos con estos radioisótopos debe realizarse rápidamente y poseer un equipo PET cercano al sitio de producción. Así mismo, estos radionúclidos están limitados a estudiar procesos de naturaleza biológica rápida, ya que los eventos que requieren una distribución del radiofármaco durante horas o días se ven limitados en investigarse. El interés en uso de radioisótopos no convencionales, como radiometales y radiohalógenos, ha crecido en los últimos años debido a su vida media larga. En particular, la variedad de isótopos de cobre ha generado un gran interés en este metal debido a los tipos de sus emisiones y energías.

El cobre posee un grupo de radioisótopos con potencial para diagnóstico y terapia. Entre sus isótopos más investigados se encuentra el ^{64}Cu , producido vía ciclotrón y con una

vida media de 12.7 h. Este radioisótopo posee tres formas de decaimiento (β^+ , β^- y captura electrónica), dándole posibilidad tanto para radioterapia molecular e imagen. Las partículas β^+ emitidas poseen una energía máxima de 653 keV, que brindan una calidad de imagen muy similar a los estudios realizados con el radionúclido ^{18}F .

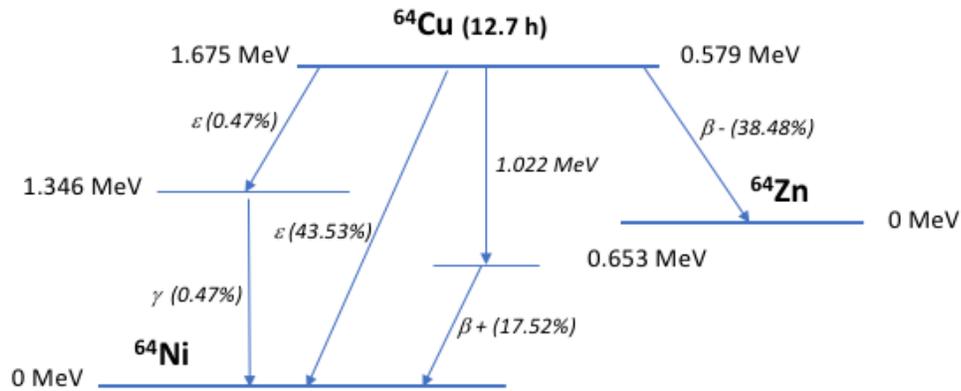


Figura 6: Esquema de decaimiento del Cu-64.

^{64}Cu posee distintos canales para su producción, siendo el más efectivo $^{64}\text{Ni}(p,n)$ debido a la alta actividad específica que se obtiene del producto (Ávila-Rodríguez et al., 2011). Un factor que limita su producción es el costo del blanco enriquecido ^{64}Ni (abundancia natural del 0.926%).

La forma química $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ posee características especiales de biodistribución en el cuerpo humano, siendo los sitios de mayor captación el hígado, el páncreas, los riñones, el intestino y el cerebro (Ávila-Rodríguez et al 2017). El catabolismo de esta molécula permite a los iones de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ distribuirse sistémicamente hasta ser captado por el transportador hCTR1 como blanco molecular principal.

Capítulo 3

Metodología Experimental

3.1 Producción del radiofármaco ^{18}F -6-Fluorodopamina

La producción del radionúclido ^{18}F se realiza vía la reacción nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})$, impactando protones de 11 MeV en un blanco gaseoso de oxígeno enriquecido ^{18}O (95%). La energía umbral para dicha reacción corresponde 2.574 MeV (Nndc.bnl.gov. 2019). La producción de ^{18}F en su forma molecular requiere dos bombardeos, el primero para producir la reacción nuclear (^{18}O en el blanco) y el segundo para recuperar el ^{18}F usando una mezcla de acarreador con F_2 natural. El precursor recuperado $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ se compone entonces de un núcleo de ^{18}F y otro núcleo estable de ^{19}F , por lo que la actividad específica se ve comprometida usando este método.

La síntesis química de ^{18}F -DOPA requiere del precursor químico TriBoc-L-Dopa ethyl ester, que posee grupos carboxilos protectores en sus carbonos salvo en el sexto de ellos, posición en la que se lleva a cabo la sustitución nucleofílica o electrofílica. Los grupos protectores son posteriormente removidos por medio de una hidrólisis ácida con HBr. La purificación del producto se realiza por cromatografía de líquidos usando una columna semipreparativa de fase reversa de C18.

3.2 Producción del radionúclido ^{64}Cu

El radioisótopo ^{64}Cu es producido en la Unidad Radiofarmacia/Ciclotrón de la Facultad de Medicina, UNAM. Existen varios canales de reacción para la producción de ^{64}Cu , sin embargo, el canal de reacción más utilizado es $^{64}\text{Ni}(\text{p},\text{n})^{64}\text{Cu}$ debido a la alta actividad específica que se puede obtener para este radioisótopo del cobre. La

energía umbral para esta reacción nuclear corresponde a 2.495 MeV (Nndc.bnl.gov. 2019).

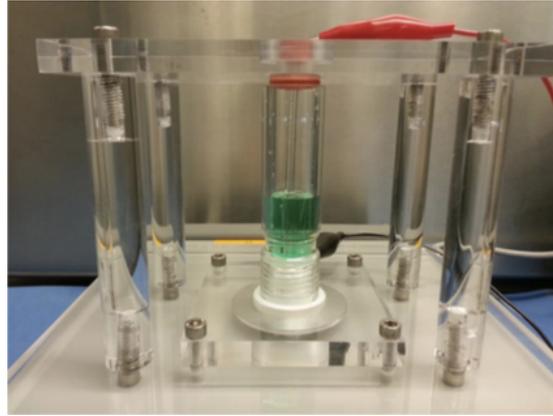


Fig. 7: Electrodeposición de ^{64}Ni (Manrique-Arias y Avila-Rodriguez, 2014).

El blanco de ^{64}Ni es electrodepositado usando una celda electrolítica con un ánodo de platino y un disco de oro como cátodo (Fig. 7). El material del blanco es previamente preparado en una solución electrolítica con 30 mg de ácido bórico en un volumen de 2 mL. La electrodeposición es realizada a temperatura ambiente, usando una corriente de 30 mA durante 60 min. Al final de este proceso, el blanco de Ni es depositado en un área circular de 0.5 cm^2 sobre el soporte de oro como se muestra en la Fig. 8.

Tabla 1: Impurezas radionuclídicas generadas en el blanco enriquecido de ^{64}Ni (96%).

| <i>Radionúclido</i> | <i>Vida media</i> | <i>Reacción nuclear</i> | <i>Abundancia en el blanco (%)</i> | <i>Rendimiento relativo a ^{64}Cu</i> | <i>Rendimiento relativo a ^{61}Co</i> |
|---------------------|-------------------|----------------------------|------------------------------------|---|---|
| ^{55}Co | 17.5 h | $^{58}\text{Ni}(p,\alpha)$ | 2.5 | - | 0.0004 |
| ^{60}Cu | 23.7 min | $^{60}\text{Ni}(p,n)$ | 1.65 | 0.0621 | - |
| ^{61}Co | 1.65 h | $^{64}\text{Ni}(p,\alpha)$ | 96 | - | 1.0 |
| ^{61}Cu | 3.4 h | $^{61}\text{Ni}(p,n)$ | 0.14 | 0.0032 | - |
| ^{62}Cu | 9.7 min | $^{62}\text{Ni}(p,n)$ | 0.51 | 0.0627 | - |
| ^{64}Cu | 12.7 h | $^{64}\text{Ni}(p,n)$ | 96 | 1.0 | - |

El blanco de Níquel enriquecido al 96% con ^{64}Ni es irradiado con un haz de protones de 11 MeV durante 1 h. Los productos de activación se muestran en la Tabla 1. Las impurezas radionuclídicas como ^{60}Cu , ^{61}Cu y ^{62}Cu no son de importancia debido a su vida media corta, lo que permite su decaimiento en isótopos de Ni para su separación.

La separación de los isótopos de Ni, ^{61}Co y ^{64}Cu se realiza por cromatografía de complejos de cloro. Después del bombardeo, el blanco es disuelto en una solución de 2 mL de HCl (10 M) a 90°C , exponiendo la cara del blanco irradiada. El blanco disuelto es transferido a una columna de intercambio iónico AG1-X8 (Bio-Rad). El Ni es eluido haciendo pasar en la columna 25 ml de HCl (6 M), permitiendo su reprocesamiento para volver a ser electrodepositado. Las trazas de ^{61}Co son separadas usando 15 ml de HCl (4 M) en la columna y finalmente el ^{64}Cu es obtenido usando 10 mL de HCl (0.1 M). La fracción de cobre es evaporada por sequedad, y la actividad de ^{64}Cu es recuperada en 5 ml de solución salina y esterilizado por filtración mediante una membrana de $0.22\ \mu\text{m}$.



Fig. 8: Blanco de ^{64}Ni electrodepositado sobre el disco de oro.

3.3 Estudios PET/CT

Los pacientes fueron captados en consulta externa en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). El protocolo de investigación fue previamente aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INNN con el número de protocolo N -117/14 con fecha del 20 de junio del 2017. Los criterios de inclusión fueron:

- Paciente con enfermedad de Parkinson diagnosticada siguiendo los criterios de Hughes (el paciente debe presentar bradicinesia y al menos otro de los síntomas cardinales de la enfermedad).

- Tratamiento fijo con Levodopa de más de tres meses.
- Firmar carta de consentimiento informado en la que se explican los estudios que se realizaron.

El grupo de estudio se conformó por 14 sujetos y su información se resumen en la Tabla 2. El estudio se realizó doble ciego, suplementado con 4 mg/12 h de sulfato de cobre a siete de los pacientes, dosis que no produce efectos tóxicos según lo reportado en la literatura (Rojas-Sorbazo, 2013); mientras el resto del grupo fue suplementado con placebo, el cual puede ser capaz de generar un efecto positivo en los pacientes debido a causas puramente psicológicas.

Tabla 2: Características del grupo con Enfermedad de Parkinson (F: femenino, M: masculino, C: cobre, P: Placebo).

| <i>Paciente</i> | Sexo | Edad (años) | Talla (m) | Peso (kg) | Suplemento |
|-----------------------------|-------------|--------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 1 | M | 65 | 1.71 | 80 | P |
| 2 | M | 51 | 1.7 | 82 | P |
| 3 | F | 65 | 1.58 | 73 | C |
| 4 | F | 51 | 1.55 | 59 | P |
| 5 | M | 65 | 1.68 | 78 | C |
| 6 | M | 71 | 1.75 | 74 | P |
| 7 | F | 51 | 1.65 | 60 | P |
| 8 | M | 56 | 1.8 | 95 | C |
| 9 | F | 62 | 1.5 | 58 | P |
| 10 | M | 42 | 1.64 | 70 | C |
| 11 | M | 43 | 1.77 | 86 | C |
| 12 | F | 67 | 1.46 | 60 | P |
| 13 | M | 68 | 1.72 | 73 | P |
| 14 | F | 46 | 1.48 | 42 | C |
| <i>Promedio ± SD</i> | | 57 ± 10 | 1.6 ± 0.1 | 71 ± 14 | N/A |

Adicionalmente se solicitó la participación de un familiar cercano al paciente con EP en este estudio como sujeto control, esto con el fin que los sujetos considerados sanos posean los mismos niveles de cobre endógenos a los pacientes debido a la dieta. Las características de este grupo se muestran en la Tabla 3.

Se realizaron estudios PET/CT iniciales a cada uno de los sujetos del estudio usando los radiofármacos $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ y ^{18}F -DOPA, dejando un mes de diferencia entre ambos estudios para la eliminación biológica de cada radiofármaco.

Los estudios PET/CT se realizaron en el departamento de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de Cancerología, en el tomógrafo dual Biograph mCT 20 PET/CT (Siemens Medical Solutions, USA).

Tabla 3: Características del grupo Control

| <i>Voluntario</i> | <i>Sexo</i> | <i>Edad (años)</i> | <i>Talla (m)</i> | <i>Peso (kg)</i> |
|----------------------|-------------|--------------------|------------------|------------------|
| 1 | M | 49 | 1.70 | 75 |
| 2 | F | 46 | 1.64 | 80 |
| 3 | F | 71 | 1.54 | 68 |
| 4 | M | 51 | 1.79 | 82 |
| 5 | M | 60 | 1.64 | 60 |
| <i>Promedio ± SD</i> | | 55 ± 10 | 1.7 ± 0.1 | 73 ± 9 |

El radiofármaco $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ fue administrado vía intravenosa, inyectando una actividad de 4 MBq/kg peso en solución salina. Los primeros pacientes con EP (pacientes 2, 4, 6, 11 y 14) y los cinco sujetos controles fueron utilizados para analizar la biodistribución sistémica del radiofármaco. Se adquirieron imágenes PET estáticas de cuerpo completo (15 min de adquisición) a tiempos de 5 min, 30 min, 1 h, 5 h, 9 h, y 24 h post inyección. El resto del grupo de pacientes fueron sometidos a un solo estudio PET cerebral a las 24 h p.i.

La progresión de la enfermedad fue evaluada con los estudios PET de la biodistribución de ^{18}F -DOPA. Los pacientes fueron suministrados una hora antes del estudio con 150 mg de Carbidopa, que es un inhibidor de la Dopa descarboxilasa. Esta enzima de localización sistémica degrada la ^{18}F -DOPA, que es un análogo de LDOPA, antes de cruzar la barrera hematoencefálica, y reduce la captación de ^{18}F -DOPA en los ganglios basales. Cada paciente fue inyectado con 4.5 MBq/kg de peso del radiofármaco y a los 75 min p.i. se obtuvo la imagen PET cerebral (15 min de adquisición estática).

Posteriormente los pacientes recibieron suplementación (CuSO_4 o placebo) por 1 año. Al término del tratamiento, se realizaron estudios PET/CT cerebrales utilizando los mismos radiofármacos. Los tiempos y estudios realizados se resumen en la Fig. 9.

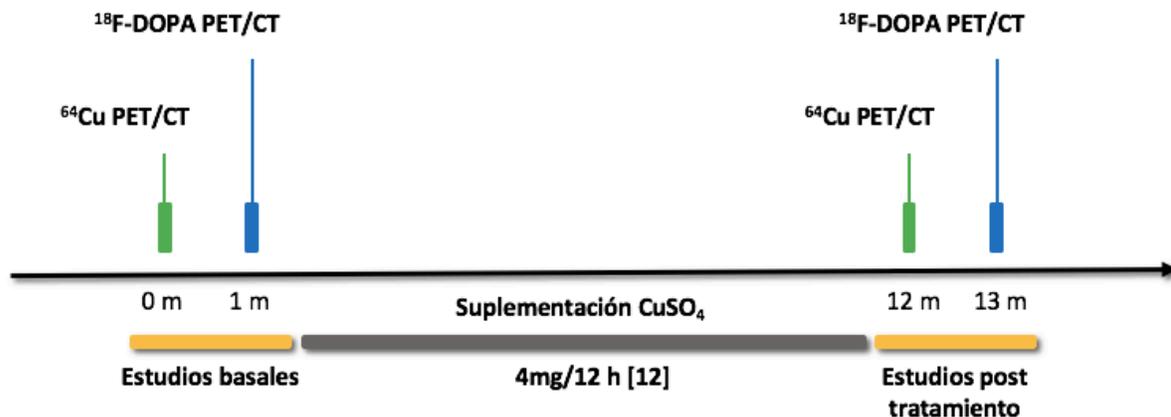


Figura 9: Representación esquemática de los estudios PET/CT.

3.4 Biodistribución sistémica de ^{64}Cu en pacientes con EP

Las imágenes PET/CT de cuerpo completo de los primeros pacientes fueron analizadas en el software OSIRIX MD. Este software opera en el sistema MAC OSX y está avalado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, para su uso en diagnóstico clínico en medicina. El programa permite visualizar distintas modalidades de imágenes biomédicas (MRI, PET, CT) en formato DICOM.

La imagen PET de cada paciente fue fusionada con su respectivo CT. Se trazó el contorno de los órganos críticos (hígado, páncreas, riñones e intestino superior) (Avila-Rodriguez et al., 2017) corte a corte para definir el volumen de interés (VOI). La fusión de las imágenes permite usar las VOIs definidas en el CT sobre la imagen PET para obtener la concentración de actividad ($\text{kBq/cc} \pm \sigma$, σ : desviación estándar) en cada

órgano, bajo la premisa que la distribución del radiofármaco es homogénea en el volumen.

Los biodistribución del ^{64}Cu es presentada como el porcentaje de la dosis inyectada en el órgano (%ID/org):

$$\% \frac{ID}{org} = \frac{A_{org}}{A_{ID} * V_{org}} * 100 \quad (3.1)$$

donde A_{org} representa la concentración de actividad (MBq/cc) medido en el VOI del órgano, V_{org} el volumen del órgano (cc) y A_{ID} es la actividad total inyectada. La adquisición de imágenes estáticas a 5 min, 30 min 1 h, 5 h, 9 h, y 24 h p.i. permite construir un gráfico de actividad vs tiempo, el cual posee un modelo exponencial debido a la eliminación biológica y el decaimiento radiactivo del radiofármaco. Las curvas de biodistribución por cada órgano fueron ajustadas siguiendo el modelo triexponencial usado en la biodistribución y dosimetría realizada en Ávila-Rodriguez et al 2017:

$$\% \frac{ID}{org}(t) = ae^{-bt} + ce^{-dt} + fe^{-gt} \quad (3.2)$$

siendo a , b , c , d , f y g ; las constantes buscadas del ajuste. La integración de la ecuación 4.2 con los valores obtenidos del ajuste, desde $t = 0$ a $t = \infty$ permite obtener la actividad acumulada en cada órgano.

3.5 Procesamiento de imágenes cerebrales

Las imágenes fueron obtenidas en formato DICOM y procesadas usando el software PMOD 3.8 dedicado al análisis cuantitativo de imágenes PET. Se cortaron las imágenes de MRI a la porción correspondiente a la región de análisis, esto con el fin de reducir el

tiempo de cómputo en el programa. Los estudios PET de los primeros pacientes fueron igualmente cortados a la región cerebral de la imagen y suavizados con un filtro Gaussiano ($FWHM = 4 \text{ mm}$).

La herramienta PNEURO (PMOD Technologies) del software permite obtener los volúmenes de interés de las estructuras cerebrales de forma automática al hacer uso de un atlas anatómico de resonancia magnética. Esta opción permite manejar la información espacial de cada estructura en el atlas y hacerla coincidir con la anatomía de cada sujeto de estudio según su estudio de resonancia magnética. Los estudios PET de cada paciente fueron complementados con un estudio MRI ponderado en T1 ($TR = 2300 \text{ ms}$, $TE = 2.26 \text{ ms}$) realizados en el resonador de 3.0 T del INNN. Las imágenes ponderadas en T1 permiten visualizar la anatomía de la sustancia gris, sin embargo, la anatomía de los ganglios basales hace difícil su segmentación debido al bajo contraste entre estructuras y el ruido de la MRI en esta área.

La herramienta PNEURO permite la segmentación del cerebro usando una base de datos en el software con 26 estudios MRI-T1 que entrenan al programa en la segmentación de las estructuras en cuatro atlas distintos con resoluciones de 1 mm y 2mm. La segmentación automática se realizó utilizando el atlas *AAL-VOIS* del Instituto Neurológico de Montreal (MNI), el cual permite la segmentación del cerebro en 120 estructuras, dentro de las cuales se incluyen las regiones del estriado. Si bien, la anatomía de la población mexicana es distinta a la población utilizada por este atlas es posible adaptar la anatomía del atlas a la anatomía de cada uno de nuestros pacientes. El uso de una transformación de seis grados de libertad que gire y deforme la anatomía del atlas permite adaptarlo a la población utilizada.

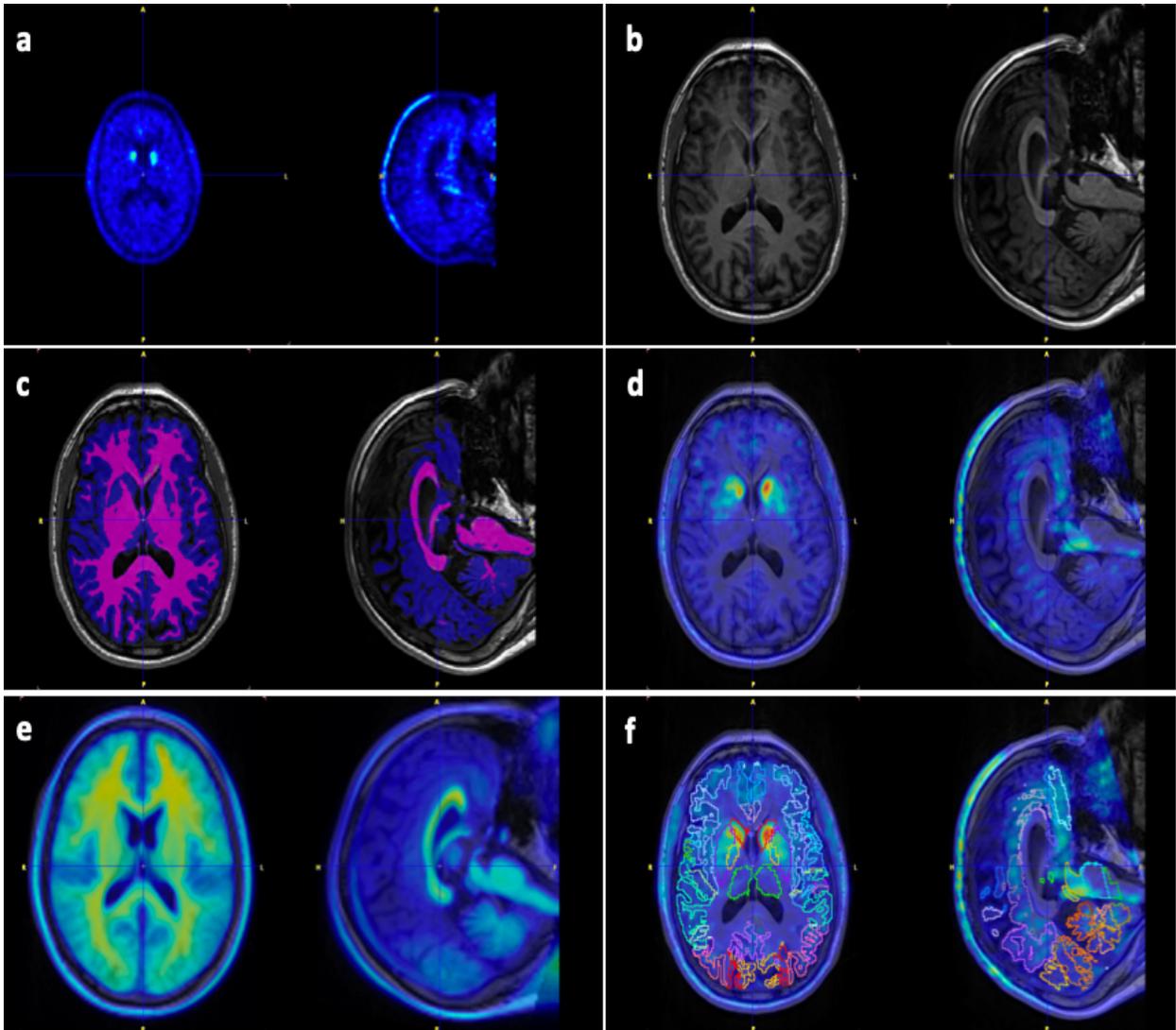


Figura 10: Segmentación de cerebro. a) Estudio PET. b) Estudio MRI. c) Mapas de materia blanca, materia gris y líquido cefalorraquídeo. d) PET en el espacio MRI. e) Transformación del atlas al espacio MRI. f) Estructuras segmentadas en el espacio MRI.

El procesamiento de imágenes partió del estudio PET (Fig. 10a) y la MRI (Fig. 10b). El estudio MRI fue cortado de forma que el campo de vista cubra solamente la región del cerebro del paciente (sin considerar el cuello de este en los estudios sagitales), de esta forma se optimiza el tiempo de computo del programa durante la segmentación. La reducción de ruido en la región del estriado se realizó por medio del algoritmo de medias-no-locales, en la que se toma el promedio de los pixeles vecinos a corregir ponderado por la variación en la intensidad del pixel a corregir.

El cerebro del paciente en la MRI es segmentado en las regiones de sustancia blanca, sustancia gris y líquido cefalorraquídeo (Fig. 10c), para ello, el software utilizado clasifica la intensidad de cada pixel de la imagen y siguiendo una curva gaussiana lo discrimina a uno de los tres tipos de tejido, lo que nos otorga un mapa de probabilidad del tejido (muestreo de 6 mm). Esta primera segmentación permite visualizar las estructuras del estriado. La segmentación en estructuras requiere la definición de un punto o región de referencia en el núcleo caudado, el cual es delimitado marcando la comisura anterior, la comisura posterior, el punto inter-caudal y el punto interhemisférico, este último permite la segmentación de las estructuras por hemisferio izquierdo y derecho.

La imagen PET del radiofármaco se hace coincidir con el espacio del estudio MRI (Fig. 10d), de esta forma la segmentación que se realiza en el MRI puede ser trasladada al estudio PET. La coincidencia entre el atlas y la MRI requiere una transformación estereostática en los mapas de probabilidad, por ello se normaliza la plantilla T1 del atlas al estudio MRI de cada paciente (Fig. 10e). El procedimiento inicia haciendo una coincidencia global del atlas con la MRI y posteriormente se modifican uno a uno los elementos de la plantilla con un algoritmo de seis grados de libertad. Las estructuras modificadas del atlas son segmentadas en la MRI creando los volúmenes de interés (VOIs) para el análisis de concentración de actividad usando la imagen PET (Fig. 10f).

3.6 Análisis estadístico

La cuantificación de concentración de actividad ($\text{kBq/cc} \pm \sigma$) de ^{64}Cu en el cerebro se realizó en las siguientes regiones (fig. 11): Ínsula (INS), Hipocampo (HPC), Amígdala (AMG), Núcleo Caudado (NCD), Putamen (PUT), Pallidum (PLD) y Tálamo (TLM) . Los valores medidos fueron normalizados con la concentración de actividad en una región esférica ($r = 5 \text{ mm}$) en la materia blanca del cerebelo (CWM), esta región fue seleccionada debido que es la responsable del transporte y circulación del cobre al cerebelo, es decir este metal no posee especificidad por la región. Los valores

medidos para cada paciente discriminados por grupo fueron sometidos a una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si siguen una distribución normal ($p=0.05$), posteriormente se obtuvo la actividad normalizada de cada grupo (promedio \pm desviación estándar) para realizar las pruebas estadísticas principales.

Los resultados basales fueron sometidos a una prueba t-student bilateral (ver Anexo A) para determinar las diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$) basales entre ambos grupos. El efecto de la suplementación con cobre en la EP se determinó con una prueba t-student bilateral de muestras pareadas ($p=0.05$).

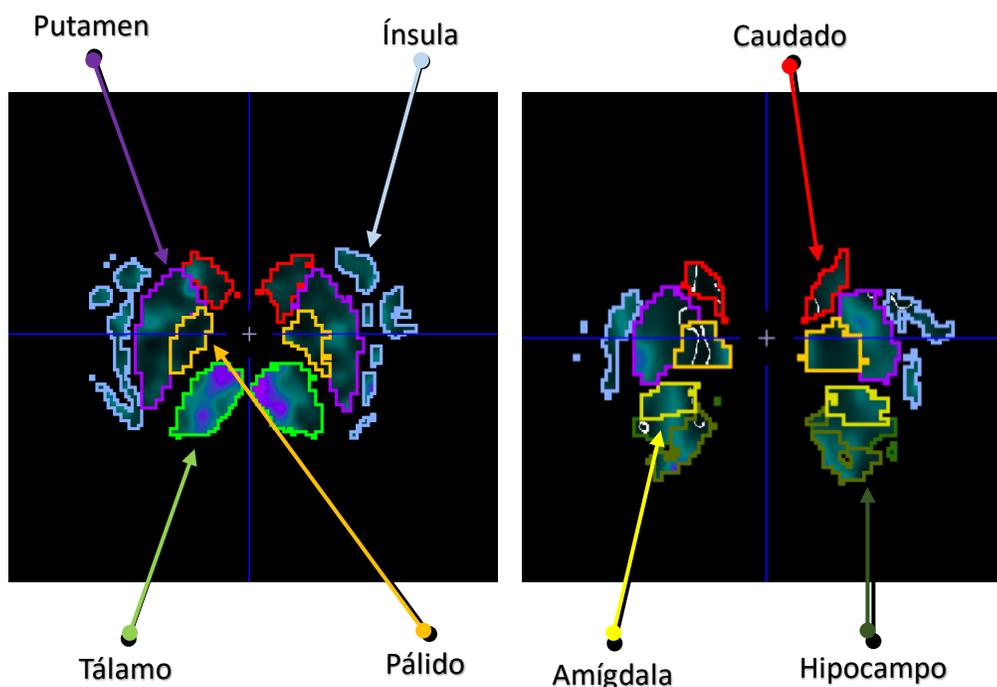


Fig. 11: Estructuras utilizadas en el análisis de distribución cerebral de Cu-64. Izquierda: corte axial, derecha: corte coronal.

Las imágenes de la distribución cerebral de ^{18}F -DOPA fueron utilizadas para conocer el estadio de la enfermedad y evaluar la progresión de esta a un año del tratamiento. Las regiones analizadas fueron las mismas que en la distribución de cobre, tomando énfasis en el estriado dorsal (putamen y núcleo caudado) al ser regiones de captación específica y que han sido correlacionadas con la evolución de la enfermedad (Nurmi,

2006). La normalización de la actividad de 18F-Fluorodopamina se realizó utilizando la actividad medida en la corteza occipital, región que no posee captación específica de este radiofármaco.

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1 Producción de ^{64}Cu

El producto final contenido en 5 ml de solución salina posee una apariencia incolora y un pH de 5.5 ± 0.5 . La pureza radionuclídica se determinó vía espectrometría gamma, haciendo uso de un detector de germanio hiper puro (HPGe), donde se identificaron las emisiones gamma del Cu-64 (Fig. 12). La pureza radionuclídica al tiempo de inyección fue mayor al 99%.

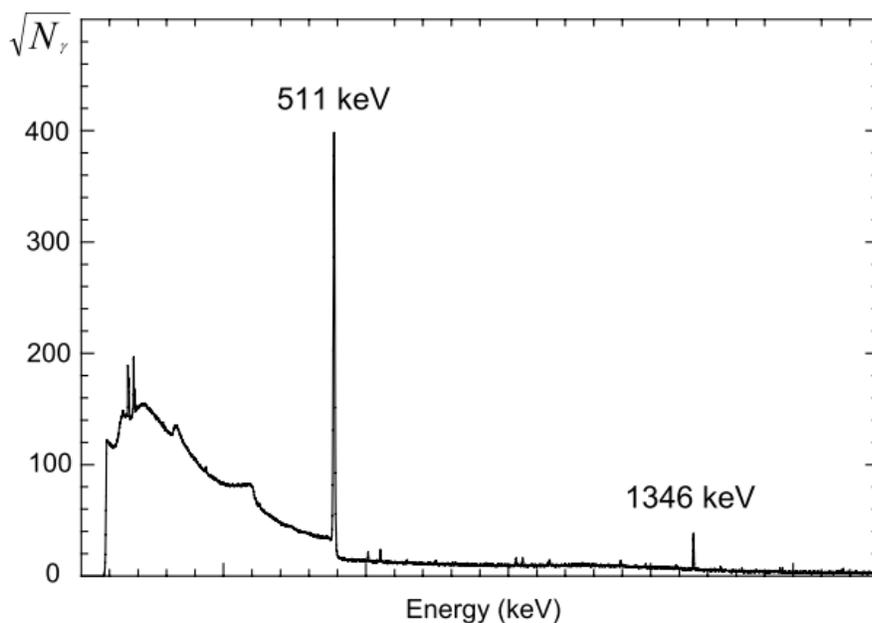


Fig. 12: Espectro gamma (HPGe) del producto al final (Cu-64) después de la separación radioquímica.

La esterilización de la muestra se realizó usando un filtro de membrana de 0.22 μm (Millex-GV). La pureza química del producto se determinó vía espectroscopía de masas (ICP-MS), obteniendo una actividad molar de 10 GBq/ μmol .

La integridad del filtro se comprobó sometiendo el filtro a la presión máxima especificada por el fabricante y verificando su integridad. La concentración de endotoxinas fue medida con el sistema Endosafe-PTS, obteniendo siempre un valor menor a 5 UE/V.

4.2 Biodistribución sistémica de ^{64}Cu en EP

Imágenes PET típicas de la biodistribución en sujetos sanos y con EP se muestran en las Fig. 13 y 14, respectivamente. Por medio de inspección visual es posible observar claramente la captación de ^{64}Cu en hígado, riñones e intestino.

La concentración de actividad medida en OSIRIX MD fue convertida a %ID/org sin realizar una corrección por decaimiento (el equipo PET/CT realiza esta corrección automáticamente al introducir en su tablero la hora de inyección del radiofármaco). La Fig. 15 muestra las curvas de biodistribución hasta 24 h p.i. El órgano con mayor captación de ^{64}Cu es el hígado, seguido por el páncreas, los riñones y finalmente el intestino.

Algunas diferencias sistémicas de las curvas de biodistribución se encuentran en el tiempo para alcanzar el máximo de la captación en el hígado, el cual ocurre 2 h p.i. en los controles sanos, mientras que los sujetos con EP alcanzan este máximo en la primera hora p.i. Este cambio en la cinética del radiofármaco en pacientes con EP puede entenderse debido al déficit de cobre reportado en el trastorno y por consiguiente distribuyen el cobre del hígado más pronto a otros órganos.

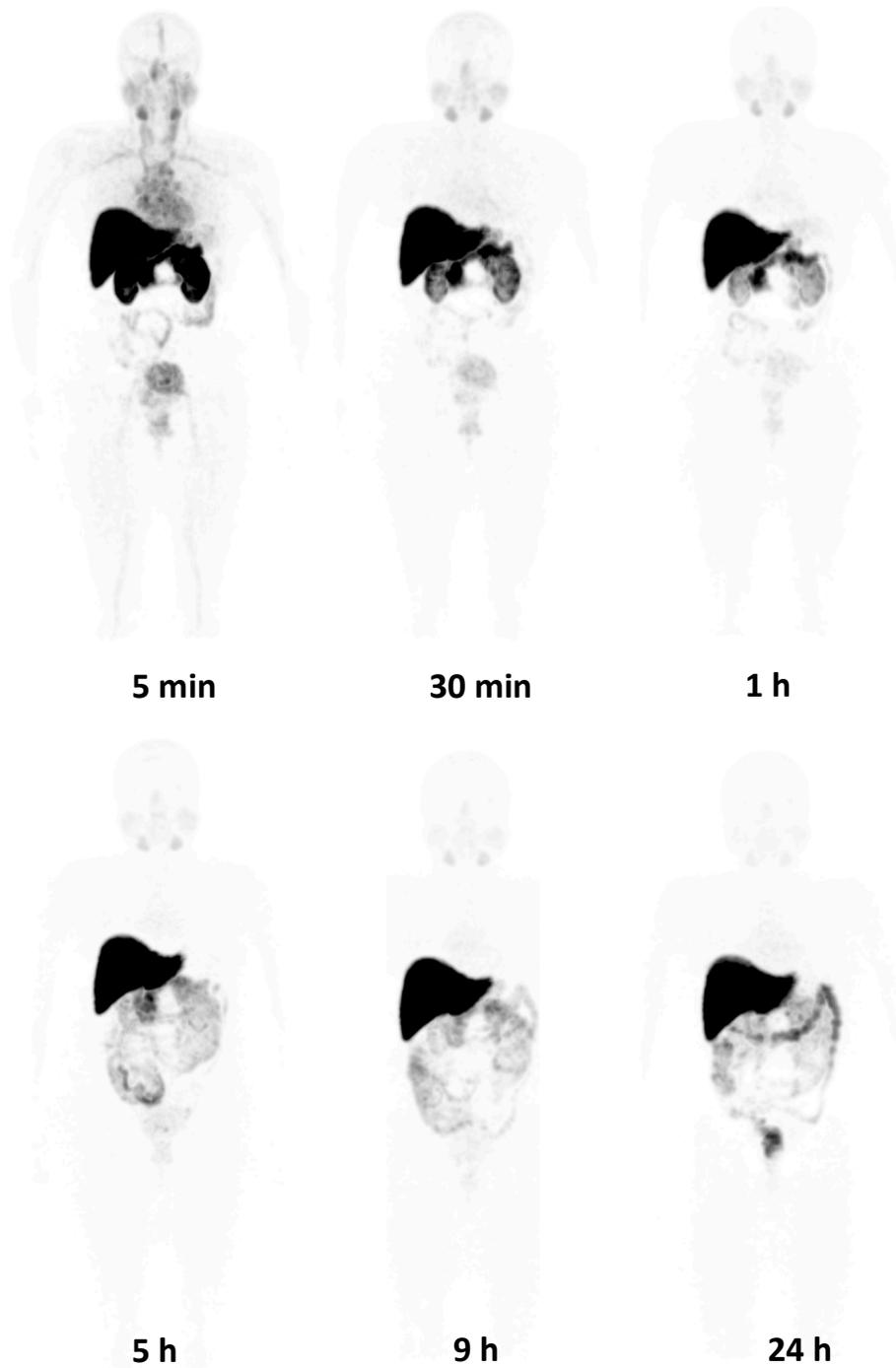


Figura 13: Imágenes PET (proyecciones de máxima intensidad) de la biodistribución sistémica de ^{64}Cu en sujetos sanos.

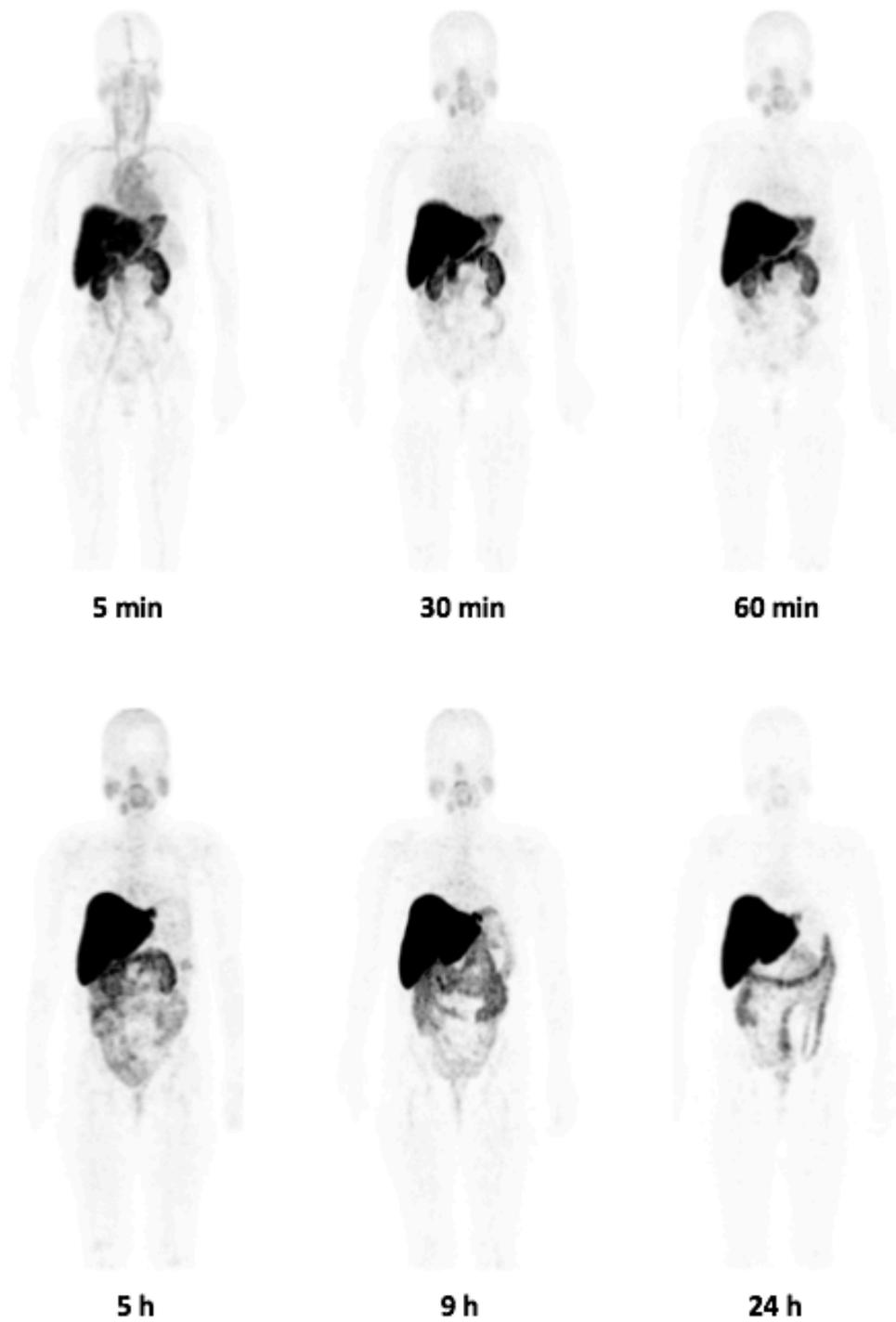


Figura 14: Imágenes PET (proyecciones de máxima intensidad) de la biodistribución sistémica de ^{64}Cu en pacientes con EP.

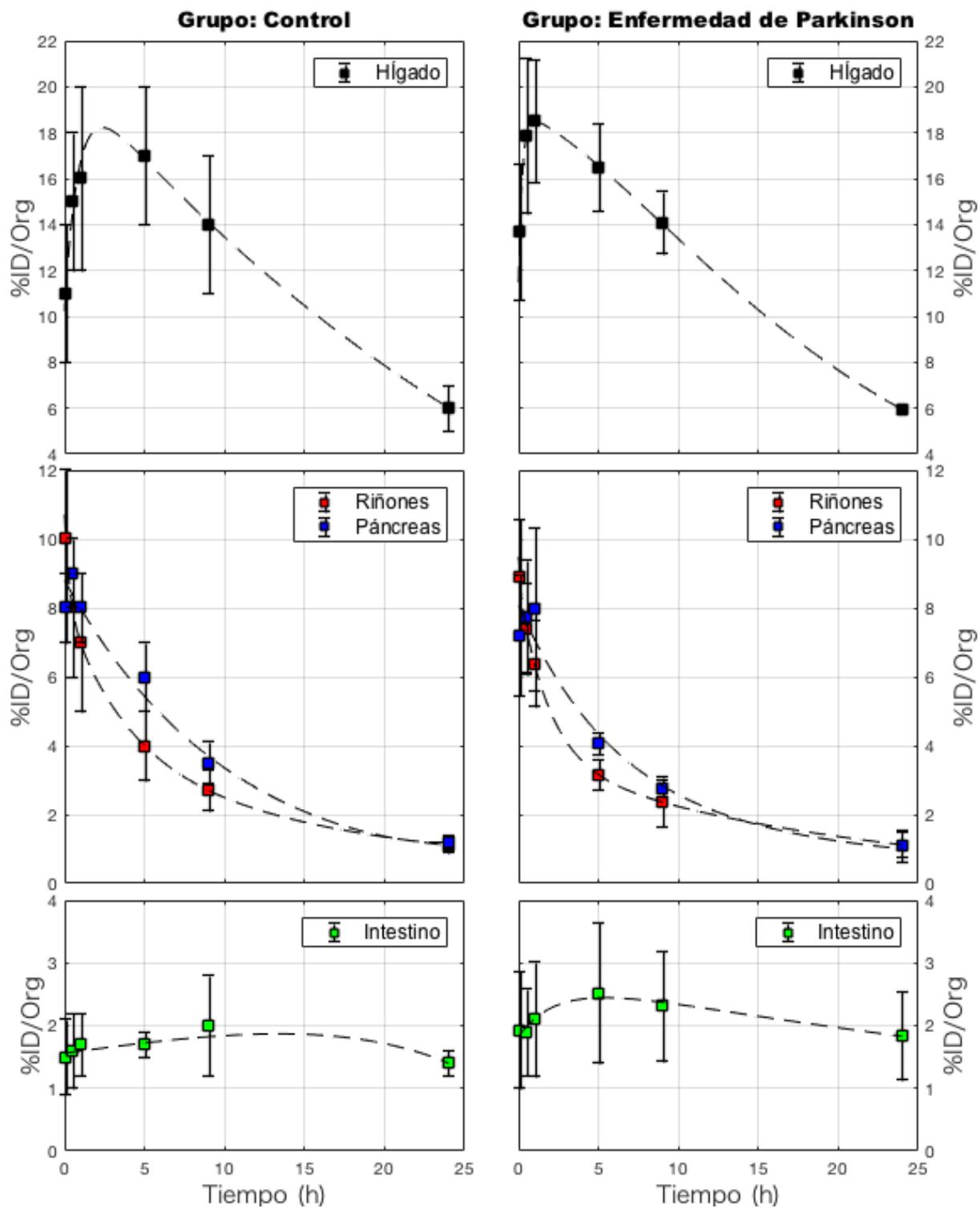


Figura 15: Curvas de %ID/Org vs. Tiempo (biodistribución) en hígado, riñones, páncreas e intestino.

Las curvas de biodistribución en páncreas y riñones poseen el mismo comportamiento exponencial en ambos grupos. Sin embargo, la curva del páncreas en la EP muestra una disminución en la captación de cobre entre las 5 y 9 h p.i. en comparación con los sujetos sanos. Por otro lado, los valores de captación de cobre en el intestino son ligeramente mayores en los sujetos con Parkinson que en sujetos sanos. Esto puede revelar un aumento de eliminación por la vía hepatobiliar por el aumento de cobre en este órgano para el grupo con EP.

Las diferencias estadísticamente significativas de la variable %ID/org se buscaron por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías y que utiliza la distribución F de Fisher-Senecor para realizar esta prueba. Se consideró a la variable %ID/org como dependiente de dos factores, el Factor 1 del *Tiempo* (5 grados de libertad, g.l.) de adquisición de las medidas y el Factor 2 una variable categórica que distingue al *Grupo* (1 g.l.) como Control o EP.

Se utilizó como hipótesis nula (H_0) que las medias de los datos no varían con ninguno de los dos factores. El nivel de significancia para rechazar H_0 se tomó con un $p = 0.05$, de obtener un valor p inferior a este se acepta la hipótesis alternativa que establece la diferencia de las medias debido a los factores de forma independiente o debido a su interacción. Los resultados del ANOVA de dos vías se muestran en la tabla 4.

El ANOVA muestra una dependencia del %ID/org con el tiempo en hígado, páncreas y riñones, esto es natural debido a la cinética del cobre en el cuerpo para su transporte a otros órganos y recirculación, sin embargo, en el intestino no existe una dependencia con esta variable. Las gráficas de la Fig. 14 de la biodistribución en intestino muestran, al observar cada grupo por separado, que los niveles de cobre en este órgano se mantienen constantes con el tiempo y 24 h p.i. aún existe cobre que está siendo excretado.

El ANOVA concluye que hay una interacción entre la variable tiempo y grupo en el páncreas ($p = 0.042$). Sin embargo, el papel que posee el páncreas en la EP o en la ruta metabólica del cobre no es claro para entender la diferencia estadísticamente significativa que se encontró.

Tabla 4: ANOVA de dos vías de la biodistribución de ^{64}Cu .

| | Valor p | | | |
|---|----------------|-----------------|----------------|------------------|
| | <i>Hígado</i> | <i>Páncreas</i> | <i>Riñones</i> | <i>Intestino</i> |
| <i>Tiempo</i> | 3.83E-07 | 4.90E-13 | 1.50E-13 | 0.561 |
| <i>Grupo</i> | 0.105 | 0.165 | 0.183 | 0.036 |
| <i>Interacción</i> <i>(Tiempo*Grupo)</i> | 7.31E-06 | 0.042 | 0.9904 | 0.986 |

Del mismo ANOVA, se obtiene una dependencia del %ID/org con la categoría sujeto en el intestino, revelando las diferencias sistémicas en la biodistribución de cobre. Para el intestino se obtuvo un $p = 0.036$ y al observar la gráfica de la biodistribución en este órgano (Fig. 14) se aprecia que el valor promedio de cobre excretado es ligeramente mayor en los sujetos con EP, lo que podría estar limitando la distribución hacia otros órganos y podría generar la ruptura en la homeostasis de este metal. Sin embargo, de existir esta ruptura homeostática, la deficiencia de cobre debido a la excreción debe observarse en las curvas de biodistribución con una disminución en el %ID/org. Por lo tanto, se requiere un grupo experimental con mayor muestreo para mejorar la estadística.

4.3 Diagnóstico usando ^{18}F -6-Fluorodopamina

Las imágenes de distribución cerebral de ^{18}F -DOPA se muestran en la Fig. 16. Se observa la captación específica del radiofármaco en las regiones del caudado y putamen, encontrándose una captación simétrica en los sujetos sanos. Los sujetos con EP presentan una asimetría según el hemisferio (izquierdo o derecho) que afecta la

enfermedad en sus primeros estadios, así como un gradiente de captación en el putamen que va de anterior a posterior.

La cuantificación de ^{18}F -DOPA se centró en las regiones del Caudado y Putamen. El promedio de captación de ^{18}F -DOPA (normalizada a la corteza occipital) en el grupo control se consideró como referencia para confirmar el diagnóstico de la EP, siendo estos niveles $1.9 \pm 0.2 \%$ para el caudado y $2.2 \pm 0.2 \%$ en el putamen.

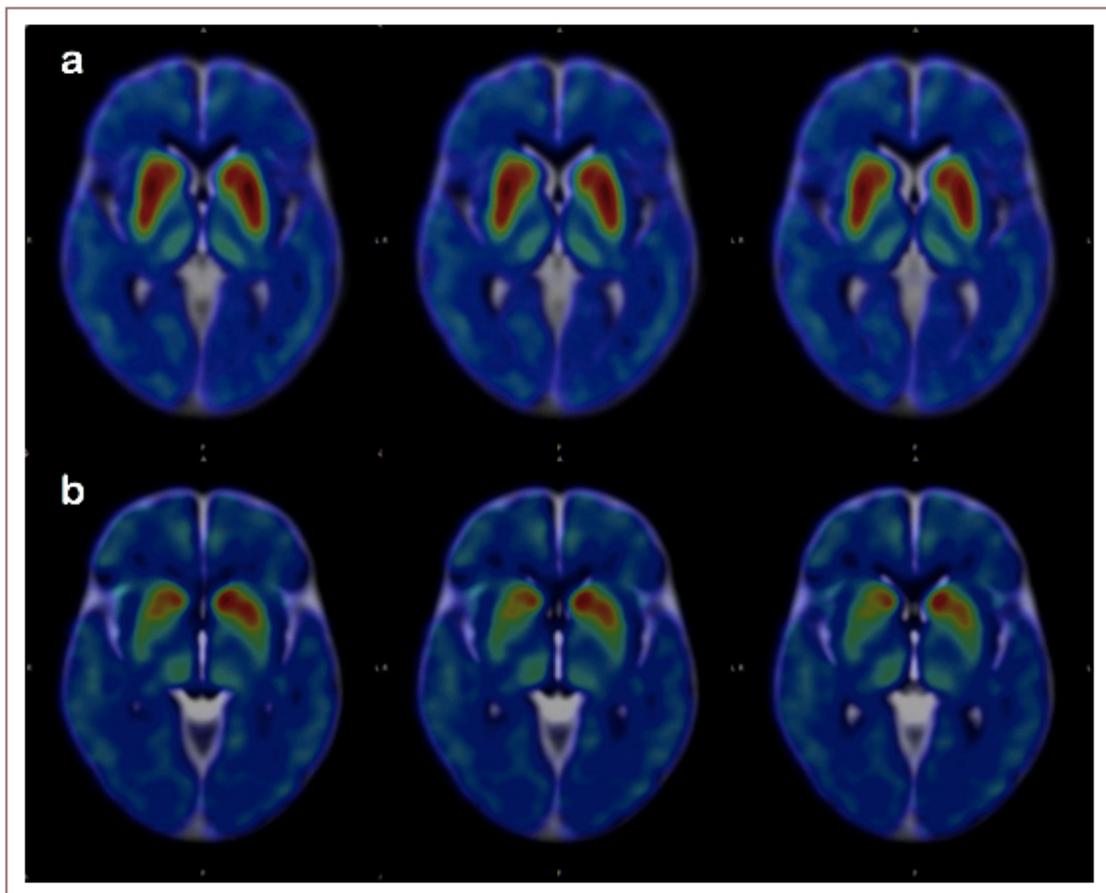


Figura 16: Cortes axiales de las imágenes PET cerebrales usando ^{18}F -DOPA en (a) sujeto sano y (b) sujeto con EP.

El estándar para evaluar de manera cuantitativa el estadio de la enfermedad es la constante de influjo K_{in} que se determina por medio de estudios dinámicos de 90 min y un análisis cinético de Patlak. Sin embargo, se ha reportado (Jonikien 2009) que el uso

de un valor semicuantitativo como el Cociente Estriado – Occipital (SOR) correlaciona con los valores K_i medidos en la EP. El uso del SOR brinda la ventaja de realizar estudios estáticos que no requieren que el paciente se coloque 90 minutos en camilla durante la adquisición de un estudio dinámico de la imagen PET.

Los valores de SOR promedio obtenidos en el estriado dorsal para el grupo experimental fueron 1.6 ± 0.2 en el caudado y 1.7 ± 0.2 en el putamen. La cuantificación de ^{18}F -DOPA en la enfermedad de Parkinson arrojó valores inferiores de este radiofármaco en los sujetos enfermos (Fig. 17), siendo esta diferencia del $16 \pm 3 \%$ en el caudado y del $23 \pm 3 \%$ en el putamen. Se realizó una prueba t-Student para confirmar diferencias en la distribución obtenida del SOR entre los grupos, obteniendo una significancia estadística en el caudado ($p=0.009$) y en el putamen ($p=3.5E-6$). Estos niveles medidos antes de tratamiento permitirán evaluar el posible efecto neuroprotector del suplemento de cobre.

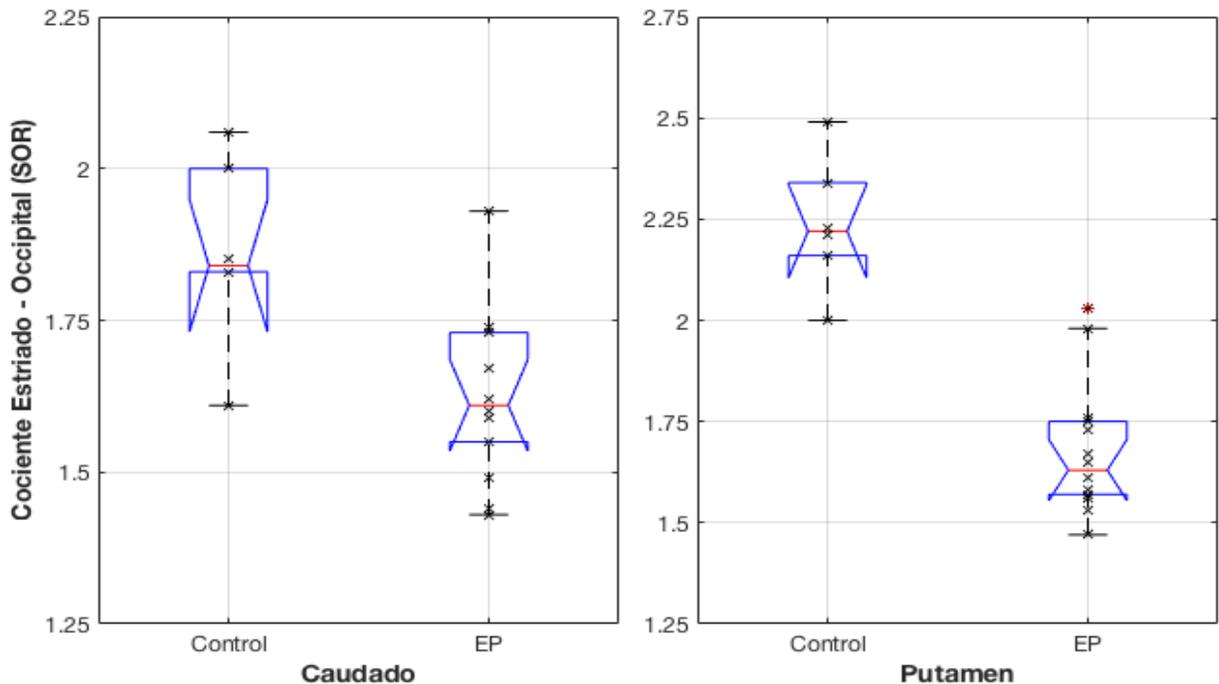


Fig. 17: Gráficos de cajas para el SOR medido en sujetos control y con EP en caudado y putamen. En la gráfica las líneas negras horizontales superior e inferior muestran el valor

máximo y mínimo de la distribución, mientras las líneas azules superior e inferior representan el tercer y primer cuartil respectivamente.

4.4 Biodistribución cerebral de ^{64}Cu

Las imágenes PET de la biodistribución cerebral de ^{64}Cu se muestran en la Fig. 18. La distribución a nivel cerebral de este radiofármaco no muestra sitios de captación específica, como es el caso de las imágenes del radiofármaco ^{18}F -DOPA, debido que estas imágenes obtienen un mapeo de los transportadores de cobre como CTR1, COX17, ATOX17 o CSS, los cuales poseen una distribución heterogénea en el cerebro (Holzer et al 2006).

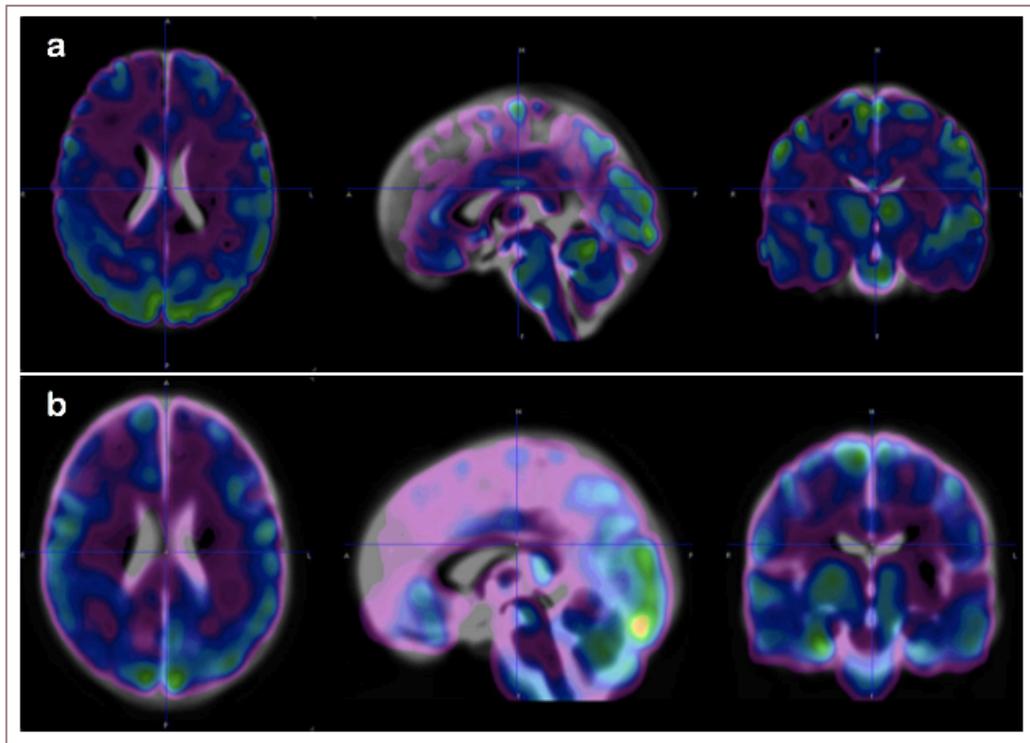


Figura 18: Imágenes PET cerebrales de $^{64}\text{CuCl}_2$ fusionadas con IRM (referencia anatómica), en (a) sujeto control y (b) sujeto con EP. Cortes de izquierda a derecha: axial, sagital y coronal.

Debido a la señal tan baja encontrada en la región central del cerebro (concentración de actividad máxima ~ 0.6 kBq/cc), y la distribución homogénea de cobre en cerebro,

se realizó una prueba Test – Rest -Test (TRT), con fin de descartar que las diferencias que puedan ser encontradas entre estudios sean debido al ruido de las imágenes.

El estudio TRT se realizó a un voluntario sano siguiendo el mismo protocolo de adquisición de imágenes PET, dejando 1 mes de diferencia entre ambos estudios. Para estos estudios se controló que la dosis inyectada fuera la misma en ambas adquisiciones, así que el tiempo de adquisición fueran 24 h p.i. Los estudios PET se observan en la Fig. 19. La inspección visual revela que el Cu-64, en su forma química de cloruro, posee los mismos puntos de hipercaptación como el lóbulo occipital y el bregma cerebral.

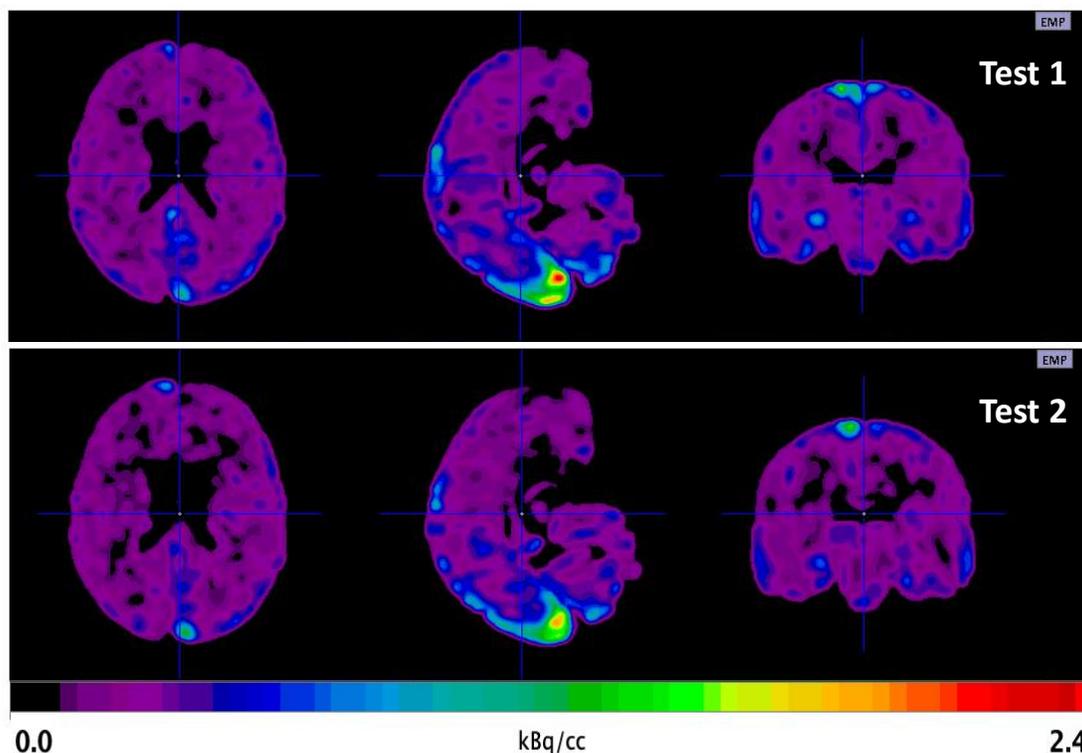


Fig. 19: Estudios Test-Re-Test de un mes de diferencia con $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ en paciente sano. Cortes de izquierda a derecha: axial, sagital y coronal.

Cuantitativamente, en el estudio TRT no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la biodistribución de cobre ($[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$) para estudios sucesivos de un mes de diferencia Fig. 20, por lo que los cambios en la biodistribución de cobre, de haberlos, serán debidos a la biodistribución de cobre y no al ruido de la técnica de imagen.

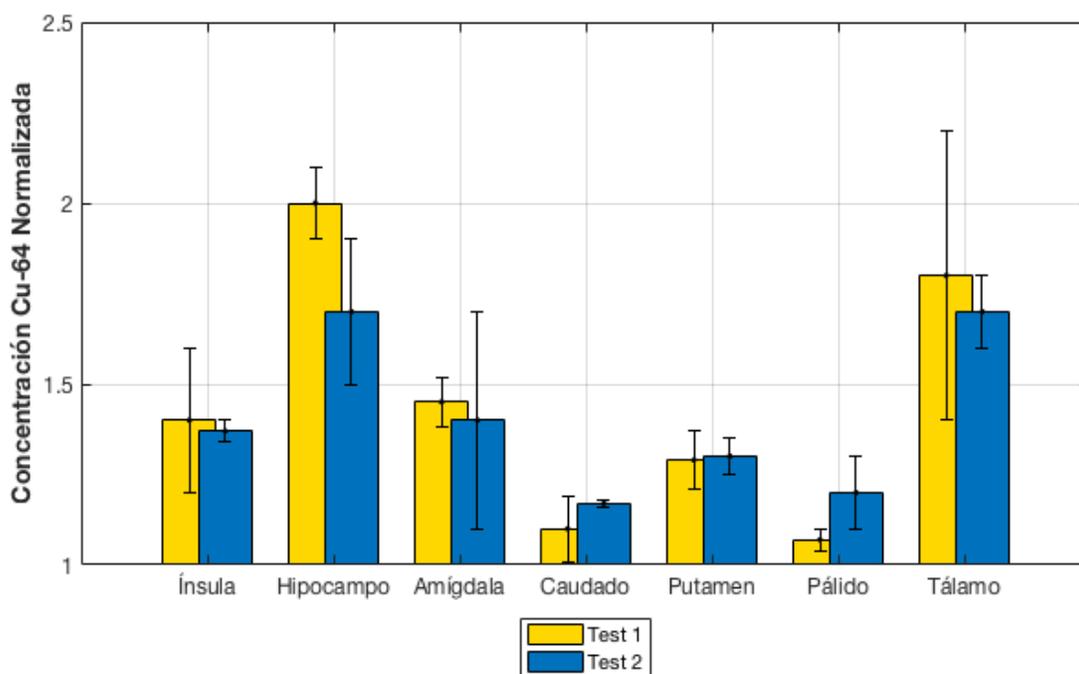


Fig. 20: Concentración de actividad de $^{64}\text{CuCl}_2$ normalizada (promedio \pm desviación estándar) medida en la prueba TRT en un sujeto control. (* : $p < 0.05$)

La biodistribución de ^{64}Cu se centró en las estructuras del estriado y cerebro medio como la ínsula, la amígdala, el hipocampo, el caudado, el putamen, el pálido y el tálamo (Fig. 21); debido que son las regiones mayormente especializadas en el control motor y sensación. La concentración de ^{64}Cu medida fue normalizada con la actividad medida en la sustancia blanca del cerebelo. En la cuantificación de Cu-64, se utilizaron los mismos volúmenes de interés en ambos estudios, de forma que los volúmenes de dichas regiones posean la misma cantidad de píxeles y no esta variable no fuera una fuente de error.

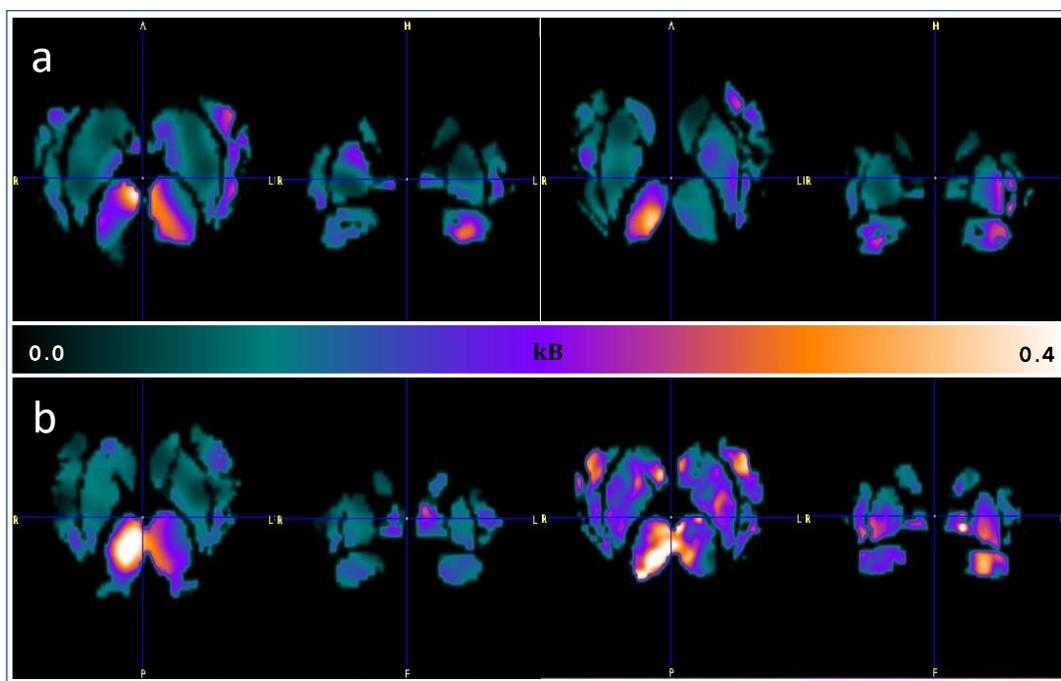


Figura 21: Imágenes PET (corte axial y coronal) obtenidas con $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ de las estructuras del estriado analizadas. a) Sujetos control b) Sujetos con EP.

La inspección visual de los estudios PET revela focos de hipercaptación en los estudios de sujetos con EP, siendo más prominentes en el hipocampo y el tálamo. Los valores de concentración de actividad de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ normalizada (promedio \pm desviación estándar) del grupo control y los sujetos con EP se muestran en la Figura 22. Se comprueba que los niveles de cobre son mayores en las zonas de estudio, siendo las regiones de mayor concentración el hipocampo y el tálamo, mientras la región de menor captación fue el caudado.

Las diferencias estadísticamente significativas previas a la suplementación fueron determinadas con una prueba de hipótesis de dos colas. Se aceptó la hipótesis alternativa de diferencia en las medias cuando el nivel de significancia p es menor al 0.05. Las regiones encontradas con una diferencia estadísticamente significativas son la ínsula ($p=0.049$), la amígdala ($p=0.042$) y el caudado ($p=0.011$).

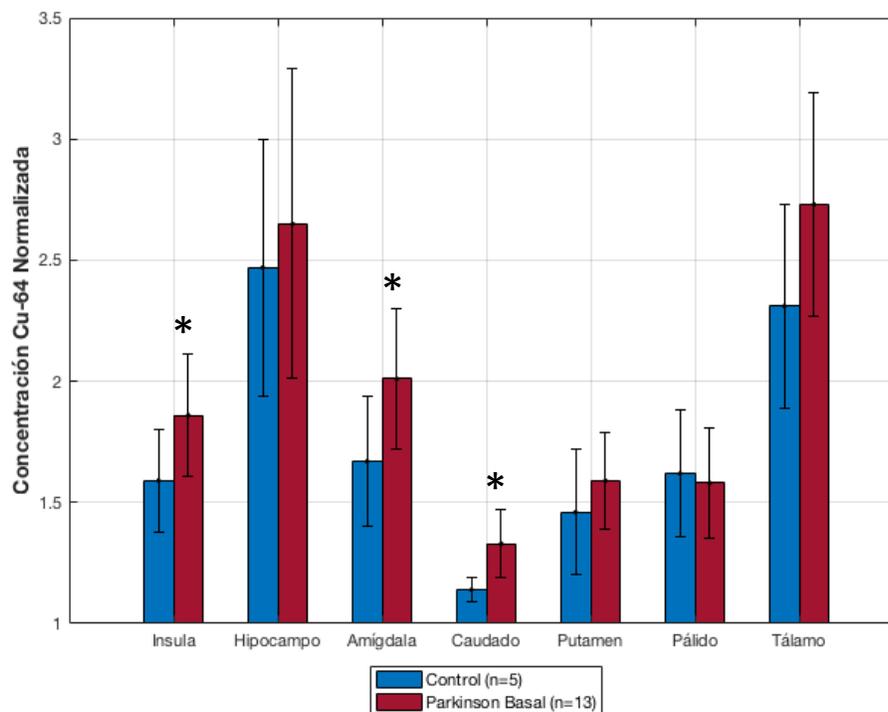


Figura 22: Concentración de actividad de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ normalizada (promedio \pm desviación estándar) medida en el grupo control y el grupo con EP, previo a la suplementación con cobre (* : $p < 0.05$).

La prueba t-student se repitió entre el grupo suplementado con placebo y el grupo suplementado con cobre, con fin de descartar diferencias estadísticamente significativas previas al tratamiento. En las siete estructuras analizadas no existió una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

4.5 Análisis de imágenes post-suplementación

Los estudios post-suplementación se realizaron a 11 de los sujetos del grupo con EP, debido que tres de ellos abandonaron el estudio (dos sujetos suplementados con cobre y uno recibiendo placebo).

4.5.1 Imágenes de Cu-64

Las imágenes PET de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ post-suplementación y su contraste con el estudio basal se muestra en la Fig. 23. Las imágenes posteriores a la suplementación no poseen

un patrón de captación específica en el cerebro para los sujetos del mismo grupo (ver Anexo B).

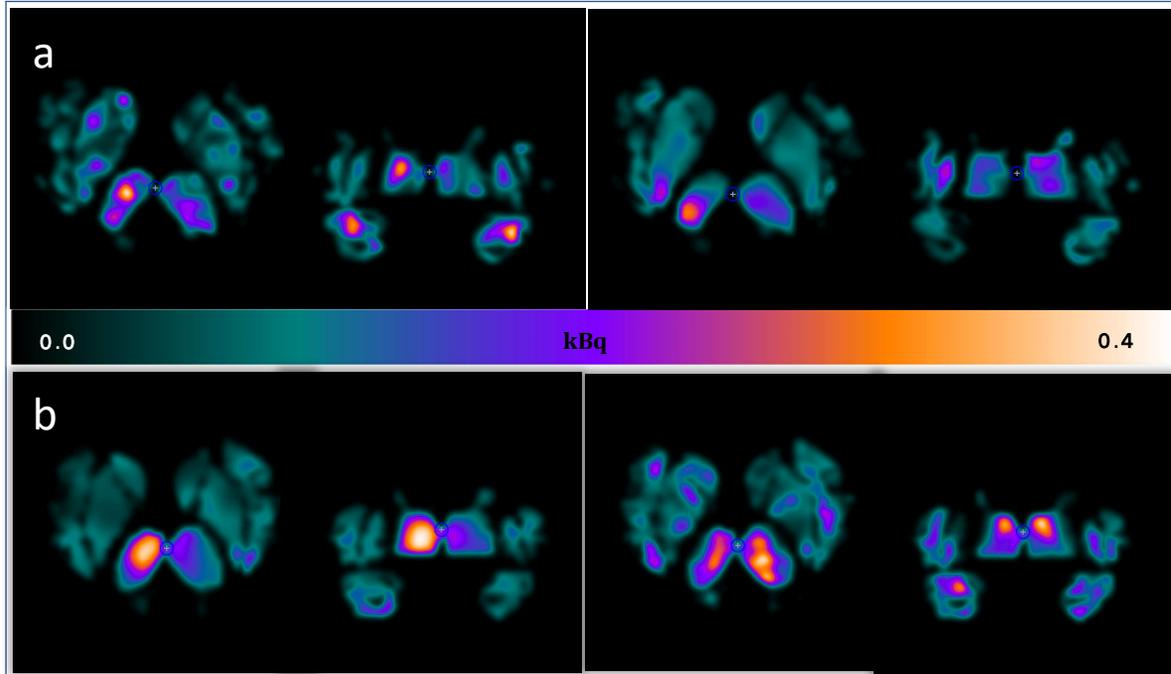


Fig. 23: Imágenes PET (corte axial y coronal) de ^{64}Cu CuCl₂ en la región del estriado para (a) un sujeto suplementado con placebo y (b) un sujeto suplementado con cobre. Izquierda: estudio basal. Derecha: estudio de seguimiento.

El promedio medido de grupo con EP post-suplementación y su comparación con los valores del grupo control se muestran en la Fig. 24. El grupo con Parkinson mantiene los niveles de cobre en las estructuras analizadas superiores a los niveles normales (salvo para el pálido) a un año de suplementación. En contraste con los valores promedios medidos en los estudios basales, la concentración de ^{64}Cu CuCl₂ post-suplementación es menor en las siete estructuras. La prueba t-Student no pareada entre el grupo control y el grupo con EP post-suplementación no revela diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las siete estructuras.

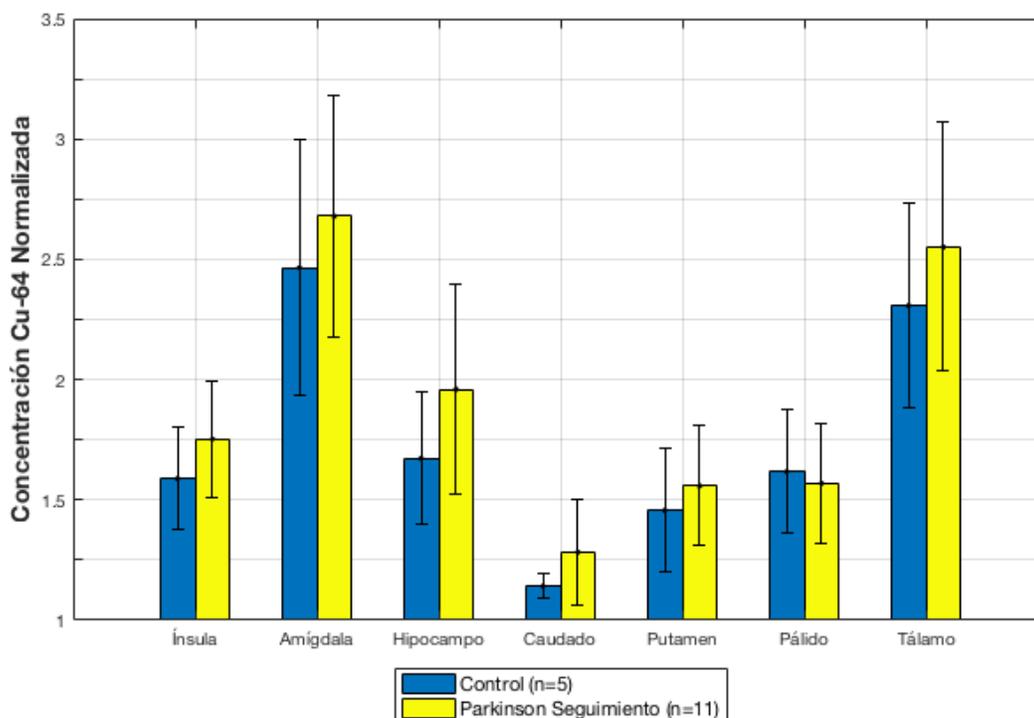


Figura 24: Concentración de actividad de $[^{64}\text{Cu}]\text{Cl}_2$ normalizada (promedio \pm desviación estándar) medida en el grupo control y el grupo con EP posterior a la suplementación con cobre (*: $p < 0.05$).

Una segunda prueba t-Student pareada entre los valores basales y de seguimiento del grupo con EP, concluye que no hay diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5) en la distribución de los datos de ambos grupos que puedan ser atribuidas a la suplementación.

Al separar el grupo experimental según el suplemento, se observa que el grupo que recibió cobre (Fig. 25) la concentración de Cu en ínsula disminuyó (1.6 ± 2.1 %) mientras que las estructuras de hipocampo (2.9 ± 3.0 %), amígdala (7.1 ± 1.7 %), caudado (17.8 ± 3.5 %), putamen (12.4 ± 1.2 %), pálido (10.3 ± 2.0 %) y tálamo (1.4 ± 3.4 %) aumentaron sus niveles de dicho metal ($[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$).

Tabla 5: Prueba t-student pareada de la suplementación con cobre y placebo.

| | | Concentración Cu-64 Normalizada | | | | | | |
|----------------|------------------|---------------------------------|---|-----|-------------|---|-----|---------|
| | | Basal | | | Seguimiento | | | Valor p |
| COBRE | Ínsula | 1.9 | ± | 0.2 | 1.8 | ± | 0.3 | 0.906 |
| | Hipocampo | 2.5 | ± | 0.6 | 2.6 | ± | 0.4 | 0.855 |
| | Amígdala | 1.9 | ± | 0.1 | 2.1 | ± | 0.3 | 0.421 |
| | Caudado | 1.3 | ± | 0.2 | 1.6 | ± | 0.4 | 0.397 |
| | Putamen | 1.6 | ± | 0.1 | 1.8 | ± | 0.1 | 0.167 |
| | Pálido | 1.6 | ± | 0.2 | 1.7 | ± | 0.3 | 0.207 |
| | Tálamo | 2.4 | ± | 0.4 | 2.5 | ± | 0.7 | 0.944 |
| PLACEBO | Ínsula | 1.9 | ± | 0.2 | 1.7 | ± | 0.2 | 0.213 |
| | Hipocampo | 2.7 | ± | 0.6 | 2.7 | ± | 0.6 | 0.995 |
| | Amígdala | 2.1 | ± | 0.4 | 2.0 | ± | 0.5 | 0.379 |
| | Caudado | 1.3 | ± | 0.1 | 1.2 | ± | 0.2 | 0.435 |
| | Putamen | 1.6 | ± | 0.2 | 1.5 | ± | 0.3 | 0.222 |
| | Pálido | 1.6 | ± | 0.3 | 1.5 | ± | 0.2 | 0.340 |
| | Tálamo | 2.9 | ± | 0.5 | 2.5 | ± | 0.6 | 0.105 |

Por otro lado, el grupo que recibió placebo (Fig. 26) decreció los valores de cobre en ínsula (10.3 ± 1.5 %), amígdala (6.7 ± 2.9 %), caudado (3.7 ± 1.6 %), putamen (8.1 ± 2.1 %), pálido (8.5 ± 2.0 %) y tálamo (16.5 ± 2.4 %); siendo el hipocampo (0.1 ± 3.1 %) la única estructura en mantener constante su concentración de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$.

Los valores obtenidos de aumento y descenso en los niveles de concentración cobre, en su forma de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ requieren de más pruebas clínicas que determinen el estado del cobre intracelular, debido a que el cobre libre aumenta el estrés celular, mientras el cobre ligado a proteínas posee un carácter neuroprotector ante el estrés neurodegenerativo causado por la enfermedad.

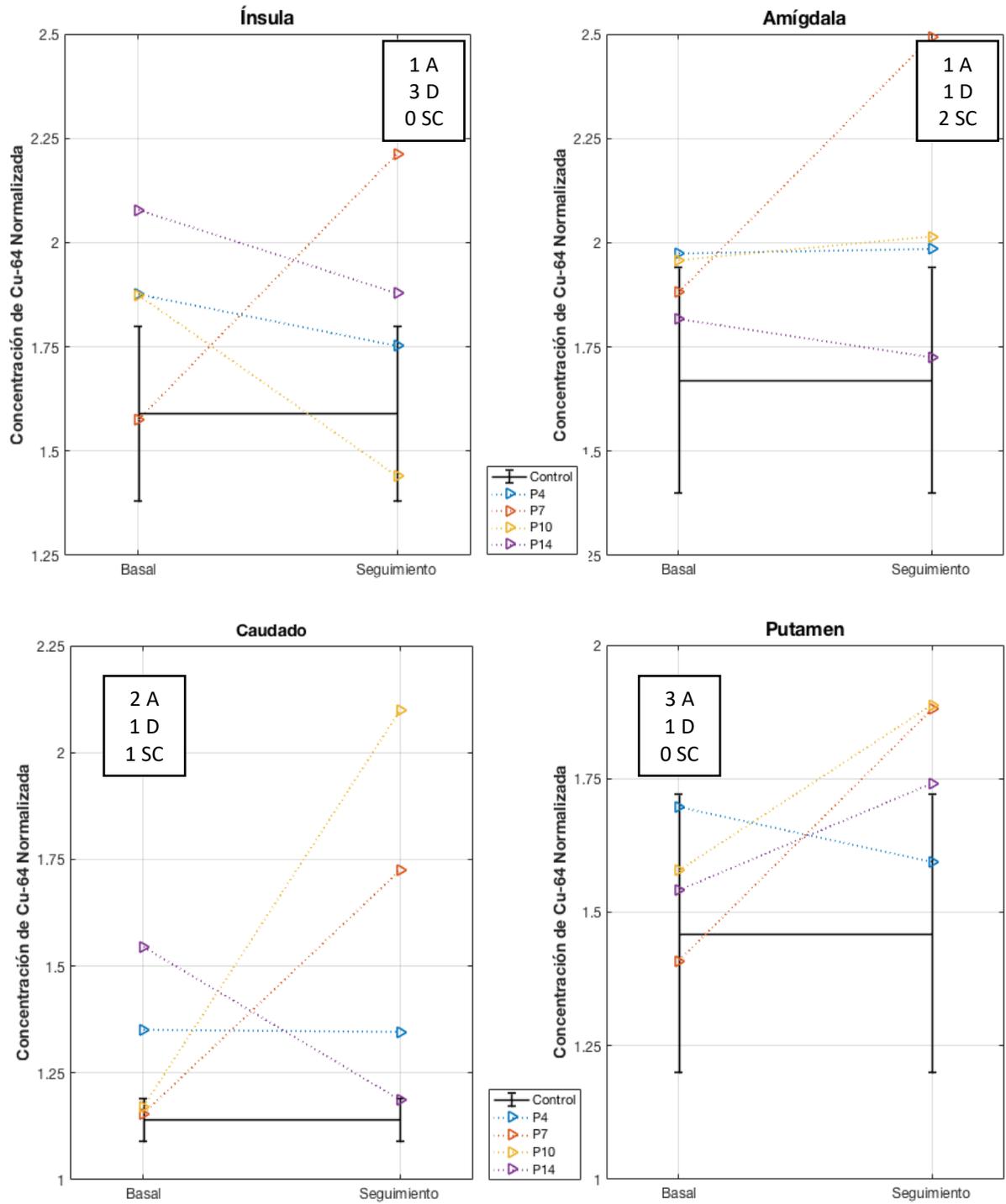


Fig. 25: Cambios en la distribución de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ cerebral en los pacientes suplementados con cobre. A: aumento, D: descenso, SC: sin cambios

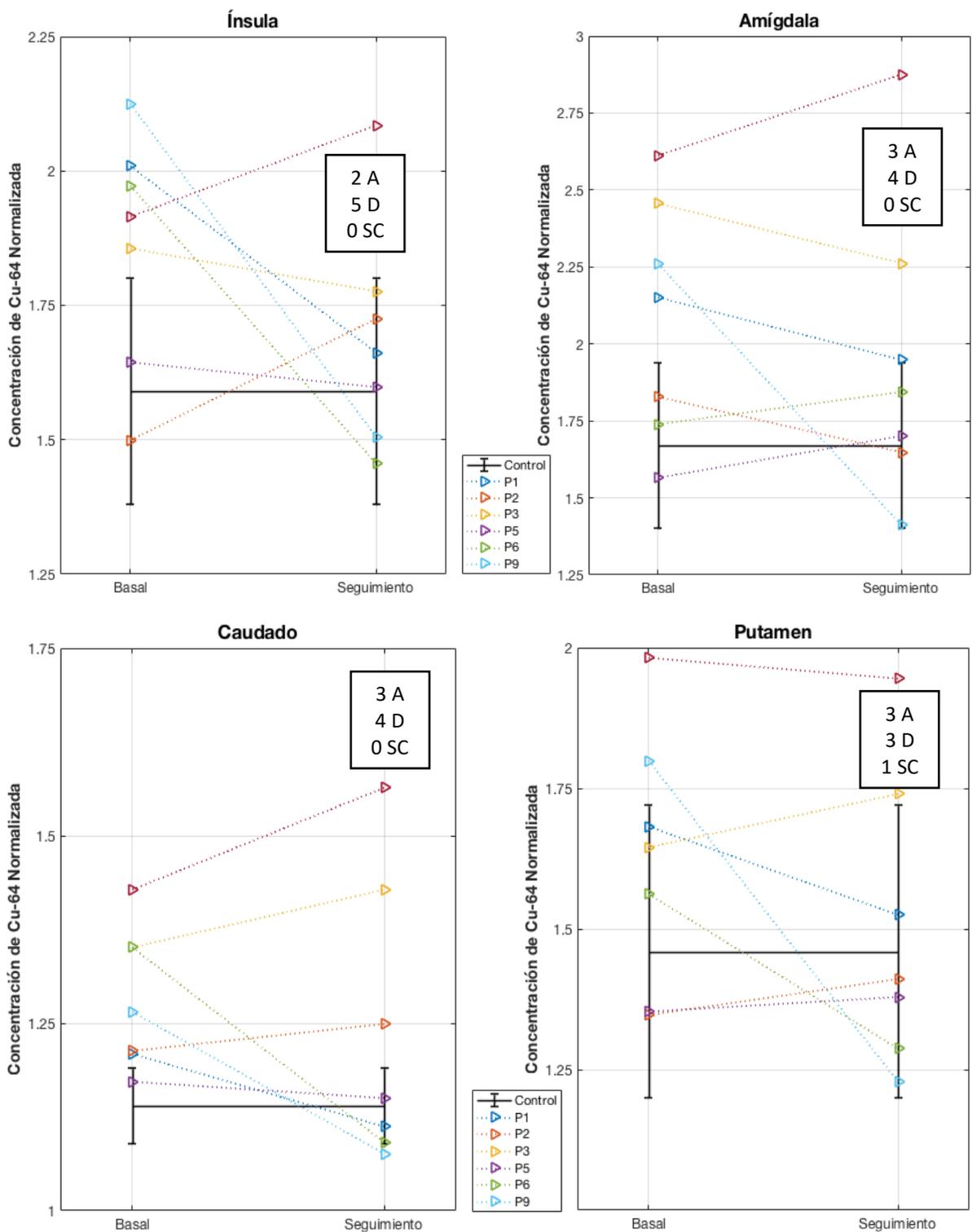


Fig. 26: Cambios en la distribución de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ cerebral en los pacientes suplementados con placebo. A: aumento, D: descenso, SC: sin cambios.

4.5.2 Progresión de la EP con ^{18}F -6-Fluorodopamina

Los estudios PET con ^{18}F -6-Fluorodopamina se muestran en la Figura 27. Es apreciable el seguimiento del gradiente de depleción dopaminérgica en el putamen de ambos sujetos (independiente de la suplementación), siendo más prominente en los sujetos que no recibieron el cobre. Por otro lado, el caudado de los sujetos que recibieron la suplementación no posee diferencias cualitativas apreciables a simple vista.

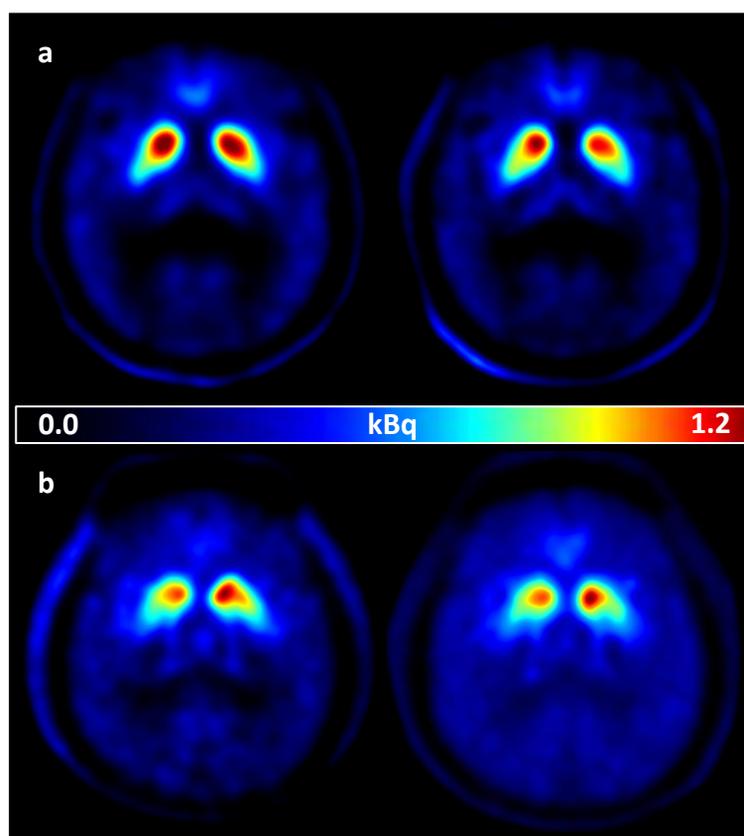


Fig. 27: Estudios PET (cortes axiales del estriado dorsal) con ^{18}F -6-Fluorodopamina basales (izquierda) y de seguimiento post-suplementación (derecha), para un sujeto recibiendo placebo (a) y con suplementación de cobre (b).

La progresión de la enfermedad se midió a partir de la variación del Cociente Estriado – Occipital (SOR) a un año post-suplementación. Se obtuvo un SOR promedio para el grupo con EP de 1.8 ± 0.1 en el caudado y 1.8 ± 0.2 en la región del putamen. La prueba t de student pareada por subgrupos según la suplementación recibida (Tabla 6)

no reveló cambios estadísticamente significativos que se puedan atribuir a la suplementación.

Tabla 6: Prueba t-student pareada de los valores basales y de seguimiento de ^{18}F -DOPA.

| | Suplemento | Cociente Estriado - Occipital | | p-valor |
|---------|------------|-------------------------------|-------------------|---------|
| | | Basal | Seguimiento 1 año | |
| Caudado | Placebo | 1.6 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.2 | 0.222 |
| | CuSO4 | 1.7 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.2 | 0.156 |
| Putamen | Placebo | 1.7 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.2 | 0.760 |
| | CuSO4 | 1.7 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.1 | 0.167 |

Por otro lado, se determinó el aumento porcentual ($\Delta\%$) en la captación de ^{18}F -DOPA como sigue:

$$\Delta\% = \frac{|SOR_{\text{seguimiento}} - SOR_{\text{Basal}}|}{SOR_{\text{Basal}}} \times 100$$

El SOR promedio posterior a la suplementación con cobre posee un aumento porcentual ($\Delta\%$) de $6 \pm 1 \%$ en la región del putamen, mientras los sujetos suplementados con placebo revelan un aumento de este radiofármaco del $2 \pm 2 \%$. En el caudado, este aumento es del $13 \pm 2 \%$ en sujetos suplementados con cobre y $8 \pm 2 \%$ para quienes recibieron placebo. La progresión de la enfermedad anual reportada (Nurmi et al., 2001) ha mostrado un declive del SOR en un 5.9% para el caudado y un 9.3% dentro del putamen, por lo que encontramos cambios en la progresión de la enfermedad debidos al tipo la suplementación.

La suplementación debe poseer un carácter neuroprotector en el estriado que detiene la progresión de la enfermedad. Sin embargo, al analizar individualmente a los sujetos del grupo y distinguirlos entre sujetos suplementados con placebo (Fig. 28) y cobre (Fig. 29), se conserva la tendencia de aumento en los niveles de captación de ^{18}F -DOPA, por lo no queda claro si el aumento de dicho cociente es atribuible al cobre y se requieren pruebas clínicas, como la escala UPDRS, que descarten en posible efecto placebo.

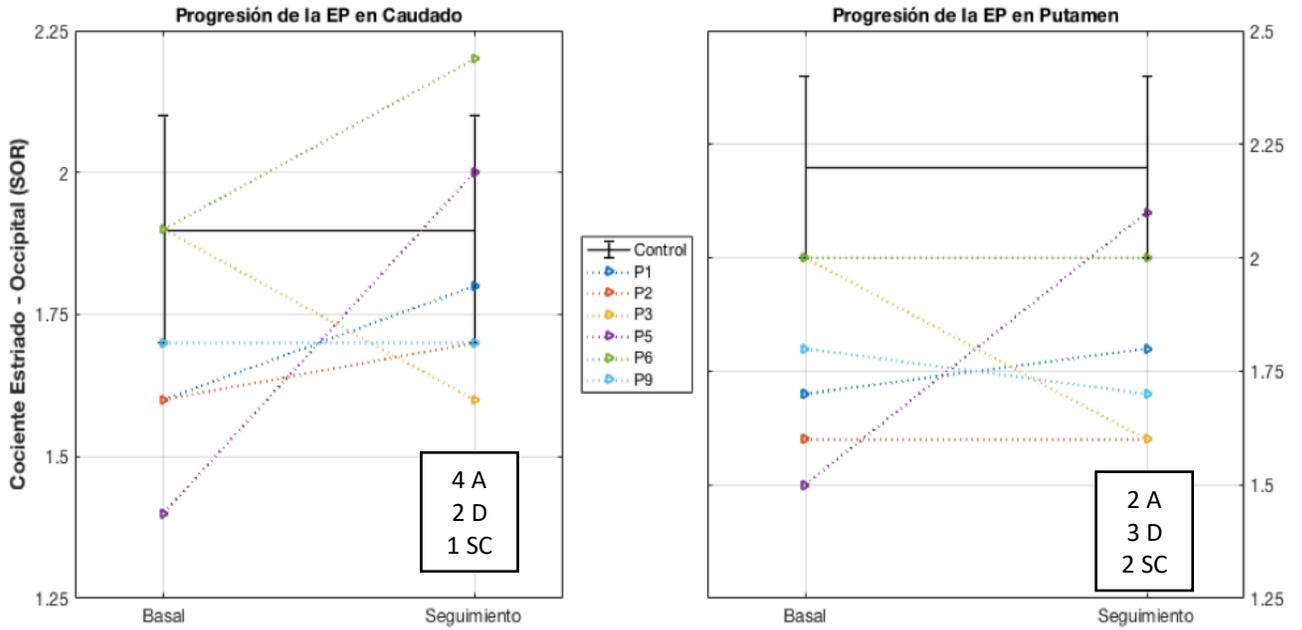


Fig. 28: Progresión de la enfermedad de Parkinson en el grupo suplementado con placebo, usando el Cociente Estriado Occipital (^{18}F -DOPA) de las estructuras del estriado dorsal. A: aumento, D: descenso, SC: sin cambios.

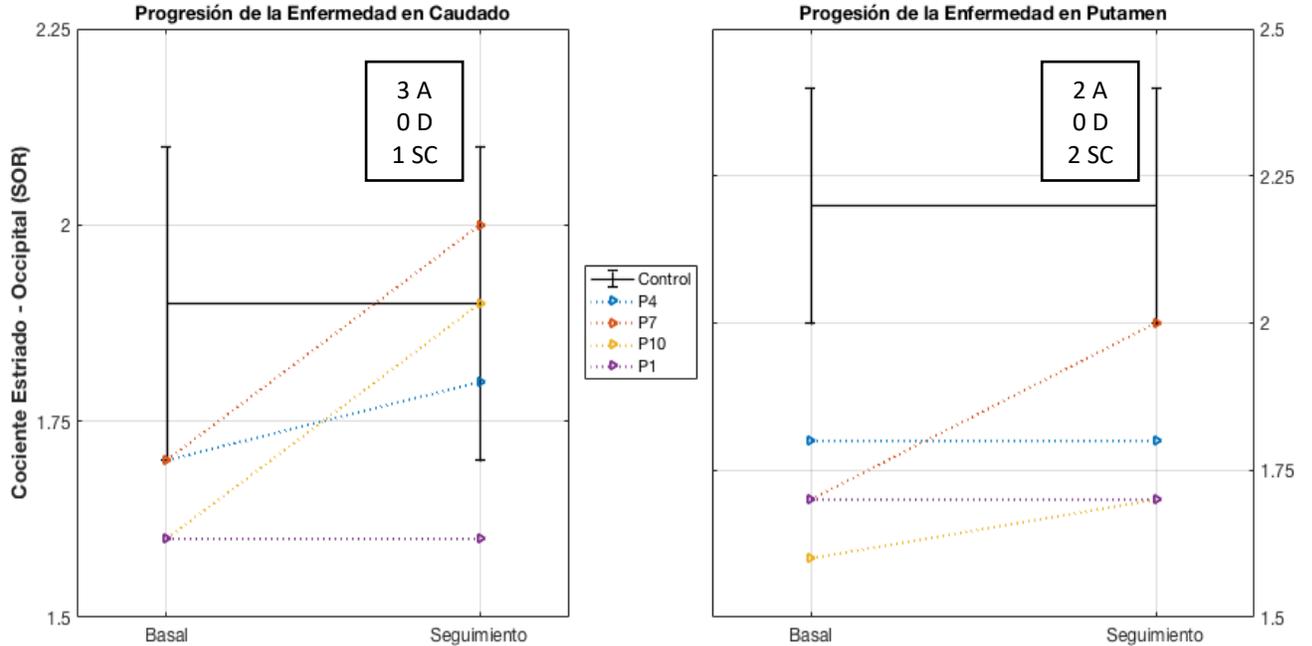


Fig. 29: Progresión de la enfermedad de Parkinson en el grupo suplementado con sulfato de cobre, usando el Cociente Estriado Occipital (^{18}F -DOPA) de las estructuras del estriado dorsal. A: aumento, D: descenso, SC: sin cambios.

4.6 Correlación Cu-64 y ¹⁸F-6-Fluorodopamina en la EP

Con fin de evaluar el posible efecto neuroprotector del cobre, se buscó correlacionar el cambio en la captación de [⁶⁴Cu]CuCl₂ en el estriado dorsal de los pacientes con el cambio en la captación de ¹⁸F-6-Fluorodopamina.

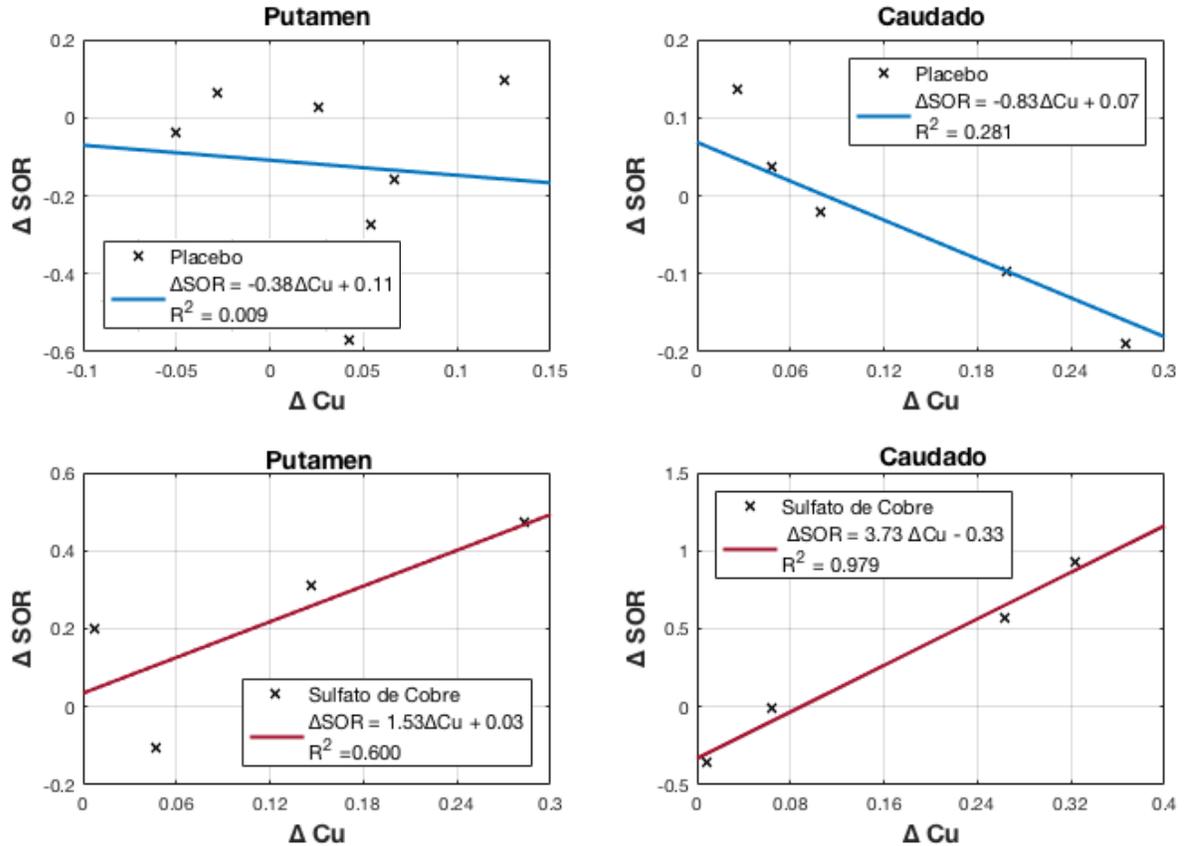


Fig. 30: Correlación del aumento del cociente estriado – occipital (¹⁸F-DOPA) en función del aumento de cobre ([⁶⁴Cu]CuCl₂). Arriba: grupo suplementado con placebo. Abajo: grupo suplementado con sulfato de cobre.

La Fig. 30 muestra la dispersión de los datos obtenidos según el suplemento y la región del estriado. Se observa una correlación negativa para los datos del grupo placebo, es decir, un aumento en los niveles de cobre ([⁶⁴Cu]CuCl₂) reduce los niveles de ¹⁸F-DOPA en los pacientes debido al estrés oxidativo causado por la enfermedad.

Por otro lado, el grupo que sí recibió cobre como suplementación posee la característica de aumentar sus niveles de SOR (^{18}F -DOPA) si los niveles de ^{64}Cu CuCl_2 aumentan.

El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson (tabla 7) para los datos obtenidos demuestra que existe una correlación positiva en la captación de ^{18}F -DOPA y Cu-64 cuando los sujetos son suplementados con sulfato de cobre y esta correlación es negativa en ausencia del tratamiento.

Tabla 7: Coeficientes de correlación de Pearson para los cambios en la captación de ^{18}F -DOPA y Cu-64.

| | Correlación de Pearson | |
|---------|------------------------|---------|
| | Putamen | Caudado |
| Placebo | -0.10 | -0.53 |
| Cobre | 0.77 | 0.99 |

Este aumento de ^{18}F -DOPA debido al aumento del cobre ($^{64}\text{CuCl}_2$) sugiere que el cobre recibido en la suplementación posee un carácter neuroprotector que protege las células productoras de DA y a la vez permite la síntesis de DA.

Capítulo 5

Conclusiones

La distribución sistémica de cobre en pacientes con EP revela diferencias respecto al grupo considerado control en la interacción del grupo con el tiempo para el páncreas y para el intestino esta diferencia es significativa para la variable grupo. No se cuenta con información sobre la función del cobre en el páncreas y como este cambio en la distribución del metal pueda estar ligado con la enfermedad. Los valores de %ID/org en intestino son superiores en la EP sugiriendo una mayor eliminación del metal y por consiguiente menor concentración de Cu para la distribución en otros órganos, sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la captación del radiofármaco para otros órganos y requerimos un grupo más grande de estudio para mejorar la estadística.

Esta es la primera vez que se realiza un análisis sobre la biodistribución de cobre en el cerebro usando imágenes PET. El análisis se logró realizando un corregistro de las imágenes PET con imágenes de MRI y el uso de un atlas neurológico, lo que permitió adaptar las estructuras del cerebro de cada paciente con las estructuras de un atlas de RM y obtener un análisis personalizado de precisión.

Las imágenes PET de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ en cerebro no revelan un sitio de captación específica debido que se mapean los transportadores de cobre. Los sitios de mayor captación del metal son el hipocampo y tálamo, pero no poseen una distribución homogénea de cobre dentro de ellos. Los sujetos con EP poseen valores aumentados de captación de $[^{64}\text{Cu}]\text{CuCl}_2$ en la región del estriado, siendo significativo este aumento en ínsula, amígdala y caudado.

La suplementación a un año con cobre no modifica de forma cualitativa las imágenes de $^{64}\text{CuCl}_2$, la inspección visual entre pacientes revela una distribución altamente variable. Los sujetos suplementados con cobre poseen una tendencia al alza en los niveles de captación de $^{64}\text{Cu}[\text{CuCl}_2]$, mientras los sujetos que recibieron placebo disminuyeron sus valores de captación de este metal. Se requieren pruebas clínicas adicionales que determinen el estado del cobre (cobre libre o cobre ligado a proteínas) para poder predecir su posible efecto benéfico o perjudicial.

Los estudios PET con ^{18}F -6-Fluorodopamina revelan que existe una pausa en la progresión de la enfermedad al obtener un aumento en el Cociente Estriado – Occipital (SOR). Los resultados del grupo suplementado con placebo no son claros y el aumento de los niveles de captación de ^{18}F -DOPA pueden deberse a un efecto placebo en los sujetos de este grupo.

Se correlacionaron las diferencias en el tiempo en la captación de $^{64}\text{Cu}[\text{CuCl}_2]$ y ^{18}F -6-Fluorodopamina, encontrando una correlación positiva en la región del caudado y putamen para el grupo suplementado con cobre. Esta correlación sugiere que la suplementación posee un carácter neuroprotector en los pacientes con EP al aumentar el cobre a nivel cerebral.

Desafortunadamente, el número de sujetos suplementados con cobre (n=4) fueron muy pocos, por lo que esta prueba considerada piloto abre paso a un estudio más amplio sobre el papel del cobre en la enfermedad de Parkinson. En un futuro se plantea agregar las pruebas clínicas que determinen el estado del cobre y la evolución de la enfermedad con la escala UPDRS. Así mismo se plantea controlar el apego al tratamiento y aumentar el tiempo de la suplementación para eliminar un posible efecto placebo del mismo cobre en el paciente.

Anexos

A. Prueba t de student para dos muestras

Cuando se analizan datos cuantitativos de distintas poblaciones es requerido evaluar una proposición o supuesto sobre los parámetros de una o más muestras. Esta proposición recibe el nombre de hipótesis y un procedimiento que lleva a tomar una decisión sobre esta recibe el nombre de prueba de hipótesis. El procedimiento para realizar dicha prueba depende de las características de la muestra.

La hipótesis nula H_0 es la afirmación sobre una característica de la población que se supone cierta (usualmente se toma la igualdad de la media a un valor); mientras la hipótesis alternativa H_1 es una afirmación contradictoria a la hipótesis nula a investigar. La aceptación de la hipótesis nula se realiza dentro de un intervalo de confianza α , que define un valor de significancia p crítico (generalmente es tomado un $p_c = 0.05$)

La prueba t de student compara la igualdad de medias de dos muestras n_1, n_2 ; con $n_1, n_2 < 30$ y que siguen cada una distribución normal. En esta prueba es utilizado el estadístico t con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad (g.l.) y se rechaza la hipótesis nula si el valor absoluto del estadístico es mayor al valor t crítico de la distribución definido por el valor de significancia.

Para comparar la igualdad de medias de dos muestras de dos independientes ($H_0 : X_1 = X_2$; X_1, X_2 representan las medias de la muestra 1 y 2) la prueba se denomina no pareada y el estadístico t puede ser calculado como sigue:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{S_{1,2} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde $S_{1,2}$ es la desviación estándar combinada, definida por:

$$S_{1,2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Con S_1 y S_2 la desviación estándar de la muestra 1 y 2 respectivamente. El valor p, de significancia de la prueba se calcula buscando en la tabla de la distribución t para los grados de libertad de la prueba. Si $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se asume la distribución de las muestras posee una diferencia estadísticamente significativa.

Por otro lado, si se requiere evaluar la igualdad de medias para dos muestras dependientes, por ejemplo, dos observaciones a una misma muestra pero en dos momentos distintos la prueba recibe el nombre de pareada y el estadístico t debe ser determinado como sigue:

$$t = \frac{X_D - \mu}{S_D / \sqrt{n}}$$

Donde X_D representa el promedio de cada una de las diferencias observadas para los n elementos de la muestra y S_D es la desviación estándar de la distribución de diferencias. El valor μ es diferente de cero si se desea probar que la diferencia observada en el tiempo es distinta a un valor. El valor p para esta prueba se busca en la tabla de la distribución t para los n-1 g.l. de la prueba. Si $p < 0.05$ se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se asume que hubo un cambio en la distribución de las muestras estadísticamente significativo.

B. Imágenes Cu-64

A continuación, se muestran las imágenes basales y de seguimiento de los pacientes que participaron en este estudio separados según el suplemento de sulfato de cobre (Fig. B1) y placebo (Fig. B2).

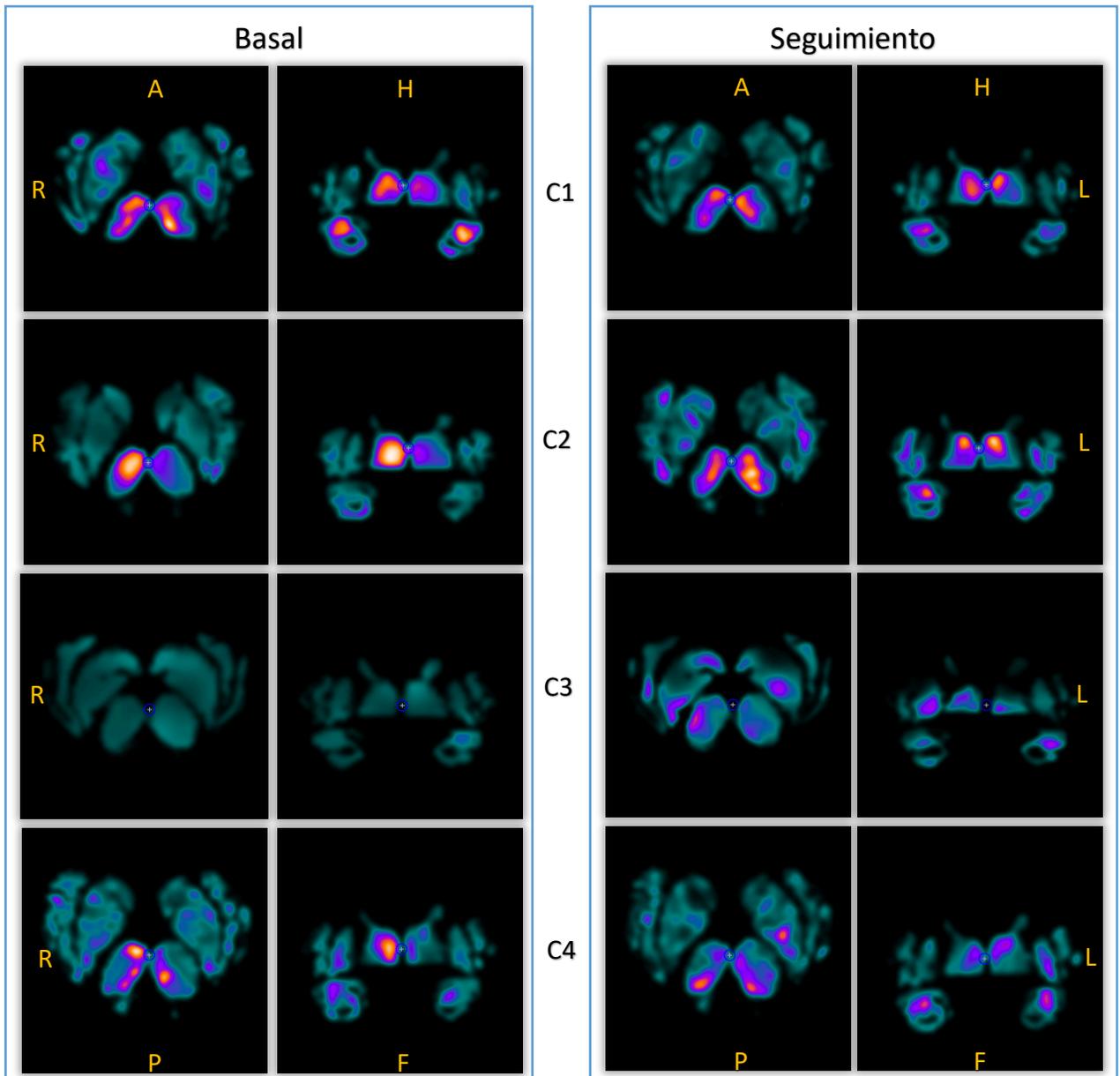
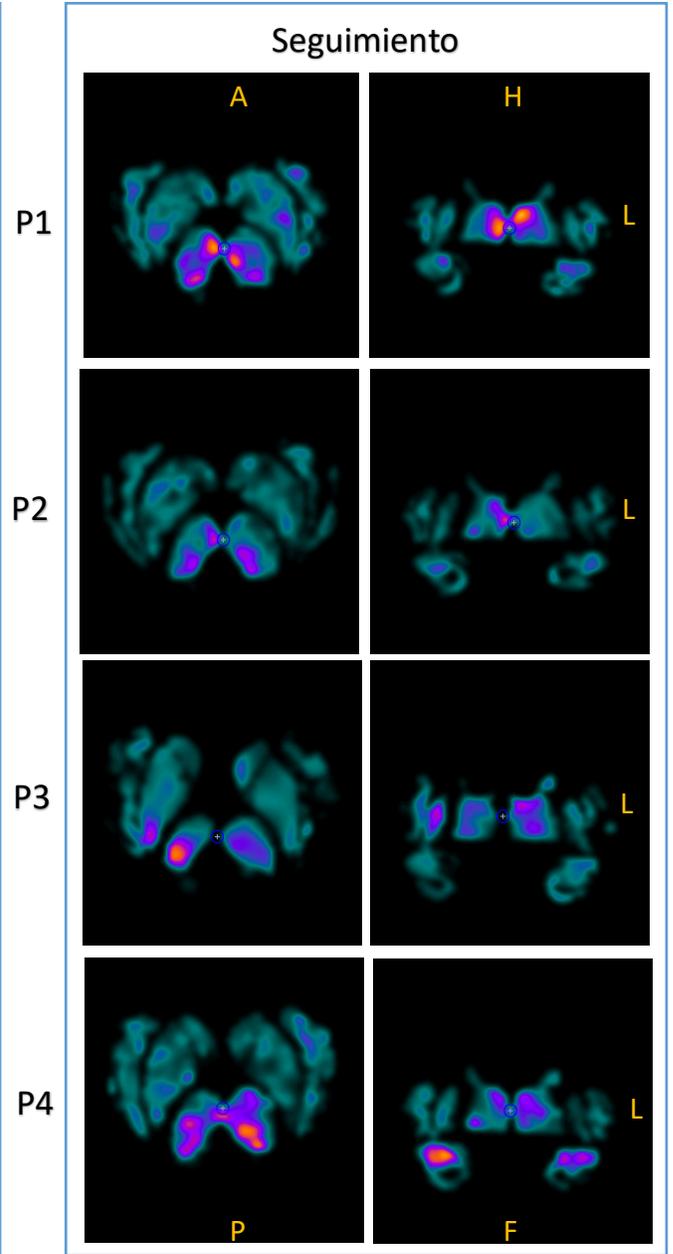
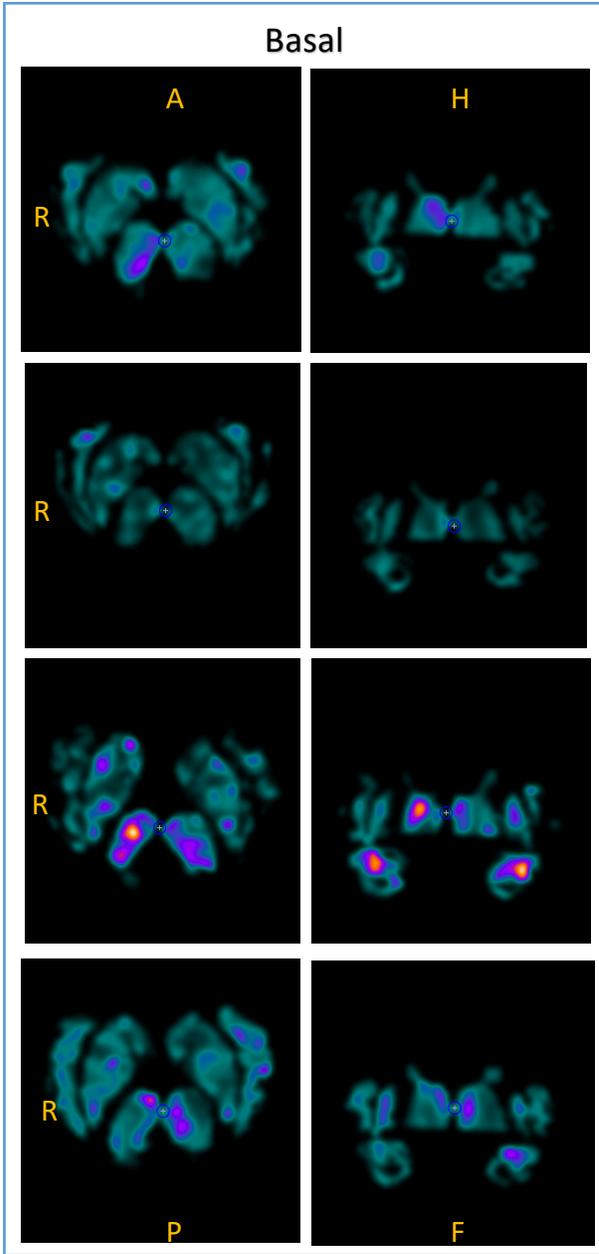


Fig. B.1: Imágenes PET Cu-64 basales (izquierda) y de seguimiento (derecha) de los sujetos con enfermedad de Parkinson (C#) que recibieron sulfato de cobre como suplemento.



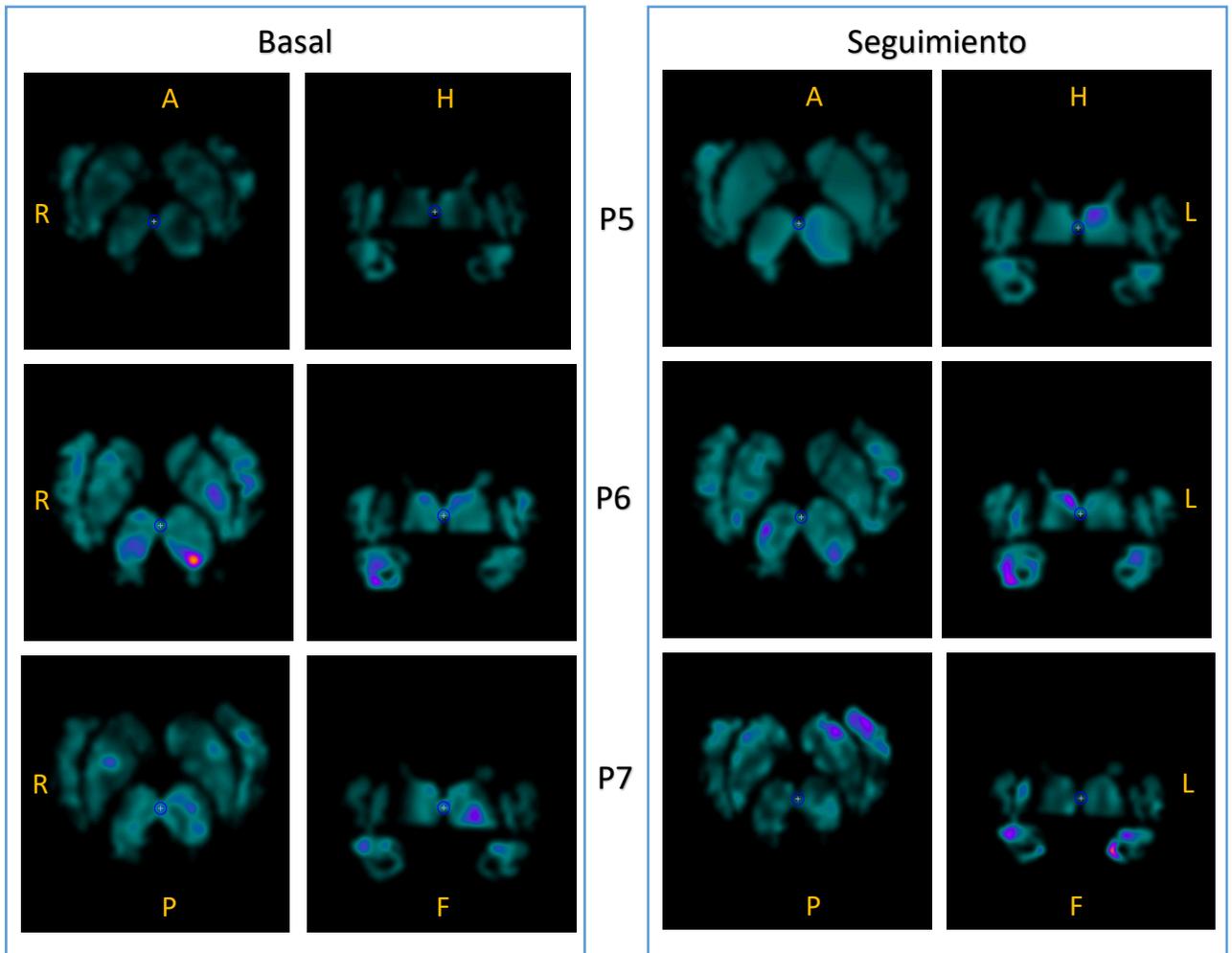


Fig. B.2: Imágenes PET Cu-64 basales (izquierda) y de seguimiento (derecha) de los sujetos con enfermedad de Parkinson (p#) que recibieron placebo como suplemento.

Referencias

Avila-Rodriguez, Miguel A., Nye, Jonathon A., Nickles, Robert J., *Simultaneous production of high specific activity ^{64}Cu and ^{61}Cu with 11.4 MeV protons on enriched ^{64}Ni nuclei*. Applied radiation and isotopes, 2011.

Avila-Rodriguez M.A., MacQuarrie S.A. *The rol of non-standard PET Radionuclides in the development of new radiopharmaceuticals*. AIP Conference Proceedings, 2014.

Avila-Rodriguez., et al. *Biodistribution and radiation dosimetry of [^{64}Cu]copper dichloride: first-in-human study in healthy volunteers*. EJNMMI, 2017.

Bailey D.L., et al. *Nuclear Medicine Physics: A Handbook for Teachers and Students*. International Atomic Energy Agency, 2014.

Bhattacharyya, S., & Dixit, M. *Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals*. Dalton Transactions, 2011.

Cervantes-Arriaga Amin, et al. *Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK*. Gaceta Médica de México, 2013.

Davies, K.M., et al. *Localizations of copper and copper transporters in human brain*. Metallomics, 2013.

Davies K.M., Mercer J.F.B., Chen N., Double K., *Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics*. Clinical Science, 2016.

Di Matteo Vincenzo and Di Giovanni Giuseppe. *Death in the substantia nigra: a motor tragedy*. Expert Review of Neurotherapeutics, 2007.

Hisahara S., Shimohama S. *Dopamine receptors and Parkinson's Disease*. International Journal of Medicinal Chemistry 2011.

Holzer A.K., et al. *Expression of the Human Copper Influx Transporter 1 in Normal and Malignant Human Tissues*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry.

Hughes A.J., Daniel S.E. & Lees A.J. (1992). *Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases*. J Neurol Neurosurg Psychiatry (55).

Jonikien P., et al. *Simple ratio analysis of ¹⁸F-Fluorodopa Uptake in Striatal Subregions Separates Patients with Early Parkinson Disease from Healthy Controls*. J Nucl Med, 2009.

Kowalsky R.J., Falen S.W., *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. American Pharmacist Association, 2004.

Manrique-Arias J.C., Avila-Rodriguez M.A. *A simple and efficient method of nickel electrodeposition for the cyclotron production of ⁶⁴Cu*. Applied Radiation and Isotopes, 2014.

Manto M. *Abnormal Copper Homeostasis: Mechanisms and role in Neurodegeneration*. Toxics, 2014.

Montes Sergio, et al. *Copper and Copper Proteins in Parkinson Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014.

Nndc.bnl.gov. (2019). *Q-value Calculator (QCalc)*. [online] Disponible en: <https://www.nndc.bnl.gov/qcalc/> [Consultado 7 Enero. 2019].

Nurmi E., et al. *Rate of progression in Parkinson's Disease: a 6-[¹⁸F]Fluoro-L-Dopa PET study*. Movement Disorders, 2001.

Politis M. *Neuroimaging in Parkinson's disease: from research setting to clinical practice*. Nature Reviews Neurology, 2014.

Popescu B.F., et al. *Mapping metals in Parkinson's and normal brain using rapid-scanner x-ray fluorescence*. Physics in Medicine and Biology, 2009.

Przedborski S. *Pathogenesis of nigra cell death in Parkinson's disease*. *Parkinsonism & Related Disorders* (2005)

Scheiber, I.F., Mercer, J.F.B., Dringen R. *Metabolism and functions of copper in brain*. Progress in Neurobiology, 2014.

Rivera-Mancía S., et al. *The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases*. Chem Biol Interact, 2010.

Roberts E.A., Sakar B. *Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper*. Am J Clin Nutr, 2008.

Rojas-Sobarzo L., et al. *Copper supplementation at 8 mg neither affect circulating lipids nor liver function in apparently healthy Chilean men*. Biol Trace Elem Res, 2013.

Tai Y.F., Piccini P. Applications of positron emission tomography (PET) in neurology. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004.

Tortora J., Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. Biological Science Textbooks Inc. 2006.

Tysnes O., Storstein A. *Epidemiology of Parkinson's disease*. J Neural Transm, 2017.

Zheng W., Monnot A.D., *Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases*. Pharmacology & Therapeutics, 2012.