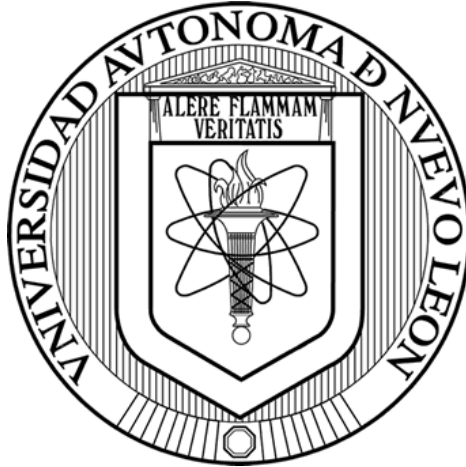


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL COBRE SOBRE
ÓRGANOS IMPLICADOS EN SU METABOLISMO**

POR

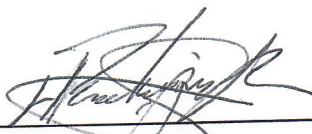
DANIEL GARZA GUZMÁN

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

JUNIO, 2024

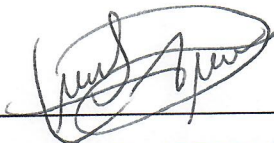
EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL COBRE SOBRE ÓRGANOS IMPLICADOS EN SU METABOLISMO

APROBACIÓN DE TESIS



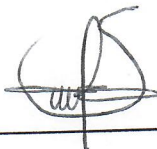
DR. en C. HUMBERTO RODRÍGUEZ ROCHA

DIRECTOR



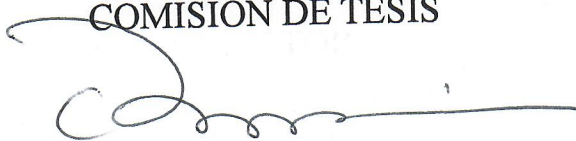
DRA. en C. ARACELY GARCÍA GARCÍA

CO-DIRECTORA



DRA. en C. SHEILA ADELA VILLA CEDILLO

COMISIÓN DE TESIS



DR. MED. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNES

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Guadalupe y Norma, por inculcarme desde muy temprana edad la importancia de la educación y el valor del esfuerzo. Por darme todo su amor, apoyo y las herramientas necesarias para seguir cumpliendo cada meta que me propongo.

A mis hermanos, Eric y Dania, por ser grandes compañeros de vida y ejemplos de trabajo duro.

A mis antiguos compañeros del Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, Alfredo, Ana y Yareth, por recibirme con los brazos abiertos, por todos sus consejos y enseñanzas, y por ayudarme cada vez que lo necesité.

A mis actuales compañeros y amigos del Laboratorio de Terapéutica Antioxidante, Diego y Paulina, por compartir sus días conmigo, su compañía ameniza el tiempo en el laboratorio. Juntos hemos formado un gran equipo.

A mi amiga Daniela, por ser la mejor compañera de laboratorio, por estar a mi lado cada día, en los buenos y malos momentos, durante cada experimento y en los días de limpieza de bioterio, por su ayuda y cariño incondicional.

A mis amigos y compañeros de licenciatura y maestría Mike y Paola, por tantos años de amistad, por cada momento que hemos compartido dentro y fuera de la facultad. Los quiero y admiro demasiado.

A todos mis amigos que decidieron tomar un camino diferente, a pesar de la distancia, siempre los llevo en mi corazón y mente.

A la Dra. Sheila, por todos sus consejos y atenciones. Por contagiar siempre su alegría.

Al Dr. Humberto y a la Dra. Aracely, por permitirme unirme a su equipo de trabajo, por toda su paciencia, y por todas las palabras de motivación y enseñanza que me inspiran a alcanzar un nivel cada vez más alto.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el otorgamiento de la beca de maestría.

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 El cobre, un oligoelemento esencial.....	3
2.1.1 Distribución y metabolismo del cobre.....	3
2.2 Desregulación del cobre en el organismo.....	6
2.2.1 Enfermedad de Menkes.....	6
2.2.2 Enfermedad de Wilson.....	7
2.3 Papel del cobre en enfermedades neurodegenerativas.....	8
2.4 Principales órganos involucrados en el metabolismo del cobre.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. OBJETIVOS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Modelo animal.....	15
5.2 Evaluación del peso corporal y la sobrevivencia.....	16
5.3 Evaluación de la función motora y cognitiva.....	16
5.3.1 Prueba de la marcha.....	16
5.3.2 Prueba de campo abierto.....	17
5.3.3 Prueba de transición luz-oscuridad.....	17
5.3.4 Prueba de construcción del nido.....	18
5.3.5 Prueba de la madriguera.....	18
5.4 Sacrificio del modelo animal.....	19
5.5 Técnica histológica.....	19
5.5.1 Tinción Hematoxilina & Eosina.....	20
5.5.2 Tinción Tricrómico de Masson.....	21
5.5.3 Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS).....	22
5.5.4 Análisis morfométrico de las tinciones histológicas.....	23
5.6 Espectroscopía de absorción atómica con llama.....	25

5.7 Ensayo TUNEL.....	26
5.7.1 Análisis morfométrico del ensayo TUNEL.....	27
5.8 Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Evaluación del peso corporal y la supervivencia del modelo animal.....	28
6.2 Evaluación de la función motora y cognitiva.....	29
6.2.1 La exposición prolongada a cobre afecta la coordinación motora de los ratones.....	29
6.2.2 La exposición prolongada a cobre afecta la locomoción general y la actividad exploratoria de los ratones.....	30
6.2.3 La exposición prolongada a cobre no induce ansiedad en los ratones.....	31
6.2.4 La exposición prolongada a cobre no altera la función cognitiva de los ratones.....	31
6.2.5 La exposición prolongada a cobre no afecta el bienestar general de los ratones.....	32
6.3 Evaluación morfológica de los principales órganos involucrados en el metabolismo del cobre.....	33
6.3.1 La exposición crónica al cobre induce alteraciones morfológicas en el hígado.....	33
6.3.2 La exposición crónica al cobre induce alteraciones morfológicas en el riñón.....	35
6.3.3 La exposición crónica al cobre no induce alteraciones morfológicas en el intestino delgado.....	39
6.4 Evaluación de la concentración de cobre en los principales órganos involucrados en su metabolismo.....	41
6.5 Evaluación de la muerte celular inducida por cobre en los principales órganos involucrados en su metabolismo.....	42
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIÓN.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Enzimas dependientes de cobre.....	7

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Transporte y metabolismo celular del cobre.....	4
Figura 2. Homeostasis general del cobre en el cuerpo humano.....	5
Figura 3. Reacción de Fenton.....	8
Figura 4. Formación del complejo α -sinucleína-cobre.....	9
Figura 5. La exposición crónica al cobre no afecta el peso corporal.....	28
Figura 6. La exposición crónica al cobre no afecta la supervivencia.....	28
Figura 7. La exposición crónica al cobre afecta la coordinación motora.....	29
Figura 8. La exposición crónica al cobre afecta la locomoción general y la actividad exploratoria.....	30
Figura 9. La exposición crónica al cobre no induce ansiedad.....	31
Figura 10. La exposición crónica al cobre no altera la función cognitiva.....	32
Figura 11. La exposición crónica al cobre no afecta el bienestar general.....	32
Figura 12. La morfología del hígado se altera en respuesta a la administración crónica de cobre.....	34
Figura 13. El tejido conectivo no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre en el hígado.....	34
Figura 14. Los depósitos de glucógeno no se alteran en respuesta a la administración crónica de cobre.....	35
Figura 15. La exposición crónica al cobre no induce alteraciones morfológicas en la corteza renal.....	36
Figura 16. La exposición crónica al cobre induce alteraciones morfológicas en la médula renal.....	37
Figura 17. El tejido conectivo no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre en el riñón.....	38
Figura 18. La membrana basal glomerular no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre.....	38
Figura 19. La morfología del intestino delgado no se altera en respuesta a la exposición crónica al cobre.....	39
Figura 20. El tejido conectivo no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre en la lámina propia de la mucosa del duodeno.....	40

Figura 21. Las células caliciformes y la chapa estriada no se alteran en respuesta a la administración crónica de cobre.....	41
Figura 22. El cobre administrado de manera crónica se acumula en el hígado y en el mesencéfalo.....	42
Figura 23. La exposición crónica al cobre induce fragmentación de ADN en el hígado.	43
Figura 24. La exposición crónica al cobre induce fragmentación de ADN en los túbulos renales medulares.....	44

RESUMEN

Propósito y Método de Estudio: El cobre es esencial para los organismos vivos, ya que es un cofactor en una variedad de reacciones enzimáticas en muchos procesos fisiológicos. Se ha reportado que la deficiencia o el exceso de cobre conllevan a efectos adversos para la salud, lo que pudiera reflejarse a nivel histológico. Anteriormente nuestro grupo de investigación demostró que la exposición crónica al cobre conduce a la neurotoxicidad, por lo que procedimos con el análisis de la función motora y cognitiva. Además, analizamos histológicamente el hígado, riñón e intestino delgado, para determinar el efecto de la exposición crónica a cobre en los principales órganos involucrados en su metabolismo.

Conclusiones y Contribuciones: La exposición crónica a cobre afectó el comportamiento de manera dependiente de la dosis. En la prueba de la marcha se observó una disminución en el largo de la pisada y en la prueba de campo abierto disminuyó la distancia recorrida y el tiempo de exploración vertical, lo cual evidencia una disfunción motora y cognitiva. En el hígado observamos una disminución en el número de células binucleadas en la zona centrolobulillar, de manera dependiente de la dosis de cobre. Además, confirmamos un incremento en la acumulación de cobre en el hígado. En el riñón encontramos cambios morfológicos a nivel de la médula, en la cual el parénquima fue reemplazado por tejido adiposo, de manera dependiente de la dosis de cobre. Por lo tanto, se realizó el ensayo de TUNEL, mediante el cual se detectó un incremento en la muerte celular en el parénquima hepático y en los túbulos renales medulares, lo cual fue significativo en respuesta a la dosis de 500 ppm de cobre. Por último, mediante la evaluación morfológica y morfométrica del intestino delgado, no detectamos alteraciones. Por lo tanto, la exposición crónica al cobre altera la función motora y cognitiva, y la morfología del hígado y riñón, además de que conduce a neurodegeneración. Por lo que representa un modelo de enfermedad de Wilson no hereditaria, que facilitara la evaluación de terapias quelantes.

ABSTRACT

Copper is essential for living organisms as it is a cofactor in various enzymatic reactions and physiological processes. It has been reported that both copper deficiency and excess can lead to adverse health effects, which may be reflected at the histological level. Previously, our research group demonstrated that chronic copper exposure leads to neurotoxicity, prompting us to analyze motor and cognitive functions. Additionally, we histologically analyzed the liver, kidney, and small intestine to determine the effect of chronic copper exposure on the primary organs involved in its metabolism. Chronic copper exposure affected behavior in a dose-dependent manner. In the gait test, a decrease in stride length was observed, and in the open field test, a decrease in traveled distance and vertical exploration time was noted, indicating motor and cognitive dysfunction. In the liver, we observed a dose-dependent decrease in the number of binucleated cells in the centrilobular zone and confirmed an increase in copper accumulation in the liver. In the kidney, morphological changes were found at the medullary level, where the parenchyma was replaced by adipose tissue, also in a dose-dependent manner. Therefore, we conducted the TUNEL assay, which detected an increase in cell death in the hepatic parenchyma and medullary renal tubules, which was significant in response to 500 ppm copper dose. Finally, no alterations were detected through morphological and morphometric evaluation of the small intestine. Therefore, chronic copper exposure alters motor and cognitive function and the morphology of the liver and kidney and leads to neurodegeneration. Thus, it represents a model of non-hereditary Wilson's disease, facilitating the evaluation of chelation therapies.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El cobre es esencial para los organismos vivos, ya que es un cofactor en una variedad de reacciones enzimáticas en muchos procesos fisiológicos [1]. Se ha reportado que la deficiencia o el exceso de cobre conllevan a efectos adversos para la salud [2], lo que pudiera reflejarse a nivel histológico. Existen diversas fuentes de exposición a altas concentraciones de cobre que representan un riesgo para la salud humana, siendo la principal el medio ambiente. Entre los factores ambientales más significativos se encuentra la contaminación del aire por metales pesados, la cual está estrechamente relacionada con el crecimiento industrial y el aumento del tráfico vehicular. Este fenómeno se ha convertido en un gran problema ambiental en las grandes ciudades [3].

Se han establecido diferentes modelos animales de la enfermedad de Wilson, los cuales han permitido una mejor comprensión del efecto del exceso de cobre en el organismo [4]. Gracias a estos, se ha demostrado la relación del cobre con diversas patologías, incluyendo diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas [5-7]. Además, se ha evidenciado su asociación con manifestaciones clínicas como la insuficiencia hepática y el daño renal [8,9]. El principal mecanismo de daño por exceso de cobre es el estrés oxidativo. Este metal induce la formación de radicales libres, principalmente a través de la reacción de Fenton. Estos radicales libres pueden causar peroxidación lipídica en las membranas celulares, lo que compromete la integridad de la membrana y la función celular. Además, el estrés oxidativo puede provocar daño al ADN, lo que conduce a la muerte celular. Este proceso también puede desencadenar respuestas inflamatorias que exacerbaban el daño tisular [10]. Sin embargo, aún se desconocen muchos mecanismos de su fisiopatología, lo que hace necesario realizar más investigaciones.

Anteriormente nuestro grupo de investigación demostró que la exposición crónica al cobre conduce a la neurotoxicidad [11], por lo que procedimos con el análisis histológico del hígado, riñón e intestino delgado, para determinar el efecto de la exposición crónica a cobre en los principales órganos involucrados en su metabolismo.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 El cobre, un oligoelemento esencial

Los oligoelementos son vitales para el organismo, estos se requieren en cantidades muy pequeñas que van desde 50 µg hasta 18 mg por día, para mantener la salud y el funcionamiento adecuado de los procesos biológicos [12]. El cobre (Cu) es un oligoelemento esencial para el funcionamiento de diversas enzimas. Los iones de cobre pueden existir en diferentes estados de oxidación, ya sea como Cu^{2+} oxidado o Cu^{+} reducido, lo que permite al metal actuar como un cofactor catalítico crucial en la química redox de las enzimas. Este metal juega un papel vital en la fisiología celular, participando en procesos como la respiración mitocondrial, la absorción de hierro, la eliminación de radicales libres, la reticulación de elastina, entre otras funciones [13].

La principal forma de obtener el cobre, para que pueda cumplir con sus múltiples funciones en el organismo, es por medio de la dieta. Aquellos alimentos ricos en cobre incluyen el hígado de res, mariscos como ostras, cereales de salvado de trigo y productos integrales, nueces como anacardos, y semillas como sésamo y girasol. La cantidad recomendada de ingesta diaria para el adulto es de 900 µg [14].

2.1.1 Distribución y metabolismo del cobre

Una vez ingerido, el cobre se absorbe en el intestino delgado, mayormente en el duodeno. La principal ruta de entrada del cobre a la célula es mediante los transportadores de cobre CTR (también conocido como SLC31A1). Entre éstos se encuentran el CTR1 (transportador de alta afinidad) y el CTR2 (transportador de baja afinidad) [15]. El cobre existe principalmente en su forma oxidada en el medio ambiente. Sin embargo, debe ser reducido para que los transportadores de alta afinidad lo transporten eficientemente a través de la membrana plasmática. Las proteínas reductasas de la familia Steap se encuentran en

la membrana plasmática, y son las que se encargan de reducir al cobre, y otros metales como el hierro, para que puedan ser captados por la célula [16]. Dentro del citoplasma, diversas chaperonas lo llevan a sitios específicos de la célula. La proteína transportadora de cobre ATOX1 lo dirige al aparato de Golgi. En este organelo el cobre se une al transportador de cobre ATP7A. Cuando hay un incremento en la concentración de cobre intracelular, las proteínas ATP7A median su salida de la célula hacia el torrente sanguíneo [17]. En la Figura 1 se resumen las diferentes vías por las que se transporta el cobre dentro del citoplasma celular y las moléculas con las que interacciona.

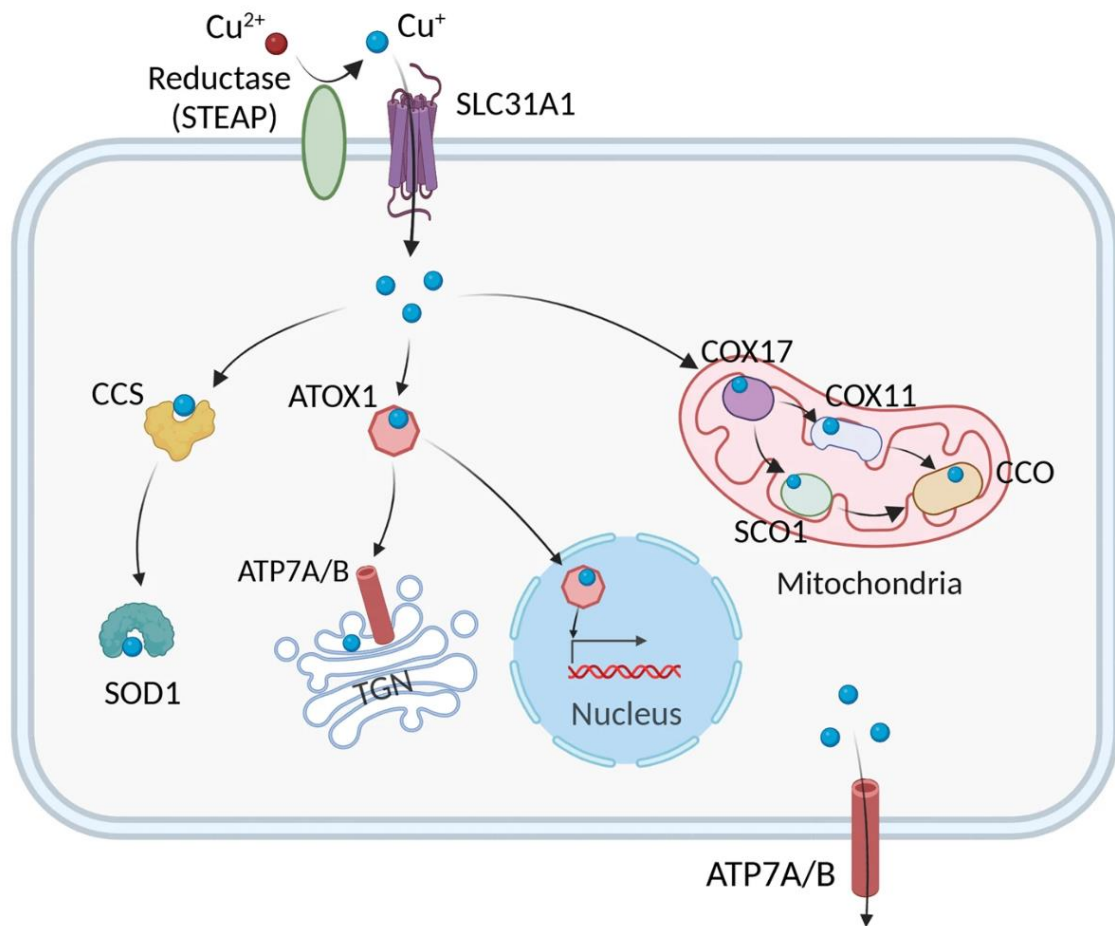


Figura 1. Transporte y metabolismo celular del cobre. El Cu^{2+} extracelular es reducido por la reductasa STEAP a Cu^+ , que es transportado a la célula por el transportador de Cu^+ CTR1 (SLC31A1), donde se entrega a las chaperonas citosólicas de Cu^+ como CCS y SOD1 y luego se distribuye a compartimentos subcelulares específicos como las mitocondrias, TGN y el núcleo. En las mitocondrias, el Cu^+ está involucrado en la cadena respiratoria y en las vías redox a través de la unión a CCO. En el espacio intermembrana mitocondrial, COX17 se une y entrega Cu^+ a SCO1 o COX11, que transfiere Cu^+ a la subunidad citocromo oxidasa. En el núcleo, el Cu^+ puede unirse a factores de transcripción e impulsar la

expresión génica. Finalmente, en el TGN las ATPasas transportadoras de Cu^+ ATP7A y ATP7B transfieren Cu^+ desde el citosol al lumen del TGN, donde activa enzimas dependientes de Cu^+ en la vía secretora. Cuando los niveles citosólicos de Cu^+ son altos, ATP7A y ATP7B salen del TGN y facilitan la exportación de Cu^+ . ATOX1, chaperona de cobre antioxidante 1; ATP7A y ATP7B, ATPasas transportadoras de cobre 7A y 7B, respectivamente; CCO, citocromo c oxidasa, CCS: chaperona de cobre para la superóxido dismutasa; COX17 citocromo c oxidasa chaperona de cobre 17, COX11, citocromo c oxidasa chaperona de cobre 11, SCO1, síntesis de citocromo c oxidasa 1; SOD1, superóxido dismutasa 1; STEAP, antígeno epitelial de la próstata con seis dominios transmembranales; SLC31A1, familia de transportadores de solutos 31 miembro 1; TGN, red trans-Golgi [18].

Los iones de cobre llegan al hígado a través de la vena porta y son captados por los hepatocitos mediante el transportador CTR1. Una vez en el citoplasma, los iones de cobre tienen dos destinos diferentes: pueden ser secretados a través de la bilis en el intestino delgado, que es su principal vía de eliminación, o entrar en la circulación sanguínea a través de la vía ATOX1/ATP7B/Ceruloplasmina. La ceruloplasmina actúa como el principal transportador de cobre en el torrente sanguíneo, dirigiéndolo hacia otros órganos como el cerebro, corazón, riñón, huesos y músculos, donde cumple con diversas funciones (Figura 2) [17-19].

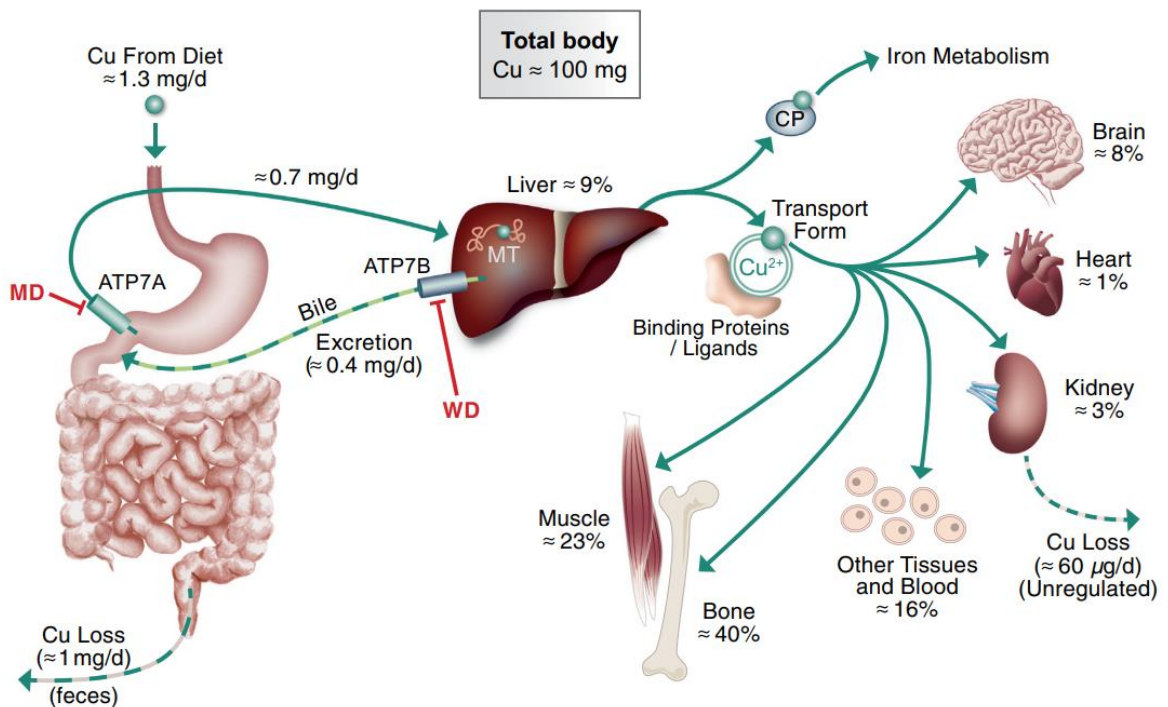


Figura 2 Homeostasis general del cobre en el cuerpo humano. Se muestran los principales mecanismos regulatorios que controlan los niveles de cobre en el cuerpo. Las ATPasas transportadoras de cobre juegan papeles críticos en la absorción intestinal (ATP7A) y la excreción biliar (ATP7B), y su disfunción es la base de la enfermedad de Menkes (MD) y la enfermedad de Wilson (WD), respectivamente (indicadas en rojo). Después de la absorción, la mayor parte del cobre dietético entra en el hígado, donde puede almacenarse en metalotioneína, incorporarse en ceruloplasmina (CP) o distribuirse por la sangre a varios órganos. La CP circulante participa en el metabolismo del hierro, mientras que el cobre oxidado (Cu^{2+}) se puede unir a varios ligandos séricos para ser transportado. Se indica el porcentaje aproximado de cobre corporal presente en diversos órganos/tejidos [20].

El cobre también puede ser secuestrado por las metalotioneínas, una familia de proteínas ricas en cisteína, un aminoácido que contiene azufre en forma de grupos tiol, por lo que tienen una alta afinidad de unión a los iones metálicos bivalentes y pueden almacenarlos para su posterior uso [21]. Cabe destacar, que el metabolismo del cobre debe estar estrictamente controlado para lograr la homeostasis y evitar un desequilibrio en su concentración.

2.2 Desregulación del cobre en el organismo

El balance general del cobre en el cuerpo se mantiene regulando su tasa de absorción en el intestino delgado y su excreción desde el hígado a través de la bilis. Sin embargo, diferentes factores pueden alterar este balance. La enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson son enfermedades bien conocidas que destacan los efectos por una alteración en el metabolismo del cobre [22,23].

2.2.1 Enfermedad de Menkes

La enfermedad de Menkes es una enfermedad autosómica recesiva ligada al cromosoma X, causada por una mutación en el gen que codifica para el transportador ATP7A dejándolo no funcional o ausente. Esto conlleva a una acumulación de cobre en los enterocitos, ya que esta proteína es la encargada de liberarlo a la circulación cuando se eleva la concentración de cobre en el citoplasma, y por lo tanto produce una deficiencia sistémica del metal. Las consecuencias de la enfermedad se deben entonces a una disminución en

la actividad de las enzimas dependientes de cobre [24]. Por ejemplo, los pacientes suelen presentar neurodegeneración, la cual se debe al deterioro de la función de la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que es esencial para la síntesis de neurotransmisores [25]. También pueden presentarse anomalías en el tejido conectivo, causando osteopenia, laxitud de la piel, aneurismas arteriales y fracturas espontáneas. Dichas alteraciones se deben a la disminución de la actividad de la lisil oxidasa, enzima que se encarga de oxidar a la lisina y la hidroxilisina presentes en la elastina y el colágeno, lo que disminuye la formación de enlaces covalentes cruzados que otorgan resistencia a la tracción y elasticidad a los tejidos conectivos de los sistemas esquelético, muscular y cardiovascular [26]. Las anteriores son ejemplos de algunas enzimas dependientes de cobre, entre muchas otras (Tabla 1).

Enzima	Función
Citocromo c oxidasa	Fosforilación oxidativa
Cobre-Zinc superóxido dismutasa	Detoxificación, señalización
Ceruloplasmina	Ferroxidasa, transporte
Lisil oxidasa	Reticulación de colágeno y elastina
Tirosinasa	Síntesis de melanina
Dopamina-β-monoxigenasa	Síntesis de norepinefrina
Peptidilglicina α-amidante	Activación de hormonas peptídicas
Amina oxidasa de cobre	Desaminación de aminas
Hefestín	Ferroxidasa
Factor de coagulación V y VIII	Coagulación de la sangre
Dopamina-β-hidroxilasa	Síntesis de neurotransmisores

Tabla I. Enzimas dependientes de cobre. Se incluyen algunas de las enzimas dependientes de cobre y sus funciones [27].

2.2.2 Enfermedad de Wilson

La enfermedad de Wilson es una enfermedad autosómica recesiva, causada por una mutación en el gen que codifica para el transportador ATP7B dejándolo no funcional o ausente. Esto conlleva a una acumulación de cobre en los pacientes, principalmente en hígado y cerebro, presentando síntomas hepáticos y/o neuropsiquiátricos [28]. El principal mecanismo de daño en la enfermedad de Wilson es la toxicidad por la acumulación de

cobre, esta acumulación genera especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente por la reacción de Fenton (Figura 3) [29]. En consecuencia, se produce estrés oxidativo, generando, daño en el ADN, peroxidación lipídica y disfunción mitocondrial, los cuales son hallazgos típicos en el hígado de estos pacientes. [30,31].

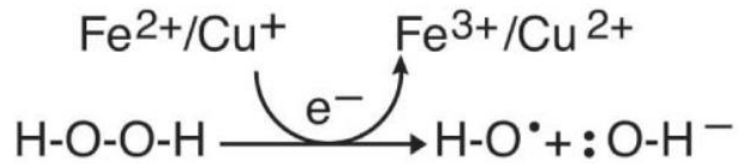


Figura 3. Reacción de Fenton. La reacción entre el peróxido de hidrógeno y un metal de transición, como el cobre, genera radicales hidroxilo altamente reactivos.

Estas enfermedades y sus efectos no son los únicos asociados con la pérdida de la homeostasis del cobre, el exceso de este metal en el organismo se ha relacionado con el cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas [32-34].

2.3 Papel del cobre en enfermedades neurodegenerativas

Tanto la enfermedad de Menkes como la enfermedad de Wilson presentan manifestaciones en el sistema nervioso central (SNC), aunque los cambios neurodegenerativos difieren de aquellos asociados con otras condiciones. Por ejemplo, la enfermedad de Menkes se manifiesta principalmente en el cerebelo, mientras que la enfermedad de Wilson afecta principalmente a los ganglios basales. Por otro lado, la característica patológica principal de la enfermedad de Alzheimer es la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en la materia gris, resultado del procesamiento anómalo de la proteína precursora amiloide, lo que conduce a la agregación de péptidos β -amiloide ($A\beta$) y de la proteína tau, respectivamente. A pesar de estas diferencias existe evidencia que sugiere que la alteración de la homeostasis del cobre puede estar relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, ya que el cobre puede interactuar con varios factores patogénicos clave, como el $A\beta$ y la proteína tau. [35-38]. Además, se ha reportado un incremento del cobre libre y la ceruloplasmina inactiva, en el torrente sanguíneo, en pacientes con la enfermedad de Alzheimer en comparación con otros pacientes de edad similar sin la enfermedad [39,40].

Otro trastorno neurológico que se ha visto relacionada al cobre es la enfermedad de Huntington (EH). Esta enfermedad es causada por una mutación en el gen HTT, que se encuentra en el cromosoma 4 y que codifica para la proteína huntingtina. La mutación consiste en una expansión anormal de repeticiones de los nucleótidos CAG. La proteína huntingtina mutada promueve la formación de agregados proteicos tóxicos que afectan la función neuronal, en regiones del cerebro involucradas en el control del movimiento, principalmente en los ganglios basales: núcleo caudado y putamen, los cuales ayudan a suavizar y coordinar los movimientos [41,42]. Aunque se desconoce el papel del cobre en la patogénesis de esta enfermedad, se han reportado altas concentraciones de cobre y hierro en el cerebro de pacientes con EH [43]. Además, se ha utilizado como tratamiento el quelante de cobre tetratiomolibdato en modelos murinos de la EH, en donde se ha observado un retraso en el deterioro de la función motora, lo que respalda un posible papel del cobre en la progresión de la enfermedad [44].

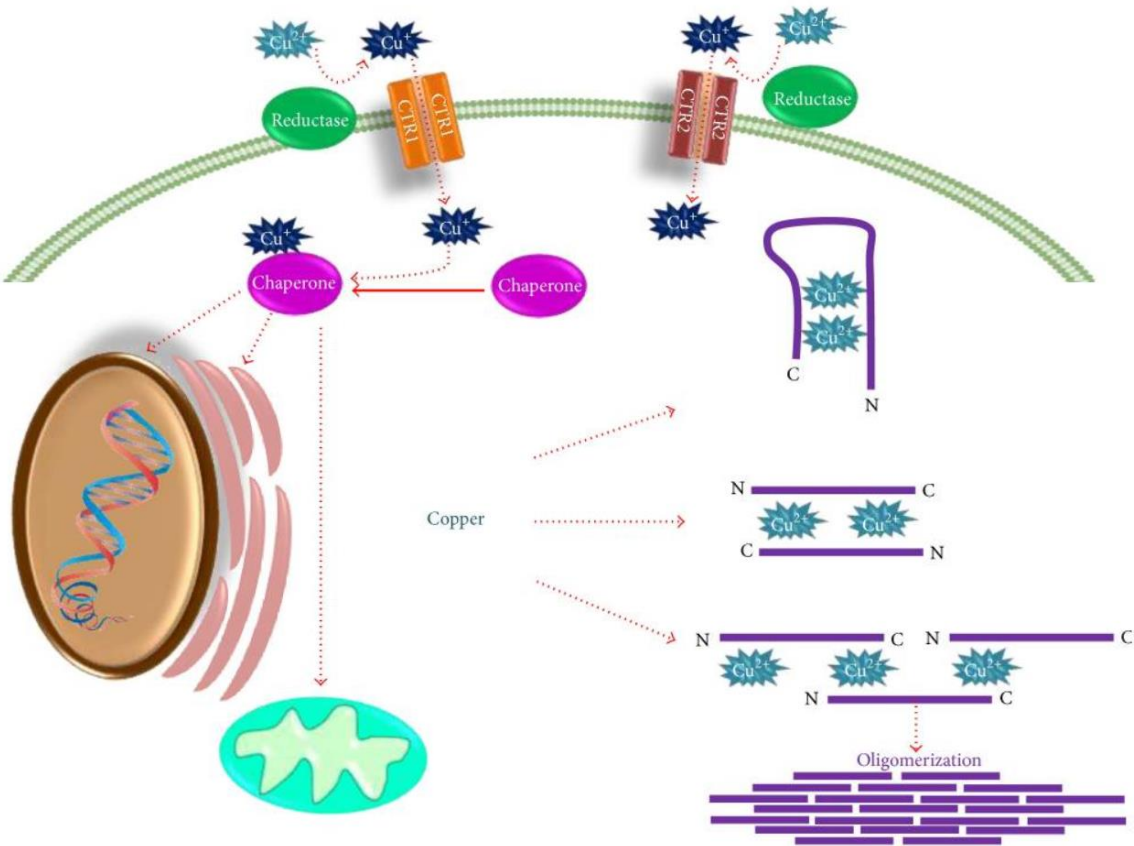


Figura 4. Formación del complejo α -sinucleína-cobre. El cobre puede encontrarse en organismos vivos en forma oxidada Cu^{2+} y reducida Cu^{1+} , ingresando a la célula como Cu^+ a través de CTR1 y CTR2. Posteriormente, el cobre es transportado hacia el núcleo, retículo endoplásmico y mitocondrias mediante proteínas chaperonas. Un exceso de cobre puede llevar a la formación del complejo α -sinucleína-cobre mediante tres mecanismos potenciales. En el primero, una molécula de α -sinucleína se une a Cu^{2+} , plegándose y acercando los extremos amino y carboxilo. El segundo mecanismo implica dos moléculas de α -sinucleína dispuestas cabeza con cola, generando un sitio de unión para el cobre en ambos extremos. En el tercer mecanismo, la región carboxilo-terminal de una molécula de α -sinucleína interactúa con la región amino-terminal de otra molécula de α -sinucleína creando un sitio de unión para Cu^{2+} . Luego, una de las dos α -sinucleínas interactúa con una tercera molécula de α -sinucleína, formando un segundo sitio de unión para Cu^{2+} . Este proceso eventualmente conduce a la oligomerización de α -sinucleína [45].

Otra de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el desbalance de cobre es la enfermedad de Parkinson. Su principal característica neuropatológica es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, en la sustancia negra de la región del mesencéfalo, así como la presencia de inclusiones citoplasmáticas en diferentes regiones del SNC y periférico, que corresponden a agregados insolubles de la proteína alfa-sinucleína (AS), llamados cuerpos de Lewy [46]. Diferentes estudios han reportado que la AS interacciona con iones metálicos. Entre ellos, se han identificado dos sitios de unión a cobre en la región N-terminal de la AS desencadenando su agregación, lo que podría ser relevante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson y otras alfa-sinucleinopatías (Figura 4) [47-49].

2.4 Principales órganos involucrados en el metabolismo del cobre

El metabolismo del cobre involucra una serie de órganos, principalmente el hígado, riñón e intestino delgado, los cuales coordinan la absorción, distribución, utilización y excreción de este metal. Por lo que estos órganos podrían verse afectados cuando se pierde el balance del cobre.

Se han establecido diferentes modelos animales de la enfermedad de Wilson [50-52], caracterizados por la acumulación de cobre en el hígado y el subsecuente daño hepático, lo que ha permitido estudiar la fisiopatología hepática por exceso de cobre. Las

manifestaciones que se presentan pueden ser muy variables, desde asintomáticas hasta insuficiencia hepática.

En etapas tempranas, cuando los signos de insuficiencia hepática están ausentes, se han reportado alteraciones en la estructura y función mitocondrial, observándose crestas agrandadas y espacios intermembranales ensanchados [53]. También, se ha observado peroxidación lipídica de la membrana mitocondrial de los hepatocitos en ratas con sobrecarga crónica de cobre en la dieta [54]. Las mitocondrias son responsables de la producción de energía celular a través de la fosforilación oxidativa, un proceso que implica la transferencia de electrones a través de varios complejos proteicos. Si estos complejos se dañan, los electrones pueden escapar y reaccionar con el oxígeno, formando ROS, lo que conlleva a daño celular por estrés oxidativo. Cuando hay un daño en este órgano, las células hepáticas estrelladas se activan, provocando un aumento en la producción de los componentes de la matriz extracelular, como el colágeno I y la alfa-actina de músculo liso. La matriz extracelular sustituye a las células dañadas del parénquima hepático provocando una fibrosis hepática, la cual puede evolucionar hasta una cirrosis e insuficiencia hepática [55].

El metabolismo anormal del cobre también se ha relacionado a las enfermedades renales. Un ejemplo es la nefropatía diabética, ya que se han reportado niveles séricos elevados de cobre y ceruloplasmina en pacientes con diabetes tipo 1, estos niveles disminuyeron después del control glucémico, mostrando una correlación positiva entre ambos parámetros. [56]. Otro estudio comparó la actividad de la cobre-zinc superóxido dismutasa (SOD1) en pacientes diabéticos e hipertensos con o sin insuficiencia renal. Como resultado, la actividad de la SOD1 fue significativamente mayor en los pacientes diabéticos con insuficiencia renal, lo que sugiere que las alteraciones en la actividad antioxidante, en donde participa el cobre, se asocian con complicaciones de las diabetes como la hipertensión e insuficiencia renal [57].

Se ha reportado que altas concentraciones de cobre alteran significativamente la morfología del intestino delgado en modelos animales, observándose una reducción en el

tamaño de las vellosidades en el duodeno y el yeyuno proximal, lo que podría afectar la capacidad de absorción de nutrientes. Además, se observó un incremento en la concentración duodenal de malondialdehído, un marcador de estrés oxidativo, en los animales expuestos a altas concentraciones de cobre, en comparación con los grupos control [58].

Aunque existen numerosos estudios que demuestran el efecto del cobre en diversas patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, insuficiencia hepática y daño renal, aún se desconocen muchos mecanismos de su fisiopatología, lo que hace necesario realizar más investigaciones.

En el presente estudio se evaluó el efecto de la exposición crónica al cobre en combinación con el envejecimiento sobre órganos implicados en su metabolismo en un modelo *in vivo*. El conocimiento generado en este estudio proporcionará evidencia que contribuirá a explicar la patogenia de diversas enfermedades relacionadas con altas concentraciones de cobre.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

El cobre es un elemento esencial para los seres vivos ya que participa en procesos fisiológicos críticos para el organismo. Sin embargo, un desbalance en su concentración representa un riesgo para la salud.

Los hallazgos derivados de este estudio permitirán establecer si el cobre tiene algún efecto sobre los principales órganos involucrados en su metabolismo. Esto con el fin de aportar evidencia que ayude a explicar la patogenia de las distintas enfermedades relacionadas a altas concentraciones de cobre.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición crónica al cobre sobre los principales órganos involucrados en su metabolismo.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la exposición crónica al cobre sobre la función motora y cognitiva.
2. Evaluar el efecto de la exposición prolongada al cobre sobre los principales órganos relacionados a su metabolismo.
3. Determinar si la exposición crónica al cobre induce muerte celular en los principales órganos relacionados a su metabolismo.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Modelo animal.

Se utilizaron 24 ratones macho de la cepa C57BL/6J de entre 8 y 10 semanas de nacidos, con un peso inicial promedio de 25 g. Se mantuvieron en un ambiente controlado a una temperatura constante de 25 °C, con ciclos de luz/obscuridad de 12 h, teniendo libre acceso a alimento (Prolab RMH 2500) y agua purificada. Se realizaron cambios de la cama de tipo aserrín, alimento y agua cada tercer día. Los sujetos fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos de 6 ratones cada uno, grupo 1: control; grupo 2: administrados con 100 ppm de Cu; grupo 3: administrados con 250 ppm de Cu y grupo 4: administrados con 500 ppm de Cu. La administración se realizó por vía oral en el agua disponible para beber por un lapso de 10 meses.

El tamaño de la muestra se calculó en base a la ley de los rendimientos decrecientes [59], en donde se calcula el valor de “E”, que es el grado de libertad del análisis de varianza (ANOVA), el cual debe encontrarse entre los valores 10 y 20 al realizar la siguiente formula:

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

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

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

$$E = 20$$

Si el valor de “E” es menor a 10 se debe incrementar el tamaño de la muestra, en este caso el número de animales, mientras que, si es mayor a 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.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999” y lo establecido por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de

Animales de Laboratorio (CICUAL), además de ser aprobados por el Comité de Ética de nuestra Universidad (HT22-00001).

5.2 Evaluación del peso corporal y la supervivencia

Al inicio de cada semana se registró el peso corporal de cada ratón en gramos, y se monitoreó la supervivencia a lo largo de los 10 meses de tratamiento. Al finalizar, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos del peso corporal, mediante una ANOVA de dos colas. La supervivencia se evaluó con una prueba de Log-Rank (Mantel-Cox) [60].

5.3 Evaluación de la función motora y cognitiva

Se evaluó la función motora y cognitiva mediante una serie de pruebas que se realizaron individualmente a todos los ratones al finalizar el período de administración, incluyendo la prueba de la marcha, de campo abierto, de transición luz-oscuridad, de construcción del nido y de la madriguera.

5.3.1 Prueba de la marcha

Los trastornos del movimiento se caracterizan por alteraciones en el sistema nervioso que resultan en un exceso o una falta de movimientos voluntarios o automáticos. La alteración de la marcha se observa frecuentemente en pacientes con trastornos del movimiento. Por lo tanto, se considera una prueba conductual apropiada para validar modelos animales de trastornos del movimiento. Esta prueba consistió en colocar a cada sujeto en una primera cámara que conecta con una segunda a través de un túnel. Se utilizó pintura lavable no tóxica para marcar las patas de los ratones, de dos colores distintos, uno para las extremidades anteriores y otro para las extremidades posteriores, luego se permitió que caminaran a través del túnel dejando impresas sus huellas sobre una hoja de papel. Los parámetros que se midieron fueron el largo de la pisada anterior y posterior tanto del lado derecho como el izquierdo, y el ancho de las pisadas anterior y posterior [61].

5.3.2 Prueba de campo abierto

El sistema de monitoreo de actividad en campo abierto permite una evaluación integral de los niveles de actividad locomotora y conductual en ratones, lo cual se puede correlacionar con la función locomotora. Además, esta prueba es ampliamente utilizada para evaluar comportamientos relacionados con la ansiedad y la exploración. Ésta consistió en colocar a cada sujeto en una caja de acrílico cerrada, en cuya base había una hoja de papel dividida en 25 cuadrantes. La prueba comenzó al colocar al ratón en el cuadrante central dejando que explore el tablero por un total de 10 min, los cuales se grabaron en video para su posterior análisis. Aquellos ratones con ansiedad pasan más tiempo en la periferia tratando de buscar una salida. Esta prueba también nos permite evaluar la locomoción general al medir la distancia recorrida por cada sujeto en un tiempo determinado, lo cual se logra al contar el número de cuadros que recorrieron sabiendo que estos miden 6 cm por lado. Realizamos dos mediciones, una a los 5 y otra a los 10 min. Finalmente, se midió la actividad exploratoria, al contar el tiempo que el ratón se paraba en dos patas tomando una posición erguida para explorar la zona [62].

5.3.3 Prueba de transición luz-oscuridad

La prueba de transición luz-oscuridad es una de las pruebas más utilizadas para medir el comportamiento similar a la ansiedad en ratones. La prueba se basa en la aversión natural a las áreas brillantemente iluminadas y en su comportamiento exploratorio espontáneo en entornos nuevos para los ratones. Se coloca a cada sujeto en una caja de acrílico, que consta de un compartimento grande iluminado (2/3 de la caja) que percibe como un sitio aversivo, y un compartimento oscuro (1/3 de la caja), el cual el ratón percibe como un lugar seguro. Los parámetros que se midieron fueron el tiempo que el ratón paso tanto en el compartimento iluminado como en el oscuro, y las veces en que el ratón cambio de compartimento [63].

5.3.4 Prueba de construcción del nido

La prueba de construcción del nido nos permite evaluar la función cognitiva de los ratones. Para ello, se pone a prueba a cada ratón al medir la velocidad en el rendimiento de tareas que requieren el procesamiento de la información para tomar una decisión, además de la memoria de trabajo, como lo es la construcción de un nido, ya que los ratones al entrar en contacto con materiales que pueden manipular tienden a construir uno. Esta prueba consistió en proporcionarle a cada sujeto 5 g de algodón comprimido en una caja individual, tras 24 h se calificó la complejidad del nido considerando la altura y el cierre de las paredes que rodean al nido. Se calificó con una puntuación que va de 0 a 5, obteniendo un puntaje de 0 aquellos sujetos que no tuvieron contacto con el algodón, 1 a los que manipularon el algodón, pero no construyeron un nido, 2 a los que construyeron un nido plano, 3 a los que construyeron un nido en forma de copa, 4 a los que construyeron un domo incompleto, y 5 a los que construyeron un domo completo con una entrada y una salida [64].

5.3.5 Prueba de la madriguera

La prueba de la madriguera nos permite evaluar el bienestar general de los animales de laboratorio, ya que en ocasiones algún factor externo al experimento, presente en el ambiente del laboratorio, puede alterarlos provocando algún sesgo en nuestros resultados. Se ha observado que el instinto de excavación es un parámetro que se modifica poco dentro del ambiente de laboratorio. Por lo tanto, cambios en el rendimiento en la excavación de la madriguera son un parámetro sensible para monitorear el bienestar de los murinos. Esta prueba consistió en colocar 80 g de alimento en tubos cerrados por uno de sus extremos fungiendo como una madriguera. Cada sujeto fue colocado en una caja individual junto con una madriguera 2 h antes del inicio del ciclo de oscuridad, y se retiró 12 h después al terminar el ciclo. Posteriormente, se procedió a pesar el alimento que se encontraba fuera del tubo para determinar el porcentaje de alimento desplazado durante la noche [65].

5.4 Sacrificio del modelo animal

Una vez finalizados los 10 meses de tratamiento y las pruebas que evalúan la función motora y cognitiva, los sujetos fueron sacrificados. A cada ratón se le administraron 500 µl del anticoagulante heparina (Inhepar[®], PiSA Labs, Guadalajara, Jalisco, México) por vía intraperitoneal, 10 minutos previos al sacrificio. Posteriormente, fueron anestesiados con ketamina (#Q7833028, PiSA Labs, General Escobedo, México) 100 mg/mL mezclado con el analgésico xilacina (#Q7833099, PiSA Labs, General Escobedo, México) 10 % (100 mg/kg de ketamina con 10 mg/kg de xilacina) por vía intraperitoneal. Se comprobó que los ratones estuvieran bajo los efectos de la anestesia mediante la evaluación de 3 puntos de reflejo: patas, cola y córnea.

Se procedió con la técnica de perfusión cardíaca mediante la inmovilización del animal, fijándolo a una placa de poliestireno con sujetadores. Luego, se realizó una incisión con el bisturí a la altura de la apófisis xifoides, y con ayuda de unas tijeras se realizó un corte longitudinal por la línea media. Posteriormente, se separó y exhibió la cavidad torácica. Se procedió a fijar los órganos mediante perfusión cardíaca. Para esto, se colocó un catéter dispuesto en una bomba peristáltica, en el ventrículo izquierdo. Con ayuda de unas tijeras se realizó una pequeña incisión en la aurícula izquierda, y se bombeó (a una presión de 80-100 mm Hg) un volumen de 50 ml de una solución de buffer de fosfatos (PBS 1X, 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 (P6148, Sigma Aldrich, St. Louis and Burlington, MA) al 4% con el fin de preservar el tejido. Finalmente, se recolectaron los órganos de interés y se almacenaron en el mismo fijador.

5.5 Técnica histológica

Una vez extraídos los órganos de interés: hígado, riñón e intestino delgado, se fijaron en paraformaldehído al 4% por 24 h. Posteriormente, se llevó a cabo la inclusión en un procesador de tejidos (KD-TS3B, Zhejiang Jinhua Kedee Instrumental Equipment). Este equipo cuenta con doce contenedores en donde se depositan distintas soluciones, por cada

una de las cuales se introducen la muestra de manera automatizada. Dichas soluciones consisten en una serie de alcoholes de concentración creciente hasta llegar a alcohol absoluto, los cuales fueron preparados a partir de alcohol etílico absoluto (CTRO1160, CTR Scientific, Monterrey, N.L., México) para la deshidratación del tejido, xilol (20229, CTR Scientific, Monterrey, N.L., México) para el aclaramiento, y parafina (1.07164.2504, Sigma Aldrich, St. Louis and Burlington, MA) para dar soporte al tejido. Posteriormente, se realizó la inclusión utilizando un centro de inclusión de tejidos (KD-BM, Zhejiang Jinhua Kedee Instrumental Equipment)., en donde los órganos se colocaron en un molde metálico, el cual se rellenó con parafina fundida, luego se pasaron a una placa de enfriamiento (KD-BL, Zhejiang Jinhua Kedee Instrumental Equipment) en donde la parafina se solidificó obteniendo bloques para ser seccionados.

Utilizando un microtomo (RM2235, Leica, Wetzlar, Germany) se realizaron cortes con un grosor de 4 μm , estos se pasaron a un baño de flotación (KD-P, Zhejiang Jinhua Kedee Instrumental Equipment). de agua destilada (2 L aproximadamente), a una temperatura entre 35 y 40 °C, a la cual se le añadió 0.5 g de gelatina (104078, Merck, Rahway, Nueva Jersey, USA). Cuando el tejido se observó sin dobleces fue retirado del agua con ayuda de un portaobjetos, las laminillas fueron rotuladas y almacenadas hasta el momento de su tinción.

Previo a ser teñidos los cortes deben hidratarse, para ello primeramente se colocaron dentro de un horno (Equipos S.A., Ciudad de México) a 60 °C por 1 h para eliminar el exceso de parafina. Posteriormente se sumergen en xilol por 5 min para continuar con la desparafinación, seguido de una serie de alcoholes de concentración decreciente hasta llegar a agua destilada (Los Alpe's, Monterrey, N.L., México).

5.5.1 Tinción Hematoxilina & Eosina

Con el objetivo de observar la morfología general de cada órgano se realizó la tinción hematoxilina & eosina. Ésta consiste en utilizar a la hematoxilina (H3136, Sigma Aldrich, St. Louis and Burlington, MA) como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color

violeta o azul oscuro, y a la eosina (45380, Reactivos Química Meyer, Ciudad de México) como colorante citoplasmático, tiñendo a los componentes del citoplasma y matriz extracelular en tonos rosados. De esta forma se consigue un buen contraste entre todas las estructuras antes mencionadas. Una vez hidratados los cortes se sumergieron en hematoxilina por 2 min, luego, se retiró el exceso del colorante con una inmersión rápida en alcohol ácido, el cual se prepara utilizando 99mL de alcohol etílico al 70% y 1 mL de ácido clorhídrico (A1425-13, Jalmek, San Nicolás de los Garza, México), seguido de un lavado en agua destilada. Posteriormente, se viró la muestra con dos inmersiones rápidas en agua amoniacal, la cual se prepara utilizando 99 mL de agua y 1 mL de hidróxido de amonio (20153, CTR Scientific, Monterrey, N.L., México), seguido de un lavado en agua destilada. Finalmente, los cortes se coloraron en eosina por 1 min seguido de la deshidratación a través de diferentes alcoholes de concentraciones crecientes hasta llegar a xilol. Una vez realizada la tinción, se procedió con la inclusión final, la cual consiste en colocar una gota de resina adyacente al tejido, se utilizó la solución Entellan (107960, Sigma Aldrich, St. Louis and Burlington, MA), que actúa como medio de montaje recubriendo la muestra al colocar un cubreobjetos sobre ella, confiriendo protección y conservación al preparado histológico además de ayudar a obtener imágenes nítidas en el microscopio ya que tiene un índice de refracción similar al del vidrio [66].

5.5.2 Tinción Tricrómico de Masson

La tinción Tricrómico de Masson se utilizó para teñir fibras de colágeno e identificar una posible fibrosis en los órganos de interés, ya que cuando hay daño tisular el parénquima suele sustituirse por estroma. Después de la hidratación, los cortes se colocaron en fijador de Bouin, el cual se prepara mezclando 75 mL de una solución acuosa saturada de ácido pícrico (05602, Fermont, Monterrey, N.L., México), 25 mL de formaldehído 37 % (02681, CTR Scientific, Monterrey, N.L., México) y 5 mL de ácido acético glacial (J.T. Baker, Radnor Township, Pennsylvania, USA), por 1 h a 56 °C, el cual actúa como mordente. Luego, se lavaron en agua corriente hasta que el color amarillo del fijador desapareció, y se enjuagaron en agua destilada. Los cortes se colocaron en una solución de hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min seguido de un lavado en agua corriente y un enjuague

en agua destilada. Para preparar la hematoxilina, antes se prepararon 2 soluciones: La solución A contenía 1 g. de hematoxilina y 100 mL de alcohol etílico al 96 % (144531, CTR Scientific, Monterrey, N.L., México); la solución B contenía: 4 mL de cloruro férrico al 29 % (803945, Merck, Rahway, Nueva Jersey, USA), 95 mL de agua destilada, y 1 mL de ácido clorhídrico. Se mezclaron en partes iguales ambas soluciones. Luego, se tiñeron con fucsina escarlata por 5 seg y se lavaron en agua destilada hasta que esta dejó de teñirse. Para preparar la fucsina escarlata, se mezclaron 90 mL de escarlata de Biebrich al 1 % (10065680, Thermo Scientific Chemicals, Waltham, Massachusetts), 10 mL de fucsina ácida (2211-5, Fagalab, Sinaloa, México) al 1 % y 1 mL de ácido acético glacial. Los cortes se colocaron en una solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min seguido de un enjuague con agua destilada. Para preparar la solución de los ácidos se mezclaron 5 g de ácido fosfomolibdico (2000944500, Biopack®, Bondi Junction, Australia) y 5 g de ácido fosfotúngstico (2000160505, Biopack®, Bondi Junction, Australia) en 200 mL de agua destilada. Después, se utilizó la solución de azul de anilina durante 15 seg seguido de un lavado con agua destilada hasta retirar el exceso de colorante. Para preparar la solución de azul de anilina se mezclaron 2.5 g de azul de anilina (2078-25, Fagalab, Sinaloa, México), 100 mL de agua destilada y 2 mL de ácido acético glacial. Finalmente, se sumergió en ácido acético acuoso, el cual se prepara mezclando 1 mL de ácido acético glacial y 99 mL de agua destilada, por 2 min seguido de la deshidratación en alcoholes de concentración creciente hasta llegar a xilol y el montaje final con la resina Entellan [67].

5.5.3 Tinción Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

La tinción PAS es específica para carbohidratos, tiñéndolos de color violeta, lo que nos permite analizar diferentes estructuras en cada órgano: en el hígado se midieron las reservas de glucógeno, en el riñón se evaluaron posibles alteraciones en la membrana basal glomerular, y en el intestino delgado se analizaron la chapa estriada y células caliciformes. Después de la hidratación, los cortes se sumergen en ácido Peryódico (2000164900, Biopack®, Bondi Junction, Australia) por 10 min, oxidando los grupos hidroxilo en grupos aldehído presentes en los carbohidratos, seguido de un enjuague en agua destilada. Luego,

se incubaron con el reactivo de Schiff (1.09033.0500, Sigma Aldrich, St. Louis and Burlington, MA) por 20 min, éste forma un complejo color violeta con los aldehídos en los carbohidratos. Posteriormente, se diferenciaron los cortes en solución enjuagadura sulfurosa, realizando 2 cambios de 2 min cada uno. Esta solución contiene metabisulfito de sodio (S9000, Sigma Aldrich, St. Louis and Burlington, MA) el cual bloquea la oxidación por parte del ácido Peryódico. Después, se enjuago con agua destilada y se contratiñó con hematoxilina por 2 min, para dar contraste entre las estructuras celulares y los carbohidratos. Se retiró el exceso de colorante con una inmersión rápida en alcohol ácido, el cual se prepara utilizando 99 mL de alcohol etílico al 70% y 1 mL de ácido clorhídrico, seguido de un lavado en agua destilada. Posteriormente, se viró la muestra con dos inmersiones rápidas en agua amoniacal, la cual se prepara utilizando 99 mL de agua destilada, y 1 mL de hidróxido de amonio, seguido de un lavado en agua destilada. Finalmente, los cortes se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente hasta llegar a xilol y el montaje final se realizó con la resina Entellan [68].

5.5.4 Análisis morfométrico de las tinciones histológicas

Una vez realizadas las tinciones se tomaron imágenes digitales utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i[®] y el software Q-capture Pro 7[®], a partir de ellas se llevó a cabo el análisis morfométrico utilizando el programa ImageJ[®].

En los cortes teñidos con hematoxilina y eosina se analizaron diferentes estructuras propias de cada órgano. En el hígado, se analizaron 2 zonas, la zona centrolobulillar, que corresponde a la periferia de la vena central, y la zona periportal, que corresponde a la periferia de la triada portal. En ambas zonas, utilizando la herramienta “Cell Counter” se contaron las células binucleadas presentes en 5 campos de cada sujeto utilizando un objetivo de 40X. También, utilizando la herramienta “Straight Line”, se midió el diámetro de 10 vasos sinusoidales por campo, y se analizaron 5 campos por sujeto utilizando un objetivo de 40X.

En el riñón, se analizaron 3 estructuras presentes en la corteza renal, el glomérulo y los túbulos contorneados distales y proximales, midiendo 40 de cada estructura por sujeto, en campos obtenidos con un objetivo de 40X. Se midió el área y perímetro glomerular, el área del espacio de Bowman y el área luminal de los túbulos contorneados distales y proximales, utilizando la herramienta “Freehand”; el diámetro glomerular y los diámetros interno y externo de los túbulos contorneados distales y proximales se midieron utilizando la herramienta “Straight Line”; la celularidad glomerular se midió utilizando la herramienta “Cell Counter”; y la circularidad glomerular se calculó utilizando la fórmula:
$$\text{Circularidad} = 4\pi \times \text{área} / \text{perímetro}^2$$

En el intestino delgado, se analizó la mucosa del duodeno, realizando mediciones en 6 vellosidades y 6 glándulas intestinales, también llamadas criptas de Lieberkühn por campo. Se evaluaron 3 campos por sujeto, obtenidos con un objetivo de 10X. Se midió la altura y ancho de la vellosidad, la profundidad de la cripta, el espesor de la muscular de la mucosa y el espesor de la mucosa, utilizando la herramienta “Straight Line”. Además, se calculó la relación que existe entre la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta dividiendo la primera entre la segunda.

En los cortes teñidos con Tricrómico de Masson, se midió el porcentaje de fibras de colágeno por campo, las cuales se tiñeron de color azul. En total se analizaron 5 campos por sujeto por cada órgano, utilizando un objetivo de 40X, y con la herramienta “Threshold”.

En los cortes teñidos con ácido Peryódico de Schiff, se analizaron diferentes parámetros para cada órgano. En el hígado, se midió el porcentaje de depósitos de glucógeno (teñidos de color violeta) por campo, tomando en cuenta 5 campos por sujeto, los cuales fueron obtenidos con un objetivo de 40X, y utilizando la herramienta “Threshold”. En el riñón, se midió la cantidad de carbohidratos presentes en la membrana basal glomerular utilizando la herramienta “Threshold”, para el análisis se tomaron en cuenta 40 glomérulos por sujeto, utilizando campos obtenidos con un objetivo de 40X. En el intestino delgado, se realizó un conteo de las células caliciformes presentes por vellosidad utilizando la

herramienta “Cell Counter”, y se midió el grosor de la chapa estriada utilizando la herramienta “Straight Line”, para ambos parámetros se analizaron 10 vellosidades por sujeto, utilizando campos obtenidos con un objetivo de 100X.

5.6 Espectroscopía de absorción atómica con llama

Para determinar si el daño causado por el cobre se debía directamente a una acumulación de este metal en los órganos, se procedió a cuantificar la concentración de cobre en los órgano correspondientes, utilizando la técnica de espectroscopia de absorción atómica con llama.

A partir de los órganos recolectados tras el sacrificio, se tomaron 0.3 g de cada uno y se digirieron individualmente utilizando ácido nítrico ultrapuro. Éste, contiene trazas de metales en cantidades muy bajas que corresponden a partes por trillón, por lo que no emiten señales que puedan alterar los resultados. La digestión consistió en añadir a cada muestra 1 mL de ácido nítrico ultrapuro (6901-01, J.T. Baker, Radnor Township, Pennsylvania, USA), e incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 10 min, observándose la muestra homogénea, luego se incubo toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, por la mañana se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, 1 h antes del análisis. Además, se preparó una curva de calibración, a partir de una solución estándar de cobre, para determinar la linealidad de nuestro método.

El espectroscopio cuenta con una pequeña manguera que aspira la solución líquida que queremos analizar y se rocía como un aerosol fino en una cámara para combinarla con un combustible y gases oxidantes, para el análisis del cobre se utilizó acetileno y aire. La mezcla se introduce en una llama, donde la alta temperatura provoca la atomización, es decir, la descomposición de las moléculas de la muestra en átomos libres. Luego, se utiliza una lámpara de cátodo hueco, la cual es específica para cada elemento, esta emite radiación en las longitudes de onda características del elemento deseado. Después, la radiación de la lámpara pasa a través de la llama, y posteriormente a través de un

monocromador, que selecciona la longitud de onda específica de interés. Finalmente, un detector mide la intensidad de la radiación transmitida y la convierte en una señal eléctrica que es leída por una computadora [69].

5.7 Ensayo TUNEL

Este ensayo es utilizado para detectar la fragmentación del ADN, un indicador de muerte celular. De esta manera, determinamos si el cobre causaba muerte celular en cada órgano analizado.

A partir de los órganos recolectados tras el sacrificio, se realizaron cortes en laminillas silanizadas, la silanización crea una capa de moléculas de silano en la superficie del vidrio del portaobjetos, lo que proporciona sitios activos para la unión de muestras biológicas, mejorando así su adherencia y reduciendo la posibilidad de un desprendimiento.

Una vez desparafinados e hidratados los cortes, se realizó el ensayo utilizando el kit comercial “TUNEL Assay Kit BrdU-Red” de la marca abcam (ab66110, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Primeramente, se realizó un lavado en PBS 1X por 5 min, seguido de una incubación con proteinasa K 10 mg/ml diluido en Tris HCL pH 8 + EDTA 50 mM por 5 min, que actúa como una solución permeabilizante. Luego, se realizó un lavado en PBS 1X, seguido de 2 lavados en “Wash Bufer”, por 5 min cada uno. Después, se realizó una incubación a 37 °C en oscuridad por 1 h en “Labeling Solution”, la cual contiene “TdT reaction bufer”, “TdT enzyme”, “Br-dUTP” y agua destilada. Trascurrido el tiempo, se realizaron 2 lavados en PBS 1X de 5 min cada uno, seguido de una incubación de 30 min en oscuridad en “Antibody Solution”, la cual contiene “Anti-BrdU-Red” y “Rinse Buffer”. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada por 5 min, seguido de una incubación de 30 min con el marcador nuclear DAPI. Finalmente, se realizó el montaje utilizando VectaShield® [70].

5.7.1 Análisis morfométrico del ensayo TUNEL

Una vez realizado el ensayo se obtuvieron imágenes digitales utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i[®] y el software Q-capture Pro 7[®]. A partir de ellas, se llevó a cabo el análisis morfométrico con el programa Image J[®], el cual consistió en un conteo de células positivas para el ensayo TUNEL (células con fluorescencia color rojo), utilizando la herramienta “Cell Counter”.

5.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism versión 8. Primeramente, se realizó la prueba de normalidad Shapiro Wilk, con el objetivo de determinar si los datos eran paramétricos o no paramétricos. Los datos paramétricos se analizaron mediante la prueba t de Student, en el caso de comparaciones entre dos grupos, y ANOVA de una vía con post hoc de Tukey, en comparaciones entre más de dos grupos. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Para los datos no paramétricos se utilizó la prueba U de Mann Whitney, en caso de comparaciones entre dos grupos; y Kruskal Wallis con post hoc de Dunn, en comparaciones entre más de dos grupos. Los resultados se expresaron como mediana \pm rango intercuartil. En todos los casos se consideró significativo un valor de p menor a 0.05.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Evaluación del peso corporal y la supervivencia del modelo animal

A lo largo del modelo experimental se monitoreó el peso corporal semanalmente, en donde no se observó una diferencia significativa entre el grupo control y los grupos tratados con cobre (Figura 5). Al finalizar el modelo se evaluó la supervivencia utilizando una prueba de Log-Rank, en donde observamos que no fue afectada por el tratamiento con cobre (Figura 6).

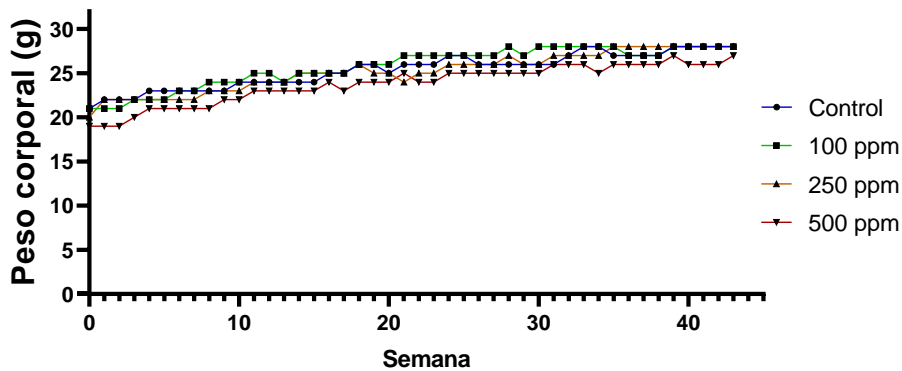


Figura 5. La exposición crónica al cobre no afecta el peso corporal. Evaluación semanal del peso corporal del modelo animal.

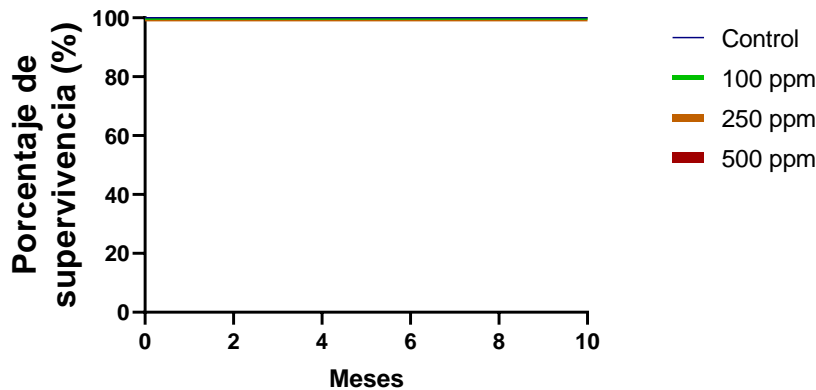


Figura 6. La exposición crónica al cobre no afecta la supervivencia. Evaluación de la supervivencia del modelo animal al finalizar el tratamiento.

6.2 Evaluación de la función motora y cognitiva

Tras el periodo de administración del cobre, se evaluó la función motora y cognitiva en cada uno de los sujetos de experimentación por medio de 5 pruebas.

6.2.1 La exposición prolongada a cobre afecta la coordinación motora de los ratones

La coordinación motora se evaluó utilizando la prueba de la marcha, los parámetros medidos fueron el largo de la pisada anterior y posterior, tanto del lado derecho como del lado izquierdo, y el ancho de la pisada anterior y posterior (Figura 7A). Como resultado, se observó una disminución en el largo de la pisada en los grupos tratados con cobre de manera dosis-dependiente con respecto al grupo control (Figura 7B). A mayor concentración de cobre, menor fue la distancia de las pisadas anterior y posterior, tanto del derecho como del lado izquierdo. Por otro lado, no se observó una diferencia significativa en el ancho de las pisadas anteriores y posteriores. Sin embargo, hubo una tendencia de un aumento en el ancho de ambas pisadas en los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control.

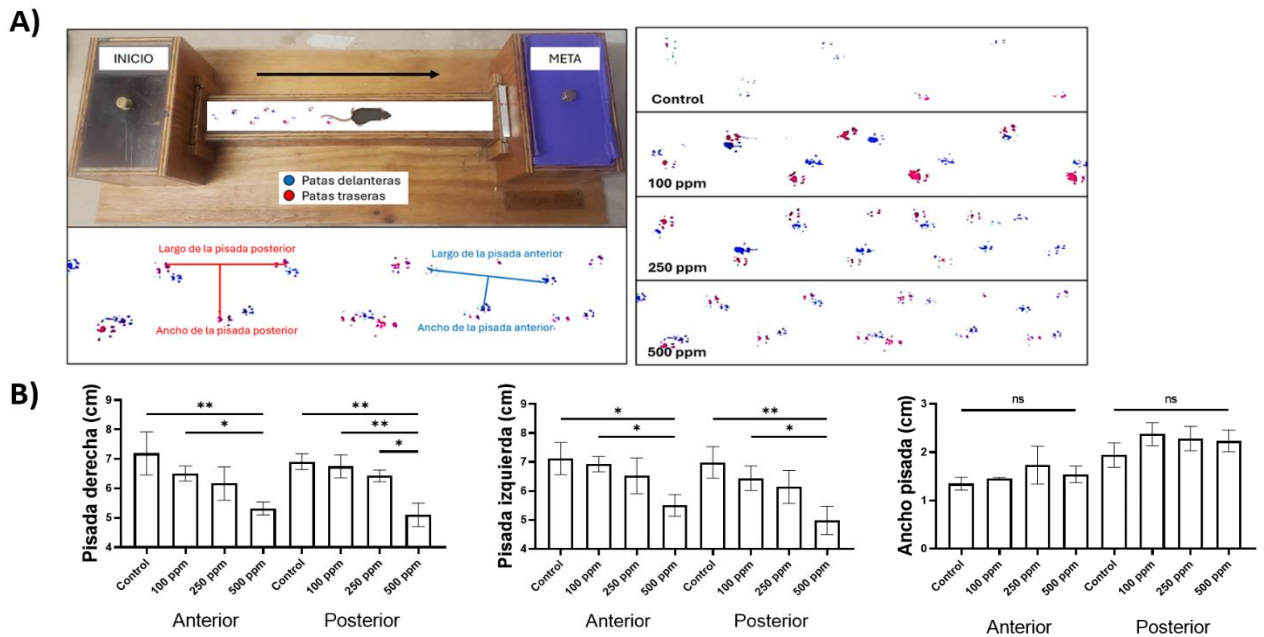


Figura 7. La exposición crónica al cobre afecta la coordinación motora. A) Imagen del túnel que recorren los ratones en la prueba de la marcha, esquema de las mediciones del largo y ancho de la pisada, y

patrón representativo de la marcha de los ratones. B) Análisis estadístico de los parámetros medidos en la prueba de la marcha.

6.2.2 La exposición prolongada a cobre afecta la locomoción general y la actividad exploratoria de los ratones

La prueba de campo abierto nos permitió evaluar la ansiedad de los ratones, para ello se cuantificó el tiempo que pasaron en el centro o la periferia de la caja de acrílico (Figura 8A). No se observó diferencia significativa entre los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 8B). También, se midió la locomoción general al determinar la distancia recorrida por cada sujeto durante el tiempo de la prueba, esto por medio del conteo de cuadrados recorridos, los cuales miden 6 cm por lado. Se observó que en los grupos tratados con cobre hubo una disminución en la distancia recorrida con respecto al grupo control. Por último, se midió la actividad exploratoria al cuantificar el tiempo en que cada ratón mantenía una posición erguida para explorar la zona. Se observó una disminución de la actividad exploratoria en los grupos tratados con cobre de manera dosis-dependiente, en donde a mayor concentración de cobre administrado, menor fue el tiempo de exploración vertical, en comparación con el grupo control.

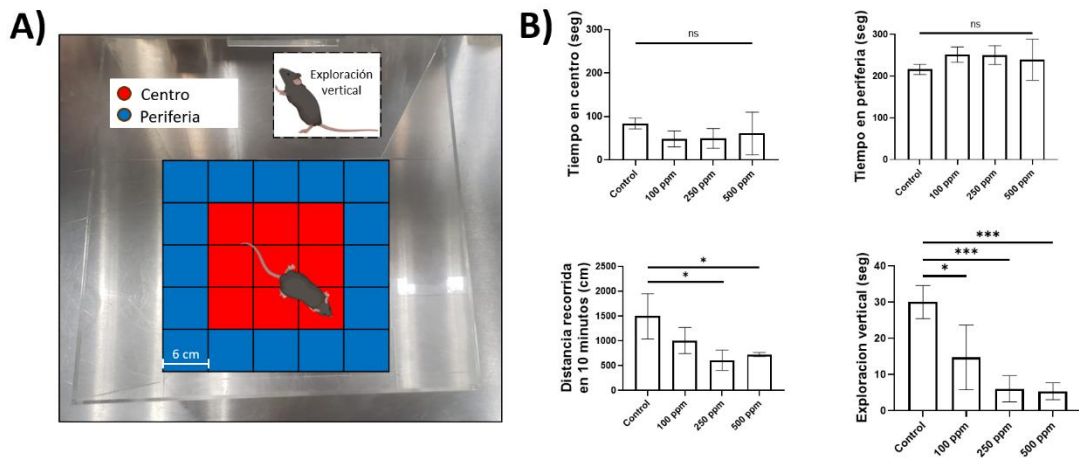


Figura 8. La exposición crónica al cobre afecta la locomoción general y la actividad exploratoria. A) Esquema de la prueba de campo abierto. B) Análisis estadístico de los parámetros medidos en la prueba de campo abierto.

6.2.3 La exposición prolongada a cobre no induce ansiedad en los ratones

La prueba de transición luz-oscuridad también es útil para evaluar la ansiedad. Los parámetros que se midieron fueron el tiempo que el ratón permaneció en el cuarto iluminado y en el cuarto oscuro, y las veces que cambio de cuarto (Figura 9A). En ninguno de los parámetros se observó diferencia significativa entre los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 9).

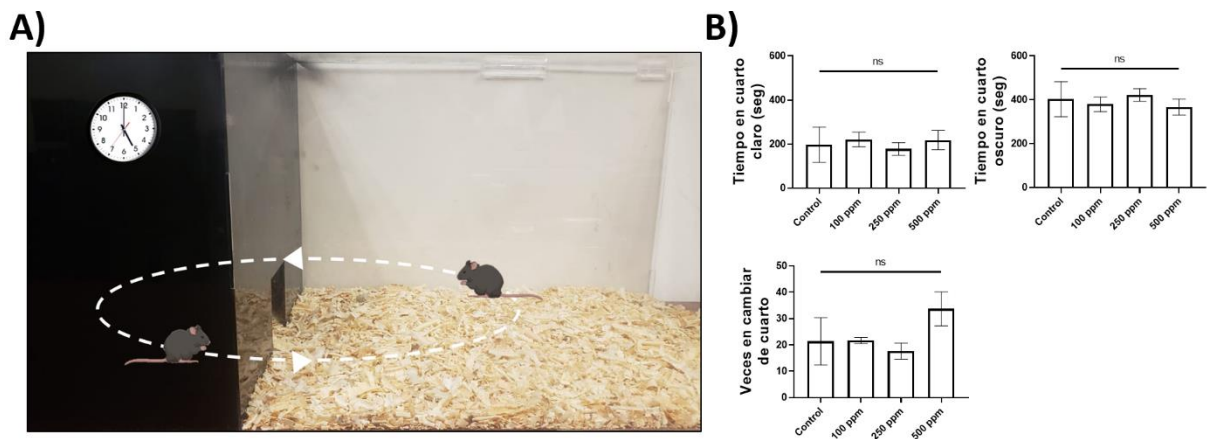


Figura 9. La exposición crónica al cobre no induce ansiedad. A) Esquema de la prueba de transición luz-oscuridad. B) Análisis estadístico de los parámetros medidos en la prueba de transición luz-oscuridad.

6.2.4 La exposición prolongada a cobre no altera la función cognitiva de los ratones

La función cognitiva de los ratones se evaluó mediante la prueba de construcción del nido, en esta se calificó la complejidad del nido que construyó cada sujeto de experimentación considerando la altura y el cierre de las paredes (Figura 10A). Dicha calificación consistió en una puntuación del 0 al 5, obteniendo un mayor puntaje los nidos más complejos. Como resultados observamos que ninguno de los sujetos logró superar una puntuación de 2 (Figura 10B y C).

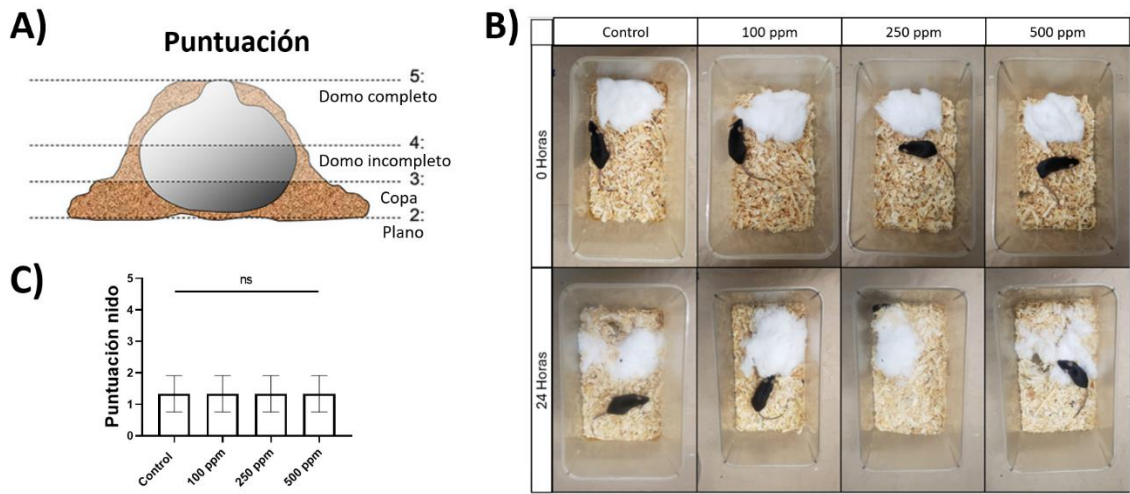


Figura 10. La exposición crónica al cobre no altera la función cognitiva. A) Esquema de la prueba de construcción del nido. B) Imágenes representativas de los nidos construidos. C) Análisis estadístico de los parámetros medidos en la prueba de construcción del nido.

6.2.5 La exposición prolongada a cobre no afecta el bienestar general de los ratones

La prueba de la madriguera nos permitió evaluar el bienestar general de los ratones, descartando cualquier alteración causada por algún factor externo a nuestro experimento. En ésta, se midió el porcentaje de alimento desplazado fuera de la madriguera por el ratón, y no se observó una diferencia significativa en los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 11).

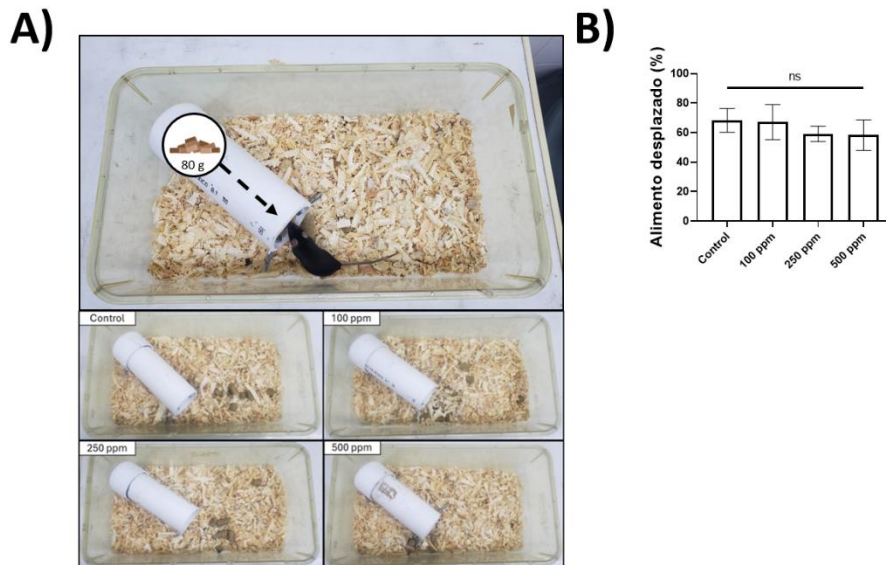


Figura 11. La exposición crónica al cobre no afecta el bienestar general. A) Imágenes representativas de la prueba de la madriguera. B) Análisis estadístico de los parámetros medidos en la prueba de la madriguera.

6.3 Evaluación morfológica de los principales órganos involucrados en el metabolismo del cobre

Una vez terminado el período de administración de cobre y realizadas las pruebas que evalúan la función motora y cognitiva, se procedió con el sacrificio del modelo animal. Se recolectaron los principales órganos involucrados en el metabolismo del cobre, incluyendo el hígado, riñón e intestino delgado. Para el análisis morfológico se utilizaron las tinciones H&E, Tricrómico de Masson y PAS en cada uno de los órganos.

6.3.1 La exposición crónica al cobre induce alteraciones morfológicas en el hígado

El hígado es el principal órgano que almacena cobre. Dado que los hepatocitos participan en la detoxificación y eliminación de fármacos, toxinas y xenobióticos, estas células son propensas a sufrir daño y muerte celular [18]. Con la finalidad de observar la histología general del hígado, se realizó la tinción H&E. El análisis se realizó en dos zonas: la zona centrolobulillar, la cual corresponde a la periferia de la vena central, y la zona periportal, que corresponde a la periferia de la triada porta. En ambas zonas se realizó un conteo de los hepatocitos binucleados y se midió el diámetro de los vasos sinusoidales. En la Figura 12A se muestran micrografías representativas del hígado de los diferentes grupos. Se observó una disminución en el número de hepatocitos binucleados en los grupos tratados con cobre de manera dosis-dependiente en comparación con el control (Figura 12B). A mayor concentración de cobre, menor fue el número de hepatocitos binucleados, mostrando significancia estadística entre el grupo tratado con 500 ppm de cobre y el grupo control en la zona centrolobulillar. En cuanto al diámetro de los vasos sinusoidales no se observó diferencia significativa.

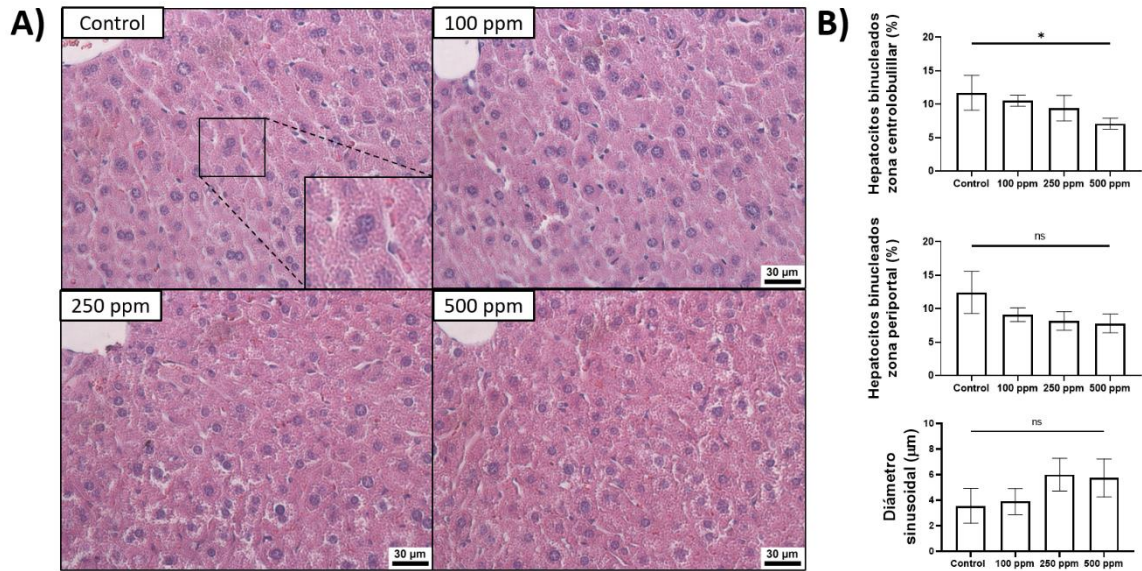


Figura 12. La morfología del hígado se altera en respuesta a la administración crónica de cobre. A) Micrografías representativas del hígado teñidas con H&E. **B)** Análisis morfométrico de los hepatocitos binucleados en las zonas centrolobulillar y periportal, así como del diámetro de los sinusoides hepáticos. hígado.

Generalmente, cuando un órgano es dañado el parénquima suele sustituirse por estroma, esto quiere decir que las células funcionales propias de cada órgano se sustituyen por tejido de sostén, principalmente fibras de colágeno. Por lo que evaluamos la presencia de algún tipo de alteración a nivel de las fibras de colágeno mediante la tinción Tricrómico de Masson, la cual tiñe estas fibras de color azul. Al realizar el análisis, no se observaron fibras de colágeno en el parénquima del hígado en ninguno de los grupos, por lo que no se realizó ninguna morfometría (Figura 13).

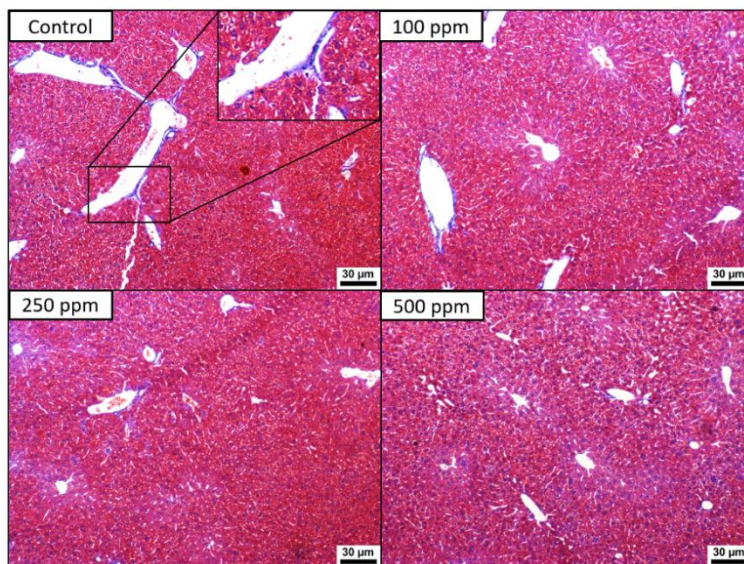


Figura 13. El tejido conectivo no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre en el hígado. Micrografías representativas del hígado teñidas con Tricrómico de Masson.

También, se evaluó una posible alteración a nivel de las reservas de glucógeno presentes en el parénquima del hígado. Para ello se utilizó la tinción PAS (Figura 14A), la cual es específica para teñir carbohidratos de color violeta. No se observó diferencia significativa entre los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control en cuando a la cantidad de glucógeno (Figura 14B).

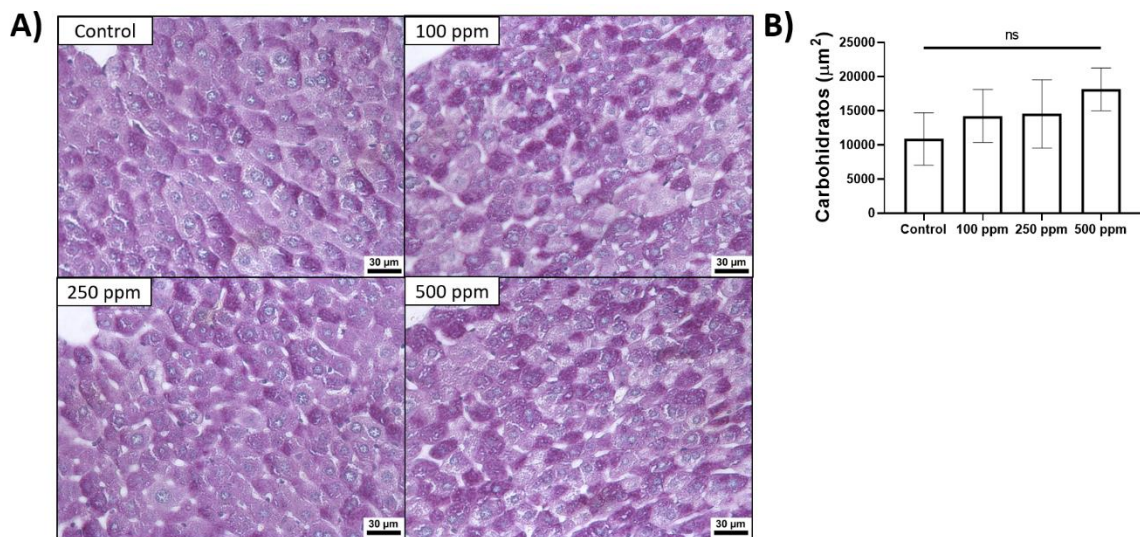


Figura 14. Los depósitos de glucógeno no se alteran en respuesta a la administración crónica de cobre. A) Micrografías representativas del hígado teñidas con PAS. B) Análisis morfológico del contenido de glucógeno en los hepatocitos.

6.3.2 La exposición crónica al cobre induce alteraciones morfológicas en el riñón

El riñón es uno de los principales órganos implicados en la excreción de metales pesados, incluido el cobre. Dado que las células renales, especialmente las de los túbulos proximales, participan activamente en la filtración y reabsorción de diversas sustancias, están particularmente expuestas a la toxicidad inducida por el cobre [71]. Mediante la tinción H&E se pudo observar la morfología general del riñón (Figura 15A). El análisis consistió en una serie de mediciones en los glomérulos y los túbulos contorneados

proximales y distales, estructuras presentes en la corteza renal. Se analizaron los parámetros de área, perímetro, diámetro, circularidad y celularidad glomerular, sin observarse cambios significativos en respuesta a la exposición crónica a cobre, en comparación con el grupo control (Figura 15B).

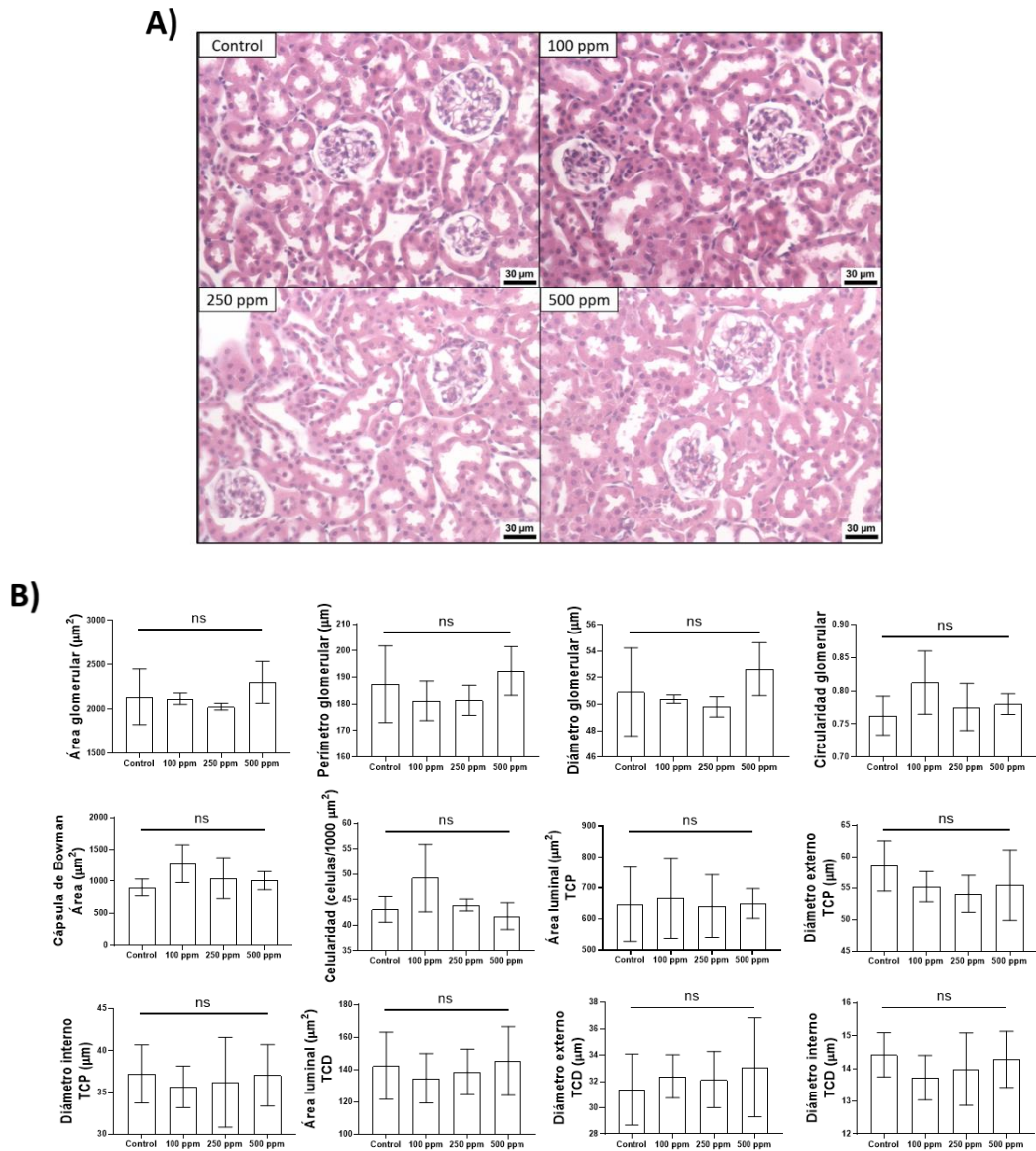


Figura 15. La exposición crónica al cobre no induce alteraciones morfológicas en la corteza renal. A) Micrografías representativas de la corteza renal teñida con H&E. **B)** Análisis morfométrico de la corteza renal. TCP, túbulo contorneado proximal; TCD, túbulo contorneado distal.

Además, se analizó el espacio de la cápsula de Bowman, y los parámetros de área luminal, diámetro interno y diámetro externo del laberinto cortical, sin presentarse cambios significativos en los grupos tratados con cobre en comparación con el grupo control (Figura 15B).

Al analizar la médula renal, se observaron depósitos de tejido adiposo (Figura 16), por lo que se procedió a realizar una morfometría más. Dicha morfometría consistió en medir el área total de depósitos de tejido adiposo presentes en cada sujeto. Como resultado, se observó que en los grupos tratados con cobre había una mayor área de tejido adiposo, siendo un resultado dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración de cobre administrado, mayor fue el área de tejido adiposo presente (Figura 16B).

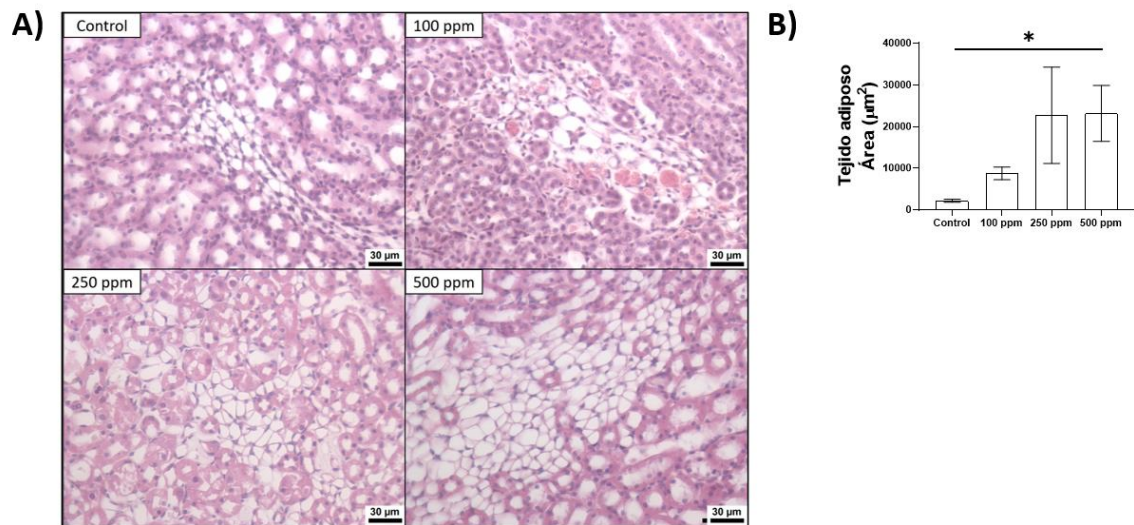


Figura 16. La exposición crónica al cobre induce alteraciones morfológicas en la médula renal. A) Micrografías representativas de la medula renal teñida con H&E. B) Análisis morfométrico de la médula renal.

Asimismo, se evaluó la presencia de algún tipo de alteración a nivel de las fibras de colágeno, mediante la tinción Tricrómico de Masson, en donde no se observó alteración alguna en la distribución y cantidad de fibras de colágeno presentes en el riñón de los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 17).

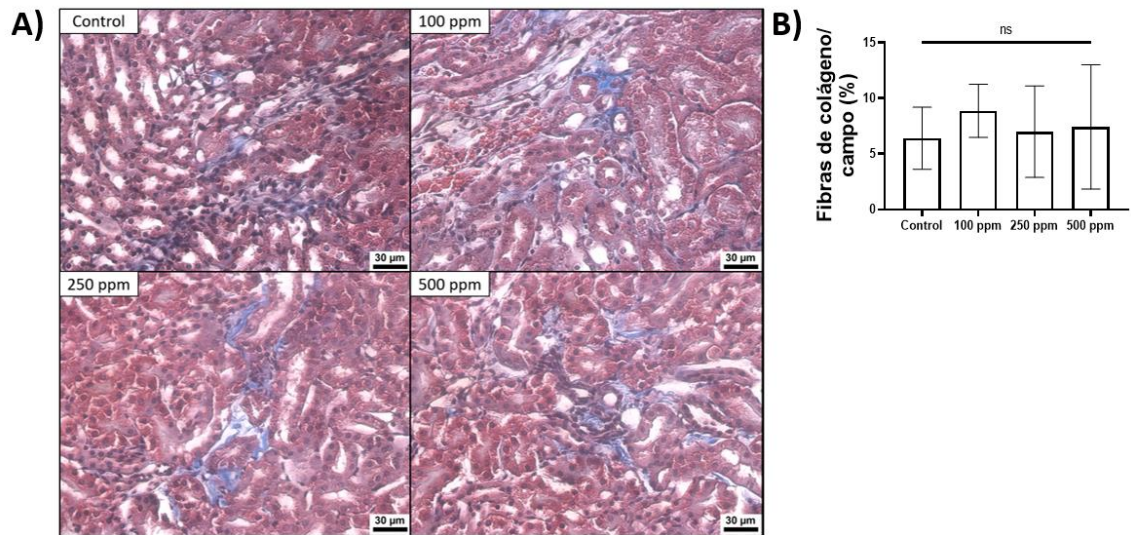


Figura 17. El tejido conectivo no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre en el riñón. A) Micrografías representativas del riñón teñidas con Tricómico de Masson. B) Análisis morfométrico de las fibras de colágeno del riñón.

Utilizando la tinción PAS, se evaluó la cantidad de carbohidratos presentes en la membrana basal glomerular, y no se observó ninguna alteración en dicha membrana en los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 18).

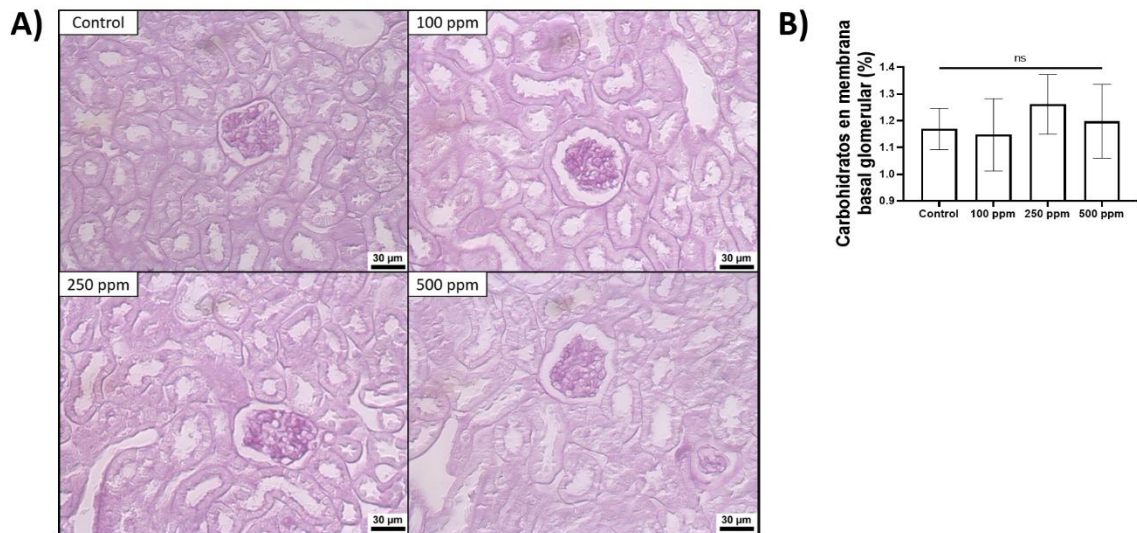


Figura 18. La membrana basal glomerular no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre. A) Micrografías representativas del riñón teñidas con PAS. B) Análisis morfométrico de la membrana basal en el riñón.

6.3.3 La exposición crónica al cobre no induce alteraciones morfológicas en el intestino delgado

Anatómicamente, el intestino delgado se divide en tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon. Tanto la absorción como la excreción de cobre a través de la bilis ocurren en el duodeno [18]. Se realizó la tinción H&E para analizar la morfología general del intestino delgado (Figura 19A). El análisis se llevó a cabo en la mucosa del duodeno, en donde se midió la altura y ancho de la vellosidad, la profundidad de la cripta de Lieberkühn, la relación entre la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta, el espesor de la mucosa y el espesor de la muscular de la mucosa. Para todos los parámetros mencionados no hubo diferencia significativa entre los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control, preservándose la morfología normal del duodeno (Figura 19B).

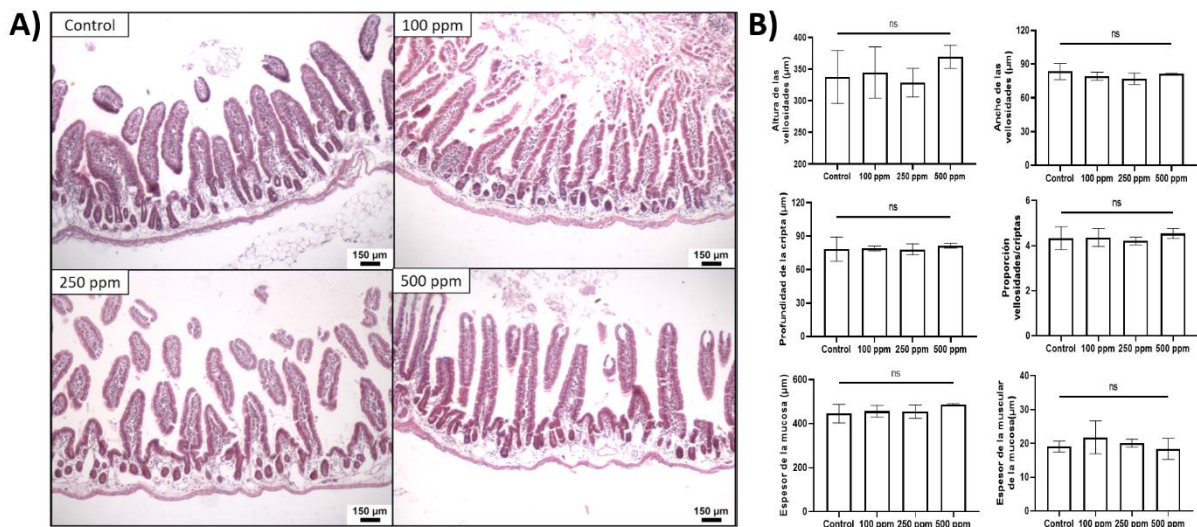


Figura 19. La morfología del intestino delgado no se altera en respuesta a la exposición crónica al cobre. A) Micrografías representativas del duodeno teñidas con H&E. B) Análisis morfométrico de la mucosa del duodeno.

Posteriormente, se evaluó la presencia de algún tipo de alteración a nivel de las fibras de colágeno presentes en la lámina propia de la mucosa del duodeno, mediante la tinción Tricrómico de Masson. Sin embargo, no se observó ninguna alteración en la distribución y cantidad de fibras de colágeno presentes en los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 20).

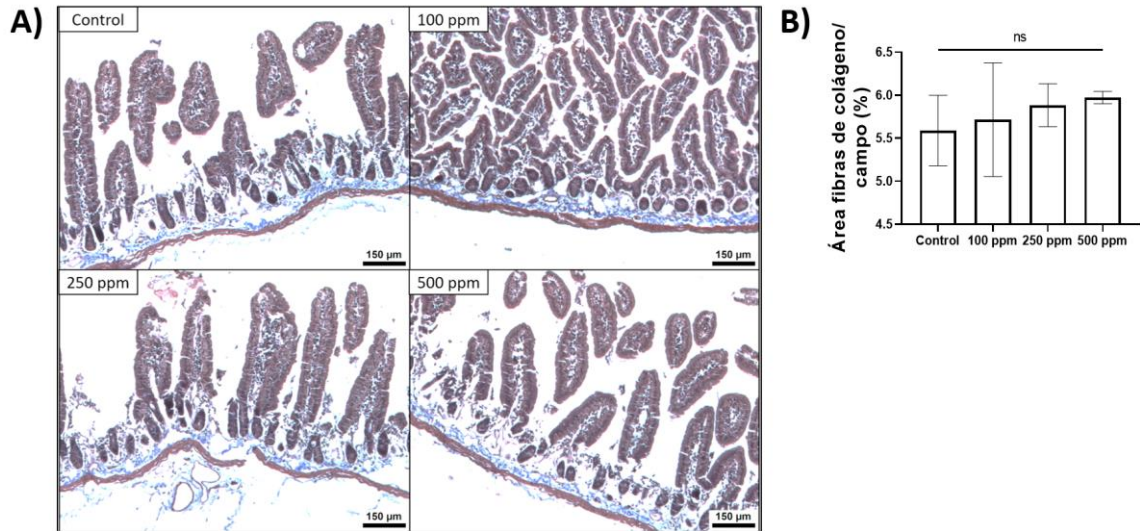


Figura 20. El tejido conectivo no se altera en respuesta a la administración crónica de cobre en la lámina propia de la mucosa del duodeno. A) Micrografías representativas del duodeno teñidas con Tricrómico de Masson. B) Análisis morfométrico de las fibras de colágeno del intestino delgado.

Utilizando la tinción PAS (Figura 21A) se realizó un conteo de células caliciformes en las vellosidades de la mucosa del duodeno, y se midió el grosor de la chapa estriada para determinar una posible alteración en estas estructuras inducida por la administración crónica de cobre. No se observó ninguna alteración en dichas estructuras en respuesta al cobre con respecto al grupo control (Figura 21B).

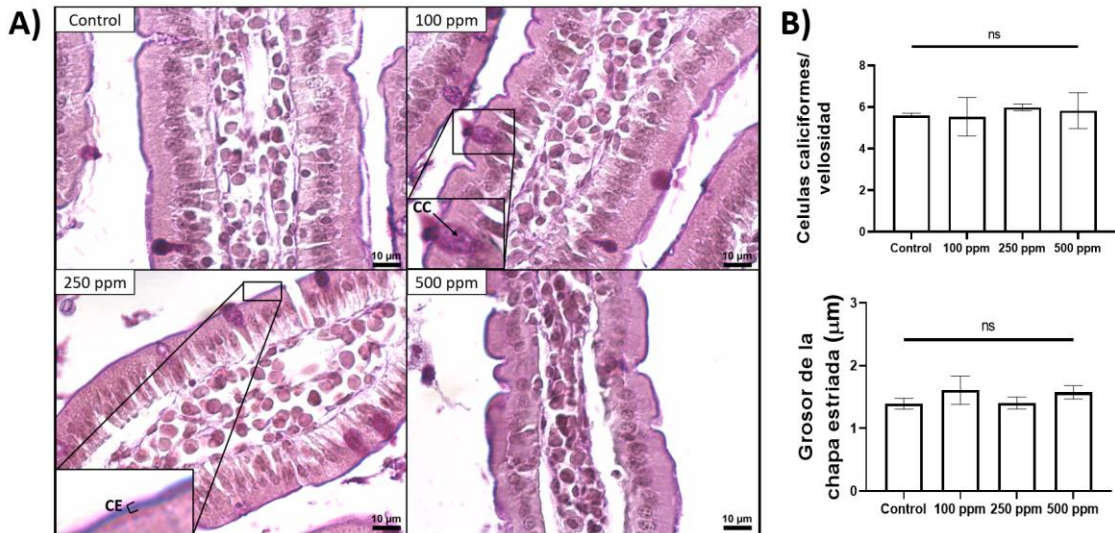


Figura 21. Las células caliciformes y la chapa estriada no se alteran en respuesta a la administración crónica de cobre. A) Micrografías representativas del duodeno teñidas con PAS. B) Análisis morfométrico de las células caliciformes y la chapa estriada en el intestino delgado.

6.4 Evaluación de la concentración de cobre en los principales órganos involucrados en su metabolismo

Una vez que determinamos los cambios morfológicos presentes en los órganos analizados, nos preguntamos si dichos cambios se debían directamente a la acumulación de cobre en ellos. Por lo que procedimos a cuantificar la concentración de cobre en hígado y riñón, órganos en los cuales se encontraron alteraciones morfológicas. Además, se incluyó al mesencéfalo en el análisis, ya que previamente observamos una disminución en las neuronas dopaminérgicas presentes en esta estructura [11]. Para ello, se utilizó la técnica de espectroscopía de absorción atómica con llama. Se observó un incremento en la acumulación de cobre en el hígado en los grupos tratados con este metal de manera dosis-dependiente con respecto al grupo control. A mayor concentración de cobre administrado, mayor fue la acumulación de este metal, existiendo una diferencia significativa entre el grupo tratado con 500 ppm con respecto al grupo control y el tratado con 100 ppm de cobre (Figura 22A). Con respecto al riñón, no se observó diferencia en los grupos tratados con cobre con respecto al control (Figura 22B). En el mesencéfalo, se observó un incremento en la acumulación de cobre en los grupos tratados con este metal con respecto

al grupo control, con excepción del grupo tratado con 500 ppm, el cual tuvo una concentración similar al grupo control (Figura 22C).

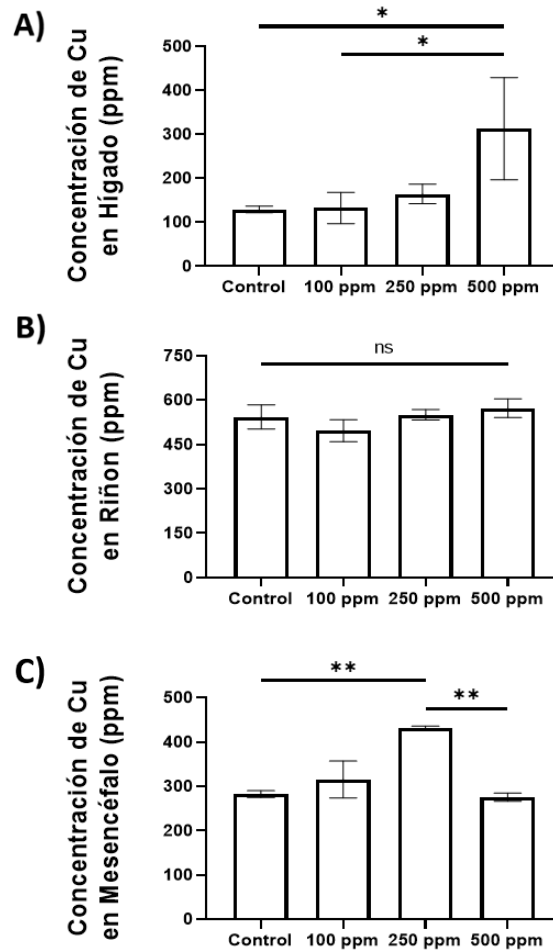


Figura 22. El cobre administrado de manera crónica se acumula en el hígado y en el mesencéfalo. Determinación de la concentración de cobre en A) hígado, B) riñón y C) mesencéfalo por espectroscopía de absorción atómica con llama.

6.5 Evaluación de la muerte celular inducida por cobre en los principales órganos involucrados en su metabolismo

Por último, determinamos si había presencia de muerte celular en aquellos órganos que presentaron alteraciones morfológicas. Para ello utilizamos el ensayo TUNEL, técnica que detecta la fragmentación del ADN, un indicador de muerte celular. En el hígado, observamos un incremento de las células positivas para el ensayo TUNEL en los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control (Figura 23A). Dicho efecto se presentó

de forma dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración de cobre administrado, mayor fue el número de células TUNEL positivas. Este resultado fue significativo entre los grupos tratados con 250 y 500 ppm de cobre con respecto al grupo control (Figura 23B).

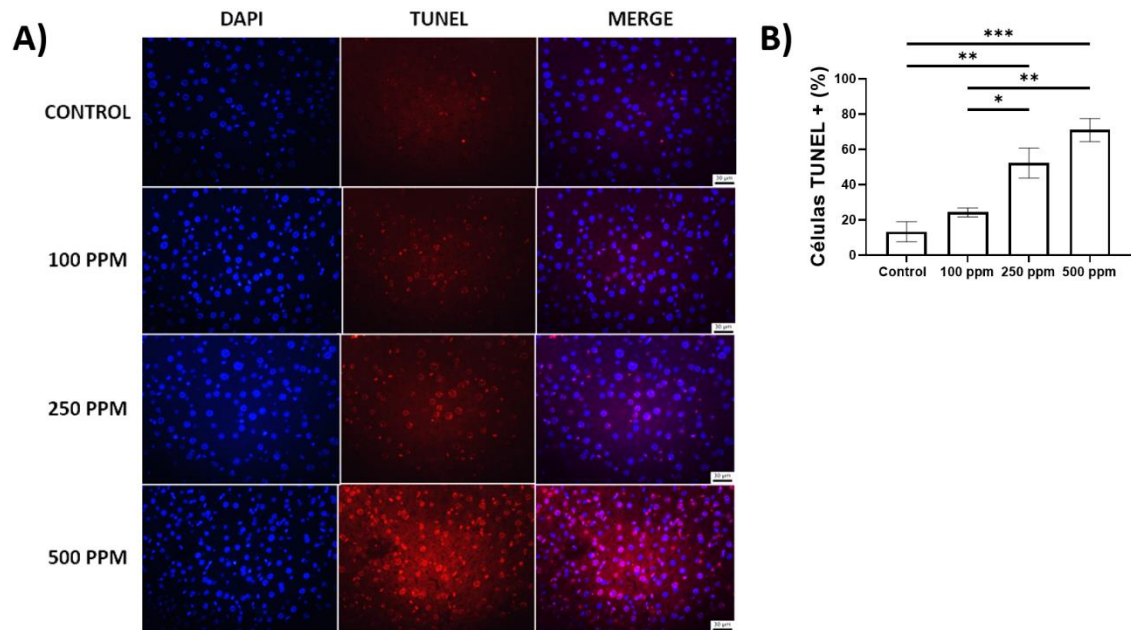


Figura 23. La exposición crónica al cobre induce fragmentación de ADN en el hígado. A) Imágenes representativas del ensayo TUNEL. Los núcleos se tiñeron con DAPI (señal azul), mientras que en rojo se muestra la positividad para el TUNEL. B) Análisis morfométrico del TUNEL.

En el riñón, también observamos un incremento de las células positivas para el ensayo TUNEL en respuesta al cobre comparado con el control, siendo un resultado dosis-dependiente (Figura 24A). A mayor concentración de cobre administrado, mayor fue el número de células TUNEL positivas, principalmente en los túbulos renales medulares. Este resultado fue significativo entre el grupo tratado con 500 ppm de cobre con respecto al grupo control (Figura 24B).

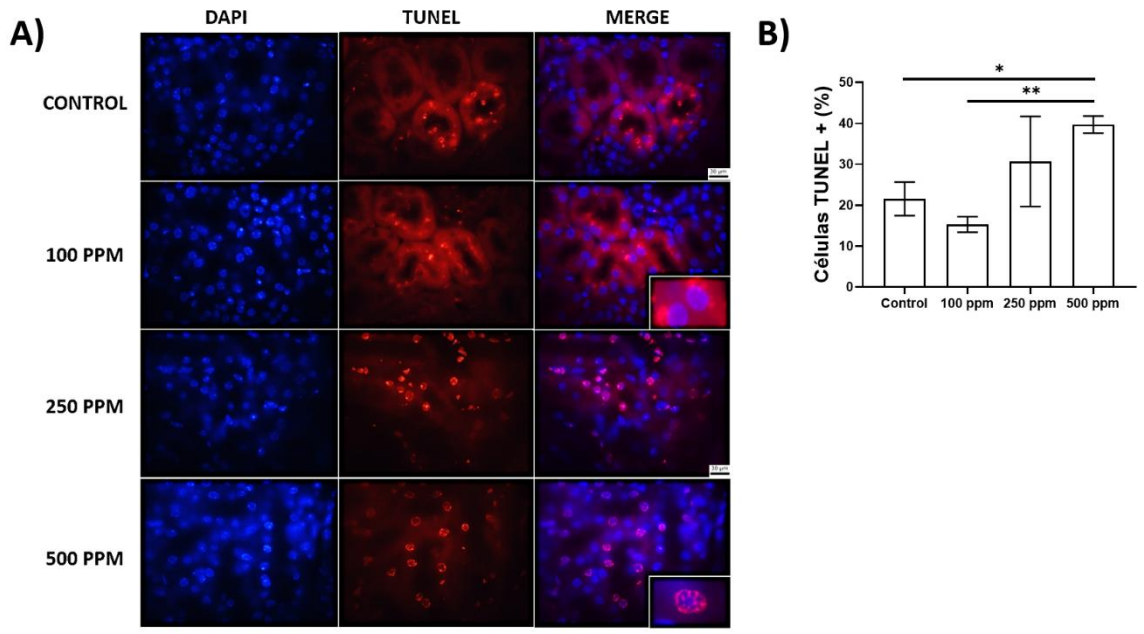


Figura 24. La exposición crónica al cobre induce fragmentación de ADN en los túbulos renales medulares. A) Imágenes representativas del ensayo TUNEL. Los núcleos se tiñeron con DAPI (señal azul), mientras que en rojo se muestra la positividad para el TUNEL. B) Análisis morfométrico del TUNEL.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

El cobre es un ion metálico esencial que participa en una amplia gama de procesos biológicos, actuando como cofactor en numerosos procesos enzimáticos. Los transportadores de cobre son responsables de su distribución a lo largo del cuerpo. Para mantener los niveles adecuados, el exceso de cobre es excretado eficientemente. No obstante, un desbalance intracelular de cobre puede provocar alteraciones significativas en la función de distintos tipos celulares, lo que resalta la importancia de su regulación homeostática [72].

La ingesta diaria recomendada de cobre varía según la edad y el género, pero en general, los adultos necesitan alrededor de 900 μg al día. Esta cantidad puede obtenerse a través de una dieta balanceada que incluya alimentos ricos en cobre, como mariscos, nueces, semillas y granos enteros [73]. Sin embargo, más allá de la ingesta dietética, las personas también están expuestas al cobre a través de diversas fuentes ambientales. La principal fuente de exposición ambiental al cobre es la contaminación del aire por metales pesados. La sobrecarga vehicular y las actividades industriales, como la minería y la fundición de cobre, pueden liberar partículas de cobre al aire, las cuales pueden ser inhaladas o depositarse en el suelo. Otra fuente de exposición ambiental significativa es el agua potable, especialmente en áreas con sistemas de distribución que utilizan tuberías de cobre. La corrosión de estas tuberías puede liberar cobre al agua, incrementando su concentración más allá de los niveles recomendados para consumo humano [74].

El objetivo de este estudio fue esclarecer el efecto de la exposición crónica a cobre en los órganos implicados en su metabolismo, para ello se utilizó un modelo murino que consistió en 4 grupos formados por un grupo control y tres grupos a los cuales se les administró cobre a diferentes dosis en el agua de beber *ad libitum*.

Se ha reportado que la esperanza de vida de los ratones disminuye cuando se exponen a 317 ppm de cobre durante 700 días [75], y que el hígado y el intestino se dañan cuando se exponen a 762 ppm durante 2 semanas [76]. Por lo tanto, establecimos 500 ppm como la concentración más alta de cobre, 250 ppm como una concentración intermedia y 100 ppm como la dosis más baja, asegurando así la viabilidad del modelo durante al menos 700 días.

Además, en este estudio, se emuló la interacción entre la exposición ambiental y el envejecimiento, sometiendo a los ratones a un tratamiento crónico con cobre en el agua potable durante 10 meses. Al finalizar el período experimental, se confirmó que nuestro modelo no afectó el peso corporal ni la supervivencia de los ratones. Sin embargo, se presentó una alteración en la función motora y cognitiva, que se evaluó por medio de una serie de pruebas. En la prueba de la marcha observamos una disminución en el largo de las pisadas, de manera dosis-dependiente de cobre. Con respecto al ancho de la pisada no se observó diferencia significativa. Sin embargo, observamos una tendencia, a ser más anchas en los grupos tratados con cobre que en el grupo control, lo cual evidencia una alteración en la coordinación motora de los ratones [77]. Este resultado se correlaciona con un estudio en el que se observó una disminución en la longitud de la pisada en un modelo de enfermedad de Parkinson, en comparación con el grupo control [78]. En la prueba de campo abierto se observó una disminución en la distancia recorrida y en el tiempo de exploración vertical, lo cual evidencia una disfunción motora y cognitiva [79]. Este resultado es consistente con un estudio realizado en un modelo genético de enfermedad de Wilson, que demostró una reducción en la distancia recorrida, en comparación con el grupo control [80]. En la prueba de construcción del nido, de transición luz-oscuridad y de la madriguera no se observaron cambios significativos en los ratones tratados con cobre con respecto al grupo control.

El cobre se almacena principalmente en el hígado, cuyo parénquima está compuesto por cordones de hepatocitos de una sola célula de espesor, separados por vasos sinusoidales a través de los cuales fluye la sangre desde la triada portal hasta la vena central. Dado que los hepatocitos participan en la detoxificación y eliminación de fármacos, toxinas y xenobióticos, estas células son propensas a sufrir daño y muerte celular. Una característica particular del hígado es la presencia de células binucleadas, lo que facilita una rápida división celular para compensar la pérdida de células dañadas con mayor rapidez [81]. En nuestro modelo, observamos una disminución en el número de hepatocitos binucleados en la zona centrolobulillar, siendo significativa entre el grupo de 500 ppm con respecto al grupo control. Estos resultados sugieren daño en dicha zona, en donde la disminución en el número de las células binucleadas podría deberse a su rápida división celular como mecanismo compensatorio a la toxicidad producida por el cobre. La sangre que llega al hígado desde la triada portal fluye primero a través de la zona periportal y luego hacia la zona centrolobulillar. A medida que la sangre fluye, el contenido de oxígeno y nutrientes disminuye, lo que deja a la zona centrolobulillar más vulnerable a la hipoxia y al estrés oxidativo provocado por la acumulación del cobre [82]. En cuanto al diámetro de los sinusoides, no se observó diferencia significativas en los ratones tratados con cobre con respecto al grupo control.

El riñón se encarga de la excreción de una parte del cobre, si bien no se conoce el efecto por el exceso de este metal en dicho órgano, se ha reportado que otros metales de transición como el cadmio inducen disfunción renal tubular y glomerular [83]. En nuestro modelo, no se observaron cambios histológicos inducidos por cobre en la corteza renal. Sin embargo, en la médula renal se encontraron depósitos de tejido adiposo. El área de estos depósitos se incrementó de manera dosis-dependiente de cobre. Se ha reportado, que con el envejecimiento el parénquima de los órganos con actividad endocrina tiende a sustituirse por tejido especializado, principalmente tejido adiposo [84], lo cual es consistente con nuestros resultados. Una de las características del estrés oxidativo es acelerar el envejecimiento. La disfunción mitocondrial es uno de los mecanismos que contribuyen al envejecimiento, ya que las mitocondrias son la principal fuente de ROS.

Durante el envejecimiento, disminuye la producción de ATP y aumenta la producción de ROS, junto con una reducción en las defensas antioxidantes. Los niveles elevados de ROS causan estrés oxidativo y daños en el ADN, las membranas de los orgánulos, los lípidos y las proteínas, contribuyendo al fenotipo del envejecimiento [85]. Entonces, puesto que el cobre induce la producción de ROS [86], sus efectos nocivos podrían reflejarse en la lesión del parénquima y su reemplazo por tejido adiposo.

Debido a que en el intestino delgado, principalmente en el duodeno, es en donde se absorbe el cobre, se realizó la evaluación morfológica y morfométrica, y no detectamos alteraciones, su histología se preservó en los grupos tratados con cobre similar al control.

Tras identificar los cambios morfológicos inducidos por la exposición crónica a cobre, nos preguntamos si estas alteraciones podrían estar directamente relacionadas con la acumulación de este metal en los órganos afectados. Para comprobar esta inferencia, utilizamos la técnica de espectroscopía de absorción atómica con llama para cuantificar la concentración de cobre en los tejidos que mostraron alteraciones morfológicas, específicamente en el hígado, riñón y mesencéfalo. Como resultado, en el hígado observamos un incremento en la concentración de cobre en los grupos tratados con este metal de manera dosis-dependiente en comparación con el grupo control. A mayor concentración de cobre administrado, mayor fue su concentración en el órgano. La acumulación de cobre en el hígado observada en nuestro modelo se correlaciona con lo observado en modelos animales de enfermedad de Wilson [87, 88]. El hígado es el principal órgano que almacena cobre, uniéndose a la proteína metalotioneína, cuya concentración se modula proporcionalmente a la concentración del cobre. Por lo que, al haber grandes cantidades del metal, habrá una mayor cantidad de esta proteína quelante [89] y podría ser un biomarcador a evaluar en nuestro modelo en el futuro. Por otro lado, en el riñón, no se observó diferencia entre los grupos tratados con cobre con respecto al grupo control, por lo que el daño histológico observado no se debe directamente a la acumulación de cobre en este. En el mesencéfalo, se observó un incremento en la concentración de cobre en los grupos tratados con este metal de manera dosis-dependiente

en comparación con el grupo control, con excepción del grupo tratado con 500 ppm de cobre, cuya concentración fue similar al grupo control. La captación de iones de cobre en las células es llevada a cabo por el transportador CTR1. Cuando los niveles extracelulares de cobre aumentan, las células previenen la acumulación excesiva al internalizar rápidamente el transportador por endocitosis [90]. Por lo que cuando la concentración de cobre de 500 ppm, que causa la mayor toxicidad y muerte de las neuronas dopaminérgicas, al reducir la densidad celular también reduce la acumulación del metal. Sin embargo, a 500 ppm se incrementa la población glial tanto en astrocitos como microglía, las cuales podrían endocitar los transportadores de cobre, evitando así su acumulación.

Finalmente, determinamos el efecto de la exposición crónica al cobre sobre la muerte celular en estos mismos órganos, utilizando el ensayo TUNEL, el cual nos permite identificar la presencia de fragmentación de ADN, un indicador de muerte celular. Tanto en el hígado como el riñón, se observó un aumento de las células positivas para el ensayo TUNEL, siendo un resultado dosis-dependiente, a mayor concentración de cobre administrado, mayor fue el número de células TUNEL positivas. Altas concentraciones de cobre inducen la formación de ROS, mediante la reacción de Fenton. Esto, conlleva a daño del ADN y muerte celular [91], lo cual concuerda con nuestros hallazgos, en donde la muerte celular fue directamente proporcional a la concentración de cobre.

Por lo tanto, el modelo de exposición crónica a cobre en combinación con el envejecimiento evaluado en este estudio nos permitió determinar el efecto de este metal en los órganos implicados en su metabolismo, con un enfoque principalmente a nivel histológico. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que realiza un análisis de este tipo, lo que puede proporcionar una base para evaluar posibles terapias futuras.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIÓN

La exposición crónica al cobre, en combinación con el envejecimiento, altera la función motora y cognitiva, la cual se relaciona con su acumulación en el mesencéfalo. Además, conduce a su acumulación en el hígado, provocando una disminución en las células binucleadas, específicamente en la zona centrolobulillar, y muerte celular. Asimismo, induce cambios morfológicos en el riñón, aumentando el depósito de tejido adiposo en la médula renal y la muerte celular. Por lo tanto, representa un modelo de enfermedad de Wilson no hereditaria, que facilitará la evaluación de terapias quelantes.

REFERENCIAS

1. Bulcke F, *et al.* Neurotoxicity of Copper. *Adv Neurobiol.* 2017;18:313-343.
2. Bandmann O, *et al.* Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol.* 2015 Jan;14(1):103-13.
3. *ToxFAQsTM: Cobre (Copper) / ToxFAQ / ATSDR.* (s. f.).
4. Reed E, Lutsenko S, Bandmann O. Animal models of Wilson disease. *J Neurochem.* 2018 Aug;146(4):356-373.
5. Gembillo G, Labbozzetta V, Giuffrida AE, Peritore L, Calabrese V, Spinella C, Stancanelli MR, Spallino E, Visconti L, Santoro D. Potential Role of Copper in Diabetes and Diabetic Kidney Disease. *Metabolites.* 2022 Dec 22;13(1):17.
6. Li Y. Copper homeostasis: Emerging target for cancer treatment. *IUBMB Life.* 2020 Sep;72(9):1900-1908. doi: 10.1002/iub.2341. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32599675.
7. Gromadzka G, Tarnacka B, Flaga A, Adamczyk A. Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases-Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 4;21(23):9259.
8. Schilsky ML. Liver transplantation for Wilson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 May;1315:45-9.
9. Jiayi H, Ziyuan T, Tianhua X, Mingyu Z, Yutong M, Jingyu W, Hongli Z, Li S. Copper homeostasis in chronic kidney disease and its crosstalk with ferroptosis. *Pharmacol Res.* 2024 Apr;202:107139.
10. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology.* 2011 May 10;283(2-3):65-87.
11. Gonzalez-Alcocer A, *et al.* Combined chronic copper exposure and aging lead to neurotoxicity in vivo. *Neurotoxicology.* 2023 Mar;95:181-192.
12. Mertz W. The essential trace elements. *Science.* 1981 Sep 18;213(4514):1332-8.
13. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother.* 2003 Nov;57(9):386-98.
14. *Office of Dietary Supplements - Cobre.* (s. f.). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-DatosEnEspanol/>

15. Öhrvik H, Thiele DJ. The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *J Trace Elem Med Biol.* 2015; 31:178-82.
16. Ohgami R, Campagna D, McDonald A, Fleming M, (2006) The Steap proteins are metalloreductases. *Blood* (2006) 108 (4): 1388–1394.
17. A. P. Ingle *et al.* (2018) *Biomedical Applications of Metals* 4: 95-108.
18. Chen L, Min J, Wang F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 Nov 23;7(1):378.
19. Chen, J., Jiang, Y., Shi, H. *et al.* The molecular mechanisms of copper metabolism and its roles in human diseases. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 472, 1415–1429 (2020).
20. Collins, J. F. (2020). Copper. En *Elsevier eBooks* (pp. 409-427).
21. Thirumoorthy N, Manisenthil Kumar KT, Shyam Sundar A, Panayappan L, Chatterjee M. Metallothionein: an overview. *World J Gastroenterol.* 2007 Feb 21;13(7):993-6.
22. Tümer Z, Møller LB. Enfermedad de Menkes. *Eur J Hum Genet.* mayo de 2010; 18(5):511-8.
23. Mulligan C, Bronstein JM. Wilson Disease: An Overview and Approach to Management. *Neurol Clin.* 2020 May;38(2):417-432.
24. Chen, L., Min, J., & Wang, F. (2022). Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 7(1).
25. Kaler, S. G., Goldstein, D. S., Holmes, C., Salerno, J. A. & Gahl, W. A. Plasma and cerebrospinal fluid neurochemical pattern in Menkes disease. *Ann. Neurol.* 33, 171–175 (1993).
26. Royce, P. M., Camakaris, J. y Danks, D. M. Reduced lysyl oxidase activity in skin fibroblasts from patients with Menkes' syndrome. *Biochem. J.* 192, 579–586 (1980).
27. Scheiber I, Dringen R, Mercer JF. Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions Life Sci.* 2013;13:359-87.
28. Czlonkowska, A. et al. Enfermedad de Wilson. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4 y 21 (2018).
29. Reyhani A, McKenzie TG, Fu Q, Qiao GG. Fenton-Chemistry-Mediated Radical Polymerization. *Macromol Rapid Commun.* 2019 Sep;40(18):e1900220.
30. Gu, M. et al. Oxidative-phosphorylation defects in liver of patients with Wilson's disease. *Lancet* 356, 469–474 (2000).
31. Huster, D. Structural and metabolic changes in *Atp7b*^{-/-} mouse liver and potential for new interventions in Wilson's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1315, 37–44 (2014).

32. Ge EJ, Bush AI, Casini A, Cobine PA, Cross JR, *et al.* Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nat Rev Cancer*. 2022 Feb;22(2):102-113.
33. Cui X, Wang Y, Liu H, Shi M, Wang J, Wang Y. The Molecular Mechanisms of Defective Copper Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Oct 4;2022:5418376.
34. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol*. 2015 Jan;14(1):103-13.
35. Eskici, G. & Axelsen, P. H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **51**, 6289–6311 (2012).
36. Guzior, N., Wieckowska, A., Panek, D. & Malawska, B. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **22**, 373–404 (2015).
37. Carlos, C. C., & Carlos, C. C. (s. f.). *Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer*.
38. Sarell CJ, Syme CD, Rigby SE, Viles JH. Copper (II) binding to amyloid-beta fibrils of Alzheimer's disease reveals a picomolar affinity: stoichiometry and coordination geometry are independent of Abeta oligomeric form. *Biochemistry*. 2009 May 26;48(20):4388-402.
39. Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Celmins DF, Heckman SM, Dick R. Copper and ceruloplasmin abnormalities in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 2010 Sep;25(6):490-7.
40. Squitti R, Simonelli I, Ventriglia M, Siotto M, Pasqualetti P, Rembach A, Doecke J, Bush AI. Meta-análisis de cobre sérico no ceruloplasmina en la enfermedad de Alzheimer. *J Alzheimers Dis*. 2014; 38(4):809-22.
41. Stoker TB, Mason SL, Greenland JC, Holden ST, Santini H, Barker RA. Huntington's disease: diagnosis and management. *Pract Neurol*. 2022 Feb;22(1):32-41.
42. Gonzalez-Usigli, H. A. (2022, February 8). *Huntington's Disease*. MSD Manual
43. Fox JH, Kama JA, Lieberman G, Chopra R, Dorsey K, Chopra V, Volitakis I, Cherny RA, Bush AI, Hersch S. Mechanisms of copper ion mediated Huntington's disease progression. *PLoS One*. 2007 Mar 28;2(3):e334.
44. Tallaksen-Greene SJ, Janiszewska A, Benton K, Hou G, Dick R, Brewer GJ, Albin RL. Evaluation of tetrathiomolybdate in the R6/2 model of Huntington disease. *Neurosci Lett*. 2009 Mar 6;452(1):60-2.

45. Castillo-Gonzalez JA, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. Phosphorylated α -Synuclein-Copper Complex Formation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2017;2017:9164754.
46. Simon DK, Tanner CM, Brundin P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clin Geriatr Med.* 2020 Feb;36(1):1-12.
47. Binolfi A, Rodriguez EE, Valensin D, D'Amelio N, Ippoliti E, *et al.* Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein. *Inorg Chem.* 2010 Nov 15;49(22):10668-79.
48. Okita Y, Rcom-H'cheo-Gauthier AN, Goulding M, Chung RS, Faller P, Pountney DL. Metallothionein, Copper and Alpha-Synuclein in Alpha-Synucleinopathies. *Front Neurosci.* 2017 Apr 4;11:114.
49. Castillo-Gonzalez JA, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H. Phosphorylated α -Synuclein-Copper Complex Formation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2017;2017:9164754.
50. Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet.* 1994 Aug;7(4):541-5.
51. Theophilos MB, Cox DW, Mercer JF. The toxic milk mouse is a murine model of Wilson disease. *Hum Mol Genet.* 1996 Oct;5(10):1619-24.
52. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, Gilliam CT, Lutsenko S. Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b*^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice. *Am J Pathol.* 2006 Feb;168(2):423-34.
53. Zischka H, Lichtmanegger J, Schmitt S, Jägemann N, Schulz S, Wartini D, Jennen L, Rust C, Larochette N, Galluzzi L, Chajes V, Bandow N, Gilles VS, DiSpirito AA, Esposito I, Goettlicher M, Summer KH, Kroemer G. Liver mitochondrial membrane crosslinking and destruction in a rat model of Wilson disease. *J Clin Invest.* 2011 Apr;121(4):1508-18.
54. Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology.* 1993 Jul;105(1):178-87.
55. Cheng C, Wang Q, Huang Y, Xue Q, Wang Y, Wu P, Liao F, Miao C. Gandouling inhibits hepatic fibrosis in Wilson's disease through Wnt-1/ β -catenin signaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 2023 Jul 15;311:116445.

56. Squitti R, Negrouk V, Perera M, Llabre MM, Ricordi C, Rongioletti MCA, Mendez AJ. Serum copper profile in patients with type 1 diabetes in comparison to other metals. *J Trace Elem Med Biol.* 2019 Dec;56:156-161.
57. Stancic A, Rasic-Milutinovic Z, Perunicic-Pekovic G, Buzadzic B, Korac A, Otasevic V, Jankovic A, Vucetic M, Korac B. Relation of CuZnSOD activity with renal insufficiency in hypertensive diabetic patients. *Indian J Biochem Biophys.* 2012 Apr;49(2):97-100. PMID: 22650006.
58. Fry RS, Ashwell MS, Lloyd KE, O'Nan AT, Flowers WL, Stewart KR, Spears JW. Amount and source of dietary copper affects small intestine morphology, duodenal lipid peroxidation, hepatic oxidative stress, and mRNA expression of hepatic copper regulatory proteins in weanling pigs. *J Anim Sci.* 2012 Sep;90(9):3112-9.
59. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013 Oct;4(4):303-6.
60. Kerschke L, Faldum A, Schmidt R. An improved one-sample log-rank test. *Stat Methods Med Res.* 2020 Oct;29(10):2814-2829.
61. Sugimoto H, Kawakami K. Low-cost Protocol of Footprint Analysis and Hanging Box Test for Mice Applied the Chronic Restraint Stress. *J Vis Exp.* 2019 Jan 23;(143).
62. Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J Vis Exp.* 2014 Sep 29;(91):51785.
63. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol.* 2003 Feb 28;463(1-3):55-65.
64. Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *J Vis Exp.* 2013 Dec 24;(82):51012.
65. Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc.* 2006;1(1):118-21.
66. Sampias, C., & Rolls, G. (s. f.). *Descripción general de la tinción con H&E: Una guía de mejores prácticas.*
67. Cáceres, F., Herrera, G., Fernández, A., Fernández, J., Martínez, R., Carvajal, D., & Haidar, Z. S. (2017). Utilidad de Tinción de Tricrómico de Masson en la Cuantificación

de Densidad Media Vascular en Mucosa Oral Normal, Displasia Epitelial y Carcinoma Oral de Células Escamosas. *International Journal Of Morphology*, 35(4), 1576-1581.

68. User, S. (s. f.). *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica - Utilidad de la tinción pas para el diagnóstico histopatológico*.

69. *CONTROL DE CALIDAD DE INSUMOS y DIETAS ACUICOLAS*. (s. f.).

70. *The TUNEL assay*. (s. f.). JoVE.

71. Gueutin V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Physiologie rénale [Renal physiology]. *Bull Cancer*. 2012 Mar 1;99(3):237-49. French.

72. Scheiber I, Dringen R, Mercer JF. Copper: effects of deficiency and overload. *Met Ions Life Sci*. 2013;13:359-87.

73. *Office of Dietary Supplements - Cobre*. (s. f.-b).

74. *Cobre (Copper) : CAS#: 7440-50-8*. (2004b, septiembre 1).

75. Massie HR, Aiello VR. Excessive intake of copper: influence on longevity and cadmium accumulation in mice. *Mech Ageing Dev*. 1984 Aug;26(2-3):195-203.

76. 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.

77. Fouda R, Argueta D, O'Daniel K, Peterson K, Sorto T, Gupta K. Assessment of gait in mice using simplified analysis tools. *Res Sq [Preprint]*. 2023 May 5:rs.3.pex-2191.

78. Wang XH, Lu G, Hu X, Tsang KS, Kwong WH, Wu FX, Meng HW, Jiang S, Liu SW, Ng HK, Poon WS. Quantitative assessment of gait and neurochemical correlation in a classical murine model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci*. 2012 Nov 14;13:142.

79. Viglicca NS, Molina SC, Peñalva MC. Multivariate study of the Open Field Drink Test using undernourished rats and desipramine as an antipanic drug. *Invest Clin*. 2007 Dec;48(4):495-508. Spanish.

80. Han Y, Dong J, Xu C, Rao R, Shu S, Li G, Cheng N, Wu Y, Yang H, Han Y, Zhong K. Application of 9.4T MRI in Wilson Disease Model TX Mice With Quantitative Susceptibility Mapping to Assess Copper Distribution. *Front Behav Neurosci*. 2020 Apr 22;14:59.

81. Pawlina, W. P. (2016). *Ross Histology a Text and Atlas* (7.^a ed.).

82. *Topic 6 Patho*. (s. f.). Toxicology MSDT.

83. Win-Thu M, Myint-Thein O, Win-Shwe TT, Mar O. Environmental cadmium exposure induces kidney tubular and glomerular dysfunction in the Myanmar adults. *J Toxicol Sci*. 2021;46(7):319-328.

84. Waterhouse JP, Chisholm DM, Winter RB, Patel M, Yale RS. Replacement of functional parenchymal cells by fat and connective tissue in human submandibular salivary glands: an age-related change. *J Oral Pathol.* 1973;2(1):16-27.
85. Maldonado E, Morales-Pison S, Urbina F, Solari A. Aging Hallmarks and the Role of Oxidative Stress. *Antioxidants (Basel).* 2023 Mar 6;12(3):651.
86. Yang F, Pei R, Zhang Z, Liao J, Yu W, Qiao N, Han Q, Li Y, Hu L, Guo J, Pan J, Tang Z. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2019 Feb;54:310-316. doi: 10.1016/j.tiv.2018.10.017. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30389602.
87. Lavrut PM, Guillaud O, Dumortier J, Mintz E, Brun V, Heissat S, Couchonnal Bedoya E, Lachaux A, Bost M, Hervieu V. Histological features of liver disease development in the *Atp7b^{-/-}* mouse: a model of Wilson's disease. *J Clin Pathol.* 2023 Nov 15:jcp-2023-209190.
88. Allen KJ, Buck NE, Cheah DM, Gazeas S, Bhathal P, Mercer JF. Chronological changes in tissue copper, zinc and iron in the toxic milk mouse and effects of copper loading. *Biometals.* 2006 Oct;19(5):555-64.
89. Luza SC, Speisky HC. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Am J Clin Nutr.* 1996 May;63(5):812S-20S.
90. Clifford RJ, Maryon EB, Kaplan JH. Dynamic internalization and recycling of a metal ion transporter: Cu homeostasis and CTR1, the human Cu⁺ uptake system. *J Cell Sci.* 2016 Apr 15;129(8):1711-21.
91. Chen Z, Li YY, Liu X. Copper homeostasis and copper-induced cell death : Novel targeting for intervention in the pathogenesis of vascular aging. *Biomed Pharmacother.* 2023 Dec 31;169:115839.



Q.C.B. DANIEL GARZA GUZMÁN

PERFIL

Químico Clínico Biólogo,
actualmente estudiante de
Maestría en Ciencias con
Orientación en Morfología en la
Facultad de Medicina U.A.N.L.

CONTACTO

Teléfono Celular:

87-3103-1350

Correo electrónico:

Personal:

daniel_garza95@yahoo.com

Institucional / Universitario:

daniel.garzagzm@uanl.edu.mx

Dirección:

Tulancingo #1408, Col. Mitras
Centro, Monterrey N.L.

LENGUAS

Español – Lengua natal

Inglés - Básico

EDUCACIÓN

Licenciatura: Químico Clínico Biólogo.

Facultad de Medicina UANL Monterrey Nuevo León.
Agosto 2017 – Junio 2022.

Maestría: Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología.

Facultad de Medicina UANL Monterrey Nuevo León.
Agosto 2022 – Julio 2024

EXPERIENCIA

Servicio social.

Unidad de Hígado, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.
Julio 2021 – Diciembre 2021.

Encargado de actividades como manejo de equipos de laboratorio, pruebas de función hepática, biometría hemática, examen general de orina, evaluación de control de calidad, manejo de animales de laboratorio y participación en distintos proyectos de investigación. Realización del proyecto de tesis de licenciatura titulado “Efecto hepatoprotector de la cafeína contra el daño por isquemia-reperusión en ratas Wistar”

Estancia de investigación.

Unidad de Hígado del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Enero 2022 – Junio 2022.

Realización del proyecto de tesis de licenciatura titulado “Efecto hepatoprotector de la cafeína contra el daño por isquemia-reperusión en ratas Wistar”

Congreso Nacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio.

Mayo 2022. Sede: En línea.

Participación en la modalidad cartel, siendo acreedor del primer lugar, con el proyecto titulado “Efecto hepatoprotector de la cafeína contra el daño por isquemia-reperusión en ratas Wistar”

Congreso Nacional de Hepatología Mérida 2022.

Julio 2022. Sede: Mérida, Yucatán.

Participación en la modalidad presentación oral con el proyecto titulado “Efecto hepatoprotector de la cafeína contra el daño por isquemia-reperusión en ratas Wistar”

23 Encuentro Estatal de Investigación en Salud.

Agosto 2023. Sede: Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS).

Participación como colaborador en el proyecto titulado “La metformina previene el neurodeterioro motor y cognitivo asociado al envejecimiento en un modelo in vivo”

Tercer Congreso Internacional de Futuros Investigadores en Biociencias.

Noviembre 2023. Sede: Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

Participación en la modalidad cartel con el proyecto titulado “La exposición crónica a cobre altera la médula renal”

Expo Científica CTR Edición 2024.

Mayo 2024. Sede: Pabellón M, Monterrey, N.L., México.

Participación en la modalidad cartel con el proyecto titulado “Efecto de la exposición crónica al cobre en un modelo animal”