



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Informe final del proyecto de servicio social:

**CUANTIFICACIÓN PLASMÁTICA Y DISTRIBUCIÓN DEL COBRE EN UN
SISTEMA BIOLÓGICO, MEDIANTE SU ADMINISTRACIÓN COMO
ESTRUCTURA METAL ORGÁNICA (MOF)**

Proyecto genérico:

Modificaciones físicas de fármacos y desarrollo de medicamentos.


Lugar de realización: Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106), Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicio de UAMX


Periodo: 24 de noviembre de 2022 al 24 de mayo de 2023

Alumna:

Tania Elizabeth Adame Vázquez

Matrícula: 2182030988

Asesor Interno: Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda (Núm. Eco 8351). Vo.Bo 

Asesor Externo: Dr. Javier Águila Rosas (Núm. Eco 43870). Vo.Bo 

Ciudad de México, agosto de 2023

Índice

Glosario de términos

1. Glosario	4
2. Introducción	5
3. Antecedentes	6
2.1. Mecanismos de captación, distribución y eliminación del cobre en la célula....	6
4. Objetivo general	9
5. Objetivos específicos	9
4.1. Recopilación de información.....	9
4.2. Administración por vía oral	9
4.3. Aplicación de técnicas de disección.....	9
4.4. Comprobación del método analítico.....	9
4.5. Determinación de la cantidad de cobre.....	9
6. Materiales	9
5.1. Lugar de realización	10
5.2. Consideraciones éticas	10
7. Metodología	10
6.1. Investigación bibliográfica.	10
6.2. Administración vía oral mediante una cánula esofágica para dosificación	10
6.3. Extracción del tejido seleccionado.....	11
6.3.1. Extracción de plasma por medio del método punción cardíaca	11
6.3.2. Extracción del tejido por medio de la técnica de disección	11
6.4. Cuantificación de cobre mediante la Aplicación de la espectroscopia de absorción atómica (AAS)	12
8. Resultados, discusión y metas alcanzadas	13

7.1. Revisión bibliográfica	13
7.2. Administración vía oral	14
7.3. Disección de tejidos seleccionados.....	14
7.4. Cuantificación de Cu mediante un método analítico.....	15
7.5. Determinación de la concentración de Cu por Espectroscopia de Absorción Atómica (AAS).....	15
7.5.1. Cuantificación de cobre en plasma.....	16
7.5.2. Cuantificación de cobre en tejido cerebral: mesencéfalo y estriado	18
7.5.3. Hígado como principal órgano de detoxificación	20
7.5.4. Cuantificación de cobre en otros órganos de depuración.....	21
7.5.5. Comparación de la concentración de cobre entre la primera y segunda dosificación.....	23
9. Conclusiones.....	27
10. Perspectivas	28
11. Referencias	29

Glosario de términos

ATP7B: Gen que codifica para la síntesis del polipéptido beta de la ATPasa transportadora de cobre.

ATX1: Metalochaperona del gen atx1 (*S. cerevisiae*) de acción antioxidante.

ATOX1: Metalochaperona antioxidante 1 de cobre.

ANOVA: Análisis de Varianza

AUC: Área bajo la curva.

CCS: Proteína metalochaperona responsable del transporte celular de metales: Cu.

COX: Citocromo C oxidasa

Cp: Ceruloplasmina

Ctr1: Proteína transportadora de Cu.

RE: Retículo endoplásmico

SOD: Superóxido dismutasa

1. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es una condición crónica asociada con la edad; es el segundo trastorno neurodegenerativo más común y afecta a una fracción importante de la población mundial. La principal característica patológica de la enfermedad de Parkinson es la pérdida de neuronas productoras de dopamina, cuyos cuerpos celulares se encuentran en la sustancia negra compacta (Montes *et al.*, 2014). Una cantidad cada vez mayor de evidencia apunta ahora a la importancia de los iones metálicos en la enfermedad de Parkinson, además de niveles elevados de hierro y zinc en cerebro (Rose *et al.*, 2011).

El cobre (Cu) es un micronutriente esencial y se encuentra en diversos órganos que tienen elevada actividad metabólica, tales como, el hígado, el cerebro, los riñones y el corazón. Además, el transporte de este elemento es fundamental en la célula y, por lo tanto, se puede presentar trastornos en la homeostasis del Cu a consecuencia de las mutaciones en los transportadores de este elemento (Feoktistova & Clark., 2018).

Por otro lado, las estructuras metal-orgánicas (MOF) o PCP (polímeros de coordinación porosos) son una clase de polímeros de coordinación porosos cristalinos (Xiao *et al.*, 2018). Las MOF tienen varios campos de aplicación como por ejemplo en almacenamiento y separación de gases, como materiales con propiedades ópticas, conductoras y magnéticas, como sensores químicos, y como catalizadores en catálisis heterogénea y fotocatalisis (Villegas *et al.* 2021). Pero su aplicación como sistema de administración de fármacos es relativamente nueva, por lo que, la incorporación de biomoléculas y oligoelementos esenciales como cationes endógenos (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+3} , Mg^{+2} y Co^{+2}) en la estructura metal-orgánica puede dar lugar a la formación de MOF biocompatibles. Además, los diversos sitios potenciales de unión de cada ion metálico con los ligantes generan una gran diversidad de estructuras de baja toxicidad. No obstante, el tamaño del poro de la MOF es variable a diferencia de otras estructuras poliméricas y se puede controlar. Esto permite una liberación controlada de un fármaco y/o un metal en diversas aplicaciones biomédicas (Ramos *et al.*, 2022).

Hasta el momento, las MOF de cobre se han empleado como terapia contra el cáncer, como transportadores de fármacos, así como efecto profiláctico en heridas y diversas aplicaciones de biosensores, por ejemplo, para la detección de glucosa (Aguila *et al.*, 2023), sin embargo, no se han llevado a cabo investigaciones que vinculen directamente las MOF de cobre con el campo de la neurociencia. A pesar de su versatilidad y aplicaciones en diversas áreas científicas, no existen estudios documentados que exploren su potencial en este ámbito.

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la biodistribución del cobre en forma de un sistema denominado MOF-74(Cu) en un sistema biológico murino sanos mediante una administración oral para comprender la distribución, tiempo de residencia en el tejido y conocer el riesgo de toxicidad en el principal órgano de detoxificación de metales como es el hígado.

2. Antecedentes

2.1. Mecanismos de captación, distribución y eliminación del cobre en la célula

El cobre (Cu) es transportado al interior de las células por una familia de proteínas transmembranales llamadas “familia 31 transportadora de solutos, transportadoras de Cu” conocidas principalmente como proteínas “CTR” de las cuales se han identificado dos genes en el humano CTR1 Y CTR2; sin embargo, se conoce más el funcionamiento de la proteína CTR1 que capta el Cu extracelular uniéndolo a la membrana celular (Rodríguez & Pescador, 2009).

Una vez que el Cu cruza la luz intestinal, es transportado a la circulación portal donde se entrega al hígado, un órgano central para la homeostasis del Cu, donde se moviliza a la circulación periférica o se secreta en la bilis para su excreción. Además, en el hígado el Cu se incorpora entre otras proteínas, a la ceruloplasmina multi-Cu ferroxidasa secretada, que cataliza la oxidación del hierro ferroso (Fe^{2+}) a hierro férrico (Fe^{3+}) en el suero. En la figura 1 se muestra el proceso de absorción de Cu en el intestino.

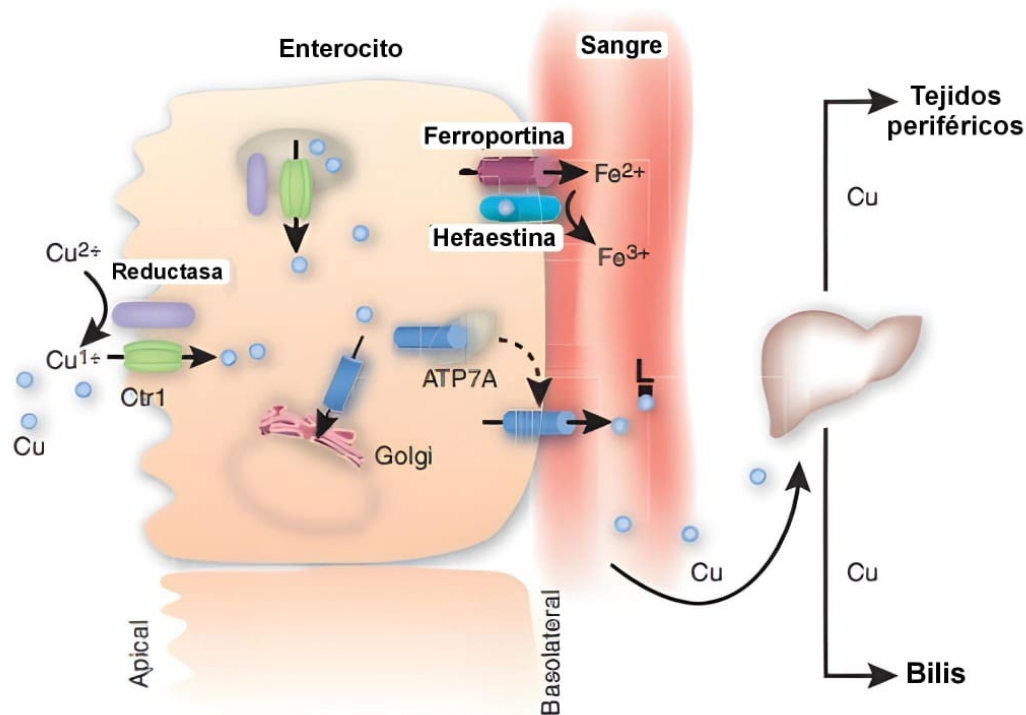


Figura 1. Absorción intestinal del Cu y distribución periférica (Adaptado de: Kim *et al.*, 2008).

El hígado es el principal órgano de almacenamiento del Cu, y su introducción al citoplasma del hepatocito lo realiza la Ctr1 por medio de cuatro vías:

1. Unión al pool Cu/metalotioneina o al glutatión para ser almacenado.
2. Circulación a la mitocondria para ser incorporado al citocromo C oxidasa vía COX17.
3. Unión a CCS para hacer parte de la SOD.
4. Incorporación a la Cp vía Atx1 / ATP7B en el sistema RE-Golgi-Vesícula (Rodríguez & Pescador, 2009).

Las moléculas pequeñas como el glutatión y las metalotioneinas se unen al Cu para su almacenamiento y/o desintoxicación y pueden proporcionar una reserva intercambiable de Cu. Además, una clase de proteínas llamadas metalochaperonas también se unen al Cu y lo dirigen a destinos específicos dentro de la célula. La CCS entrega Cu a Cu/Zn-SOD1, COX17 realiza la metalización y ensamblaje de la citocromo c oxidasa, y ATOX1 transfiere Cu a las ATPasas (ATP7A y ATP7B) para su entrega a la vía secretora y para la salida del exceso de Cu en la célula (La

Fontaine & Mercer, 2007). Siendo así, ambas proteínas (ATP7A y ATP7B) tienen una doble función: suministrar el Cu que necesitan las cupro-enzimas, como la tirosinasa o la ceruloplasmina, que tras ser sintetizadas son transportadas a través de la vía secretora, y eliminar el exceso del Cu por la bilis, vía exocitosis. En la figura 2 se muestra el proceso celular en un hepatocito.

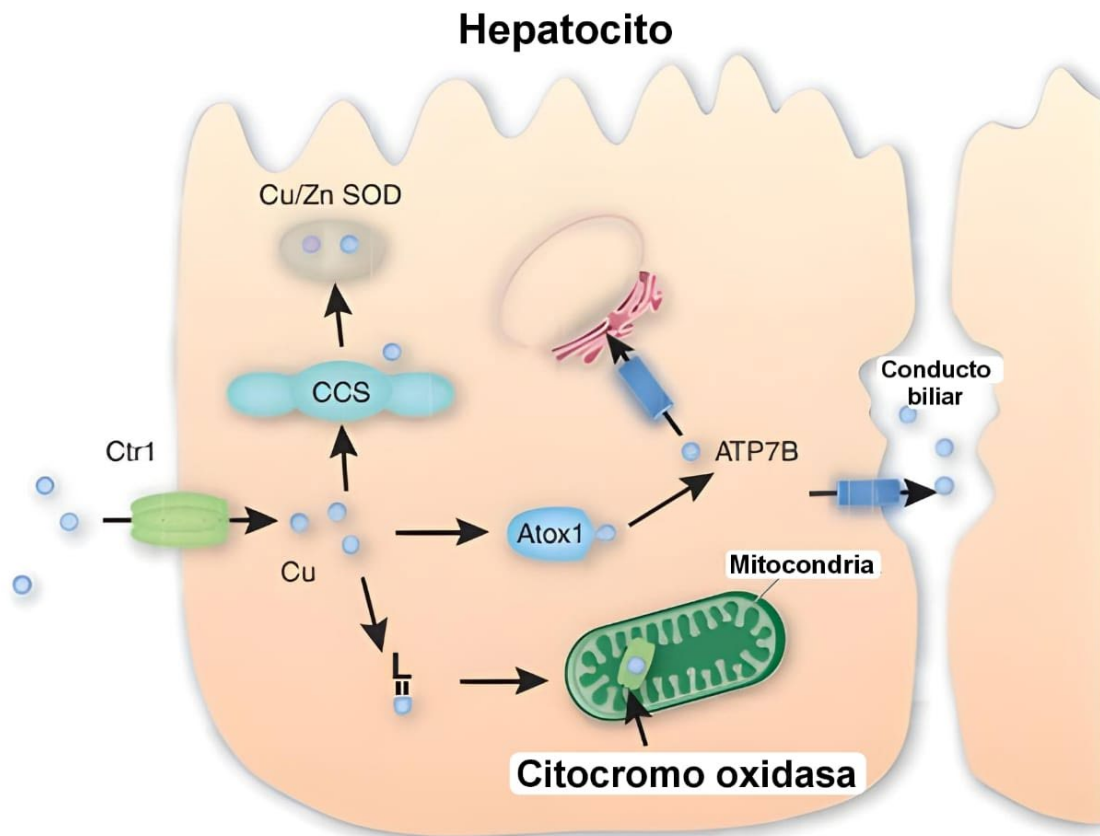


Figura 2 Vía intracelular y secreción biliar en el hígado (Adaptado de: Feoktistova & Clark., 2018).

Un defecto de la proteína ATP7A conduce a deficiencias en el transporte del Cu desde el intestino a la circulación y al sistema nervioso central, como consecuencias de ello existe deficiencia de Cu sistémico y actividad reducida de varias enzimas (Feoktistova & Clark., 2018).

3. Objetivo general

Determinar la biodistribución del cobre administrado en forma de MOF-74(Cu), mediante la cuantificación de este oligoelemento en plasma y en diferentes órganos de un modelo animal.

4. Objetivos específicos

- 4.1. Realizar una investigación bibliográfica sistematizada de la MOF-74(Cu), mediante plataformas conteniendo revistas científicas especializadas, para recaudar información que sustente su potencial aplicación biológica.
- 4.2. Administrar por vía parenteral una dispersión coloidal estandarizada de MOF-74(Cu) en un modelo animal murino, para cuantificar el cobre en plasma, así como el distribuido en diferentes órganos.
- 4.3. Extraer los órganos seleccionados (cuerpo estriado de la corteza cerebral, hígado, bazo y riñón, además de plasma) mediante la técnica de disección para poder cuantificar la cantidad de cobre distribuido en el organismo.
- 4.4. Ejecutar la verificación de un método analítico previamente validado, para cuantificar Cu en plasma y tejidos animales.
- 4.5. Determinar por espectroscopia de absorción atómica, la cantidad de cobre contenida en los tejidos y reportar su distribución en el organismo utilizado.

5. Materiales

Material de vidrio de uso común en laboratorios; disolventes orgánicos como acetona, metanol, acetato de Cu monohidratado, 2-hidroxi-ácido tereftálico, agua desionizada, nitrógeno líquido, estuche de disección.

Ratas macho de cepa Wistar de 270-290 g de peso proporcionadas por la Unidad de Experimentación y Producción Animal Pecuaria (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco (UAM-X).

Equipos: espectroscopía de absorción atómica, estufa, mufla, balanza analítica, estufa de vacío, ultra congelador.

5.1. Lugar de realización

El presente proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada (N-106) ubicado en el edificio N, Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad.

5.2. Consideraciones éticas

Para el uso del modelo animal, este proyecto de servicio social se supeditó a lo establecido por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales en Laboratorio (CICUAL) de la División de CBS de la UAMX.

Para el manejo del sujeto experimental no humano y la administración de la MOF en estudio en el modelo animal, así como la obtención y tratamiento de las muestras biológicas, se contó con la asesoría personalizada de la Dra. Betzabeth García Martínez, aplicándose el protocolo aprobado para el proyecto de investigación número 170 titulado: "Evaluación de la farmacoterapia con sales de Cu en una forma farmacéutica óptima en un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson"

6. Metodología

6.1. Investigación bibliográfica

Se realizó una investigación bibliográfica sistematizada de la MOF-74(Cu), en plataformas con artículos científicos especializados como *Google Scholar*, *SpringerLink* y *ScienceDirect*, con los cuales se recaudó información para sustentar la aplicación del compuesto en estudio en sistemas biológicos murinos.

6.2. Administración vía oral mediante una cánula esofágica para dosificación.

El presente proyecto se realizó de acuerdo con los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Las ratas utilizadas en este estudio se obtuvieron de la Unidad de Experimentación y Producción Animal-Pecuaria (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X) y se criaron internamente, entre un peso de 260 g a 290 g, además se mantuvieron en

condiciones libres de patógenos específicos, las pruebas se realizaron durante el día y el número de animales de experimentación se mantuvo al mínimo (n=3).

La administración de la MOF-74(Cu) se realizó de forma oral en suspensión mediante una cánula esofágica para dosificación, se asignaron aleatoriamente diferentes grupos de la misma cepa para la administración con dos dosis diferentes a distintas horas (3, 6, 9 y 12). Se tomaron 4 grupos de forma aleatoria para la primera dosis de la MOF, después se pesaron las ratas para calcular la dosis de administración con 39.7 mg de la MOF por cada kilogramo. Para la administración de la segunda dosis, se tomaron dos grupos aleatorios a las 6 y 12 horas, con una dosis incrementada de 79.5 mg de la MOF. El grupo control recibió vehículo (agua desionizada), y las ratas fueron sacrificadas inmediatamente después de la administración del tratamiento.

6.3. Extracción del tejido de interés farmacológico

6.3.1. Extracción de plasma por medio del método punción cardíaca.

La anestesia se inyectó intramuscular o intraperitoneal y se esperó unos minutos para obtener el efecto en cada rata. En cuanto a la extracción de plasma, se realizó hasta un 10% en volumen, de manera lenta y constante con la ayuda de una aguja esterilizada. Se comprobó la anestesia en el animal por falta de reflejos, relajación y respiración regular, entonces se colocó en la mesa de trabajo sujetado de las cuatro patas, recto en línea vertical. Después, se localizó la apófisis xifoides del esternón y se pinchó en dirección cráneoventral con un ángulo de 30°, ejerciendo presión para llegar al corazón. Una vez bien ubicada la jeringa, se comenzó a extraer el plasma lentamente hasta obtener la suficiente muestra de sangre. Finalmente, cuando la extracción fue completada, se sacrificó al animal mediante guillotina para realizarlo de forma rápida y minimizar cualquier dolor o angustia.

6.3.2 Extracción del tejido por medio de la técnica de disección.

La extracción de los tejidos u órganos de interés se realizó por métodos de disección. En el cerebro los tejidos seleccionados fueron estriado y mesencéfalo,

en cuanto a los órganos, se eligieron el riñón, bazo e hígado. La disección en cerebro se realizó separando el tejido circundante, se colocó en hielo y se procedió a diseccionar enseguida, para evitar la desecación se utilizó una solución salina. Después, se comenzó descartando el cerebelo con ayuda de una espátula sin mucha presión, al retirarlo se visualizó el mesencéfalo y se tomó la muestra en un tubo Eppendorf. Ya obtenido el tejido anterior, se comenzó por realizar un corte coronal a nivel de hipocampo para finalmente obtener el estriado en cerebro. En cuanto a los órganos, se comenzó por colocar el cuerpo del animal en la mesa de trabajo, con el dorso hacia abajo, asegurando las cuatro patas para evitar movimiento al hacer la disección. Después, se levantó la piel del abdomen con una pinza y se realizó un corte recto hasta llegar a la caja torácica, cuidando no dañar los órganos que se encuentran debajo. Se ubicaron los órganos seleccionados riñón, bazo e hígado y se tomó una pequeña muestra de cada uno. Finalmente, se pesaron cada uno de los tejidos.

6.4 Cuantificación de Cobre mediante la Aplicación de la Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS).

La cuantificación de Cu se realizó mediante un espectroscopio de absorción atómica (AAS) (Perkin-Elmer 3110) equipado con un horno de grafito (Perkin-Elmer HGA-600) y un cátodo hueco, lámpara a 324.8 nm de longitud de onda. Este ensayo fue realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, con un método comprobado, supervisado por la doctora Betzabeth García Martínez. Los tejidos se digirieron con 0.2 mL de HNO₃ concentrado para mesencéfalo, y 0.3 mL para los tejidos más fibrosos, a 60°C durante 30 min. Las digestiones de plasma y tejido se diluyeron 1:50 con HNO₃ al 0.2%, los resultados se obtuvieron en microgramos de Cu por gramo de tejido húmedo (µg Cu/g). Las concentraciones de Cu se calcularon usando una curva de calibración (seis puntos), en un rango de concentración entre 2 y 45 µg/L por dilución de una solución madre con 0.2% HNO₃.

7. Resultados y discusión

7.1 Revisión bibliográfica

La revisión bibliográfica se realizó en plataformas como *ScienceDirect*, *SpringerLink* y *Google Scholar*, de las cuales se obtuvieron resultados favorables donde se respalda el potencial de la MOF-74(Cu) para su aplicación biológica. En un artículo de Feoktistova y Clark (2018) recalcan que problemas en la homeostasis del Cu a consecuencia de las mutaciones en los transportadores de este elemento causan trastornos, además, Rose (2011) menciona que una cantidad cada vez mayor de evidencia apunta ahora a la importancia de los iones metálicos en la enfermedad del Parkinson (EP). Por lo que existe una importancia relacionada entre la EP y la homeostasis del Cu en las células; además, García *et al.* (2021) subrayan en su estudio que los suplementos de Cu podrían utilizarse como una alternativa terapéutica potencial para la restitución de metales en enfermedades caracterizadas por el agotamiento de Cu, como la esquizofrenia, los trastornos depresivos, la esclerosis lateral amiotrófica y la EP. Sin embargo, aunque el Cu es un elemento esencial para el funcionamiento adecuado del organismo, en exceso puede generar problemas de toxicidad celular como estrés oxidativo y en ciertos tejidos u órganos provocar enfermedades metabólicas donde el organismo tiene dificultades para eliminar el exceso de Cu, lo que lleva a su acumulación en hígado y cerebro u otros tejidos, causando daño celular y disfunción orgánica. Por estas razones, un enfoque prometedor es utilizar la molécula de Cu con liberación modificada evitando la toxicidad en el organismo. Ramos *et al.* (2022) explica que el tamaño del poro de la MOF tiene como ventaja que es variable y a diferencia de otras estructuras poliméricas, se puede controlar, por lo tanto, puede permitir una liberación controlada de un metal en diversas aplicaciones biomédicas. Con estos resultados se cumplió con el **objetivo 1** de revisión bibliográfica.

Tabla 1. Aplicaciones de la MOF-74(Cu).

	Aplicaciones	Referencia
MOF-74(Cu)	Liberación controlada de un fármaco y/o un metal en diversas aplicaciones biomédicas	(Ramos <i>et al.</i> , 2022).
	Almacenamiento y separación de gases	(Pacheco, 2021)
	Materiales con propiedades ópticas, conductoras y magnéticas	(Villegas <i>et al.</i> 2021).
	Sensores químicos	(Ferraz, 2017)
	Catalizadores en catálisis heterogénea y fotocatalisis	(Villegas <i>et al.</i> 2021).

7.2 Administración vía oral

La aplicación por vía oral de una dispersión coloidal estandarizada de MOF-74(Cu) demostró ser adecuada, ya que se logró una administración exitosa de la solución en el modelo animal murino. No se observaron complicaciones significativas o efectos adversos relacionados con la administración del compuesto. Además, la concentración utilizada en este estudio se estableció de acuerdo con un estudio realizado por García *et al.* (2021), en el cual caracterizó y analizó perfiles de concentración de Cu en ratas Wistar macho, donde el grupo experimental III con dosis 79.5 mgCu/Kg tuvo una tasa de supervivencia del 100%. A partir de este resultado se cumplió con el **objetivo 2** de la administración por vía oral de una dispersión coloidal estandarizada de MOF-74(Cu) mediante una cánula esofágica.

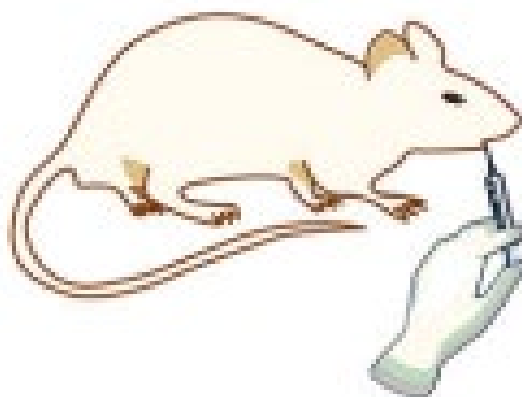


Figura 3. Administración de la suspensión de cobre vía oral mediante una cánula esofágica (García *et al.* 2021)

7.3 Disección de tejidos seleccionados

Durante el proceso de extracción mediante técnicas de disección, en el cual se obtuvieron muestras de los tejidos seleccionados, se experimentó una pérdida de algunas muestras. A pesar de los esfuerzos para llevar a cabo la extracción de manera cuidadosa, factores como la fragilidad del tejido o dificultades técnicas contribuyeron a la pérdida de dichas muestras. Sin embargo, se tomaron medidas para mitigar esta eventualidad y no tener un impacto significativo en los objetivos del estudio, con estos resultados se cumple el **objetivo 3**.

7.4 Cuantificación de cobre mediante un método analítico

La cuantificación de Cu fue realizada con un método analítico verificado, previamente validado, el cual, resultó eficaz dentro de una curva de calibración en un rango de concentración de 2 y 45 µg/L. Ya que las concentraciones de Cu determinadas en los ensayos del presente estudio estuvieron dentro de los puntos de la curva para su cuantificación en cada tejido, se puede afirmar que se cumplió con el **objetivo 4.**

7.5 Determinación de la concentración de cobre por Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS)

Los resultados de la concentración Cu en los tejidos por espectroscopía de absorción atómica proporcionaron concentraciones reproducibles en los diferentes órganos estudiados. A los datos se les realizó un análisis estadístico mediante el programa IBM® SPSS® Statistics. Para cada tejido se realizaron pruebas de distribución normal, además de la homogeneidad de varianzas con la finalidad seleccionar métodos estadísticos paramétricos o no paramétricos.

El programa SPSS® reportó datos con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y Kolmogórov-Smirnov, sin embargo, se tomó en cuenta Shapiro-Wilk, debido a que esta prueba se emplea para contrastar normalidad cuando el tamaño de la muestra es menor a 50 observaciones y en muestras grandes es equivalente a la prueba de Kolmogórov-Smirnov (Flores *et al.*, 2021). Las pruebas con Shapiro-Wilk, demostraron tener un p valor mayor a 0.05, lo que significa que los datos provienen de una distribución normal. Además, las variables analizadas en la prueba de homogeneidad obtuvieron un valor $p > 0.05$, aceptando que las varianzas son homogéneas, por lo que se realizaron estudios paramétricos.

Una vez se obtuvieron los resultados de estas pruebas, se realizó un ANOVA de un factor, seguido de una prueba *post hoc* con Bonferroni. En los resultados se compara concentración *versus* tiempo en cada tejido.

7.5.1. Cuantificación de cobre en plasma

En la figura 4 se muestran los resultados de la concentración de Cu en plasma con administración vía oral de dos dosificaciones, contra el grupo control a distintos tiempos.

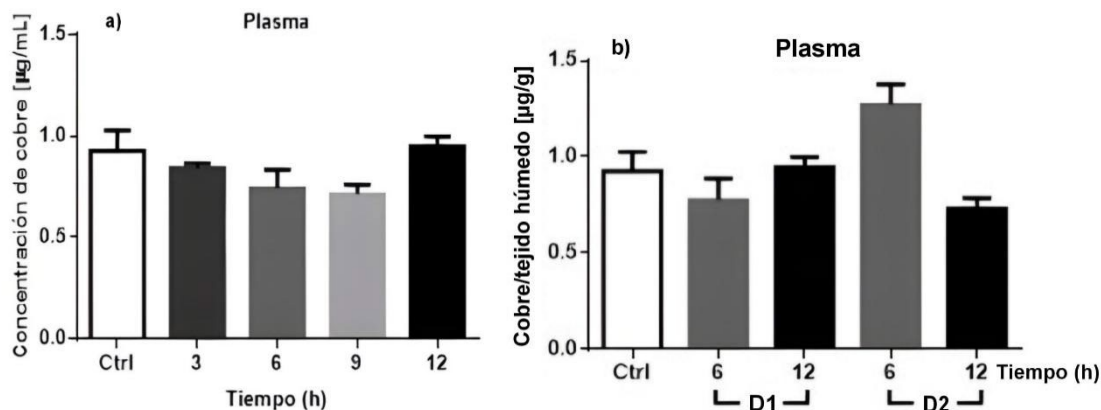


Figura 4. Comparación de la biodistribución del Cu con administración vía oral del grupo experimental contra el grupo control en plasma con la a) primera dosis de 39.75mg Cu/Kg en cuatro tiempos diferentes 3, 6, 9 y 12 h; y comparación de la concentración de Cu en plasma de b) dos dosis: D1 de 39.75mg Cu/Kg y D2 de 79.5 mg Cu/Kg a dos tiempos 6 y 12 h. Cada barra representa la media \pm SEM de n= 3-4 ratas por grupo. *Un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa en las medias de concentración de Cu en cada tejido analizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA frente al grupo control ($t = 0$).

La comparación de la distribución del Cu en primera dosificación demuestra que no existe diferencia entre los grupos analizados a distintos tiempos y el grupo control, por lo que podrían ser diferentes factores los que determinaron este resultado (Fig. 4a). La dosis inadecuada llevó a bajas concentraciones de Cu en plasma, por lo tanto, no se encontraron impactos significativos. Sin embargo, es posible que el metabolismo del Cu en las ratas sea regulado de manera eficiente, es decir, los niveles de Cu pudieron mantenerse en un rango estrecho y por ello, no se vieron afectados por el tratamiento experimental. Además, el Cu en el organismo se distribuye en diferentes tejidos y órganos, por lo que, las células sanguíneas pueden tener niveles relativamente bajos de Cu en comparación con otros tejidos, por ejemplo, la ceruloplasmina (Cp) es una proteína que se une a los átomos de Cu, se sintetiza en los hepatocitos y, al ser liberada al torrente sanguíneo funciona como principal factor que mantiene la homeostasis de este microelemento (Cholewińska *et al.*, 2018). Por lo tanto, aunque no se haya detectado en las células sanguíneas, puede estar presente en otros tejidos como el hígado, el cual es el principal órgano

responsable del metabolismo del Cu, que acumula la mayor cantidad de este elemento (Cholewińska *et al.*, 2018). Por ello, podría esperarse que exista una elevada concentración del metal en este tejido, ya que cuando en el plasma la concentración de Cu es baja, éste se eleva en el hígado debido a su almacenamiento. Según un estudio de García *et al.* (2021), los autores demostraron que la expresión del gen metalotioneína (MT) en el hígado es inducida por metales como Cu, Cd, Cr, Fe, Pb, Mn, Hg, Ni y Zn, destacando el papel vital del hígado para el almacenamiento, distribución y metabolismo de los metales pesados. También menciona que los datos en el tejido hepático mostraron que el AUC del hígado era 24.6 veces mayor que el AUC del plasma. Además, señala que su estudio cuando fue comparado con otro obtuvo resultados similares, en el cual después de la administración a ratas Wistar macho, se notificó una eliminación rápida de Cu en plasma, ya que el nivel del Cu era aproximadamente el 1% de la concentración inicial sólo después de 1 hora de la administración y concluyó que los resultados sugieren que la concentración plasmática de Cu no afecta la biodisponibilidad del metal en el tejido cerebral de manera directa.

En este trabajo se muestra la comparación de los resultados de la concentración de Cu con la primera dosis (39.75 mg Cu/Kg) y la segunda dosis (79.5 mg Cu/Kg) contra el grupo control, a dos tiempos: 6 y 12 h (Fig. 4b). De acuerdo con el ANOVA realizado, no se encontraron diferencias significativas con una $p < 0.05$; por lo que aunque no hubo diferencias en los niveles de Cu en el plasma entre las dos dosis, este resultado sugiere que ambas dosis son igualmente toleradas por los animales en experimentación. La falta de Cu en el plasma puede indicar que el organismo es capaz de regular eficientemente la absorción y eliminación del metal en respuesta a las diferentes dosis experimentales administradas.

Como se mencionó anteriormente, las dosis experimentales de este estudio se establecieron con base a la literatura previa, donde García *et al.* (2021) realizaron un estudio de caracterización y análisis del perfil de concentración de Cu en ratas Wistar macho, en el cual, el grupo experimental III con dosis de 79.5 mgCu/Kg, no

mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control y la tasa de supervivencia fue del 100%.

7.5.2. Cuantificación de cobre en tejido cerebral: mesencéfalo y estriado.

La figura 5 muestra el tejido mesencéfalo en la primera dosificación (39.75 mgCu/Kg), en cuatro tiempos diferentes: 3, 6, 9 y 12 h, además del tejido estriado en cerebro.

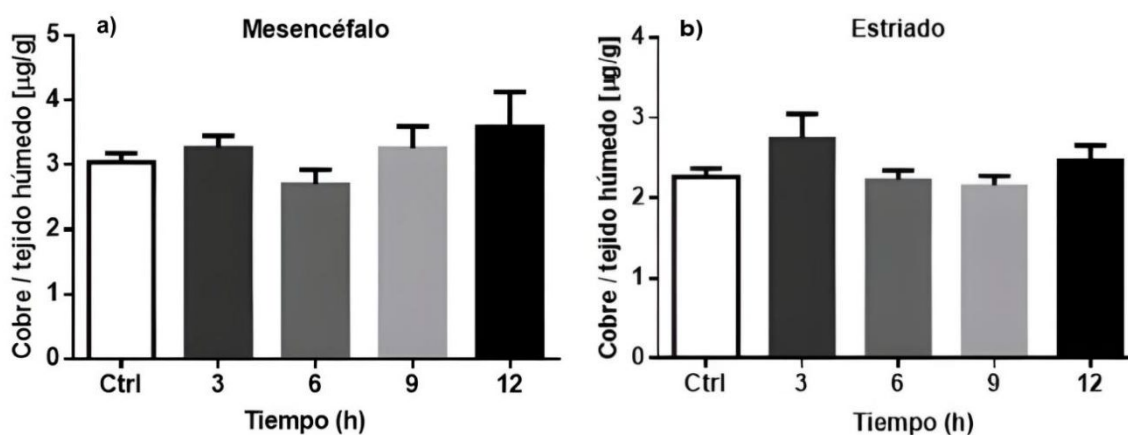


Figura 5. Comparación de la biodistribución del Cu mediante la administración vía oral aguda de 39.75 mg Cu/Kg en ratas Wistar macho, grupo experimental contra el grupo control, en tejido cerebral a) mesencéfalo y b) estriado. Cada barra representa la media \pm SEM de n= 3-4 ratas por grupo. *Un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa en las medias de concentración de Cu en cada tejido analizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA frente al grupo control ($t = 0$).

El análisis con ANOVA resultó no mostrar diferencias significativas en las medias de concentración de Cu en cada tejido analizado ($p < 0.05$) frente al grupo control. En relación con el mesencéfalo (Fig. 5a), que es una región específica del cerebro con funciones y características diferentes, es posible que la distribución y el metabolismo del Cu en el mesencéfalo sean diferentes en comparación con otros tejidos, lo que explicaría la falta de diferencias significativas. Según Platonova *et al.* (2005), existen diferentes tipos de neuronas y enzimas que podrían modificar la distribución de Cu, además la barrera hematoencefálica regula el paso de las sustancias desde la sangre al cerebro y puede influir en la disponibilidad y la acumulación de Cu en el tejido mesencefálico. En un estudio comparativo de la distribución de Cu en el mesencéfalo con concentración 79.5 mg Cu/Kg, García *et*

al. (2021) mencionan que el perfil de concentración-tiempo de Cu en el mesencéfalo se siguió durante 6 h y no mostró una variación significativa. También, recalca que se ha documentado que esta región del cerebro es capaz de absorber el metal de manera lineal después de la perfusión de ^{64}Cu libre durante 120 s a través de la arteria carótida interna en ratas macho. Por otro lado, Manrique-Arias *et al.* (2016) mencionan que, utilizando tomografía por emisión de positrones (PET) para estudiar la biodistribución de ^{64}Cu en ratas Wistar macho, no encontraron un cambio significativo en la concentración de Cu en el tejido cerebral.

En cuanto al tejido estriado del cerebro (Fig. 5b), se demostró que no existe diferencia significativa entre los grupos analizados con un valor $p < 0.05$. Por lo que, aunque en esta figura los resultados muestran una mayor concentración de Cu a los tiempos 3 y 12 h, el análisis estadístico utilizando ANOVA no encontró diferencias significativas. Sin embargo, García *et al.* (2021) demostraron en su estudio que la distribución del metal en este tejido alcanzó la concentración máxima y fue de un 49.9% superior a la concentración basal de Cu; habiendo disminuido significativamente después de las 12 a 72 h, con posterioridad a la administración de una concentración de 79.5 mg Cu/Kg. Estos resultados podrían indicar que las variaciones en las concentraciones de la MOF de Cu en el tejido estriado podrían ser atribuidas a otros factores no considerados en el estudio.

Entonces, los resultados de este estudio sugieren que las diferencias observadas podrían o no reflejar efectos reales de la administración de la MOF de Cu; entre éstas, se encuentra la variabilidad en los datos biológicos y la posibilidad de que la dosis o la duración de la administración de la MOF de Cu no hayan sido suficientes para generar cambios significativos en el tejido. También factores como el tamaño de la muestra y otras interacciones biológicas podrían haber influido en los resultados, a manera de ejemplo, García *et al.* (2021) mencionan que, bajo altas concentraciones de Cu intracelular, el Ctr1, principal transportador de Cu en el cerebro podría estar en una forma inactiva o podría ser internalizado y degradado. Además, es importante destacar que un resultado no significativo en un análisis

estadístico no descarta por completo la posibilidad de efectos, pero indica que no se encontró suficiente evidencia estadística para afirmar su presencia.

7.5.3. Hígado como principal órgano de detoxificación

En la figura 6 y 6.1 se muestran resultados del hígado, bazo y riñón, con la primera dosificación en cuatro tiempos distintos.

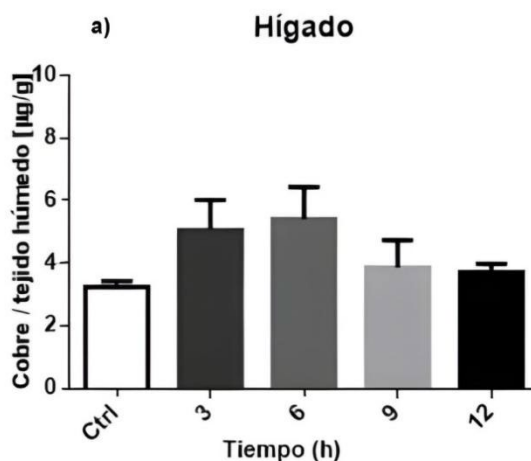


Figura 6. Comparación de la biodistribución del Cu tras la administración oral aguda de 39.75 mg Cu/Kg en tejidos como a) hígado. Cada barra representa la media \pm SEM de $n= 3-4$ ratas por grupo. *Un valor de $p<0.05$ como diferencia estadísticamente significativa en las medias de concentración de Cu en el tejido analizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA frente al grupo control ($t= 0$).

El resultado de la concentración de Cu en hígado (Fig. 6a), presenta los resultados de concentración de Cu del control y los grupos experimentales a 4 diferentes tiempos. Los resultados del análisis estadístico utilizando ANOVA no demostraron diferencias significativas entre los grupos, con un valor de $p<0.05$, lo cual puede parecer contradictorio, ya que visualmente la gráfica muestra una clara tendencia de mayor concentración de la MOF de Cu en el hígado en los grupos experimentales en todos los tiempos de muestreo. No obstante, la falta de significancia estadística sugiere que estas diferencias podrían haber ocurrido debido algunas variaciones en los datos, una razón podría ser la presencia de una alta variabilidad individual en las concentraciones de la MOF de Cu en el hígado, lo que dificultaría detectar diferencias estadísticamente significativas. Además de otros factores no considerados en el estudio, como el metabolismo individual de los

animales o la interacción con otros compuestos hepáticos. García *et al* (2021) señalan que la homeostasis del metal por parte del hígado y su excreción son los principales factores que podrían modificar la toxicidad y distribución del Cu entre cepas animales. Al igual, la falta de diferencias significativas podría indicar que el hígado tiene mecanismos eficientes de regulación y eliminación de Cu, permitiéndole mantener la homeostasis del metal y evitando una acumulación excesiva o una deficiencia. H. Tapiero *et al*. (2003) menciona que la vía principal de excreción de Cu del cuerpo es de los hepatocitos a través de la bilis, además, enfatiza que la excreción directa de Cu parece tener lugar cuando las células se someten a elevados niveles de Cu. La ventaja de la falta de diferencias en el análisis estadístico y la tendencia observada en la gráfica sugiere que puede existir una asociación entre la administración de la MOF de Cu y las concentraciones hepáticas. García *et al*. (2021) mencionan en su estudio de comparación de la distribución de Cu que la concentración inicial en el tejido hepático se encontró a las 12 h después de la administración, con una concentración mayor a la utilizada en la primera dosificación de este estudio, por lo que con la MOF no se llega una concentración de citotoxicidad.

7.5.4. Cuantificación de cobre en otros órganos de depuración

Los resultados de concentración de Cu en el bazo se muestran en la Fig. 6.1b, los cuales refieren los datos para este tejido en el estudio experimental con animales murinos después de la administración de una concentración de 39.75 mg Cu/Kg. Gráficamente, existen diferencias en el tiempo de 6 h, sin embargo, en el análisis realizado con ANOVA no se encontraron diferencias significativas con un valor $p < 0.05$. Es importante mencionar que la falta de diferencias significativas en el bazo es consistente con los resultados encontrados en el hígado, donde tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Esto sugiere que la primera administración de la MOF de Cu con los valores de concentración utilizados puede no tener un efecto significativo. Sin embargo, Iannacone (2014) menciona que el bazo actúa como órgano de depósito de Cu, lo cual nos permite proponer con los resultados de este estudio que, con la

administración utilizada de Cu (39.75 mg Cu/Kg) no se tuvo un efecto significativo en la acumulación de este metal en el bazo de las ratas. No obstante lo anterior, podría existir la posibilidad de que el bazo tenga una capacidad reguladora para mantener una concentración constante de Cu en su tejido, independientemente de la dosis administrada, es decir, que el bazo tenga mecanismos de compensación que equilibran la acumulación y eliminación de Cu en respuesta a diferentes niveles de ingesta.

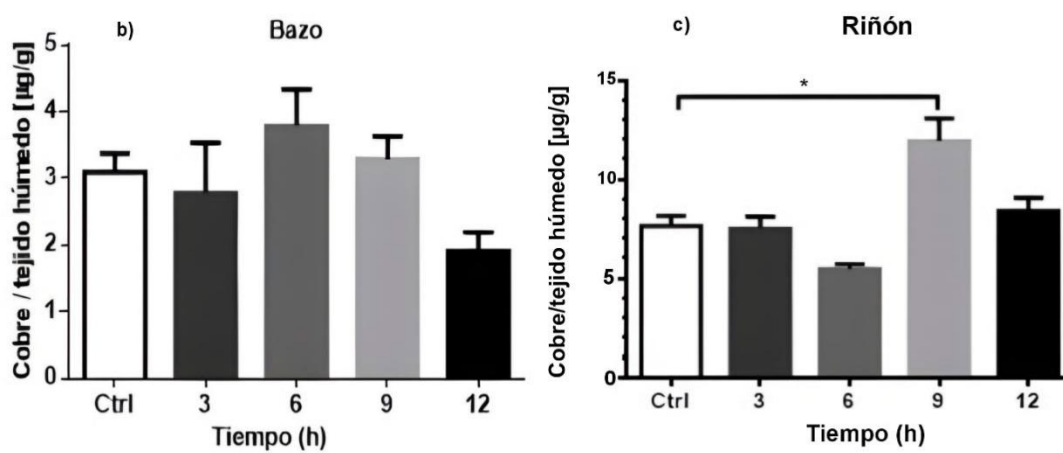


Figura 6.1. Comparación de la biodistribución del Cu tras la administración oral aguda de 39.75 mg Cu/Kg en tejidos como b) bazo y c) riñón. Cada barra representa la media \pm SEM de n= 3-4 ratas por grupo. *Un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa en las medias de concentración de Cu en cada tejido analizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA frente al grupo control ($t = 0$).

En cuanto al riñón (Fig. 6.1c), los resultados obtenidos utilizando ANOVA, valor $p < 0.05$, demostraron que en la primera dosificación tiene diferencias significativas en el tiempo 9 h contra el grupo control. Esto sugiere que el riñón tiene una mayor capacidad de acumulación de Cu en comparación con otros tejidos evaluados en la primera dosificación, lo que tiene implicaciones importantes en la homeostasis del metal en el organismo. Esto indica que el riñón es sensible y responde rápidamente a la administración de Cu, acumulando el metal en concentraciones detectables (Gutiérrez, 2007). Además, posiblemente porque la MOF-74(Cu) presenta una tendencia hidrofílica, lo que hace que pueda ser eliminada vía renal.

7.5.5. Comparación de la concentración de cobre mediante un aumento de dosificación

Los resultados de la segunda dosificación (79.5 mg Cu/Kg) están representados en las siguientes figuras (7 y 8). Con los resultados obtenidos se realizó un análisis ANOVA para obtener datos estadísticos más certeros.

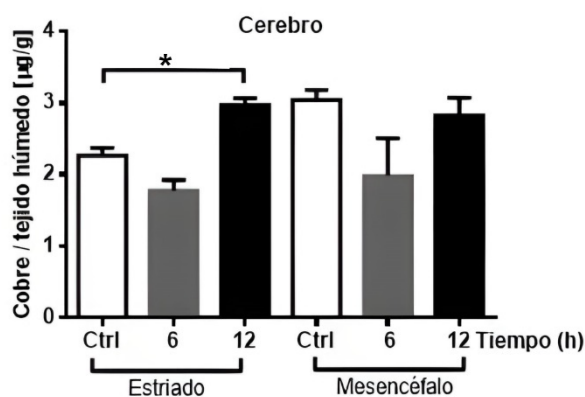


Figura 7. Comparación de la biodistribución del Cu tras la administración oral aguda de 79.5 mg Cu/Kg en tejidos del cerebro a) estriado, b) mesencéfalo a dos tiempos diferentes 6 y 12 h. Cada barra representa la media \pm SEM de n= 3-4 ratas por grupo. *Un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa en las medias de concentración de Cu en cada tejido analizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA frente al grupo control (t= 0).

El estudio examinó la concentración de Cu en el tejido cerebral; centrándonos específicamente en el tejido estriado Fig. 7, al analizar los datos a las 12 h, observamos que la concentración de Cu en el grupo experimental fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. Estos resultados indican que la administración de Cu tuvo un impacto significativo en la acumulación del metal en el tejido estriado. Además, la diferencia significativa en la concentración en el tejido sugiere que esta área cerebral tiene una mayor capacidad de acumular Cu en respuesta a la administración. García *et al.* (2021) mencionan que la distribución del metal en este tejido alcanzó la concentración máxima, con la misma dosificación de 79.5 mg Cu/Kg. Es importante mencionar que los resultados obtenidos a las 12 h después de la administración pueden reflejar una respuesta aguda al Cu y no necesariamente indican cambios a largo plazo en la homeostasis del metal en el cerebro. Además, Gutiérrez *et al.* (2007) realizaron un estudio donde determinaron el efecto del Cu sobre las actividades de las enzimas ChAT y AChE

en corteza cerebral total, cuerpo estriado y en hipocampo de cerebro de rata en desarrollo, donde describieron que el curso temporal de la acumulación en el tejido estriado de rata tuvo una concentración de Cu mayores en relación con el grupo control, también enfatizaron que los niveles del metal sólo incrementaron en el tejido estriado sin aumentar significativamente en las otras dos estructuras analizadas, a pesar de que en el hipocampo hubo una tendencia al aumento, ésta no fue significativa. Así mismo, concluyeron que sus resultados sugieren una regulación de los niveles de Cu que parecen depender de cada estructura involucrada, puesto que la concentración aumentó precozmente en el tejido estriado. La diferencia significativa en el tejido estriado también puede tener implicaciones funcionales, debido a que el Cu desempeña un papel esencial en la actividad de enzimas y procesos bioquímicos, como caso concreto, Gutiérrez *et al.* (2007) mencionan en su estudio que la metalotioneína (MT) participa en la detoxificación de metales pesados, por lo que la inducción de esta proteína en estructuras encefálicas sirve para quelar al Cu, y probablemente los mecanismos de inducción de esta proteína por el metal se establecen más tardíamente en el tejido estriado, en comparación con el hipocampo y la corteza cerebral total, lo cual podría causar acumulación del Cu en el tejido.

En cuanto al mesencéfalo, los resultados revelaron que no hubo diferencias significativas en la concentración de Cu en este tejido tanto en la primera dosis como en la segunda. Lo anterior sugiere una falta de homogeneidad en la respuesta de este tejido al Cu administrado, indicando que el mesencéfalo pudo mantener una concentración estable de Cu independientemente de la dosis administrada. García *et al.* (2021) realizaron un perfil de concentración de Cu en el mesencéfalo, el cual se siguió durante 6 h y no mostraron una variación significativa entre la concentración del grupo experimental y la concentración inicial de Cu. Sin embargo, detectaron un aumento del 27.6% a las 0.25 h posteriores a la administración.

La figura 8 presenta la concentración de Cu en $\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo, en tejidos como hígado, bazo y riñón con la segunda dosificación de 79.5 mg Cu/Kg. El análisis realizado mediante ANOVA mostró resultados $p < 0.05$, por lo que se

determinó que existen diferencias en los dos tiempos, particularmente para el hígado en la segunda dosificación (Fig. 8a). A las 6 h observamos que la concentración de Cu en hígado del grupo experimental fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. Por lo tanto, indica una rápida acumulación de Cu en el hígado después de la administración. Así mismo, a las 12 h la concentración mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control, aunque en menor grado. Este resultado puede indicar que el hígado ha logrado regular y eliminar parte del Cu acumulado durante el periodo inicial de 6 h. Además, estos resultados revelan una diferencia interesante en la acumulación de Cu en el hígado entre las dos dosificaciones administradas. En la primera dosificación, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, en la segunda, que fue más elevada, se encontraron diferencias. Es posible que la dosis más alta haya superado los mecanismos de regulación y eliminación del hígado, lo que resultó en una acumulación significativa de Cu en este órgano, esta diferencia podría indicar una relación dosis-dependiente en la acumulación de Cu. García *et al.* (2021) mencionaron en su estudio que el hígado fue el tejido con mayor nivel de Cu tras la administración, recalando que se tomó la misma dosificación de 79.5 mg Cu/Kg y que ésta es la empleada en nuestro estudio. Además, señalaron que el tiempo de eliminación de Cu del organismo está regulado por el tiempo de residencia del Cu en el hígado y se comprobó que se excreta a través de las heces, unido a las sales biliares como se menciona en la literatura. Igualmente, sugirieron considerar como factor importante el hígado, ya que es el principal órgano afectado tras una intoxicación por metales.

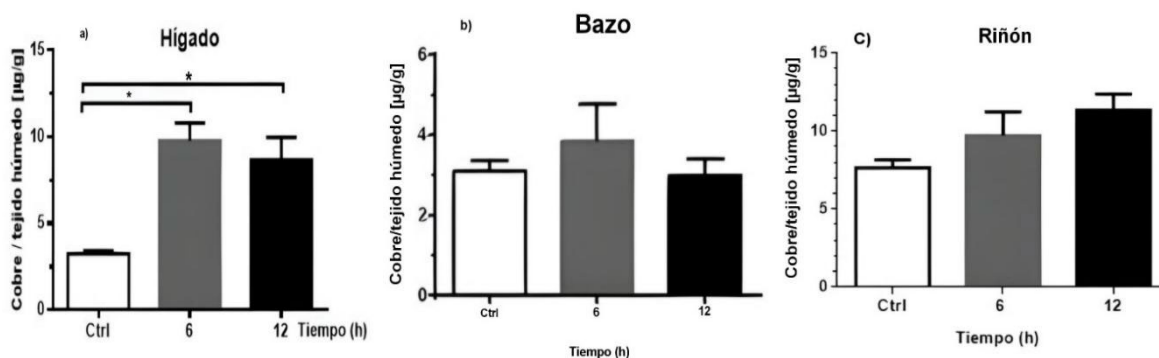


Figura 8. Comparación de la biodistribución del Cu tras la administración oral de 79.5 mg Cu/Kg en tejidos como a) hígado, b) bazo y c) riñón en dos tiempos 6 y 12 h. Cada barra representa la media \pm SEM de n= 3-4 ratas por grupo. *Un valor de $p < 0.05$ como diferencia estadísticamente significativa en las medias de concentración de Cu en cada tejido analizado. Los datos se analizaron mediante ANOVA frente al grupo control ($t = 0$).

En cuanto al bazo (Fig. 8b), a pesar de la concentración más alta de Cu observada a las 6 h, el análisis ANOVA no reveló diferencias significativas en la segunda dosificación ni en la primera. Esto podría indicar que el bazo tiene una capacidad adaptativa para regular y mantener la homeostasis del Cu, incluso en presencia de dosis más altas (Crane *et al.*, 2020). Además, la falta de diferencias significativas en la acumulación de Cu en el bazo a pesar de que la dosis fue aumentada, podría sugerir que el bazo tiene un umbral de saturación o una capacidad limitada para acumular Cu, es decir, más allá de cierto punto, la acumulación adicional de Cu no se reflejaría en diferencias significativas en los resultados. También es importante recalcar que la respuesta del bazo a la administración puede verse influenciada por otros factores, como ejemplo, la duración del estudio, la interacción con otros tejidos u órganos, y la presencia de mecanismos de regulación específicos en el bazo. Crane *et al.* (2020) mencionan que efectivamente el bazo es un órgano que puede adaptarse al igual que los ganglios linfáticos y como tal, es un órgano único con funciones clave en la filtración de la sangre, la renovación celular y la inmunidad, y en él se puede observar una variedad de proliferaciones linfoides en el contexto de una infección y reacción a fármacos. Por otra parte, Guo *et al.* (2021) realizaron un estudio de la inducción de Cu en el bazo donde mencionaron haber encontrado un valor LD_{50} de $CuSO_4$ de 245.47 mg/Kg en ratones, por lo que su estudio, que fue realizado con 10 mg/Kg, 20 mg/Kg y 40 mg/Kg de $CuSO_4$, sus resultados mostraron que el Cu puede causar cambios histopatológicos en el bazo.

De acuerdo con los resultados del riñón (Fig. 8c), no se encontraron diferencias significativas con ANOVA obteniendo un valor $p < 0.05$. Sin embargo, los resultados revelaron una diferencia en la concentración del Cu para el riñón en la primera dosificación (39.75 mg Cu/Kg), la cual fue menor a la segunda (79.5 mg Cu/Kg). Esto indica que el riñón es sensible y responde rápidamente a la administración de Cu, acumulando el metal en concentraciones detectables

(Gutiérrez, 2007), lo que sugiere que el riñón puede haber desarrollado mecanismos adaptativos y de regulación en respuesta a la exposición inicial de Cu, es decir, permitirle al riñón mantener la homeostasis del Cu y evitar una acumulación excesiva en la segunda dosificación. Además, la respuesta del riñón puede ser influenciada por el tiempo, es posible que la diferencia observada en la primera dosificación refleje una respuesta aguda y temprana del riñón, mientras que en la segunda dosificación pueda deberse a una respuesta adaptativa y compensatoria a largo plazo. Según lo que indica Peña (2022) en su artículo de revisión, una de las grandes virtudes de la sabiduría del riñón es su gran capacidad adaptativa a la destrucción progresiva de sus unidades funcionales.

Con los resultados de la concentración de cobre en los distintos tejidos, se logró cumplir con el **objetivo 5**. Alcanzándose así todas las metas propuestas.

8. Conclusiones

Los resultados experimentales revelaron que la biodistribución del cobre administrado intragástricamente en forma de una suspensión coloidal de MOF-74(Cu), es diferente en plasma y distintos órganos de un modelo animal murino; además, que después de una primera dosis de 39.5 mg Cu/kg de masa animal, la segunda dosificación, con 79.5 mg Cu/kg, se presentan diferencias significativas en la concentración de Cu presente en el hígado y el cuerpo estriado de la corteza cerebral; la cual resultó ser mayor que con la primera dosis.

Lo anterior sugiere una dependencia con la dosis administrada de MOF-74(Cu), lo cual puede influir en la acumulación de Cu en dichos tejidos específicos. Además, se respalda la idea de que diferentes tejidos pueden mostrar respuestas variables a la administración de Cu, observándose que el riñón mostró una respuesta específica con la primera dosificación.

Estos hallazgos proporcionan información preliminar sobre la distribución y acumulación de Cu en diferentes tejidos a partir de una administración oral de una suspensión de la MOF-74(Cu), y señalan la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos involucrados en la respuesta

de los tejidos a la administración de un sistema de liberación modificado de cobre tipo MOF.

9. Perspectivas

Los resultados obtenidos con este estudio permiten visualizar varias acciones a realizar a futuro con relación a:

- **Mecanismos de regulación:** Investigar más a fondo los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la acumulación diferencial de cobre en los distintos tejidos. Además, explorar cómo los tejidos regulan la absorción, distribución y eliminación de cobre en respuesta a diferentes dosis, esto podría proporcionar una comprensión más detallada de los procesos adaptativos.
- **Interacciones entre tejidos:** Investigar cómo los diferentes tejidos interactúan entre sí en términos de la acumulación y regulación de cobre. Por ejemplo, cómo la acumulación en un tejido específico puede influir en la acumulación en otros tejidos y como estas interacciones pueden modular las respuestas observadas.
- **Efectos funcionales y patológicos:** Explorar las implicaciones funcionales y patológicas de la acumulación diferencial de la MOF de cobre en distintos tejidos, es decir, ¿cómo podría afectar esta acumulación a la función normal de cada tejido? o bien, ¿qué implicaciones podría tener para la salud general?
- **Optimización de la dosis:** Investigar el efecto de dosificaciones variables en un rango más amplio para comprender mejor los umbrales de acumulación de cobre liberado desde la MOF en cada tejido y cómo estos podrían variar en diferentes condiciones.
- **Evaluación a largo plazo:** Realizar estudios a largo plazo para analizar cómo los tejidos responden a la acumulación de cobre liberado desde la MOF a lo largo del tiempo. Esto podría revelar patrones de adaptación a largo plazo y proporcionar información sobre como los tejidos mantienen la homeostasis en presencia de concentraciones cambiantes de cobre.

10. Referencias

1. Cholewińska, E., Ognik, K., Fotschki, B., Zduńczyk, Z., & Juśkiewicz, J. (2018). Comparison of the effect of dietary copper nanoparticles and one copper (II) salt on the copper biodistribution and gastrointestinal and hepatic morphology and function in a rat model. *PLoS One*, *13*(5), e0197083.
2. Crane, G. M., Liu, Y. C., & Chadburn, A. Spleen: development, anatomy and reactive lymphoid proliferations. In *Seminars in Diagnostic Pathology* (Vol. 38, No. 2, pp. 112-124). WB Saunders.
3. Feoktistova Victorava, L., & Clark Feoktistova, Y. (2018). El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Medisur*, *16*(4), 579-587.
4. Ferraz, N. V. D. A. (2017). Desenvolvimento de um novo sensor eletroquímico para detecção de glutatona reduzida: baseado no metal organic framework cobre (ii)-benzeno-1, 3, 5-tricarboxilato.
5. Tapia, C. E. F., & Cevallos, K. L. F. (2021). Pruebas para comprobar la normalidad de datos en procesos productivos:: Anderson-darling, ryan-joiner, shapiro-wilk y kolmogórov-smirnov. *Societas*, *23*(2), 83-106.
6. García-Martínez, B. A., Montes, S., Tristán-López, L., Quintanar-Guerrero, D., Melgoza, L. M., Baron-Flores, V., & Ríos, C. (2021). Copper biodistribution after acute systemic administration of copper gluconate to rats. *Biometals*, *34*(3), 687-700.
7. Gutiérrez, B. A. (2007). *Efecto de la raza sobre la acumulación de cobre en terneros de cebo*. Univ Santiago de Compostela.
8. Tapiero, H., Townsend, D. Á., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *57*(9), 386-398.
9. Hernández Tiedra, S. (2008). Determinantes moleculares implicados en el tráfico intracelular del transportador de cobre ATP7B, responsable de la enfermedad de Wilson.[Tesis doctoral].
10. Guo, H., Wang, Y., Cui, H., Ouyang, Y., Yang, T., Liu, C., ... & Deng, H. (2022). Copper induces spleen damage through modulation of oxidative stress, apoptosis, DNA damage, and inflammation. *Biological Trace Element Research*, 1-9.

11. Kim, B. E., Nevitt, T., & Thiele, D. J. (2008). Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature chemical biology*, 4(3), 176-185.
12. La Fontaine, S., & Mercer, J. F. (2007). Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 463(2), 149-167.
13. Manrique-Arias, J. C., Carrasco-Hernández, J., Reyes, P. G., & Ávila-Rodríguez, M. A. (2016). Biodistribution in rats and estimates of doses to humans from $^{64}\text{CuCl}_2$, a potential theranostic tracer. *Applied Radiation and Isotopes*, 115, 18-22.
14. Montes, S., Rivera-Mancia, S., Diaz-Ruiz, A., Tristan-Lopez, L., & Rios, C. (2014). Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.
15. Pacheco Hernández, H. (2021). *Síntesis de Mg-MOF-74 y Cu-MOF-74 para la separación de compuestos aromáticos simples* (Master's thesis, Universidad Autónoma Metropolitana (México). Unidad Azcapotzalco. Coordinación de Servicios de Información.).
16. Peña Rodríguez, J. C. (2022). La sabiduría del riñón III. La adaptación de la función renal a su daño progresivo. Hipótesis de la nefrona intacta. *Acta médica Grupo Ángeles*, 20(2), 207-217.
17. Platonova, N. A., Barabanova, S. V., Povalikhin, R. G., Tsymbalenko, N. V., Danilovskii, M. A., Voronina, O. V., ... & Puchkova, L. V. (2005). In vivo expression of copper-transporting proteins in rat brain regions. *Biology Bulletin*, 32, 108-120.
18. Puig, S., & Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 171-180.
19. Ramos, D., Aguila-Rosas, J., Quirino-Barreda, C. T., Santiago-Tellez, A., Lara-García, H. A., Guzmán, A., ... & Lima, E. (2022). Linezolid@ MOF-74 as a host-guest system with antimicrobial activity. *Journal of Materials Chemistry B*, 10(48), 9984-9991.
20. Rodríguez, E., & Pescador, B. (2009). Metabolismo, regulación y función del cobre. *Revista Semilleros*, 3(1), 16-22.

21. Rose, F., Hodak, M., & Bernholc, J. (2011). Mechanism of copper (II)-induced misfolding of Parkinson's disease protein. *Scientific reports*, 1(1), 11.
22. Iannacone Silva, E. P. (2014). Efectos de la deficiencia aislada y simultánea de hierro y cobre sobre la actividad del citocromo C oxidasa del musculo esquelético en ratas.[Tesis doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. *Cybertesis*. Efectos de la deficiencia aislada y simultánea de hierro y cobre sobre la actividad de la citocromo C oxidasa del musculo esquelético en ratas. (unmsm.edu.pe).
23. Villegas-Fernández, M. H., Carpio-Granillo, M., Vargas-Hernández, E., Zuno-Cruz, F. J., & Sánchez-Cabrera, G. (2021). Una revisión general de las estructuras metal-orgánicas (MOF) dentro de la química inorgánica. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías Del ICBI*, 8(16), 18-29.
24. Xiao, J., Zhu, Y., Huddleston, S., Li, P., Xiao, B., Farha, O. K., & Ameer, G. A. (2018). Copper metal-organic framework nanoparticles stabilized with folic acid improve wound healing in diabetes. *ACS nano*, 12(2), 1023-1032.