

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
QUÍMICA MEDICINAL

“EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEÍNA II
EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCIDO POR MPP⁺
EN RATÓN”

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA
Q.F.B. RAÚL RODRÍGUEZ RAMÍREZ
MATRÍCULA: 2161800588

COMITÉ TUTORIAL

Cotutor: Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Cotutor: Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruíz

Asesor: Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

JULIO, 2018

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEINA II
EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCIDO POR MPP⁺
EN RATÓN

Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Dra. María de los Ángeles Araceli Díaz Ruíz

Dra. Norma Angélica Noguez Méndez

Q.F.B. Raúl Rodríguez Ramírez

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA METALOTIONEINA II
EN UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON INDUCIDO POR MPP⁺
EN RATÓN

Jurado del Examen de Grado.

Presidente. Dr. Luis Antonio Tristán López

Vocal. Dr. Moisés Rubio Osornio

Secretario. Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda

Resumen.

La enfermedad de Párkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que no tiene cura, se caracteriza por alteraciones del movimiento y disminución del contenido estriatal de dopamina (DA) que es el resultado de la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta*. El estándar de tratamiento es la L-DOPA, no obstante y a pesar de su eficacia terapéutica, este no detiene el progreso de la enfermedad, por lo que se siguen desarrollando diversas estrategias neuroprotectoras encaminadas a detener la muerte neuronal. Su fisiopatología es muy compleja, sin embargo se han descrito como principales mecanismos de daño la acumulación de hierro en los ganglios basales que lleva a la generación de estrés oxidativo y la reducción del contenido de cobre cerebral alterando la función de diversas cuproproteínas importantes en el transporte de hierro (ceruloplasmina) y en la síntesis de ATP (citocromo C oxidasa). Por otra parte se sabe que las metalotioneínas (MT) son péptidos endógenos antioxidantes y quelantes de metales con efecto neuroprotector. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó el efecto neuroprotector de la MT administrada sola o en combinación con CuSO_4 en un modelo de la EP inducido con 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) en ratón. Para esto se analizaron las concentraciones de productos finales de la lipoperoxidación (como marcador de daño oxidativo) y las alteraciones conductuales evaluadas en un equipo de actividad locomotriz. Los resultados mostraron que los tratamientos con MT (administrada intracerebroventricular 24 h antes de la inyección con MPP^+) y con CuSO_4 (administrado i.p.) reducen la lipoperoxidación y mejoran el desempeño funcional de los animales únicamente cuando se administran por separado ya que al combinarse no se observan beneficios terapéuticos. Los hallazgos indican que aun cuando el estrés oxidativo y la reducción del contenido de Cu^{+2} en el cerebro son mecanismos de daño que participan de manera importante en la muerte neuronal, la interacción terapéutica del CuSO_4 y la MT no confieren beneficios en los marcadores de daño evaluados, sin embargo la MT y el cobre administrados de forma independiente mostraron efecto antioxidante y mejoría funcional, por lo que se sigue que es necesario seguir explorando su potencial terapéutico.

Agradecimientos Institucionales.

Para el desarrollo de esta tesis agradezco el apoyo proporcionado por la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, quien me abrió las puertas una vez más y por permitirme formar parte nuevamente de su comunidad universitaria.

También agradezco al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" y al Departamento de Neuroquímica por permitirme realizar allí los experimentos necesarios para llevar a buen término esta investigación, debo también mi agradecimiento al bioterio de esta institución quien me proporciono los recursos animales suficientes.

Finalmente agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de beca de manutención, ya que gracias a ese apoyo fue posible realizar estudios de posgrado y continuar con mi preparación académica para formar parte de la construcción de un México mejor.

Agradezco también al proyecto financiado por CONACyT No. 233815, cuyos recursos fueron utilizados para la compra de reactivos.

“Nada puede merecer más nuestro patrocinio que la promoción de la ciencia y la literatura. El conocimiento es en todos los países la base más segura de la felicidad pública.”

- George Washington -
(Discurso en el Congreso, 8 de enero de 1790)

Agradecimientos personales.

Me gustaría expresar mis agradecimientos a todas las personas que de alguna manera han contribuido a la realización de esta Tesis.

Agradezco al Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda y a la Dra. Araceli Díaz Ruiz por las enseñanzas dentro y fuera del aula, por su apoyo en la realización de este estudio que me permite obtener el grado de Maestro en Ciencias. Por compartir su conocimiento adquirido a través de varios años de experiencia... gracias.

A la Dra. Norma Angélica Noguez Méndez por su cariño, amistad y enseñanzas durante mi formación académica durante todo este tiempo, desde mis estudios de licenciatura hasta mis estudios de posgrado siendo una gran guía para la elaboración de este escrito.

Agradezco a la Dra. Mireya Alcaraz Zubeldia por el apoyo que me dio, además de sus consejos para poder obtener mejores resultados basados en su amplia experiencia.

Al Dr. Luis Antonio Tristán López quien fue una parte fundamental para el desarrollo de esta tesis, sus valiosos consejos e interés han sido factores importantes que me dejan una grata experiencia, y la satisfacción de haber trabajado con una persona dispuesta a ayudar. Por ser una gran persona...Gracias.

Así mismo, agradezco a mis compañeros de estudio de posgrado: a Juan Cervantes Naranjo, a Carlos Solís Gaspar y a Pedro Antonio Méndez Nolasco, quienes han compartido conmigo momentos difíciles, pero también momentos de alegría, quienes han sido compañeros de desvelos en tiempo de estudio y también lo han sido en momentos de gozo.

Finalmente, y lo más importante es el agradecimiento a mi familia, a mi tía Gabriela quien sin interés alguno me facilito material de apoyo para conseguir esta meta, a mi madre Alicia Ramírez Jiménez porque nunca ha perdido la fe en mí. A mis hermanos Alejandro y Aline por que al verlos me doy cuenta de que alguien sigue mis pasos, pero a su modo.

Esta tesis es para mi padre Raúl Anastasio Rodríguez Ortíz, quien no solo ha sido un padre sino un maestro y un amigo, quien ha sido mi principal generador de interés en la ciencia y en enseñarme a emitir juicios críticos.

A todos ellos por interesarse e ilusionarse sinceramente en todo lo que hago, a todos aquellos que se han preocupado, interesado, y aportado entusiasmo durante este tiempo. Espero que todos ustedes se sientan parte de este trabajo. GRACIAS.

“Es un error capital teorizar antes de tener datos. Sin darse cuenta, uno empieza a deformar los hechos para que se adapten a las teorías, en lugar de adaptar las teorías a los hechos.”

- Arthur Conan Doyle -

Abreviaturas.

3MT	3-hidroxitiramina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ADP	Adenosín difosfato
AMPAr	Receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosín trifosfato
COMT	Catecol-o-metiltransferasa
Cp	Ceruloplasmina
Cu/SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EP	Enfermedad de Parkinson
ETC	Cadena transportadora de electrones
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido
GABA	Acido gama aminobutírico
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HVA	Ácido homovanílico
LCR	Líquido cefalorraquídeo.
MAO B	Monoamino oxidasa B
MnSOD	superóxido dismutasa dependiente de magnesio
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MT	Metalotioneínas
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NADH	Nicotin adenín dinucleótido
NMDAr	Receptores N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico.
ONOO ⁻	Peroxinitrito.
PPN	Núcleo pedunculoponino
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema nervioso central
SNC	<i>Sustantia nigra pars compacta</i>
SNr	<i>Sustantia nigra pars reticulata</i>
SOD	Superóxido dismutasa
ST	Estándar
STN	Núcleo subtalámico
TH	Tirosina hidroxilasa
TNF	Factor necrótico de tumoración
VMAT2	Transportador de monoaminas vesiculares
VTA	Área tegmental ventral

Índice

1. Introducción.....	1
2. Enfermedad de Parkinson.....	3
2.1 Epidemiología e importancia de la Enfermedad de Parkinson.....	3
2.2. Síntomas de la EP.....	4
2.3. Diagnóstico de la EP.....	6
2.3.1. Diagnóstico de síndrome Parkinsónico.....	7
2.3.2. Criterios de exclusión de EP.....	7
2.3.3. Criterios predictivos positivos de la EP.....	8
2.4. Ganglios Basales.....	8
2.4.1. Anatomía y fisiología de los ganglios basales.....	8
2.4.2. Bioquímica de los ganglios basales.....	10
2.4.3. Dopamina.....	10
2.4.4. Biosíntesis de Dopamina.....	11
2.4.5. Almacenamiento de dopamina.....	12
2.4.6. Liberación y recaptura de dopamina.....	12
2.4.7. Metabolismo de la dopamina.....	12
2.4.8. Receptores de dopamina.....	14
2.5. Fisiopatología de la EP.....	15
2.5.1. Disfunción mitocondrial en la EP.....	16
2.5.2. Deficiencia del Complejo I.....	17
2.5.3 Complejo mitocondrial I y estrés oxidante.....	18
2.6. Estrés oxidante y la EP.....	19
2.6.1. Estrés oxidante.....	19
2.7. Modelos animales para la EP.....	23
2.7.1. Importancia de los modelos animales en la EP.....	23
2.7.2. Modelos Farmacológicos.....	23
2.7.3. Modelos de plaguicidas y herbicidas.....	24
2.7.4. Modelos Genéticos.....	26
2.7.5. Modelos Neurotóxicos.....	27
2.8. 1-metil-4-fenilpiridinia (MPP ⁺).....	28
2.9. Tratamientos en la EP.....	31

2.9.1. Tratamientos actuales.	31
2.9.2. Sulfato de cobre.....	32
2.9.3. Metalotioneína (MT).....	34
2.9.4. El papel de las MT en cáncer y apoptosis.....	37
2.9.5. Función antioxidante de las MT.	39
3. Planteamiento del problema.....	42
4. Hipótesis.....	43
5. Objetivos.	43
5.1. Objetivo General.	43
5.1.2. Objetivos particulares.	43
6. Métodos.....	44
6.1. Grupos experimentales.....	44
6.2. Diseño experimental.....	44
6.3. Administración de sulfato de cobre.....	45
6.4 Administración de MPP ⁺	45
6.5. Método de eutanasia y cuidados postoperatorios.....	46
6.6. Administración de MT.	46
6.7. Análisis de la lipoperoxidación.	46
6.8. Análisis de actividad locomotora espontánea.....	47
6.9. Análisis cromatográfico del contenido de DA estriatal.....	48
6.10. Análisis estadístico.....	49
6.11. Consideraciones éticas.	49
7. Resultados.	50
7.1. Análisis de lipoperoxidación.....	50
7.2. Actividad locomotora espontánea.....	52
7.2.1. Tiempo total de reposo.....	52
7.2.2. distancia total recorrida.	54
7.3. Análisis de dopamina.....	56
8. Discusión.....	58
9. Conclusión.	64
10 Referencias.....	65
ANEXO 1.	75

1. Introducción.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento neurodegenerativo con alta incidencia en todo el mundo solo por debajo de la enfermedad de Alzheimer (Poewe *et al.*, 2017). Se sabe que la EP se encuentra ligada al sexo y a la edad; se desconoce el momento exacto en que inicia el padecimiento y su diagnóstico solo es posible cuando el 70 % de las neuronas productoras de dopamina (DA) se ha perdido (Surmeier *et al.*, 2014). Hasta el momento no se cuenta con una cura para esta enfermedad y las estrategias terapéuticas están enfocados en el tratamiento de los síntomas. Uno de los mecanismos fisiopatológicos de la EP es la sobreproducción de radicales libres lo que lleva a un estado de estrés oxidante y a través de este a la muerte celular. Para reproducir las características de la enfermedad es necesaria la administración de 1-metil-4-fenilpiridinia (MPP⁺) metabolito activo de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), esta neurotoxina tiene la capacidad unirse al complejo mitocondrial 1, lo que lleva a la reducción en la síntesis de ATP y al desacople de la cadena transportadora de electrones con la subsecuente producción de radicales libres, lo que genera estrés oxidante y como consecuencia la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Hertzman *et al.*, 1990). Para evitar el daño celular generado por el estrés oxidante, el organismo sintetiza defensas antioxidantes como las metalotioneínas (MT), las cuales tienen la capacidad de atrapar radicales libres y de manera preferente al radical hidroxilo (HO[•]) uno de los más tóxicos por su alta capacidad de reaccionar con diversas biomoléculas, adicionalmente tienen la capacidad de quelar diversos metales relacionados con la producción de radicales libres. Por otra parte, a las MT también se le ha asociado con un efecto neuroprotector al inhibir la muerte celular por apoptosis y reducir la respuesta inflamatoria. Por estas características es que se les ha conferido un potencial terapéutico en padecimientos neurológicos agudos y neurodegenerativos. Por otra parte, se sabe que en la EP existe una alteración en la homeostasis del Cu⁺² (Arnal., 2010), lo que lleva a la acumulación de hierro en los ganglios basales, esto debido a la reducción de la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina, una proteína dependiente de Cu⁺² necesaria

para transformar el Fe^{2+} en Fe^{3+} , ya que solo en este estado de oxidación es posible que la transferrina elimine del cerebro a este metal. Además de que el Cu^{+2} es cofactor de la citocromo C oxidasa (una proteína clave en la síntesis de ATP) que se encuentra en el complejo-IV de la cadena transportadora de electrones. Adicionalmente, también se sabe que el Cu^{+2} es cofactor de las superóxido dismutasas 1 y 3 (Cu/Zn-SOD) que son enzimas antioxidantes que transforman el anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Es por estas razones que en el presente estudio se evaluó el efecto neuroprotector de la MT, CuSO_4 y su combinación en un modelo de la EP inducido por MPP^+ .

2. Enfermedad de Parkinson.

2.1 Epidemiología e importancia de la Enfermedad de Parkinson.

La EP es considerada a nivel mundial como la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que la prevalencia de este padecimiento se modifica dependiendo de la edad, el sexo y la región geográfica (Fig. 1) (Poewe *et al.*, 2017). De acuerdo con el resultado de un meta-análisis realizado por Pringsheim, *et al.*, (2014), en el que se incluyen 47 estudios epidemiológicos de 1985-2010 analizados por ubicación geográfica (Asia, África, América del Sur, y Europa / América del Norte / Australia), mostraron un aumento en la prevalencia de la EP dependiente de la edad como se muestra: 41 casos en pacientes entre 40 y 49 años, 107 en adultos de 50 a 59 años; 173 para 55 a 64 años; de 428 para 60 a 69 años; 425 para 65 a 74 años; 1087 en población con 70 a 79 años; y de 1903 casos en población mayor de 80 años de edad (todos por cada 100,000). Además, se observó una diferencia significativa en la prevalencia según la ubicación geográfica sólo para las personas de 70 a 79 años de edad, con una prevalencia de 1601 en individuos procedentes de América del Norte, Europa y Australia, en comparación con 646 en los individuos de Asia ($P<0.05$). Se encontró una diferencia significativa en la prevalencia por sexo, sólo para los individuos de 50 a 59 años de edad, con una prevalencia de 41 en mujeres y 134 en hombres ($P<0.05$), tomando en consideración que la esperanza de vida cada vez es mayor, resulta importante desarrollar líneas de investigación para el desarrollo de terapias eficaces para el tratamiento de dicho padecimiento y de forma ideal terapias que estén dirigidas a evitar la muerte celular.

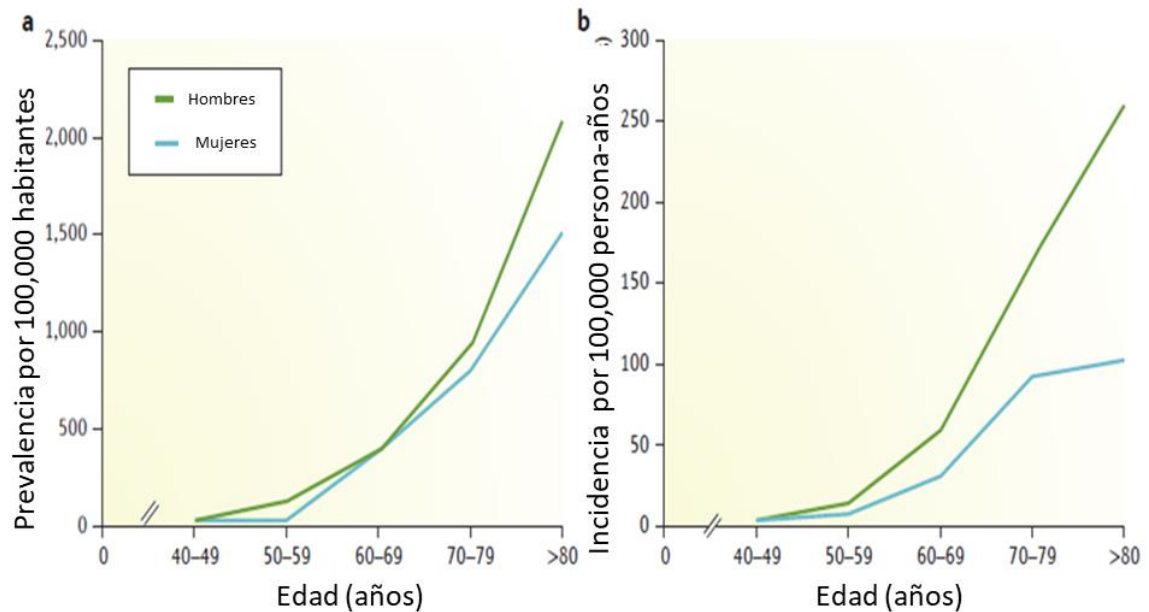


Figura 1. Incidencia y prevalencia de la EP. A) prevalencia de la EP en hombres y mujeres por 100,000 individuos. B) tasa de incidencia de la EP por 100,000 persona-años. Los datos son derivados de dos diferentes meta-análisis, los cuales utilizan datos crudos si realizar ajustes por diferencias demográficas o diferencias metodológicas entre los estudios. Tomado de Poewe *et al.*, 2017.

2.2. Síntomas de la EP.

La sintomatología de la EP se define como la presencia simultánea de hipertonía, acinesia y temblor en reposo. El cuadro clínico descrito en 1817 por James Parkinson en su "Ensayo sobre la Parálisis Agitante" merece el nombre de EP, entidad anatomoclínica caracterizada por su aparición en la segunda mitad de la vida, su evolución lentamente progresiva y el tipo de lesiones anatómicas que van a afectar selectivamente al *locus niger* o *sustantia nigra* del mesencéfalo. (Surmeier *et al.*, 2014).

Se desconoce con certeza cuánto tiempo se encuentra presente la enfermedad antes de que los síntomas motores aparezcan y se plantean dos fases de este padecimiento; la primera o fase presintomática (prodromal) (Fig. 2) que transcurre entre la exposición del individuo con o sin carga hereditaria al medio ambiente, incluyendo toxinas, traumatismos, edad etc., y la segunda fase sintomática que incluye signos y síntomas motores y no motores de la enfermedad que comprende los estados temprano, medio y final de la enfermedad. Los

síntomas no motores implican una multitud de funciones, que incluyen trastornos de la regulación del ciclo sueño-vigilia, deterioro cognitivo (incluyendo disfunción ejecutiva frontal, déficit de recuperación de memoria, demencia y alucinosis), trastornos del estado de ánimo y afecto, disfunción autonómica (principalmente hipotensión ortostática, disfunción urogenital, estreñimiento e hiperhidrosis), así como síntomas sensoriales (la hiposmia más prominente) y dolor. En los síntomas motores, los síntomas de la EP en estado temprano los síntomas iniciales son: bradicinesia, rigidez y temblor; en el estado medio de la EP se presentan síntomas como fluctuaciones, discinensia, deformidades axiales y disfagia, mientras que en la etapa final de la EP se comienzan a presentar caídas e inestabilidad en la postura, además de disfagia (Poewe *et al.*, 2017).

Las manifestaciones clínicas están ligadas a la severidad de la pérdida neuronal en la *sustantia nigra*. Se estima que la DA estriatal está reducida entre el 70 a 90% cuando ocurren las primeras manifestaciones clínicas, y que entre el 60 y 70% de las neuronas dopaminérgicas se han perdido cuando el primer síntoma aparece, por lo que resulta ideal contar con marcadores del proceso de enfermedad en la etapa presintomática que nos permitieran establecer el diagnóstico temprano o incluso antes del inicio de los síntomas (Surmeier *et al.*, 2014).

La forma idiopática de la EP es probablemente la enfermedad neurodegenerativa más frecuente en México. Su diagnóstico es clínico y su confirmación es anatomopatológica (Hughes *et al.*, 1992); macroscópicamente se observa la despigmentación de la *sustantia nigra*, depósitos de hierro en dicho núcleo y la presencia de cuerpos de inclusión citoplásmicos o cuerpos de Lewy.

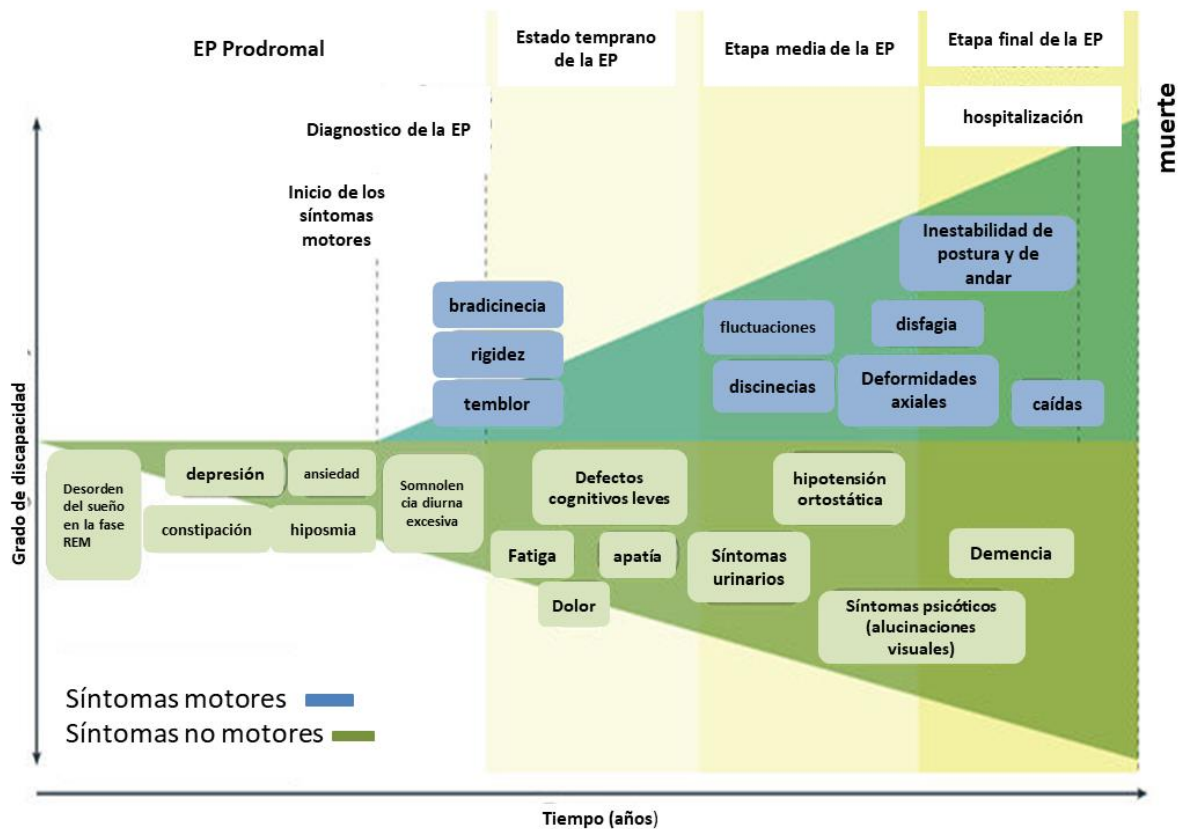


Figura 2. Descripción de los síntomas clínicos asociados con la EP. Para el diagnóstico de la enfermedad es necesario observar síntomas motores y no motores. Tomado de Poewe *et al.*, 2017.

2.3. Diagnóstico de la EP.

En estadios tempranos de la EP el diagnóstico es difícil, se ha descrito que existe un margen de error del 5-10%. Por lo anterior, se han creado varios criterios clínicos, entre los más utilizados están los descritos por el Banco de Cerebros de la Sociedad de EP del Reino Unido, los cuales se consideran que tienen una certeza diagnóstica del 90%. Se identifican con base en estos criterios (Gibb.,1988):

- Síntomas esenciales para el diagnóstico del síndrome parkinsoniano.
- Criterios de exclusión para el diagnóstico de la EP.
- Criterios que apoyan el diagnóstico de la EP.

2.3.1. Diagnóstico de síndrome Parkinsónico.

- a) Bradicinesia (lentitud del inicio de los movimientos voluntarios con reducción progresiva de la velocidad y amplitud de acciones repetitivas).
- b) Al menos uno de los siguientes:
 - a) Rigidez muscular
 - b) Temblor de reposo de 4-6 Hz.
 - c) Inestabilidad postural no causada por disfunción visual, vestibular, cerebelosa propioceptiva.

2.3.2. Criterios de exclusión de EP.

Se requieren la ausencia de todos factores para el diagnóstico de EP definida.

- a) Historia de infartos cerebrales de repetición con progresión brusca de los rasgos parkinsonianos.
- b) Historia de traumatismos craneales de repetición.
- c) Historia de encefalitis diagnosticada.
- d) Crisis oculógiras.
- e) Tratamiento neuroléptico al inicio de los síntomas.
- f) Más de un familiar afectado.
- g) Remisión mantenida de los síntomas.
- h) Síntomas estrictamente unilaterales después de tres años de evolución.
- i) Parálisis supranuclear de la mirada.
- j) Signos cerebelosos.
- k) Afectación autonómica severa precoz.
- l) Demencia severa precoz con trastornos del lenguaje, memoria y praxias.
- m) Signo de Babinski.
- n) Presencia de tumores cerebrales o hidrocefalia comunicante en la tomografía computada.
- o) Ausencia de respuesta a grandes dosis de levodopa (excluida la mal absorción).
- p) Exposición a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

2.3.3. Criterios predictivos positivos de la EP.

- a) Inicio unilateral.
- b) Temblor de reposo presente.
- c) Trastorno progresivo.
- d) Asimetría persistente, afectando más al lado inicial.
- e) Respuesta excelente a Levodopa.
- f) Corea severa inducida por Levodopa.
- g) Respuesta a la L-Dopa durante 5 años o más. Curso clínico de 10 años o más

Regiones anatómicas cerebrales involucradas en la EP, su función en condiciones normales.

2.4. Ganglios Basales.

Los ganglios basales son un grupo de núcleos subcorticales cuyos componentes del circuito modular están implicados en varias funciones corticales; han recibido mucha atención en la investigación básica y clínica ya que se considera que están ampliamente involucrados en desórdenes del movimiento.

2.4.1. Anatomía y fisiología de los ganglios basales.

Los ganglios basales con un grupo de núcleos subcorticales relacionados (Fig. 3) incluyendo el cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen), los segmentos internos y externos de los globos pálidos (GPe y GPi respectivamente), el núcleo subtalámico (STN) y la *sustantia nigra pars compacta* y *pars reticulata* (SNc y SNr respectivamente) (Siegel GJ *et al.*, 2006).

El estriado es la principal estructura de entrada, recibe varios aferentes desde la corteza, el tálamo, SNc, SNr y GPi son las principales estructuras de salida y proyectan principalmente al tálamo y a la médula espinal. (Tisch *et al.*, 2004)

Las conexiones entre el estriado y los núcleos de salida de los ganglios basales (GPi / SNr) se organizan en vías directas e indirectas. La vía directa es una proyección monosináptica entre el cuerpo estriado y GPi / SNr, mientras que la vía indirecta es una conexión polisináptica que implica neuronas intercaladas en GPe

y STN. Algunas neuronas estriatogénicas también pueden colateralizarse más extensamente, alcanzando GPe, GPi / SNr y STN. Otros insumos relacionados con el motor al estriado y STN surgen de los núcleos talámicos intralaminar, es decir, los núcleos centromedianos y parafasciculares (Siegel GJ *et al.*, 2006; Tisch *et al.*, 2004)

La salida de ganglios basales se dirige desde GPi y SNr al tálamo. Los ganglios basales relacionados con el movimiento producen proyecciones desde el GPi casi exclusivamente al núcleo ventrolateral del tálamo que, a su vez, se proyecta hacia la corteza motora primaria, el área motora suplementaria cortical y otras áreas corticales premotoras (Siegel GJ *et al.*, 2006).

La salida del SNr relacionada con el movimiento termina en los núcleos ventral anterior y en medio dorsal del tálamo, que a su vez inervan las regiones premotoras (y prefrontales) del lóbulo frontal (Siegel GJ *et al.*, 2006).

Las GPi y SNr también se proyectan a neuronas no colinérgicas en el núcleo pedunculopontino (PPN) en el tallo cerebral. Las proyecciones adicionales del SNr alcanzan el colículo superior. Esta conexión puede jugar un papel crítico en el control de los movimientos sacádicos y la orientación de los movimientos de la cabeza y los ojos (Siegel GJ *et al.*, 2006).

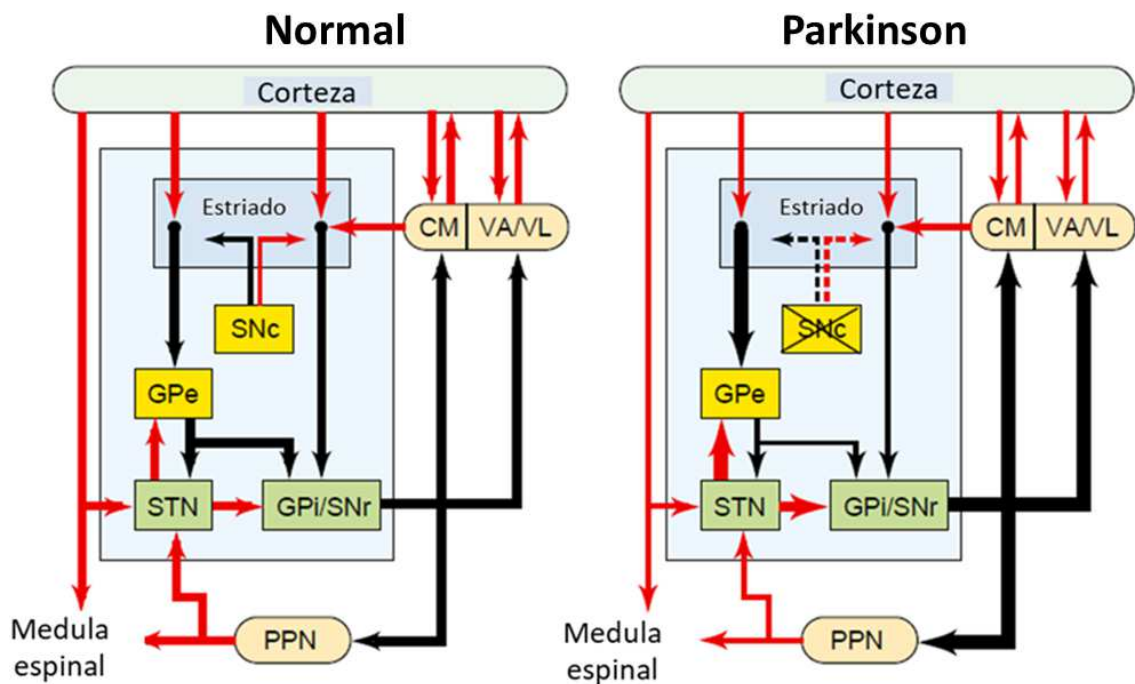


Figura 3. Diagrama simplificado que demuestra las conexiones anatómicas dentro de los circuitos de los ganglios basales: GPe, Globo pálido externo; STN, núcleo subtalámico; GPI, segmento pálido interno; SNr, *substantia nigra pars reticulata*; SNc, *substantia nigra pars compacta*; PPN, núcleo pedunculopontino; GABA, ácido gamma aminobutírico; Glu, glutamato. Las flechas rojas indican conexiones excitatorias, las flechas negras identifican conexiones inhibitorias (GABAérgicas). Los cambios en el ancho de las flechas indican cambios de actividad. Modificado de Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. 1990. Y Siegel GJ *et al.*, 2006.

2.4.2. Bioquímica de los ganglios basales

La distribución de neurotransmisores y subtipos de receptores es muy similar a la organización anatómica de los ganglios basales. Los ganglios basales, el tálamo y la corteza interactúan por medio de vías que emplean monoaminas (glutamato, GABA), principalmente DA y neurotransmisores neuropéptidos. La acetilcolina juega un papel importante, particularmente en la modulación de la actividad de las neuronas de proyección espinosa media dentro del cuerpo estriado.

2.4.3. Dopamina

Las neuronas dopaminérgicas se encuentran en el SNc y mesencéfalo. El cuerpo estriado dorsal recibe la entrada dopaminérgica principalmente de SNc (sistema nigroestriatal).

La DA es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendócrina.

La función de los sistemas dopaminérgicos del SNC se ha convertido en foco de gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas, directa o indirectamente, con trastornos severos del SNC, tales como la enfermedad de Parkinson, trastornos psicóticos que incluyen a la esquizofrenia y la dependencia a drogas como la anfetamina y la cocaína (Baena-Trujillo *et al.*, 2000).

Si bien la gran mayoría de los efectos de la DA sobre la función de los ganglios basales ha sido referida a su acción en el estriado, se ha sugerido también que los efectos de la transmisión dopaminérgica sobre los comandos motores puede reflejar acciones combinadas de la DA en el estriado, en la *sustantia nigra pars reticulata* y en el núcleo subtalámico (Baena-Trujillo *et al.*, 2000).

2.4.4. Biosíntesis de Dopamina.

El proceso enzimático involucrado en la síntesis de DA involucra una serie de enzimas donde la tirosina hidroxilasa (TH) es el paso limitante para la síntesis de catecolaminas. La TH es encontrada en todas las células que sintetizan DA y su función oxidasa utiliza O_2 y tirosina como su sustrato y biópterina como cofactor (Fig. 4). La TH puede hidroxilar fenilalanina para convertirla después en L-DOPA. La TH cataliza la unión de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina formando L-DOPA. (Levitt *et al.*, 1965)

La DOPA descarboxilasa es una enzima dependiente de piridoxina que cataliza la remoción del grupo carboxilo de la L-DOPA. La síntesis de DA se lleva a cabo en el citosol.

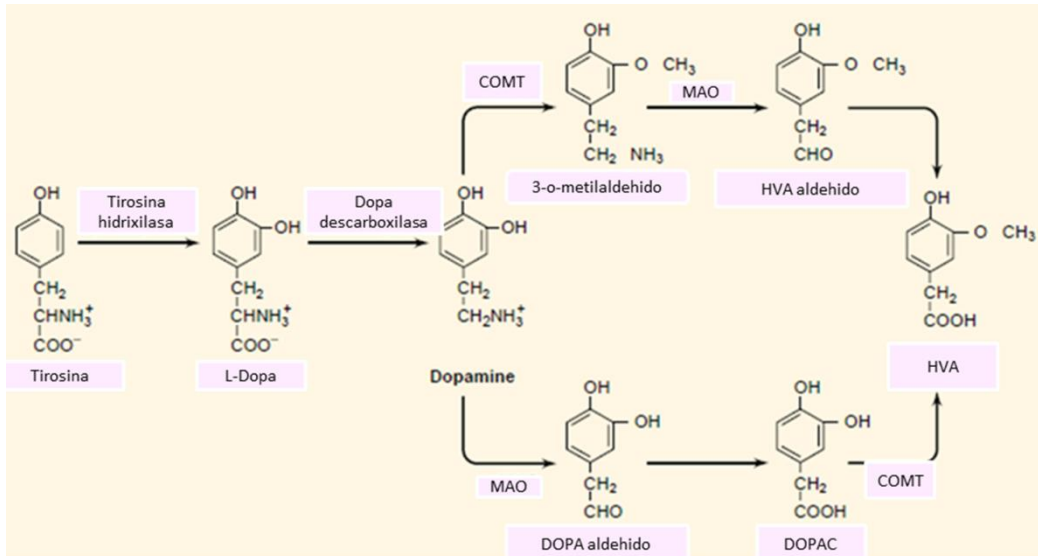


Figura. 4. Ruta biosintética de la dopamina. Tomado de (Siegel GJ *et al.*, 2006).

2.4.5. Almacenamiento de dopamina.

Comúnmente, bajas concentraciones de las catecolaminas se encuentran libres en el citosol donde pueden ser metabolizadas por enzimas como la monoamino oxidasa, por lo tanto, para resguardar y proteger a la DA del metabolismo enzimático, son invaginadas en vesículas en el citosol por medio del transportador de monoaminas vesiculares 2 (VMAT2). Las vesículas juegan un doble papel manteniendo un suministro de DA listo para la liberación.

2.4.6. Liberación y recaptura de dopamina.

La liberación de la DA ocurre debido a una estimulación que genera un potencial de acción y una despolarización de la membrana presináptica que permite la entrada de Ca^{+2} dependiente de voltaje, la entrada y el incremento de Ca^{+2} en el citosol genera la fusión de las vesículas con la membrana celular por medio de proteínas de membrana y con proteínas asociadas al sinaptosoma.

La DA es internalizada dentro de las neuronas por medio de transportador de DA (DAT) situado en las terminaciones presinápticas y algunos autores lo consideran un marcador de la densidad de terminales dopaminérgicos (Mané, Anna., 2013).

2.4.7. Metabolismo de la dopamina.

La DA recapturada es convertida por la enzima monoamino-oxidasa, en particular por la forma B (MAO-B), presente en el interior de la terminal nerviosa (Fig. 5), en

ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) el cual 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-A (Baena-Trujillo et al., 2000)

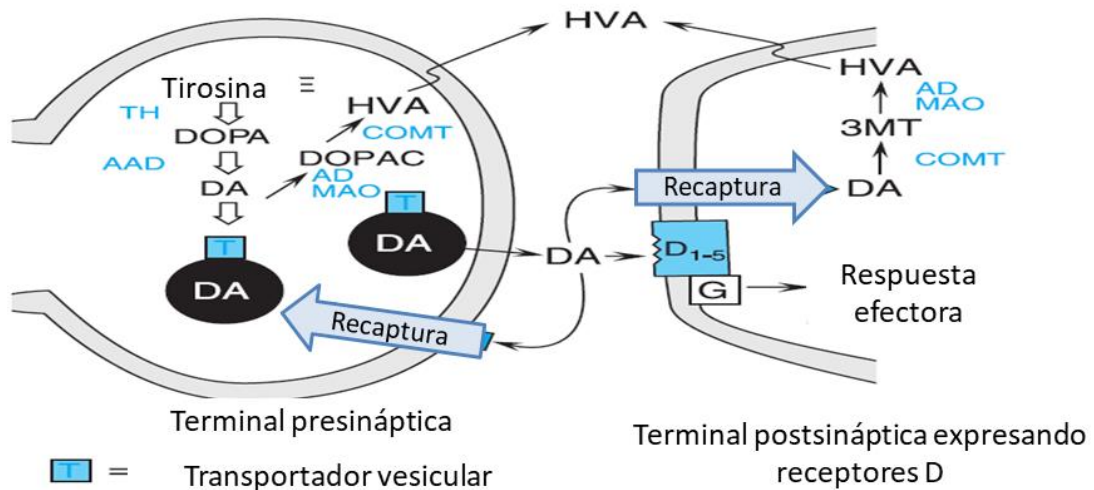


Figura 5. El metabolismo se produce por las acciones seriadas de enzimas. Catecol-o-metiltransferasa (COMT); monoamino oxidasa (MAO); aldehído deshidrogenasa (AD); 3-hidroxitiramina (3MT); dopamina (DA); ácido homovanílico (HVA); ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). La tirosina es convertida en DA y después invaginada en vesículas por medio del transportador de monoaminas vesiculares 2 en las cuales puede ser almacenada o expulsada por exocitosis al espacio intersináptico para ser captada por receptores de DA acoplados a proteínas G o ser recapturados por el transportador de DA, la DA que no es invaginada es metabolizada enzimáticamente hasta ácido homovanílico. Modificado de Siegel GJ *et al.*, 2006.

2.4.8. Receptores de dopamina.

La neurotransmisión dopaminérgica está mediada por 5 subtipos de receptores distintos, que se clasifican en 2 clases principales de receptores denominados tipo D1 (D1 y D5) y tipo D2 (D2, D3 y D4). La ubicación y la función de estos subtipos de receptores se enumeran en la tabla 1 (Wang, G.-J., *et al.*, 2009).

Tabla 1. Tipo de receptor y su localización dentro de los ganglios basales.

Receptor	Localización
Tipo D1 (D1 y D5)	Núcleo caudado, cortezas prefrontal, premotora, cingulada y entorrinal, hipocampo, circunvolución dentada, <i>substantia nigra</i>
D2	Predominantemente en el cuerpo estriado, en el núcleo del núcleo accumbens (NAc) y en el tubérculo olfatorio. También se presenta en las cortezas prefrontal, cingulada, temporal y entorrinal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, <i>pars compacta de substantia nigra</i> , área tegmental ventral (VTA)
D3	Predominantemente en regiones límbicas del cerebro, es decir, NAc, , VTA, sustancia negra, globo pálido interno, pálido ventral y niveles más bajos en el cuerpo estriado dorsal, tabique, amígdala, hipocampo
D4	Predominantemente en la corteza frontal, la amígdala, el hipocampo, el hipotálamo, el mesencéfalo y los niveles bajos en los ganglios basales

Modificado de (Wang, G.-J., *et al.*, 2009)

2.4.9. Sistema de dopamina Nigrostriata.I

El sistema de DA *nigroestriatal* es importante en el control motor para modular el inicio y la ejecución de los programas motores. Las neuronas de DA, principalmente del SNc, regulan la función estriatal por acción directa sobre neuronas espinosas medianas y por acción indirecta mediante interneuronas estriatales (Tisch *et al.*, 2004).

La DA inhibe las neuronas estriatonigrales de la vía indirecta, por medio de receptores predominantemente D2, y excita las neuronas de vía directa estriatopallidal por medio de receptores predominantemente D1 (Hodaie, M., *et al.*, 2017). Las neuronas estriatopallidales de la vía directa coexpresan la sustancia P; las de la vía indirecta expresan encefalina (Tisch *et al.*, 2004).

La entrada dopaminérgica a las interneuronas estriatales también es un importante modulador de la función estriatal. Las interneuronas estriatales colinérgicas y GABAérgicas se modulan por acción de la DA mediante mecanismos pre y postsinápticos. La entrada dopaminérgica en el cuerpo estriado también está involucrada en la modulación de la depresión y potenciación a largo plazo inducida

por la acción glutaminérgica corticostriatal en los receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos, lo que indica un papel importante de la DA en la modulación de la plasticidad estriatal (Tisch *et al.*, 2004).

La deficiencia de DA produce disfunción en el cuerpo estriado, lo que lleva a:

- a) Disminución de la actividad en la vía directa, de neuronas estriatales GABAérgicas al segmento interno del globo pálido (GPi) y *sustantia nigra pars reticulata* (SNr).
- b) Mayor impulso a través de la vía indirecta, que involucra particularmente el segmento externo del globo pálido (GPe) y el núcleo subtalámico (STN).

Como consecuencia, hay una interrupción de la actividad en las estructuras de salida de los ganglios basales (GPi y SNr), que a su vez interrumpe la actividad en las áreas motoras del tallo cerebral, incluyendo el núcleo pedunculopontino y el sistema motor talamocortical. (Hodaie, M., *et al.*, 2017). Se cree que esta alteración es responsable de la dificultad en el inicio de los movimientos y la pobreza del movimiento que son características de la enfermedad de Parkinson (Hamani, C., & Lozano, A. M. 2003).

2.5. Fisiopatología de la EP.

La causa de la degeneración de las células dopaminérgicas en la EP es todavía desconocida. En el estado actual del conocimiento se pueden mencionar factores ambientales, como los generadores de reacciones oxidativas, que llevan a la muerte neuronal en pacientes con alguna predisposición genética a ser más susceptibles a las neurotoxinas ambientales (Hertzman *et al.*, 1990). Esta hipótesis se sustenta en que, agentes tóxicos, tales como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y el plaguicida, paraquat, inducen la producción de radicales libres que reaccionan con los lípidos poliinsaturados de las membranas, y llevan a la muerte neuronal específica de las células de la *sustantia nigra*, tal como ocurre en el Parkinson idiopático (Jenner *et al.*, 1992). Basados en esta información es importante destacar que el estrés oxidante puede ser un mecanismo clave que lleva a la muerte neuronal, Varias líneas de evidencia han implicado la disfunción mitocondrial como un elemento clave en la patogénesis de

la EP. Una teoría emergente es de un círculo vicioso en el que la agregación de α -sinucleína y la disfunción mitocondrial se exacerbaban mutuamente, lo que podría explicar por qué estos cambios celulares se observan juntos en las neuronas dañadas en la EP (Fig. 6).

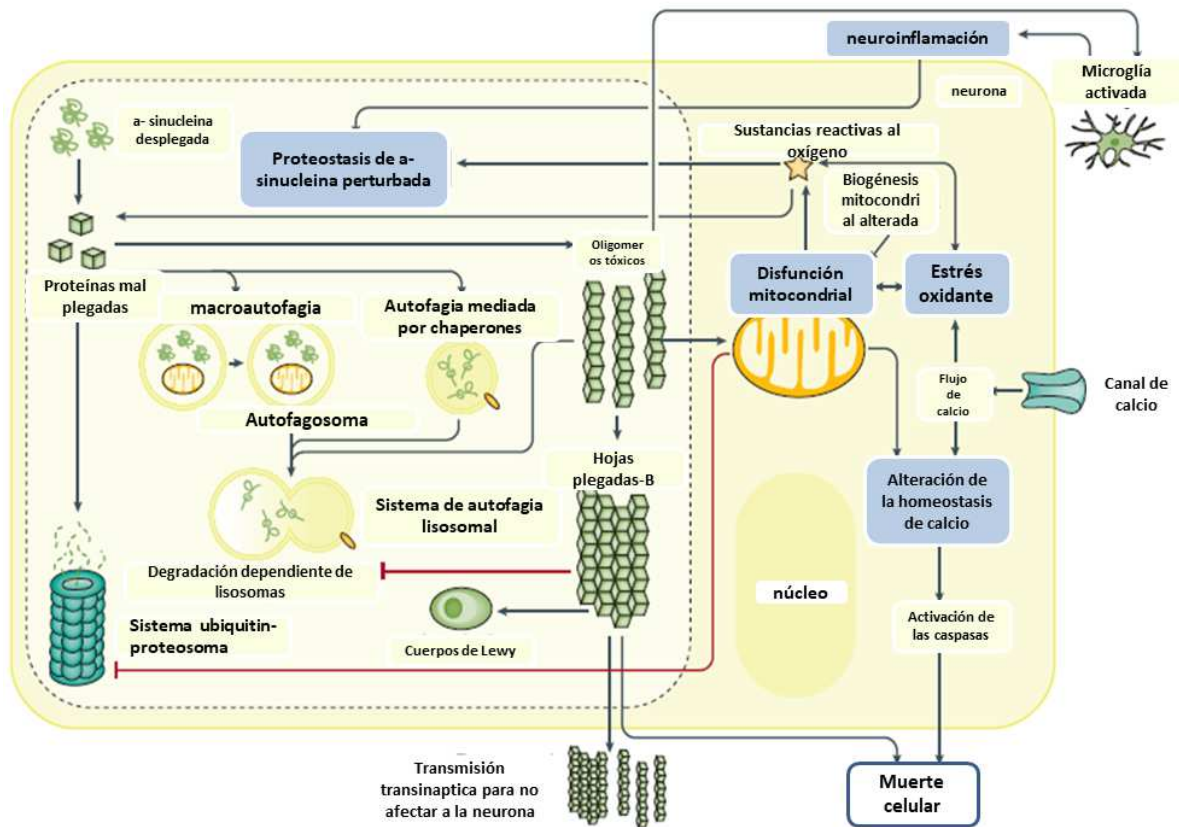


Figura 6. Mecanismos moleculares involucrados en la EP. Diagrama esquemático que representa las interacciones entre las principales vías moleculares que están implicadas en la patogénesis de la EP. Tomado de Poewe *et al.*, 2017.

2.5.1. Disfunción mitocondrial en la EP.

Se han sugerido varias teorías para la patogénesis de la EP, de las cuales, la disfunción mitocondrial juega un papel importante en las formas esporádica y familiar de la enfermedad. La disfunción de las mitocondrias que es causada por defectos bioenergéticos, mutaciones en el DNA mitocondrial, mutaciones en genes nucleares del DNA ligados a las mitocondrias y cambios en la dinámica de las mitocondrias tales como fusión o fisión, cambios en el tamaño o morfología, alteraciones en el tráfico o transporte, movimientos alterados de las mitocondrias y

la presencia de proteínas mutadas asociadas con las mitocondrias están implicadas en la EP (Bose., 2016).

Las toxinas que afectan a las mitocondrias causan defectos en el complejo mitocondrial de transporte de electrones, reducen el movimiento de las mitocondrias, causan un incremento en la transición de la permeabilidad de la membrana, incrementan la generación de especies reactivas al oxígeno y la actividad de la óxido nítrico sintasa en la mitocondria (Bose., 2016).

Los defectos en el complejo I juegan un papel crucial en la pérdida de neuronas dopaminérgicas junto con otros defectos. Los cambios estructurales en el complejo I que resultan de una deficiencia en el factor de inducción de apoptosis no llevan a la neurodegeneración causada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas, pero hace a las neuronas más sensibles a las neurotoxinas. Muchos estudios han demostrado que la disfunción mitocondrial lleva a la producción crónica de especies reactivas del oxígeno (ROS) y causa la muerte de neuronas dopaminérgicas (Bose., 2016).

Varias líneas de evidencia sugieren que la disfunción mitocondrial juega un rol central en la patogénesis de la EP.

Además de los síntomas motores típicos, varias características no motoras se pueden desarrollar, tales como: disfunción autónoma, alteraciones de sueño, depresión y discapacidad cognitiva; indicando un proceso degenerativo más amplio. (Winklhofer y Haass., 2010). También es concebible que las variaciones en la deficiencia del complejo I o las diferencias entre el cerebro y los tejidos periféricos reflejan que la EP no es una entidad uniforme sino un síndrome etiológico y patológicamente heterogéneo.

2.5.2. Deficiencia del Complejo I.

Las mitocondrias son esenciales para la bioenergía celular por la vía de la generación de energía del ATP a través de un proceso de fosforilación oxidativa. Esta tarea crucial es llevada a cabo por cinco complejos multiproteínicos de los cuales el NADH mitocondrial: ubiquinona oxidoreductasa o Complejo I es el más grande y complicado, durante años recientes, las mutaciones en genes nucleares que codifican las subunidades estructurales del complejo I han sido identificadas

como causa de desórdenes neurodegenerativos devastadores (Distelmaier., 2009).

La deficiencia aislada del complejo mitocondrial I es el desorden de la cadena respiratoria mitocondrial más comúnmente observado y está asociado a un amplio rango de presentaciones clínicas incluyendo una marcada acidosis láctica fatal, cardiomiopatía, leucoencefalopatías y hepatopatías con tubulopatías, la deficiencia del complejo I es uno de las desórdenes mitocondriales más comunes en la infancia, el inicio suele ser temprano y la muerte a menudo ocurre dentro del primer año de vida (Swalwell., 2011).

La estructura y función de las proteínas enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial han sido estudiadas *posmortem* en la *sustantia nigra* en nueve pacientes con la EP y comparados con 9 controles. El total de proteínas y masa mitocondrial fue la misma en ambos grupos. La actividad de la NADH-ubiquinona reductasa (complejo I) y la NADH citocromo C reductasa estaba reducida significativamente, mientras que la actividad de la del citocromo succinato C reductasa fue normal. Esos resultados indicaron un defecto específico en el complejo I de la *sustantia nigra* de los pacientes con EP (Schapira *et al.*, 1990).

Varias líneas de investigación sostienen una relación entre la EP y la actividad del complejo I mitocondrial, aunque existen discrepancias entre en los reportes en cuanto a la actividad del complejo I mitocondrial en pacientes con EP, estas pueden ser explicadas por cuestiones metodológicas, particularmente la preparación de las muestras y la técnica de ensayo. También es concebible que las variaciones en la deficiencia del complejo I o las diferencias entre el cerebro y los tejidos periféricos reflejan que la EP no es una entidad uniforme sino un síndrome etiológico y patológicamente heterogéneo (Winklhofer y Haass., 2010).

2.5.3 Complejo mitocondrial I y estrés oxidante.

El transporte de electrones a través de los complejos I-IV en la membrana mitocondrial interna involucra una serie de reacciones redox acopladas, las cuales proveen la energía necesaria para generar un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna. La reducción de equivalentes del proceso catabólico ingresa a la cadena de transporte de electrones (ETC) como NADH (en

el complejo I) o FADH_2 en el complejo II. Los electrones provenientes de NADH y FADH_2 se transmiten paso a paso hasta que reducen el oxígeno para usar en el complejo IV. El movimiento de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana crea un gradiente electroquímico a través de la membrana interna. El gradiente electroquímico está compuesto de un gradiente de pH y un potencial eléctrico y conduce a la síntesis de ATP a partir de ADP mientras que los protones reingresan a la matriz a través de la ATP sintetasa (complejo V). El proceso completo es llamado fosforilación oxidativa (Winklhofer y Haass., 2010).

Abundantes estudios han establecido que las mitocondrias son una fuente importante de ROS. Una alta producción de ROS o una remoción defectuosa de ROS por el sistema de defensa mitocondrial, resulta en un daño oxidante a: DNA mitocondrial (mtDNA), proteínas y lípidos, y perturba las rutas de señalización redox. El daño oxidante al mtDNA podría comprometer las subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el mtDNA, estableciéndose así un círculo vicioso de estrés oxidante y una falla bioenergética que es racional con la teoría del envejecimiento mitocondrial.

El complejo I y en un pequeño grado el complejo III de la cadena de la ETC son considerados el mayor sitio de producción de ROS, el cual es el resultado de la transferencia de un solo electrón al oxígeno para generar el anión superóxido

El anión superóxido es la ROS producida principalmente en la matriz mitocondrial, donde es rápidamente convertido a peróxido de hidrogeno catalizado por manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) en la presencia de iones metálicos, el peróxido de hidrogeno puede ser convertido rápidamente al radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Winklhofer y Hass., 2010).

2.6. Estrés oxidante y la EP.

2.6.1. Estrés oxidante.

El estrés oxidante es la consecuencia del desbalance entre la producción de ROS y la baja capacidad de las defensas antioxidantes para contrarrestarlos. Se sabe que algunos metales como el hierro ferroso (Fe^{+2}) puede favorecer la producción de ROS. Tomando esto como base, se ha propuesto que en la EP el estrés

oxidante sea uno de los mecanismos por los cuales se origina la muerte celular, Martínez-Hernández *et al.*, en el 2011 demostraron un incremento en los depósitos de Fe^{+2} en pacientes con EP, aunado a esto se conoce que existe una alteración de la función de la ceruloplasmina (Cp), una cuproproteína con actividad ferroxidasa, cuya actividad es importante para la eliminación del Fe^{+2} en el SNC, además de considerarse una cuproproteína transportadora de Cu^{+2} que se expresa tanto en neuronas como en las células gliales (Texel *et al.*, 2008). Se sabe que existe una pérdida de 80% de la actividad de ferroxidasa de la Cp en la *sustantia nigra* de pacientes con EP idiopática (Boll *et al.*, 1999), de manera que, su déficit pone en riesgo el transporte del Cu^{+2} hacia los tejidos donde algunas enzimas antioxidantes dependientes del metal deberán ser sintetizadas, como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD/Mn) (enzima mitocondrial) que es la primera defensa antioxidante en contra del radical superóxido producido como consecuencia de la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones, que es uno de los mecanismos propuestos como fuente de daño oxidativo y causa de la muerte neuronal en este padecimiento. Con base en esto de manera reciente Belluzzi *et al.*, (2012), demostraron que existe una disminución de hasta un 50% en la actividad de la SOD/Mn en modelos experimentales y en pacientes con EP (Zuo *et al.*, 2013), por lo que el incremento en la actividad de la SOD/Mn es un blanco terapéutico que debe ser tomado en consideración. La deficiencia de Cu^{+2} como causa del daño oxidativo y la muerte neuronal en la EP se ha estudiado desde hace varios años, la estrategia ha sido el uso de un suplemento de sulfato de Cu^{+2} para revertir esta carencia. La suplementación de CuSO_4 ha demostrado aumentar la actividad de la SOD/Mn y ejercer efecto neuroprotector en el modelo de la EP en animales administrados con MPP^+ (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001b). Así mismo se ha analizado la participación del Cu^{+2} y su relación con la Cp; cabe mencionar que, aunque el déficit de Cu^{+2} no afecta la síntesis o secreción de la Cp, un defecto en la incorporación del Cu^{+2} durante su biosíntesis, genera una apoproteína inestable y carente de actividad oxidasa (Sato y Gitlin., 1991; Gitlin *et al.*, 1992). De tal manera que, la falta de Cu^{+2} en la enzima, no sólo inhibe su capacidad para

remover al hierro de los depósitos cerebrales, sino que también reduce el tiempo de vida media de la Cp (de semanas como holoenzima, a días como apoenzima). El déficit funcional de la Cp en la EP no sólo repercute en el transporte del Cu^{+2} cerebral y en la movilización del hierro de sus depósitos cerebrales, sino que pone en riesgo los efectos neuroprotectores que ejerce por sí misma como: su capacidad para inhibir la autooxidación de los lípidos, su potencial como “atrapadora” del radical libre superóxido, su capacidad para prevenir la acumulación de los productos derivados de la oxidación de la 6-OHDA, así como, la formación de nitrosotioles (considerada actualmente como una nitrito sintasa), controlando de esta manera los posibles efectos neurotóxicos del NO, al evitar la formación de peroxinitrito, ONOO^- (Shiva *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos de estudios básicos nos han conducido a estudiar la respuesta antioxidante de los pacientes con EP. Se ha demostrado que la actividad ferroxidasa de la Cp de pacientes con la EP se encuentra reducida hasta en un 40% con respecto a pacientes del grupo control, pareados por género y edad. También se ha demostrado que existe una relación directa entre la gravedad de los síntomas, determinada a través de la escala de Hoen & Yahr (Grados I-V), y la reducción en la actividad ferroxidasa de la Cp (Boll *et al.*, 1999). En 2008, se reportó la existencia de alteraciones en la defensa antioxidante, participación del óxido nítrico e incremento en la tasa de lipoperoxidación en pacientes con EP. No sólo la actividad ferroxidasa de la Cp aparece reducida en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con EP, sino que éstos también tienen una disminución en la actividad de la Superóxido Dismutasa dependiente de Cu^{+2} (Cu/SOD), lo que podría favorecer el incremento de cerca del 60% observado en la tasa de peroxidación de lípidos en las muestras analizadas. De la misma manera pudo ser establecida la participación del óxido nítrico, quien no sólo promueve la modificación funcional (nitricación) de algunas proteínas, sino también la generación de especies reactivas del nitrógeno como participantes del establecimiento del estrés oxidante (Boll *et al.*, 2008). Los niveles de nitritos y nitratos (como metabolitos finales del óxido nítrico, NO) reflejan un incremento de hasta 2 veces con respecto al grupo control. Estos resultados, aunados al incremento en el

contenido de hasta 2 veces con respecto al contenido de Cu^{+2} libre en el control, sugieren que la inhibición de la actividad de las proteínas dependientes de Cu^{+2} anteriormente citadas (Cp y Cu/ZnSOD) se debe a la falta del Cu^{+2} en sus sitios catalíticos. Por otra parte, no sólo el elevado contenido de NO es el responsable de las modificaciones post-traduccionales que provocan la inactivación de la enzima tirosina hidroxilasa (paso limitante en la síntesis de DA), sino que provoca la inactivación de los complejos de la cadena respiratoria (con la subsecuente disminución en el contenido de ATP), la generación del altamente tóxico y permeable ONOO^- , tras la combinación del radical superóxido con el NO), así como la activación de la vía de las caspasas por el ONOO^- .

Larner y *et al.*, en el 2013, compararon el metabolismo de Cu^{+2} en diez pacientes con EP y contra controles sanos con la ayuda de un radioisótopo de Cu^{+2} , los resultados indicaron que el metabolismo de Cu^{+2} se encuentra alterado. Finalmente, otro posible blanco como agente terapéutico en la EP, es la Metalotioneína (MT) única proteína endógena, capaz de atrapar de manera eficiente al radical hidroxilo liberado por la reacción de Fenton; Rojas *et al.*, (2000) determinaron que en animales administrados con MPP^+ la cantidad de MT disminuye de manera significativa. Ebadi y Sharma (2006) demostraron que la MT-1 y 2 disminuyen el daño oxidativo y la muerte neuronal en modelos animales de la EP, tomando en consideración que la MT, es un péptido cuya expresión se incrementa por daño oxidativo y metales como el Cu^{+2} (Zatta *et al.*, 2008), el incremento en su expresión puede ser un marcador importante en la EP.

El término estrés oxidante es comúnmente utilizado para describir un desbalance entre la manifestación sistémica de radicales libres y la capacidad de las células para desintoxicarse y combatir el daño a las proteínas, lípidos y DNA. El origen perceptivo del estrés oxidante ha sido rastreado hasta la década de 1950 y el término comenzó a ser utilizado por los científicos a partir de los años 70 cuando comenzaron a desenmarañar los efectos de los radicales libres y la radiación ionizante (Ahmadinejad., 2017).

2.7. Modelos animales para la EP.

Los modelos animales, permiten establecer los parámetros y condiciones necesarias para estudiar los cambios fisiológicos presentes en cada trastorno orgánico, ya que permiten la aplicación de técnicas de análisis que no pueden emplearse en el ser humano por razones éticas. Así mismo, estos modelos brindan información que no pueden ser obtenidas mediante técnicas *in vitro* como cultivos celulares, donde los resultados no siempre reproducen lo que ocurre en el organismo.

2.7.1. Importancia de los modelos animales en la EP.

A pesar de los avances que se han logrado en el tratamiento de la EP, aún son varios los aspectos de la enfermedad que son desconocidos, por lo que se ha creado la necesidad de disponer de modelos experimentales en animales que permitan entender a profundidad las causas de la enfermedad (etiología, patología y mecanismos moleculares), así como ensayar tratamientos con nuevos fármacos (Jackson-Lewis, *et al.*, 2012).

Los modelos animales empleados para el estudio de la EP, se categorizan de acuerdo al modo en que inducen la patología: modelos farmacológicos y modelos neurotóxicos.

2.7.2. Modelos Farmacológicos.

Los modelos de inducción farmacológica (tabla 2) se caracterizan por alterar o modificar las vías metabólicas en el desarrollo y homeostasis neuronal provocando una sintomatología o bioquímica encontrada en la EP (Duty; 2011), entre ellos se encuentran:

- Reserpina.
- Haloperidol.

Tabla 2. Características de los modelos animales de la EP inducidos por fármacos.

MODELO	MECANISMO DE ACCION	CARACTERISTICAS DE LA EP	CONTRAS	PUNTOS A FAVOR	REFERENCIA
Reserpina	Inhibe al transportador vesicular de monoaminas, esto hace que se pierda la capacidad de almacenamiento de las monoaminas del cerebro produciendo al agotamiento de monoaminas,	-Letargo, depresión y discinesia motora	-Falta de selectividad por la dopamina.* -Los animales vuelven a condiciones normales 24 horas después de la administración -No induce neurodegeneración y agregación de proteínas.	Agotamiento de dopamina del 95%	Leao et al., 2015, Duty, 2011, Leal et al., 2016
Haloperidol	Es un antagonista de los receptores de dopamina D2 y los receptores D1, los metabolitos tóxicos como RHPP+ y HP+ inhibe el complejo I en la cadena respiratoria mitocondrial que está asociado con la generación de ROS y estrés oxidativo	-Rigidez, discinesia motora	- Modelo transitorio que limita su utilidad a largo plazo. -No muestran ninguna patología que permitan la investigación de nuevas estrategias de neuroprotección o neuroreparación.	Puede ser comparada con la incapacidad de los pacientes para iniciar los movimientos	Raudenska et al., 2013, Gumulec et al., 2013

Modificado de: Leao et al., 2015, Duty., 2011, Leal et al., 2016, Raudenska et al., 2013 y Gumulec et al., 2013.

2.7.3. Modelos de plaguicidas y herbicidas.

Desde los años 80's se ha estudiado la relación que hay entre la EP y la exposición a productos químicos (tabla 3 y 4) a través de diversos estudios epidemiológicos que relacionan el riesgo a padecer dicha enfermedad con la exposición a sustancias provenientes de la actividad industrial (Van-der-Mark *et al.*, 2012). Entre ellos se encuentran:

- Paraquat.
- Maneb.
- Rotenona.

Tabla 3. Principales características de los modelos animales de la EP inducidos por pesticidas.

MODELO	MECANISMO DE ACCION	CARACTERISTICAS DE LA EP	CONTRAS	PUNTOS A FAVOR
El N, N'-dimetil-4-4'-bipiridilo (Paracuat)	El paraquat (PQ) penetra el cerebro a través del transportador de aminoácidos neutros antes de producir la captación dependiente de Na ⁺ en las células, y una vez dentro, conduce tanto a la toxicidad mitocondrial indirecta a través del ciclo redox como a la inhibición directa del complejo I generando ROS, en particular el radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo	-Muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas -Postura encorvada y disminución en la actividad locomotora de los ratones	-los efectos más notables se dan cuando se combina con maneb	Útil para evaluar agentes neuroprotectores (en combinación con Maneb)
etilenbisditiocarbamato de manganeso (Maneb)	Inhibe preferentemente el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial	-Observadas en combinación con paraquat -Postura encorvada y disminución en la actividad locomotora de los ratones	Poco estudiada	Útil para evaluar agentes neuroprotectores (en combinación con Paraquat)

Modificado de: Stojkovska et al., 2015, Duty., 2011, Nandipati y Litva., 2016.

Tabla 4. Principales características de los modelos animales de la EP inducidos por rotenona

MODELO	MECANISMO DE ACCION	CARACTERISTICAS DE LA EP	CONTRAS	PUNTOS A FAVOR
Rotenona	Atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y se difunde en neuronas donde, de manera similar a MPTP, se acumula dentro de las mitocondrias e inhibe el complejo I	Reproduce la mayoría de los sistemas motores y características histopatológicas de la EP, incluyendo los cuerpos de Lewy.	La administración sistémica de rotenona (2-3 mg/kg/día durante 1 a 5 semanas). Presenta un alto grado de toxicidad sistémica (principalmente cardiovascular) que produce altas tasas de mortalidad Pérdida de peso, por lo que se requieren dietas especializadas para mantener a los animales	Permite la comparación entre pares de hemisferios cerebrales tratados y no tratados y la expresión de la α -sinucleína

Modificado de: Norazit et al., 2010 y Xiong et al., 2009.

2.7.4. Modelos Genéticos.

Uno de los componentes más importantes en la EP es el componente genético, ya que se han encontrado defectos genéticos en algunos casos familiares de la EP (10%-20% de los casos). Dentro de estos casos familiares se han categorizado en dos grupos de acuerdo al tipo de herencia al que se van ligados y sus características principales se resumen en la tabla 5 (Dawson., 2010). Estos son los modelos:

- Autosómicos dominantes.
- Autosómicos recesivos.

Tabla 5: Características de los modelos genéticos autosómicos y recesivos.

MODELO	MECANISMO DE ACCION	CARACTERISTICAS DE LA EP	CONTRAS	PUNTOS A FAVOR
Autosómicos dominantes y recesivos	Sobreexpresión de genes o la atenuación de genes	Los efectos dependen del gen afectado	Los modelos no presentan los cambios comportacionales característicos de la EP, además muchos de los modelos tienen límites obvios en cuanto a que tanta puede ser su trazabilidad hacia lo que pasa en el ser humano	Su valor radica en los mecanismos moleculares y genéticos de la enfermedad.

Tomado de Dawson., 2010 y Tsika., 2015.

2.7.5. Modelos Neurotóxicos.

Varios modelos animales se encuentran actualmente en uso en primates y roedores, sin embargo, hay algunos inconvenientes en el uso de esos modelos (tabla 6), pero esos hechos no niegan el valor de esos modelos animales en el estudio de la EP, entre los que se encuentran:

- 6-hidroxidopamina.
- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Tabla 6. Características de los modelos animales de la EP inducidos por neurotoxinas.

MODELO	MECANISMO DE ACCION	CARACTERISTICAS DE LA EP	CONTRAS	PUNTOS A FAVOR
6-hidroxidopamina (6-OHDA)	-Utiliza el DAT para obtener acceso al citosol donde puede auto-oxidarse, generando por lo tanto un estrés oxidante intracelular	-Estrés oxidante - Discinesia motora -Rigidez	-No cruza la barrera hematoencefálica -No produce o induce agregados proteínicos o inclusiones tipo Lewy como las observadas en la DP -La inyección bilateral de este compuesto en el cuerpo estriado produce no sólo adipsia severa, afagia, convulsiones y la muerte.	Reproduce la mayoría de las características de la EP
1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	MPTP es absorbido por los astrocitos, y es metabolizado a MPP+ por la MAO-B, es liberado por los astrocitos por medio del transportador OCT-3, es absorbido por las neuronas por medio del DAT y bloquear sitio 1 del complejo mitocondrial e iniciar otras reacciones intracelulares.	-Estrés oxidante -Radicales libres -Discinesia motora -Rigidez	No produce cuerpos de Lewy	Replicación de casi todas las marcas de la EP

Modificado de: Lee CS; 1996, Graham; 1978, Alves; 2006.

El estrés oxidante, las especies reactivas al oxígeno, la disfunción energética y la inflamación han sido constantemente apuntados como signos distintivos de la EP. La MPTP, ha emulado casi todas las características de la EP (Langston., 1983) en humanos y otros mamíferos superiores; y un número significativo de estos hallazgos en ratones, pero no en ratas, ya que se encontró que eran resistentes a

esta toxina (Chiueh., 1984). Sin embargo, este modelo no presenta el sello definitivo de la EP: los cuerpos de Lewy. Pero incluso esto puede convertirse en una realidad con MPTP dependiendo de cómo sea administrada.

2.8. 1-metil-4-fenilpiridinina (MPP⁺).

A finales de los años 70 y principios de los 80, los jóvenes drogadictos en California, Estados Unidos, desarrollaron parkinsonismo de forma progresiva e irreversible después de utilizar un subproducto generado accidentalmente durante la síntesis de un análogo de meperidina por vía intravenosa, el compuesto neurotóxico fue rastreado hasta MPTP. Uno de esos pacientes, un estudiante de química quien murió de sobredosis 2 años después de iniciados los síntomas de Parkinson, mostró degeneración de la *sustantia nigra pars compacta* sin una evidencia clara de cuerpos de Lewy. Esos descubrimientos fueron confirmados más tarde cuando tres pacientes más llegaron a la autopsia 3-16 años después de la intoxicación con MPTP (Winklhofer y Haass., 2010).

Es importante destacar que los efectos benéficos y adversos de la terapia con L-Dopa en los pacientes intoxicados con MPTP y primates son comparables con aquellos pacientes que sufrieron la EP de forma esporádica. Las similitudes neuropatológicas y clínicas entre el parkinsonismo inducido por MPTP y la EP esporádica promovieron el uso de MPTP en modelos animales en mono para estudios neuropatológicos, neurofisiológicos y terapias preclínicas. Por razones de practicidad, el modelo de MPTP ha sido establecido en ratones, los cuales ahora son ampliamente usados para estudiar algunos aspectos de la EP.

El MPTP cruza la barrera hematoencefálica debido a su alta lipofilicidad y es oxidado a una especie de piridinio por la mono amino oxidasa B (MAO B) en las células gliales. Esta especie es después oxidada a la molécula tóxica MPP⁺, la cual es liberada por un mecanismo aún no conocido y puede ser capturada por las neuronas dopaminérgicas por la vía del transportador de DA (Fig. 7). En las neuronas el MPP⁺ es concentrado en las mitocondrias donde inhibe el complejo mitocondrial I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) de la cadena de transporte de electrones (Fig. 8). Como una consecuencia del flujo de electrones alterado a través del complejo I, la producción mitocondrial de ATP decrece mientras que la

producción de especies reactivas al oxígeno aumenta (Fig. 9) (Winklhofer y Haass., 2010).

Los efectos inducidos por MPP^+ incluyen alteraciones estráteles bioquímicas tales como incremento en la peroxidación lipídica, un proceso relacionado con la sobre producción de ROS y el agotamiento de la DA, asociado con la pérdida de neuronas dopaminérgicas que acompaña la muerte neuronal. También se ha reportado la disminución de la concentración Cu^{+2} estriatal después de la administración de MPTP en ratones (Alcaraz-Zubeldia et al., 2001a).

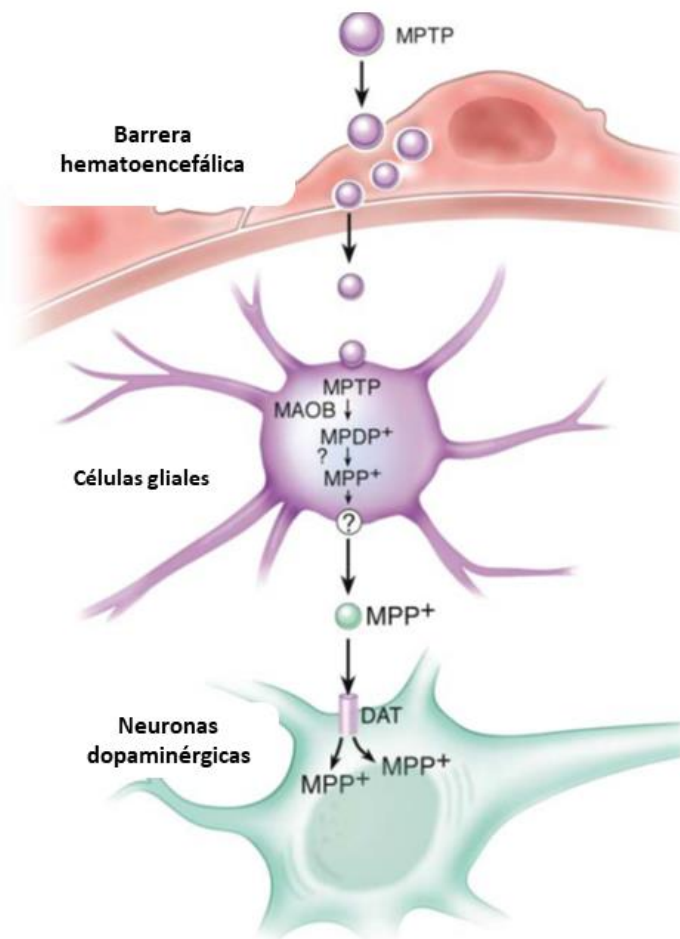


Figura 7. Representación esquemática del metabolismo del MPTP. Después de la administración sistémica, el MPTP cruza la barrera hematoencefálica, una vez en el cerebro, el MPTP es convertido a $MPDP^+$ por la MAO-B dentro de las células no dopaminérgicas, tales como células gliales y células serotoninérgicas (no mostrado) y posteriormente a MPP^+ por un mecanismo desconocido. Posteriormente el MPP^+ es liberado por un mecanismo aún no dilucidado hacia el espacio extracelular, posteriormente el MPP^+ es concentrado dentro de las neuronas dopaminérgicas por la vía del transportador de DA (DAT). Tomado de Daue y Przedborski (2003).

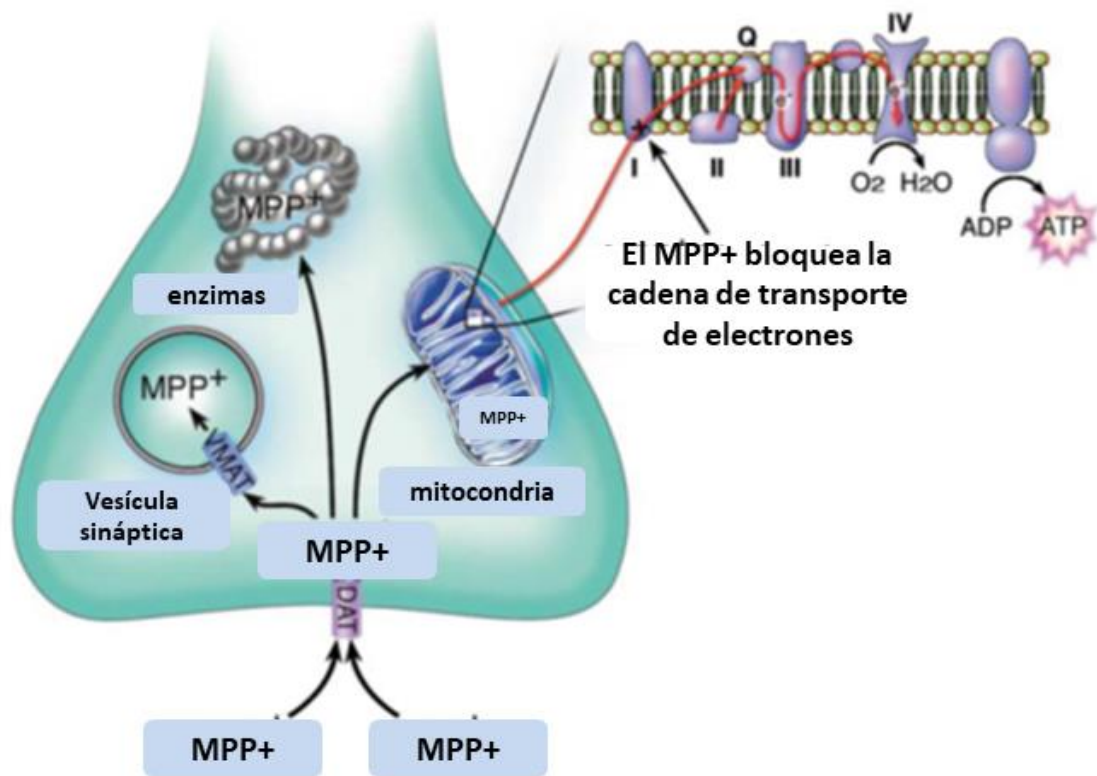


Figura 8. Representación esquemática de las rutas intracelulares del MPP⁺ dentro de las neuronas dopaminérgicas, el MPP⁺ puede seguir una de estas tres rutas: (1) concentrarse dentro de las mitocondrias a través de un proceso activo (tóxico); (2) interacción con las enzimas citosólicas (tóxico); (3) captura dentro de las vesículas sinápticas por la vía del transportador vesicular (protector). Tomado de Dauer. y Przedborski (2003).

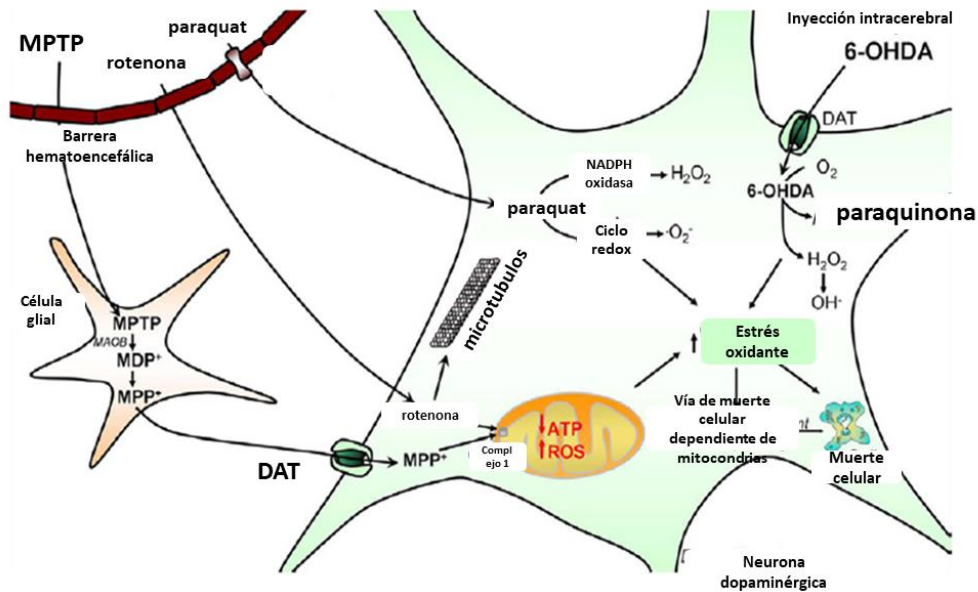


Figura 9. Mecanismo de acción de las neurotoxinas utilizadas para modelar la EP. La 6-hydroxydopamina (6-OHDA) entra en las neuronas a través del transportador de DA (DAT). Después de varias reacciones consecutivas, se oxida, produciendo peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y para-quinona. De este modo induce la muerte celular neuronal a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El MPTP y la rotenona, como compuestos lipófilos, pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Una vez dentro del cerebro, el MPTP se metaboliza en el catión tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+) por la enzima monoaminoxidasa B (MAO B) en las células gliales. MPP^+ ingresa a las células dopaminérgicas a través de DAT. El MPP^+ y la rotenona se acumulan en las mitocondrias donde inhiben el complejo de la cadena respiratoria mitocondrial. La inhibición del complejo I conduce a una disminución de los niveles de ATP, un aumento de la producción de ROS y, en última instancia, a la activación de una vía de muerte celular dependiente de mitocondrias. La rotenona también puede inducir la despolimerización de los microtúbulos celulares, que participan en el proceso de muerte celular. El paraquat ingresa al cerebro con la ayuda de transportadores de aminoácidos neutros (aa) y cataliza la formación de ROS a través de dos mecanismos: (1) ciclos redox y (2) activación de enzimas generadoras de ROS tales como NADPH oxidasas. Tomado de Bove y Perier., (2012).

2.9. Tratamientos en la EP.

2.9.1. Tratamientos actuales.

La mayoría de los fármacos utilizados para el tratamiento de la EP están orientados a reestablecer el contenido de DA que existe en el estriado de estos pacientes, mediante la administración del precursor de la DA la L-DOPA (considerado el estándar de oro) y más recientemente se han utilizado los agonistas dopaminérgicos. Aunque, estos tratamientos proporcionan una mejoría sintomática importante de los parámetros de calidad de vida durante al menos 5-8 años, al cabo de este tiempo, la mayoría de los pacientes desarrollan complicaciones motoras (fluctuaciones y discinesias) (Iravani y Jenner., 2011),

neuropsiquiátricas y en algunos casos, alteraciones cognitivas importantes de difícil manejo clínico. Estas complicaciones son probablemente el reflejo de una combinación de factores entre los cuales la progresión de la enfermedad es el factor más importante, en su conjunto, esta combinación de síntomas conduce a la discapacidad y la dependencia (Jankovic., 2008). Las graves complicaciones y efectos adversos de estas terapias que llevan a la discinesia tardía han dado lugar a grandes esfuerzos para desarrollar nuevas terapias que funcionan de manera distinta a la restauración o sustitución de la DA, algunos estudios clínicos realizados en pacientes son:

- a) Antagonistas de los receptores para adenosina A2A como el Istradefilina,
- b) Antagonistas NMDA para glutamato (amantadina y memantina).
- c) Antagonistas AMPA (perampanel, talampanel y topiramato).
- d) Antagonistas del receptor de glutamato de tipo metabotrópico del grupo 1 (Dipraglurant, AFQ056).
- e) Agonistas de receptores de serotonina (5-HT1A) como el sarizotan, la luspirona, la mirtazapina, la clozapina, la tandospirina y la aripiprazola.
- f) Bloqueadores de canales de calcio (isradipina) (Stayte y Vissel., 2014).
- g) Quelantes de hierro como la deferiprona (Devos *et al.*, 2014).
- h) Antiinflamatorios (minociclina).
- i) Factores neurotróficos, y terapias génicas.

Sin embargo, hasta el momento estas terapias no han demostrado tener eficacia en clínica, por lo que se sigue en busca de otros blancos terapéuticos. En años recientes ha cobrado particular interés los hallazgos y evidencias de una disminución de Cu^{+2} en el cerebro de pacientes con EP y su relación con la muerte celular y la acumulación de hierro en la *sustantia nigra pars compacta* (Rivera-Mancia *et al.*, 2010; Montes *et al.*, 2014).

2.9.2. Sulfato de cobre.

Hay evidencia importante en la literatura sobre el papel del Cu^{+2} libre como deletéreo para las enfermedades neurodegenerativas. Los principales efectos del

Cu^{+2} están mediados por su capacidad redox y por su capacidad de iniciar, mantener o incluso potenciar la generación de radicales libres (Arnal *et al.*, 2010). Los iones de Cu^{+2} están estrechamente implicados en trastornos neurodegenerativos humanos especialmente la EP. Las moléculas cruciales en la fisiología del sistema nervioso central (SNC), tales como proteínas, ácidos nucleicos, y también restos lipídicos (que son componentes clave de las biomembranas) son el blanco preferido de los radicales libres generados a partir de reacciones de Fenton catalizadas por iones metálicos tales como Cu^{+2} (Arnal *et al.*, 2010).

La evidencia experimental sugiere fuertemente que el Cu^{+2} juega un papel clave en los trastornos neurodegenerativos. A medida que el cerebro envejece, se produce un aumento en los eventos pro-oxidantes e inflamatorios que está íntimamente asociado con lesiones patológicas características de las enfermedades neurodegenerativas (Arnal *et al.*, 2010).

La fisiopatología de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas es muy compleja y probablemente involucra varias vías de daño neuronal distintas y a veces superpuestas. Por otra parte, el Cu^{+2} se ha asociado cada vez más con la gliosis o la activación microglial y los mecanismos inflamatorios inducidos por el estrés oxidativo, que están siempre presentes en muchas de estas condiciones clínicas (Montes *et al.*, 2014).

El Cu^{+2} tiende a aumentar en el cerebro humano desde la infancia, a expensas de su concentración en otros tejidos. Sin embargo, no se aprecia tal tendencia en las mediciones de los niveles plasmáticos de Cu^{+2} . La homeostasis del Cu^{+2} está alterada en la EP; sin embargo, en este trastorno neurológico la concentración del metal varía de la acumulación al agotamiento entre las regiones cerebrales en estudio (Arnal *et al.*, 2010).

Las alteraciones en el almacenamiento de metales de transición, el transporte y el manejo celular han ganado atención en las enfermedades neurodegenerativas, sobre todo porque los primeros informes *post mortem* mostraron acumulación de Fe^{+2} y disminución de los niveles de Cu^{+2} en el estriado de los pacientes con EP. Debido a que ambos metales están implicados en la generación y propagación de

radicales libres, así como en la precipitación de proteínas, como resultado de sus propiedades redox (Montes *et al.*, 2014).

El Cu^{+2} es necesario para la fisiología celular, y el Cu^{+2} se considera un metal esencial. Existe un sistema complejo para la absorción, distribución, almacenamiento y manipulación de este metal de transición.

El Cu^{+2} no sólo participa en la extinción de especies reactivas de oxígeno como cofactor en Cu/Zn-SOD, sino que también contribuye a la cadena de transporte de electrones en el citocromo C, que transfiere electrones entre los complejos III (Coenzima Q-Cyt, citocromo C reductasa) y citocromo C oxidasa en el complejo IV en la membrana interna de las mitocondrias. También participa en la síntesis de neurotransmisores (dopamina beta-hidroxilasa), el metabolismo de neurotransmisores (diamina oxidasa y monoamina oxidasa), el manejo o almacenamiento de otros metales (metalotioneínas, ceruloplasmina y hafequina) y la formación de matriz extracelular entre otras funciones (Montes *et al.*, 2014).

2.9.3. Metalotioneína (MT).

Las metalotioneínas (MT-I, MT-II, MT-III y MT-IV), constituyen una superfamilia de proteínas, ricas en cisteína capaces de unir metales a su estructura. En el SNC la MT-I y II han sido localizadas a lo largo de la médula espinal y cerebro, principalmente en los astrocitos, mientras que la MT-III sólo ha sido localizada en las neuronas dopaminérgicas (Juárez-Rebollar; 2014). Cada una de las isoformas contiene un porcentaje alto de cisteína (25-30%) y bajo peso molecular (6-7 kDa). Las MT contienen dos dominios de unión a metales, en los cuales cuatro y tres iones divalentes son quelados en el grupo A del dominio α y el grupo B del dominio β , respectivamente. Estos iones metálicos se coordinan por medio de puentes de cisteína tiolato a 11 cisteínas en el dominio α y a 9 cisteínas en el dominio β . (Wirenfeldt *et al.*, 2009). Las MT, las metalotioneínas I y II (MT-I+II) contienen 61 y 62 aminoácidos, respectivamente (Fig. 10), otra de sus características es la ausencia de aminoácidos aromáticos (Nielsen *et al.*, 2006); estos péptidos a menudo son estudiadas en relación con el metabolismo de iones metálicos, particularmente iones de Zn^{+2} y por su efecto protector contra daño por radicales libres debido a las propiedades antioxidantes de la proteína.

Recientemente, ha surgido un gran interés en las MT debido a su aparente papel en la supervivencia celular y en el caso del daño cerebral las MT- I+II tienen una actividad neurotrópica y neuroprotectora que mejoran la supervivencia celular en SNC de los mamíferos. Aunque el mecanismo molecular por el cual funcionan las MT aún no está claro, se sabe que algunos procesos intracelulares son alterados o regulados por ellas, incluyendo la homeostasis de iones metálicos, la expulsión de ROS y la inhibición de mecanismos preapoptóticos, lo que le confiere propiedades con potencial terapéutico en padecimientos neurológicos agudos y neurodegenerativos (Wirenfeldt *et al.*, 2009).

En el cerebro, la variación en la homeostasis de metales esenciales está asociada con un número de enfermedades y neuropatologías, incluidas, apoplejía, epilepsia, Parkinson y Alzheimer (Nielsen *et al.*, 2006). No está claro si las MT se dirigen a un receptor de la superficie de la membrana neuronal o es internalizada por endocitosis. Recientemente, miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad, las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas han sido establecidas como posibles chaperonas para el transporte de las MT a través de la membrana neural, posiblemente impulsada por un mecanismo de internalización/endocitosis. Se ha demostrado que el sitio responsable de la unión a las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas está localizado en el C-terminal del dominio β de las MT. (Wirenfeldt *et al.*, 2009). Bajo condiciones biológicas normales, las MT se unen al Zn^{+2} y al Cu^{+2} a través de sus residuos de cisteína, pero pueden ser fácilmente reemplazados por otros tales como: Cd^{+2} , Hg^{+2} , Ag^{+2} , Pt^{+2} , etc. Así mismo, se ha indicado que, en estudios recientes, se da soporte a la actividad neuroprotectora de las MT como resultado de sus propiedades antioxidantes; el exceso de DA tomado por los astrocitos incrementa la expresión de MT-I+II, protegiendo a las neuronas dopaminérgicas de los radicales libres (Santos *et al.*, 2012). Estudios en células modificadas para sobreexpresar MT-I+II, han demostrado una protección clara contra condiciones de estrés oxidante. Esta capacidad antioxidante ha sido evaluada en modelos de daño al SNC, demostrando una disminución en la peroxidación lipídica y menos nitración de la tirosina generada después de la formación de peroxinitrito. La

capacidad antiinflamatoria de las MT-I+II ha sido reportada en modelos experimentales de encefalitis autoinmune. También se ha reportado que las MT-I+II están asociadas con una disminución en la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF) bajo diferentes condiciones de daño cerebral, además de tener la capacidad de inhibir la apoptosis inducida por la 6-aminonicotinamida (Arellano-Ruiz *et al.*, 2012).

Basándose en modelos estructurales, se puede asumir que la molécula de MT está compuesta de dos dominios (α y β) que están compuestas de grupos de cisteína. Los enlaces covalentes de los átomos metálicos involucra a los residuos de cisteína sulfhídrido. La parte N terminal del péptido esta designada como el dominio β y tiene tres sitios de acción para iones divalentes, la parte C terminal (dominio α) tiene la capacidad de unirse a cuatro iones divalentes.

La vida media de la MT endógena en animales adultos es de 21 a 33 horas, sin embargo, aún no se ha podido determinar el tiempo de vida media de la MT exógena.

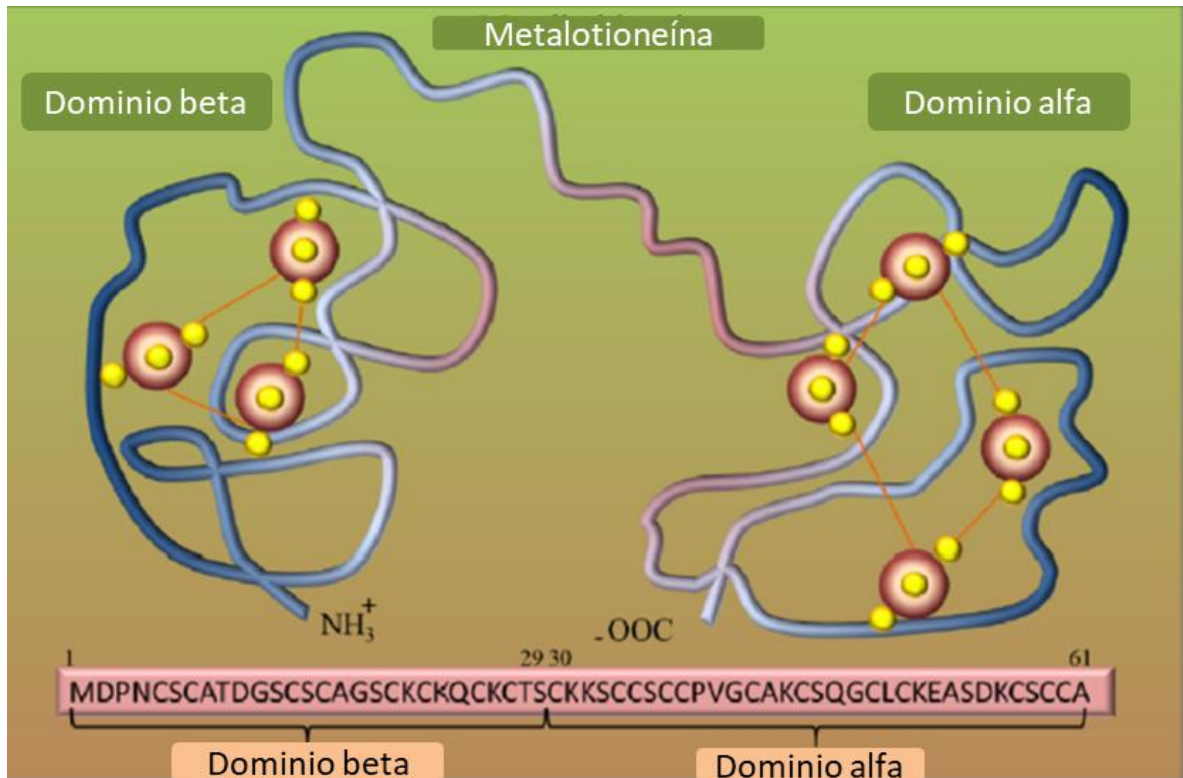


Figura 10. Estructura de metalotioneína (MT). Modelo de dos sitios de unión de MT. Las cuentas grandes rojas son átomos metálicos (por ejemplo, Zn), y las pequeñas cuentas amarillas son átomos de azufre. Tomado de Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013.

2.9.4. El papel de las MT en cáncer y apoptosis.

Las MT juegan un rol importante en la regulación de la apoptosis. Primero: las MT regulan la concentración intracelular del Zn^{+2} , como segundo: se encuentra la interacción de las MT con proteínas involucradas en la apoptosis. Las MT protegen contra la apoptosis distribuyendo Zn^{+2} . El Zn^{+2} es un mediador intracelular de la apoptosis el cual puede interferir con la acción del Ca^{+2} . Pueden ser activadas por varios estímulos, incluyendo iones metálicos, citosinas y factores de crecimiento (Fig.11) (Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013). En varios experimentos, la síntesis de MT ha demostrado incrementarse varias veces durante el estrés oxidante para proteger a las células de la citotoxicidad, radiación y daño al DNA. Los estímulos que inducen las MT y el efecto descendente de la expresión de las MT se encuentran resumidos en la (Fig. 12).

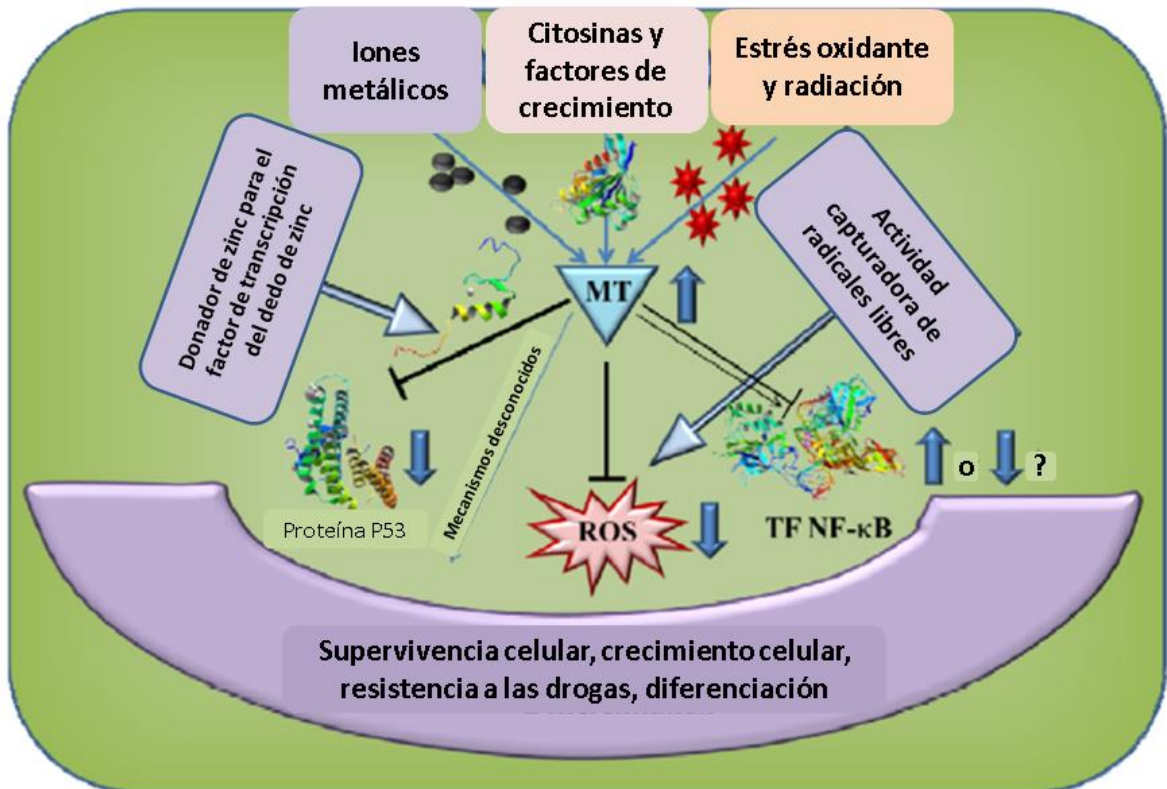


Figura 11. Representación esquemática de los estímulos que inducen MT y la cascada de efectos de la sobreexpresión de MT. Las MT pueden ser activadas por varios estímulos, incluyendo iones metálicos, citosinas, factores de crecimiento, estrés oxidante y radiación. La cascada de efectos de la sobreexpresión de las MT es la modulación de la transcripción de la proteína supresora de tumores p53 y el factor de transcripción nuclear NF-κB. Otra cascada de efectos de las MT influye en la supervivencia celular, crecimiento celular, resistencia a fármacos y diferenciación. Tomado de Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013.

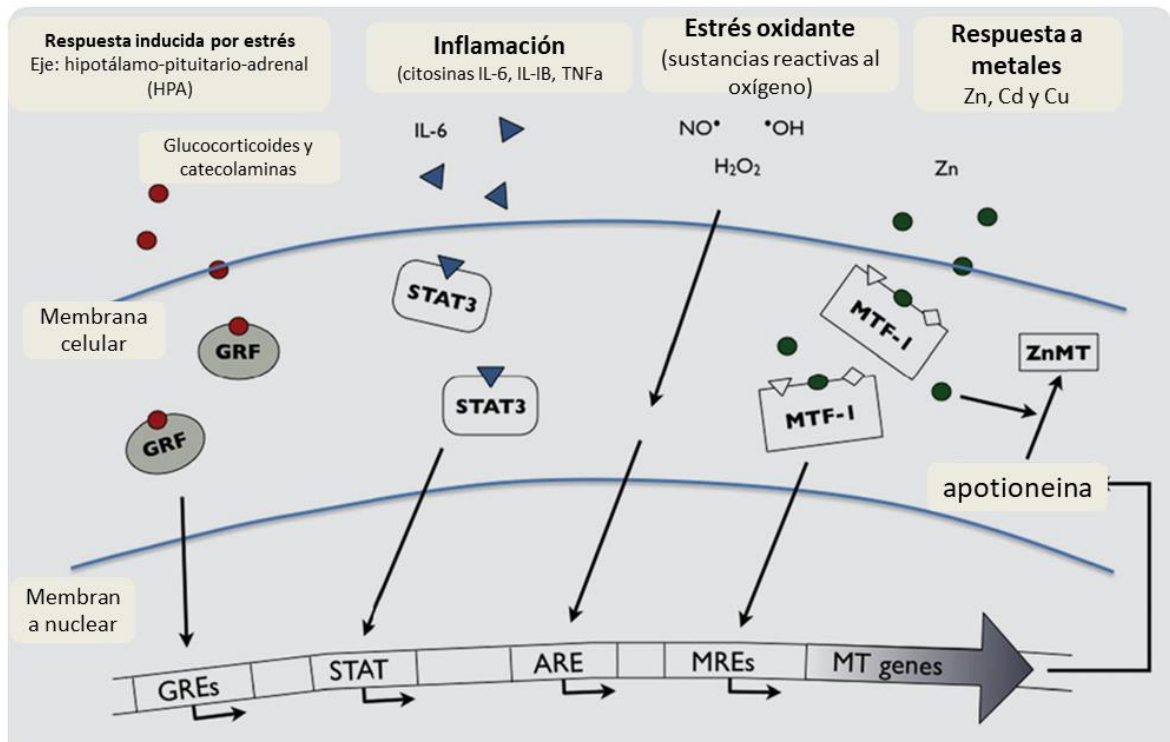


Figura 12. Imagen en la que se representan las principales vías de inducción de la expresión de la MT cerebral por señalización de vías intracelulares y elementos de respuesta presentes en la región reguladora del gen. Algunos de los inductores comprenden: hormonas (glucocorticoides, catecolaminas) que activan moléculas como los factores de respuesta a los glucocorticoides (GRF) que posteriormente se unen a los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE); citocinas proinflamatorias (por ejemplo, interleucinas (IL) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)) señalización a través del transductor de señal y el activador de la transcripción (STAT); especies de oxígeno reactivo (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), óxido de nitrógeno (NO), radical hidroxilo (OH)) señalización a través de elementos de respuesta antioxidante (ARE); e iones metálicos (por ejemplo, Zn⁺², Cu⁺², Cd⁺²), que se unen a factores de transcripción metálicos (MTF), tras lo cual se unen a elementos de respuesta metálicos (MRE) en la región promotora del gen. Tomado de Pedersen et al., 2009., 2009.

2.9.5. Función antioxidante de las MT.

Las MT juegan un papel importante en la regulación de la apoptosis. El primer papel de las MT es la regulación de la concentración intracelular del Zn⁺². El segundo papel es la interacción de las MT con proteínas involucradas en la apoptosis.

Los avances más críticos en la investigación de las MT es la demostración de la regulación redox de la interacción zinc-azufre (Zn-S), el acoplamiento del Zn⁺² y el metabolismo redox, la estructura del complejo Zn-MT provee una base química por la cual el ligando cisteína, puede inducir propiedades oxidoreductoras, lo que constituye un ciclo redox para las MT (Fig. 13).

Estudios en células modificadas para sobreexpresar MT-1 y MT-II han demostrado una clara protección contra condiciones de estrés oxidante (Kondo, Y., *et al.*, 1997; Wanpen, S., *et al.*, 2004). Esta capacidad antioxidante ha sido evaluada en modelos de daño al SNC, mostrando una disminución en la lipoperoxidación y menos nitración de tirosina generada después de la formación de peroxinitrito (Ebadi, M., & Sharma, S. 2006). Sin embargo, el efecto antiinflamatorio de MT en enfermedades autoinmunes del SNC como la esclerosis múltiple, también se ha descrito en asociación con la inhibición de CD4+ (Penkowa, M., *et al.*, 2005).

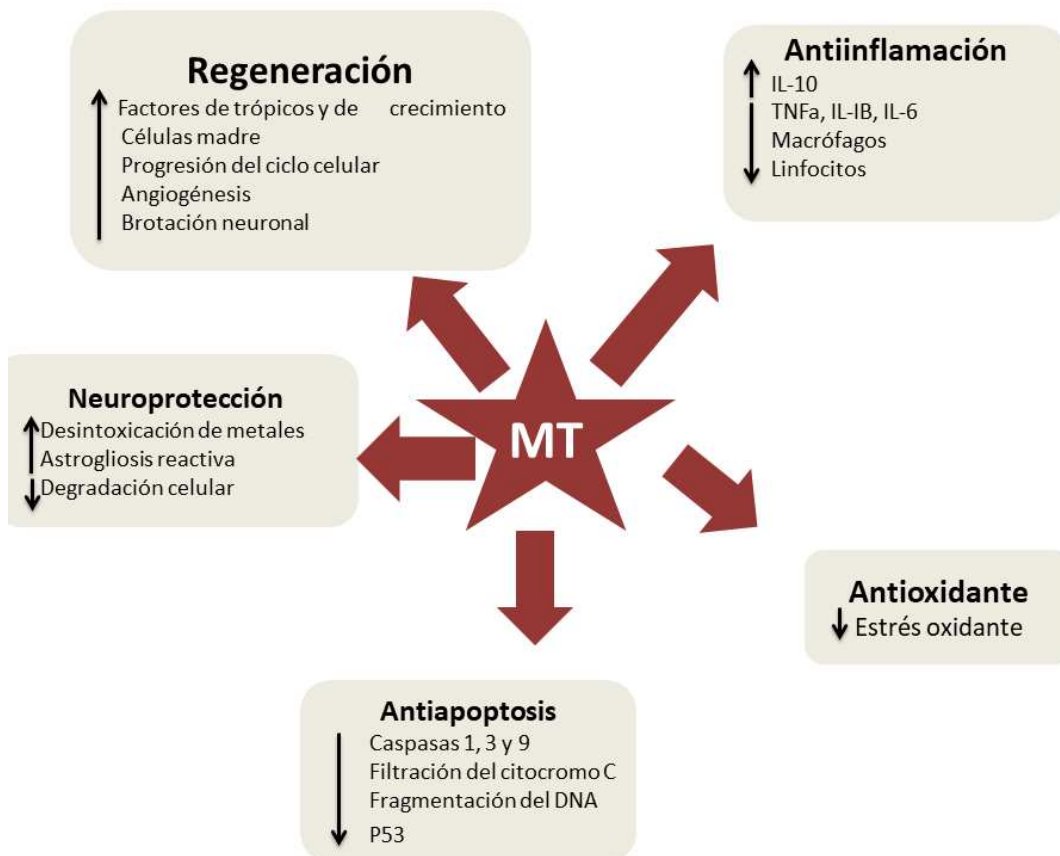


Figura 13. Imagen en la que se esquematiza de forma general los efectos neuroprotectores de las MT en respuesta al daño tisular durante condiciones neuropatológicas. tales como lesión cerebral y encefalomiélitis autoinmune experimental. Abreviaturas: BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; EPO, eritropoyetina; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; FGFR, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos; GDNF, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; IL, interleucina; NGF, factor de crecimiento nervioso; NT, neurotrofina; TGF, factor de crecimiento transformante beta; TGFR, receptor transformante del factor de crecimiento beta; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. Tomado de Pedersen *et al.*, 2009.

Arellano-Ruiz, S. *et al.*, (2012) demostraron que después de un daño en la médula espinal (SCI), una cascada compleja de procesos fisiológicos daña rápidamente el tejido nervioso. El daño inicial se extiende al tejido circundante por diferentes

mecanismos incluyendo al estrés oxidante, también en el mismo estudio reporta que la inducción de MT endógena es un mecanismo de respuesta rápido después de la SCI. Los resultados del estudio demuestran que la administración exógena de MT-II a dosis de 10 y 100 g, 2 y 8 h después de animales tratados con dosis de 10 y 100 g, pero no con dosis de 3,2 g de MT-II, 2 y 8 h después de la lesión, mostraron una mejor recuperación funcional en comparación con los animales en el grupo control administrados solo con el vehículo, se promueve significativamente la recuperación de la función motora, la cual se correlaciona con una mayor cantidad de tejido de la médula espinal preservada. Estos resultados pueden explicarse debido al efecto antioxidante de esta proteína. Una característica común observada en muchos estudios *in vitro* e *in vivo* es que MT-I y MT-II reducen la muerte celular y el daño cerebral.

Con base en lo establecido previamente es que este trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto neuroprotector de la MT y el CuSO₄ administrados solos o en combinación en un modelo de la EP en rata.

3. Planteamiento del problema.

La EP es el segundo padecimiento neurodegenerativo más común en la población mundial. En México se reporta una incidencia de 50 casos por cada 100,000 habitantes de acuerdo con información del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez” (salud.gob.mx INNN 2016). La L-DOPA ha demostrado tener beneficio terapéutico y es considerado como estándar de tratamiento, sin embargo; éste solo sirve para controlar los síntomas de la enfermedad sin tener efecto neuroprotector, por lo que la muerte de las neuronas dopaminérgicas sigue incrementándose, es por esta razón que se siguen desarrollando diversas líneas de investigación para encontrar un tratamiento exitoso que logre detener el progreso de la enfermedad. Se sabe que la MT y el Cu^{2+} , son moléculas que inciden y regulan diversas vías de daño presentes en la EP, es por esta razón que en el presente estudio se propone evaluar su efecto neuroprotector en un modelo de la EP inducido por MPP^+ en ratón.

4. Hipótesis.

La MT actúa como un péptido antioxidante y quelante de metales de transición, y en combinación con sulfato de cobre reduce el daño dopaminérgico y la formación de productos lipídicos inducidos por la inyección intracerebroventricular de MPP⁺ mejorando la actividad locomotora espontánea en el ratón.

5. Objetivos.

5.1. Objetivo General.

Evaluar el efecto neuroprotector de la MT y el CuSO₄ administrados solos o en combinación en el modelo experimental de la EP inducido por MPP⁺ en ratón.

5.1.2. Objetivos particulares.

- 1) Evaluar el efecto antioxidante de la MT administrada en una dosis de 10 µg/ratón sola o en combinación con CuSO₄ (2.5 mg Cu/Kg i.p.) con base en la cantidad de lipoperoxidación presente en el estriado de ratón después de la administración de MPP⁺.
- 2) Evaluar el efecto promotor de la recuperación funcional de la MT administrada sola o en combinación con CuSO₄ evaluando la actividad locomotora espontánea a través de la cuantificación de la distancia total recorrida y el tiempo total de reposo.
- 3) Evaluar el efecto neuroprotector de la MT administrada sola o en combinación con CuSO₄ analizando el contenido de DA estriatal después de la administración de MPP⁺.

6. Métodos.

6.1. Grupos experimentales.

Todos los procedimientos para el manejo de animales fueron realizados de acuerdo con las “Guías regulatorias para el cuidado y uso de animales de laboratorio” conforme a la NOM-062-ZOO-2001. Para este experimento se emplearon ratones C-57 Black macho, utilizando 6 animales por grupo en experimentos independientes para la evaluación de la lipoperoxidación y del contenido de DA, con una “n” total de 48 ratones. Los animales fueron alojados en cajas de acrílico bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (12 horas luz y 12 horas oscuridad), con libre acceso a alimento comercial estándar para ratones y al agua.

6.2. Diseño experimental.

Los animales fueron seleccionados aleatoriamente para formar los siguientes 8 grupos experimentales (Fig. 14).

Grupo 1 (control solución salina): Animales administrados con el vehículo para MT (solución salina (SS)), el vehículo para CuSO_4 (SS), y con el vehículo para el MPP^+ (SS).

Grupo 2 (control MT): Animales administrados con MT, con el vehículo para CuSO_4 , y con el vehículo para MPP^+ .

Grupo 3 (control Cu^{+2}): Animales con el vehículo para MT, con CuSO_4 y con el vehículo de MPP^+ .

Grupo 4 (MT + Cu^{+2}): Animales tratados con MT, con CuSO_4 , y con el vehículo de MPP^+ .

Grupo 5 (control de daño MPP^+): Animales administrados con el vehículo para MT, con el vehículo para CuSO_4 , y con MPP^+ .

Grupo 6 (MT+ MPP^+): Animales administrados con MT, con vehículo para CuSO_4 y con MPP^+ .

Grupo 7 (Cu^{+2} + MPP^+): Animales administrados con el vehículo para MT, con CuSO_4 y con MPP^+ .

Grupo 8 (MT + Cu +MPP⁺): Animales administrados con MT, con CuSO₄ y con MPP⁺.

Los 8 grupos fueron utilizados en los ensayos de lipooxidación, actividad locomotora espontánea y determinación del contenido de DA estriatal.

Los grupos 1,2 y 3 se agruparon en un solo grupo control al no mostrar diferencias significativas entre sí.

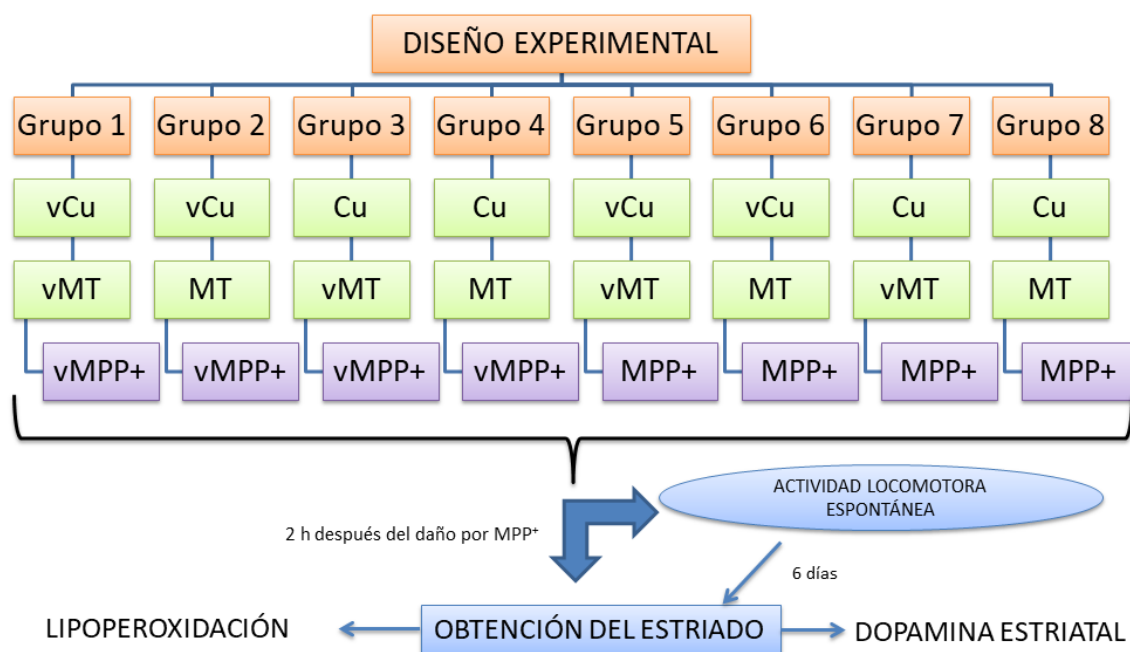


Figura 14. Diseño experimental, con los diferentes ensayos que forman parte del proyecto. Vehículo de CuSO₄ (vCu), Vehículo de metalotioneína (vMT), 1-metil-4-fenilpiridinia (MPP⁺), vehículo de MPP⁺ (vMPP⁺), CuSO₄ (Cu), metalotioneína (MT).

6.3. Administración de sulfato de cobre.

La administración de sulfato de cobre se aplicó por vía intraperitoneal en una dosis de CuSO₄ (2.5 mg/Kg) en solución salina conforme Alcaraz-Zubeldia *et al.*, (2001a), quienes reportaron que el tratamiento previo con CuSO₄, 24 horas antes de la administración de la neurotoxina MPP⁺ protege a los ratones contra la pérdida de neuronas dopaminérgicas, así como la lipoperoxidación inducida por la neurotoxina.

6.4 Administración de MPP⁺.

La microinyección se realizó intracerebroventricularmente con 18 µg de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) disueltos en 3 µL de solución salina. Para esto se utilizó una

micro jeringa Hamilton de 10 μ L calibre 26s, longitud N2 y punta biselada de 12°. De acuerdo con el método descrito por Touchette., (2016).

6.5. Método de eutanasia y cuidados postoperatorios.

Posteriormente a la administración de MPP⁺, a los animales se les realizó una limpieza de la herida y se llevó a cabo una administración tópica de gentamicina sobre la herida quirúrgica.

El sacrificio de todos los animales en este protocolo se realizó por decapitación 2 horas después de la administración de MPP⁺ para el análisis de lipoperoxidación, y 6 días después de la administración de MPP⁺ para el análisis de DA estriatal, con sedación previa inducida con pentobarbital sódico (40 mg/Kg) administrado por vía intraperitoneal.

6.6. Administración de MT.

Se administró la MT exógena (10 μ g/4 μ L) disuelta en SS en dosis única antes de la administración de CuSO₄ (2.5 mg/Kg) y 24 horas antes del establecimiento del modelo de la EP con el MPP⁺.

6.7. Análisis de la lipoperoxidación.

La cantidad de los productos lipídicos fluorescentes fueron evaluados en el estriado de los ratones 2 horas después de la administración de MPP⁺. Se disecó el cuerpo estriado, el cual fue cuidadosamente pesado y homogenizado en 2 mL de agua desionizada. Se tomó una alícuota de 1.0 mL del homogenizado en tubos de vidrio y se le añadieron 4.0 mL de una mezcla de 4.0 mL de cloroformo-metanol en una proporción (2:1). Los tubos se taparon y se agitaron suavemente por 2 minutos y se colocaron en hielo por 30 min para permitir la separación de las fases. Se desechó la parte acuosa y se transfirió 1.0 mL del estrato clorofórmico a una celda de cuarzo y se añadió 0.1 mL de metanol. Se midió la fluorescencia a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión en un espectrofotómetro. Se ajustó el espectrofotómetro con un estándar de quinina 0.1 mg /L preparada en una solución acuosa 0.05 M de ácido sulfúrico antes de medir las muestras (Alcaraz., - Zubeldia *et al.*, 2001a).

6.8. Análisis de actividad locomotora espontánea.

El análisis de actividad locomotora espontánea se realizó en un equipo Opto-Varimex 4.

El Opto-Varimex 4 de Columbus Instruments consta de una unidad de control compacta que admite una amplia variedad de configuraciones y tipos de sensores de haz óptico. Hasta cuatro pares de sensores se conectan a una sola unidad de control Opto-Varimex 4. Una pantalla LCD retroiluminada en el panel frontal muestra los recuentos “total” y “ambulatorio” del haz para cada uno de los cuatro pares de sensores en tiempo real. Cada vez que se interrumpe un sensor, se acumula una cuenta “total”. Se acumula un conteo “ambulatorio” cada vez que se interrumpe un nuevo haz. El conteo “ambulatorio” no responde al mismo haz que se interrumpe y restaura repetidamente. Esto evita que los conteos ambulatorios respondan a las interrupciones rápidas del haz causadas por arañazos, acicalamiento, excavación u otros movimientos estereotípicos no ambulatorios. Al registrar los recuentos acumulados por los contadores “total” y “ambulatorio”, es posible comparar cantidades de movimientos estereotípicos y ambulatorios. Los pares de sensores constan de una barra emisora de infrarrojos, con cuatro a dieciséis rayos infrarrojos y una barra detectora correspondiente.

El cuerpo principal del archivo de resultados es generado automáticamente y contiene los datos de cada jaula. Cada intervalo de jaula tiene una sola línea que enumera, en este orden:

- a) El número de intervalo (Int)
- b) El número de la jaula (C #)
- c) El tiempo de inicio del intervalo (inicio)
- d) El intervalo de tiempo de parada (Stop)
- e) La distancia en centímetros recorrida por el sujeto durante el intervalo (DT cm)
- f) El tiempo de descanso (sin movimiento detectado) en segundos (RT sec)
- g) El tiempo estereotípico (pequeños movimientos) en segundos (ST sec)

- h) El tiempo ambulatorio (movimiento ambulatorio grande) en segundos (AT sec)
- i) 9. Explosiones de movimiento estereotípico (BSM)

Este análisis se realizó entre las 08:00 y 16:00 h en una habitación aislada. Como tiempo de adaptación se mantuvieron los animales durante 10 minutos dentro de la caja del equipo de análisis y posteriormente se inició el análisis durante un periodo de 20 min. Para el análisis se limpió la caja de acrílico con una mezcla de etanol-agua 50:50 % v/v, y toallas de papel para remover las heces fecales de los ratones, posteriormente se dejaron evaporar los remanentes de la mezcla metanol-agua y se inició el análisis. Este ensayo permitió evaluar la distancia total recorrida y el tiempo de reposo total.

6.9. Análisis cromatográfico del contenido de DA estriatal.

Los cerebros de los ratones fueron removidos 6 días después de administración de MPP⁺ y los estriados fueron diseccionados sobre hielo, y se conservaron a -70°C hasta su análisis. Para el análisis las muestras se homogenizaron en un homogeneizador ultrasónico con solución antioxidante (5.6 ml de ácido perclórico y 1 g de metabisulfato de sodio en un litro de agua desionizada) en un volumen de 5 veces el peso del tejido. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se transfirió viales de inyección con un colector de 150 µL.

El contenido de DA estriatal fue analizado utilizando un sistema de cromatografía líquidos de alta resolución Agilent 1100 acoplado a un detector de arreglo de diodos ajustado a una excitación de 279 y una emisión de 206 nm, en el que se le realizó una validación parcial del método analítico (anexo 1). Las curvas de calibración fueron elaboradas con DA y las concentraciones fueron obtenidas por interpolación en la curva de calibración estándar. Para el análisis se utilizó una columna Zorbax SB-C18 150 x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm y con un volumen de inyección de 80 µL. Como fase móvil se utilizó un buffer de fosfatos que compuesto por fosfato de sodio monobásico 0.87 M, octil-sulfato de sodio 1.7

mM y 38 μ M de EDTA a un pH = 3 y se utilizó ácido fosfórico para ajustar el pH. Se obtuvo un tiempo de retención de 3 minutos y un cromatograma resuelto que se muestran en la figura 15).

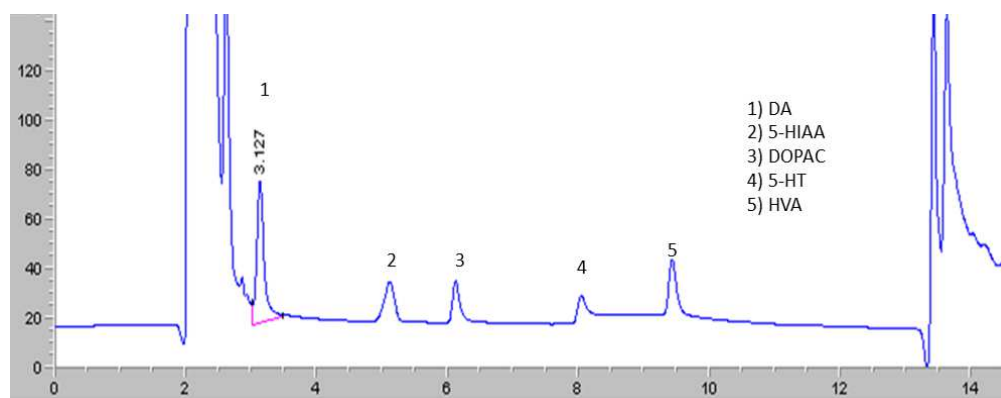


Figura 15. Cromatograma de un punto de la curva de calibración correspondiente a una concentración de 800 nM de dopamina (DA), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido homovanílico (HVA).

6.10. Análisis estadístico.

Los resultados de los análisis de la lipoperoxidación, tiempo de reposo total en la actividad locomotora espontánea se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney.

Los resultados del efecto neuroprotector y antioxidante de la MT, el CuSO_4 y su combinación para el estudio de la distancia total recorrida en la actividad motora espontánea así como el análisis de la concentración de la DA estriatal se analizaron mediante una prueba estadística de ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett. Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS statistics 23. Las gráficas que se presentan para la representación gráfica de los datos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism vr 6.01.

6.11. Consideraciones éticas.

Todos los procedimientos para el manejo de animales fueron realizados de acuerdo con las Guías regulatorias para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía y conforme a la NOM-062-ZOO-1999.

7. Resultados.

7.1. Análisis de lipoperoxidación.

Los resultados obtenidos (tabla 7) en el análisis de productos de lipoperoxidación se muestran en la figura 16.

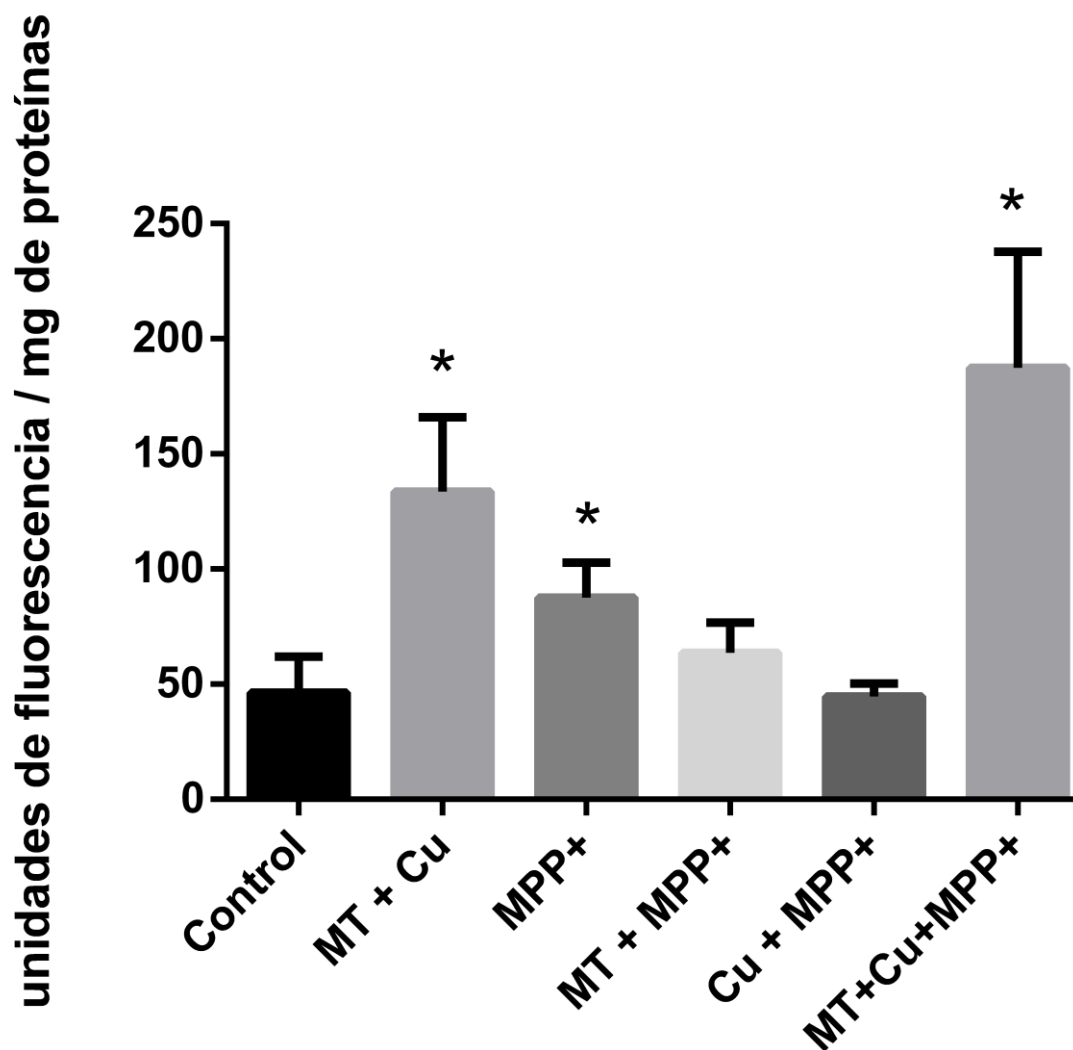


Figura 16. Se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de productos de lipoperoxidación. Metalotioneína (MT), CuSO_4 (Cu), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$ con respecto al grupo control)

Tabla 7. Resultados obtenidos de la evaluación de productos de lipoperoxidacion. El análisis estadístico utilizado corresponde a una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

LIPOPEROXIDACIÓN			
Tratamiento	Animales	Media	Error estándar
CONTROL	17	51.40	7.98
MT + Cu	7	133.74	32.21
MPP ⁺	6	87.65	15.21
MT + MPP ⁺	4	63.63	13.08
Cu + MPP ⁺	5	44.61	5.68
MT + Cu + MPP ⁺	8	187.44	50.33

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) aumentando los productos de lipoperoxidación en la comparación con los grupos que recibieron los tratamientos: MT + Cu, MPP⁺ y MT+Cu+ MPP⁺ con respecto la agrupación de los grupos control. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$ con respecto al grupo control $n = 5-6$)

7.2. Actividad locomotora espontánea.

7.2.1. Tiempo total de reposo.

Los resultados obtenidos (tabla 8) de reposo total promedio en minutos en la prueba de actividad locomotora espontánea figura 17.

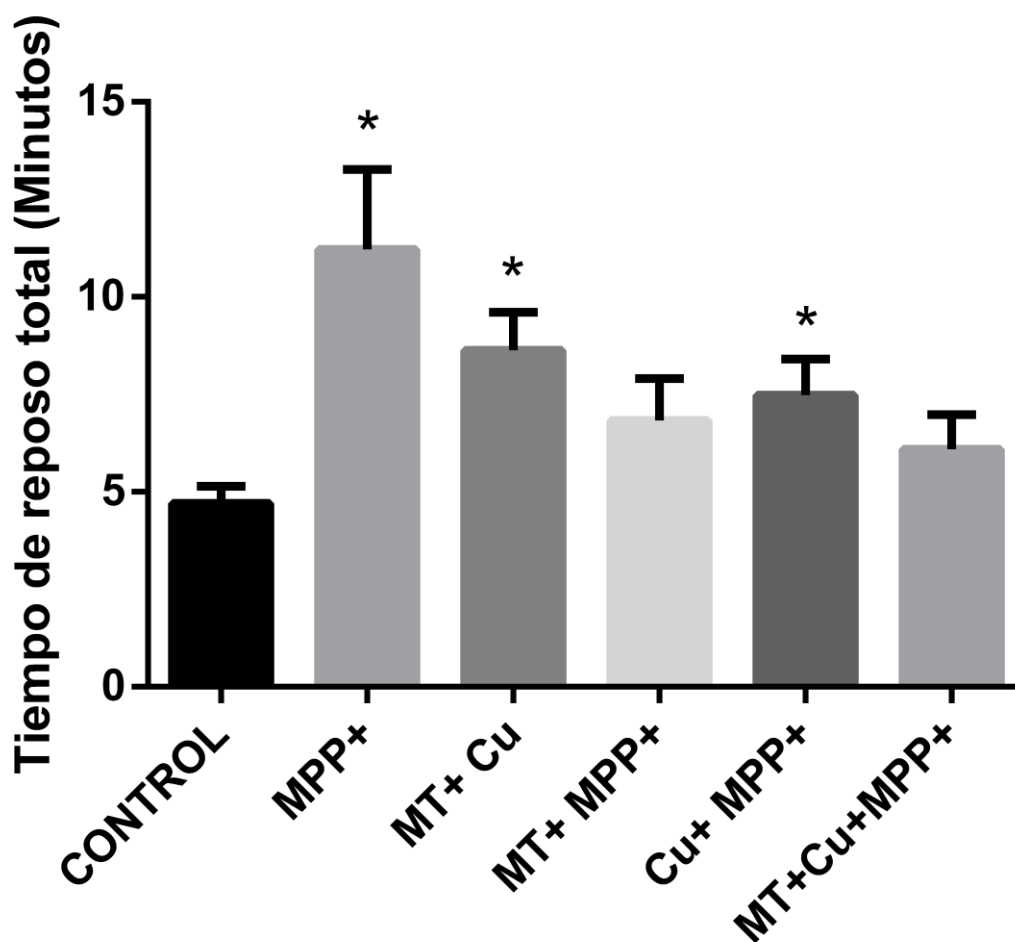


Figura 17. Se muestran los resultados obtenidos de reposo total en la prueba de actividad locomotora espontánea. Metalotioneína (MT), CuSO_4 (Cu), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$ con respecto al grupo control $n = 4-6$)

Tabla 8. Resultados obtenidos de reposo total en la prueba de actividad locomotora espontánea. Para el análisis estadístico de los datos se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

TIEMPO DE REPOSO TOTAL (minutos)			
Tratamiento	Animales	Media	Error estándar
CONTROL	13	4.70	0.44
MPP ⁺	11	11.22	2.05
MT+ Cu	6	8.63	0.97
MT+ MPP ⁺	6	6.83	1.07
Cu+ MPP ⁺	4	7.48	0.93
MT+Cu+MPP ⁺	5	6.09	0.89

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) incrementando el tiempo de reposo en la comparación de los grupos MPP⁺, MT+Cu y Cu+MPP⁺ con respecto al grupo control y. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis seguido de una prueba de U de Mann-Whitney (* $p < 0.05$ con respecto al grupo control)

7.2.2. Distancia total recorrida.

El promedio de los resultados obtenidos (tabla 9) de la distancia total recorrida en metros en la prueba de actividad locomotora espontánea se muestran en la figura 18.

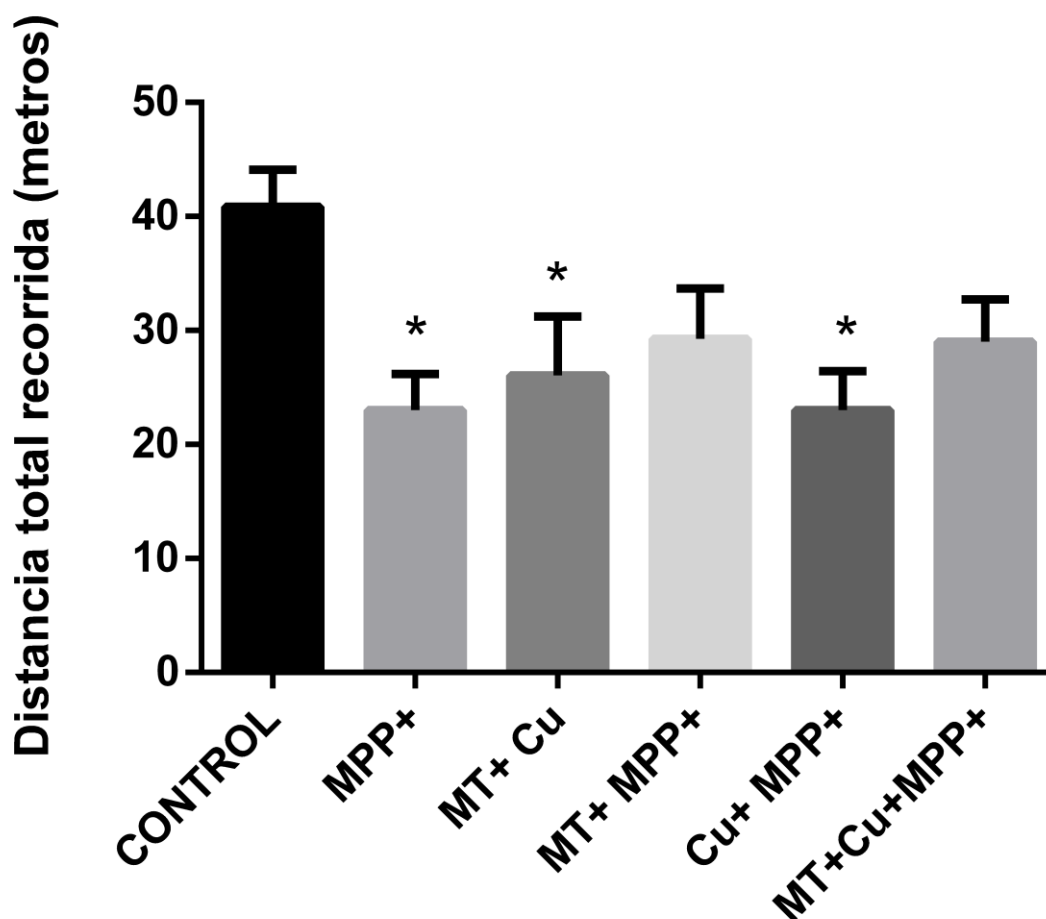


Figura 18. Se muestran los resultados promedio obtenidos de la distancia total recorrida en metros en la prueba de actividad locomotora espontánea. Metalotioneína (MT), CuSO_4 (Cu), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP^+). Se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett ($*P < 0.05$ comparada con el grupo control $n = 4-6$).

Tabla 9. Resultados obtenidos de la distancia total recorrida en la prueba de actividad locomotora espontánea. Para el análisis de los datos se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (* $P < 0.05$ comparado con el grupo control).

DISTANCIA TOTAL RECORRIDA (metros)			
Tratamiento	Animales	Media	Error estándar
CONTROL	13	40.85	3.25
MPP ⁺	11	23.02	3.15
MT+ Cu	6	26.05	5.18
MT+ MPP ⁺	6	29.25	4.42
Cu+ MPP ⁺	4	23.04	3.41
MT+Cu+MPP ⁺	5	29.01	3.71

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) disminuyendo la distancia total recorrida en la comparación de los grupos MPP⁺, MT+Cu y Cu+MPP⁺ en comparación con el grupo control. Para el análisis de los datos se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. (* $P < 0.05$ con respecto al grupo control $n=5-6$).

7.3. Análisis de dopamina.

Los resultados promedio obtenidos (tabla 10) para el análisis del contenido de DA estriatal se muestran en la figura 19.

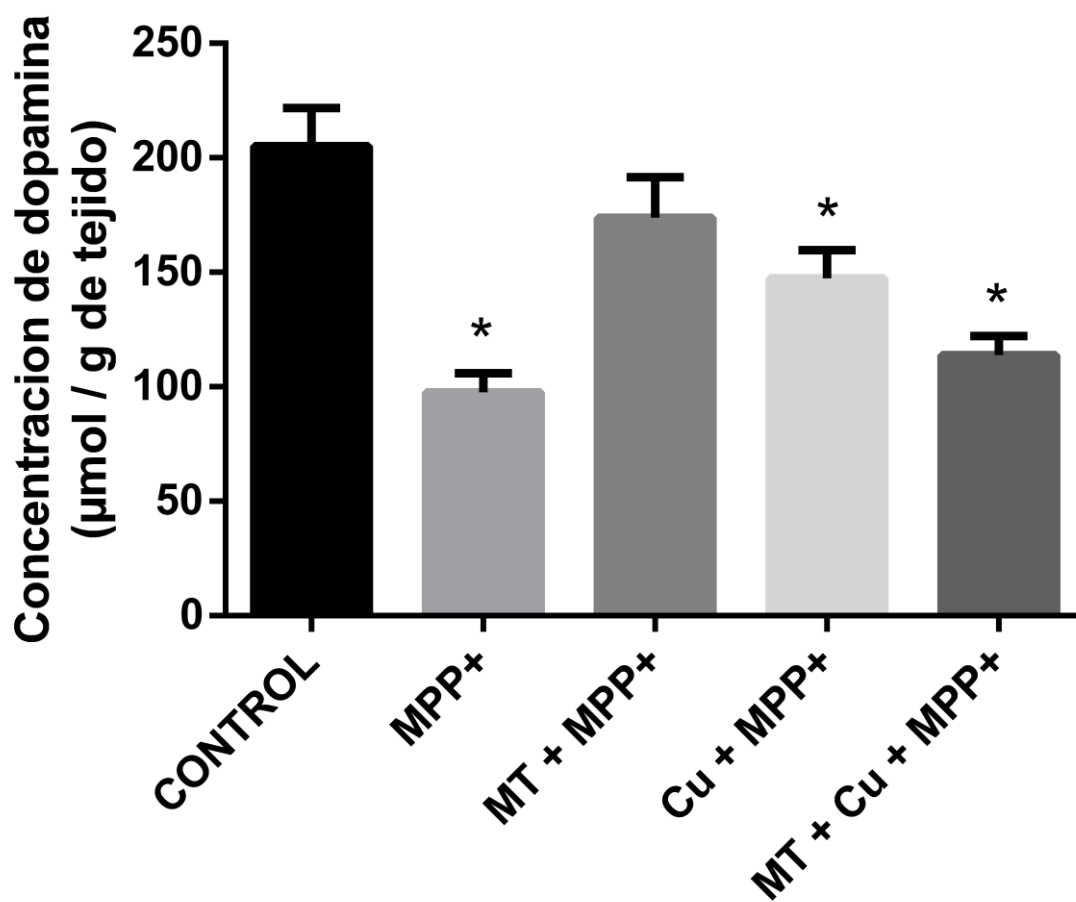


Figura 19. Se muestra el contenido promedio de DA estriatal (n= 4-6). Metalotioneína (MT), CuSO_4 (Cu), 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+). Para el análisis de los datos se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. (* $P < 0.05$ con respecto al grupo control).

Tabla 10. Resultados obtenidos para el análisis de dopamina estriatal. Para el análisis de los datos se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett (* $P < 0.05$ con respecto al grupo control).

CONCENTRACIÓN DE DOPAMINA ESTRIATAL			
Tratamiento	Animales	Media	Error estándar
CONTROL	8	205.18	16.58
MPP ⁺	4	97.56	8.32
MT + MPP ⁺	4	173.80	17.71
Cu + MPP ⁺	4	147.44	12.19
MT + Cu + MPP ⁺	4	113.83	8.38

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos tratados con MPP⁺; Cu + MPP⁺ y MT + Cu + MPP⁺ disminuyendo la concentración de DA al ser comparados con el grupo control. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett.

8. Discusión.

La investigación preclínica es una etapa importante en el desarrollo de nuevos tratamientos ya que, permite evaluar los efectos farmacológicos y tóxicos en animales de laboratorio. En el presente estudio se evaluó el efecto neuroprotector de la MT y de CuSO_4 administrados de manera individual y en combinación para el tratamiento de la EP en un modelo de administración intracerebroventricular de MPP^+ que reproduce los principales mecanismos de daño que se observan durante el progreso de esta enfermedad cuyas causas de origen aún siguen siendo desconocidas.

Aunque existen diversos factores involucrados en la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas, uno de los principales factores promotores de daño son las condiciones de estrés oxidante y generación de radicales libres. Los radicales libres generados por la reacción de Fenton están regulados por metales y metaloproteínas.

El Cu^{+2} , es un elemento traza esencial que es necesario para varios procesos biológicos importantes, sin embargo, un exceso de Cu^{+2} puede ser tóxico para las células. Por lo tanto, la homeostasis celular y sistémica de Cu^{+2} está fuertemente regulada, sin embargo, una desregulación de la homeostasis de Cu^{+2} puede ocurrir en estados de enfermedad, llevando a una deficiencia o exceso de Cu^{+2} y toxicidad. El Cu^{+2} participa en varias rutas fisiológicas incluyendo el metabolismo energético, defensas antioxidantes y metabolismo de hierro (Bulcke *et al.*, 2017).

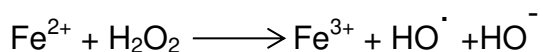
Las MT son una familia de proteínas capaces de unirse a metales intracelularmente, por lo tanto su principal función es regular el metabolismo de metales esenciales como Zn^{+2} y Cu^{+2} . Otra de sus funciones es la desintoxicación de metales pesados, regulación de la expresión genética, procesos de inflamación y protección contra radicales libres generados por el estrés oxidante (Juárez-Rebollar *et al.*, 2017).

La homeostasis del Cu^{+2} está controlada por las MT y por la actividad del transportador de Cu^{+2} . Se considera que el Cu^{+2} intracelular está ligado en gran parte y es intercambiable y transferido de proteína a proteína (Ward *et al.*, 2012).

El contenido total de Cu^{+2} se estima en 5.5 $\mu\text{g/g}$ de peso húmedo en ratones, no obstante, el cerebro es un órgano heterogéneo con diferencias fisiológicas y anatómicas específicas, las cuales varían en la concentración de Cu^{+2} . La acumulación de Cu^{+2} en el citosol puede generar toxicidad siempre y cuando este en forma libre, de cualquier forma, bajo condiciones fisiológicas, la concentración de Cu^{+2} se mantiene muy baja (10^{-18} M).

Esta concentración de Cu^{+2} libre se mantiene mediante la unión de este metal a diversas proteínas entre ellas a las MT y ligandos de baja masa molecular tal como glutatión; además, es probable que las mitocondrias contribuyan a la capacidad de amortiguamiento del Cu^{+2} celular ya que enzimas como la Citocromo C oxidasa requieren de este metal para su función (Bulcke *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración de la MT en combinación con el CuSO_4 , tienen un efecto pro-oxidante, esto se aprecia en el incremento en los productos finales de la lipoperoxidación así como como en la reducción en el contenido de DA estriatal; debido a que la MT al ser un péptido quelante de metales de transición secuestra al Cu^{+2} presente en el cerebro, esto puede traducirse en una disminución de dicho metal impidiendo que se incorpore en el retículo endoplásmico a las diversas cuproproteínas importantes para el correcto metabolismo de la célula entre las cuales se encuentra la citocromo C oxidasa (presente en el complejo IV mitocondrial) necesaria para una correcta síntesis de ATP, o la ceruloplasmina que, como se mencionó previamente es una cuproproteína que transforma el Fe^{2+} en Fe^{3+} (actividad ferro oxidasa) para que en este estado de oxidación el fierro pueda ser transportado al exterior del cerebro por los transportadores (ferritina y transferrina), ya que cuando el fierro está presente en altas concentraciones se favorece la producción de radicales libres. Se ha descrito que el fierro en presencia de peróxido de hidrógeno producen el radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton:



Cabe mencionar que este radical libre es altamente reactivo. Se sabe que una de las defensas antioxidantes que reducen su concentración es la MT, sin embargo;

es necesario que el cobre participe en la expresión de este péptido endógeno ya que el promotor del gen tiene un sitio de respuesta a metales, por lo que la reducción en la concentración de cobre podría estar inhibiendo la expresión y síntesis de la MT (Pedersen *et al.*, 2009), pudiendo ser este, uno de los mecanismos por los cuales la combinación de cobre y MT fueron pro-oxidantes. Así mismo, otra de las defensas antioxidantes que pudieran reducirse por una baja concentración de cobre es la Cu/ZnSOD la cual transforma el $\cdot\text{O}_2^*$ (superóxido) en peróxido de hidrógeno, favoreciendo un estado oxidativo (Davies *et al.*, 2014; Rubio-Osornio *et al.*, 2017).

Así mismo observamos una protección efectiva en la administración de MT y de Cu^{+2} de manera individual. Estos hallazgos son importantes debido a que se ha reportado una disminución del 50% en la concentración de Cu^{+2} en la *substantia nigra* y *locus coeruleus* en la EP (Bulcke *et al.*, 2017). Esta reducción en el contenido de Cu^{+2} de la *sustantia nigra* en la EP se ha discutido como factor para generar deterioro de las vías dependientes del Cu^{+2} , lo que contribuye a la patogénesis de la EP (Bulcke *et al.*, 2017). En apoyo de esta evidencia, la suplementación de CuSO_4 (Alcaraz-Zubeldia *et al.*, 2001a) ha demostrado ser neuroprotectora en modelos animales de EP, mientras que la quelación de Cu^{+2} no lo es (Youdim *et al.*, 2007).. Esto desencadena la aparición de diversas afecciones patológicas en humanos como el cáncer, la artritis, la distrofia muscular (DM), el Alzheimer y la EP (Maqsood *et al.*, 2015). Cuando las ROS generadas por metales se producen en una zona cercana a los fosfolípidos de la membrana se inicia la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos, y los hidroperóxidos lipídicos que son generados, se descompondrán para formar una variedad de derivados lipídicos α,β -insaturados y 4-hidroxialdehidos de los cuales los más abundantes son: 4-hidroxi-2-hexenal (HNE) y 4-hidroxi-2-hexenal (Ward., 2015).

La actividad de la SOD1 y la reducción en las ROS pueden ser normalizada por la suplementación de Cu^{+2} (Davies *et al.*, 2014). Por otra parte, se sabe que la EP es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la presencia de alteraciones motoras derivadas de la depleción de DA estriatal y la muerte de las neuronas

dopaminérgicas. El estrés oxidante ha estado implicado en el proceso neurodegenerativo de la EP.

El análisis de actividad locomotora espontánea en el reposo total indican un aumento en el tiempo de reposo en los animales tratados con MPP⁺, en la combinación de MPP⁺, MT y CuSO₄ y en la combinación MT y CuSO₄, esto indica que estas combinaciones no reducen los efectos provocados por la lipoperoxidación generada por la producción de ROS.

Por otro lado, se aprecian tendencias que indican una disminución en la distancia total recorrida en los animales que recibieron MT o CuSO₄ en combinación con MPP⁺ en comparación con el grupo control, sin embargo, la distancia total recorrida tiene una tendencia a incrementarse con respecto al grupo que solo recibió MPP⁺. La combinación de estos dos estudios de movimiento podría ser un reflejo de la bradicinesia característica de la EP.

De acuerdo con Alcaraz-Zubeldia *et al.*, (2009), ha sido demostrado que la administración intracerebroventricular de MPP⁺ reduce la actividad locomotora espontánea en ratones, mientras que la actividad locomotora espontánea se ve incrementada con la exposición a CuSO₄, lo cual podría estar relacionada con un incremento en la concentración de DA. Por otro lado, el estudio realizado por Sgroi *et al.*, (2014) reveló que la distancia total recorrida se ve reducida en animales tratados con 6-OHDA y al ser administrados con L-DOPA pasaban a un estado de excitación e hiperactividad en la actividad locomotora. Esto revela el impacto del déficit de DA en el movimiento. No obstante, la química oxidativa de la DA puede conducir a la formación de radicales libres y especies reactivas de quinona. Dichas quinonas derivadas de la DA pueden reaccionar con varios objetivos celulares que podrían fomentar los procesos implicados en la patogénesis de la EP y contribuir a la progresión del trastorno (Ward *et al.*, 2015).

La reducción en la distancia total recorrida, así como el aumento en el tiempo total de reposo se explica por medio del modelo fisiológico del circuito de los ganglios basales. La lesión neuroquímica fundamental en la EP clásica es la deficiencia de DA en el sistema extrapiramidal (caudado y putamen). En esta región del cerebro, la DA aumenta la excitabilidad de las áreas motoras de la corteza cerebral y

aumenta el movimiento. Una vez que se pierden las neuronas dopaminérgicas ganglionares basales, el córtex motor y premotor se vuelven menos excitables y disminuyen el movimiento espontáneo (Dorman., 2015). La pérdida dopaminérgica temprana causa una mayor actividad de STN, que a su vez aumenta la excitación y la lesión en el SNc. Este proceso puede tener un efecto tóxico similar en las otras proyecciones del STN al GPi, SNr y PPN. Esto ha sido respaldado en modelos de roedores que demuestran que la ablación de STN previa tiene un efecto protector sobre el SNc de las toxinas mitocondriales que causan atrofia dopaminérgica (Hodaie., *et al.*, 2017).

El presente modelo fisiopatológico de los ganglios basales predice que la deficiencia de DA conduce a efectos opuestos sobre subconjuntos de neuronas eferentes estriatales como resultado de los patrones de expresión del receptor dopaminérgico. Las neuronas GABA espinosas medianas, que en su mayoría expresan receptores D2 y se proyectan hacia el GPe, se vuelven hiperactivas, mientras que las neuronas que expresan principalmente receptores D1 y proyectan al GPi se vuelven poco activas. El aumento de la actividad de las neuronas GABA que se proyectan a la GPe (la "vía indirecta") conduce a la inhibición excesiva de la GPe, que a su vez da como resultado la desinhibición del núcleo subtalámico (Hodaie, *et al.*, 2017).

La vía directa o excitadora está conformada por neuronas del cuerpo estriado proyectadas hacia la SNr y la parte medial del globo pálido. Esta vía es activada por el glutamato y la DA y resulta en la inhibición de la parte medial del globo pálido, que, a su vez, desinhibe los núcleos talámicos ventral lateral y ventral anterior.

Como resultado, la vía tálamo-cortical incrementa su actividad y los movimientos iniciados corticalmente son facilitados. El circuito indirecto o inhibitorio está compuesto por neuronas estriatales desde el putamen, que contienen GABA, proyectadas hacia la parte lateral del globo pálido. La inhibición de la parte lateral del globo pálido ocasiona la desinhibición del núcleo subtalámico. El resultado es la inhibición talámica que reduce el estímulo tálamo-cortical a las áreas motoras precentrales e impide el movimiento voluntario (Albin, *et al.*, 1989).

La hiperactividad del núcleo subtalámico que conduce a una producción inhibitoria excesiva del GPi y de la SNr a la corteza (a través del tálamo) y los sistemas motores del tallo cerebral- se considera el sello fisiopatológico del estado parkinsoniano (Lang y Obeso, 2004); por lo tanto, se sugiere que en el modelo putativo de la función de los ganglios basales conduce a una hiperactividad relativa en los núcleos que comprenden la "vía indirecta", reduce el tono talamocortical y produce la relativa escasez de movimiento observada en la EP (Hodaie, *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos del análisis de tejido estriado muestran una disminución en el contenido de DA estriatal en los grupos que recibieron la combinación de MT y CuSO₄, con o sin MPP⁺, lo que implica una pérdida de células dopaminérgicas. Tomando en cuenta el incremento de productos de lipoperoxidacion en esos tratamientos se confirma su incompatibilidad de manera coherente a los hallazgos de los estudios realizados por Alcaraz-Zubeldia *et al.*, (2001b) en sus estudio acerca del efecto neuroprotector del Cu⁺², y es además congruente con los estudios realizados por Kondo, *et al* (1997) y Montes, *et al.*, (2017) en los protocolos experimentales realizados dirigidos a demostrar el papel neuroprotector y antioxidante de las MT.

9. Conclusión.

En este estudio pudimos observar que la MT reduce la peroxidación lipídica de igual forma que el CuSO₄, tanto en tejido sano como en el administrado con MPP⁺, mientras que la combinación de estos tratamientos es prooxidante al incrementar la cantidad de productos finales de la lipoperoxidación.

El MPP⁺ reduce la actividad locomotora espontánea y la combinación de tratamientos con MT + CuSO₄ no revierte esta alteración conductual, sin embargo, la administración de dichos tratamientos por separado mejoró el desempeño funcional al observarse en los animales una mayor actividad motora.

En los animales con MPP⁺ sin tratamiento se pudo observar una reducción en el contenido de DA estriatal el cual no fue revertido por el tratamiento combinado de MT + CuSO₄, mientras que la administración de MT revirtió este efecto y el CuSO₄ restauró de manera parcial el contenido de dicho neurotransmisor.

Con los hallazgos de este proyecto se concluye que la administración de MT y CuSO₄ tienen efecto neuroprotector sólo cuando se administran de manera independiente, ya que la combinación no mostró algún beneficio terapéutico después de la administración del MPP⁺ en el efecto antioxidante, en el desempeño funcional ni protección contra la disminución del contenido de DA estriatal.

10. Referencias.

- Ahmadinejad, F., Geir Moller, S., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhor, G., & Jami, M. S. (2017). Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel)*, 6(3). doi:10.3390/antiox6030051.
- Albin, Roger L., Young, Anne B., & Penney, John B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366-375. doi:https://doi.org/10.1016/0166-2236(89)90074-X
- Alcaraz-Zubeldia, M., Rojas, P., Boll, C., & Rios, C. (2001a). Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP⁺ neurotoxicity in mice. *Neurochem Res*, 26(1), 59-64.
- Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., & Rios, C. (2001b). Participation of manganese-superoxide dismutase in the neuroprotection exerted by copper sulfate against 1-methyl 4-phenylpyridinium neurotoxicity. *Brain Res Bull*, 55(2), 277-279.
- Alcaraz-Zubeldia, M., Boll-Woehrlén, M. C., Montes-Lopez, S., Perez-Severiano, F., Martínez-Lazcano, J. C., Díaz-Ruiz, A., & Rios, C. (2009). Copper sulfate prevents tyrosine hydroxylase reduced activity and motor deficits in a Parkinson's disease model in mice. *Rev Invest Clin*, 61(5), 405-411.
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*, 13(7), 266-271.
- Alves da Costa C., Dunys J, Brau F, Wilk S, Cappai R, Checler F. 6-Hydroxydopamine but not 1-methyl-4-phenylpyridinium abolishes alpha-synuclein anti-apoptotic phenotype by inhibiting its proteasomal degradation and by promoting its aggregation. *J Biol Chem* 2006;281:9824–31
- Ambjorn, M., Asmussen, J. W., Lindstam, M., Gotfryd, K., Jacobsen, C., Kiselyov, V. V., Berezin, V. (2008). Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J Neurochem*, 104(1), 21-37. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05036.x

- Arellano-Ruiz, S., Rios, C., Salgado-Ceballos, H., Mendez-Armenta, M., Del Valle-Mondragon, L., Nava-Ruiz, C., . . . Diaz-Ruiz, A. (2012). Metallothionein-II improves motor function recovery and increases spared tissue after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*, *514*(1), 102-105.
- Arnal, N., Cristalli, D. O., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2010). Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res*, *1319*, 118-130. doi:10.1016/j.brainres.2009.11.085
- Baena-Trujillo, R. B. T. Ricardo, Flores, G. F. Gonzalo, & Arias-Montaña, J. A. A. M. Jose A.. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.. *Biomed*, *11*(1), 39-60.
- Bhattacharyya, S., & Saha, J. (2015). Tumour, Oxidative Stress and Host T Cell Response: Cementing the Dominance. *Scand J Immunol*, *82*(6), 477-488. doi:10.1111/sji.12350
- Belluzzi, E., Bisaglia, M., Lazzarini, E., Tabares, L. C., Beltramini, M., & Bubacco, L. (2012). Human SOD2 modification by dopamine quinones affects enzymatic activity by promoting its aggregation: possible implications for Parkinson's disease. *PLoS One*, *7*(6), e38026.
- Boll, M. C., Sotelo, J., Otero, E., Alcaraz-Zubeldia, M., & Rios, C. (1999). Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, *265*(3), 155-158.
- Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., & Rios, C. (2008). Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, *33*(9), 1717-1723. doi:10.1007/s11064-008-9610-3
- Bove, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, *211*, 51-76. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.10.057
- Bose, A., & Beal, M. F. (2016). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem*, *139* Suppl 1, 216-231. doi:10.1111/jnc.13731

- Braungart, E., Gerlach, M., Riederer, P., Baumeister, R., & Hoener, M. C. (2004). Caenorhabditis elegans MPP⁺ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener Dis*, 1(4-5), 175-183. doi:10.1159/000080983
- Bulcke, F., Dringen, R., & Scheiber, I. F. (2017). Neurotoxicity of Copper. *Adv Neurobiol*, 18, 313-343. doi:10.1007/978-3-319-60189-2_16
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(3), 287–299. <http://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
- Chiueh CC., Markey SP, Burns RS, Johannessen JN, Jacobowitz DM, Kopin IJ. Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol Bull* 1984;20:548–53.
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889-909.
- Davies, K. M., Bohic, S., Carmona, A., Ortega, R., Cottam, V., Hare, D. J., . . . Double, K. L. (2014). Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 35(4), 858-866. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.034
- Dawson TM., Seok KH., Dawson LV. (2010). Genetic Animal Models of Parkinson's disease. *Neuron*. 66: 646-661.
- De la Fuente, M., Hernanz, A., & Vallejo, M. C. (2005). The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Signal*, 7(9-10), 1356-1366. doi:10.1089/ars.2005.7.1356
- Devos, D., Moreau, C., Devedjian, J. C., Kluza, J., Petrault, M., Laloux, C., Bordet, R. (2014). Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 21(2), 195-210.
- Distelmaier., Felix., Koopman., Werner J. H., van den Heuvel, Lambertus P., Rodenburg, Richard J., Mayatepek, Ertan, Willems, Peter H. G. M., & Smeitink, Jan A. M. (2009). Mitochondrial complex I deficiency: from

- organelle dysfunction to clinical disease. *Brain*, 132(4), 833-842.
doi:10.1093/brain/awp058
- Dorman, D. (2015). Extrapyramidal system neurotoxicity: animal models. *Handb Clin Neurol*, 131, 207-223. doi:10.1016/b978-0-444-62627-1.00012-3
- Duty S., Jenner P., (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British J. of Pharmacology*. 164: 1357-1391.
- Ebadi, M., & Sharma, S., (2006). Metallothioneins 1 and 2 attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(9), 1576-1583.
- Gibb, W. R., & Lees, A. J., (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(6), 745-752.
- Gitlin, J. D., Schroeder, J. J., Lee-Ambrose, L. M., & Cousins, R. J. (1992). Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J*, 282 (Pt 3), 835-839.
- Graham, D. G. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol*, 14(4), 633-643.
- Gumulec, J., Raudenska, M., Hlavna, M., Stracina, T., Sztalmachova, M., Tanhauserova, V. (2013). Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in guinea pigs treated with haloperidol. *Exp Ther Med* 5:479-84
- Hamani, C., & Lozano, A. M. (2003). Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 15-21.
- Hertzman, C., Wiens, M., Bowering, D., Snow, B., & Calne, D. (1990). Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med*, 17(3), 349-355.
- Hodaie, M., Neimat, J. S., & Lozano, A. M. (2007). The dopaminergic nigrostriatal system and Parkinson's disease: molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. *Neurosurgery*, 60(1), 17-28; discussion 28-30. doi:10.1227/01.neu.0000249209.11967.cb

- Hughes, A. J., Ben-Shlomo, Y., Daniel, S. E., & Lees, A. J. (1992). What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology*, 42(6), 1142-1146.
- Hsu, H. W., Bondy, S. C., & Kitazawa, M. (2018). Environmental and dietary exposure to copper and its cellular mechanisms linking to Alzheimer disease. *Toxicol Sci.* doi:10.1093/toxsci/kfy025
- Iravani, M. M., & Jenner, P. (2011). Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. *J Neural Transm (Vienna)*, 118(12), 1661-1690..
- Jackson-Lewis, V., Blesa, J., Przedborski, S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* Suppl 1:S183-5.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 79(4), 368-376.
- Jenner, P., Schapira, A. H., & Marsden, C. D. (1992). New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology*, 42(12), 2241-2250.
- Juarez-Rebollar D., y Méndez-Armenta M. (2014). Aspectos funcionales de la metalotioneína en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién.* 19(1): 34-41.
- Juarez-Rebollar, D., Rios, C., Nava-Ruiz, C., & Mendez-Armenta, M. (2017). Metallothionein in Brain Disorders. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 5828056. doi:10.1155/2017/5828056
- Kondo, Y., Rusnak, J. M., Hoyt, D. G., Settineri, C. E., Pitt, B. R., & Lazo, J. S. (1997). Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol Pharmacol*, 52(2), 195-201.
- Lang, Anthony E., & Obeso, Jose A. (2004). Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *The Lancet Neurology*, 3(5), 309-316. doi:https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00740-9
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219 (4587), 979-980.

- Larner, F., Sampson, B., Rehkemper, M., Weiss, D. J., Dainty, J. R., O'Riordan, S., Bain, P. G. (2013). High precision isotope measurements reveal poor control of copper metabolism in parkinsonism. *Metallomics*, 5(2), 125-132.
- Leal, P.C., Lins, L.C., De Gois, A.M., Marchioro, M., y Santos, J.R. (2016). Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. *Front Neurosci.* 21;10:283.
- Leao, A.H., Sarmiento-Silva, A.J., Santos, J.R., Ribeiro, A.M., y Silva, R.H. (2015). Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathol.* 25(4):377-90.
- Lee, C. S., Sauer, H., & Bjorklund, A. (1996). Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Neuroscience*, 72(3), 641-653.
- Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 23:1493-501
- Maqsood, Syed Raashid, Khan, Badruddin, Bhat, Mohsin Ahmad, Dar, Tanveer Ali, & Mir, Syed Hussain. (2015). Targeting copper induced oxidative damage to proteins by ligation: a novel approach towards chelation therapy for oxidative stress disorders. *New Journal of Chemistry*, 39(4), 2720-2727. doi:10.1039/C4NJ02073A
- Martinez-Hernandez, R., Montes, S., Higuera-Calleja, J., Yescas, P., Boll, M. C., Diaz-Ruiz, A., & Rios, C. (2011). Plasma ceruloplasmin ferroxidase activity correlates with the nigral sonographic area in Parkinson's disease patients: a pilot study. *Neurochem Res*, 36(11), 2111-2115.
- Mané, Anna. (2013). Transportador de la DA (DAT) y pronóstico de la esquizofrenia: Estudio prospectivo de una cohorte evaluada mediante DaTSCAN, RM volumétrica y el polimorfismo -67 A/T del gen del DAT. *Psiqu. Biol.*, 20(1), 18-19. doi:10.1016/j.psiq.2013.06.004

- Montes, S., Rivera-Mancia, S., Diaz-Ruiz, A., Tristan-Lopez, L., & Rios, C. (2014). Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 147251.
- Nandipati, S., y Litvan, I. (2016). Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *Int J Environ Res Public Health*. 3;13(9).
- Nielsen, A. E., Bohr, A., & Penkowa, M. (2007). The Balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneins. *Biomark Insights*, 1, 99-111.
- Norazit, A., Meedeniya, A.C., Nguyen, M.N., Mackay-Sim, A. (2010). Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res*. 1360:119-29.
- Pedersen Mie, Rikke, Jensen, S., Pedersen Dan, D., Skjolding Anders, Casper, Hempel, Lasse, Maretty, & Milena, Penkowa. (2009). Metallothionein-I+II in neuroprotection. *Biofactors*, 35(4), 315-325. doi:doi:10.1002/biof.44
- Penkowa, M., Florit, S., Giralt, M., Quintana, A., Molinero, A., Carrasco, J., & Hidalgo, J. (2005). Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *J Neurosci Res*, 79(4), 522-534. doi:10.1002/jnr.20387
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., . . . Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17013. doi:10.1038/nrdp.2017.13
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*, 29(13), 1583-1590.
- Raudenska, M., Gumulec, J., Babula, P., Stracina, T., Sztalmachova, M., Polanska, H., y et al., (2013). Cytotoxicity and Its Relations to Oxidative Stress. *Mini Rev Med Chem*. 13:1993-1998.
- Rivera-Mancia, S., Perez-Neri, I., Rios, C., Tristan-Lopez, L., Rivera-Espinosa, L., & Montes, S. (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem Biol Interact*, 186(2), 184-199.

- Rojas, P., Hidalgo, J., Ebadi, M., & Rios, C. (2000). Changes of metallothionein I + II proteins in the brain after 1-methyl-4-phenylpyridinium administration in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 24(1), 143-154.
- Rubio-Osornio, M., Montes, S., Perez-Severiano, F., Aguilera, P., Floriano-Sanchez, E., Monroy-Noyola, A., . . . Rios, C. (2009). Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP⁺ in rats. *Neurochem Int*, 54(7), 447-451. doi:10.1016/j.neuint.2009.01.019
- Ruttikay-Nedecky, B., Nejdl, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., . . . Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 14(3), 6044-6066. doi:10.3390/ijms14036044
- Santos, C. R., Martinho, A., Quintela, T., & Goncalves, I. (2012). Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life*, 64(2), 126-135.
- Sato, M., & Gitlin, J. D. (1991). Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem*, 266(8), 5128-5134.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54(3), 823-827.
- Sgroi, S., Kaelin-Lang, A., & Capper-Loup, C. (2014). Spontaneous locomotor activity and L-DOPA-induced dyskinesia are not linked in 6-OHDA parkinsonian rats. *Front Behav Neurosci*, 8, 331. doi:10.3389/fnbeh.2014.00331}
- Shiva, S., Wang, X., Ringwood, L. A., Xu, X., Yuditskaya, S., Annavajjhala, V., . . . Gladwin, M. T. (2006). Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat Chem Biol*, 2(9), 486-493.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. 2006. Basic Neurochemistry: Molecular, Cell and Med. Asp.. 7th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven
- Stayte, S., & Vissel, B. (2014). Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. *Front Neurosci*, 8, 113.

- Stojkovska, I., Wagner, B.M., Morrison, B.E. (2015). Parkinson's disease and enhanced inflammatory response. *Exp Biol Med* (Maywood). (11):1387-95.
- Surmeier, D. J., Graves, S. M., & Shen, W. (2014). Dopaminergic modulation of striatal networks in health and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 29, 109-117.
- Swalwell, H., Kirby, D. M., Blakely, E. L., Mitchell, A., Salemi, R., Sugiana, C., ... Thorburn, D. R. (2011). Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations. *European Journal of Human Genetics*, 19(7), 769–775. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2011.18>
- Texel, S. J., Xu, X., & Harris, Z. L. (2008). Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 6), 1277-1281.
- Tisch, S., Silberstein, P., Limousin-Dowsey, P., & Jahanshahi, M. (2004). The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatr Clin North Am*, 27(4), 757-799. doi:10.1016/j.psc.2004.06.004
- Touchette, J. C., Breckenridge, J. M., Wilken, G. H., & Macarthur, H. (2016). Direct intranigral injection of dopaminochrome causes degeneration of dopamine neurons. *Neurosci Lett*, 612, 178-184.
- Tsika, E., Nguyen, A. P., Dusonchet, J., Colin, P., Schneider, B. L., & Moore, D. J. (2015). Adenoviral-mediated expression of G2019S LRRK2 induces striatal pathology in a kinase-dependent manner in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 77, 49-61. doi:10.1016/j.nbd.2015.02.019
- Van der Mark, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., y Vermeulen, R. (2012). Is Pesticide use related to Parkinson Disease? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environ Health Persp*.120(3): 340-47.
- Wang, G.-J., Volkow, N. D., Thanos, P. K., & Fowler, J. S. (2009). Imaging of Brain Dopamine Pathways: Implications for Understanding Obesity. *Journal of Addiction Med.*, 3(1), 8–18. <http://doi.org/10.1097/ADM.0b013e31819a86f7>
- Wanpen, S., Govitrapong, P., Shavali, S., Sangchot, P., & Ebadi, M. (2004). Salsolinol, a dopamine-derived tetrahydroisoquinoline, induces cell death by causing oxidative stress in dopaminergic SH-SY5Y cells, and the said effect

- is attenuated by metallothionein. *Brain Res*, 1005(1-2), 67-76. doi:10.1016/j.brainres.2004.01.054
- Ward, R. J., Dexter, D. T., & Crichton, R. R. (2015). Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators. *J Trace Elem Med Biol*, 31, 267-273. doi:10.1016/j.jtemb.2014.12.012
- Ward, R. J., Dexter, D. T., & Crichton, R. R. (2012). Chelating agents for neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem*, 19(17), 2760-2772.
- Winklhofer, K. F., & Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1802(1), 29-44.
- Wirenfeldt A. J., Ambjørn M., Bock E., Berezin V.. (2009). Peptides modeled after the a-domain of metallothionein induce neurite outgrowth and promote survival of cerebellar granule neurons. *European J. of Cell Biol.*, 88, 433–443.
- Xiong, N., Xiong, J., Jia, M., Liu, L., Zhang, X., Chen, Z., Huang, J., Zhang, Z., Hou, L., Luo, Z., Ghoorah, D., Lin, Z., Wang, T. (2013). The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behav Brain Funct.* 15;9:13.
- Youdim, M. B., Grunblatt, E., & Mandel, S. (2007). The copper chelator, D-penicillamine, does not attenuate MPTP induced dopamine depletion in mice. *J Neural Transm (Vienna)*, 114(2), 205-209. doi:10.1007/s00702-006-0499-1
- Zatta, P., Drago, D., Zambenedetti, P., Bolognin, S., Nogara, E., Peruffo, A., & Cozzi, B. (2008). Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging. *J Chem Neuroanat*, 36(1), 1-5. doi:10.1016/j.jchemneu.2008.02.008
- Zuo, L., & Motherwell, M. S. (2013). The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene*, 532(1), 18-23. doi:10.1016/j.gene.2013.07.085

ANEXO 1.

Validación parcial del método de análisis de catecolaminas por HPLC, acorde a las indicaciones estipuladas en la NOM-177-SSA1-2013.

Los resultados de la linealidad del análisis de DA por el método de CLAR se realizaron obteniendo el área de los cromatogramas en tres diferentes curvas de calibración realizadas el mismo día. El intervalo de cuantificación fue de 100 nM a 3200 nM con 4 lecturas repetidas de los puntos intermedios de 2400, 600 y 300 nM, ver tabla 1.

Tabla 1. Concentración de las curvas de calibración con las áreas de los cromatogramas obtenidas. ABC: promedio del área bajo la curva, DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

C. del estándar	ABC	DE	CV
3200	1347.05	0.64	0.05
2400	1038.33	6.16	0.59
1600	689.10	5.91	0.86
800	344.70	2.11	0.61
600	260.80	2.38	0.91
400	173.46	4.62	2.66
300	126.50	1.31	1.04
200	88.06	2.15	2.44
140	61.60	1.18	1.91
100	44.30	0.75	1.70

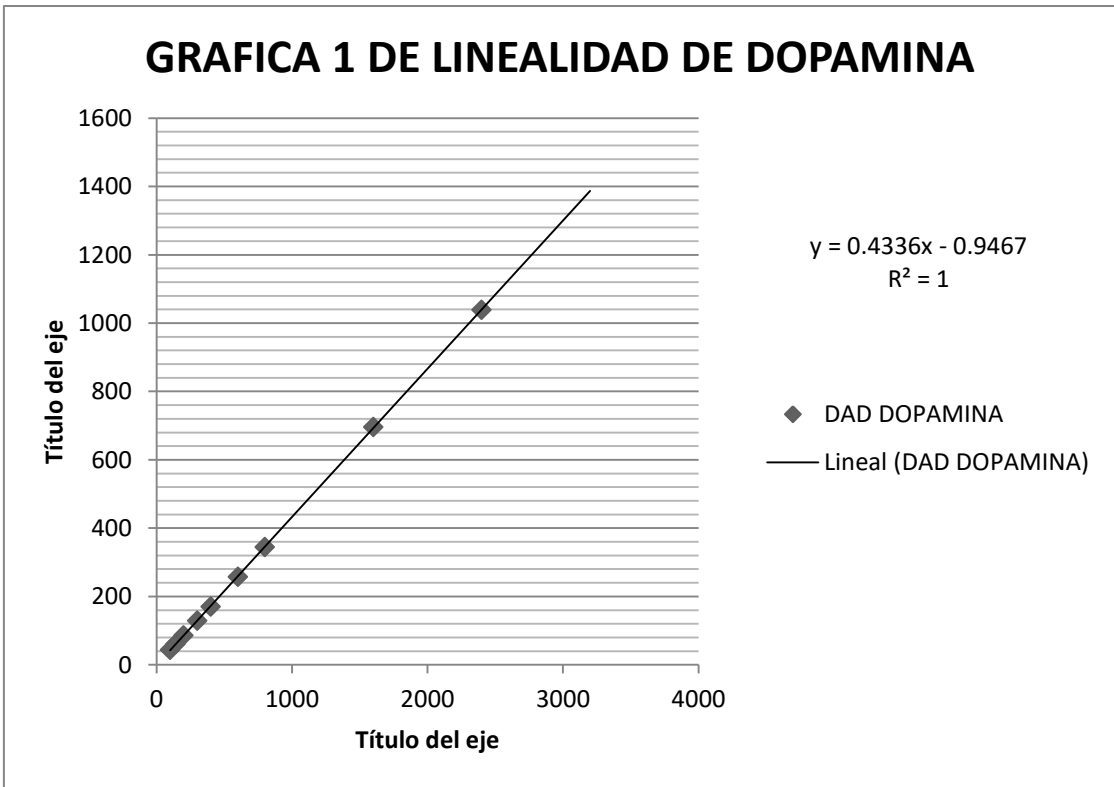


Figura 1. Linealidad de las área 1 de los cromatogramas de dopamina.

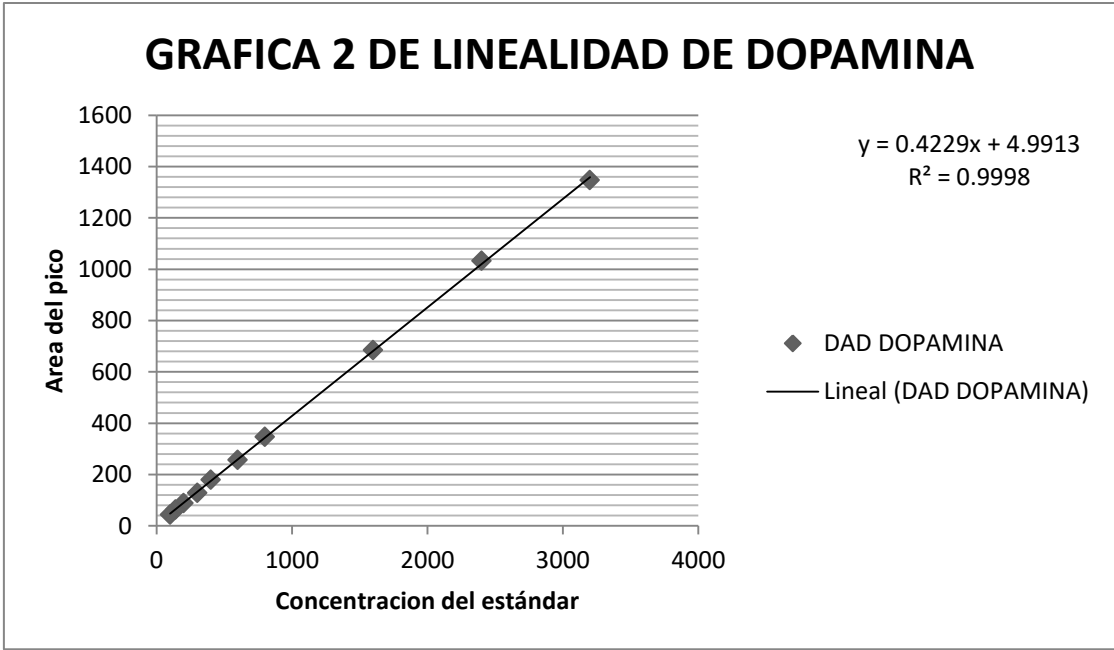


Figura 2. Linealidad del área 2 de los cromatogramas de dopamina.

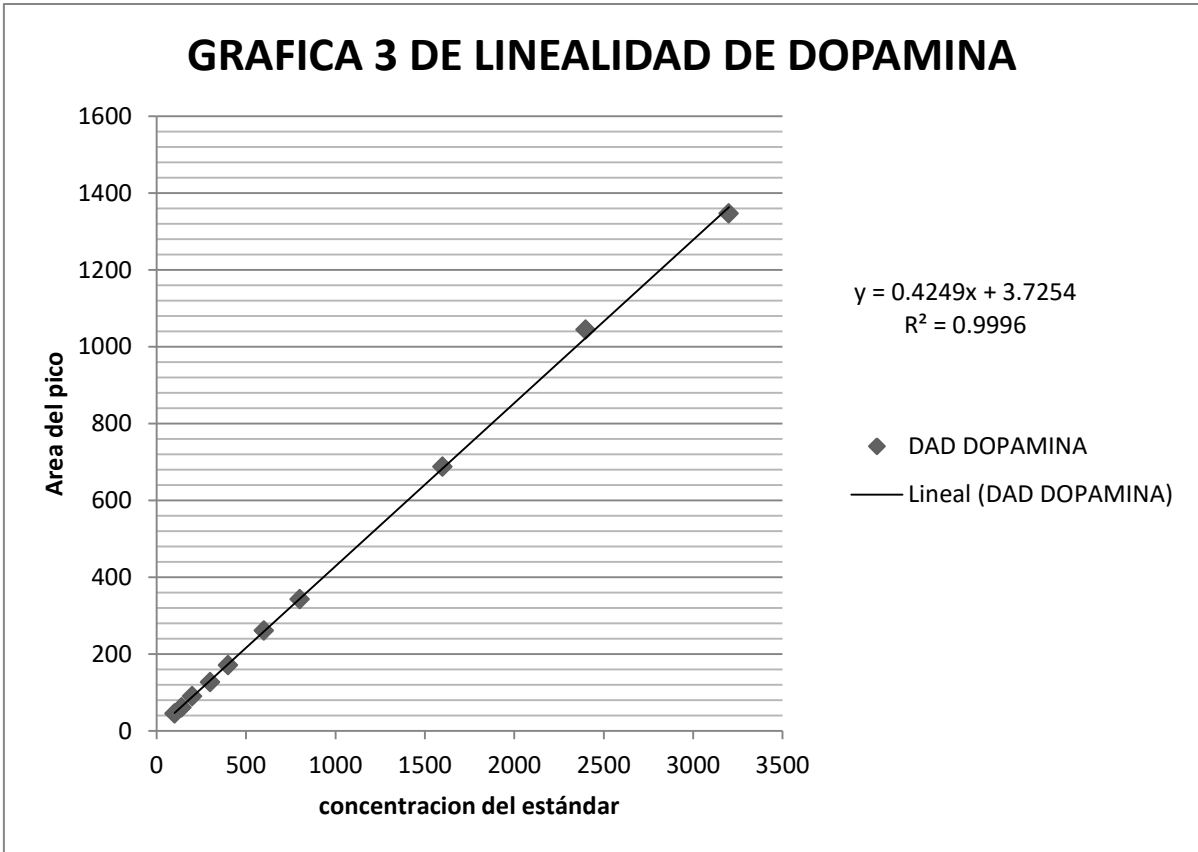


Figura 3. Linealidad del área bajo la curva de los cromatogramas de dopamina.

La repetibilidad y estabilidad consistió en realizar 4 lecturas cromatográficas en días diferentes con estándar recién preparado y con estándar de 24 horas, 4 días y 10 días de antigüedad en concentraciones intermedias de: 2400, 600, 300 y 140 nM, se obtuvo el área bajo la curva y se promedió, posteriormente se calcularon el porcentaje de desviación estándar absoluto con respecto al valor nominal y el coeficiente de variación y la desviación estándar de los estándares con diferente tiempo de envejecimiento y se compararon los datos obtenidos a partir del estándar recién preparado.

Tabla 2. Repetibilidad de los estándares de dopamina con preparado antes del análisis. Se muestra la concentración de los estándares y el área del cromatograma obtenido, la concentración obtenida del promedio del área, el porcentaje de la desviación estándar (%DEA), promedio del área bajo la curva (ABC), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV).

Análisis del Día 1				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	2428.25	1.18	12.71	0.52
600	593.80	-1.03	3.27	0.55
140	129.97	-7.17	4.02	3.09
Análisis del día 2				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	2386.50	-0.56	10.13	0.42
600	609.99	1.67	2.57	0.42
140	146.80	4.86	5.06	3.45
Evaluación de los dos días				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	2407.37	0.31	24.72	1.03
600	601.90	0.32	9.07	1.51
140	138.39	1.15	9.95	7.19

Estabilidad de los estándares.

La estabilidad consistió en realizar 4 lecturas cromatográficas en días diferentes con estándar recién preparado, con estándar de 24 horas, 4 días y 10 días de antigüedad en concentraciones intermedias de: 2400, 600, 300 y 140 nM, se obtuvo el área bajo la curva y se obtuvieron: el porcentaje de desviación absoluto y el coeficiente de variación con respecto al estándar recién preparado.

Tabla 3. Estabilidad del estándar de dopamina preparado antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR FRESCO				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	998.08	-0.57	4.25	0.43
600	252.48	1.64	1.08	0.43
300	121.15	-0.98	0.44	0.37
140	58.08	4.64	2.13	3.66

Tabla 4. Estabilidad del estándar de dopamina preparado 24 horas antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR 24 HORAS				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	981.45	-2.26	1.81	0.18
600	239.20	-3.74	0.89	0.37
300	115.50	-5.77	1.15	0.99
140	53.23	-3.51	1.95	3.67

Tabla 5. Estabilidad del estándar de dopamina preparado 4 días antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR 4 DÍAS				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	1020.85	1.67	1.88	0.18
600	257.23	3.43	2.20	0.86
300	120.48	-1.53	1.55	1.29
140	61.60	9.80	2.17	3.52

Tabla 6. Estabilidad del estándar de dopamina preparado 4 días antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR 10 DÍAS				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	963.50	-4.16	2.56	0.27
600	236.33	-4.98	1.69	0.72
300	113.03	-8.02	0.89	0.79
140	54.73	-0.85	0.85	1.56

Tabla 7. Estabilidad del estándar de dopamina preparado antes del análisis comparado con el estándar preparado 24 horas antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR FRESCO VS ESTÁNDAR 24 HORAS				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	989.76	-1.41	9.39	0.95
600	245.84	-0.98	7.15	2.91
300	118.33	-3.32	3.13	2.64
140	55.65	0.73	3.21	5.76

Tabla 8. Estabilidad del estándar de dopamina preparado antes del análisis comparado con el estándar preparado 4 días antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR FRESCO VS ESTÁNDAR 4 DÍAS				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	1012.91	0.90	11.87	1.17
600	255.95	2.96	3.21	1.25
300	120.86	-1.21	1.12	0.93
140	60.86	8.76	2.88	4.74

Tabla 9. Estabilidad del estándar de dopamina preparado antes del análisis comparado con el estándar preparado 10 días antes del análisis. Se muestra la concentración del estándar, el promedio del área bajo la curva obtenido (ABC), porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV).

ESTÁNDAR FRESCO VS ESTÁNDAR 10 DÍAS				
C. del estándar	ABC	%DEA	DE	CV
2400	984.24	-1.97	23.70	2.41
600	245.50	-1.12	10.19	4.15
300	117.14	-4.34	4.44	3.79
140	57.43	3.62	3.79	6.59

El método cumple con los parámetros de linealidad en el intervalo de trabajo seleccionado ($r^2 = 0.99$) precisión y exactitud al obtenerse coeficientes de variación y porcentaje de desviación absoluta con respecto al valor nominal de los puntos de concentración evaluados menores al 15% en todos los casos y conforme a la NOM-0177-SSA1-2013. Los estándares de DA preparados para la validación fueron estables a 1,4 y 10 días conservados a 4°C