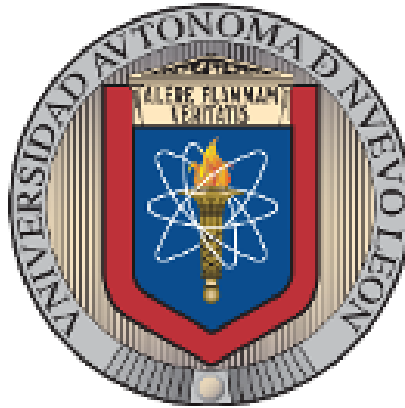


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROTÓXICO MEDIADO
POR LA EXPOSICIÓN A COBRE EN UN MODELO *IN VIVO*
Y SU INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

TESIS DE DOCTORADO

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

M.C. ALFREDO GONZÁLEZ ALCOCER

SEPTIEMBRE 2023

**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROTÓXICO MEDIADO
POR LA EXPOSICIÓN A COBRE EN UN MODELO *IN VIVO*
Y SU INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

APROBACIÓN DE TESIS



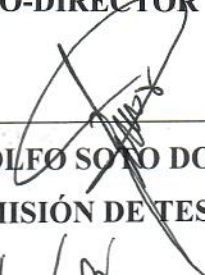
Dr. en C. HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA

DIRECTOR



Dra. en C. ARACELY GARCÍA GARCÍA

CO-DIRECTOR



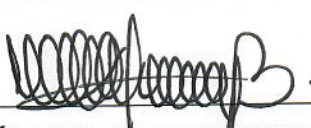
Dr. en C. ADOLFO SOTO DOMÍNGUEZ

COMISIÓN DE TESIS



Dr. en C. UZIEL CASTILLO VELÁZQUEZ

COMISIÓN DE TESIS



Dra. en C. MARÍA DEL CARMEN BARBOZA CERDA

COMISIÓN DE TESIS



Dr. en Med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROTÓXICO MEDIADO
POR LA EXPOSICIÓN A COBRE EN UN MODELO *IN VIVO*
Y SU INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

Presentado por:

M.C. Alfredo González Alcocer

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, del
Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma
de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. en C. Humberto Rodríguez Rocha y la co-
dirección de la Dra. en C. Aracely García García.**

Monterrey, Nuevo León

Septiembre 2023

"The only way of discovering the limits of the possible is to venture a little way past them
into the impossible."

Isaac Asimov (1920-1992)

Agradecimientos

A mis padres, por ser los que me dieron las herramientas y las oportunidades, para lograr metas nuevas en mi vida.

A mis hermanos, Jessica y Diego, que fueron motor de mi día a día, aún en la distancia, siempre estuvieron en mi mente y en mi corazón.

A la Dra. Aracely, por darme la oportunidad de ser su estudiante, por aprender de ella y por tanta paciencia.

Al Dr. Humberto, por enseñarme a ver las cosas de otra manera, su peculiar manera de enseñar me ha dejado, grandes enseñanzas.

Al Dr. Adolfo, por enseñarme desde un principio a trabajar en el laboratorio, por sus consejos y su valiosa aportación en mi formación académica.

Al Dr. Uziel, por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus consejos y su aportación en mi formación académica.

A la Dra. María del Carmen, por sus consejos y su aportación en mi formación académica.

Al Dr. Miguel, por su colaboración y su aportación en mi formación académica.

Al Dr. Roberto Montes, por darme la oportunidad desde el servicio social de integrarme al Departamento de Histología.

A mis compañeros del Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, Yareth, Ana y Diego, por su apoyo incondicional, que sin ustedes esto no habría sido posible.

Al personal del Departamento de Histología, Juany, Edith, Jaime, Iván, Luis, todos fueron parte de este gran viaje, agradezco sus palabras, las risas y los momentos que pudimos compartir.

A mis amigos, por siempre estar al alcance de una llamada o un mensaje, para darme sus consejos cuando más lo necesité.

A mi mejor amigo, Neri, por el apoyo que siempre obtuve de ti.

A mi futura esposa, Ilse, por darme esa energía extra en los momentos que más lo necesité.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca de maestría.

Dios, gracias por tanto.

Lista de Abreviaturas

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
1×	Uno por
16S	Subunidad ribosomal 16S
2- $\Delta\Delta$ Ct	Método Dos delta delta CT
3N	Fibras del tercer nervio
A30P	Variante Alanina 30 cambia a prolina
A53T	Variante Alanina 53 cambia a treonina
Abcam	Productor, distribuidor y vendedor de herramientas de investigación
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	Vía autofagia-lisosomal, por sus siglas en inglés
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ANOVA	Análisis de la varianza
anti	anticuerpo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
Asp-2	Ácido aspártico 2
ATG5	Proteína relacionada a la autofagia 5
Atox1	Chaperona antioxidante de cobre 1
ATP7A	ATPasa tipo P transportadora de cobre alfa
ATP7B	ATPasa tipo P transportadora de cobre beta
ATPasa	Enzimas catalizadoras de la descomposición de ATP en ADP y un ion de fosfato libre
Bio-Rad®	Desarrollador y fabricante estadounidense de productos tecnológicos
bp	Pares de bases
C57BL/6J	Cepa endogámica común de ratón de laboratorio
Ciclina D1	Proteína que es codificada en humanos por el gen <i>CCND1</i>
CICUAL	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Cp	Ceruloplasmina
CP	Pedúnculo cerebral
Ct	Umbral de ciclo, por su siglas en inglés, Cycle threshold
CTCF	Fluorescencia celular total corregida
Ctr1	Proteína transportadora de cobre 1 en ratones
CTR1	Proteína transportadora de cobre 1 en humanos
Cu	Cobre
Cu ⁺	Cobre +1 valente
Cu ²⁺	Cobre +2 valente
CuCl ₂	Cloruro de cobre II
DA	Dopamina
DAB	Diaminobencidina
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DCT1	Proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural 2
dH ₂ O	Agua destilada
DLB	Demencia con cuerpos de Lewy
DMT1	Proteína de transporte de metal divalente 1
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleótido
Dr. en C.	Doctor en Ciencias
Dra. en C.	Doctora en Ciencias
Dr. en Med.	Doctor en Medicina
E	Número total de animales – Número total de grupos
E46K	Variante Ácido glutámico 46 cambia a Lisina
EA	Enfermedad de Alzheimer
ecSOD	Superóxido dismutasa extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de Protección Ambiental, por sus siglas en inglés, Environmental Protection Agency
EE. UU.	Estados Unidos
EGTA	Ácido tetraacético de etilenglicol
EP	Enfermedad de Parkinson

EPR	Espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones
etc.	Etcétera
Fig.	Figura
G	Gauge
g	Gramos
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GI	Gastrointestinales
Gr	Gravedad
GSH	Glutación
h	Hora
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
H ₂ O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
His-50	Histidina-50
HyE	Hematoxilina y eosina
IBA-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1
Inc.	Incorporated
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Intra peritoneal
KCl	Cloruro de potasio
LC3	Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos
LC3 I	Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos I
LC3 II	Proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos II
LI-COR®	Empresa internacional de biotecnología
M	Molar
M.C.	Maestro en Ciencias
mA	Miliamperes
MA	Massachusetts
Mac OS	Sistema Operativo de Macintosh
ME	Mesencéfalo
Met-1	Metionina-1

mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo/Kilogramo
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercurio
MNK	Proteína de Menkes
MPTP	1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
MSA	Atrofia multisistémica
MT	Metalotioneína
N	Nitrógeno
n=	Número de la muestra
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE	Nevada
ng	Nanogramos
NH ₂	Radical amino
NOM	Norma Oficial Mexicana
Nram2	Transportador de metales Nramp2
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
<i>p</i>	Valor de probabilidad
p62	Secuestrosoma 1
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Enfermedad de Parkinson, por sus siglas en inglés, Parkinson's disease
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
RMN	Resonancia magnética nuclear
RN	Núcleo rojo
RNS	Especies reactivas de nitrógeno, por sus siglas en inglés, Reactive Nitrogen Species
ROS	Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species
S.A. de C.V.	Sociedad Anónima de Capital Variable
SC	Santa Cruz
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
SH-SY5Y	Tercera subclona de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH
SN	Sustancia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	Gen que codifica para la proteína alfa sinucleína, por sus siglas en inglés, synuclein alpha
SNE	Sistema nervioso entérico
SNET	Solución tampón de lisis
SOD	Superóxido dismutasa
SYBR	Colorante de cianina utilizado para la tinción de ácido nucleico
T4OLIGO®	Empresa productora de oligonucleótidos y lo relacionado a ácidos nucleicos
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TH	Tirosina hidroxilasa
TM	Marca comercial
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TX	Texas
U	Unidades
UI	Unidades Internacionales de insulina
Ulk1	Proteína cinasa Unc-51 activadora de autofagia

UV	Ultravioleta
V	Volts
WB	Western Blot
wt/vol	Peso/volumen
α -Syn	Alfa sinucleína
β	Beta
β -COO-	Grupo carbonilo β -insaturado
μ l	Microlitro

Lista de Figuras

- Fig. 1** Principales características histopatológicas de la EP.
- Fig. 2** Procesos involucrados en la patogénesis de la EP.
- Fig. 3** Transporte normal de cobre citoplasmático.
- Fig. 4** Distribución del cobre en células de mamífero.
- Fig. 5** Alteración de la homeostasis del cobre en la enfermedad de Menkes.
- Fig. 6** Alteración de la homeostasis del cobre en la enfermedad de Wilson.
- Fig. 7** Representación bidimensional de los modelos de unión putativos del Cu^{2+} a pH 7.4.
- Fig. 8** Representación de los parámetros evaluados en la prueba de la marcha.
- Fig. 9** La exposición crónica al cobre no afecta el peso ni la sobrevivencia de los ratones.
- Fig. 10** La exposición crónica al cobre altera la función motora.
- Fig. 11** La administración crónica de cobre conduce a la pérdida neuronal dopaminérgica.
- Fig. 12** La exposición crónica a cobre induce astrocitosis.
- Fig. 13** La exposición crónica a cobre induce microgliosis.
- Fig. 14** La exposición crónica a cobre aumenta los niveles de la α -Syn.
- Fig. 15** La exposición crónica a cobre aumenta el patrón de ubiquitinación de proteínas *in vivo*.
- Fig. 16** La exposición crónica a cobre aumenta la fosforilación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina *in vivo*.
- Fig. 17** La exposición crónica a cobre aumenta los niveles de LC3-II.
- Fig. 18** La nitración de proteínas aumenta con la intoxicación crónica por cobre.
- Fig. 19** La exposición crónica a cobre altera el perfil de las familias bacterianas relacionadas con la EP.

Lista de Tablas

Tabla 1. Familias de bacterias seleccionadas, secuencias de oligonucleótidos, temperatura de alineamiento y tamaño del producto.

Contenido temático

Lista	de
Abreviaturas.....	IV
Lista	de
Figuras.....	X
Lista	de
Tablas.....	XI
Resumen.....	XV
Abstract.....	XVI
Introducción.....	1
Capítulo 1	
1.1 Antecedentes.....	4
1.1.1 La Enfermedad de Parkinson (EP).....	4
1.1.2 El cobre como ión metálico esencial.....	6
1.1.2.1 Mecanismo de regulación del	
cobre.....	7
1.1.3 El cobre en la neurodegeneración.....	9
1.1.3.1 Patologías causadas por el desbalance de los niveles de	
cobre.....	10
1.1.4 La α-Syn, ¿la verdadera culpable?.....	13
1.1.4.1 La α-Syn y las α-sinucleopatías.....	14
1.1.4.2 La α-Syn & el cobre.....	14
1.1.5 El sistema nervioso entérico (SNE), la microbiota y su relación con la	
EP.....	16
1.2 Justificación.....	19
1.3 Hipótesis.....	20
1.4 Objetivo	
General.....	21
1.5 Objetivos Específicos.....	22
Capítulo 2	

2.1	Materiales y métodos.....	23
2.1.1	Modelo animal.....	23
2.1.2	Evaluación del peso corporal y la supervivencia.....	24
2.1.3	Evaluación de la disfunción motora.....	24
2.1.4	Técnica de inmunofluorescencia (IF).....	25
2.1.4.1	Morfometría de los resultados por técnica de IF.....	27
2.1.5	Técnica de inmunohistoquímica (IHQ).....	27
2.1.5.1	Morfometría de cortes histológicos.....	27
2.1.6	Extracción de proteínas.....	28
2.1.7	Electroforesis en gel SDS-PAGE.....	28
2.1.8	Transferencia en cámara húmeda.....	29
2.1.9	Western Blot (WB).....	29
2.1.10	Extracción de ADN genómico.....	30
2.1.11	PCR punto final.....	30
2.1.12	qPCR tiempo real.....	31
2.1.13	Análisis estadístico.....	33
Capítulo 3		
3.1	Resultados.....	34
3.1.1	La concentración de cobre no altera el peso ni afecta el ciclo de vida...34	
3.1.2	Evaluación del efecto de la exposición crónica a cobre sobre la función motora.....	35

3.1.3 La exposición crónica a cobre reproduce las alteraciones motoras clásicas de la EP.....	35
3.1.4 Determinación del efecto del cobre sobre el SNC.....	36
3.1.5 La exposición crónica a cobre induce astrocitosis y microgliosis.....	38
3.1.6 Los niveles de α -Syn aumentan por la exposición crónica al cobre.....	41
3.1.7 Evaluación del efecto de la exposición crónica a cobre sobre los mecanismos de degradación de proteínas.....	43
3.1.8 La fosforilación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina aumenta en respuesta a la exposición prolongada al cobre <i>in vivo</i>	44
3.1.9 En el modelo <i>in vivo</i> de exposición crónica a cobre se incrementa la autofagia.....	46
3.1.10 Evaluación del estrés oxidativo en respuesta a la intoxicación por cobre.....	47
3.1.11 Caracterización de la microbiota intestinal en un modelo <i>in vivo</i> de exposición crónica a cobre.....	49
Capítulo 4	
4.1 Discusión.....	51
Capítulo 5	
5.1 Conclusiones.....	56
Literatura Citada.....	57
<i>Curriculum Vitae</i>	
Artículos Publicados	

Resumen

M.C. Alfredo González Alcocer

Fecha de Graduación: Septiembre 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: “EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROTÓXICO MEDIADO POR LA EXPOSICIÓN A COBRE EN UN MODELO *IN VIVO* Y SU INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL”

Número de páginas: 67

Área de Estudio: Morfología

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología

Propósito y Método de Estudio:

En el medio ambiente existen diversos agentes contaminantes: 1) químicos, 2) toxinas y 3) metales como el hierro, el manganeso, el zinc y el cobre, los cuales juegan un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. La exposición ocupacional al cobre aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson (EP). Mediante ensayos *in vitro* se han determinado los mecanismos por los cuales el cobre induce la muerte celular dopaminérgica. Sin embargo, el efecto de la exposición crónica al cobre *in vivo* sobre el proceso neurodegenerativo no había sido explorado. La evidencia sugiere que la EP comienza en el intestino y desde ahí se disemina al cerebro, causando una disbiosis de la microbiota intestinal que se ha asociado con trastornos neurológicos. En este estudio se evaluó el efecto de la exposición crónica (40 semanas) al cobre a 0, 100, 250 y 500 ppm por vía oral en ratones macho C57BL/6J. Mediante la prueba de la marcha, demostramos que la exposición crónica al cobre alteró la función motora. Además, demostramos la muerte de las neuronas dopaminérgicas utilizando microscopía de fluorescencia y western blot, así como astrocitosis y microgliosis, el incremento de la α -sinucleína, la ubiquitinación de proteínas, la fosforilación de AMPK, del marcador de autofagia LC3-II y el estrés nitrosativo, mediante la detección de la nitración de proteínas. Adicionalmente, se observó la alteración de la microbiota intestinal mediante qPCR, con el incremento de las familias *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidetes-Prevotellaceae* y *Enterococcaceae*, y la disminución de la familia *Enterobacteriaceae* de manera dependiente de la dosis de cobre. La familia *Lactobacillaceae* se incrementó en respuesta a la dosis de cobre de 100 ppm, y por el contrario, a las concentraciones de 250 y 500 ppm, disminuyó.

Conclusiones y contribuciones

La exposición crónica al cobre:

- Alteró la función motora.
- Indujo la muerte de las neuronas dopaminérgicas.
- Indujo astrocitosis y microgliosis.
- Aumentó la α -sinucleína, la ubiquitinación de proteínas, la fosforilación de AMPK y el marcador de autofagia LC3-II.
- Indujo estrés nitrosativo.
- Alteró la microbiota intestinal.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que establece la exposición crónica durante el envejecimiento al cobre como un modelo *in vivo* de la EP no genética, lo que podría ayudar a evaluar posibles agentes profilácticos y blancos terapéuticos.

Director: Dr. en C. Humberto Rodríguez Rocha

Abstract

The environment, which contains chemical pollutants, toxins, and transition metals (copper, iron, manganese, and zinc), plays a fundamental role in neurodegenerative disease development. Occupational exposure to copper increases the risk of developing Parkinson's disease (PD). Previously, the mechanisms by which copper induces dopaminergic cell death *in vitro* were determined, where overexpression of copper transporter protein 1 (Ctr1) led to intracellular glutathione (GSH) depletion, enhancing caspase-3 mediated cell death; oxidative stress was mainly cytosolic, and Nrf2 was upregulated in an attempt to mediate an antioxidant response; protein ubiquitination and AMPK-Ulk1 signaling, p62, and Atg5-dependent autophagy were also increased as a protective mechanism. However, the effect of chronic copper exposure on the neurodegenerative process has not been explored *in vivo*. In addition, there is evidence to suggest that PD begins in the gut and spreads to the brain; dysbiosis of the gut microbiota is associated with inflammatory and neurological disorders and may be influenced by the antimicrobial properties of copper. In the present study, we evaluated whether chronic copper exposure *in vivo* reproduces the characteristics and mechanisms of PD. Over 40 weeks, male C57BL/6J mice were orally treated with copper at 0, 100, 250, and 500 ppm.

We proved that chronic copper exposure altered motor function and induced dopaminergic cell death, astrogliosis, and microgliosis in a dose-dependent manner. α -Synuclein accumulation and aggregation were increased in response to copper, and the proteasome and autophagy alterations, previously observed *in vitro*, were confirmed *in vivo*, where protein ubiquitination, AMPK phosphorylation, and the autophagy marker LC3-II were also increased by copper exposure. Additionally, nitrosative stress was induced by copper in a concentration-dependent fashion, as evidenced by increased protein nitration. Finally, the alteration of the intestinal microbiota was observed by qPCR, with the increase of the families *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidetes-Prevotellaceae*, and *Enterococcaceae*, and the decrease of the *Enterobacteriaceae* family in a dose-dependent manner of copper. The *Lactobacillaceae* family increased in response to the copper dose of 100 ppm, and on the contrary, at concentrations of 250 and 500 ppm, it decreased. To our knowledge, this is the first study establishing chronic copper exposure as an *in vivo* model of non-genetic PD, which may help assess potential prophylactic and therapeutic approaches.

Introducción

El medio ambiente es clave en la salud y el desarrollo de enfermedades en los seres humanos, entre las cuales se incluyen el cáncer, diabetes, enfermedades pulmonares y neurodegenerativas. La exposición a agentes ambientales como contaminantes químicos, alergógenos, toxinas naturales y metales, tienen efectos nocivos para la salud, y se ha demostrado que contribuyen de manera substancial al desarrollo de enfermedades de alto impacto en la salud pública de la población en México [1].

La exposición crónica a metales de transición ha sido relacionada principalmente a desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Wilson, el síndrome de Hallervorden-Spatz, la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) [2-4].

La EP es el primer desorden neurodegenerativo motor más común en el mundo y afecta aproximadamente a 6 millones de personas. En México, la epidemiología de esta enfermedad no se ha explorado con precisión. Sin embargo, la Secretaría de Salud de México estima que existen al menos 500,000 personas afectadas. Mientras que el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ha estimado 50 casos nuevos por cada 100,000 habitantes al año. Por lo que en los próximos 50 años, aproximadamente una cuarta parte de la población será adulto mayor, y con ello se incrementará la incidencia de la EP [5].

La EP se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Desafortunadamente, la sintomatología clínica se presenta cuando ya existe una pérdida de 40-60% de estas neuronas [6].

Etiológicamente, el 90 % de los casos de la EP se deben a una causa idiopática, esto significa que en realidad no se conoce la causa, pero hay una relación entre la susceptibilidad genética, el envejecimiento y los factores ambientales [7, 8].

Una de las principales características histológicas de la EP, son los cuerpos de Lewy, que son agregados proteicos compuestos mayormente por la proteína α -sinucleína (α -Syn), ésta es una proteína nativa no plegada, soluble en el citoplasma. Las duplicaciones del gen *SNCA*, que codifica para la α -Syn, están presentes en pacientes diagnosticados con la EP familiar. Las alteraciones del gen *SNCA* también se han relacionado con la EP de origen esporádico. Por lo que, la variabilidad de la secuencia del promotor del gen *SNCA* está

asociada con el incremento de expresión de la α -Syn y el aumento del riesgo de desarrollar la EP de manera esporádica [9, 10].

Para el estudio de la EP, se han generado diversos modelos animales transgénicos que sobreexpresan la α -Syn silvestre o versiones mutantes, para determinar el papel de su sobreexpresión y las mutaciones de esta proteína *in vivo*. Sin embargo, en ninguno de estos modelos se reproducen todas las características de la EP. En particular, desarrollan cuerpos de Lewy sin pérdida de neuronas dopaminérgicas. Por lo que estas observaciones sugieren que hay otros factores involucrados, incluyendo el envejecimiento y la exposición a factores ambientales tóxicos, entre ellos los metales de transición como el cobre, que contribuyen al desarrollo de la EP asociada con mutaciones en el gen *SNCA* [7, 9].

Estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a metales pesados que se encuentran en el medio ambiente están involucrados en la etiología de la EP [11]. Se ha propuesto que el desbalance intracelular de los iones metálicos es un fenómeno que contribuye con el desarrollo esta patología [12]. De manera interesante, pacientes con la EP muestran un incremento de cobre tanto en el líquido cefalorraquídeo como en la sangre [13]. Asimismo, la exposición ocupacional a este ion metálico aumenta el riesgo de desarrollar la EP [14-16].

El cobre es un ion metálico esencial, el cual puede ser adquirido en la dieta, así como por vía aérea [17]. Este metal es utilizado por muchas proteínas como cofactor para realizar procesos enzimáticos vitales en múltiples órganos como el hígado, la vesícula biliar y el cerebro, y es distribuido por los transportadores de cobre a todo el cuerpo. Cuando hay un exceso de cobre, éste es excretado para mantener las cantidades requeridas por nuestro cuerpo. Sin embargo, el desbalance intracelular de cobre induce alteraciones en la función de los diferentes tipos celulares, entre ellas las neuronas [17]. Asimismo, el cobre que se encuentra libre en el espacio intracelular tiene la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS), y por ende el exceso de ROS resulta tóxico llevando a la muerte celular. Previamente, se ha demostrado que el cobre tiene afinidad por la α -Syn [18]. Además, se han propuesto dos mecanismos del proceso de agregación de la α -Syn mediada por cobre. En el primero, los niveles altos de complejos de α -Syn-cobre provocan inestabilidad en las interacciones intramoleculares y conducen al autoensamblaje de α -Syn en complejos fibrilares. Mientras que, en el segundo, las reacciones redox

mediadas por el cobre inducen la oxidación de α -Syn utilizando donantes de electrones (NADH, NADPH, glutatión, etc.), provocando su oligomerización y precipitación por oxidación [19-22].

Adicionalmente, existe evidencia que indica que en la EP también se afectan varias estructuras neuronales fuera del sistema nervioso central (SNC), entre las cuales se encuentra el sistema nervioso entérico (SNE). Entre los cambios que se han detectado en los tejidos gastrointestinales en pacientes con EP, se encuentra la acumulación de α -Syn en el SNE [23], el deterioro de la barrera de la mucosa del colon [24] y la invasión bacteriana [25]. De acuerdo con estas características patológicas, existe una alta frecuencia de varios síntomas gastrointestinales (GI) como el estreñimiento, que se considera como el síntoma pre-motor más frecuente en pacientes con la EP, cuya aparición se presenta aproximadamente 20 años antes que los síntomas motores clásicos [26]. Por lo que actualmente se piensa que la formación de los cuerpos de Lewy se manifiesta en las neuronas entéricas mucho antes que en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, y antes de que los síntomas de la EP sean evidentes [27]. Por lo tanto, debido a que el intestino es una ruta importante de ingreso de agentes tóxicos ambientales (contaminantes químicos, toxinas y metales de transición) que pueden contribuir con el inicio de la patología de la EP, se cree que alteraciones en la interacción intestino-cerebro influyen en el desarrollo de la EP [28, 29].

En el presente estudio, demostramos el efecto neurotóxico de la exposición crónica a cobre durante el envejecimiento *in vivo*, así como la relación con alteraciones en la microbiota intestinal, estableciendo por primera vez un modelo no genético de la EP por exposición crónica a este metal de transición.

Capítulo 1

1.1 Antecedentes

1.1.1 La Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es el primer desorden neurodegenerativo motor más común en el mundo, y afecta aproximadamente a 6 millones de personas. En México, la epidemiología de esta enfermedad no se ha explorado con precisión y se estima que existen al menos 500,000 personas afectadas por esta enfermedad (Secretaría de Salud de México).

La EP se caracteriza por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (**Fig. 1**). Desafortunadamente, la sintomatología clínica se presenta cuando ya existe una pérdida de 40-60% de estas neuronas [6].

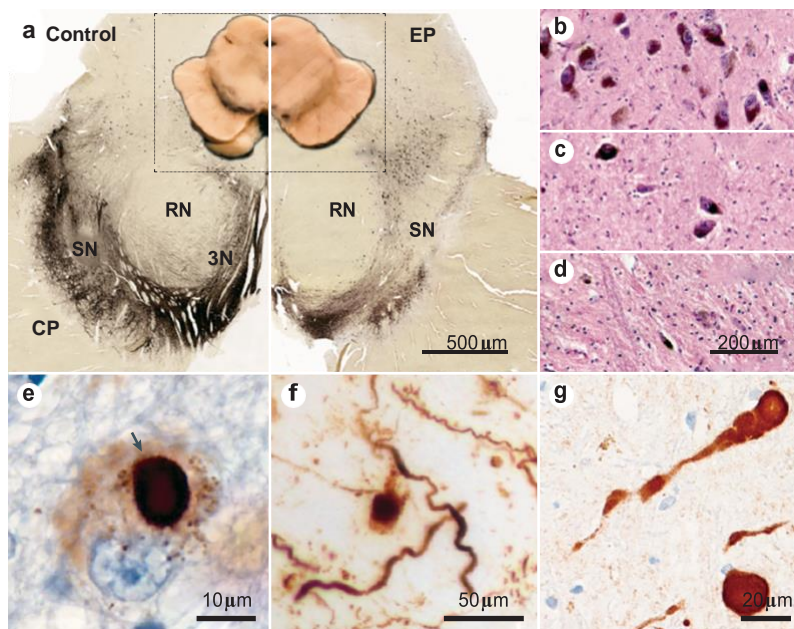


Fig. 1 Principales características histopatológicas de la EP. a. La EP se define por la pérdida de la sustancia nigra (SN) (panel derecho) en comparación con el control (panel izquierdo). Secciones microscópicas (recuadro) y transversales del mesencéfalo tras la tinción IHQ para tirosina hidroxilasa (TH). b-d. Tinción con hematoxilina y eosina (HyE) de la región ventrolateral del SN mostrando una distribución normal de neuronas pigmentadas en un control sano (b) y pérdida de células pigmentadas moderada (c) o grave (d) significativa desde el punto de vista diagnóstico en la EP. e-g. La tinción IHQ de la α -Syn muestra la redondez intracitoplasmática. Cuerpos de Lewy (flecha en el panel e), depósitos granulares más difusos de α -Syn (e y f), depósitos en procesos de células neuronales (f), α -Syn extracelular en forma de punto estructuras (f), α -Syn extracelular en patrón punteado (f) y estructuras esferoides de α -Syn en axones (g). 3N, fibras del tercer nervio; CP, pedúnculo cerebral; RN, núcleo rojo [30].

Dentro de la etiología de la EP el 90 % de los casos se deben a una causa idiopática, esto significa que no se conoce la causa exacta, pero hay una relación entre la susceptibilidad genética, el envejecimiento y factores ambientales.

La muerte de las neuronas dopaminérgicas es una de las principales características de la EP, pero aún no se conocen los mecanismos moleculares implicados en ésta. Sin embargo, existe evidencia que señala que la disfunción mitocondrial, la acumulación anormal de proteína y el estrés oxidativo están involucrados en la muerte neuronal en la patogénesis de la EP (**Fig. 2**) [31, 32].

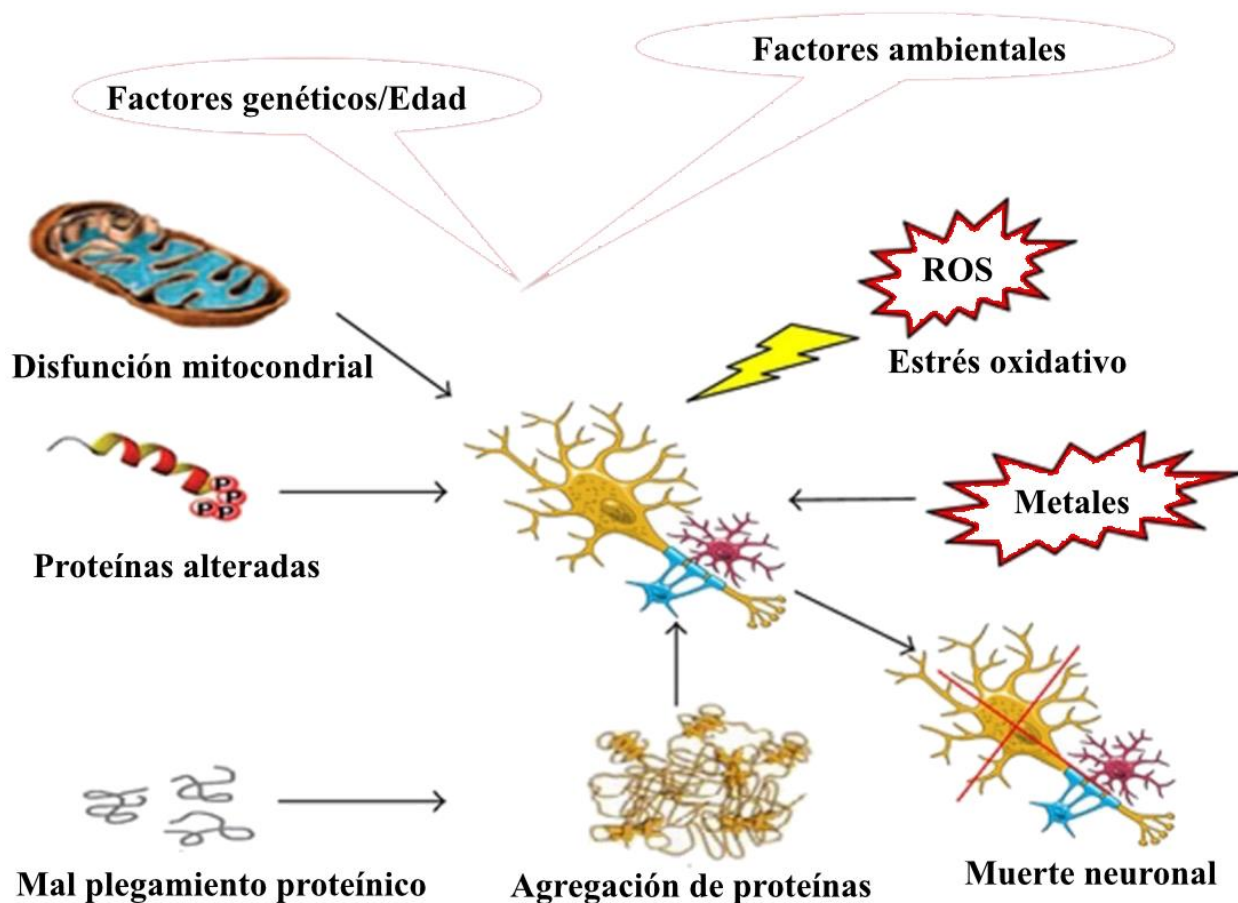


Fig. 2 Procesos involucrados en la patogénesis de la EP [31, 32].

De manera muy interesante, pacientes con la EP muestran un incremento de cobre tanto en el líquido cefalorraquídeo como en sangre [13]. Por lo que la exposición ocupacional a este ion metálico aumenta el riesgo de desarrollarla [14-16].

1.1.2 El cobre como ión metálico esencial

El cobre (Cu) es un ion metálico esencial, el cual puede ser adquirido mediante la ingesta en la dieta, así como por vía aérea. El cobre es importante para los seres vivos, tanto en su forma oxidada Cu^{2+} , como en su forma reducida Cu^+ [33]. Este metal de transición interviene en la fosforilación oxidativa mitocondrial, la desintoxicación de radicales libres, la síntesis y desnaturalización de neurotransmisores, la formación de pigmentos, la síntesis de tejido conectivo y el metabolismo del hierro [34, 35].

El ser humano adulto tiene aproximadamente una concentración de 100 mg de cobre, distribuidos en medula ósea (46 mg), músculo esquelético (26 mg), hígado (10 mg), cerebro (8 mg) y sangre (6 mg) [33]. Asimismo, se calcula que la concentración de cobre libre en el tejido sanguíneo es de entre 10^{-18} a 10^{-13} M [33, 36-38].

El cobre es utilizado por muchas proteínas como cofactor para realizar procesos enzimáticos vitales en múltiples órganos como el hígado, la vesícula biliar y el cerebro. El cobre puede ser distribuido por todo el cuerpo por medio de transportadores, y es excretado para mantener el balance del mismo. En condiciones fisiológicas, la concentración de cobre libre dentro de la célula se mantiene muy baja [39]. Sin embargo, el desbalance intracelular de cobre ocasiona la aparición de diversas patologías e induce defectos característicos en la función neurológica [17]. Simultáneamente, este metal interviene en otros procesos no enzimáticos como lo son la angiogénesis, mielinización de nervios y la actividad de endorfinas [40]; también tiene un papel relevante en el desarrollo cerebral, reproducción, expresión génica, desarrollo y crecimiento sano [41, 42].

Por otra parte, los biometales intrínsecos como el cobre, pueden desempeñar un papel importante como factores/cofactores en la etiología de varias enfermedades neurológicas [43].

1.1.2.1 Mecanismo de regulación del cobre

El cobre puede ser absorbido en el estómago y el intestino delgado, principalmente en la región del íleon [38]. Asimismo, el tracto gastrointestinal recibe alrededor de 1 mg de cobre al día proveniente de la dieta y alrededor de 4.5 mg/día a través de la saliva, bilis, jugos gástricos y células en apoptosis de la mucosa gastrointestinal (**Fig. 3**) [44].

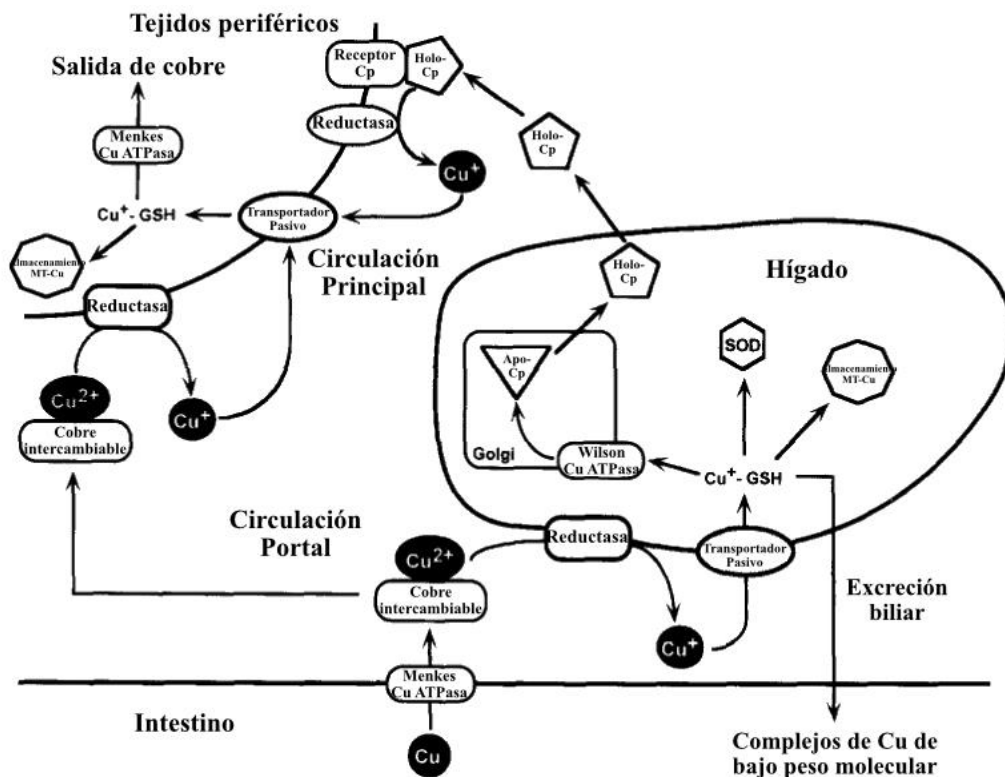


Fig. 3 Transporte normal de cobre citoplasmático. El cobre se absorbe en el tracto gastrointestinal y entra en el grupo de cobre intercambiable. Este conjunto consta de cobre unido a albúmina y complejos de aminoácidos de bajo peso molecular en forma de Cu^{2+} . Durante la captación, el cobre se reduce a Cu^+ por una reductasa de membrana y es absorbido por la célula a través de un transportador pasivo. El cobre de la ceruloplasmina (Cp) también puede ser absorbido por las células. En esta vía, la Cp interactúa con un receptor de la superficie celular y sus átomos de cobre se reducen a Cu^+ por una reductasa de membrana. Luego, la célula toma Cu^+ por transporte pasivo. Al ingresar al citoplasma, el cobre puede formar complejos con una variedad de ligandos. Sin embargo, se cree que la mayoría del cobre citoplasmático forma complejos con el glutatión (GSH) como Cu^+ . El complejo Cu^+ -GSH puede entonces donar cobre a varias proteínas intracelulares como la superóxido dismutasa (SOD) y la metalotioneína (MT). La cobre-ATPasa de Wilson, que se puede colocar en la membrana del Golgi, es responsable de proporcionar cobre a las proteínas necesarias en la vía excretora como la ceruloplasmina. Esta ATPasa también puede estar involucrada en el movimiento de átomos de cobre a través de la membrana canalicular y en la bilis [45].

Dentro del organismo, a nivel celular, la principal proteína de transporte del cobre en los enterocitos es la proteína transportadora de cobre 1 (CTR1). Esta proteína se localiza en la membrana plasmática de los enterocitos, otorga una vía permeable a los iones Cu^{2+} y puede internalizarse ante una alta concentración de cobre [46].

Por otro lado, el transporte del ion Cu^+ en las células intestinales es llevado a cabo por la proteína de transporte de metal divalente 1 (DMT1), conocido también como Nram2 o DCT1 [47]. Cuando el cobre llega al citoplasma, es transportado por medio de metalotioneínas [48, 49], siendo la unión del cobre a las metalotioneínas un proceso esencial para evitar la toxicidad y estrés oxidativo inducido por el cobre [50]. Las metalotioneínas se encargan del transporte del cobre desde el polo luminal de las células intestinales hasta el polo baso-lateral [51]. Después, partiendo de la región baso-lateral, es transportado por la principal proteína transportadora de cobre a través de la membrana basal celular, la ATP7A, conocida también como proteína de Menkes (MNK) [52].

La ATP7A en conjunto con la ATP7B (proteína Wilson), llevan a cabo funciones esenciales en la homeostasis del cobre [53]. En el hígado la ATP7B se localiza en la red *trans* Golgi, en donde provee iones cobre a cupro-enzimas esenciales. En condiciones de estrés, tanto la ATP7A como la ATP7B detectan el incremento de los niveles de cobre y se translocan a la membrana de la célula para liberar el exceso de cobre al espacio extracelular (**Fig. 4**) [54].

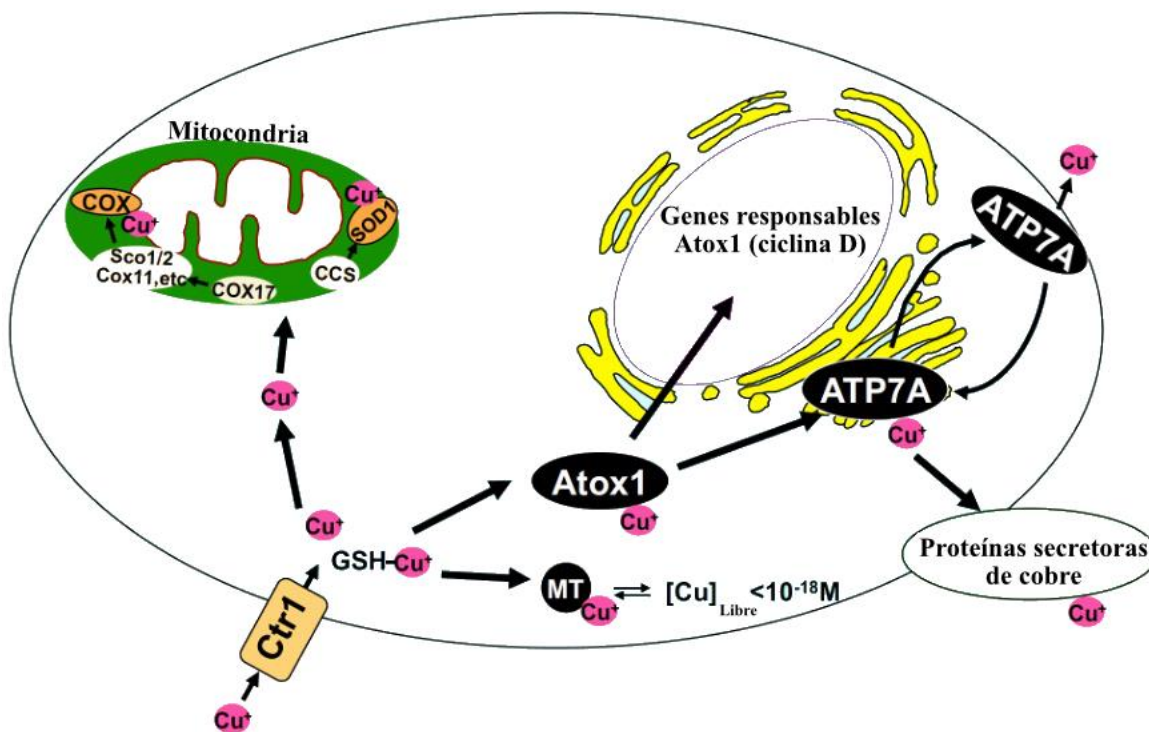


Fig. 4 Distribución del cobre en células de mamífero. El cobre es distribuido por el transportador de cobre (CTR1); las proteínas transportadoras de cobre citosólicas solubles denominadas “chaperonas de cobre” pueden obtener el cobre directamente del CTR1 o del GSH y son necesarias para transportar cobre a enzimas específicas que requieren cobre, a través de interacciones directas proteína-proteína. Atox1 funciona como un factor de transcripción dependiente de cobre para genes sensibles a Atox1, como ecSOD y ciclina D1. Las concentraciones citosólicas de cobre libre se mantienen típicamente en niveles específicamente bajos (10^{-18} M) mediante sistemas de captación de metales, incluida la metalotioneína (MT) [55].

1.1.3 El cobre en la neurodegeneración

El cobre tiene la capacidad de inducir la producción de ROS y por ende resulta altamente tóxico en exceso.

Como consecuencia de la alteración en los niveles de cobre en el cerebro, se ha observado que en diversas enfermedades causa muerte celular, agregación de proteínas [56, 57], estrés oxidativo [58, 59] y disfunción mitocondrial [60].

Algunos metales de transición, entre ellos el cobre, aceleran la formación de fibras de α -Syn en modelos *in vitro* [61]. Asimismo, se ha demostrado que el cobre es el ion más efectivo en promover la oligomerización de α -Syn [62].

También, se ha demostrado que la sobreexpresión de α -Syn no induce muerte celular por sí misma. Cuando se sobreexpresa α -Syn silvestre o mutante (α -Syn A53T) en presencia de cobre hay un efecto sinérgico para inducir la muerte celular dopaminérgica *in vitro* [63].

Estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a metales de transición, que se encuentran en el medio ambiente, son factores involucrados en la etiología de la EP [11], y causan cambios conformacionales en la α -Syn, incluyendo la oligomerización y la fibrogénesis. La patogenicidad de estos cambios conformacionales aún no se conoce. Aunque se ha propuesto que el desbalance intracelular de los iones metálicos es un fenómeno que contribuye en el desarrollo de la EP [12].

Si bien se ha observado que la homeostasis del cobre está alterada en pacientes que padecen la EP, su papel en la formación de los cuerpos de Lewy y el desarrollo de esta enfermedad aún no está claro. Sin embargo, algunos estudios indican que el desbalance homeostático del cobre en el SNC contribuye a la formación de agregados de α -Syn y al desarrollo de la EP.

1.1.3.1 Patologías causadas por el desbalance de los niveles de cobre

Una gran parte del conocimiento sobre los mecanismos homeostáticos del cobre a nivel molecular, proviene de los modelos de dos enfermedades relacionadas con el metabolismo del cobre: la enfermedad de Menkes (**Fig. 5**), la cual se caracteriza por una aparente deficiencia de cobre; y la enfermedad de Wilson (**Fig. 6**), debido a una sobrecarga de cobre en el individuo [64-66]. Esta última, es una enfermedad por intoxicación con cobre que afecta principalmente al hígado, pero en su etapa final los pacientes presentan síntomas de la EP y neurodegeneración [67]. Ambas enfermedades son diferentes entre sí, pero su origen surge a partir de la alteración de dos bombas de cobres muy similares, la ATP7A y ATP7B [68].

La enfermedad de Menkes es causada por una alteración en la bomba ATP7A por lo que los pacientes no pueden expulsar el cobre de las células intestinales, lo cual evita que el metal llegue del torrente sanguíneo y al hígado, y de ahí al resto del cuerpo [69], mimetizándose como una severa deficiencia nutricional de cobre.

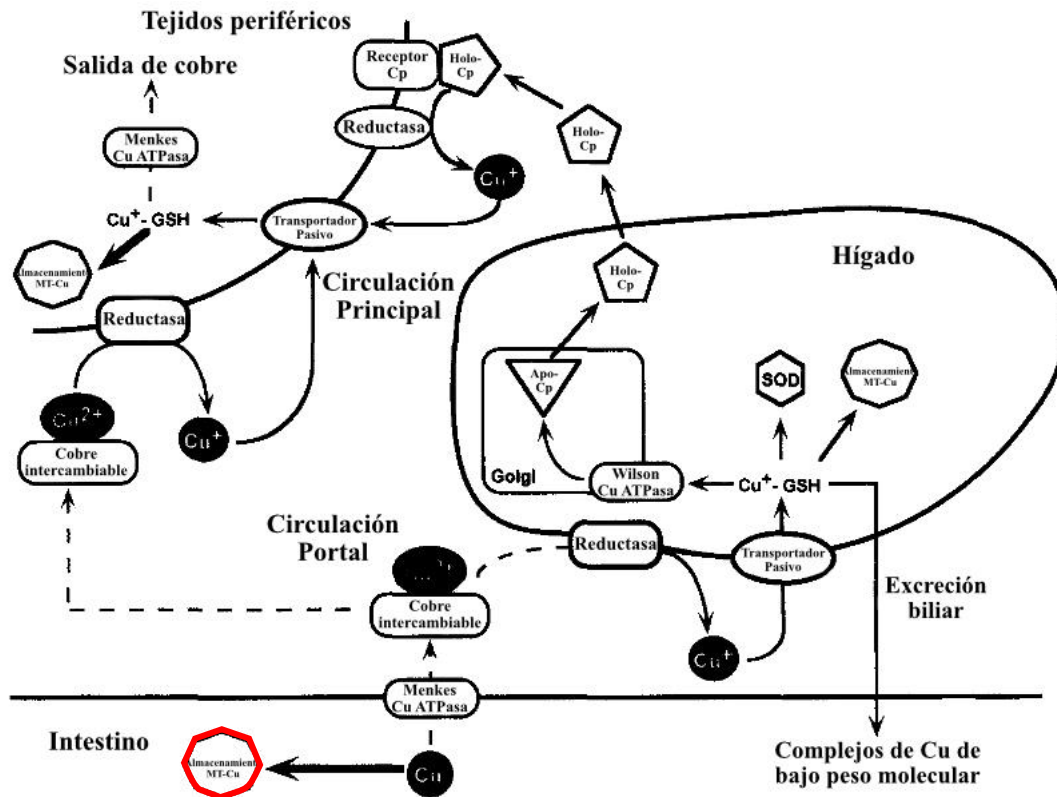


Fig. 5 Alteración de la homeostasis del cobre en la enfermedad de Menkes. En la enfermedad de Menkes, la absorción de cobre en el tracto gastrointestinal es gravemente impedida. Las cantidades crecientes de cobre en la luz intestinal conducen al incremento de metalotioneína y al almacenamiento de cobre como el complejo cobre-metalotioneína. La absorción y excreción de cobre por el hígado son normales, al igual que los niveles de enzimas que utilizan el cobre como cofactor. La absorción intestinal severamente disminuida de cobre da lugar a una escasez de cobre intercamiable seguida de una deficiencia de cuproenzimas importantes para el desarrollo. La absorción por los tejidos periféricos es normal; sin embargo, la excreción y el tráfico de cobre intracelular se ven interrumpidos por mutaciones en el gen *ATP7A* asociado a Menkes. Como resultado de la salida deficiente de cobre, los tejidos periféricos de los pacientes con la enfermedad de Menkes tienden a acumular cobre en forma de metalotioneína de cobre [70].

Por otro lado, la enfermedad de Wilson es conocida también como degeneración hepatolenticular, es una enfermedad autosómica recesiva, en donde el transporte de cobre se encuentra alterado [65, 71]. Asimismo, esta enfermedad es provocada por la poca o nula incorporación del cobre en la ceruloplasmina derivando en una excreción biliar deficiente de cobre, debido a mutaciones en el gen que codifica para la proteína *ATP7B*. Esto permite el desarrollo de una toxicosis causada por el exceso de cobre almacenado en el organismo, principalmente en hígado y cerebro, y en menor cantidad en riñones, ojos y otros órganos [72]. Usualmente la sintomatología se manifiesta en los rangos de edad que abarcan desde los 3 a los 50 años de edad y los síntomas pueden ser variados. Los principales son manifestaciones hepáticas, neurológicas y psiquiátricas, y raramente renales, esqueléticas o

endocrinas. A nivel neurológico, el daño ocurre inicialmente en el putamen y globo pálido, conocidos en conjunto como núcleo lenticular (razón por la que a la enfermedad también se le denomina degeneración hepatolenticular [73]).

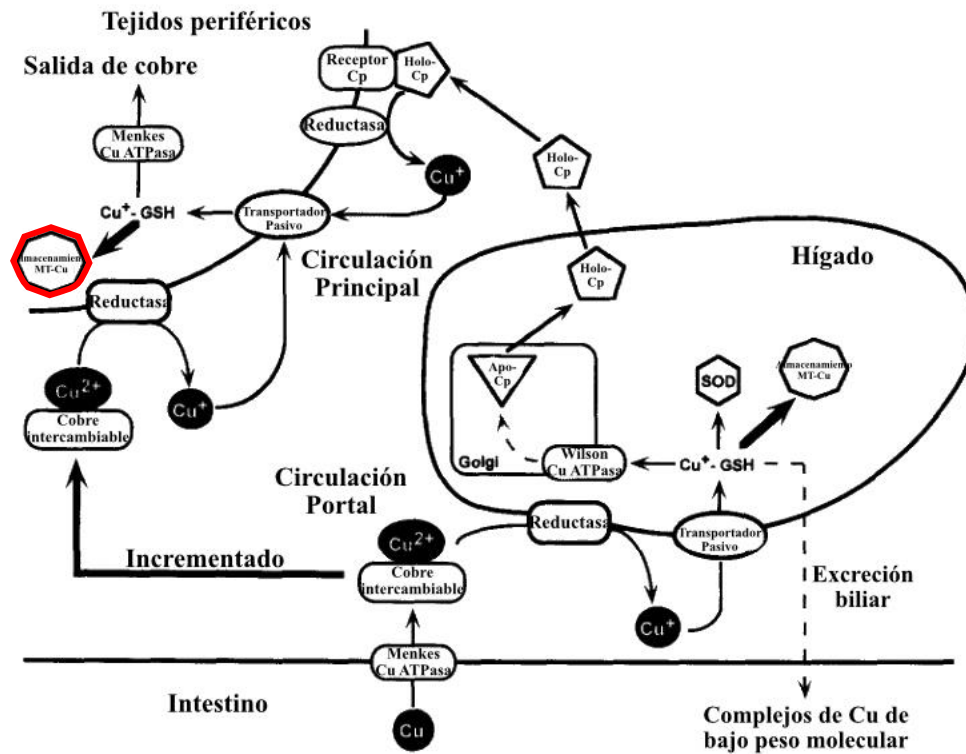


Fig. 6 Alteración de la homeostasis del cobre en la enfermedad de Wilson. En la enfermedad de Wilson la absorción de cobre por el intestino y el hígado es normal, sin embargo, se altera la excreción biliar de cobre y la incorporación de cobre a la ceruloplasmina (Cp). La excreción biliar severamente disminuida conduce a un aumento dramático en los niveles de cobre citosólico que conduce a un aumento importante en la cantidad de cobre unido a la metalotioneína (MT). A medida que avanza la enfermedad, el aumento del daño hepático conduce a la liberación de grandes cantidades de cobre no unido a ceruloplasmina que se acumulan en órganos periféricos como el cerebro, los riñones y la córnea. El depósito de cobre en la córnea conduce a la formación de anillos de Kayser-Fleischer que son característicos de la enfermedad [70].

Aunque el papel del cobre en patologías humanas no se limita solamente a las enfermedades de Wilson y enfermedad de Menkes, existen reportes que relacionan al cobre con el cáncer, la diabetes, a problemas cardiovasculares, la aterosclerosis y a enfermedades neurodegenerativas (EA, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y EP) [74][75].

Además, el cobre se encuentra relacionado con la aceleración en la agregación de la α -Syn, lo que favorece la formación de los cuerpos de Lewy en la EP [18].

1.1.4 La α -Syn, ¿la verdadera culpable?

La α -Syn nativa es una proteína no plegada y soluble en el citoplasma, que también se ha encontrado asociada a la membrana. Las mutaciones con cambio de sentido en el gen *SNCA* (A30P, A53T, y E46K), y las multiplicaciones génicas de *SNCA* están asociadas a la EP familiar, donde la edad del individuo y la severidad de la enfermedad están relacionadas a la mutación o al número de copias del gen. La multiplicación y las mutaciones puntuales en el gen, así como la expresión normal que conduzca a una agregación anormal de la proteína α -Syn [76-78] están implicadas en enfermedades clasificadas como α -sinucleopatías [79]. La EP se encuentra dentro de este tipo de patogénesis, debido a la presencia de agregados citoplásmicos de α -Syn en múltiples regiones del cerebro [80-82].

Se ha reportado que las duplicaciones del gen *SNCA* características de pacientes diagnosticados con la EP familiar, también están relacionadas con la EP de origen esporádico, así como la variabilidad del promotor está asociada con el incremento en la expresión de α -Syn y el aumento del riesgo de desarrollar la EP de manera esporádica [9, 10].

La agregación de α -Syn es modulada por diferentes mecanismos, incluyendo: la fosforilación, principalmente en el aminoácido S129 [83], la falta de la región C-terminal, así como su interacción con metales y las condiciones pro-oxidantes en el ambiente citoplasmático [9].

Se han generado diversos modelos animales transgénicos que sobreexpresan la α -Syn silvestre o versiones mutantes, para el estudio de la EP *in vivo*. Sin embargo, en ninguno de estos modelos se pueden reproducir todas las características de la EP. En particular, la pérdida de neuronas dopaminérgicas es pobremente observada en estos modelos transgénicos. Por lo tanto, estas observaciones sugieren la intervención de otros factores para el desarrollo de la EP asociada con mutaciones en el gen *SNCA*, entre los que se incluyen el envejecimiento y la exposición a factores ambientales tóxicos, como la exposición a metales de transición, entre ellos el cobre [7, 9].

1.1.4.1 La α -Syn y las α -sinucleopatías

Patológicamente, a las enfermedades caracterizadas por la formación de agregados de α -Syn en diferentes regiones del SNC y periférico se les conoce como sinucleinopatías. Las diferencias en la ubicación celular y el patrón de depósito de la α -Syn conducen a entidades clínicamente distintas de sinucleinopatías, como la falla autonómica pura, la atrofia multisistémica (MSA), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) o la EP [84, 85].

Si bien los síntomas pueden superponerse, el patrón y la gravedad de la disfunción autonómica con síntomas y signos clínicos asociados diferencian las diversas sinucleinopatías.

1.1.4.2 La α -Syn & el cobre

Existe evidencia experimental que demuestra una interacción directa del cobre con la α -Syn y de una mayor predisposición a la agregación de ésta después de unirse al cobre. Asimismo, la interacción entre la α -Syn y el cobre parece ser altamente específica, ya que la α -Syn puede unirse al cobre en rangos de concentración micromolar [86-88]. También, se han identificado dos sitios de unión para Cu^{2+} en la α -Syn mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) en el sitio His-50 [18] y el sitio Met-1 [86, 89]. La caracterización de la interacción entre la α -Syn y el Cu^{2+} mediante espectroscopia de resonancia paramagnética de electrones (EPR), se ha demostrado que a pH fisiológico existen dos modelos de unión: el primero corresponde a la interacción con Met-1 y Asp-2, mientras que el segundo incluye adicionalmente la unión a His-50 (**Fig. 7**) [90].

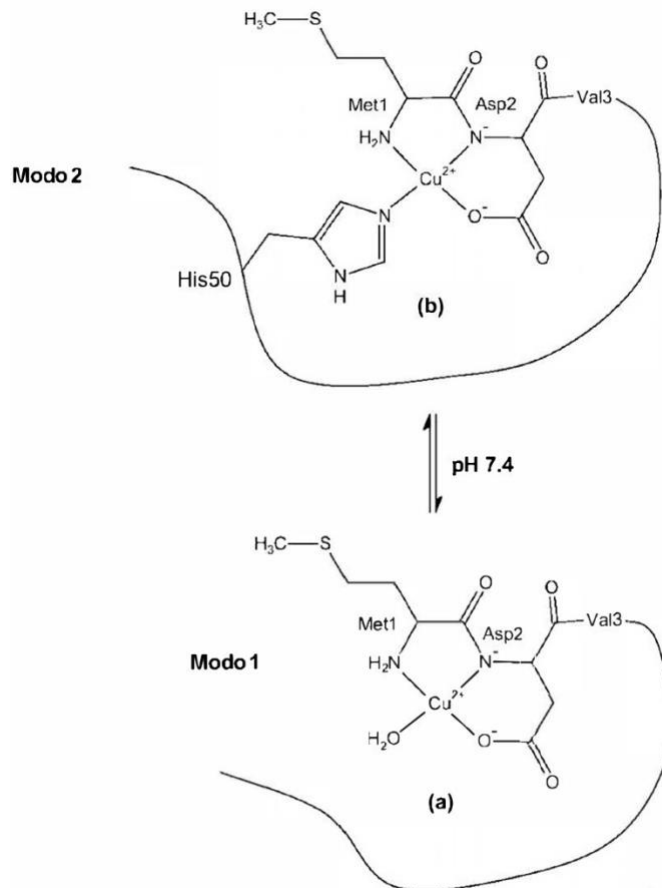


Fig. 7 Representación bidimensional de los modelos de unión putativos del Cu²⁺ a pH 7.4. (a) La unión [NH₂, N⁻, β-COO⁻, H₂O] asignada como modelo 1, observada a pH 7,4 involucrando a Met1 y Asp2. (b) El modelo de unión propuesto, asignado como modelo 2, observado a pH 7.4, el cual involucra a His-50.

Las mutaciones en la α-Syn responsables de las formas hereditarias de la EP (A30P, E46K, A53T), muestran esencialmente el “modelo 1” de unión a Cu²⁺. Sin embargo, a la mutación A30P la favorece el “modelo 2” de unión a Cu²⁺, que implica a His-50. Esto se debe a que en las mutaciones A30P y A53T hay cambios que permiten una liberación parcial del sitio de unión al Cu²⁺. [91]. Aunado a esto, el Cu⁺ puede unirse directamente a la α-Syn [92, 93]. Se ha demostrado que dos regiones de la proteína (aminoácidos del 1–5 y 116–127) se unen a este metal [92].

El cobre contribuye a la toxicidad celular cuando se asocia con la α-Syn, por ejemplo, cuando se sobreexpresa la α-Syn en las células SH-SY5Y en presencia de cobre, ambos tienen un efecto sinérgico en la citotoxicidad [94]. Curiosamente, el secuestro de cobre

mediante un quelante da como resultado una redistribución de α -Syn hacia la membrana y reduce la formación de agregados, mientras que la suplementación con CuCl_2 restaura su tendencia a la agregación [94]. Una explicación de este efecto podría ser la capacidad del cobre para aumentar el estrés oxidativo dentro de la célula. También, en el modelo antes mencionado, el Cu^{2+} unido a la α -Syn se reduce a Cu^+ , lo que conduce a la producción de H_2O_2 que a su vez puede oxidar al neurotransmisor dopamina (DA). Finalmente, la adición de complejos Cu^{2+} - α -Syn a las células SH-SY5Y da como resultado un decremento en la viabilidad celular [95].

En resumen, la interacción del cobre con la α -Syn se caracteriza por modelos de unión específicos y dependientes del pH que pueden alterarse por mutaciones patogénicas de la α -Syn y afectar la predisposición a la agregación de la proteína. Esta interacción también puede promover efectos nocivos como una mayor producción de ROS, lo que probablemente contribuya a la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas.

1.1.5 El sistema nervioso entérico (SNE), la microbiota y su relación con la EP

Como se mencionó previamente, la EP es una enfermedad idiopática del sistema nervioso caracterizada por manifestaciones tanto motoras como no motoras. Los síntomas gastrointestinales son de los síntomas no motores más comunes en pacientes con la EP. Hasta el 30% de los pacientes con la EP presentan síntomas gastrointestinales, los cuales se observan en todas las etapas de la enfermedad. Esto indica un proceso patológico que inicia en el tracto digestivo previo a los síntomas clínicos característicos de la neurodegeneración en la EP [96, 97].

El SNE es una puerta de entrada para la comunicación bidireccional entre el cerebro y el intestino, principalmente a través del nervio vago [98]. Evidencia experimental, clínica y epidemiológica sugiere que existe una relación entre la EP y el intestino, como la presencia de inflamación, la disfunción, la aparición de cuerpos de Lewy y disbiosis en pacientes con la EP. El llamado "eje intestino-cerebro", podría afectar la actividad cerebral, causando enfermedades neurodegenerativas [99, 100]. Se ha propuesto que el tracto gastrointestinal es un punto de inicio para la EP, con el nervio vago actuando como una vía, por la cual la patología puede extenderse hacia el SNC [101].

Por lo tanto, las alteraciones del intestino son un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como la EP.

Además, se ha observado que la disbiosis intestinal, es decir, el desequilibrio de la microbiota intestinal, se ha relacionado con trastornos del SNC, como la ansiedad, la depresión y el trastorno del espectro autista [98]. Aunque aún no se sabe si la disbiosis es parte del proceso patológico o simplemente un evento asociado, se ha observado que muchos pacientes con la EP presentan trastornos gastrointestinales a lo largo de todo el tracto gastrointestinal [102, 103].

Estudios recientes han demostrado cambios en la composición de la microbiota en los pacientes con la EP, indicando una diversidad de microorganismos en términos de número y género. En la EP, el número de *Lactobacillus* fue mayor respecto a la suma de bacterias analizadas, mientras que el grupo de *Clostridium coccoides* y de *Bacteroides fragilis* fueron más bajos que en la población sana [104].

Del mismo modo, existe una diferencia en los niveles de ciertos metabolitos bacterianos y el microambiente que proporcionan, por ejemplo, en una población sana se encontraron bacterias productoras de butirato “antiinflamatorio”, mientras que los pacientes con la EP muestran un perfil proinflamatorio con abundantes bacterias del género *Ralstonia* [105].

Los cambios en las poblaciones bacterianas y sus metabolitos afectan directamente la mucosa intestinal, alterando los procesos inflamatorios, y disminuyendo ciertas especies del filo *bacteroidete* y la familia *Prevotellaceae*, y por lo tanto, la disminución de ácidos grasos de cadena corta que pueden inducir alteraciones en el SNE que contribuyen a la dismotilidad gastrointestinal observada en pacientes con la EP [106].

Asimismo, cambios en la microbiota intestinal son evidentes en la EP a través del tiempo, ya que la población bacteriana total disminuye en el curso de la progresión de la EP [107].

Además, se ha descubierto que la disbiosis no solo contribuye al establecimiento y la progresión de la EP, sino también en la respuesta del paciente al tratamiento, por ejemplo, el aumento de la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) de la familia *Helicobacteraceae*, produce adhesinas que se unen directamente a la levodopa (precursor metabólico de la dopamina, neurotransmisor del cerebro que juega un papel fundamental en el control del movimiento y otras funciones cognitivas), reduciendo la absorción y con ello la efectividad del tratamiento para el paciente con la EP [107]. Por lo que la identificación de la disbiosis

microbiana intestinal en pacientes con la EP presenta posibilidades interesantes para un posible tratamiento.

1.2 Justificación

La alta incidencia de la EP de origen esporádico y la falta de una prueba diagnóstica precisa limita la detección temprana de la patología. Por lo tanto, establecer un modelo *in vivo* del efecto neurotóxico de la exposición crónica a cobre y su relación con la microbiota intestinal es de suma importancia para poder discernir la fisiopatología que se observa en la EP.

Analizando la sintomatología gastrointestinal y los avances en el estudio de la microbiota se podría identificar el inicio de la patología, inclusive 20 años antes de la aparición del cuadro clínico motor.

Los hallazgos derivados de este estudio permitirán establecer si el cobre tiene algún efecto neurotóxico, así como su relación con la microbiota intestinal, esto con el fin de aportar evidencia que facilite el estudio de la enfermedad y el establecimiento de un posible tratamiento y/o prueba diagnóstica precisa de esta patología que afecta y afectará cada día a millones de personas en todo el mundo.

1.3 Hipótesis

La exposición crónica a cobre tiene un efecto neurotóxico y altera la microbiota intestinal en un modelo *in vivo*.

1.4 Objetivo General

Evaluar el efecto neurotóxico mediado por la exposición crónica a cobre y la relación con la microbiota en un modelo *in vivo*.

1.5 Objetivos Específicos

- 1.5.1** Evaluar el efecto de la exposición crónica a cobre sobre la función motora.
- 1.5.2** Determinar el efecto del cobre sobre el SNC.
- 1.5.3** Evaluar el efecto de la exposición crónica a cobre sobre los mecanismos de degradación de proteínas.
- 1.5.4** Evaluar el estrés oxidativo en respuesta a la intoxicación por cobre.
- 1.5.5** Caracterizar la alteración de la microbiota intestinal mediada por la intoxicación crónica a cobre.

Capítulo 2

2.1 Materiales y métodos

2.1.1 Modelo animal

Se utilizaron 24 ratones de la cepa C57BL6/J, obtenidos de la empresa Círculo ADN S.A de C.V. de 8 semanas de edad, con un peso inicial promedio de 25 g. El modelo empleado utiliza ratones singénicos y como mamíferos, gran parte de su metabolismo bioquímico se asemeja al del ser humano, son de fácil adaptación a un bioterio, lo que nos facilita el control de las variables ambientales [108-114]. Los ratones se mantuvieron en un ambiente controlado a temperatura constante, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h. Los ratones tuvieron libre acceso al agua y al alimento (Prolab RMH 2500), realizando cambios de cama tipo aserrín, alimento y agua cada tercer día. Fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos de 6, grupo 1: control; grupo 2: tratado con 100 ppm; grupo 3: con 250 ppm y grupo 4: con 500 ppm de cobre en el agua para beber. Este mismo tamaño de muestra ha sido empleado en estudios similares por otros grupos de investigación [115-117]. El tamaño de la muestra se calculó en base a la ley de los rendimientos decrecientes (law of diminishing return), en donde se mide el valor de “E”, que es el grado de libertad del análisis de varianza (ANOVA), el cual debe encontrarse entre 10 y 20. Si el valor de “E” es menor que 10, se debe incrementar el tamaño de la muestra (número de animales), mientras que, si es mayor de 20, no se tendrá una mayor significancia en los resultados. Por lo tanto, si el tamaño de una muestra tiene un valor de “E” entre 10 y 20, se considera adecuada. El valor de “E” se obtuvo con la siguiente fórmula [118]:

$E = \text{Número total de animales} - \text{Número total de grupos}$

Utilizamos 4 grupos de 6 ratones cada uno, por lo tanto:

$$E = (6 \times 4) - 4$$

$$E = 20 \text{ (Tamaño de muestra adecuado)}$$

El modelo animal fue inducido por la exposición a cobre en el agua potable *ad libitum* a diferentes concentraciones hasta observar alteraciones en la función motora, lo cual ocurrió a los diez meses de tratamiento.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999” y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), y aprobados por el Comité de Ética de nuestra Universidad (HT22-00001).

2.1.2 Evaluación del peso corporal y la sobrevivencia

A cada ratón se le monitoreó el peso corporal en gramos (g) y la sobrevivencia a lo largo de los 10 meses de tratamiento. Al inicio de cada semana se registró el peso de cada sujeto, así como la sobrevivencia. Al finalizar, para el peso corporal se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante una ANOVA de dos colas. La sobrevivencia se evaluó con una prueba de Log-rank (Mantel-Cox).

2.1.3 Evaluación de la disfunción motora

Dado que la pérdida de coordinación motora es una de las principales características de la EP, la marcha se evaluó individualmente en todos los ratones al final del modelo animal, colocando pintura lavable no tóxica en las patas de los ratones, se utilizaron dos colores, uno para las extremidades anteriores y otro para las extremidades posteriores. Posterior a esto se permitió caminar a través de un túnel dejando impresas las huellas sobre una hoja de papel bond blanca. Esta prueba aprovecha el comportamiento natural del ratón y su afinidad por los lugares pequeños y oscuros. El túnel que se utilizó tiene las dimensiones que permiten que los ratones puedan caminar cómodamente y dar suficientes pasos (> 4) para poder medir la marcha. Antes de iniciar con la prueba, se realizó la aclimatación de los ratones una semana previa al entrenamiento, este último se realizó 3 días alternados de 3 intentos por cada ratón. Los parámetros que se midieron fueron: (i) largo de la pisada izquierda, (ii) largo de la pisada derecha, (iii) ancho de la pisada anterior y (iv) ancho de la pisada posterior (**Fig. 8**). Este enfoque es lo suficientemente sensible como para detectar

cambios tempranos en la marcha en la presentación del fenotipo, y debido a su enfoque no invasivo, permite la evaluación de grupos a lo largo de la vida o presentación fenotípica.

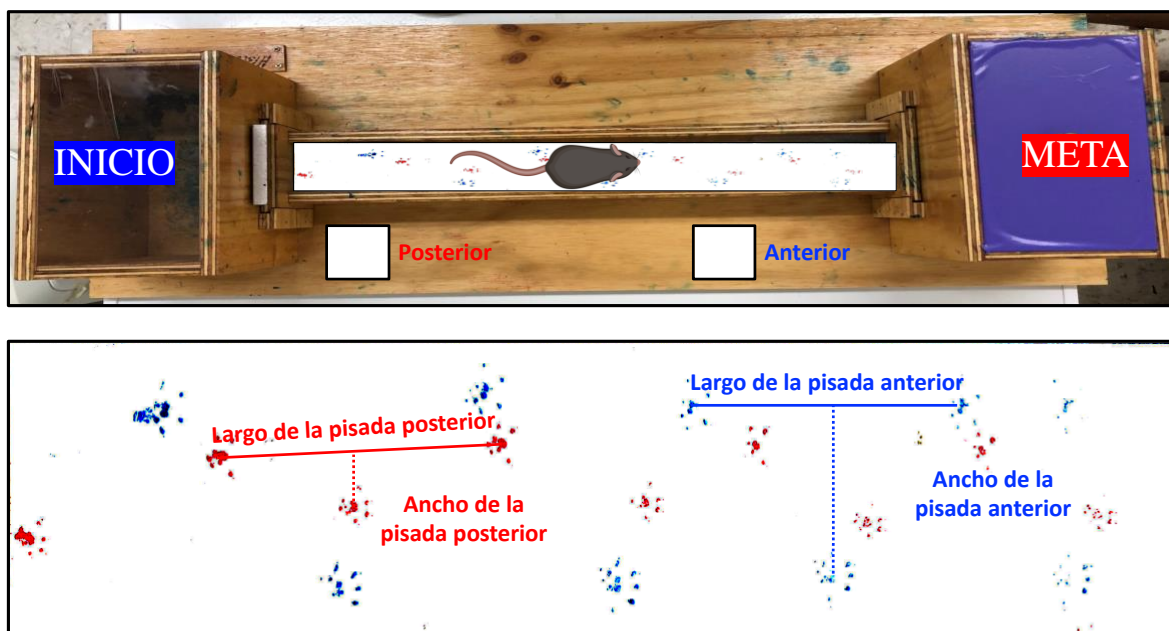


Fig. 8 Representación de los parámetros evaluados en la prueba de la marcha.

El efecto del cobre (CuSO_4) en la función motora se evaluó utilizando pintura lavable no tóxica para marcar las patas de los ratones, las extremidades anteriores de color azul y las extremidades posteriores de color rojo. Posteriormente, los ratones caminaron a través de un túnel dejando impresas las huellas sobre una hoja de papel bond blanca. El túnel utilizado tiene las dimensiones que permiten a los ratones caminar cómodamente y dar suficientes pasos (> 4) para poder medir la marcha. Los parámetros que se midieron fueron: largo de la pisada izquierda, largo de la pisada derecha, ancho de la pisada anterior y ancho de la pisada posterior.

2.1.4 Técnica de inmunofluorescencia (IF)

A 3 ratones de cada grupo se le administraron 500 μl del anticoagulante heparina (5000 UI), con aguja de insulina por vía intraperitoneal (IP), 10 min previos a la eutanasia. Posteriormente, los ratones fueron anestesiados con Avertin® mezclado con xilacina (500 mg/kg de Avertin® con 150 mg/kg de xilacina) en un volumen de 750 μl por vía IP, con aguja calibre 32 Gauge. Después de comprobar que los ratones estaban anestesiados mediante la evaluación de los 3 puntos de reflejo: patas, cola y reflejo corneal, se procedió a iniciar la técnica de perfusión cardíaca mediante la inmovilización del animal, fijándolo a una placa de poliestireno. Luego, se realizó una incisión con el bisturí a la altura del apéndice xifoides, y con ayuda de unas tijeras se realizó un corte longitudinal por la línea media ventral, cortando en toda su extensión el esternón hasta el mango del mismo.

Posteriormente, se separó y exhibió la cavidad torácica. Una vez realizado lo anterior, se procedió a fijar los órganos mediante perfusión cardíaca. Para esto, se colocó un catéter de 21 G \times 32 mm de diámetro dispuesto en una bomba peristáltica, en el ventrículo izquierdo. Con ayuda de unas tijeras se realizó una pequeña incisión en la aurícula izquierda, se bombeó (a una presión de 80-100 mm Hg) un volumen de 50 ml de una solución de buffer de fosfatos (PBS 1 \times , pH 7.4 a temperatura ambiente), con la finalidad de eliminar el contenido hemático. A continuación, se bombeó un volumen de 50 ml del fijador paraformaldehído (PFA) al 4%. Cabe señalar que este procedimiento nos permite preservar el SNC en óptimas condiciones, lo cual es indispensable para nuestro estudio. Después, se extrajo el cerebro, el cual se dejó fijando por 24 h.

Posteriormente, se llevó a cabo el procesamiento e inclusión en bloques de parafina y microtomía con la técnica histológica convencional. La evaluación histológica se realizó en cortes de 5 μ m de grosor. A las muestras se les realizó la tinción de HyE con el fin de identificar la región de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) para proceder con los análisis pertinentes.

Al identificar el área de interés, se realizaron cortes de mesencéfalo (ME) de 5 μ m montados en laminillas xilanizadas, las cuales se bloquearon con suero de caballo al 10 % (#16050-122, Thermo Fisher Scientific) y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-TH de conejo (#ab112, Abcam), anti-GFAP de conejo (proteína ácida fibrilar glial) (#ab7260, Abcam), anti- α -Syn de conejo (#ab52168, Abcam) y anti-AMPK-alfa-1 (fosforilado en T183) + AMPK-alfa-2 (fosforilado en T172) de conejo (#ab23875, Abcam) a una dilución de 1:1000, durante la noche a 4°C. Después de enjuagar, las secciones se incubaron con anticuerpo Alexa 488 anti-conejo secundario (#ab150077, Abcam) a una dilución de 1:1000, durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montaron con medio de montaje VECTASHIELD Antifade Mounting Medium con DAPI.

Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio fluorescente Nikon® Eclipse 50i, mediante el software Q-capture 7 pro® y los resultados se analizaron con el software ImageJ. Los parámetros de adquisición se mantuvieron iguales para cada marcador, incluido el tiempo de exposición, la intensidad del láser, el ajuste de ganancia y la amplificación de la imagen.

2.1.4.1 Morfometría de los resultados por técnica de IF

La morfometría se llevó a cabo mediante el conteo del número de células positivas para los marcadores celulares TH y GFAP, utilizando el programa ImageJ con la función de conteo automatizado de imágenes de un solo color. Esto fue realizado en 3 campos a un aumento de 40× con un microscopio de fluorescencia por sujeto, un total de 3 sujetos por grupo.

La intensidad de fluorescencia de las neuronas dopaminérgicas se evaluó en tres campos aleatorios por sección de tres sujetos diferentes por grupo.

La fluorescencia celular total corregida (CTCF) se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\text{CTCF} = \text{Densidad integrada} - (\text{Área de la celda seleccionada} \times \text{Fluorescencia media de las lecturas de fondo}).$$

2.1.5 Técnica de inmunohistoquímica (IHQ)

A partir de cortes de mesencéfalo de 5 µm de grosor montados en laminillas xilanizadas, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas con el anticuerpo primario anti-IBA-1 de ratón (molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1) (#ab15690, Abcam), incubando durante toda la noche a 4 °C a una dilución 1:1000. Posteriormente, fueron incubados con el anticuerpo secundario de ratón (#ab6789, Abcam) diluido 1:1000, por 1 h a temperatura ambiente. Después, se adicionó el cromógeno diaminobencidina (DAB) como sustrato para la enzima conjugada a los anticuerpos secundarios (peroxidasa de rábano). Las microfotografías se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse 50i, mediante el software Q-capture 7 pro® y los resultados se analizaron con el software ImageJ.

2.1.5.1 Morfometría de cortes histológicos

A partir de la IHQ se realizó la cuantificación del número de células positivas para IBA-1 utilizando el programa ImageJ con la función de conteo automatizado de imágenes de un solo color. Esto se realizó en 3 campos por sujeto, a un aumento de 40× con un microscopio Nikon Eclipse 50i®, en un total de 3 sujetos por grupo.

2.1.6 Extracción de proteínas

Al finalizar los 10 meses de tratamiento, tres ratones de cada grupo fueron sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical o exanguinación, previamente anestesiados y se colectó el cerebro.

Para extraer el área de interés, se siguieron las coordenadas del bregma y los límites anatómicos para la disección del mesencéfalo ventral en base al atlas del cerebro del ratón [119]. Posteriormente, utilizando un microscopio estereoscópico, se retiraron las placas del cráneo para localizar visualmente el bregma. El cerebro se extrajo y se colocó con el lado dorsal hacia arriba. Usando una hoja de bisturí se hicieron dos cortes coronales adyacentes a los colículos inferiores aproximadamente en el bregma. La sección se colocó con el lado rostral hacia arriba y se diseccionó el mesencéfalo ventral, asegurándose de que no hubiera contaminación con el hipocampo, la corteza o el cerebelo.

Una porción de 2 mm de tejido fue triturada con una navaja y se colocó en un tubo eppendorf de 1.75 ml con 150 µl de buffer de lisis en tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%) que contenía cóctel inhibidor de fosfatasa y proteasa Halt (#78446, Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, las muestras se sonicaron (Ultrasonic Processor®) por un pulso de 5 segundos y se centrifugaron a 15 493 G por 10 min a 4 °C. Al finalizar, se extrajo el sobrenadante y éste se colocó en un tubo nuevo. Para determinar la concentración de proteínas obtenida, se llevó a cabo su cuantificación mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay siguiendo las especificaciones del fabricante. Las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento.

2.1.7 Electroforesis en gel SDS-PAGE

Del extracto proteínico obtenido se tomaron 50-100 µg por muestra y se mezclaron con el buffer de carga 6× (Glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (w/v), cianol de xileno 0.25% (w/v)). Se procedió a desnaturalizar las muestras a 95 °C por 3 min y se analizaron por triplicado mediante geles desnaturalizantes discontinuos de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10%, en una cámara de electroforesis vertical (Bio-Rad®) con buffer Tris-Glicina 1×. La electroforesis se realizó a 100 Volts y 500 mA por 2 h.

2.1.8 Transferencia en cámara húmeda

Después de la electroforesis se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa previamente activadas con dH₂O. Tanto el gel, como la membrana y el papel filtro fueron impregnados con el buffer para transferencia húmeda 1× (Tris base 48 mM, glicina 390 mM, SDS 0.1% (w/v), metanol 20%) para elaborar el “sandwich”. Los geles se colocaron en contacto con la membrana de nitrocelulosa entre los papeles filtro dentro una cámara de transferencia húmeda (cámara de electroforesis vertical, Bio-Rad®) bajo las siguientes condiciones: 100 Volts y 500 mA por 1 h, con una fuente de poder (Enduro power supplies 300V, E0303, Labnet®).

2.1.9 Western Blot (WB)

Terminada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche semi-descremada al 5% por 1 h para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Se realizaron 3 lavados con PBS 1× de 10 min cada uno.

Después se incubaron, durante toda la noche a 4 °C a una dilución de 1:1000, con el anticuerpo primario correspondiente: anti-TH de conejo, anti-α-Syn de conejo (#ab52168, Abcam), anti-IBA-1 de ratón, anti-LC3B de conejo (#L7543, Millipore Sigma), anti-ubiquitina de ratón (#ab7254, Abcam), anti-3-nitrotirosina de ratón (#ab61392), y anti-β-actina de conejo (#A5060, Millipore Sigma) como control interno de carga de proteínas. Se usaron anti-conejo y anti-ratón secundarios conjugados con peroxidasa a una dilución de 1:1000 (#sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) y se detectaron con el sustrato

quimioluminiscente SuperSignal West Pico Plus (#34580, Thermo Fisher Scientific) en un escáner de WB (LI-COR®, modelo 3600, LI-COR, Inc. Lincoln, NE). El análisis de densitometría de las inmunotransferencias se realizó utilizando el software ImageJ.

2.1.10 Extracción de ADN genómico

Para analizar las poblaciones de la microbiota intestinal se colectaron dos o tres pellets fecales recién evacuados por ratón, cada semana durante los 10 meses y se colocaron en un tubo estéril de 1.5 ml. Las muestras fueron almacenadas de inmediato en un congelador a -20 °C. Antes de la extracción de ADN, los pellets fecales de cada grupo de estudio se mezclaron para obtener un peso de 300 mg de muestra fecal por grupo. Las muestras se sometieron a disrupción mecánica utilizando un estilete quirúrgico estéril, en un tubo que contenía 1000 µl de solución tampón de lisis SNET [20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1 % (wt/vol) SDS, 400 µg de Proteinasa K y 1000 µg de lisozima; pH 8,0] y se incubaron en un agitador a 40 °C a 2 G por 1 h y a 65 °C durante 1 hora adicional. A continuación, las muestras se centrifugaron a 17 968 G durante 5 min a 4 °C. Inmediatamente, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se añadió un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Los lisados se mezclaron e incubaron en hielo durante 3 min y luego se centrifugaron. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml y se añadió un volumen de isopropanol frío. Las muestras se incubaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 17 968 G a 4 °C durante 15 min. La pastilla de ADN resultante se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 100 µL de Tris-EDTA (10 mM Tris y 1 mM EDTA) durante 1 h a 65 °C. La pureza del ADN se evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), y la integridad del ADN se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa.

2.1.11 PCR punto final

A partir de muestras de ADN genómico microbiano se llevó a cabo la amplificación de regiones conservadas provenientes del gen del ARN ribosomal (ARNr) 16S. El gen ARNr

16S normalmente se utiliza para estudios filogenéticos [120], ya que su secuencia está altamente conservada entre las distintas familias y especies de bacterias y arqueas [121]. Además de contar con estos sitios altamente conservados, también cuentan con regiones hipervariables del gen ARNr 16S que son específicas para la identificación de bacterias a nivel de familia [122, 123]. Por lo que su detección por PCR resulta ser una técnica útil para la elaboración de perfiles microbianos. En el presente estudio, se diseñaron oligonucleótidos específicos para determinar la modificación del perfil bacteriano previamente reportado en modelos animales y pacientes con la EP. Las secuencias específicas de los oligonucleótidos que se utilizaron para identificar la alteración en la proporción de diversas familias bacterianas que se relacionan con la EP, en el modelo de exposición crónica al cobre se enumeran en la **Tabla 1**. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por T4OLIGO® (México). Para la amplificación de las secuencias de interés por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hicieron reacciones en un volumen de 25 μ l utilizando las condiciones descritas por el fabricante de la *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Waltham, Massachusetts). La mezcla de reacción contenía 10.9 μ l (250 ng) de ADN genómico, 1 μ l (250 μ M) de cada nucleósido trifosfato (dNTP), 1 μ l (4 ng) de cada oligonucleótido, 0.5 μ l (0.5 U) de *Taq* ADN polimerasa, 2.5 μ l (1 \times) de *Taq* Buffer con KCl (10 \times), 1.5 μ l (1.5 mM) de un stock de MgCl₂ (25 mM) y se ajustó el volumen final con agua estéril libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 μ l. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 96 °C por 5 min, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos, finalmente se realizó un último paso de extensión a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 volts y teñidos con Gel-Red (Biotium) para su detección en el transiluminador UV (Bio-Rad).

2.1.12 qPCR tiempo real

Se utilizó qPCR en tiempo real para la amplificación de ARNr 16S, lo que permite la cuantificación directa de productos de PCR y elimina la necesidad de análisis de cuantificación adicionales. Cada reacción se realizó por triplicado en tubos para PCR de calidad óptica (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts). Se tomaron precauciones

para asegurar que los datos de cada triplicado se encontraran dentro de un ciclo de umbral de 0.5 (Ct) y se eliminaron los valores atípicos claros (> 2 desviaciones estándar) antes de calcular el Ct promedio de cada muestra. Se utilizaron curvas de fusión y controles sin ADN para evaluar la fiabilidad del experimento. No hubo amplificación detectable derivada de controles negativos (sin ADN) en los ensayos. La eficiencia de amplificación de todos los ensayos de qPCR osciló entre el 91% y el 98%. La mezcla de reacción contenía 1 µl de 1× SYBR Green I, 50 ng de buffer 1× (MgCl₂ 1.5 mM), 4 ng de cada oligonucleótido, 0.06 U *Taq* ADN polimerasa y se ajustó con agua estéril hasta un volumen final de 10 µl. Las condiciones del termociclador consistieron en un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 180 s y 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. La fluorescencia se midió al final de cada paso de extensión a 72 °C con mediciones simultáneas de las intensidades de la señal SYBR Green I. Los productos de qPCR también se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa. La cuantificación se realizó mediante un método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ entre un gen endógeno (Uni 331F y Uni 797R) frente a la amplificación de la secuencia específica de ARNr 16S de las distintas familias de bacterias seleccionadas. La amplificación se realizó utilizando el analizador genético StepOne Real-Time PCR System de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Familias de bacterias seleccionadas, secuencias de oligonucleótidos, temperatura de alineamiento y tamaño del producto.

Organismos seleccionados (Familias)	Set de oligos	de Secuencias (5' a 3')	Tm (°C)	Tamaño del producto (bp)	Referencias
<i>Lactobacillaceae</i>	F	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	341	[124, 125]
	R	CACCGCTACACATGGAG			
<i>Enterococcaceae</i>	ECST748F	AGAAATTCCAAACGAACTTG	60	92	[126]
	ENC854R	CAGTGCTCTACCTCCATCATT			

<i>Verrucomicrobiaceae</i>	VS1Bf	GCCCGACAGGGTTGATAGTA	60	83	[127]
	VS1Br	CGCTTGGGACCTTCGTATTA			
<i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAA	63	195	[128]
	Eco1652R	GAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC			
<i>Bacteroidetes</i>	Bac303F	GAAGGTCCCCCACATTG	56	418	[128]
<i>Prevotellaceae</i>	Bac708R	CAATCGGAGTTCTTCGTG			
Universal bacteria	para Uni 331F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	58	466	[129]
	Uni 797R	GGACTACCAGGGTATCTAATC CTGTT			

2.1.13 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron de forma independiente en días separados. Se empleó una $n=3$ por grupo, la cual fue calculada con un nivel de confianza de 95% para obtener el número mínimo necesario para asegurar la confiabilidad de los resultados. Se utilizaron tres ratones por grupo para los análisis histopatológicos y otros tres para los análisis a nivel de proteínas. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para obtener una distribución normal de los datos. La sobrevivencia se evaluó con una prueba de Log-rank (Mantel-Cox). A continuación, analizamos la pérdida neuronal dopaminérgica, la astrocitosis, la microgliosis, la fosforilación de AMPK, la acumulación de α -Syn, la autofagia y los niveles de proteínas nitradas mediante la prueba de ANOVA de una vía con la comparación múltiple de Šídák. El peso corporal, la función motora y el marcador de proteosoma se analizaron mediante la prueba de ANOVA de dos vías y la comparación múltiple de Tukey. Los datos se representaron como las medias de al menos tres réplicas independientes \pm error estándar de la media (SEM). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo para todos los análisis. A continuación el resumen de valores p : No significativo (ns) $\geq 0,05$, (*) 0,01 a 0,05, (**) 0,001 a 0,01, (***) 0,0001 a 0,001, (****)

<0,0001. Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism (versión 9.0.0 para Mac OS, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU., www.graphpad.com).

Capítulo 3

3.1 Resultados

3.1.1 La concentración de cobre no altera el peso ni afecta el ciclo de vida

Para establecer nuestro modelo experimental, los ratones de la cepa C57BL6/J se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos expuestos a diferente concentración de cobre, 0 (control, ctrl), 100, 250 o 500 ppm durante 40 semanas. El peso corporal de los ratones (**Fig. 9A**) y la sobrevivencia (**Fig. 9B**) se registraron semanalmente durante todo el modelo. Como primeros resultados tuvimos que el peso y la sobrevivencia de los ratones del modelo animal durante el período experimental no se afectó, todos los grupos mostraron una distribución normal sin diferencia estadística.

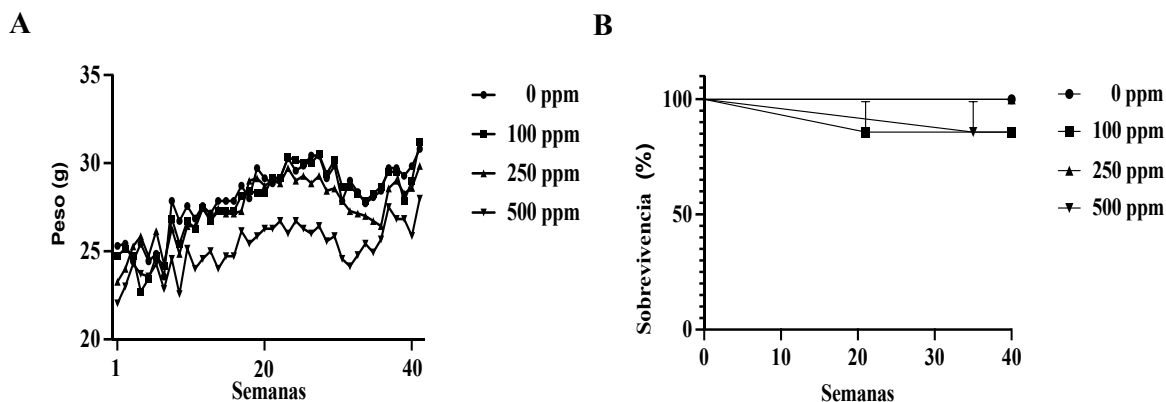


Fig. 9 La exposición crónica al cobre no afecta el peso ni la sobrevivencia de los ratones. (A) Peso corporal y (B) sobrevivencia de los ratones expuestos a concentraciones crecientes de cobre a lo largo de 40 semanas de tratamiento. $n = 6$ animales por grupo. Todos los grupos presentan una distribución normal sin diferencia estadística. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías con una prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

Con los resultados se pudo concluir que la exposición crónica a concentraciones crecientes de cobre no afecta el peso corporal ni la sobrevivencia de los ratones.

3.1.2 Evaluación del efecto de la exposición crónica a cobre sobre la función motora

Dado que la interrupción de la homeostasis del cobre conduce a graves alteraciones en la función neurológica [17, 130], y la pérdida de la coordinación motora es una de las principales características de la EP [131-133], nuestro objetivo fue determinar si la exposición al cobre afecta la función motora. Es por ello que posteriormente, se evaluó la función motora mediante la prueba de la marcha.

3.1.3 La exposición crónica a cobre reproduce las alteraciones motoras clásicas de la EP

La pérdida de la coordinación motora es una de las principales características de la EP [129], por lo que para probar si la exposición crónica al cobre altera la función motora de los ratones, realizamos la prueba de la marcha [130, 131]. Esto fue evaluado, desde el inicio del tratamiento hasta el punto en que observáramos alteraciones en la función motora. En la **Figura 10A** se muestra el patrón de huellas impresas representativo de cada grupo, donde el grupo de control mostró un patrón típico. Por el contrario, las habilidades de marcha de los grupos tratados con cobre se alteraron significativamente de una manera dependiente de la dosis (**Fig. 10B-D**), ya que la longitud de la pisada, fue menor en los ratones tratados con cobre, mientras que el ancho de la pisada, fue mayor que en los ratones del grupo control.

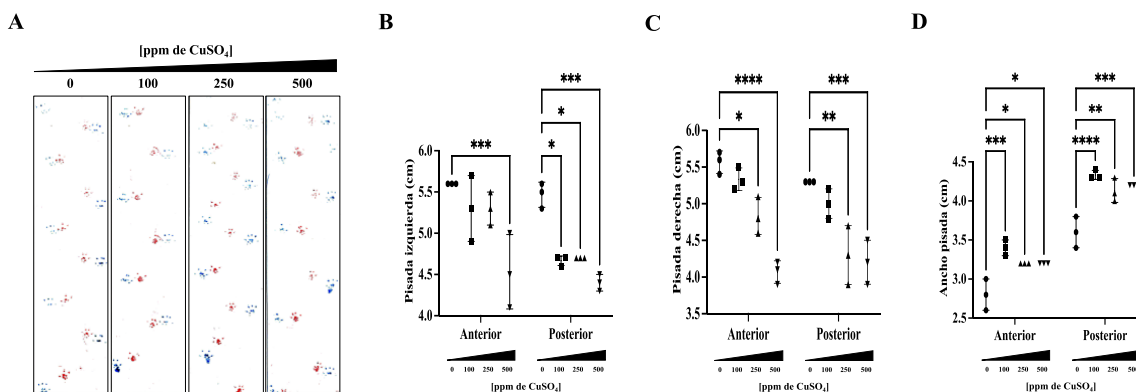


Fig. 10 La exposición crónica al cobre altera la función motora. Para evaluar el efecto del cobre (CuSO_4) en la función motora, se utilizó la prueba de la marcha. Posterior, los ratones caminaron a través de un túnel dejando impresas las huellas sobre una hoja de papel bond blanca (A). Se muestran las medidas del paso

izquierdo (**B**), derecho (**C**) y ancho (**D**) de las extremidades delanteras y traseras. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías con una prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

Por lo tanto, la exposición prolongada a cobre, afecta la función motora de los ratones de manera significativa.

3.1.4 Determinación del efecto del cobre sobre el SNC

Una zona afectada en la EP es la SNpc del mesencéfalo, que es donde radican las neuronas dopaminérgicas productoras del neurotransmisor dopamina. La muerte de estas neuronas es la responsable de la pérdida progresiva de la función motora [134, 135]. Debido a la alteración en la marcha, quisimos determinar si ésta se relacionaba con la pérdida de neuronas en el mesencéfalo. Por lo que a continuación, tras la identificación de la zona de interés mediante el uso del atlas de referencia [119], se realizó la técnica de inmunofluorescencia, con un anticuerpo para la TH específica de neuronas dopaminérgicas con fluorescencia verde, mientras que la tinción nuclear se hizo con DAPI con fluorescencia azul. La **Figura 11A** muestra la población típica de neuronas dopaminérgicas del grupo control. Por el contrario, los grupos tratados con cobre mostraron una disminución notable de las neuronas dopaminérgicas de manera dosis dependiente. Además, estos resultados fueron confirmados por la cuantificación de neuronas positivas para TH (**Fig. 11A, B**).

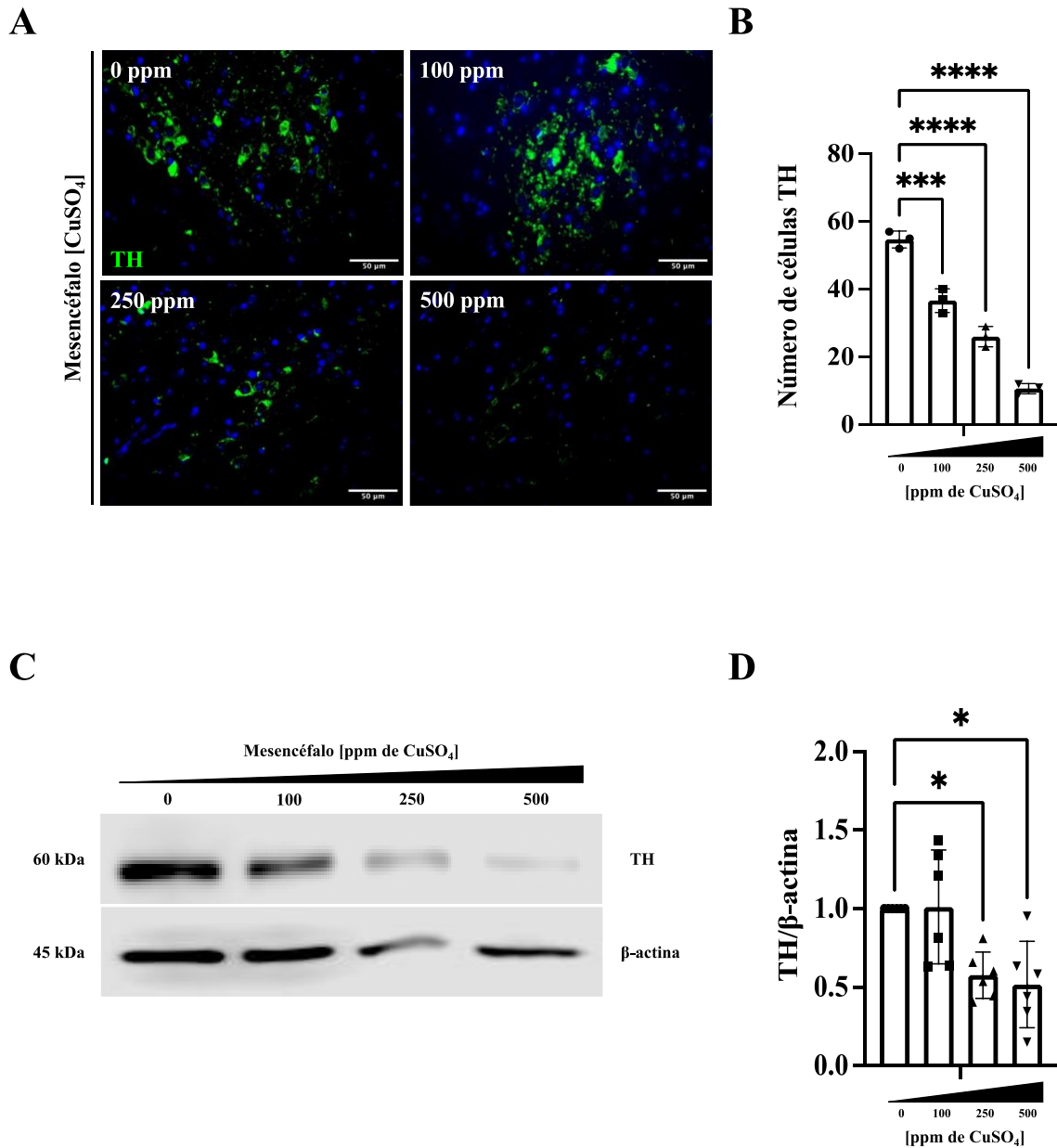


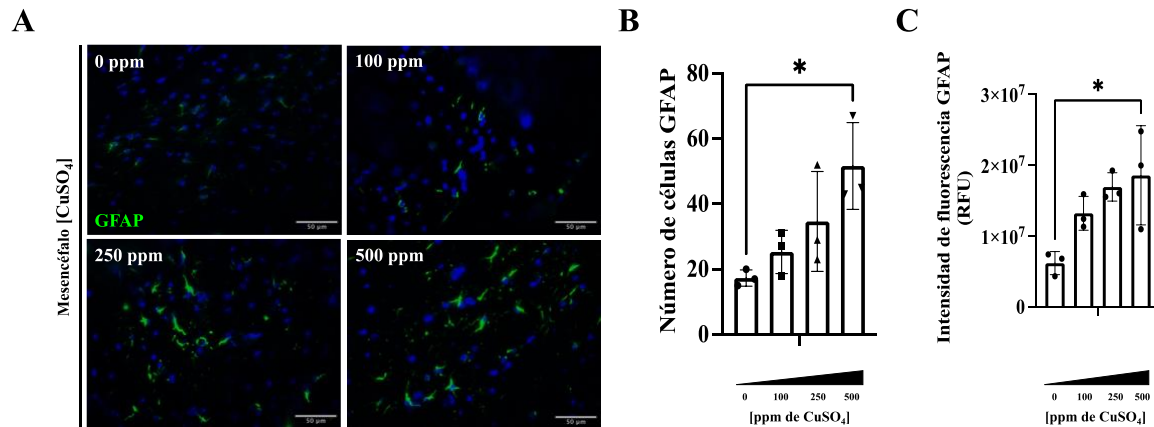
Fig. 11 La administración crónica de cobre conduce a la pérdida neuronal dopaminérgica. (A) IF de muestras de mesencéfalo utilizada para identificar la población de células dopaminérgicas con un anticuerpo anti-TH específico. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (B) El análisis morfométrico indicó una disminución de las células dopaminérgicas dependiente de la dosis de cobre. (C) Western blot de muestras de mesencéfalo lisadas en tampón RIPA utilizado para identificar el marcador de células dopaminérgicas con un anticuerpo anti-TH específico. (D) El análisis densitométrico indicó una disminución de las células dopaminérgicas dependiente de la dosis de cobre. Los valores de densitometría se normalizaron con β-actina. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes ± SEM.

La pérdida neuronal fue confirmada por WB utilizando muestras de mesencéfalo lisadas en buffer con RIPA, donde se evidenció una disminución del marcador TH de manera dependiente de la dosis de cobre (**Fig. 11C, D**).

Los análisis efectuados sugieren que la exposición crónica al cobre induce disminución del marcador TH y de la población neuronal dopaminérgica.

3.1.5 La exposición crónica a cobre induce astrocitosis y microgliosis

Los astrocitos y la microglía pueden inhibir la toxicidad de los iones metálicos preservando la homeostasis del cerebro, pero con el envejecimiento, la distrofia glial y la pérdida de la homeostasis de los metales aumentan y pueden predisponer al cerebro envejecido a enfermedades neurodegenerativas [136]. Además, los astrocitos detectan la actividad neuronal y las variaciones de la composición del espacio extracelular y responden a diversas lesiones cerebrales o formas de enfermedades con expresión genética, morfología, capacidad proliferativa y función modificada, lo que se conoce como astrocitosis reactiva [137, 138]. Por lo tanto, ante la disminución de las neuronas dopaminérgicas, determinamos si la población de astrocitos estaba alterada. La **Figura 12A** muestra la población de astrocitos del grupo de control. En contraste, el cobre indujo un aumento en la población de astrocitos de manera dependiente de la dosis, evidenciado al detectar la población celular positiva para la GFAP con fluorescencia verde (**Fig. 12A-C**), mientras que el núcleo fluoresce de color azul (DAPI). Este ensayo sugiere que la exposición crónica a cobre induce la astrocitosis.



Por otro lado, se ha detectado microglía activada en muestras *post mortem* de cerebro de pacientes con la EP [139], lo que sugiere que hay un proceso inflamatorio que desempeña un papel esencial en la patogenia de la EP. Por lo anterior, determinamos el efecto de la exposición crónica al cobre en la activación de la microglía mediante IHQ para la detección de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (IBA-1), una proteína específica de las células de microglía [140, 141]. En la **Figura 13A, B** se puede observar el nivel basal de células de microglía activada en el grupo de control. Por el contrario, la exposición al cobre causa un aumento en la activación microglial de una manera dependiente de la dosis.

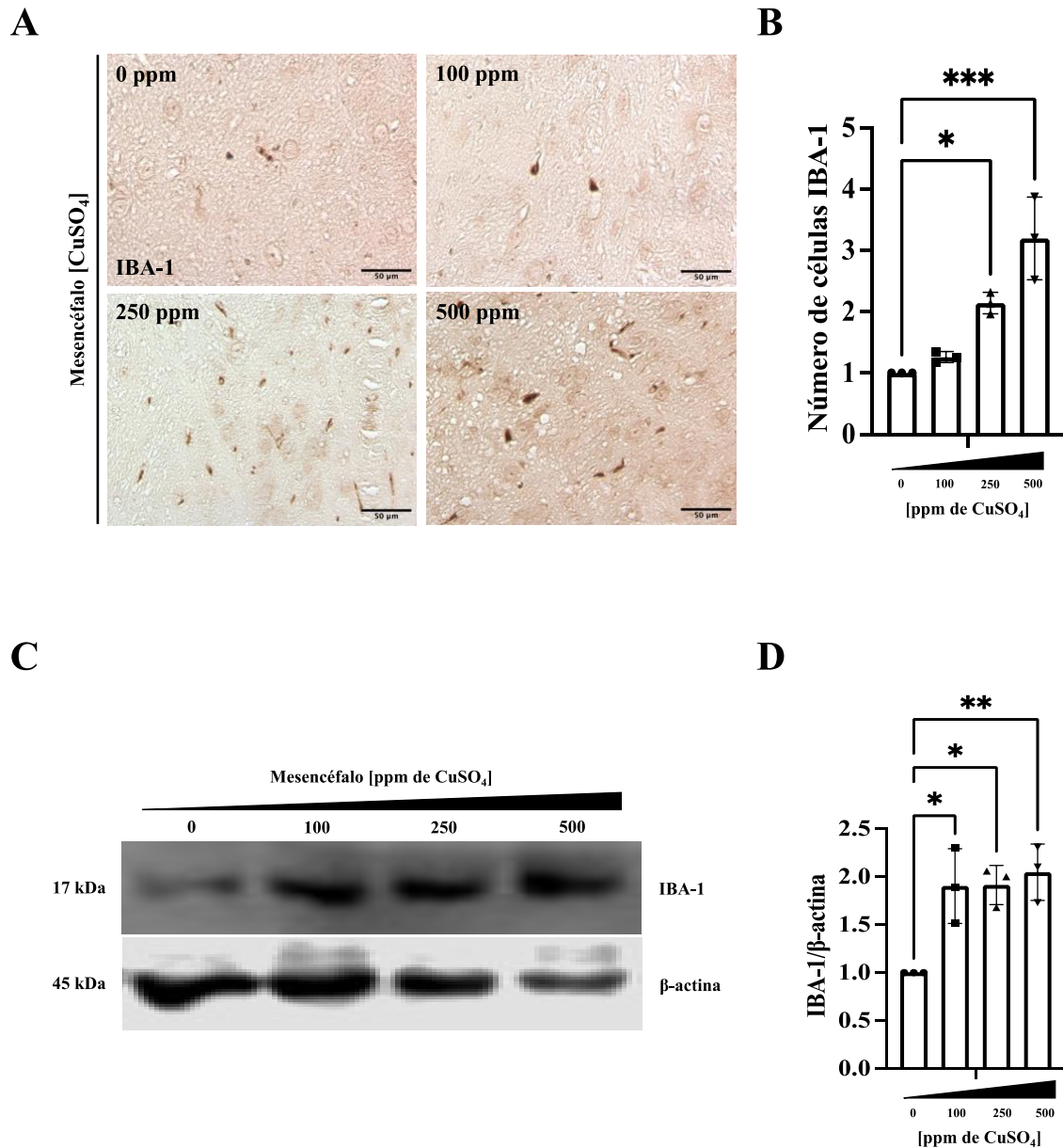


Fig. 13 La exposición crónica a cobre induce microgliosis. (A) IHQ de muestras de mesencéfalo para identificar células positivas para IBA-1, una proteína de unión al calcio que juega un papel en la activación y función de los macrófagos, con un anticuerpo anti-IBA-1. Sin contratinción. (B) El análisis morfométrico indicó una respuesta dependiente de la dosis de cobre. (C) WB de muestras de mesencéfalo lisadas en tampón RIPA para identificar la proteína IBA-1, que juega un papel en la activación y función de los macrófagos. (D) El análisis densitométrico indicó una respuesta dependiente de la dosis de cobre. Los valores de densitometría se normalizaron a β -actina. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

El incremento de la microglía también fue corroborado por WB y densitometría (**Fig. 13C, D**).

Por lo que, nuestros resultados demuestran que la exposición crónica al cobre induce microgliosis.

3.1.6 Los niveles de α -Syn aumentan por la exposición crónica al cobre

Como se mencionó anteriormente, los efectos tóxicos de la α -Syn se atribuyen ampliamente a su agregación. Asimismo, el cobre interactúa con la α -Syn acelerando su agregación y formación de fibrillas, así como su localización en la membrana [18, 61, 94]. Por lo anterior, determinamos si la expresión de α -Syn se veía afectada por la exposición crónica al cobre. Se muestra la proteína α -Syn basal en el grupo control. Por el contrario, en los grupos tratados con cobre se mostró un aumento notable en la señal formando un patrón punteado, indicativo de agregación de proteínas, y fue dependiente de la dosis en comparación con el grupo control. Además, estos resultados fueron confirmados por la cuantificación de células positivas para α -Syn positivas con fluorescencia verde (**Fig. 14A, B**) e intensidad de fluorescencia (**Fig. 14C**). El núcleo fluoresce en color azul (DAPI).

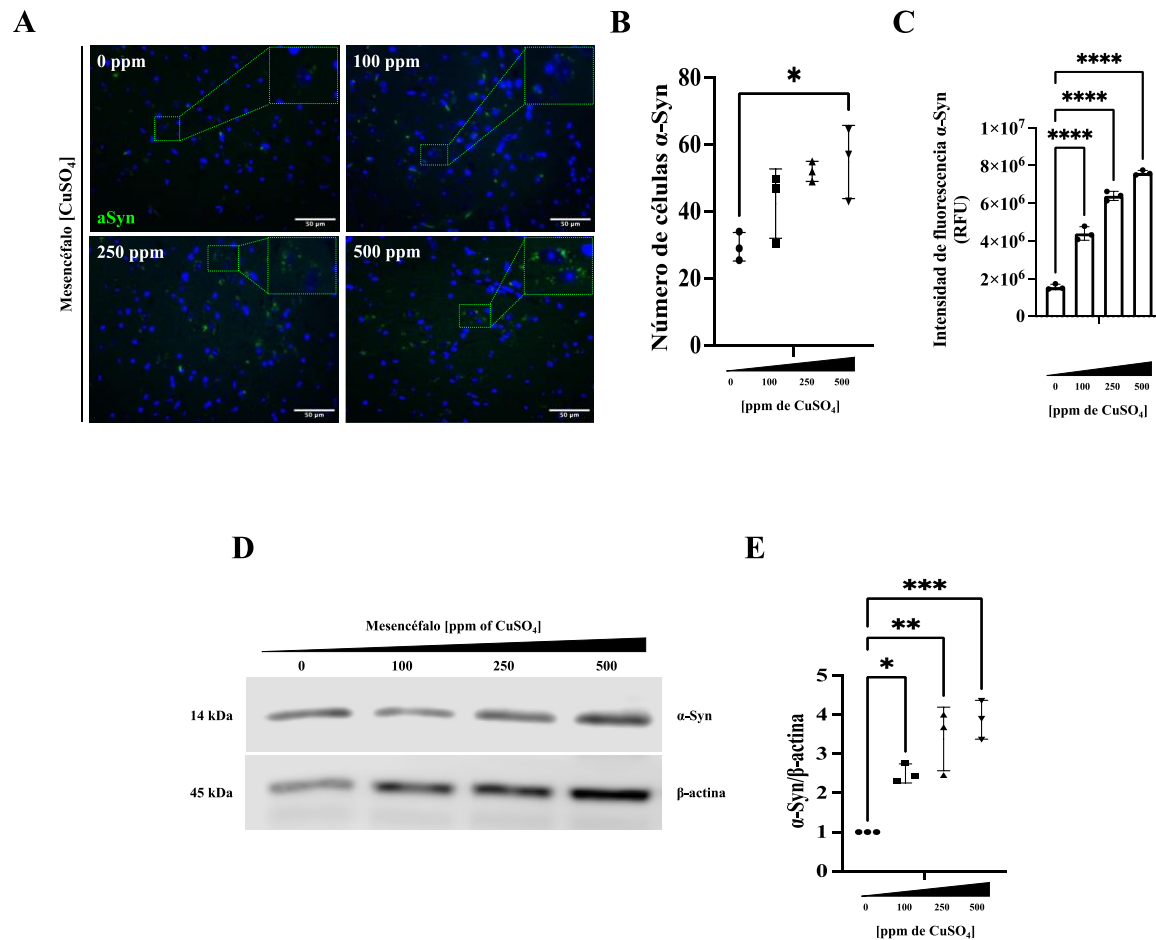


Fig. 14 La exposición crónica a cobre aumenta los niveles de la α -Syn. (A) IF de de muestras de mesencéfalo para evaluar la proteína α -Syn con un anticuerpo específico anti- α -Syn. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (B) El análisis morfométrico y (C) de intensidad de fluorescencia determinó que la exposición crónica al cobre aumenta la α -Syn de manera dependiente de la dosis. (D) WB de muestras de mesencéfalo lisadas en tampón RIPA para evaluar la proteína α -Syn con un anticuerpo específico anti- α -Syn. (E) El análisis densitométrico determinó que la exposición crónica al cobre aumenta la α -Syn de manera dependiente de la dosis. Los valores de densitometría se normalizaron a β -actina. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

Estos resultados fueron corroborados por WB (Fig. 14D) a partir de muestras de mesencéfalo lisadas en una solución de RIPA, donde se evidencia un aumento constante en los niveles de α -Syn (Fig. 14E).

Con esto, nuestros resultados sugieren que la intoxicación por cobre induce la acumulación de α -Syn.

3.1.7 Evaluación del efecto de la exposición crónica a cobre sobre los mecanismos de degradación de proteínas

El sistema ubiquitina-proteosoma (UPS), y la autofagia son mecanismos primarios de control de calidad de proteínas que se encuentran defectuosos en la EP [142]. Anandhan, A., et al., demostraron que el cobre aumenta la ubiquitinación de proteínas y la activación de la autofagia *in vitro* [63]. Por lo que quisimos determinar si este efecto se podía reproducir en un modelo *in vivo*.

El UPS es uno de los mecanismos primarios de control de calidad de proteínas, que también se ve afectado en la EP. Mediante WB, se muestran los niveles de ubiquitinación de proteínas basales en el grupo control. En contraste, se observó un aumento en el patrón de proteínas ubiquitinadas en respuesta a las concentraciones crecientes de cobre (**Fig. 15A**). El patrón de proteínas de alto peso molecular unidas a ubiquitina se analizó por densitometría, confirmando el efecto dependiente de la concentración de cobre (**Fig. 15B**).

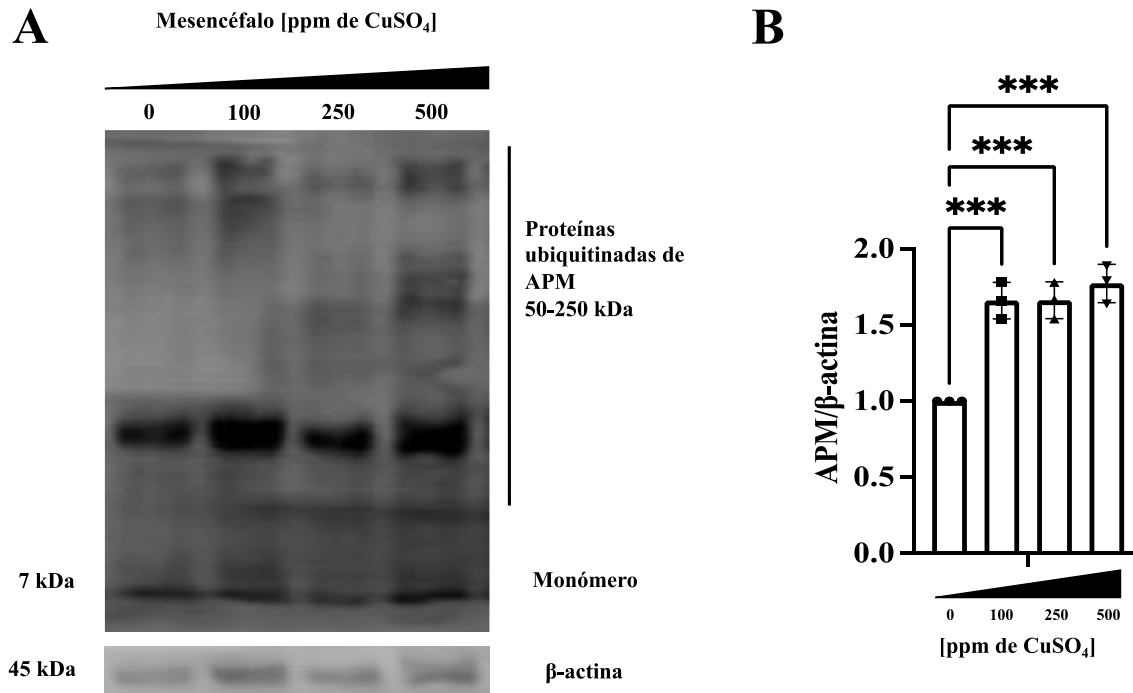


Fig. 15 La exposición crónica a cobre aumenta el patrón de ubiquitinación de proteínas *in vivo*. (A) Proteínas marcadas con ubiquitina, una etiqueta para la degradación de proteínas a través del proteosoma, detectada por WB a partir de muestras de mesencéfalo lisadas en el buffer RIPA. (B) El análisis densitométrico mostró que las proteínas ubiquitinadas aumentaron por la exposición crónica al cobre de una manera dependiente de la dosis. Los valores de densitometría se normalizaron con respecto a β -actina. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías con una prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

Este resultado sugiere que el aumento de proteínas ubiquitinadas se debe a la alteración del UPS por el exceso de cobre.

3.1.8 La fosforilación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina aumenta en respuesta a la exposición prolongada al cobre *in vivo*

La proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) regula diferencialmente la homeostasis energética en la célula mediante su transporte entre el núcleo y el citoplasma para regular sus blancos en ambos compartimentos [143-145]. Modula reacciones específicas, incluida la autofagia, para equilibrar las perturbaciones metabólicas [143-145].

La activación de AMPK por fosforilación conduce a la inhibición de las vías anabólicas y la activación de las vías catabólicas, reprogramando el metabolismo celular para restablecer el equilibrio energético [146]. Dado que AMPK se activó previamente en respuesta al cobre *in vitro* [63], evaluamos si esta activación se llevaba a cabo en el modelo *in vivo*. Se detectó la fosforilación de AMPK (pAMPK) por inmunofluorescencia con fluorescencia verde en secciones del cerebro medio de ratones expuestos al cobre. El núcleo fluoresce en color azul (DAPI). En la **Figura 16A** se muestra que pAMPK aumenta significativamente de manera dependiente de la dosis de cobre. Se confirmó mediante la cuantificación de células positivas para pAMPK (**Fig. 16B**), así como de la intensidad de fluorescencia (**Fig. 16C**).

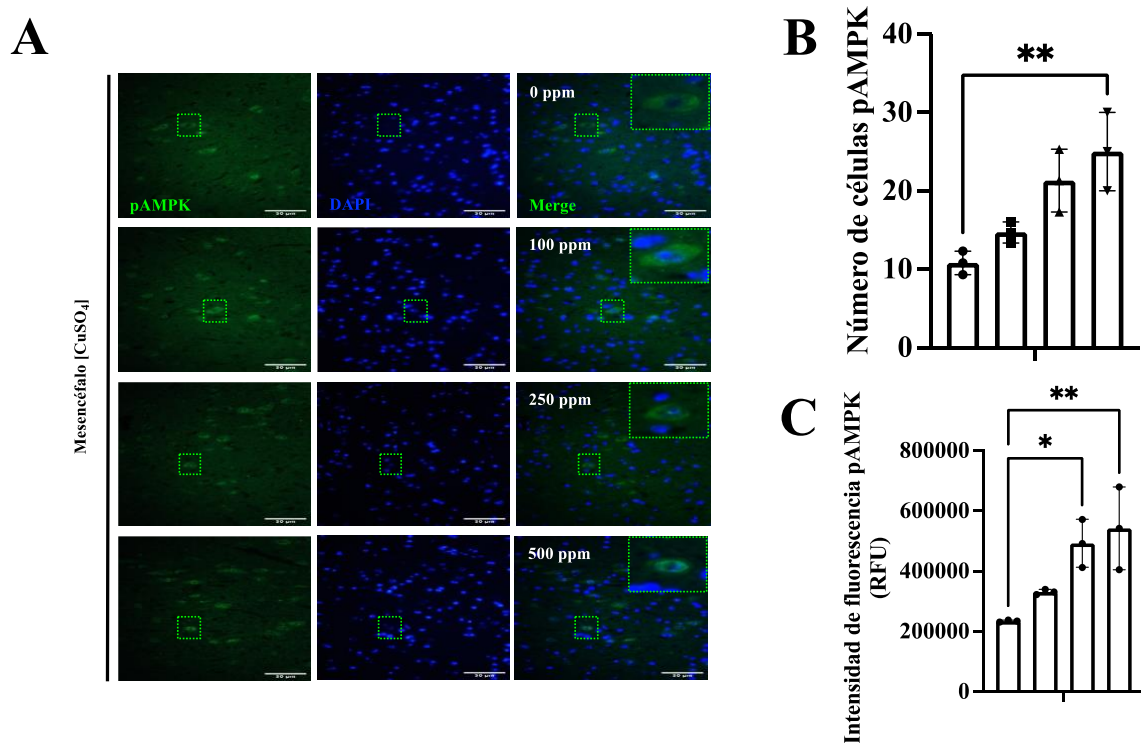


Fig. 16 La exposición crónica a cobre aumenta la fosforilación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina *in vivo*. (A) IF en donde se detectó la fosforilación de AMPK en secciones del mesencéfalo. Los núcleos se tiñeron con DAPI. (B) Representación gráfica de la cuantificación de las células positivas para pAMPK y (C) de la intensidad de fluorescencia en RFU. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

Estos resultados sugieren, que la exposición crónica a cobre aumenta la fosforilación de AMPK *in vivo*.

3.1.9 En el modelo *in vivo* de exposición crónica a cobre se incrementa la autofagia

Previamente, se observó la alteración en la vía del proteosoma, por lo que decidimos evaluar otra vía de degradación de proteínas conocida como autofagia, que además puede ser mediada por AMPK. La autofagia es un mecanismo intracelular activado bajo el estímulo de diversos factores, y puede monitorearse mediante el análisis de la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3), que nos indica los niveles de la autofagia. La molécula LC3-I (citosólica) es modificada por el sistema de ubiquitina a su forma lipidada, LC3-II (ligada a las estructuras de la membrana, incluyendo el fagóforo, autofosoma y autofagolisosoma). Esta isoforma se ancla a la membrana externa e interna del autofosoma [68]. Mediante WB se analizó la activación de la vía de la autofagia mediante la conversión de LC3-I a LC3-II, lo que indica la formación de vesículas relacionadas con la autofagia [69].

Por lo tanto, detectamos el marcador de autofagia, la proteína LC3-II mediante WB, para determinar si el cobre activa este mecanismo. Los niveles basales de autofagia se muestran en el grupo control. Por el contrario, el cobre aumentó los niveles de LC3-II de forma dependiente de la dosis de cobre (**Fig. 17A**). Estos resultados fueron validados por densitometría, demostrando un aumento evidente en respuesta a la concentración de cobre (**Fig. 17B**).

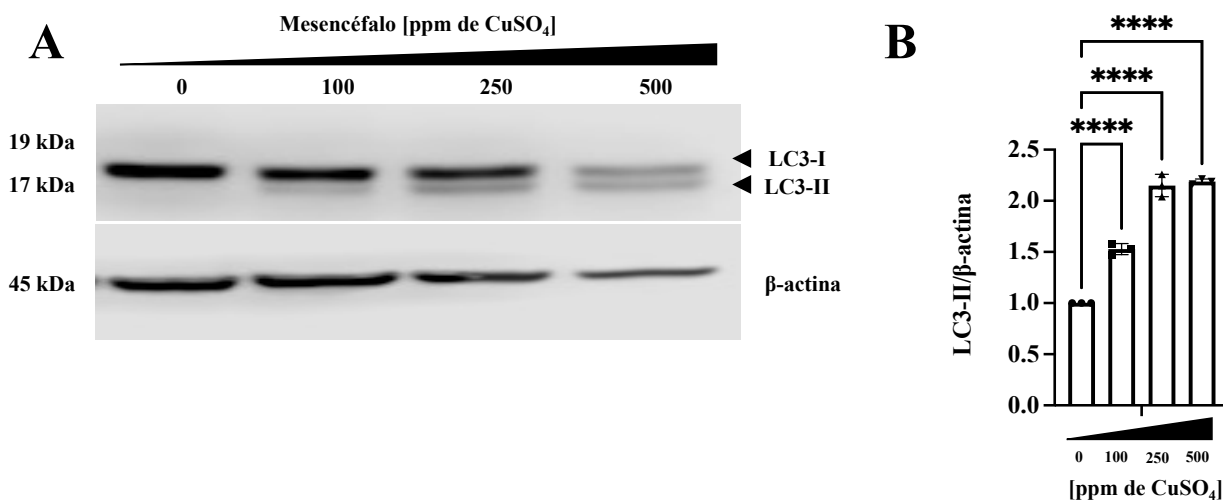


Fig. 17 La exposición crónica a cobre aumenta los niveles de LC3-II. (A) Detección de la cadena ligera de proteína asociada a microtúbulos 3 II (LC3-II) por WB a partir de muestras de mesencéfalo tratadas con cobre. (B) El análisis densitométrico mostró que la LC3-II aumentó por la exposición crónica al cobre de una manera dependiente de la dosis. Los valores de densitometría se normalizaron con respecto a β -actina. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una o dos vías con una prueba de comparaciones múltiples de Šídák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

En conjunto estos resultados, sugieren que los niveles de la proteína LC3-II, el principal marcador de autofagia, aumentan en respuesta a la exposición crónica a cobre.

3.1.10 Evaluación del estrés oxidativo en respuesta a la intoxicación por cobre

El cobre libre tiene la capacidad de inducir la producción de ROS y por ende resulta altamente tóxico en exceso. Por otra parte, la muerte de las neuronas dopaminérgicas es una de las principales características de la EP sin embargo, aún no se conocen los mecanismos moleculares implicados en ésta, en parte, debido a que en la mayoría de los casos no se sabe a ciencia cierta cuál es el factor que inicia la muerte de estas neuronas en esta enfermedad. Existe evidencia que señala que la disfunción mitocondrial, la acumulación anormal de proteínas y el estrés oxidativo están involucrados en la muerte neuronal en la patogénesis de la EP [31, 32].

La oxidación y nitración de las proteínas son un reflejo del estrés oxidativo, y la nitración de tirosina se observa a menudo en las enfermedades neurodegenerativas bajo estrés nitrosativo [147]. Además el cobre tiene un papel importante como ion polivalente en este proceso [147]. Por lo tanto, analizamos el efecto de la exposición crónica a cobre sobre la nitración de proteínas, mediante WB de muestras de mesencéfalo, utilizando un anticuerpo anti-3-nitrotirosina. En el grupo control se muestra el nivel basal de nitración de proteínas. Mientras que la señal de 3-nitrotirosina aumentó de forma dependiente de la concentración de cobre (**Fig. 18A**), los resultados se cuantificaron mediante densitometría (**Fig. 18B**).

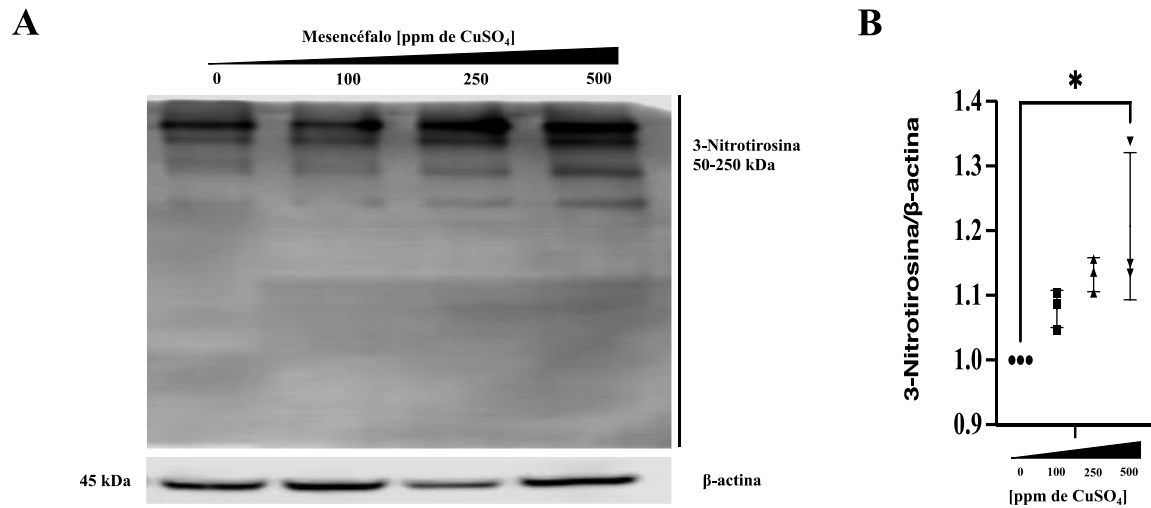


Fig. 18 La nitración de proteínas aumenta con la intoxicación crónica por cobre. Detección de 3-nitrotirosina en el cerebro medio de ratones tratados con concentraciones crecientes de sulfato de cobre para evaluar el estrés oxidativo. (A) Los niveles de proteína nitrada se detectaron con un anticuerpo anti-3-nitrotirosina específico mediante WB a partir de muestras de mesencéfalo. (B) Representación gráfica del análisis densitométrico, observese el aumento significativo del patrón de proteínas nitradas en respuesta al cobre. Los valores de densitometría se normalizaron con respecto a β -actina. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías con una prueba de comparaciones múltiples de Šidák y se representaron como valores medios de al menos tres réplicas independientes \pm SEM.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el cobre induce la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS, Reactive Nitrogen Species) e incrementa la nitración de proteínas.

3.1.11 Caracterización de la microbiota intestinal en un modelo *in vivo* de exposición crónica a cobre

El cerebro y el intestino están conectados a través del SNE, el nervio vago, el sistema inmunitario y los metabolitos de la microbiota. La microbiota intestinal afecta el desarrollo y la función del SNC a través del eje microbiota-intestino-cerebro [100]. Además, la colonización de ratones que sobreexpresan α -Syn con microbiota de pacientes con EP, intensificó las deficiencias motoras en comparación con los trasplantes de microbiota de donantes sanos [148]. Debido a la complejidad de la microbiota intestinal, ha sido difícil

establecer un perfil específico como biomarcador de esta enfermedad, ya que pocos estudios con diferentes poblaciones de pacientes con la EP, han mostrado variaciones en la composición de la microbiota intestinal. Entre las modificaciones más consistentes de la microbiota intestinal, se encuentra el incremento de las familia *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, *Christensenellaceae*, *Verrucomicrobiaceae* y *Enterobacteriaceae*. Por el contrario, *Bacteroidetes*, *Prevotellaceae* y *Lachnospiraceae* disminuyeron en pacientes con la EP en comparación con sujetos sanos [106, 149]. Asimismo, el estado redox mitocondrial y los cambios en la producción de ROS están asociados con modificaciones en la microbiota intestinal [150].

Finalmente, para caracterizar la composición de la microbiota intestinal de nuestro modelo murino, se recolectaron las muestras de materia fecal del décimo mes de tratamiento, y fueron almacenadas a -20°C. Se extrajo el ADN y posteriormente se evaluaron por qPCR, las diversas familias bacterianas que se relacionan con el modelo animal de la EP.

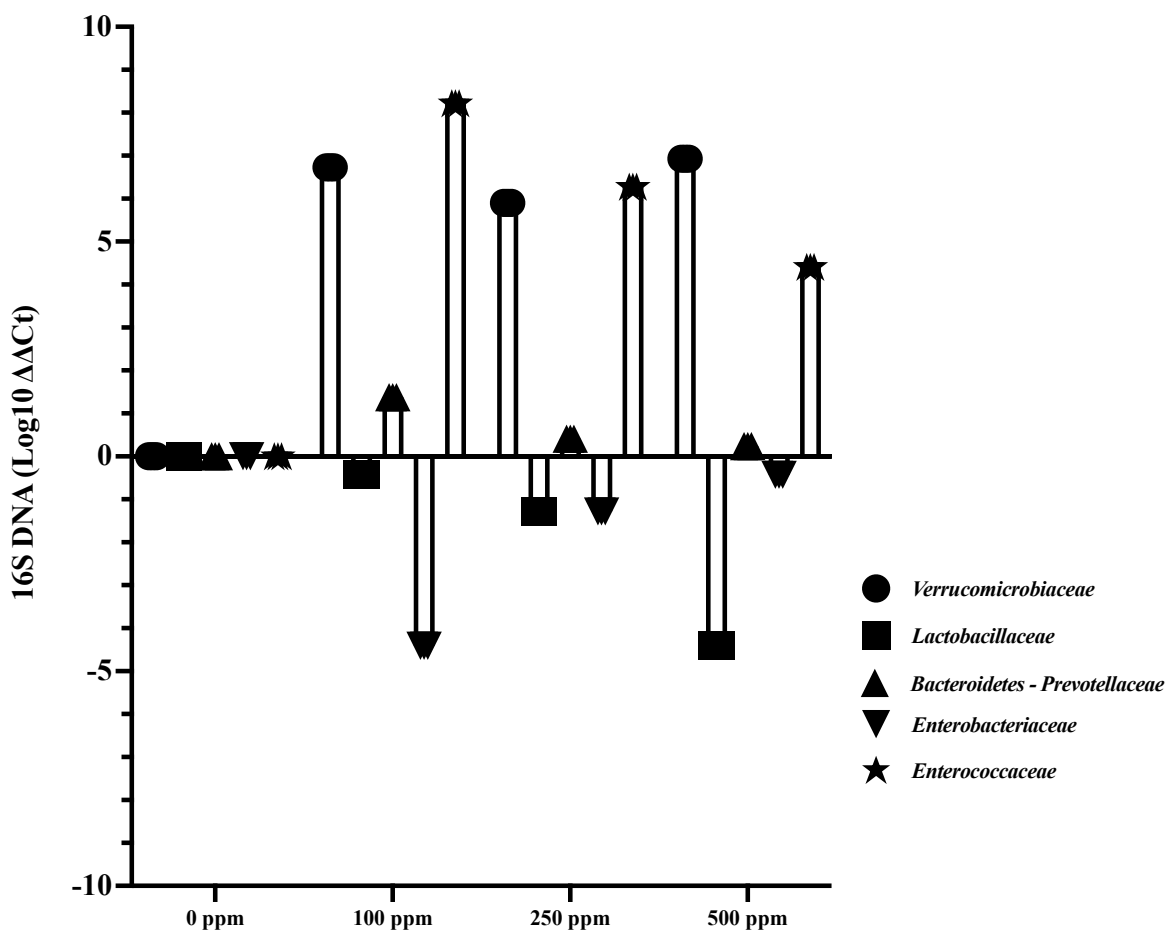


Fig. 19 La exposición crónica a cobre altera el perfil de las familias bacterianas relacionadas con la EP. (A) Detección por qPCR de las familias bacterianas relacionadas con la EP tratadas con las diferentes concentraciones de sulfato de cobre de muestras fecales de 10 meses de exposición. Se observa el $\text{Log}_{10}^{\Delta\Delta\text{Ct}}$. Los oligos Uni331F y Uni797R fueron utilizados como control endógeno. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. Un valor de probabilidad de $*p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Se determinó que la exposición crónica a cobre, en todas las concentraciones, incrementó a las familias *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidetes-Prevotellaceae* y *Enterococcaceae*, en comparación con el grupo control (**Fig. 19**). Por el contrario, la familia *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae* disminuyó.

Capítulo 4

4.1 Discusión

La EP es el primer trastorno neurodegenerativo motor relacionado con el envejecimiento [151]. Desafortunadamente, el diagnóstico de la EP se basa principalmente en criterios clínicos observacionales que en su mayoría son síntomas clínicos motores [131], incluyendo temblor en reposo, rigidez, bradicinesia, entre otros [152], y se manifiestan cuando los pacientes han perdido alrededor del 60-80% de las neuronas dopaminérgicas [153].

Diversos estudios ambientales y ocupacionales han asociado el riesgo de la EP con la industria [154-158]. Estudios epidemiológicos sugieren la participación de diversos metales pesados en la etiología de la EP [12]. Además, se ha reportado una mayor mortalidad en pacientes con la EP, en aquellos que residen en países con industrias papeleras, químicas, del hierro y del cobre [15, 159, 160]. Por lo que, la exposición ocupacional y ambiental crónica al cobre aumenta el riesgo de desarrollar la EP [12, 15, 16, 161]. Un reciente estudio de meta-análisis reportó una disminución de los niveles de cobre en la sustancia negra de los pacientes con la EP en comparación con sujetos sanos de la misma edad [162], lo que sugiere un efecto del cobre sobre la neurodegeneración.

Aunque, los mecanismos por los cuales el cobre induce la muerte celular dopaminérgica se han determinaron *in vitro* [63], el efecto de la exposición crónica al cobre sobre el proceso neurodegenerativo no se ha explorado *in vivo*.

La susceptibilidad a la toxicosis por cobre depende en gran medida de la especie. En especies de mamíferos no rumiantes, como ratones, ratas, conejos, cerdos y perros, los efectos tóxicos significativos del cobre están asociados con la ingestión a largo plazo de altas dosis más allá de las toleradas por los humanos. Según la agencia de protección ambiental (EPA), la concentración de cobre permitida en el agua potable es de 1,3 ppm [163]. Sin embargo, la esperanza de vida disminuyó un 12,8 % en ratones C57BL/6J de 1 mes de edad que recibieron cobre a 317 ppm (317 mg Cu/L) como gluconato de cobre en el agua potable durante un máximo de 31 a 700 días, los principales órganos afectados fueron el intestino y el hígado [115, 116]. Además, el Programa Nacional de Toxicología (NTP) de

EE. UU. utilizó un modelo de toxicología en ratones B6C3F1 expuestos a sulfato de cobre (CuSO_4) en el agua potable a 76, 254, 762, 2543 o 7629 ppm durante 2 semanas [117]. Es de destacar que los ratones machos y hembras expuestos a 762 ppm o dosis más altas de cobre experimentaron numerosos efectos, incluida la pérdida de peso neto de los órganos y la muerte.

Por lo tanto, es urgente contar con modelos de la EP fisiopatológicamente relevantes que reproduzcan la enfermedad tal como ocurre en humanos, ya que los modelos actuales no reproducen todas las características de la enfermedad y pueden conducir a ella a través de diferentes mecanismos.

Por todo lo anterior, el objetivo de este estudio fue dilucidar si la exposición crónica a cobre durante el envejecimiento reproduce las características de la EP en un modelo murino. Dado que la esperanza de vida de los ratones disminuyó cuando se expusieron a 317 ppm durante 700 días [115, 116], debido a que el intestino y el hígado fueron los más dañados cuando los ratones se expusieron a 762 ppm durante 2 semanas [117], decidimos utilizar 500 ppm de cobre como la concentración más alta, 250 ppm y 100 ppm como la dosis más baja, lo que nos aseguró que los ratones no mostrarían daños visibles durante al menos 700 días.

En este proyecto, se emuló la interacción entre la exposición ambiental y el envejecimiento en el proceso neurodegenerativo al someter a ratones a un tratamiento crónico con cobre en el agua potable durante 40 semanas. Después del período experimental, pudimos confirmar que nuestro esquema de dosificación no afecta el peso corporal ni la sobrevivencia.

Sin embargo, la interrupción de la homeostasis del cobre provoca alteraciones graves en la función neurológica [17, 130], ya que demostramos que la exposición crónica al cobre durante el envejecimiento afecta la función motora de los ratones, que se evaluó mediante la prueba de la marcha.

Se han reportado niveles elevados de cobre en el líquido cefalorraquídeo y la sangre de pacientes con la EP [13, 14]. Se cree que la pérdida neuronal presente en la EP, puede conducir a una disminución de las proteínas de unión al cobre, causando que el cobre extracelular migre al líquido cefalorraquídeo y a la sangre para unirse a otras proteínas o aumentar la producción de ROS a través de la reacción de Fenton, causando un círculo vicioso que culmina con la muerte de las neuronas dopaminérgicas. Por lo que nuestro

proyecto fue consistente con la literatura, al observar la pérdida neuronal dopaminérgica encontrada en respuesta a concentraciones crecientes de cobre. Por lo tanto, demostramos que la alteración de la función motora inducida por el cobre está relacionada con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas mediada por la exposición crónica a cobre.

En relación a la glía, los astrocitos junto con la microglía preservan la homeostasis del cerebro al inhibir la toxicidad de los iones metálicos; durante el envejecimiento, la alteración de la glía y la pérdida de la homeostasis del metal aumentan y pueden conducir a la neurodegeneración [136]. Es por ello que tras la evaluación de diversas células de la glía, encontramos que la pérdida de las neuronas dopaminérgicas observadas en nuestro modelo de exposición crónica al cobre estuvo acompañada de astrocitosis y microgliosis. Esto se relaciona con el aumento observado de la expresión de los transportadores de cobre en los astrocitos durante la inflamación cuando el cobre está desregulado [164]. Además, la microgliosis observada en nuestro modelo, coincide con el aumento de la microglía activada presente en muestras de cerebro *post mortem* de pacientes con la EP [139].

El sello histopatológico de la EP es la presencia de cuerpos de Lewy compuestos por depósitos anormales de agregados de proteínas, particularmente proteínas unidas a α -Syn y ubiquitina [165]. Asimismo, la fosforilación de la α -Syn junto con el cobre, acelera el proceso de agregación de proteínas [83, 166, 167]. Aunado a esto, la agregación anormal de proteínas también resulta de la alteración de UPS y de la vía autofagia-lisosomal(ALP) [142, 168, 169], mecanismos que también se encuentran afectados en la EP [142]. Anteriormente, se demostró que el cobre aumenta la ubiquitinación de proteínas y la activación de la autofagia *in vitro* [63]. Coincidiendo con la literatura, nuestros resultados confirmaron la intoxicación por cobre *in vivo* induce la acumulación y agregación de la α -Syn y aumenta la ubiquitinación de proteínas y la activación de la autofagia mediada por la fosforilación de AMPK durante el envejecimiento [18, 61, 63, 94, 143-146].

Dado que el cobre induce estrés oxidativo [63] y la nitración de tirosina a menudo se observa en enfermedades neurodegenerativas bajo estrés nitrosativo [147], evaluamos el efecto del tratamiento prolongado con cobre sobre la nitración de proteínas. Con ello pudimos corroborar, que en nuestro modelo animal, la exposición crónica a cobre induce estrés nitrosativo [170]. La nitración de residuos de tirosina en las proteínas puede causar cambios estructurales y funcionales, incluida la inactivación y degradación de proteínas,

que están relacionadas con la pérdida de células neuronales [170]. Sin embargo, sigue siendo difícil determinar si el efecto degenerativo del cobre es directo o indirecto.

La novedad del modelo de exposición crónica al cobre es su idoneidad para evaluar terapias dirigidas al desbalance de metales mediante quelantes que interrumpen interacciones metal-proteína anormales específicas, como 1-metil-1H-imidazol-2-carboxaldehído isonicotinoil hidrazona (X1INH) [171] y 8-hidroxiquinolina-2-carboxaldehído isonicotinoil hidracina (INHHQ) [172], que interrumpe las interacciones anómalas de cobre- α -Syn y afecta la agregación de proteínas *in vitro*. Es importante destacar que el INHHQ cruza la barrera hematoencefálica y se puede detectar en el cerebro de las ratas hasta 24 h después de su administración IP, después de 48 h, la eliminación del cerebro es completa, pero el INHHQ permanece en el hígado incluso 72 h después de la exposición aguda [172], motivo por el cual nuestro modelo animal es ideal para evaluar su efecto. El efecto de la D-penicilamina, un quelante de cobre relativamente específico, se evaluó en el modelo de ratones con la EP inducida por la neurotoxina 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina (MPTP), mostrando un efecto modesto en la prevención del agotamiento de la dopamina estriatal inducida por MPTP [173]. Sin embargo, otro estudio detectó una disminución en el contenido de cobre del estriado y el mesencéfalo en el modelo MPTP, lo que sugiere que su neurotoxicidad es independiente del cobre [174]. Por lo tanto, la investigación básica que realizamos brinda un modelo prometedor para evaluar el efecto de los quelantes de cobre y puede facilitar potencialmente los ensayos clínicos en pacientes con la EP.

Estudios recientes han relacionado la disbiosis intestinal con la EP [104-106, 175-180]. La ventaja del presente estudio radica en la identificación de cambios en la proporción de diversas familias bacterianas asociadas con la EP. La caracterización de la composición de la microbiota intestinal de nuestro modelo murino, se realizó en muestras de materia fecal, colectadas el décimo mes del tratamiento, mostrando que la exposición crónica a cobre, en todas las concentraciones, disminuyó a las familias *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae*, en comparación con el grupo control. Por el contrario, las familias *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidetes-Prevotellaceae* y *Enterococcaceae* incrementaron. Por lo antes mencionado, nuestros resultados mostraron que la exposición crónica a cobre altera diversas familias bacterianas que se relacionan con la EP.

Una ventaja de nuestro estudio, es que la exposición crónica a cobre en los ratones refleja la forma en que los humanos desarrollan la EP a través del envejecimiento y la exposición ambiental y ocupacional, ya que los ratones fueron tratados con cobre en el agua potable durante 10 meses, casi la mitad de la vida útil de los mismos, reproduciendo alteraciones motoras, la muerte de las neuronas dopaminérgicas, entre otras características clave. Sin embargo, la limitación principal de nuestro modelo animal es el tiempo requerido para manifestar la disfunción motora, una característica importante de la EP, que se alcanzó el daño neuronal. Durante 10 meses, simulando el proceso neurodegenerativo humano, los ratones deben ser cuidados y monitoreados.

En resumen, demostramos que la exposición crónica al cobre induce muerte celular dopaminérgica, astrocitosis, microgliosis, acumulación de α -Syn, esta última asociada a la alteración de las vías de degradación de proteínas, UPS y ALP; así como un aumento en la fosforilación de AMPK y la nitración de las proteínas. Finalmente, en relación a la microbiota, la exposición crónica a cobre, en todas las concentraciones, disminuye la población bacteriana de las familias *Enterobacteriaceae* y *Lactobacillaceae*, mientras que las familias *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidetes-Prevotellaceae* y *Enterococcaceae* incrementan.

Como resultado, el modelo de exposición crónica a cobre en ratones, propuesto en este estudio, emula la progresión de la EP tal como ocurre en el humano, involucrando dos factores de riesgo de la enfermedad, como son la exposición ambiental y el envejecimiento. Con esto se podrá ayudar a diseñar estrategias profilácticas y terapéuticas para mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que establece la exposición crónica al cobre como un modelo murino *in vivo* de la EP no genética, lo que puede ayudar a evaluar posibles enfoques profilácticos y terapéuticos.

Capítulo 5

5.1 Conclusiones

- La exposición crónica al cobre alteró la función motora.
- La exposición crónica al cobre indujo la muerte de las neuronas dopaminérgicas.
- La exposición crónica al cobre indujo astrocitosis y microgliosis.
- La exposición crónica al cobre aumentó la α -Syn, la ubiquitinación de proteínas, la fosforilación de AMPK y el marcador de autofagia LC3-II.
- La exposición crónica al cobre indujo estrés nitrosativo.
- La exposición crónica al cobre alteró la microbiota intestinal.

Literatura Citada

1. Kültz, D., *Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response*. *Annu Rev Physiol*, 2005. **67**: p. 225-57.
2. Riederer, P., et al., *Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains*. *J Neurochem*, 1989. **52**(2): p. 515-20.
3. Constantinidis, J., *The hypothesis of zinc deficiency in the pathogenesis of neurofibrillary tangles*. *Med Hypotheses*, 1991. **35**(4): p. 319-23.
4. Good, P.F., et al., *Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study*. *Ann Neurol*, 1992. **31**(3): p. 286-92.
5. Montoya Arce, J. and H. Montes de Oca Vargas, *Envejecimiento poblacional en el Estado de México: situación actual y perspectivas futuras*. *Papeles de población*, 2006. **12**(50): p. 117-146.
6. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. *Neuron*, 2003. **39**(6): p. 889-909.
7. Horowitz, M.P. and J.T. Greenamyre, *Gene-environment interactions in Parkinson's disease: the importance of animal modeling*. *Clin Pharmacol Ther*, 2010. **88**(4): p. 467-74.
8. Vance, J.M., et al., *Gene-environment interactions in Parkinson's disease and other forms of parkinsonism*. *Neurotoxicology*, 2010. **31**(5): p. 598-602.
9. Stefanis, L., *α -Synuclein in Parkinson's disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(2): p. a009399.
10. Rochet, J.C., B.A. Hay, and M. Guo, *Molecular insights into Parkinson's disease*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012. **107**: p. 125-88.
11. Breydo, L., J.W. Wu, and V.N. Uversky, *A-synuclein misfolding and Parkinson's disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(2): p. 261-85.
12. Santner, A. and V.N. Uversky, *Metalloproteomics and metal toxicology of α -synuclein*. *Metallomics*, 2010. **2**(6): p. 378-92.
13. Pall, H.S., et al., *Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in Parkinson's disease*. *Lancet*, 1987. **2**(8553): p. 238-41.
14. Hozumi, I., et al., *Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases*. *J Neurol Sci*, 2011. **303**(1-2): p. 95-9.
15. Rybicki, B.A., et al., *Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan*. *Mov Disord*, 1993. **8**(1): p. 87-92.
16. Gorell, J.M., et al., *Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease*. *Neurotoxicology*, 1999. **20**(2-3): p. 239-47.
17. de Bie, P., et al., *Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes*. *J Med Genet*, 2007. **44**(11): p. 673-88.
18. Rasia, R.M., et al., *Structural characterization of copper(II) binding to alpha-synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(12): p. 4294-9.
19. Lucas, H.R. and J.C. Lee, *Copper(II) enhances membrane-bound α -synuclein helix formation*. *Metallomics*, 2011. **3**(3): p. 280-3.

20. Kowalik-Jankowska, T., et al., *Products of Cu(II)-catalyzed oxidation of alpha-synuclein fragments containing M1-D2 and H50 residues in the presence of hydrogen peroxide*. Dalton Trans, 2008(6): p. 832-8.
21. Guilloureau, L., et al., *Redox chemistry of copper-amyloid-beta: the generation of hydroxyl radical in the presence of ascorbate is linked to redox-potentials and aggregation state*. Chembiochem, 2007. **8**(11): p. 1317-25.
22. Kowalik-Jankowska, T., et al., *Copper(II) binding by fragments of alpha-synuclein containing M1-D2- and -H50-residues; a combined potentiometric and spectroscopic study*. Dalton Trans, 2006(42): p. 5068-76.
23. Shannon, K.M., et al., *Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease*. Mov Disord, 2012. **27**(6): p. 709-15.
24. Devos, D., et al., *Colonic inflammation in Parkinson's disease*. Neurobiol Dis, 2013. **50**: p. 42-8.
25. Fasano, A., et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2013. **28**(9): p. 1241-9.
26. Fasano, A., et al., *Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease*. Lancet Neurol, 2015. **14**(6): p. 625-39.
27. Braak, H., et al., *Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen*. J Neural Transm (Vienna), 2003. **110**(5): p. 517-36.
28. Mulak, A. and B. Bonaz, *Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(37): p. 10609-20.
29. Qian, Y., et al., *Alteration of the fecal microbiota in Chinese patients with Parkinson's disease*. Brain Behav Immun, 2018. **70**: p. 194-202.
30. Poewe, W., et al., *Parkinson disease*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17013.
31. Levy, O.A., C. Malagelada, and L.A. Greene, *Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps*. Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 478-500.
32. Yao, Z. and N.W. Wood, *Cell death pathways in Parkinson's disease: role of mitochondria*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(9): p. 2135-49.
33. Linder, M.C., *Biochemistry of copper*. Vol. 10. 2013: Springer Science & Business Media.
34. Madsen, E. and J.D. Gitlin, *Copper and iron disorders of the brain*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 317-37.
35. Peña, M.M., J. Lee, and D.J. Thiele, *A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution*. J Nutr, 1999. **129**(7): p. 1251-60.
36. Scott, K., *Turnlund JR*. Compartmental model of copper metabolism in adult men. J Nutr Biochem, 1994. **5**: p. 342-350.
37. Tapiero, H., D.á. Townsend, and K. Tew, *Trace elements in human physiology and pathology. Copper*. Biomedicine & pharmacotherapy, 2003. **57**(9): p. 386-398.
38. Turnlund, J.R., et al., *Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu*. Am J Clin Nutr, 1989. **49**(5): p. 870-8.
39. Rae, T.D., et al., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. Science, 1999. **284**(5415): p. 805-8.
40. Lane, T.F., et al., *SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis*. J Cell Biol, 1994. **125**(4): p. 929-43.

41. Kodama, H. and C. Fujisawa, *Copper metabolism and inherited coppertransport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment*. Metallomics, 2009. **1**(1): p. 42-52.
42. Kodama, H., Y. Murata, and M. Kobayashi, *Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants*. *Pediatr Int*, 1999. **41**(4): p. 423-9.
43. Zatta, P., et al., *Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002. **228**(2): p. 271-284.
44. Wapnir, R.A., *Copper absorption and bioavailability*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1054S-1060S.
45. DiDonato, M. and B. Sarkar, *Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1360**(1): p. 3-16.
46. Lee, J., et al., *Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(6): p. 4380-7.
47. Arredondo, M., et al., *DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **284**(6): p. C1525-30.
48. Crisponi, G., et al., *Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology*. *Coordination chemistry reviews*, 2010. **254**(7-8): p. 876-889.
49. Kägi, J.H. and B.L. Vallee, *Metallothionein: a cadmium-and zinc-containing protein from equine renal cortex*. *Journal of Biological Chemistry*, 1960. **235**(12): p. 3460-3465.
50. Sturniolo, G.C., et al., *Zinc therapy increases duodenal concentrations of metallothionein and iron in Wilson's disease patients*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(2): p. 334-8.
51. Bremner, I., *Absorption, transport and distribution of copper*. *Ciba Found Symp*, 1980. **79**: p. 23-48.
52. Bankier, A., *Menkes disease*. *J Med Genet*, 1995. **32**(3): p. 213-5.
53. Lutsenko, S., et al., *Function and regulation of human copper-transporting ATPases*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(3): p. 1011-46.
54. La Fontaine, S. and J.F. Mercer, *Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **463**(2): p. 149-67.
55. Fukai, T., M. Ushio-Fukai, and J.H. Kaplan, *Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018. **315**(2): p. C186-C201.
56. Eum, W.S. and J.H. Kang, *Release of copper ions from the familial amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutants*. *Mol Cells*, 1999. **9**(1): p. 110-4.
57. Huang, X., et al., *Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(52): p. 37111-6.
58. Deibel, M.A., W.D. Ehmann, and W.R. Markesbery, *Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress*. *J Neurol Sci*, 1996. **143**(1-2): p. 137-42.
59. Rossi, L., et al., *Increased susceptibility of copper-deficient neuroblastoma cells to oxidative stress-mediated apoptosis*. *Free Radic Biol Med*, 2001. **30**(10): p. 1177-87.

60. Prohaska, J.R. and T.L. Smith, *Effect of dietary or genetic copper deficiency on brain catecholamines, trace metals and enzymes in mice and rats*. J Nutr, 1982. **112**(9): p. 1706-17.
61. Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink, *Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 44284-96.
62. Paik, S.R., et al., *Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein*. Biochem J, 1999. **340** (Pt 3): p. 821-8.
63. Anandhan, A., et al., *Overexpression of alpha-synuclein at non-toxic levels increases dopaminergic cell death induced by copper exposure via modulation of protein degradation pathways*. Neurobiol Dis, 2015. **81**: p. 76-92.
64. Andrews, N.C., *Metal transporters and disease*. Current opinion in chemical biology, 2002. **6**(2): p. 181-186.
65. Llanos, R.M. and J.F. Mercer, *The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 259-70.
66. Mercer, J.F., *Menkes syndrome and animal models*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5 Suppl): p. 1022S-1028S.
67. Gouider-Khouja, N., *Wilson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2009. **15** Suppl 3: p. S126-9.
68. Tapiero, H. and K.D. Tew, *Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2003. **57**(9): p. 399-411.
69. Kaler, S.G., *Metabolic and molecular bases of Menkes disease and occipital horn syndrome*. Pediatr Dev Pathol, 1998. **1**(1): p. 85-98.
70. DiDonato, M. and B. Sarkar, *Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 1997. **1360**(1): p. 3-16.
71. Mercer, J.F., *The molecular basis of copper-transport diseases*. Trends in molecular medicine, 2001. **7**(2): p. 64-69.
72. Stern, B.R., et al., *Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2007. **10**(3): p. 157-222.
73. Ferenci, P., et al., *Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease*. Liver Int, 2003. **23**(3): p. 139-42.
74. Jomova, K. and M. Valko, *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, 2011. **283**(2-3): p. 65-87.
75. Bleackley, M.R. and R.T. Macgillivray, *Transition metal homeostasis: from yeast to human disease*. Biometals, 2011. **24**(5): p. 785-809.
76. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
77. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
78. Singleton, A.B., et al., *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 841.
79. Galvin, J.E., V.M. Lee, and J.Q. Trojanowski, *Synucleinopathies: clinical and pathological implications*. Arch Neurol, 2001. **58**(2): p. 186-90.

80. Dickson, D.W., *Alpha-synuclein and the Lewy body disorders*. *Curr Opin Neurol*, 2001. **14**(4): p. 423-32.
81. Goedert, M. and M.G. Spillantini, *Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies*. *Mol Psychiatry*, 1998. **3**(6): p. 462-5.
82. Mukaetova-Ladinska, E.B. and I.G. McKeith, *Pathophysiology of synuclein aggregation in Lewy body disease*. *Mech Ageing Dev*, 2006. **127**(2): p. 188-202.
83. Castillo-Gonzalez, J.A., et al., *Phosphorylated*. *Parkinsons Dis*, 2017. **2017**: p. 9164754.
84. Spillantini, M.G. and M. Goedert, *The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **920**: p. 16-27.
85. Campbell, B.C., et al., *The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease*. *J Neurochem*, 2001. **76**(1): p. 87-96.
86. Binolfi, A., et al., *Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein*. *Inorg Chem*, 2010. **49**(22): p. 10668-79.
87. Jackson, M.S. and J.C. Lee, *Identification of the minimal copper(II)-binding alpha-synuclein sequence*. *Inorg Chem*, 2009. **48**(19): p. 9303-7.
88. Binolfi, A., et al., *Site-specific interactions of Cu(II) with alpha and beta-synuclein: bridging the molecular gap between metal binding and aggregation*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(35): p. 11801-12.
89. Binolfi, A., et al., *Interaction of alpha-synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement*. *J Am Chem Soc*, 2006. **128**(30): p. 9893-901.
90. Drew, S.C., et al., *Cu²⁺ binding modes of recombinant alpha-synuclein--insights from EPR spectroscopy*. *J Am Chem Soc*, 2008. **130**(24): p. 7766-73.
91. Drew, S.C., et al., *Copper coordination by familial mutants of Parkinson's disease-associated alpha-synuclein*. *Applied Magnetic Resonance*, 2009. **36**(2): p. 223-229.
92. Camponeschi, F., et al., *Copper(I)-alpha-synuclein interaction: structural description of two independent and competing metal binding sites*. *Inorg Chem*, 2013. **52**(3): p. 1358-67.
93. Miotto, M.C., et al., *Site-specific copper-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: tightening the link between metal binding and protein oxidative damage in Parkinson's disease*. *Inorg Chem*, 2014. **53**(9): p. 4350-8.
94. Wang, X., et al., *Copper binding regulates intracellular alpha-synuclein localisation, aggregation and toxicity*. *J Neurochem*, 2010. **113**(3): p. 704-14.
95. Wang, C., et al., *Redox reactions of the alpha-synuclein-Cu(2+) complex and their effects on neuronal cell viability*. *Biochemistry*, 2010. **49**(37): p. 8134-42.
96. Klingelhoefer, L. and H. Reichmann, *The Gut and Nonmotor Symptoms in Parkinson's Disease*. *Int Rev Neurobiol*, 2017. **134**: p. 787-809.
97. Felice, V.D., et al., *Microbiota-gut-brain signalling in Parkinson's disease: Implications for non-motor symptoms*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016. **27**: p. 1-8.
98. Santos, S.F., et al., *The Gut and Parkinson's Disease-A Bidirectional Pathway*. *Front Neurol*, 2019. **10**: p. 574.
99. Kim, Y.J., et al., *Risk of Parkinson's disease after colectomy: longitudinal follow-up study using a national sample cohort*. *J Neurol*, 2019.

100. Zhu, X., et al., *Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system*. *Oncotarget*, 2017. **8**(32): p. 53829-53838.
101. Breen, D.P., G.M. Halliday, and A.E. Lang, *Gut-brain axis and the spread of α -synuclein pathology: Vagal highway or dead end?* *Mov Disord*, 2019. **34**(3): p. 307-316.
102. Dinan, T.G. and J.F. Cryan, *The impact of gut microbiota on brain and behaviour: implications for psychiatry*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2015. **18**(6): p. 552-8.
103. Pfeiffer, R.F., *Gastrointestinal Dysfunction in Parkinson's Disease*. *Curr Treat Options Neurol*, 2018. **20**(12): p. 54.
104. Hasegawa, S., et al., *Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0142164.
105. Keshavarzian, A., et al., *Colonic bacterial composition in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2015. **30**(10): p. 1351-60.
106. Unger, M.M., et al., *Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls*. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016. **32**: p. 66-72.
107. Narożańska, E., et al., *Pharmacokinetics of levodopa in patients with Parkinson disease and motor fluctuations depending on the presence of Helicobacter pylori infection*. *Clin Neuropharmacol*, 2014. **37**(4): p. 96-9.
108. Jiao, Y., et al., *Acute Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) or Paraquat on Core Temperature in C57BL/6J Mice*. *J Parkinsons Dis*, 2015. **5**(2): p. 389-401.
109. Gonzalez-Polo, R.A., et al., *Paraquat, Between Apoptosis and Autophagy, Toxicity and Drug Testing*. William Acree, IntechOpen, 2012.
110. Grabie, V., et al., *Paraquat uptake in the cultured gastrointestinal epithelial cell line, IEC-6*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993. **122**(1): p. 95-100.
111. Grant, H., P.L. Lantos, and C. Parkinson, *Cerebral damage in paraquat poisoning*. *Histopathology*, 1980. **4**(2): p. 185-95.
112. Rodriguez-Rocha, H., et al., *Compartmentalized oxidative stress in dopaminergic cell death induced by pesticides and complex I inhibitors: distinct roles of superoxide anion and superoxide dismutases*. *Free Radic Biol Med*, 2013. **61**: p. 370-83.
113. Brooks, A.I., et al., *Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss*. *Brain Res*, 1999. **823**(1-2): p. 1-10.
114. Shimizu, K., et al., *Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat*. *Brain Res*, 2001. **906**(1-2): p. 135-42.
115. Massie, H.R. and V.R. Aiello, *Excessive intake of copper: influence on longevity and cadmium accumulation in mice*. *Mech Ageing Dev*, 1984. **26**(2-3): p. 195-203.
116. Massie, H.R. and V.R. Aiello, *The effect of dietary methionine on the copper content of tissues and survival of young and old mice*. *Exp Gerontol*, 1984. **19**(6): p. 393-9.
117. Hebert, C., *NTP technical report on the toxicity studies of Cupric Sulfate (CAS No. 7758-99-8) Administered in Drinking Water and Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice*. *Toxic Rep Ser*, 1993. **29**: p. 1-D3.
118. Charan, J. and N.D. Kantharia, *How to calculate sample size in animal studies?* *J Pharmacol Pharmacother*, 2013. **4**(4): p. 303-6.

119. Paxinos, G. and K.B. Franklin, *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2019: Academic press.
120. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 697-703.
121. Coenye, T. and P. Vandamme, *Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **228**(1): p. 45-9.
122. Pereira, F., et al., *Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(22): p. e203.
123. Kolbert, C.P. and D.H. Persing, *Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(3): p. 299-305.
124. Heilig, H.G., et al., *Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(1): p. 114-23.
125. Walter, J., et al., *Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, and Weissella species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(6): p. 2578-85.
126. Ludwig, W. and K.H. Schleifer, *How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts?* Syst Appl Microbiol, 2000. **23**(4): p. 556-62.
127. da Rocha, U.N., J.D. van Elsas, and L.S. van Overbeek, *Real-time PCR detection of Holophagae (Acidobacteria) and Verrucomicrobia subdivision 1 groups in bulk and leek (Allium porrum) rhizosphere soils*. J Microbiol Methods, 2010. **83**(2): p. 141-8.
128. Bartosch, S., et al., *Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(6): p. 3575-81.
129. Nadkarni, M.A., et al., *Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set*. Microbiology (Reading), 2002. **148**(Pt 1): p. 257-266.
130. Attri, S., et al., *Erythrocyte metabolism and antioxidant status of patients with Wilson disease with hemolytic anemia*. Pediatr Res, 2006. **59**(4 Pt 1): p. 593-7.
131. Jankovic, J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(4): p. 368-76.
132. Bloem, B.R., et al., *Falls and freezing of gait in Parkinson's disease: a review of two interconnected, episodic phenomena*. Mov Disord, 2004. **19**(8): p. 871-84.
133. Giladi, N., et al., *Freezing of gait in patients with advanced Parkinson's disease*. J Neural Transm (Vienna), 2001. **108**(1): p. 53-61.
134. Hornykiewicz, O., *The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain*. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 9-15.
135. Shults, C.W., *Lewy bodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1661-8.
136. Ashraf, A., et al., *Regional Distributions of Iron, Copper and Zinc and Their Relationships With Glia in a Normal Aging Mouse Model*. Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 351.
137. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.

138. Burda, J.E., A.M. Bernstein, and M.V. Sofroniew, *Astrocyte roles in traumatic brain injury*. *Exp Neurol*, 2016. **275 Pt 3**: p. 305-315.
139. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Glial reactions in Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2008. **23**(4): p. 474-83.
140. Hwang, I.K., et al., *Ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactive cells change in the gerbil hippocampal CA1 region after ischemia/reperfusion*. *Neurochem Res*, 2006. **31**(7): p. 957-65.
141. Zhang, X., et al., *Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1 (IBA1)*. *Am J Clin Pathol*, 2021. **156**(1): p. 86-99.
142. Cook, C., C. Stetler, and L. Petrucelli, *Disruption of protein quality control in Parkinson's disease*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(5): p. a009423.
143. Kodihla, M., et al., *Localization of AMP kinase is regulated by stress, cell density, and signaling through the MEK-->ERK1/2 pathway*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(5): p. C1427-36.
144. Kazgan, N., et al., *Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(19): p. 3433-42.
145. Afinanisa, Q., M.K. Cho, and H.A. Seong, *AMPK Localization: A Key to Differential Energy Regulation*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(20).
146. Hardie, D.G., *AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways*. *Cell Metab*, 2014. **20**(6): p. 939-52.
147. Qiao, L., et al., *Copper-catalyzed tyrosine nitration*. *J Am Chem Soc*, 2011. **133**(49): p. 19823-31.
148. Sampson, T.R., et al., *Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease*. *Cell*, 2016. **167**(6): p. 1469-1480.e12.
149. Gopar-Cuevas, Y., et al., *Pursuing Multiple Biomarkers for Early Idiopathic Parkinson's Disease Diagnosis*. *Mol Neurobiol*, 2021.
150. Yardeni, T., et al., *Host mitochondria influence gut microbiome diversity: A role for ROS*. *Sci Signal*, 2019. **12**(588).
151. Wirdefeldt, K., et al., *Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence*. *Eur J Epidemiol*, 2011. **26 Suppl 1**: p. S1-58.
152. Forno, L.S., *Neuropathology of Parkinson's disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996. **55**(3): p. 259-72.
153. Wu, Y., et al., *Identification of distinct blood-based biomarkers in early stage of Parkinson's disease*. *Neurol Sci*, 2020. **41**(4): p. 893-901.
154. Tanner, C.M., et al., *Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China*. *Neurology*, 1989. **39**(5): p. 660-4.
155. Aquilonius, S.M. and P. Hartvig, *A Swedish county with unexpectedly high utilization of anti-parkinsonian drugs*. *Acta Neurol Scand*, 1986. **74**(5): p. 379-82.
156. Jiménez-Jiménez, F.J., D. Mateo, and S. Giménez-Roldán, *Exposure to well water and pesticides in Parkinson's disease: a case-control study in the Madrid area*. *Mov Disord*, 1992. **7**(2): p. 149-52.
157. Jiménez-Jiménez, F.J., et al., *Serum levels of zinc and copper in patients with Parkinson's disease*. *J Neurol Sci*, 1992. **112**(1-2): p. 30-3.
158. Zayed, J., et al., *Facteurs environnementaux dans l'étiologie de la maladie de Parkinson*.

159. Seidler, A., et al., *Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany*. Neurology, 1996. **46**(5): p. 1275-84.
160. Lai, B.C., et al., *Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2002. **8**(5): p. 297-309.
161. Gorell, J.M., et al., *Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease*. Neurology, 1997. **48**(3): p. 650-8.
162. Genoud, S., et al., *Meta-Analysis of Copper and Iron in Parkinson's Disease Brain and Biofluids*. Mov Disord, 2020. **35**(4): p. 662-671.
163. Council, N.R., *Copper in drinking water*. 2000.
164. Colombo, E., et al., *Dysregulated copper transport in multiple sclerosis may cause demyelination via astrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(27).
165. Pollanen, M.S., D.W. Dickson, and C. Bergeron, *Pathology and biology of the Lewy body*. J Neuropathol Exp Neurol, 1993. **52**(3): p. 183-91.
166. Liu, L.L. and K.J. Franz, *Phosphorylation-dependent metal binding by alpha-synuclein peptide fragments*. J Biol Inorg Chem, 2007. **12**(2): p. 234-47.
167. Lu, Y., et al., *Phosphorylation of α -Synuclein at Y125 and S129 alters its metal binding properties: implications for understanding the role of α -Synuclein in the pathogenesis of Parkinson's Disease and related disorders*. ACS Chem Neurosci, 2011. **2**(11): p. 667-75.
168. Ebrahimi-Fakhari, D., L. Wahlster, and P.J. McLean, *Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(2): p. 153-72.
169. Mazzulli, J.R., et al., *α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(7): p. 1931-6.
170. Batthyány, C., et al., *Tyrosine-Nitrated Proteins: Proteomic and Bioanalytical Aspects*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(7): p. 313-328.
171. Cukierman, D.S., et al., *XIINH, an improved next-generation affinity-optimized hydrazonic ligand, attenuates abnormal copper(I)/copper(II)- α -Syn interactions and affects protein aggregation in a cellular model of synucleinopathy*. Dalton Trans, 2020. **49**(45): p. 16252-16267.
172. Cukierman, D.S., et al., *A moderate metal-binding hydrazone meets the criteria for a bioinorganic approach towards Parkinson's disease: Therapeutic potential, blood-brain barrier crossing evaluation and preliminary toxicological studies*. J Inorg Biochem, 2017. **170**: p. 160-168.
173. Youdim, M.B., E. Grünblatt, and S. Mandel, *The copper chelator, D-penicillamine, does not attenuate MPTP induced dopamine depletion in mice*. J Neural Transm (Vienna), 2007. **114**(2): p. 205-9.
174. Rios, C., R. Alvarez-Vega, and P. Rojas, *Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice*. Pharmacol Toxicol, 1995. **76**(6): p. 348-52.
175. Bedarf, J.R., et al., *Functional implications of microbial and viral gut metagenome changes in early stage L-DOPA-naïve Parkinson's disease patients*. Genome Med, 2017. **9**(1): p. 39.
176. Heintz-Buschart, A., et al., *The nasal and gut microbiome in Parkinson's disease and idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder*. Mov Disord, 2018. **33**(1): p. 88-98.

177. Hill-Burns, E.M., et al., *Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome*. *Mov Disord*, 2017. **32**(5): p. 739-749.
178. Hopfner, F., et al., *Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort*. *Brain Res*, 2017. **1667**: p. 41-45.
179. Petrov, V.A., et al., *Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease*. *Bull Exp Biol Med*, 2017. **162**(6): p. 734-737.
180. Scheperjans, F., et al., *Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype*. *Mov Disord*, 2015. **30**(3): p. 350-8.



Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress

Marcela J. Ramirez-Moreno¹ · Ana P. Duarte-Jurado¹ · Yareth Gopar-Cuevas¹ · Alfredo Gonzalez-Alcocer¹ · Maria J. Loera-Arias¹ · Odila Saucedo-Cardenas^{1,2} · Roberto Montes de Oca-Luna¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹ · Aracely Garcia-Garcia¹

Received: 7 February 2019 / Accepted: 17 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The neurodegenerative process of Parkinson's disease (PD) involves autophagy impairment and oxidative stress. Therefore, we wanted to determine whether stimulation of autophagy protects dopaminergic cell death induced by oxidative stress in a PD model. Since environmental exposure to herbicides increases the risk to develop PD, the experimental model was established using the herbicide paraquat, which induces autophagy disruption, oxidative stress, and cell death. Rapamycin-stimulated autophagy inhibited calpain-dependent and independent apoptosis induced by paraquat. Autophagy stimulation decreased oxidative stress and peroxiredoxins (PRXs) hyperoxidation induced by paraquat. Cells exposed to paraquat displayed abnormally large autophagosomes enclosing mitochondria, which correlates with an increase of p62, an essential mitophagy regulator. Interestingly, when autophagy was stimulated before paraquat treatment, autophagosome size and number were similar to that observed in control cells. Motor and cognitive function impairment induced by paraquat showed an improvement when preceded by autophagy stimulation. Importantly, dopaminergic neuronal death and microglial activation mediated by paraquat were significantly reduced by rapamycin-induced autophagy. Our results indicate that autophagy stimulation has a protective effect on dopaminergic neurons and may have a promising potential to prevent or delay PD progression.

Keywords Autophagy · Oxidative stress · Paraquat · Parkinson's disease · Rapamycin

Introduction

Parkinson's disease (PD) is characterized by the dopaminergic neuronal loss in the *substantia nigra* at the central nervous system (CNS), a significant reduction in dopamine levels affecting the motor function, and the presence of Lewy bodies

[1, 2]. Most of the PD cases have an idiopathic origin, but it is believed that genetic susceptibility, environmental exposures, and aging concur in the progress of this disease [3, 4]. Epidemiological studies have demonstrated that environmental exposures to herbicides and pesticides increase the risk of developing PD [5–8]. Although the underlying etiology of PD is not entirely understood, several mechanisms have been associated with promoting neuronal death, including mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and protein accumulation [9–11]. The latter is related to the main pathological hallmark of PD, the presence of Lewy bodies, which are composed of abnormal deposits of protein aggregates, particularly α -synuclein and ubiquitin-bound proteins [12]. Abnormal protein aggregation results from the proteasome and autophagy alteration, and in the latter, includes disruption of lysosomal hydrolase trafficking [13–15]. Importantly, both degradation pathways are dysregulated or inhibited in PD [16].

Autophagy is a self-regulatory mechanism involving macromolecules and organelles degradation, which are sequestered into autophagosomes [17, 18]. Ulterior fusion with a

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01654-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero S/N, 64460 Monterrey, Nuevo León, Mexico

² Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Delegación Nuevo León, , Mexico



Peripheral tissular analysis of rapamycin's effect as a neuroprotective agent in vivo

Alfredo Gonzalez-Alcocer¹ · Yareth Gopar-Cuevas¹ · Adolfo Soto-Dominguez¹ · Maria de Jesus Loera- Arias¹ · Odila Saucedo-Cardenas¹ · Roberto Montes de Oca-Luna¹ · Humberto Rodriguez-Rocha¹ · Aracely Garcia-Garcia¹

Received: 3 March 2022 / Accepted: 15 July 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Rapamycin is the best-characterized autophagy inducer, which is related to its antiaging and neuroprotective effects. Although rapamycin is an FDA-approved drug for human use in organ transplantation and cancer therapy, its administration as an antiaging and neuroprotective agent is still controversial because of its immunosuppressive and reported side effects. Therefore, it is critical to determine whether the dose that exerts a neuroprotective effect, 35 times lower than that used as an immunosuppressant agent, harms peripheral organs. We validated the rapamycin neuroprotective dosage in a Parkinson's disease (PD) model induced with paraquat. C57BL/6 J mice were treated with intraperitoneal (IP) rapamycin (1 mg/kg) three times per week, followed by paraquat (10 mg/kg) twice per week for 6 weeks, along with rapamycin on alternate days. Rapamycin significantly decreased dopaminergic neuronal loss induced by paraquat. Since rapamycin's neuroprotective effect in a PD model was observed at 7 weeks of treatment; we evaluated its effect on the liver, kidney, pancreas, and spleen. In addition, we prolonged treatment with rapamycin for 14 weeks. Tissue sections were subjected to histochemical, immunodetection, and morphometric analysis. Chronic rapamycin administration does not affect bodyweight, survival, and liver or kidney morphology. Although the pancreas tissular architecture and cellular distribution in Langerhans islets are modified, they may be reversible. The spleen B lymphocyte and macrophage populations were decreased. Notably, the lymphocyte T population was not affected. Therefore, chronic administration of a rapamycin neuroprotective dose does not produce significant tissular alterations. Our findings support the therapeutic potential of rapamycin as a neuroprotective agent.

Keywords Rapamycin · Chronic exposure · Histology · Neuroprotective dose · mTOR

Introduction

Rapamycin, a lipophilic macrolide antibiotic, is the best-characterized autophagy inducer, participating in cell growth, proliferation, and protein synthesis (Jung et al. 2010; Noda and Ohsumi 1998). Rapamycin is associated with beneficial effects on cancer (Anisimov et al. 2010, 2011; Heuer et al. 2012; Wang et al. 2013), diabetes (Xie and Herbert 2012; Long et al. 2012), tuberous sclerosis (Rosado et al. 2013; Wataya-Kaneda et al. 2012), cardiovascular diseases

(Selman and Partridge 2012; Comas et al. 2012; Chong and Maiese 2012; Ru et al. 2012), and neurological disorders (Tsang et al. 2007; Chong et al. 2010).

Rapamycin inhibits the serine/threonine kinase mammalian target of rapamycin (mTOR), and forms two protein complexes. The sensitivity of the mTOR complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) to rapamycin varies by cell line, tissue type, and exposure time. mTORC1 is a sensor for nutrient levels (amino acids and glucose) and insulin (Johnson et al. 2013a; Li et al. 2016; Vander Haar et al. 2007), while mTORC2 function is mediated by insulin/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling (Guertin et al. 2006; García-Martínez and Alessi 2008; Ikenoue et al. 2008; Liu et al. 2014). Interestingly, rapamycin is an acute and chronic inhibitor of mTORC1 and mTORC2, respectively.

Importantly, rapamycin immunomodulatory properties are widely used to prevent graft rejection after organ transplantation by inhibiting T and B cell proliferation (Khanna

✉ Aracely Garcia-Garcia
aracely.garciagr@uanl.edu.mx

Humberto Rodriguez-Rocha
humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero S/N, 64460 Monterrey, Nuevo León, México



Effect of methanolic extract of *Mimosa malacophylla* A.Gray in *vero* and HEK-293 cell lines, and in the morphology of kidney and bladder of rats with induced urolithiasis

Gloria A. Guillén-Meléndez^{a,1}, Adolfo Soto-Domínguez^{a,1}, María de Jesús Loera-Arias^{a,1}, Uziel Castillo-Velázquez^b, Sheila A. Villa-Cedillo^a, Edgar I. Piña-Mendoza^a, Eduardo Estrada-Castillón^c, Abelardo Chávez-Montes^d, Alfredo González-Alcocer^a, Eduardo M. Becerra-Verdín^e, Alfonso Castañeda-Martínez^e, Raymundo A. Pérez-Hernández^{d,*}, Daniel Salas-Treviño^{a,**}

^a Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., C.P. 64460, Mexico

^b Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, UANL, Escobedo, N.L., C.P. 66050, Mexico

^c Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, Linares, Nuevo León, Mexico

^d Departamento de Química, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, San Nicolás de los Garza, N.L., C.P. 64455, Mexico

^e Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, C.P. 63155, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Kidney
Bladder
Urolithiasis
Mimosa malacophylla
Cytotoxicity
Histopathology

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Urolithiasis is the presence of stones in the kidney, ureters, bladder and/or urethra; it is the third most frequent disease of the urinary tract. *Mimosa malacophylla* A. Gray, is a species distributed in northern Mexico, where people traditionally use it for its diuretic effect, and to treat kidney diseases; however, no scientific reports have been found in relation to its antiurolithic properties.

Aim of the study: This study aimed to obtain a qualitative phytochemical profile of the methanolic extract (ME) of *M. malacophylla*, and to evaluate its potential cytotoxic effect *in vitro* and its antiurolithic activity *in vivo*.

Material and methods: Phytochemical screening was performed to demonstrate the presence of secondary metabolite groups in the methanolic extract of *M. malacophylla*. *In vitro* cytotoxicity assays (MTT and nucleotide labeling with DAPI) were performed to evaluate the effect of the extract on kidney cell lines. Urolithiasis was induced in the bladder of Wistar rats introducing zinc disks for the calculus formation and exposed to three concentrations of ME.

Results: Phytochemical screening showed phenols, steroids, terpenoids and carbohydrates. *In vitro* analysis demonstrated that concentrations below 300 µg/mL of ME did not produce a cytotoxic effect on renal Vero and HEK-293 cells. *In vivo* analysis of 15 days of exposition, revealed that the extract at concentrations of 50 mg/kg to 150 mg/kg were effective as an antiurolithic treatment, and did not produce morphological alterations in kidney or bladder in murine model of induced urolithiasis.

Conclusions: The antiurolithic activity may be attributed to the presence of flavonoids, steroids and terpenes detected in the phytochemical screening which have been reported to possess this activity. These results could be useful to evaluate new alternatives and their potential therapeutic effect to treat renal or urinary affections.

*Corresponding author. raymundo.perezhrz@uanl.edu.mx

** Corresponding author.

E-mail addresses: gloria.guillenmln@uanl.edu.mx (G.A. Guillén-Meléndez), adolfo.sotodmn@uanl.edu.mx (A. Soto-Domínguez), mjjesus.loeraars@uanl.edu.mx (M.d.J. Loera-Arias), uziel.castillovl@uanl.edu.mx (U. Castillo-Velázquez), svilla.me0121@uanl.edu.mx (S.A. Villa-Cedillo), edgar.piname@uanl.edu.mx (E.I. Piña-Mendoza), andres.estrads@uanl.edu.mx (E. Estrada-Castillón), abelardo.chavezmn@uanl.edu.mx (A. Chávez-Montes), alfredo.gonzalezlc@uanl.edu.mx (A. González-Alcocer), eduardo.becerra@uanl.edu.mx (E.M. Becerra-Verdín), alfonsoc@uanl.edu.mx (A. Castañeda-Martínez), daniel.salastr@uanl.edu.mx (D. Salas-Treviño).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115552>

Received 5 May 2022; Received in revised form 12 July 2022; Accepted 13 July 2022
0378-8741/© 20XX



Review

Unscrambling the Role of Redox-Active Biometals in Dopaminergic Neuronal Death and Promising Metal Chelation-Based Therapy for Parkinson's Disease

Alfredo Gonzalez-Alcocer ¹, Ana Patricia Duarte-Jurado ¹, Adolfo Soto-Dominguez ¹, Maria de Jesus Loera-Arias ¹, Eliud Enrique Villarreal-Silva ², Odila Saucedo-Cardenas ¹, Roberto Montes de Oca-Luna ¹, Aracely Garcia-Garcia ^{1,*} and Humberto Rodriguez-Rocha ^{1,*}

¹ Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Francisco I. Madero S/N, Mitras Centro, Monterrey 64460, Mexico

² Servicio de Neurocirugía y Terapia Endovascular Neurológica, Hospital Universitario, Dr. Jose Eleuterio Gonzalez, Monterrey 64460, Mexico

* Correspondence: aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A.G.-G.); humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx (H.R.-R.); Tel.: +52-81-83-29-4000 (ext. 2713) (A.G.-G. & H.R.-R.); Fax: +52-(81)-8123-4313 (A.G.-G. & H.R.-R.)

Abstract: Biometals are all metal ions that are essential for all living organisms. About 40% of all enzymes with known structures require biometals to function correctly. The main target of damage by biometals is the central nervous system (CNS). Biometal dysregulation (metal deficiency or overload) is related to pathological processes. Chronic occupational and environmental exposure to biometals, including iron and copper, is related to an increased risk of developing Parkinson's disease (PD). Indeed, biometals have been shown to induce a dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra. Although the etiology of PD is still unknown, oxidative stress dysregulation, mitochondrial dysfunction, and inhibition of both the ubiquitin–proteasome system (UPS) and autophagy are related to dopaminergic neuronal death. Herein, we addressed the involvement of redox-active biometals, iron, and copper, as oxidative stress and neuronal death inducers, as well as the current metal chelation-based therapy in PD.

Keywords: redox-active; biometals; iron; copper; chelation; Parkinson's disease



Citation: Gonzalez-Alcocer, A.; Duarte-Jurado, A.P.; Soto-Dominguez, A.; Loera-Arias, M.d.J.; Villarreal-Silva, E.E.; Saucedo-Cardenas, O.; de Oca-Luna, R.M.; Garcia-Garcia, A.; Rodriguez-Rocha, H. Unscrambling the Role of Redox-Active Biometals in Dopaminergic Neuronal Death and Promising Metal Chelation-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 1256. <https://doi.org/10.3390/ijms24021256>

Academic Editor: Takuya Noguchi

Received: 29 November 2022

Revised: 28 December 2022

Accepted: 30 December 2022

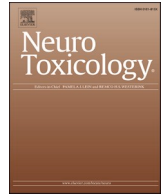
Published: 9 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Metals play essential biological functions in all living organisms. The human body requires minimal amounts of metallic elements to maintain a healthy development of physiological functions. However, metal levels outside the normal range may lead to the development of pathologies. An organism's deficiency or excess of essential metals leads to severe biological alterations. However, not all metals are essential or beneficial to organisms; some nonessential and potentially toxic metals might be capable of causing undesirable effects on the genome, glycolysis, Krebs cycle, oxidative phosphorylation, and carbohydrate, lipid, protein, and amino acid metabolism [1]. Only biometals, including iron, copper, zinc, manganese, molybdenum, sodium, potassium, calcium, chromium, and cobalt, are indispensable for life. About 40% of all enzymes with known structures require biometals to function correctly [2]. These biometals are not limited to enzymatic activities but also play structural, electrostatic, energetic, and transport functions. Biometals directly affect by targeting biomolecules (DNA, lipids, proteins) (Figure 1), organelles, cells, tissues, organs, and the biological micro- and macro-environment, as they become part of it [3,4]. Living cells possess a redox metabolism where oxidation-reduction (redox) reactions occur in fundamental processes of redox regulation, collectively termed "redox signaling" and "redox control" [5]. Several studies performed on biological systems have shown that redox-active metals, including iron, copper, cobalt, chromium, and manganese,



Combined chronic copper exposure and aging lead to neurotoxicity *in vivo*

Alfredo Gonzalez-Alcocer^a, Yareth Gopar-Cuevas^a, Adolfo Soto-Dominguez^a,
 Uziel Castillo-Velazquez^b, Maria de Jesus Loera-Arias^a, Odila Saucedo-Cardenas^a,
 Roberto Montes de Oca-Luna^a, Aracely Garcia-Garcia^{a,*}, Humberto Rodriguez-Rocha^{a,*}

^a Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León 64460, Mexico

^b Departamento de Inmunología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Escobedo, Nuevo León 66050, Mexico

ARTICLE INFO

Edited by Kennie Raviie Shepherd

Keywords:

Copper
 Chronic exposure
 Parkinson's disease
 Neurodegeneration
 Metal ions

ABSTRACT

The environment, containing pollutants, toxins, and transition metals (copper, iron, manganese, and zinc), plays a critical role in neurodegenerative disease development. Copper occupational exposure increases Parkinson's disease (PD) risk. Previously, we determined the mechanisms by which copper induces dopaminergic cell death *in vitro*. The copper transporter protein 1 (Ctr1) overexpression led to intracellular glutathione depletion potentiating caspase-3 mediated cell death; oxidative stress was primarily cytosolic, and Nrf2 was upregulated mediating an antioxidant response; and protein ubiquitination, AMPK-Ulk1 signaling, p62, and Atg5-dependent autophagy were increased as a protective mechanism. However, the effect of chronic copper exposure on the neurodegenerative process has not been explored *in vivo*. We aimed to elucidate whether prolonged copper treatment reproduces PD features and mechanisms during aging. Throughout 40 weeks, C57BL/6J male mice were treated with copper at 0, 100, 250, and 500 ppm in the drinking water. Chronic copper exposure altered motor function and induced dopaminergic neuronal loss, astrocytosis, and microgliosis in a dose-dependent manner. α -Synuclein accumulation and aggregation were increased in response to copper, and the proteasome and autophagy alterations, previously observed *in vitro*, were confirmed *in vivo*, where protein ubiquitination, AMPK phosphorylation, and the autophagy marker LC3-II were also increased by copper exposure. Finally, nitrosative stress was induced by copper in a concentration-dependent fashion, as evidenced by increased protein nitration. To our knowledge, this is the first study combining chronic copper exposure and aging, which may represent an *in vivo* model of non-genetic PD and help to assess potential prophylactic and therapeutic approaches.

Data Availability: The data underlying this article are available in the article.

1. Introduction

Copper, one of the most abundant transition metal ions in the human body and essential for life, participates in erythropoiesis, immune function, energy production, glucose metabolism, and neuropeptide synthesis (Uriu-Adams and Keen, 2005; Singh et al., 2011). Copper's involvement in physiological processes is mainly due to its function as a cofactor or structural component in diverse proteins. Its oxidation state can transition from Cu^+ to Cu^{2+} (Bisaglia and Bubacco, 2020), acting as an enzyme cofactor with oxidoreductase activity (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). Alterations in copper homeostasis have detrimental consequences; either increased or decreased copper bioavailability is related to neurodegeneration. Copper overload may occur by

environmental and occupational exposure and from copper-contaminated food such as shellfish, meat, cereal, and drinking water (Uriu-Adams and Keen, 2005). Epidemiological evidence suggests an involvement of heavy metals in PD etiology (Santner and Uversky, 2010). Alteration of intracellular metal ions concentration has been proposed to contribute to PD progression (Ayton et al., 2013).

Sporadic (non-genetic) Parkinson's disease (PD) represents 90–95% of all cases (Lesage and Brice, 2009). Increased copper levels have been reported in the cerebrospinal fluid and blood of PD patients (Hozumi et al., 2011; Pall et al., 1987), and chronic occupational exposure to copper increases the risk of developing PD (Santner and Uversky, 2010; Gorell et al., 1997, 1999; Rybicki et al., 1993). However, a recent meta-analysis reported decreased copper levels in the substantia nigra of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: aracely.garciagr@uanl.edu.mx (A. Garcia-Garcia), humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx (H. Rodriguez-Rocha).

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2023.02.002>

Received 27 October 2022; Received in revised form 28 December 2022; Accepted 8 February 2023

Available online 11 February 2023

0161-813X/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

ALFREDO GONZÁLEZ ALCOCER

CANDIDATO PARA EL GRADO DE

Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología

TESIS

EVALUACIÓN DEL EFECTO NEUROTÓXICO MEDIADO POR LA EXPOSICIÓN A COBRE EN UN MODELO *IN VIVO* Y SU INFLUENCIA SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL

CAMPO DE ESTUDIO

Morfología

DATOS PERSONALES

Nacido en Mérida, Yucatán el 27 de Septiembre de 1991, hijo de José Alfredo González Alcocer y María José Alcocer Tamayo.

EDUCACION

Doctorado en Ciencias, Morfología, 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) Campus Principal - San Nicolás de los Garza, NLE

- Publicación de artículo de investigación titulado: "Autophagy Stimulation Decreases Dopaminergic Neuronal Death Mediated by Oxidative Stress" en la revista *Molecular Neurobiology*.
- Publicación de artículo de investigación titulado: "Peripheral tissular analysis of rapamycin's effect as a neuroprotective agent *in vivo*" en la revista *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*.
- Publicación de artículo de investigación titulado: "Effect of methanolic extract of *Mimosa malacophylla* A.Gray *in vivo* and HEK-293 cell lines, and in the morphology of kidney and bladder of rats with induced urolithiasis" en la revista *Journal of Ethnopharmacology*.
- Publicación de artículo de revisión titulado: "Unscrambling the Role of Redox-Active Biometals in Dopaminergic Neuronal Death and Promising Metal Chelation-Based Therapy for Parkinson's Disease" en la revista *International Journal of Molecular Sciences*.
- Publicación de artículo de investigación titulado: "Combined chronic copper exposure and aging lead to neurotoxicity *in vivo*" en la revista *NeuroToxicology*.

Maestría en Ciencias, Morfología, 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) Campus Principal - San Nicolás de los Garza, NLE

Licenciatura en Medicina, 2016

Universidad Anáhuac Mayab - Mérida, YUC

- 1er lugar en la categoría Presentación Oral durante la "Presentación de trabajos finales del Programa Nacional de Servicio Social en Investigación en Salud, Generación Agosto 2015."

EXPERIENCIA PROFESIONAL

Médico general, 01/2022 - Actual

PRONAMED - Monterrey, NLE

Medico general, 09/2016 - 09/2021

BioMed Sport - San Pedro Garza García, NLE

Servicio Social en Medicina, 07/2017 - 07/2018

Universidad Anáhuac Mayab - Monterrey, NLE

Médico Interno de Pregrado, 07/2016 - 07/2017

Hospital Agustin O'horan - Mérida



CONTACTO

Correo electrónico:

alfredo.gonzalezlc@uanl.edu.mx