



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA



**“DETERMINACIÓN DE METALOPROTEÍNAS
SÉRICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE
PARKINSON TRATADOS CON SUPLEMENTO DE
COBRE”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN FARMACIA**

PRESENTA:

DIRECTOR DE TESIS: DR. ANTONIO MONROY NOYOLA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MA. DE LOS ÁNGELES ARACELI DÍAZ RUÍZ

L.F. ANABEL FONSECA GONZÁLEZ

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO 2018



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suárez” (INNN), en colaboración con el Laboratorio de Neuroprotección y Análisis Clínicos, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la dirección del Dr. Antonio Monroy Noyola y la Dra. Ma. De los Ángeles Araceli Díaz Ruíz.

Durante la elaboración de esta tesis se contó con los fondos de los proyectos CONACYT a través del *Protocolo No. 117/14* y *SEP/CONACYT 257092* además de la *beca de maestría No. 741529*.

DEDICATORIA

A mi madre por siempre confiar en mis decisiones;

A mi esposo por siempre confiar en mí;

A mi hermana por su cariño infinito;

A Bren por el apoyo y ánimo que me inspira;

A mi Director de Tesis por su compromiso;

A la Dra. Mireya por su invaluable apoyo durante tiempos difíciles;

Al Dr. Sergio por el tiempo regalado;

A Dios por la oportunidad.

	ÍNDICE GENERAL	
	RESUMEN	I
	SUMMARY	II
	ÍNDICE DE FIGURAS	III
	ÍNDICE DE TABLAS	VI
	ABREVIATURAS	VII
1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	Marco Histórico de la Enfermedad de Parkinson (EP)	3
1.2	Epidemiología	3
1.3	Etiología de la EP	4
1.4	Fisiopatología	6
1.5	Síntomas Cardinales de la EP	7
1.5.1	Temblor en reposo	7
1.5.2	Bradicinesia	7
1.5.3	Rigidez	8
1.5.4	Inestabilidad Postural	8
1.6	Diagnóstico	9
1.6.1	Etapas en la Valoración Clínica	9
1.7	Síntomas motores	11
1.7.1	Criterios diagnósticos	11
1.7.2	Tratamiento	13
1.7.3	Complicaciones de la terapia farmacológica	14
1.8	Síntomas no motores	15
2	NEUROQUÍMICA DEL CEREBRO	
2.1	Especies Reactivas del Oxígeno (EROs)	18
2.2	Fuentes de EROs	18
2.2.1	Fuentes Exógenas	18

2.2.2	Fuentes Endógenas	19
2.3.	Equilibrio entre especies reactivas del Oxígeno y Antioxidantes	20
2.3.1	Antioxidantes Enzimáticos	21
2.3.2	Antioxidantes no Enzimáticos	23
2.4	Metales de Transición	24
2.5	Vínculo entre el Cobre y Hierro con la EP	25
3	ANTECEDENTES	
3.1	Biomarcadores en EP	27
3.1.1	Contenido de Glutati3n Reducido (GSH)	27
3.1.2	Actividad de Super3xido Dismutasa de Cobre y Zinc (Cu/ZnSOD)	28
3.1.3	Actividad Ferroxidasa de la Ceruloplasmina (Cp)	28
3.1.4	Cobre Total y Libre	28
3.2	Suplementaci3n con Cobre	29
4	JUSTIFICACI3N	32
5	HIP3TESIS	34
6	OBJETIVOS	36
7	MATERIAL Y M3TODOS	
7.1	Dise3o del estudio	38
7.2	Poblaci3n y muestra	38
7.2.1	Criterios de inclusi3n	39
7.2.2	Criterios de exclusi3n	40
7.3	Determinaci3n de la actividad ferroxidasa de la Cp	41
7.4	Actividad de Cu/ZnSOD	41
7.5	Determinaci3n de GSH y GSSG	42
7.6	Cobre total y cobre libre	42
7.7	Transaminasas ALT/ AST	43
7.8	Análisis estadístico	43

8	RESULTADOS	
8.1	Análisis comparativo de los biomarcadores en controles sanos vs niveles basales de pacientes con EP.	45
8.2	Análisis comparativo de las transaminasas hepáticas, albúmina y proteínas totales del grupo Control vs pacientes con EP	46
8.3	Resultados de grupo por número de visita	47
8.4	Nivel de Seguridad del suplemento	53
8.5	Resultados pacientes suplementados vs placebo	56
9	DISCUSIÓN	
9.1	Concentración plasmática de GSH/GSSG	63
9.2	Actividad de las enzimas dependientes de cobre	64
9.3	Concentración de cobre total y libre	65
9.4	Nivel de transaminasas hepáticas y estudios complementarios	65
10	CONCLUSIONES	68
11	PERSPECTIVAS	70
12	BIBLIOGRAFÍA	72
13	ANEXOS	81

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia después de la Enfermedad de Alzheimer, y sus síntomas cardinales característicos son el temblor, la lentitud al iniciar un movimiento, la rigidez y la inestabilidad postural también llamada falta de equilibrio. El origen de los síntomas de la EP se debe a una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas (70%), localizadas en la substantia nigra pars compacta asociada a una denervación dopaminérgica del estriado. En la actualidad, la terapia eficaz es el reemplazo dopaminérgico (Levodopa), y debido al uso continuo acaba perdiendo efectividad y generando discinesias como efecto secundario. Hasta el momento los tratamientos existentes están enfocados solo al alivio de los síntomas. En la búsqueda de un tratamiento neuroprotector eficaz se han realizado estudios que integran quelantes de hierro sin que estos tengan un efecto positivo en la progresión de la enfermedad; otros estudios se enfocan en utilizar un suplemento de sulfato de cobre como un activador de enzimas dependientes de este metal que permitan la disminución del estrés oxidante. Por esta razón y tomando en cuenta los estudios previos en animales donde el resultado fue satisfactorio en este estudio se administró a un grupo de pacientes con el suplemento de cobre y otro grupo con placebo y se compararon los resultados. Los métodos consistieron en determinar las concentraciones de antioxidantes como el glutatión reducido y oxidado además de obtener las actividades de las enzimas dependientes de cobre y a su vez monitorizar las concentraciones de cobre libre y total por medio de tres visitas a lo largo de un semestre. Nuestros resultados mostraron que la administración de un suplemento de sulfato de cobre no genera cambios sobre la concentración de GSH/GSSG, ni afecta de manera significativa la actividad de la enzima Cu/ZnSOD. Asimismo, la actividad de la ceruloplasmina se mantuvo inalterada. Por su parte, la concentración de cobre libre en el plasma de los pacientes, si mostró una disminución, a diferencia de los niveles de cobre total, los cuales no mostraron cambios significativos. El monitoreo continuo de los pacientes a través del análisis del perfil de funcionamiento hepático, demostró que todos sujetos permanecieron dentro de un rango normal. Es importante mencionar que los estudios clínicos son largos y costosos por lo que este estudio permite fortalecer a la investigación clínica y a su vez muestra una idea de que marcadores pueden agregarse a la investigación para de esta manera obtener resultados más concretos.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) has the second place of incidence among the neurodegenerative diseases, only after Alzheimer's disease. Its cardinal symptoms include tremor, bradykinesia, rigidity and postural instability. Motor expression of PD have their origin in the accelerated neuronal loss of dopaminergic neurons (70%), located within the *substantia nigra pars compacta* related to striatal dopaminergic denervation. The Levodopa administration is still considered as the mainstay treatment for PD. Nevertheless, its continuous use may exert undesirable secondary effects, which includes dyskinesia. Nowadays, most of the drugs often used are directed to alleviate Parkinson's disease symptoms, but they are unable to change the neuronal loss rate. Some studies have

Our results showed that copper sulfate administration had no effect, neither on the plasma antioxidants levels, nor on the Cu/ZnSOD activity. Moreover, its administration failed to increase the ferroxidase activity of ceruloplasmin of been conducted in order to achieve neuroprotection. These studies include the administration of iron chelators or the administration of copper sulfate pretreatment in mice exposed to PD experimental models. Since copper sulfate pretreatment demonstrated to be able to activate be able to exhibit a reduction on oxidative stress, we decided to design a double-blind controlled by placebo trial on patients with PD. Our results include the analysis of oxidative stress biomarkers as reduced and oxidized glutathione content, as well as the measurement of the activity of copper-dependent enzymes, in concomitance with the continuous monitoring of plasma levels of free copper and also compared with the total copper content, for the 3 consecutive visits of patients occurred within a 6 months period. Free copper but not total plasma levels of patients showed to be reduced. Total plasma levels for all patients showed to be unaltered. Besides, the continuous liver function profile assessment showed that all subjects were ranked within normal values. It is important to mention that the clinical studies are long and expensive. Our study provides relevant information that supports the idea of continue the study of biomarkers in order to obtain more concrete results.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Procesos relacionados con la Neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson (EP)	5
2	<i>Substantia nigra pars compacta</i> y la vía nigro estriatal	6
3	Camptocormia en un paciente con Parkinson	8
4	Esquema de la pirámide PARS (Parkinson's disease at risk síndrome/ Síndrome de riesgo en la enfermedad de Parkinson)	10
5	Estructura de la CuZnSOD	21
6	Ciclo de oxidación- reducción de GSH	22
7	Estructura de la ceruloplasmina	23
8	Reacción de Fenton	25
9	Contenido de cobre libre en enfermedades neurodegenerativas	29
10	Actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina en plasma	30
11	Concentración de glutatión reducido en pacientes con Parkinson	47
12	Concentración de glutatión oxidado en pacientes con Parkinson	48
13	Relación de GSH/ GSSG en pacientes con Parkinson	49
14	Actividad de Cu/ZnSOD en pacientes con EP	50
15	Actividad ferróxidasa de la Cp en plasma en pacientes con EP	51
16	Concentración de cobre total en plasma y sangre en pacientes con Parkinson	52
17	Cantidad de cobre libre en pacientes con Parkinson	52
18	Niveles de Alanino aminotransferasa en pacientes con Parkinson	54
19	Concentración de Aspartato aminotransferasa en pacientes con Parkinson	54

20	Concentración de Albúmina y Proteínas totales en pacientes con Parkinson	55
21	Suplementados vs Placebo GSH plasmático	56
22	Suplementados vs Placebo GSSG	57
23	Relación GSH/GSSG en Suplementados vs Placebo	57
24	Actividad Cu/Zn SOD en suplementados vs Placebo.	58
25	Actividad de la ceruloplasmina para Suplementados vs Placebo	59
26	Concentración de cobre total en plasma para suplementados vs Placebo	60
27	Concentración de cobre total en sangre para Suplementados vs Placebo	60
28	Cantidad de cobre libre para suplementados vs Placebo	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Prevalencia en Enfermedad de Parkinson por rango de edad	4
2	Resumen de los genes implicados en las formas hereditarias de EP	4
3	Criterios clínicos empleados por el Banco de Cerebros de la Sociedad Británica para el diagnóstico de la EP	12
4	Síntomas no motores de la Enfermedad de Parkinson	16
5	Clasificación de los antioxidantes de acuerdo con su mecanismo de acción	20
6	Biomarcadores del estado redox de pacientes con EP VS controles sanos	27
7	Características de los sujetos que participaron en este estudio	39
8	Biomarcadores en Parkinson inicial vs controles	45
9	Perfil hepático en pacientes vs controles sanos	46
10	Perfil hepático pacientes inicial vs controles sanos	45

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
EP	Enfermedad de Parkinson
ATP	Adenosin trifosfato
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
SNc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
NsT	Núcleo subtalámico
PET	Tomografía por emisión de positrones
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale/ Escala Unificada para la Enfermedad de Parkinson.
PDQ-39	Cuestionario de calidad de vida en enfermedad de Parkinson
COMT	Catecol-O- metiltransferasa
MAO B	Monoamino oxidasa tipo B
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GSH	Glutación reducido
GSSG.	Glutación oxidado
GR	Glutación reductasa
SOD1	Superóxido dismutasa dependiente de Cu/Zn
Cp	Ceruloplasmina
ALT	Alanino-aminotransferasa
AST	Aspartato-aminotransferasa
GPx	Glutación peroxidasa
CAT	Catalasa
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LCR	Líquido cefalorraquídeo

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético
UV-VIS Ultravioleta-visible

*Mientras el cerebro sea un misterio,
El universo continuará siendo un misterio.*

SANTIAGO RAMON Y CAJAL

1. Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento reconocido principalmente por cuatro síntomas cardinales; el temblor en reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural. Esta enfermedad es progresiva y afecta la capacidad motriz mediante la degeneración irreversible de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la *sustancia nigra pars compacta* que a su vez manda proyecciones al cuerpo estriado dando como resultado una disminución en la concentración de dopamina en esta región. En la actualidad no existe cura ni algún tratamiento capaz de cerebral detener la pérdida acelerada de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Sin embargo, existen diversos estudios orientados a obtener una respuesta neuroprotectora, a través del tratamiento con nuevas formulaciones. Se considera actualmente como una enfermedad multifactorial que involucra la participación de diversos procesos entre los que se destacan excitotoxicidad, apoptosis, radicales libres, daño mitocondrial y uno o todos desencadenan la muerte neuronal. Durante muchos años de investigación se ha buscado relacionar parámetros bioquímicos con la progresión y efecto de posibles tratamientos neuroprotectores, sin que hasta el momento se tengan un resultado concluyente, por lo que en nuestro estudio clínico se realiza la medición de algunos parámetros en plasma antes y durante la administración de un suplemento de cobre. El cobre es propuesto en esta investigación como un neuroprotector debido a evidencias que lo relacionan como un cofactor metálico de enzimas que favorecen la reducción de ROS, además de la alteración en el transporte de este metal. La EP como muchas enfermedades se presenta con mayor incidencia en la edad avanzada y este metal en las regiones cerebrales antes mencionadas (ganglios basales) esta disminuido y es la región de deterioro de dicha enfermedad. El elemento metálico principal es este estudio, está relacionado con la concentración del hierro y coexisten en un delicado equilibrio y bajo condiciones patológicas se presenta un desequilibrio antioxidante en las enzimas dependientes de cobre como la Cu/ZnSOD y también se puede reflejar indirectamente en los antioxidantes glutatión oxidado y reducido. Por lo que la evaluación de evaluación de la capacidad de neuroprotección fue determinada mediante el análisis del estado oxidativo y la concentración de cobre en el plasma de los pacientes.

1.1 Marco histórico de la Enfermedad de Parkinson (EP)

El primero en describir esta enfermedad fue el médico James Parkinson en su documento *“Un ensayo sobre la parálisis agitante”* en el año de 1817, pero no fue hasta finales del siglo XIX que Jean-Martin Charcot la denominó Enfermedad de Parkinson (Goetz, 1986). Más tarde, en 1919, Konstantin Tretiakoff publicó la relación de la enfermedad con inclusiones a las que llamó *“Cuerpos de Lewy”*. Y en 1950, Arvid Carlsson y O. Hornykewicz reportaron por primera vez que una disminución en las concentraciones de dopamina era la **causa** de la enfermedad (Goedert, Spillantini, et al, 2012).

1.2 Epidemiología

La enfermedad de Parkinson es considerada a nivel mundial como el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (Balderas, Moreno, et al, 2013). Se estima que un millón de personas en Estados Unidos son afectadas: 0.3% en la población general y 3% en los individuos entre 65-90 años de edad (Casamitjana et al., 2007). En países desarrollados se busca relacionar las cifras epidemiológicas de la EP con los posibles factores de riesgo, un metaanálisis realizado en el año 2014 (tabla1) encontró que este padecimiento aumenta su prevalencia con la edad y que la región geográfica en donde más se presenta es Europa, Norte América y Australia, además es más común en hombres en una proporción de 134 por 100.000 en relación a las mujeres con una proporción de 41 por 100.000 (Pringsheim, Jette, et al, 2014). Por otro lado, en México esta patología se encuentra entre las causas de mortalidad de adultos mayores a 65 años (DGIS, 2010). Su incidencia es de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes/ año; afecta al 1% de la población mayor de 65 años. Sin embargo, existen también formas juveniles en las que los síntomas se presentan antes de los 50 años. Según el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velazco Suarez” es la cuarta causa de consulta y se tiene considerado que en dos décadas se duplique el número de incidencias, lo que conlleva a un problema de salud pública a futuro (CENETEC., 2010). En México la prevalencia es aproximadamente de 100 a 300 por 100 mil habitantes y una incidencia de 10.7 por 100 mil habitantes (Estrada-Bellmann, et al, 2011).

Tabla 1. Prevalencia en Enfermedad de Parkinson por rango de edad (Pringsheim et al., 2014)

GRUPOS DE EDAD	TODOS LOS ESTUDIOS	ESTUDIOS CON CALIDAD 7+	ESTUDIOS CON CALIDAD <7
40-49	41	No es posible el estudio	No es posible el estudio
50-59	107	156	82
55-64	173	220	99
60-69	428	503	383
65-74	425	572	317
70-79	1807	1277	980
80+	1903	2498	1607
En general	315	571	251

1.3 Etiología de la EP

La causa de la Enfermedad de Parkinson es desconocida, pero se considera una enfermedad multifactorial e involucra factores genéticos y ambientales. Por un lado se producen alteraciones genéticas que siguen un modelo de herencia Mendeliano, en el que, se han identificado mutaciones en diferentes genes; entre los genes mutados se encuentra α -sinucleína, cuya función está involucrada en el almacenamiento y en la compartimentación de neurotransmisores, así como en el reciclaje de vesículas sinápticas (Tatton et al., 2003). En la Tabla 2 se incluye una lista de los genes implicados en la enfermedad y cuya función está ligada en todos los casos al metabolismo de las neuronas dopaminérgicas.

Tabla 2. Resumen de los genes implicados en las formas hereditarias de EP

LOCUS	GEN	PATRÓN DE HERENCIA
Park 1 y Park 4	α Sinucleína	Dominante
Park 2	Parkina	Recesivo
Park 3	Desconocido	Dominante
Park 5	UCHL-1	Dominante
Park 6	PINK-1	Recesivo
Park 7	DJ-1	Recesivo
Park 8	LRRK2	Dominante
Park 9	Desconocido	Recesivo

En cuanto a la hipótesis ambiental, esta patología está relacionada con la exposición a toxinas dopaminérgicas. Esta teoría sienta sus bases en el hallazgo de la neurotoxina MPTP (*1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina*) y que actualmente es considerada como el mejor modelo bioquímico de la enfermedad (Langston et al,1983). Otra vía de toxicidad a través de una molécula endógena podría relacionarse con el metabolismo de la dopamina que genera metabolitos neurotóxicos como: 6-Hidroxidopamina (6-OHDA), Tetrahidroisoquinolina (THIQ) y neuromelanina. (Cohen, 1984; Hare and Double, 2016). Por su parte, la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, podría ser causa de la sobreproducción de EROs (Nicklas et al , 1987).

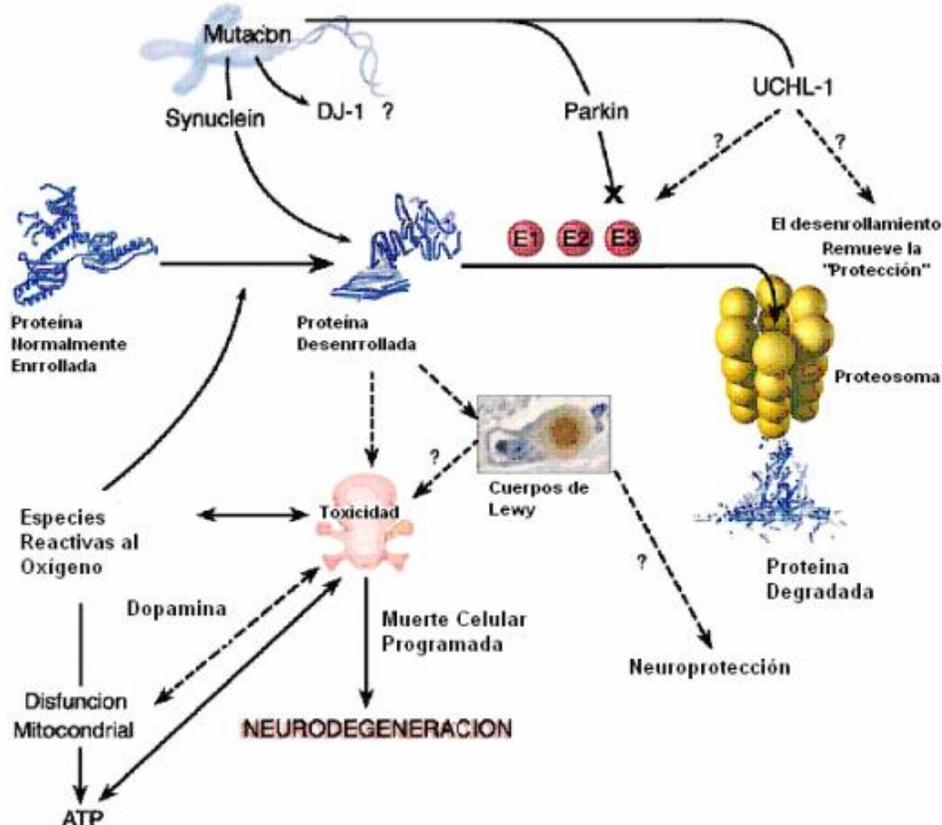


Figura 1: Procesos relacionados con la Neurodegeneración en la Enfermedad de Parkinson. Mientras que el daño oxidante y la disfunción mitocondrial son considerados como mecanismos que participan, se ha sugerido que la acumulación de proteínas “mal plegadas” ó “truncadas” podrían jugar un papel clave en la neurodegeneración, aunque aún no es posible determinar con precisión el mecanismo desencadenante. Las mutaciones patogénicas pueden inducir directamente conformaciones anormales de proteínas, como el caso específico de la alfa-sinucleína, dañando tanto a la maquinaria celular empleada para marcar las proteínas defectuosas como alterando las vías de degradación de las mismas (proteosoma) (Dauer and Przedborski, 2003).

1.4 Fisiopatología

Las manifestaciones clínicas se presentan cuando ha muerto el 70% de las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta* lo que provoca una disminución del 70 al 90% de la dopamina estriatal (Dauer-Przedborski, 2003). Las neuronas nigrales se localizan en el mesencéfalo. Esta estructura consta de dos porciones, una posterior y de apariencia oscura, compuesta por gran cantidad de neuronas con melanina (*pars compacta*) y otra anterior, más clara, con muchas menos neuronas y que posee alto contenido de mielina (*pars reticulata*). En la EP se produce la muerte acelerada de las neuronas dopaminérgicas de la zona *pars compacta*, que inervan sobre todo al estriado (núcleo caudado y putamen) y que forman en conjunto la vía nigroestriatal (figura 2). Las neuronas sobrevivientes contienen una acumulación de material en su interior formado por agregados proteicos insolubles que reciben el nombre de cuerpos de Lewy (Jankovic, 2008). Existe un equilibrio entre los niveles de dopamina; encargada de generar de manera precisa y modulada la ejecución de los movimientos finos, y la acetilcolina que coordina y provee a los músculos de la capacidad de contracción necesaria para realizar los demás movimientos. Este desbalance se ve reflejado mediante la hipercinesia característica del Parkinson (temblor de reposo).

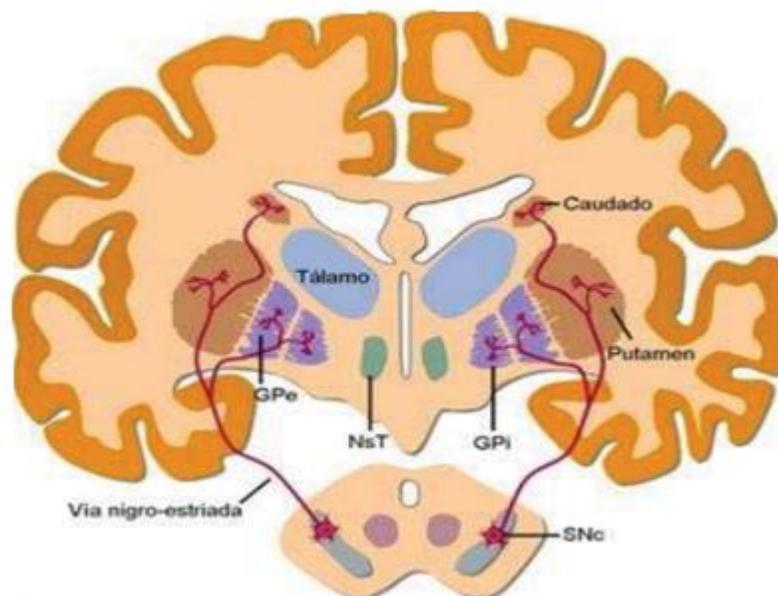


Figura 2. *Substantia nigra pars compacta* y la vía nigro estriatal: GPe: Globo pálido externo; GPi: Globo pálido interno; NsT: Núcleo subtalámico; SNc: *Substantia nigra pars compacta*.

1.5 Síntomas cardinales de la EP.

Desde su primera descripción, James Parkinson denotó los síntomas cardinales característicos de la enfermedad y estos se mantienen en la actualidad; temblor en reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural (Parkinson J, Sherwood Neely, 1817).

1.5.1 Temblor de Reposo

El temblor en reposo es el síntoma más común y fácil de reconocer en este tipo de pacientes, inicialmente se presenta unilateral y con la progresión se puede hacer bilateral se observa en los miembros distales (manos) y también acontece en los labios, mentón, mandíbula y piernas. Se denomina de reposo ya que desaparece una vez que se inicia una acción y durante el sueño (Shulman, Singer et al, 1996). Generalmente puede confundirse con un temblor esencial no obstante la evidencia indica que este puede ser un factor de riesgo para padecer EP (Jiménez-Jiménez et al, 2012). En un estudio Hughes y colaboradores informó que el 69% de los pacientes expuso el temblor al inicio de la enfermedad y que el 75% de los pacientes obtuvo el temblor en el transcurso de esta; el 9% perdió el temblor en la fase final y solo el 11% nunca lo ha presentado (Martin, Loewenson et al, 1973).

1.5.2 Bradicinesia

Se refiere a la lentitud para ejecutar los movimientos. Es un indicador distintivo de trastorno en los ganglios basales, aunque no es considerada como privativa del Parkinson (Giovannoni et al, 1999). Se identifica por la dificultad para iniciar y ejecutar un movimiento, realizar tareas simultáneas y secuenciales; como caminar. En ocasiones puede impedir tareas que requieran control de motor fino, lo que impedirá al paciente realizar actividades de la vida cotidiana como: abotonarse la camisa o el uso de utensilios para su alimentación. Otras de las manifestaciones de la bradicinesia incluyen la pérdida de movimientos espontáneos y gestos; puede depender de estado de ánimo. (Francois, Vingerhoets et al, 1997).

1.5.3 Rigidez

Es caracterizada por un incremento de la resistencia, se acompaña del fenómeno de “*Rueda Dentada*” asociado al temblor, se exagera al caminar y se alivia al sentarse (Azher-Jankovic, 2005). La camptocormia está referida en la Enfermedad de Parkinson principalmente pero también puede presentarse en otras patologías que incluyen: distonías y miopatía del tronco extensor; la deformidad se determina por una postura anormal de inclinación del tronco, principalmente cuando se está de pie o sentado (Melamed, Djaldetti, 2006).

1.5.4 Inestabilidad Postural

La inestabilidad postural es la pérdida de reflejos posturales y generalmente suele manifestarse durante las etapas más tardías de la enfermedad. Se considera la causa principal de caídas en estos pacientes y contribuye al riesgo de fractura de cadera (Williams et al, 2006). En un estudio se identificó, que el tiempo promedio desde los síntomas iniciales a la primera caída fue de 108 meses en pacientes con EP en relación con otras patologías. Otros factores que influyen en la aparición de la inestabilidad incluyen a: la hipertensión ortostática, los cambios sensitivos relacionados con la edad y la integración de los estímulos visuales, vestibulares y propioceptivos (Bloem, 1992). Un estudio posterior reveló que el 38% de los evaluados experimentaron caídas y el 13% cayó más de una vez a la semana. Como se esperaba, la frecuencia de caídas se correlacionó directamente con la gravedad de los síntomas (Koller, Glatt et al, 1989).Figura 3.



Figura 3. Camptocormia en un paciente con Parkinson (Jankovic, 2008)

1.6 Diagnóstico

Hasta el momento, el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson se basa en la exploración clínica pues no se cuenta con marcadores biológicos o exámenes de gabinete que la establezcan *in vivo*; existe un gran número de escalas usadas para evaluar el deterioro motor, no motor y la discapacidad de los pacientes con Parkinson, aunque la mayoría no se han evaluado en la fiabilidad y validez. En estadios tempranos el diagnóstico es difícil y se ha descrito que existe un margen de error del 5-10% , por lo que para el diagnóstico definitivo de enfermedad de Parkinson se requiere la existencia de uno o más de los síntomas cardinales previamente descritos, la respuesta a la administración de levodopa de al menos una dosis diaria de 1 g durante el transcurso de un mes y que esta produzca un marcado grado de mejoría clínica de por lo menos 30% en la escala unificada de la enfermedad de Parkinson modificada(UPDRS), y la duración de la mejoría debe ser de un año o más. Los estudios de neuroimagen no confirman el diagnóstico clínico, sin embargo permiten diferenciar de otras patologías, por ejemplo la TAC (tomografía computarizada) es útil para identificar hidrocefalia normotensa o lesiones vasculares. La IRM (imagen por resonancia magnética) en campo alto ha resultado común para estudiar a los pacientes con Parkinson ya que es posible detectar alteraciones en la *Substantia nigra* y *pars reticulata*, además se pueden observar depósitos de hierro en estas estructuras. El PET (tomografía por emisión de positrones) utilizando fluorodopa ayuda a determinar la captación de esta en los ganglios basales y aun que es un estudio más preciso su costo impide que sea realizado a todos los pacientes con sospecha de la enfermedad (Estrada-Bellmann et al, 2011).

1.6.1 Etapas en la Valoración Clínica

Existen escalas especializadas dedicadas a valorar a pacientes con sospecha de padecer la enfermedad de Parkinson y su uso se limita a hacer el diagnóstico previo a la presentación de los síntomas motores. Este modelo se utiliza para tener una mejor comprensión de como desplegar la tecnología de diagnóstico de manera más eficiente, y fundamentalmente en el desarrollo de tratamientos que modifican el curso de la enfermedad y que serán más eficaces cuando su uso se inicia en etapas tempranas. La pirámide PARS (Parkinson's disease at risk síndrome/ Síndrome de riesgo en la enfermedad de Parkinson) representa las cuatro etapas que preceden a la EP clínicamente manifiesta (Figura 4). Este modelo refiere que hay un gran número de individuos que tienen una predisposición a

desarrollarla, pero solo una fracción de progreso en cada nivel sucesivo, es decir el número de individuos que la desarrollan clínicamente es una pequeña fracción del grupo de riesgo.

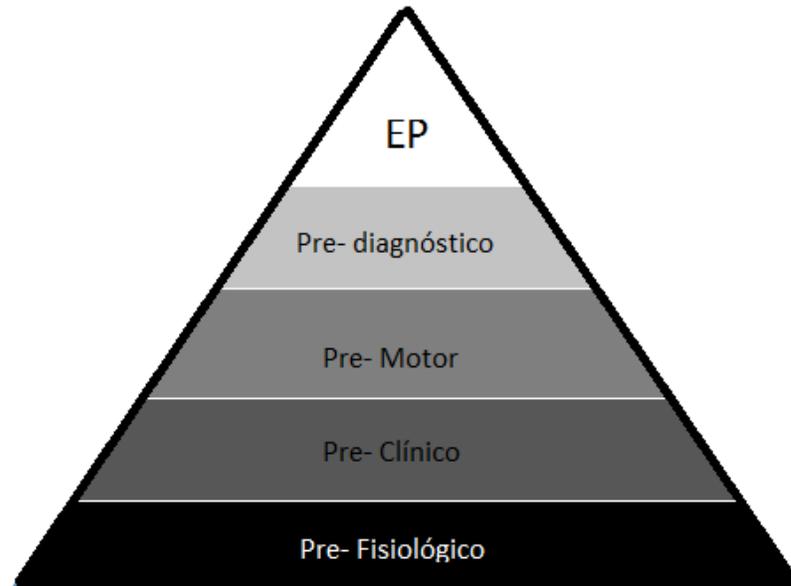


Figura 4. Esquema de la pirámide PARS (Parkinson's disease at risk síndrome/ Síndrome de riesgo en la enfermedad de Parkinson) (Siderowf & Lang, 2012).

a) Pre-Fisiológica: En esta fase los pacientes no tienen evidencia de padecer Parkinson, pero poseen una característica, como una mutación genética que le confiere un alto riesgo a desarrollarla en el futuro. El riesgo impartido dependerá del gen implicado, incluso individuos con cierto historial de exposición ambiental como plaguicidas (Lücking et al., 2000).

b) Pre-Clínica: Se refiere a cambios fisiológicos detectados usando biomarcadores en ausencia de cualquier característica clínica en pruebas de neuroimagen (18F-DOPA; PET).

c) Pre- Motor: Los pacientes en esta fase tienen síntomas no motores que son características clínicas reconocibles como: la disminución del sentido del olfato, depresión, síntomas neuropsiquiátricos, y del sueño, que a menudo preceden a los síntomas motores. Aunque estas características no son universales están presentes en diferentes grados en la mayoría de los pacientes con EP (Müller et al , 2002).

d) Pre-Diagnóstica: En esta fase se presentan los síntomas clásicos de la EP y características clínicas, pero no cumplen con los criterios diagnóstico; hay un deterioro cognitivo leve, que no necesariamente correlaciona para esta patología. En la actualidad se utiliza como biomarcador la determinación de transportadores de dopamina y si existe deficiencia en estos se pasa a la confirmación de la enfermedad (Hughes et al, 1992). La prueba de respuesta a levodopa es un examen clínico que se basa en el suministro de medicamentos dopaminérgicos para evaluar la respuesta que tienen en aquellos pacientes que presentan problemas motores, y forma parte de los estudios de diagnóstico que se utilizan para evaluar la posibilidad de parálisis supranuclear progresiva, es decir ayuda en el diagnóstico diferencial respecto a la enfermedad de Parkinson, en la que la respuesta a la levodopa suele ser más alta (Seiffert Czernek et al, 2017).

1.7 Síntomas Motores

1.7.1 Criterios Diagnósticos

El diagnóstico diferencial de la EP idiopático, considera descartar la presencia de cualquiera de los otros tres tipos de síndrome Parkinsónico: el parkinsonismo secundario o adquirido, el parkinsonismo heredo-degenerativo y síndrome multisistemas (parkinsonismo y demás síndromes) (Gelb et al, 1999). Existen diversos criterios dirigidos a distinguirlos. Dichos criterios fueron creados por el Banco de Cerebros de la Sociedad Británica de Estudio de la EP (Parkinson's Disease Society Brain Bank (UKPDSBB), considerada con un porcentaje del 90% de certeza diagnóstica (tabla 3).

Tabla 3. Criterios clínicos empleados por el Banco de Cerebros de la Sociedad Británica para el diagnóstico de la EP.

Paso 1. Diagnóstico de Parkinsonismo
Bradicinesia: al menos uno de los síntomas clínicos cardinales: <ul style="list-style-type: none"> - Rigidez - Temblor de reposo 4-6 Hz - Inestabilidad postural
Paso 2. Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> - Evolución no progresiva - Lesiones encefálicas por traumatismos <ul style="list-style-type: none"> - Encefalitis - Regresión de los síntomas - Toma de neurolépticos u otros fármacos similares <ul style="list-style-type: none"> - Crisis Oculógiras - Parálisis supranucleares - Estrictamente unilateral - Signos cerebelosos
Paso 3. Al menos 3 de los siguientes criterios de apoyo de carácter prospectivo
<ul style="list-style-type: none"> - Inicio unilateral - Asimetría persistente afectando más el lado inicial <ul style="list-style-type: none"> - Enfermedad progresiva - Excelente respuesta a levodopa (70-100%) <ul style="list-style-type: none"> - Discinesias graves por levodoterapia - Respuesta a levodopa mantenida durante más de 5 años - Cuadro clínico de por lo menos 10 años de evolución

A pesar de la precisión diagnóstica de la aplicación de dichos criterios, es considerado aún como indispensable la confirmación del diagnóstico a través de la autopsia (Visanji, Marras, 2015). Una vez diagnosticada la enfermedad, existen diferentes escalas de evaluación dirigidas hacia la obtención de características que permitan determinar el avance y /o gravedad de los síntomas que caracterizan a una enfermedad. Esto permitirá establecer de manera fehaciente el potencial de los tratamientos administrados a un paciente. Entre las escalas más frecuentemente utilizadas se encuentran: La escala de Hoehn y Yahr, la escala de actividades de la vida diaria de Schwab & England, la escala unificada para la evaluación de enfermedad de Parkinson (Unified Parkinson's Disease Rating Scale; UPDRS), así como el cuestionario de calidad de vida en la EP (PDQ-39) (Rodríguez-Violante et al, 2014).

1.7.2 Tratamiento de la EP.

El tratamiento de elección para la EP se basa en la administración de levodopa/carbidopa (Sinemet), dirigido a compensar la drástica disminución en el contenido de dopamina estriatal. Asimismo, el árbol de decisión del tratamiento farmacológico de la EP incluye la administración de agonistas dopaminérgicos, inhibidores de la enzima Monoaminoxidasa (MAO B) principalmente, así como inhibidores de la COMT. La Levodopa es capaz de atravesar la BHE pero para asegurar que no sea metabolizada a nivel periférico por la enzima dopamina decarboxilasa o la catecol-O- metiltransferasa (COMT) (Tarsy, 2006), suele administrarse en combinaciones que faciliten y aseguren su llegada al cerebro. El principal inconveniente del uso prolongado de la Levodopa radica en el desarrollo de complicaciones motoras, como las discinesias. En cuanto a los agonistas dopaminérgicos, éstos suelen ser indicados durante las primeras fases de la enfermedad, de manera concomitante con la administración de iMAOs, y se encuentran dirigidos a controlar la rigidez y la bradicinesia. Los agonistas dopaminérgicos estimulan directamente a los receptores dopaminérgicos, independientemente de la concentración de dopamina presináptica y tienen una vida media más larga que la levodopa (Levine et al., 2003). Se ha comprobado que el uso en monoterapia de los agonistas dopaminérgicos, frente a la levodopa, reduce el riesgo de desarrollo de complicaciones motoras y discinesias, a expensas de peores resultados en la mejoría de las funciones motoras (Miyasaki et al, 2002). Sin embargo, su monoterapia es considerada útil durante los estadios iniciales con la finalidad de retrasar el momento de usar la terapia con levodopa. Otros fármacos comúnmente recetados son los anticolinérgicos, dirigidos para mejorar el temblor de reposo y la rigidez de los pacientes con EP (Goetz et al, 2005); al regular los niveles de acetilcolina, éstos suelen tener efectos positivos sobre la cognición de los pacientes. Finalmente, los inhibidores de la COMT (catecol-O-metiltransferasa) y la MAO B (monoamino oxidasa B), aumentan la biodisponibilidad y la vida media de la levodopa. Están indicados en el tratamiento de la EP avanzada en combinación con la Levodopa, lo que permite reducir la dosis administrada de levodopa para controlar la presencia de sus principales síntomas motores como la Amantadina (Levine et al., 2003). Reportes previos aseguran que su administración aumenta la vida media de la Levodopa hasta en un 75%, sin aumentar los “pico de dosis”, manteniendo unos niveles de fármaco más estables, lo que permite una reducción de la dosis diaria de un 30% a un 50% (Tarsy, 2006).

De manera alternativa, aquellos pacientes que no responden al tratamiento farmacológico convencional, sufren de intervenciones neuroquirúrgicas. Algunas de ellas se basan en la

inserción de electrodos de estimulación, frecuentemente en el núcleo subtalámico y, en menor medida, en el pálido. Al igual que el tratamiento farmacológico, la estimulación cerebral profunda parece reducir significativamente los síntomas motores (Figueiras-Méndez et al, 2009). Otras aún más invasivas van dirigidas a la resección del tejido palidal cuyo propósito es lesionar la vía indirecta del circuito motor. (Cahan et al, 2018; Olanow , 2002).

1.7.3 Complicaciones Motoras del tratamiento farmacológico: Discinesia tardía.

Las discinesias son movimientos involuntarios anormales particularmente en cara y cuello, ante situaciones de estrés o durante la ejecución de tareas manipulativas finas. Como antes mencionamos, la levodopa es el fármaco de elección en el tratamiento de la EP. Sin embargo, su respuesta no se correlaciona ni con la severidad de los síntomas ni con el tiempo de evolución de la enfermedad (Levine et al., 2003); y la mayoría de pacientes desarrollan discinesias y/o fluctuaciones motoras después de cinco años de haber iniciado el tratamiento (Iravani, Jenner, 2011). Las discinesias tardías son eficazmente controladas a través de la reducción de la dosis de levodopa, por lo que la eficacia se ve limitada. Las complicaciones motoras se presentan en el 50% de los pacientes tratados por cinco años con levodopa y en más del 80% de los tratados por más de diez años (Minsal, 2010). Las discinesias relacionadas con la levodopa que se presentan de manera más frecuente son:

a) Discinesia: "on": Los movimientos involuntarios (corea, movimientos distónicos, mioclonías), coinciden con el período de mayor movilidad, porque suelen aparecer cuando la levodopa alcanza su mayor efecto, lo que se refleja cómo el momento en el que los niveles del medicamento alcanzan su nivel máximo, o bien pueden estar presentes durante todo el período de beneficio motor, sin cambios en su intensidad.

b) Discinesias bifásicas: Se definen como movimientos involuntarios, que aparecen inmediatamente al inicio y final del beneficio motor, inducido por una dosis aislada de levodopa. La presentación bifásica no necesariamente ocurre en todos los pacientes y pueden estar solamente presentes en una fase del ciclo. Estas aparecen preferentemente en las extremidades inferiores, particularmente en el lado más afectado por la enfermedad y en la mayoría de los casos suelen presentarse como movimientos lentos repetitivos alternantes.

c) Discinesias "off": Habitualmente coincide con niveles plasmáticos bajos de levodopa. Su localización más frecuente es en las extremidades inferiores, adoptando posturas dolorosas en flexión plantar e inversión del pie, junto con flexión plantar de los dedos, a excepción del primer artejo que suele estar en extensión. En una gran proporción de pacientes, esta ocurre por la mañana, antes de recibir la primera dosis de levodopa del día, por lo que también se la conoce como "disonía matutina". Sin embargo, puede aparecer durante el día, coincidiendo con los períodos de pérdida del efecto de la medicación (OFF, particularmente durante la tarde (Clarke, Moore, 2005).

1.8 Síntomas no Motores

Estos síntomas anteceden a los motores y se presentan en el 90% de los pacientes. Se ha descrito que hay un margen de error diagnóstico que va del 5 al 10% (Estrada-Bellmann, 2011) en la medición de estos parámetros. Siendo el más común de los no motores los síntomas de daño gastrointestinal observada en el 90% de los casos (Visanji, Marras, 2015). En cuanto al tratamiento, se ha constatado la eficacia de neurolépticos atípicos (Clozapina o Quetiapina), para el control de los síntomas psicóticos. La rivastigmina como un anticolinérgico ha demostrado mejoría en la cognición de estos pacientes. Cabe mencionar que estos tratamientos deben administrarse de manera concomitante a la administración del tratamiento de elección para EP (levodopa/carbidopa) (Stern, Lang, 2012) tabla 4.

Tabla 4. Síntomas no motores de la Enfermedad de Parkinson

Alteraciones Neuropsiquiátricas	Deterioro cognitivo, Trastornos afectivos (ansiedad y depresión) y psicosis.
Disfunción autonómicos	Estreñimiento, hipotensión ortostática, sudoración, seborrea, Disfunción esfinteriana, disfunción sexual, y alteraciones en la termorregulación.
Disfunciones Sensoriales	Sensación de entumecimiento, tirantez y rigidez.
Trastornos del Sueño	Insomnio, fragmentación del sueño, hipersomnia y trastornos de conducta del sueño REM como: pesadillas, conductas motoras vigorosas y ausencia de atonía muscular (De Riquer, 2013).
Alteraciones de los Nervios Craneales	Visión borrosa, dificultad para la convergencia y la mirada vertical y disfunción olfatoria.
Otras alteraciones	Pérdida de la masa corporal

2. NEUROQUÍMICA DEL CEREBRO

El cerebro es un blanco del estrés oxidante, por lo que está adecuadamente equipado con sistemas de defensa antioxidante capaces de prevenir el daño en cascada. El estrés oxidante, la disfunción mitocondrial, la agregación de proteínas, y la inflamación constituyen el complejo estado patológico que favorece la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas. Las intervenciones terapéuticas actuales están basadas en un conocimiento de la biología *redox* y pretenden ser una alternativa para combatir la muerte neuronal acelerada en la Enfermedad de Parkinson.

2.1 Especies Reactivas del Oxígeno (EROs)

Un radical libre es una especie química definida que tiene en uno o más electrones desapareados en su último orbital, lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable, con gran capacidad de transformar casi cualquier molécula o inclusive de generar otros radicales libres a través de una serie de reacciones químicas en cadena (Halliwell, 1994). Una vez liberados, éstos se aparean rápidamente con un electrón desapareado uniéndose a otro radical libre o arrancando un electrón a una estructura molecular adyacente no radical, con el fin de estabilizarse. Los sistemas biológicos precisan de Oxígeno para sobrevivir. los nutrientes que provienen de la dieta son también oxidados para la obtención de energía. Al conjunto de radicales libres derivados del Oxígeno se les denomina “especies reactivas del oxígeno” (EROs). Asimismo, existen especies reactivas nitrogenadas conocidas como Especies Reactivas del Nitrógeno (ERNOs) e incluso Especies Reactivas del Azufre.

La reducción parcial de la molécula de Oxígeno genera estas especies formando el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical Hidroxilo (OH^{\cdot}) (Halliwell-Gutteridge, 2015). A concentraciones moderadas y dada su limitado tiempo de vida media, los radicales libres se desempeñan como mediadores en la regulación de múltiples procesos fisiológicos (Packer-Wirtz, 1995), como mediadores en los factores de crecimiento (Sundaresan-Yu et al, 1995) o vasodilatadores como en el caso del Óxido Nítrico. Sin embargo, su liberación excesiva, provoca daño a una gran cantidad de componentes celulares y ponen en peligro la sobrevivencia de los organismos aeróbicos (Droge, 2002).

2.2 Fuentes de EROS

El organismo está expuesto a los efectos de los radicales libres derivados del Oxígeno Freeman en el año 1982 clasifica su producción en fuentes de tipo exógeno y endógeno.

2.2.1 Fuentes exógenas

- a) *Agentes antineoplásicos*: Como la bleomicina, adriamicina y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad (Deno et al, 1982).
- b) *Factores ambientales*: contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo de tabaco, solventes, e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes poseen radicales libres o

se convierten en radicales libres por medio del metabolismo celular y procesos de desintoxicación (Mason, 1982).

2.2.2 Fuentes endógenas

La célula por sí misma tiene fuentes de producción de radicales libres.

a) Auto-oxidación de pequeñas moléculas: La célula contiene una gran variedad de componentes solubles que tienen capacidad de oxidación y reducción, como por ejemplo los tioles, catecolaminas y flavinas entre otras. En todos los casos el radical primario que se forma es el radical superóxido por la reducción del O_2 (Baccarini, 1978), y el Peróxido de Hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido.

b) Enzimas solubles y proteínas: Enzimas como la xantina oxido-reductasa, aldehído oxidasa y la flavin protein deshidrogenasa generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Massey et al, 1989).

c) Cadena de transporte electrónico mitocondrial: En tejidos sanos la fuente principal de radicales libres son las mitocondrias, pues son responsables de más del 90% del consumo de oxígeno celular necesario para vivir. La mayor parte del peróxido de hidrogeno mitocondrial proviene de la dismutación del radical superóxido (Boveris-Chance et al, 1972). La generación de radicales en la mitocondria se produce cuando los transportadores de la cadena respiratoria (localizados en la membrana mitocondrial interna) están reducidos (Turrens-Boveris, 1980). De los cuatro complejos existentes se tiene evidencia de producción de radicales en el complejo I, como posibles generadores los centros de hierro-sulfurados (Boveris-Cadenas, 1976) y en el complejo III aún se debate si el generador es la semiquinona o el citocromo b (Herrero-Barja, 1997).

d) Membrana plasmática: Los radicales libres generados extracelularmente deben cruzar la membrana plasmática antes de reaccionar con otros componentes celulares y por esta razón inician reacciones tóxicas en la misma. Los ácidos grasos de la membrana y las proteínas transmembranales poseen aminoácidos oxidables que pueden ser alterados por el ataque de los radicales libres. Las reacciones modifican las propiedades de las membranas, de modo que cambian su fluidez, aumentan su permeabilidad, disminuyen sus funciones secretoras e inhiben algunos procesos metabólicos celulares (Freeman-Crapo, 1982). Un claro ejemplo es la enzima NAD(P)-oxidasa presente en la membrana de las células fagocíticas.

e) Metales: Catalizan las reacciones de óxido/reducción, y debido a la capacidad de combinarse con el Oxígeno estimulan la producción de radicales libres. Esto es debido a la naturaleza electronegativa del Oxígeno en combinación con la electropositividad de los metales. Se considera a los metales como la fuente más importante de radicales del Oxígeno.

2.3 Equilibrio entre especies reactivas y los antioxidantes

La sobreproducción de radicales libres en el organismo se encuentra controlada mediante una gamma de antioxidantes de origen endógeno (glutatión, albúmina, transferrina y ceruloplasmina), y exógeno como la vitamina E, C y carotenoides; estos se obtienen por medio de la dieta. Estos se clasifican de acuerdo con su mecanismo de acción en: primarios, secundarios o terciarios (tabla 5). Algunos actúan por un único mecanismo, pero existen algunos que pueden tener acciones combinadas (*Kumpulainen et al, 1999*).

Tabla 5. Clasificación de los antioxidantes de acuerdo con su mecanismo de acción

<i>Primarios</i>	Impiden la formación de radicales libres (quelantes de metales de transición).
<i>Secundarios</i>	Interrumpen la reacción de propagación por inactivación (ácido ascórbico) o desplazan a las especies reactivas de oxígeno (mayoría de enzimas antioxidantes).
<i>Terciarios</i>	Reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se has estropeado.

Por definición, una sustancia antioxidante es aquella que, a concentraciones relativamente bajas, es capaz de competir con otros sustratos oxidables y, por tanto, retrasar o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Halliwell, 1994). Esta definición contempla tanto a los antioxidantes enzimáticos como los no enzimáticos.

2.3.1 Antioxidantes enzimáticos

Son componentes celulares y su función específica es neutralizar a diversas especies reactivas, ejemplo de ellas son: superóxido dismutasa, la ceruloplasmina, y la enzima glutatión peroxidasa.

a) Superóxido dismutasa (SOD): Es considerada como la primera línea de defensa en contra del radical superóxido. Lo transforma en Peróxido de Hidrógeno y agua. En los mamíferos existen tres isoformas: la forma Cu/Zn-SOD citosólica, la Mn-SOD (mitocondrial) (Halliwell, 2009) y la forma Cu/Zn-SOD extracelular. La forma citosólica, también puede presentarse en los espacios mitocondriales, en los peroxisomas y en el núcleo (Grisham et al, 1986) y la forma extracelular se expresa solo en algunas células y tejidos como células vasculares, pulmón y plasma. (Hink et al., 2002; Köhler -Triebkorn, 2013).

b) Cu/ZnSOD o SOD1: Es una enzima dimérica. Cada unidad monomérica contiene un sitio activo de un cobre y un zinc unidos mediante un puente con el imidazol de la histidina (Figura 4). El cobre cambia entre los estados de oxidación Cu^{+2} / Cu^{+3} durante la catálisis, mientras que el Zinc desempeña un papel en la estabilidad global de la enzima y facilita la independencia del pH en la actividad (Hough-Hasnain, 2003).

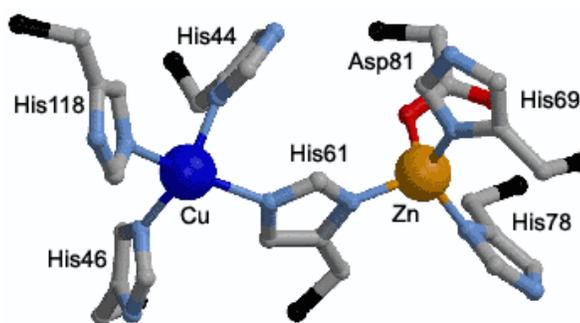
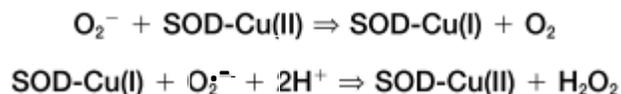


Figura 5: Estructura de la CuZnSOD: se muestran los sitios de cobre y zinc en su forma reducida en forma de esferas de color azul y naranja, unidos al puente histidina imidazol (L. GILAU*, n.d.)

El mecanismo generalmente aceptado de catálisis para CuZnSOD según Tainer implica la reducción cíclica y la reoxidación del cobre por moléculas sucesivas de superóxido. En la reducción de Cu^{+2} por el anión superóxido, la His 61 se disocia del cobre y se protona. La molécula de agua coordinada se desplaza, produciendo un sitio de tres coordenadas Cu^{+1} . A continuación, el cobre se re oxida mediante una segunda molécula de superóxido mediante la donación de protones a partir de la His61 y agua dando como resultado la liberación de peróxido de hidrógeno y agua (Murphy-Strange, 1997).



c) Glutación peroxidasa (GPx): Esta enzima reduce el Peróxido de Hidrógeno o el Hidroperóxido orgánico a agua y alcohol, respectivamente. Para ello, utiliza en ambos casos al glutación reducido (GSH) como donante de electrones (Halliwell, 2009). La GPx es Selenio-dependiente y es específica para GSH, ya que lo necesita para poder realizar su función, oxidándolo a glutación oxidado (GSSG). Se localiza en el citosol, la mitocondria y en la membrana celular. La reacción necesaria para recuperar los niveles de GSH a partir del GSSG es catalizada por la enzima glutación reductasa (GR) que consume NADPH para regenerar el GSH. (Figura 6).

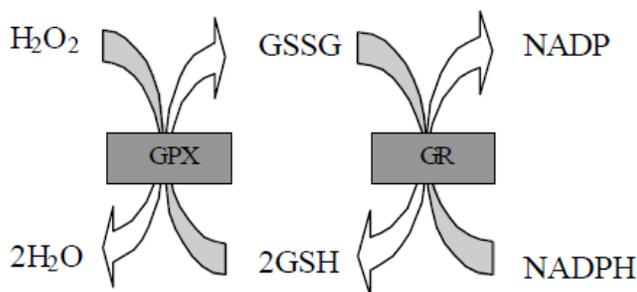


Figura 6. Ciclo de oxidación- reducción de GSH

La GR tiene una distribución similar a la de la GPx. Aunque esta enzima no es considerada como una enzima antioxidante, su función es esencial para que la enzima glutación peroxidasa realice adecuadamente su labor antioxidante.

d) Ceruloplasmina: es sintetizada en el hígado y secretada como una α - glicoproteína a nivel plasmático. Pertenece al grupo de las multi-cobre oxidasas, posee tres sitios de unión para cobre con características espectroscópicas y funcionales diferentes (Figura 7). Cataliza la reducción de una molécula de Oxígeno en forma de agua, sin liberar al ambiente a los radicales libres. Se considera la transportadora más específica y eficiente de cobre en la circulación sanguínea. Posee una actividad ferroxidasa, por lo que participa en la homeostasis del hierro. Es por esta razón que se le atribuye una actividad antioxidante. En la circulación se encuentra tanto en su forma de apoenzima como en forma de holoenzima;

la primera corresponde a la enzima sin actividad, mientras que la segunda es la enzima activa, debido a la presencia/ausencia del cobre en su sitio catalítico (Hellman-Gitlin, 2002) figura 7 . En el cerebro, es sintetizada por los astrocitos, donde está anclada a la membrana plasmática y unida a glucosil fosfatidil inositol. La ceruloplasmina glial está íntimamente ligada al flujo de hierro del cerebro porque, como en el hígado, la ceruloplasmina oxida el hierro transportado por la transferrina para ser almacenado posteriormente por la ferritina (Patel-David, 1997). Es importante resaltar que la albúmina también es la proteína más abundante en el plasma, encargada de transportar al cobre sanguíneo, y posee poder antioxidante, ya que participa como la quelante de metales (Miller, 1998)

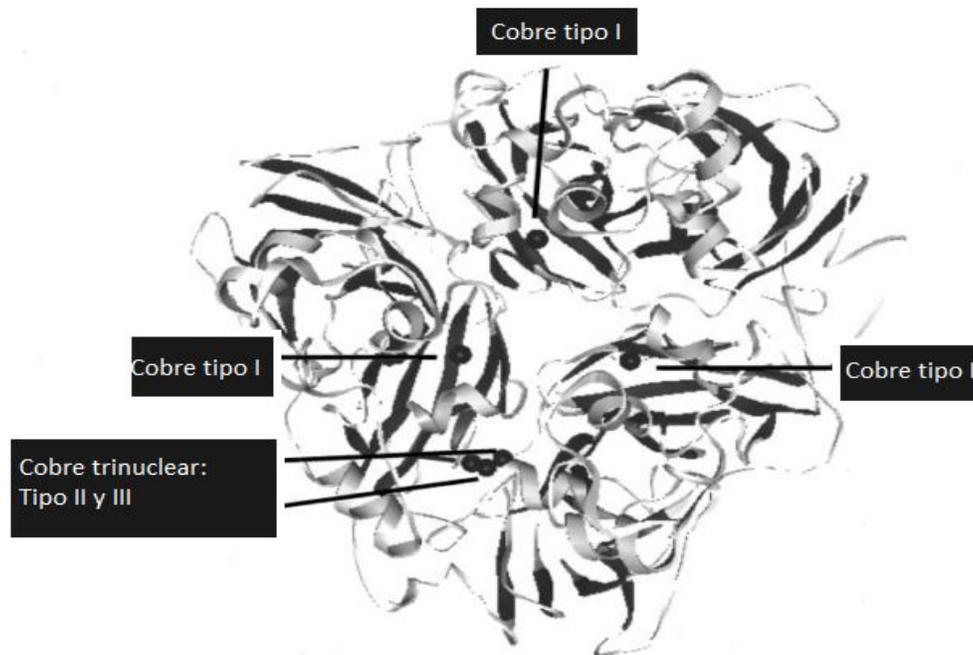


Figura 7: Estructura de la ceruloplasmina. Se muestran los cobres de tipo I,II, y III, así como el sitio de grupo de cobre trinuclear (Hellman-Gitlin, 2002)

2.3.2 Antioxidantes no enzimáticos

Este tipo de antioxidantes se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar graves *daños* a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos o bien, los transforman en radicales menos agresivos (Betancourt-Rule et al, 2000). Ejemplo de ellos son: el glutatión reducido (GSH), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina E (α -tocoferol), entre otros.

Glutatión Reducido (GSH): Está formado por el tripéptido α -glutamyl-cisteinil-glicina; y es la fuente de grupos tioles no proteicos más abundante en la célula

aproximadamente de más del 90%; (Meister, 1995). El GSH es sintetizado en el hígado por la acción de dos enzimas, α -glutamil cisteína sintetasa y la glutatión sintetasa (Meister-Anderson, 1983). Tiene dos características fundamentales: la presencia de grupos tioles provenientes de la cisteína y la presencia de un enlace α -peptídico. Ya que es un tripéptido, su ingesta no influye en los niveles celulares. Una de las funciones antioxidantes más importante es la eliminación de H_2O_2 y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por la GPx mediante la que se origina glutatión oxidado (GSSG) y se restaura el glutatión reducido (GSH). También está implicado en la reducción de varios antioxidantes celulares como la vitamina E. El GSSG se mantiene a niveles bajos y aumenta con el envejecimiento en el hígado, los riñones y el cerebro (de la Asuncion et al., 1996) mientras que el GSH contribuye al mantenimiento del estado redox celular, al cual son sensibles las proteínas, cambiando su función y/o conformación ante cambios en el estado redox, siendo más susceptibles a la degradación (Droge, 2002). En la medida en que se mantienen los tioles proteicos de las proteínas, éstas son capaces de conservar su conformación y regular actividades enzimáticas metabólicas importantes, lo que evita la formación de disulfuros mixtos y puentes disulfuro.

2.4 Metales de transición

Los iones metálicos son componentes esenciales de una amplia variedad de procesos biológicos de sistemas vivos por lo que las alteraciones en el almacenamiento, transporte y manipulación celular de ciertos metales de transición han sido especialmente evaluadas en la EP. Estudios *post mortem* realizados en el tejido cerebral de pacientes que fallecieron con EP demuestran alteraciones en los niveles de hierro y cobre en los ganglios basales (Dexter et al., 1989). Estos descubrimientos son especialmente importantes debido a que ambos metales están involucrados en la generación y propagación de las EROs debido a sus propiedades redox (Hozumi et al., 2011). En el Sistema Nervioso, los metales dirigen varias funciones celulares y actividades fisiológicas importantes. Por ejemplo, el hierro es esencial para la síntesis de ADN, la neurotransmisión, la mielinización, la activación del oxígeno, el transporte de electrones mitocondriales y el metabolismo (Halliwell, 2006). Los ganglios basales por su parte, son sitios sensibles a la degeneración debido a su alto contenido de metales (hierro y cobre), en conjunto con la presencia de una alta actividad metabólica, que facilita la generación de radicales libres y otras EROs como el que da peróxido de hidrógeno (Donaldson-Barbeau, 1985).

2.5 Vínculo entre el Cobre y Hierro con la EP.

El cobre es un metal traza con una concentración media de 1.4-2.1 mg / kg en individuos sanos y se absorbe fácilmente de la dieta a través del intestino delgado (2 mg / día) (Lan-Chen et al , 2016). Tanto el cobre como el hierro están involucrados en la generación y propagación de las EROs debido a sus propiedades redox a través de la reacción de Fenton (Figura 8), y es especialmente importante en áreas cerebrales que metabolizan aminas biológicas como la dopamina, ya que el peróxido de hidrógeno es un subproducto de la acumulación de hierro y podría estar vinculada con la disminución de la actividad ferroxidasa, llevada a cabo principalmente por la cuproproteína ceruloplasmina; cuya actividad enzimática se ha visto disminuida en pacientes con la EP (Hozumi et al, 2011; Martínez-Hernández et al, 2011). El cobre podría estar relacionado directamente con el metabolismo del control del hierro y el aumento de este metal en los ganglios basales indicaría que el cobre no se está manipulando correctamente por las cuproproteína neuronales y/o no se transporta correctamente lo que altera los niveles de los sistemas antioxidantes dependientes de cobre (Tapiero et al, 2003). En condiciones normales, el cobre plasmático es transportado por la ceruloplasmina con una porción minoritaria transportada por albumina, transcupreína y otros aminoácidos (Davies et al., 2014).



Figura 8: Reacción de Fenton

3. ANTECEDENTES

La presente tesis está orientada al daño por medio del estrés oxidante; de esta manera se busca relacionar a las especies reactivas de oxígeno con todos los componentes involucrados en esta patología. Y aunque se basa en esta teoría centralmente es imposible que otras teorías se entrelacen entre sí.

3.1 Biomarcadores en EP

La búsqueda de biomarcadores biológicos que logren explicar la fisiopatología y evolución de la EP han centrado sus esfuerzos en el empleo de modelos murinos (*in vivo* e *in vitro*), y con el avance de las investigaciones, éstos marcadores se han empleado en estudios clínicos controlados. La teoría del estrés oxidante se apoya en evidencias previas de la literatura entre las que se encuentran los cambios en algunos de sus biomarcadores más importantes.

3.1.1 Contenido de Glutación reducido (GSH)

La evidencia indica que los niveles de este antioxidante se encuentran disminuidos en los pacientes con EP (tabla 6) en comparación con los controles (voluntarios sanos) (Boll et al., 2008; (Boll et al, 2008; Yuan et al., 2015). Respecto al Glutación oxidado (GSSG) en pacientes con Parkinson está aumentado en comparación los controles (Elokda et al, 2010)

Tabla 6: Biomarcadores del estado redox de pacientes con EP VS controles sanos

Antioxidantes	Control (n=40)	EP (n=64)	Valor referencia por sujetos sanos ^a
GSH $\mu\text{mol/L}$	79.3 \pm 63.6	22.2 \pm 19.0***	81.0 \pm 35.0
GPx U/L	147.3 \pm 35.2	128.0 \pm 43.0*	155.4 \pm 41.3
CAT, U/mL	171.1 \pm 3.9	161.0 \pm 10.0***	174.5 \pm 5.0
SOD U/mL	122.3 \pm 22.5	93.5 \pm 23.7***	124.2 \pm 23.6

GSH: Glutación reducido, GPx: Glutación peroxidasa, CAT: catalasa, SOD: superóxido dismutasa. Test de Mann Whitney para GSH, GSH-Px, CAT y SOD. * $p < 0.05$ comparados con control. *** $p < 0.001$ comparados con control ^a. (Yuan et al., 2015)

3.1.2 Actividad de Superóxido Dismutasa de Cobre y Zinc (Cu/ZnSOD)

La actividad de esta enzima de pendiente de cobre en los pacientes con Parkinson se encuentra disminuida en comparación con los voluntarios sanos (Boll et al., 2008; Halliwell, 2006).

3.1.3 Actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina

La disminución en la actividad ferroxidasa de la Cp ha sido reportada tanto para el modelo murino de administración de MPP+, como en pacientes con EP coincidiendo en el resultado. (Boll et al, 2008; Grolez et al, 2015; Martínez-Hernández et al., 2011; Yapur et al, 2007). La actividad de dicha enzima se encontró disminuida significativamente con respecto a los controles (Boll et al, 2008)

3.1.4 Cobre Total y Libre

En estudios previos se determinó el cobre en regiones cerebrales específicas, mediante un método de gabinete. Estos estudios reportaron una disminución importante de este metal y un aumento significativo de hierro en las mismas zonas (*Martínez-Hernández et al., 2011*). Posteriormente, nuestro grupo de estudio realizó la determinación del contenido de cobre libre y cobre total por medio de espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, en muestras de líquido cefalorraquídeo en pacientes con enfermedad de Parkinson y observaron un aumento en el contenido de cobre libre. Lo que corrobora lo reportado previamente, y que coloca al aumento en el contenido de cobre libre como un posible marcador biológico, al compararlo con otras enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluyeron a la ELA, AD y HD (Boll et al, 2003).

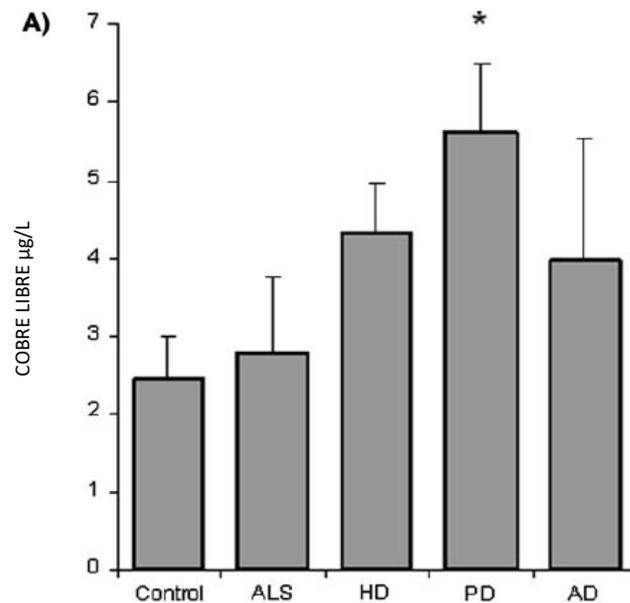


Figura 9: Contenido de cobre libre en enfermedades neurodegenerativas. Concentración de cobre libre en el LCR en pacientes diagnosticados con una enfermedad neurodegenerativa en el INNN. ANOVA seguido de Dunnett vs controles sin diferencias excepto para el grupo de pacientes diagnosticados con EP (PD) $p = 0.007$. ALS: Esclerosis Lateral Amiotrófica, HD: enfermedad de Huntington, PD: Enfermedad de Parkinson, AD: enfermedad de Alzheimer. (Boll et al., 2008)

3.2 Suplementación con Cobre

Los estudios en las primeras fases de investigación se realizaron en ratones y de estos se pudo obtener una idea más clara de si este podría ser tomada como un tratamiento de neuroprotección; utilizando el modelo de MPP+ las ratas fueron ministradas con pretratamiento de cobre y posteriormente se sacrificaban para determinar las concentraciones de cobre en la *substantia nigra*. Asimismo, se determinó la actividad de las enzimas antioxidantes (Martínez-Lazcano et al, 2014; Rios et al, 1995; Rubio-Osornio et al, 2009). En pacientes, existen reportes de suplementación de cobre a varones con problemas cardiovasculares, para su posterior valoración de las y actividades enzimáticas antes y después del tratamiento, para poder dilucidar si el cobre aumentaba la eficacia de la ceruloplasmina (Disilvestro et al, 2012; Disilvestro et al, 1997; Jones et al, 1997). Este estudio concluyó que aumentaba la actividad de la Cp como respuesta al suplemento, además de ser un tratamiento seguro para el uso en humanos.

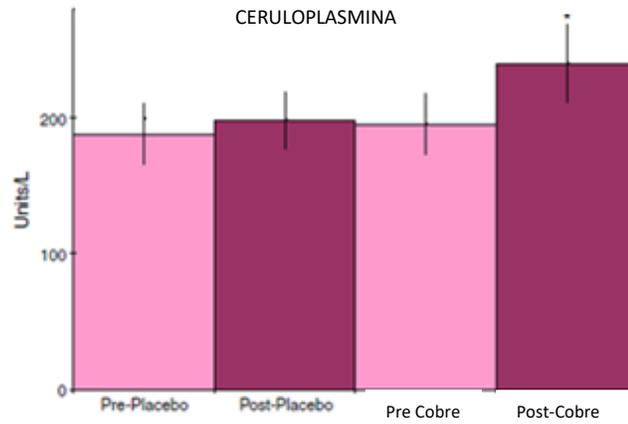


Figura 10: Actividad ferroxidasa de la Ceruloplasmina. Los datos están en Unidades/L \pm SEM. Las mediciones se realizaron antes y después del placebo o suplementos pre y post cobre durante 8 semanas. * Significativamente diferente de la prueba t pareada previa al valor, $P < .05$. (Disilvestro et al, 2012)

4. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Parkinson es una patología neurodegenerativa de carácter progresivo que aumenta en prevalencia en grupos de edad avanzada y representa un importante reto epidemiológico por el gran impacto funcional al que conlleva. El tratamiento actual de la enfermedad es sintomático. Sin embargo, la administración sostenida del tratamiento de elección pierde efectividad a lo largo del tiempo, con riesgo de aparición de efectos secundarios indeseables y un deterioro continuo de la calidad de vida de los pacientes, que culmina en una discapacidad funcional completa. La búsqueda de medicamentos o suplementos para modificar el curso clínico de la enfermedad o las alteraciones fisiopatológicas que la representan, no han mostrado hasta el momento ser exitosos. Los avances en los últimos 20 años en el entendimiento de la relación entre los procesos neurodegenerativos y alteraciones en el metabolismo del hierro cerebral, han abierto la posibilidad de atacar uno de los posibles procesos iniciales que podrían conducir a la disfunción y muerte celular. La movilidad del hierro cerebral depende de proteínas transportadores para su transformación y acarreamiento, y el cobre es un mediador fundamental en este proceso. Recientemente, modelos experimentales y tejido cerebral de pacientes con Enfermedad de Parkinson mostraron un descenso en la actividad en algunas de estas proteínas. Modelos animales han demostrado que la inducción de dichas proteínas depende de cobre, y que la administración de sus suplementos impacta también en su capacidad motora. Por esta razón, la presente tesis busca documentar el impacto del tratamiento con suplementos de cobre por vía oral en pacientes con Enfermedad de Parkinson, y la valoración de su capacidad para modificar la tasa de estrés oxidante, a través de la activación de enzimas dependientes de cobre.

5. HIPÓTESIS

La disminución en la actividad de los biomarcadores (GSH, Cp y SOD) en pacientes con enfermedad de Parkinson idiopático, tendrá un aumento significativo en aquéllos que reciban el suplemento con cobre, en comparación con los índices obtenidos de muestras de pacientes que reciban el suplemento con placebo. Por su parte, el contenido plasmático de cobre libre en los pacientes bajo tratamiento con suplementos de cobre, estará disminuido con relación a los niveles obtenidos para pacientes que reciban el tratamiento con placebo.

6. OBJETIVO

Objetivo general

Evaluar el efecto del suplemento de sulfato de cobre en la progresión de la disfunción de algunos biomarcadores bioquímicos antioxidantes en pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopático, y compararlo con pacientes bajo tratamiento con placebo. Asimismo, se pretende vigilar y consignar los efectos adversos asociados al uso del suplemento de sulfato de cobre a través del análisis de la función de enzimas hepáticas y la integración de un formato de reporte de caso. De la misma manera, realizaremos una comparación de los resultados obtenidos a partir de un grupo control (integrado por voluntarios sanos, sin diagnóstico de EP) que compararemos con muestras basales de los pacientes con EP, para confirmar la ausencia de fallas en el estado redox preexistentes de nuestros controles.

Objetivos específicos

1. Cuantificar los niveles plasmáticos de la actividad ferroxidasa de la Ceruloplasmina mediante un método enzimático.
2. Cuantificar los niveles plasmáticos de Glutación en su forma oxidada y reducida.
3. Cuantificar los niveles plasmáticos de la actividad de Superóxido dismutasa dependiente de Cobre/Zinc, mediante estudios cinéticos.
4. Cuantificar los niveles plasmáticos de cobre libre por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito.
5. Cuantificar los niveles en sangre completa de cobre total por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y automuestreador.
6. Cuantificar los niveles plasmáticos de las transaminasas hepáticas ALT y AST y otras proteínas (albúmina, proteínas totales) de interés.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo en plasma de pacientes con Enfermedad de Parkinson idiopática provenientes de la consulta externa del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” de la CDMX.

7.2 Población y muestra

Previo al reclutamiento se sometió el protocolo a un comité de ética que aprobó y monitorizó el estudio durante todo el proceso, a cargo del. Posteriormente se reclutaron 5 pacientes consecutivos para formar 2 grupos o brazos de tratamiento. También se reclutaron 6 voluntarios sanos como controles. Dos sujetos recibieron el suplemento de sulfato de cobre en unidades para administración oral de 4 mg tres veces por día y 3 sujetos recibieron placebo con la misma presentación (Tabla 7). Un Neurólogo especializado en movimientos anormales utilizó criterios clínicos (la escala del Banco de Cerebros de la Sociedad Británica para el diagnóstico de la EP, UPDRS) para el diagnóstico y selección, así como estudios paraclínicos (ecografías, TAC, RAM) dentro del diagnóstico diferencial durante una visita de escrutinio. Los estudios paraclínicos forman parte de la evaluación de rutina para el proceso diagnóstico de la enfermedad. Durante la Visita de Escrutinio, se les invitó verbalmente a participar explicando el tipo y objetivos del proyecto, y se les proporcionó una copia del documento “Carta de Consentimiento Informado” por escrito con la descripción detallada del proyecto, así como de su participación, incluyendo el número de visitas (3), los estudios a realizar y los métodos para la vigilancia de posibles efectos adversos durante el tiempo de estudio, haciendo hincapié en el hecho de que a partir de esa fecha y en cualquier momento del estudio, podían declinar su participación y retirarse del estudio. En caso de acceder a participar, los pacientes firmaron el Consentimiento Informado en presencia de 2 testigos. Los pacientes fueron codificados con un número de registro, que sirvió para la aleatorización de sus tratamientos e inclusión en cualquiera de los 2 grupos o brazos. Los pacientes, médicos, y el resto de participantes en la evaluación y seguimiento de los pacientes fueron cegados al grupo o brazo que pertenecen. Durante la visita inicial, así como de las subsecuentes a los 3 meses y 6 meses, se tomaron muestras de sangre periférica en 4 tubos (2 con heparina de 5ml y 2 tubos con EDTA de 3ml), la toma de muestras fue realizada por personal especializado del Laboratorio Clínico del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Una vez obtenida la muestra, los tubos centrifugados a 2,500 rpm durante 10 minutos para después alicuotar y separar el plasma, que se mantuvo en ultra congelación (-70 °C) en contenedores por separado de acuerdo al tubo del que provenían.

Al momento de su evaluación, las muestras fueron analizadas en conjunto.

Tabla 7. Características de los sujetos que participaron en este estudio

SUJETO	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO	# DE VISITAS	FUMADOR
1	Masculino	56	Parkinson	2	SI
2	Femenino	58	Parkinson	3	NO
3	Masculino	45	Parkinson	3	NO
4	Femenino	40	Parkinson	1	NO
5	Masculino	63	Parkinson	3	SI
6	Masculino	40	Control	1	NO
7	Femenino	45	Control	1	NO
8	Femenino	50	Control	1	NO
9	Femenino	43	Control	1	NO
10	Masculino	56	Control	1	NO
11	Masculino	41	Control	1	NO

7.2.1 Criterios de inclusión

- a) Pacientes que cumplan con los criterios clínicos para una probable enfermedad de Parkinson del Banco de Cerebros de la Sociedad Británica para el diagnóstico de la EP provenientes de la consulta externa del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.
- b) Diagnóstico de enfermedad de Parkinson dentro de los 5 años antes de la visita de revisión.
- c) Edad de 30 años o mayor.
- d) Pacientes que decidan aceptar y firmar el consentimiento informado del estudio.

7.2.2 Criterios de no inclusión

- a)** Declinación del consentimiento informado
- b)** Parkinsonismo debido a medicamentos incluyendo neurolépticos, alfa-metildopa, reserpina, metoclopramida o ácido valproico.
Uso de antioxidantes o inhibidores del al MAO-B (como Selegilina o Rasagilina), suplementos de vitaminas o minerales.
- c)** Otros desordenes parkinsonianos.
- d)** Historia de Enfermedad Vascul ar Cerebral.
- e)** Cambios en la medicación dopaminérgica en los últimos 60 días antes de la Visita Inicial o Basal.
- f)** Otras enfermedades graves, incluyendo enfermedades psiquiátricas o hepatopatías crónicas o agudas.
- g)** Pacientes con una enfermedad cardiovascular, vascular periférica o cerebrovascular activa.
- h)** Anormalidades clínicas severas en los estudios de laboratorio o electrocardiograma en la Visita de Escrutinio o en la Visita Inicial o Basal.
- i)** Uso de Metilfenidato, Cinarizina, Reserpina, anfetaminas o inhibidores de la MAO-A dentro de los 6 meses anteriores a la visita Inicial.
- j)** Dosis inestables de terapias para el Sistema Nervioso Central o Periférico (p.ej. antidepresivos, antiepilépticos, inmunomoduladores e inmunosupresores).
- k)** Uso de supresores de apetito dentro de los 60 días anteriores a la Visita Inicial.
- l)** Historia de epilepsia activa dentro de los últimos 5 años.
- m)** Participación en otros estudios de medicamentos o drogas en investigación dentro de los 30 días anteriores a la Visita de Escrutinio.
- n)** Historia de terapia electroconvulsiva.
- o)** Historia de cirugía cerebral para enfermedad de Parkinson.
- p)** Historia de enfermedad estructural cerebral como un trauma previo que causara daño detectado por una tomografía computada o Imagen de Resonancia Magnética, hidrocefalia o neoplasia cerebral previa.
- q)** Embarazo

7.3 Determinación de la actividad ferroxidasa de la Cp

Esta determinación fue descrita en los años 80 (Arnaud P, Gianazza E, 1988) para suero fue adaptada y validada en el laboratorio de neuroquímica para su análisis (Bollet al., 1999). La reacción enzimática se basa en la capacidad de Cp para transformar Fe^{2+} en Fe^{3+} . En resumen, se mezclaron 400 μ L de muestras de plasma con 800 μ L de tampón de acetatos (0,3 M, pH 6). Después de la incubación a 30°C durante 5 minutos, se añadieron 400 μ L de solución de sulfato ferroso de amonio 0,01 M recientemente preparada. Las muestras se incubaron luego durante cinco minutos más a la misma temperatura; la reacción de la mezcla se detuvo con adición de 800 μ L de ácido perclórico 1,25 M. Las muestras se centrifugaron a 8,000 rpm durante 3 min. El hierro férrico producido por la actividad ferroxidasa se determinó añadiendo 1000 μ l de solución de tiocianato de amonio 0,5 M a la mezcla de incubación. El complejo rojo derivado de la formación del complejo de tiocianato-Fe (III) se midió a 450 nm espectrofotómetro de luminiscencia (FLx800 Multimode Lector BioTex, Houston Texas, USA).

7.4 Actividad de superóxido dismutasa

Se midió espectrofotométricamente como se reportó por (Boll et al, 2003) . Curvas de calibración para evaluar fiabilidad del ensayo de actividad SOD se realizaron utilizando estándares de concentraciones conocidas de Cu / Zn-SOD bovino comprados de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). 50 μ L de plasma a 2,9 mL de una solución que contenía 10 mM de azida de sodio, 100 mM de xantina, 10 mM de citocromo c reducido y 1 mM EDTA en 20 mM de bicarbonato de sodio y 0.02% de Triton X-100, pH 10.2. El ensayo enzimático comenzó con la adición de 50 μ L de una solución de xantina-oxidasa 3.4 mg / mL en EDTA 0,1 mM, que induce la producción de superóxido. Cambios en la absorbancia de citocromo c se controlaron cada minuto a 550 nm con un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer Lambda 20. La unidad de actividad de SOD se definió como la cantidad de enzima que disminuye la tasa de reducción del citocromo c en un 50%, como se describe Boll et al.(Boll, et al, 2003).

7.5 Determinación de GSH y GSSG

Se utilizó el método reportado previamente por nuestro grupo con el uso de O-phthalaldehído (OPA) como un fluorescente reactivo (Boll et al, 2014). Las muestras de plasma se diluyeron 1: 1 (v / v) con PB-EDTA y H₃PO₄, los tubos se colocaron en hielo por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron a 4°C a 12000 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante para el ensayo de los niveles de GSH y GSSG. Aproximadamente se añadieron 900 µL del tampón fosfato-EDTA, pH 8,0, a 125 µL del sobrenadante para GSH y 50 µL para GSSG con 20 µL de NEM. Las muestras de GSSH fueron incubadas durante 15 minutos con 50 µL de solución de OPA y las muestras de GSSG se incubaron con 430 µL de NaOH con 50 µL de OPA. La fluorescencia se evaluó en microcubeta con lector de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión, con 90% de sensibilidad. Para el análisis de la muestra blanco, sustituimos muestras de plasma con agua desionizada y fueron tratados como muestras regulares. Se construyeron curvas de calibración para glutatión reducido y oxidado; las concentraciones se obtuvieron por interpolación de las curvas estándar. Los resultados se expresan como mMGS_H, mMGS_{SG}.

7.6 Cobre total y cobre libre

Las muestras de analizaron mediante Espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito con automuestreador; también del automuestreador). Para obtener el cobre de bajo peso molecular, inmediatamente después de descongelar las muestras, se colocó una alícuota de 400 µL en un dispositivo centrífugo Microcon YM-3 (Millipore Corporation) que utiliza la membrana de celulosa regenerada hidrófila anisotrópica de baja unión de Amicon capaz de separarse un peso molecular nominal de 3000 Dalton. Después de 70 min se centrifugaron a 14,000 g. en una centrífuga Eppendorf 5417R con sistema de enfriamiento rápido, se obtuvieron 300 µL de plasma filtrado, en el que la concentración de cobre se midió directamente por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y automuestreador. De las muestras de sangre completa se tomaron los 400 µL y se colocaron directamente en las cubetas para determinar mediante absorción atómica en horno de grafito, para obtener la cantidad de cobre total que estaba presente en la muestra y determina la variación entre las muestras(Boll et al, 1999).

7.7 Transaminasas ALT/AST

Para comprobar que el suplemento con cobre no tuvo consecuencias hepatotóxicas sobre los pacientes como consecuencia del tratamiento crónico, se midió la funcionalidad de las enzimas ALT/AST (Alanina transaminasa / Aspartato aminotransferasa) en muestras de suero tomadas antes, y durante tratamiento con CuSO_4 , empleando un kit comercial de Stanbio Laboratory Inc. (2930 East Houston Street, San Antonio, Texas 78202, EE. UU.) Los resultados se expresaron como U/L.

7.8 Análisis estadístico

Para evaluar tanto la actividad como la concentración de los antioxidantes de los voluntarios y pacientes inicial se consideró a cada ensayo como un análisis de muestras pareadas y se realizó una prueba t de student para comparara los grupos entre sí. Para la valoración de los antioxidantes de los pacientes durante el tratamiento se analizaron con una prueba t-Student para muestras independientes. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con ayuda del programa SPSS versión 20.0. Consideramos un nivel de $p < 0.05$ como significativo en las pruebas estadísticas realizadas.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis comparativo de los biomarcadores en controles sanos vs niveles basales de pacientes con EP.

Se determinaron las concentraciones de antioxidantes en 2 grupos; en los pacientes el análisis se realizó previo a la toma del suplemento de cobre. Estos análisis se realizaron para determinar si el nivel basal de los pacientes con Enfermedad de Parkinson era diferente a los valores de los voluntarios sanos, de acuerdo con los reportes previos de la literatura. La medición se realizó en los tubos con heparina debido a que los cálculos de enzimas se pueden ver disminuidas debido a los quelantes de metales como el EDTA (Gelb et al, 1999). En la tabla se muestran los valores comparativos entre los dos grupos.

TABLA 8: Biomarcadores en Parkinson inicial vs controles

BIOMARCADOR	PARKINSON INICIAL	CONTROLES SANOS	SIGNIFICANCIA (PRUEBA DE T)
GSH	0.269 ± 0.017	0.24±0.01	N.S
GSSG	0.006±0.00	0.0006 ±0.00	N.S
GSH/GSSG	462.35±26.29	436.74±48.04	N.S
Cu/ZnSOD	0.39±0.10	0.30±0.13	N.S
CERULOPLASMINA	3.33±0.08	3.41±0.30	N.S
COBRE LIBRE	45.82±7.00	62.02±12.65	N.S
COBRE TOTAL PLASMA	990.3±887.98	939.53±88.58	N.S
COBRE TOTAL EN SANGRE	1031.4±132.93	1056.5±165.96	N.S

N.S: No significativo

Los resultados obtenidos del análisis de las concentraciones de metaloproteínas en plasma determinó que en no hubo diferencias significativas entre el grupo de pacientes con Parkinson y el grupo control, como se había reportado en estudio previos, esto puede deberse al tipo de muestra en el que se realizó el análisis.

8.2 Análisis comparativo de las transaminasas hepáticas, albúmina y proteínas totales del grupo Control vs pacientes con EP

De manera preventiva se realizó la determinación de un perfil de funcionamiento hepático de cuatro elementos y se compararon con el grupo de pacientes que participarían en el estudio, para garantizar el buen funcionamiento del hígado y evitar ingresar a algún paciente que no estuviera en condiciones de recibir el suplemento o placebo. El estudio se delimitó a determinar las transaminasas Alanino aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST), ya que estas enzimas muestran mayor especificidad por el hígado, decidimos excluir a la Gamma glutamil transpeptidasa (GGT) por mostrar mayor especificidad por el tejido pancreático. Como mencionamos en nuestros antecedentes, la albúmina es una proteína transportadora de diversos elementos. Posee un segmento en su estructura capaz de unir al cobre, por lo que de manera complementaria se calcularon sus niveles (Hanaki, Odani, 2007). Estos resultados fueron comparados entre el grupo control y pacientes con Enfermedad de Parkinson. Los datos sugieren que los valores de las transaminasas (ALT, AST) no se ven modificadas en ningún momento del estudio es decir no existen diferencias significativas entre los promedios de los grupos, tomando en cuenta que los controles son voluntarios sanos se determina que los pacientes no tienen impedimento para el ingreso al estudio, esto se observa en la tabla 9. El análisis con respecto a la albúmina y las proteínas totales como un posible indicador de la enfermedad de Parkinson no dan algún indicio de que estén alterados en los pacientes con Parkinson ya que las medias del grupo control y grupo comparado no son diferentes significativamente, Estos resultados nos permiten tener conocimiento algún tipo de avance y amplían nuestro horizonte.

TABLA 9: PERFIL HEPÁTICO PACIENTES INICIAL VS CONTROLES SANOS

PERFIL HEPÁTICO	PARKINSON INICIAL	CONTROLES SANOS	SIGNIFICANCIA (PRUEBA DE T)	VALOR DE REFERENCIA
Alanino aminotransferasa (ALT)	16.68±2.63	25.95± 3.79	N.S	7-41 U/L
Aspartato aminotransferasa (AST)	18.22± 1.99	24.06±3.79	N.S	12-38 U/L
Proteínas totales (PT)	7.4±0.23	7.18± 0.13	N.S	6.7-8.6 g/dL
Albúmina (ALB)	4.42±0.11	4.33±0.9	N.S	4.0- 5.0 g/dL

8.3 Resultados de grupo por número de visita

Una vez comparados los resultados del grupo control y pacientes, se determinaron los mismos marcadores pero en esta ocasión se realizaron solo para el grupo de los 5 pacientes por cada número de visita es decir al inicio, a los tres y a los seis meses; el análisis se hizo por grupo sin distinguir a que brazo del estudio pertenecían. Cabe resaltar que cada paciente visitaba el consultorio mensualmente para hacer la entrega del suplemento y para en caso de necesidad hacer un reporte de reacción adversa. Los antioxidantes se relacionan directamente con el efecto de estrés oxidante en la fisiopatología de la enfermedad pues mantienen un equilibrio entre las especies reactivas y la concentración de los mismos. Se muestran los resultados del glutatión reducido (GSH) al inicio del estudio y a los tres meses, las medias no muestran una diferencia significativa. No así para los resultados de los 6 meses ya que este aumento hasta tres veces con respecto a los valores iniciales, es decir en las medias se encontró una diferencia significativa es decir un aumento del antioxidante a un $p < 0.05$, gráficamente esto se puede observar en la figura 11.

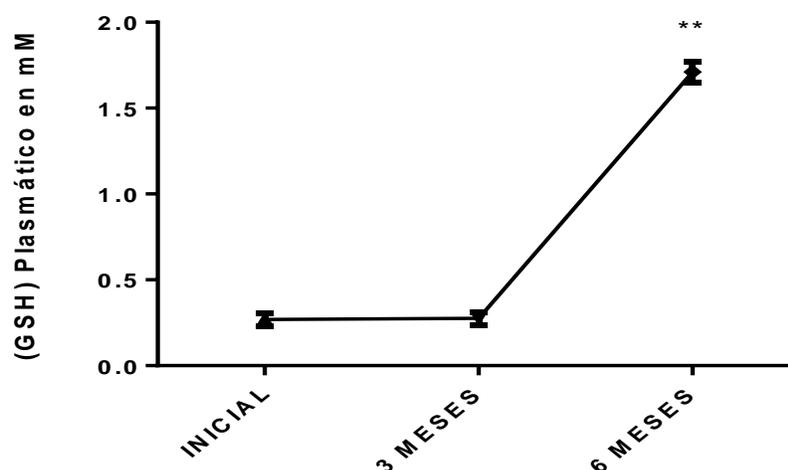


Figura 11. Concentración de glutatión reducido en pacientes con Parkinson. Cada punto representa el promedio y el error estándar de mM de GSH de cada grupo comparado con t test $p^{**} < 0.05$; GSH inicial (n: 5) 3 meses (n: 4) y 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

En glutatión oxidado (GSSG) se esperaba que las muestras tuvieran una disminución en su concentración como indicador de estrés oxidante, en nuestro estudio el GSSG inicial (0.06 %) y de 3 meses (0.06%) no detectaron diferencias significativas, en comparación al de la concentración de los 6 meses (295 %) en donde se encontró un aumento significativo en relación a las muestras previas, estos resultados no han sido reportado para este modelo, específicamente la figura lo hace visible (Figura 12).

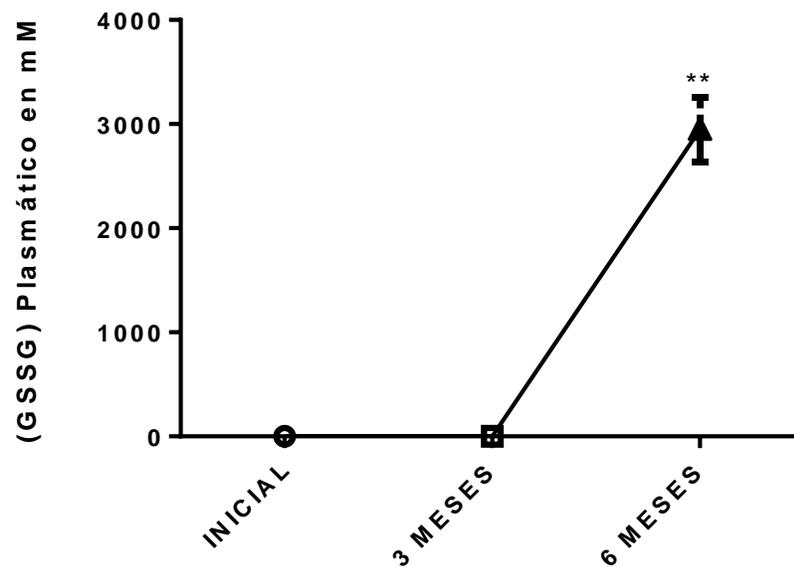


Figura 12. Concentración de glutatión oxidado en pacientes con Parkinson. Cada punto representa el promedio y el error estándar de mM de GSSG de cada grupo comparado con t test $p^{**} < 0.05$; GSSG inicial (n: 5) 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

La relación GSH/GSSG en las muestras como un claro indicador de mejoría del estado redox en los pacientes, detectó un aumento significativo hasta a los 6 meses en la figura 13 se puede observar lo reportado; lo que podría relacionarse con diversos factores como ejercicio, tratamientos concomitantes entre otros que en este estudio no fueron analizados.

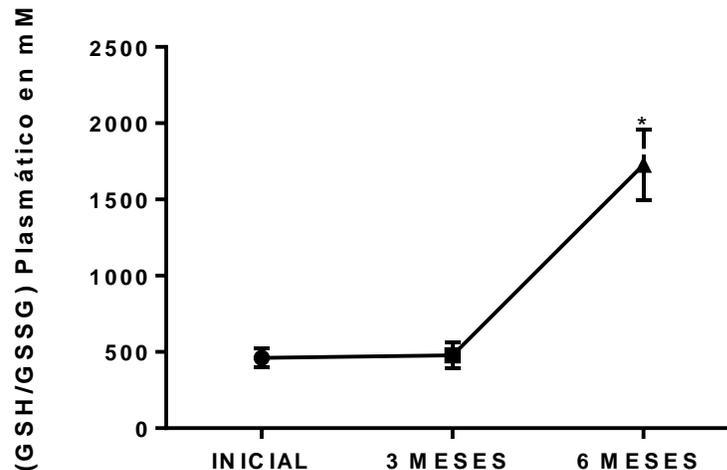


Figura 13. Relación de GSH/ GSSG en pacientes con Parkinson. Cada punto representa el promedio y el error estándar de mM de GSH/GSSG de cada grupo comparado con t test $p^{**} < 0.05$; inicial (n: 5) 3 meses (n: 4) 6 meses(n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

Como anteriormente citamos los antioxidantes son un punto clave en la defensa contra el estrés oxidante por lo que la dependencia del cobre en la enzimas antioxidantes permiten evaluar si la actividad en estas se modifica con respecto al tiempo del tratamiento; la concentración de (Cu/ZnSOD) en las muestras inicial (39%) disminuyó en relación a los tres meses (30%), es decir no tuvieron diferencias significativas durante este periodo de tiempo, en comparación con los resultados del 6to mes (59%) en la actividad ;se encontró un aumento significativo, es decir la actividad de la enzima aumento con respecto al tiempo (figura 14).

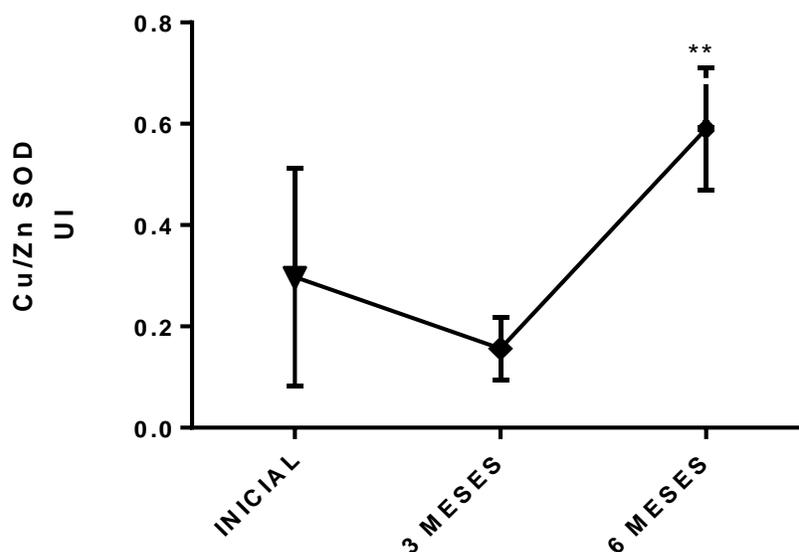


Figura 14. Actividad de Cu/ZnSOD en pacientes con Parkinson Cada punto representa el promedio y el error estándar de UI de SOD1 de cada grupo comparado con t test $p^{**} < 0.05$; SOD inicial (n: 5) 3 meses (n: 4) y 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

La ceruloplasmina es otra enzima dependiente de cobre que permite la oxidación de hierro sin la liberación de especies reactivas, está siendo la principal función a medir en el estudio además de ser la principal transportadora del cobre cerebral en el líquido cefalorraquídeo (Boll et al, 1999), además la disminución de la actividad está asociada con funciones neuroprotectoras lo que la liga con la enfermedad de Parkinson (Otagiri et al, 1999). El análisis de la actividad de esta enzima arrojó para el primer mes un 341% disminuyendo para el tercer mes hasta un 333%. Encontrando una disminución significativa, para los 6 meses con un 415%, esto podría estar relacionado directamente con la disminución en la producción de especies reactivas.

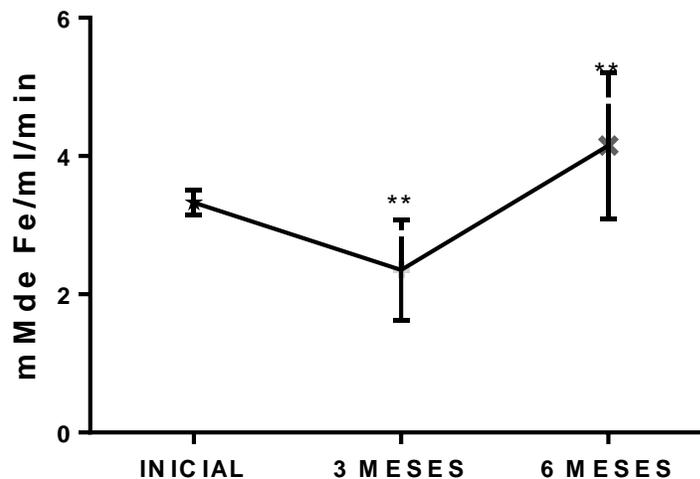


Figura 15. Actividad ferróxidasa de la Cp en plasma en pacientes con EP. Cada punto representa el promedio y el error estándar de mM de GSH de cada grupo comparado con t test ** $p < 0.05$. A) inicial (n: 5) y 3 meses (n: 4). B) Cp3meses (n: 4) y 6 meses (n: 3). Determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

Un marcador determinante, para la Enfermedad de Parkinson es la medición de cobre y hierro, desafortunadamente la medición in vivo es imposible debido a que la obtención de tejido de los ganglios basales solo se realiza post mortem, por otra parte la medición de líquido cefalorraquídeo es complicada y muy riesgosa, por lo que la toma de muestra sanguínea es menos invasiva pero los niveles aún con una técnica validada se ven disminuidos y poco concluyentes; de esta manera se realizó el análisis en las tres formas de cuantificar al cobre durante la evolución de los pacientes. El cobre total tanto en plasma como en sangre no mostro cambios significativos durante el seguimiento de los pacientes esto se observa en la figura 16.

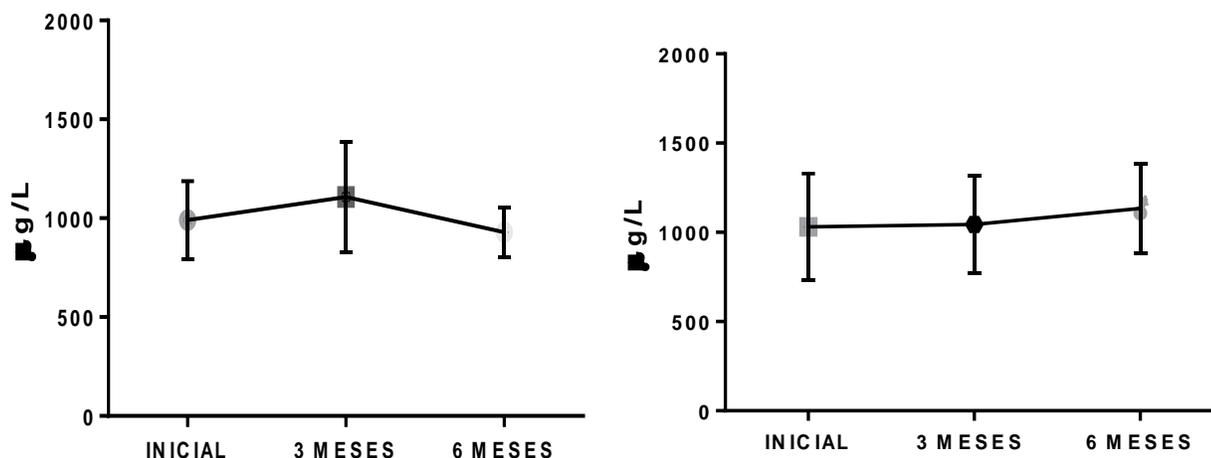


Figura 16. Concentración de cobre total en plasma y sangre en pacientes con EP. Cada punto representa el promedio y el error estándar de $\mu\text{g/L}$ cada grupo comparado con t test ** $p < 0.05$. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4), y 6 meses (n: 3). Determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

Los resultados de las concentraciones de cobre libre en plasma tampoco mostraron una disminución significativa tuvieron diferencias significativas durante el tiempo del estudio (figura 17).

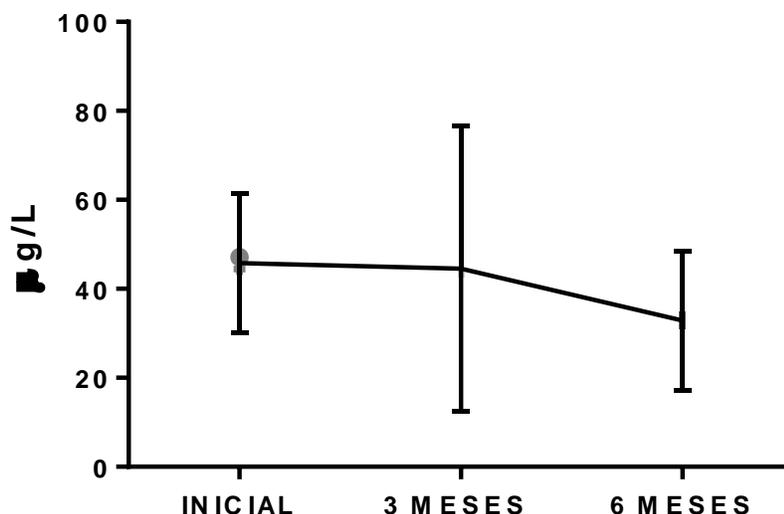


Figura 17. Concentración de cobre libre en pacientes con Parkinson. Cada punto representa el promedio y el error estándar de $\mu\text{g/L}$ de cada grupo comparado con t test ** $p < 0.05$. Inicial (n: 5) y 3 meses (n: 4) y 6 meses (n: 3). Determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

8.4 Nivel de Seguridad del suplemento

Durante todo el estudio, se valoró la ausencia de hepatotoxicidad asociada a la ingesta del suplemento con sulfato de cobre por medio de un perfil hepático de cuatro elementos. En el primer mes de seguimiento, el primer paciente fue dado de baja por falta de compromiso y dejar de asistir a las visitas programadas. En el tercer mes un paciente más abandonó el estudio por complicaciones en el páncreas, no relacionado con nuestro protocolo clínico. En la figura 18 se observa que en la enzima Alanino Amino Transferasa éstas se encuentran dentro del rango considerado como normal, es decir que no existen evidencias de daño hepático.

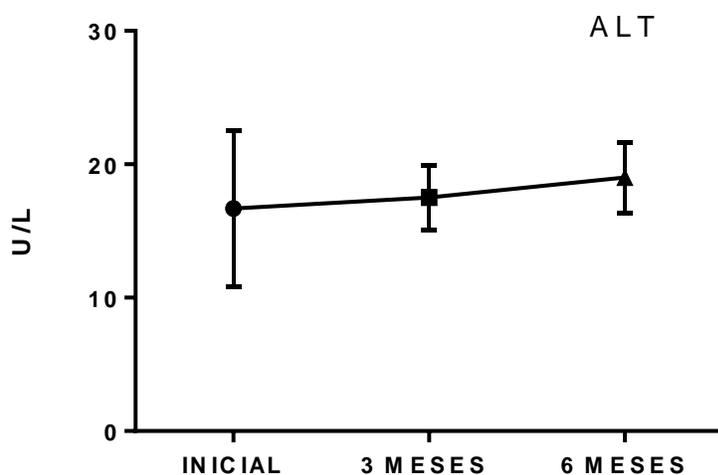


Figura 18. Concentración de Alanino aminotransferasa en pacientes con Parkinson. Cada punto representa el promedio y el error estándar de UI de ALT de cada grupo comparado con t test. ** $p < 0.05$; inicial (n: 5) 3 meses (n: 4), 6 meses (n: 3). Determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

La otra enzima determinada en el estudio para garantizar el buen estado del hígado de los pacientes fue la Aspartato Aminotransferasa y su análisis demostró también que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango considerado como normal, (Figura 19) por lo que se aseguró que los pacientes no tuvieron daño hepático durante el estudio.

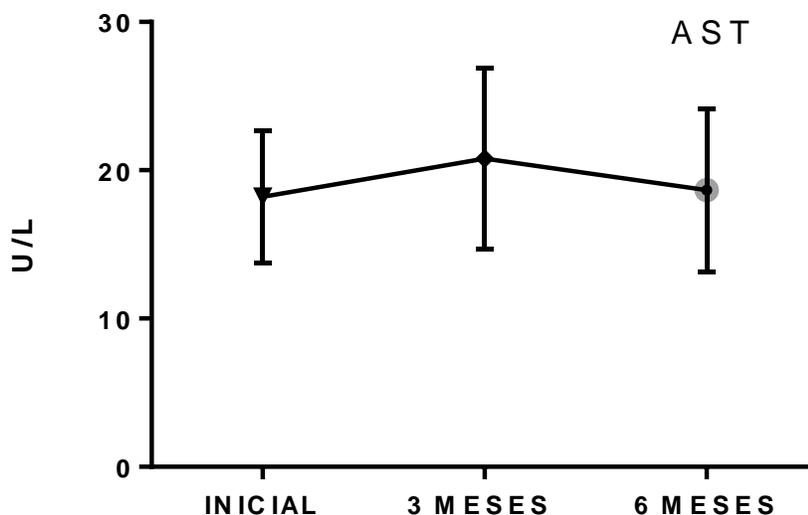


Figura 19. Concentración de Aspartato aminotransferasa en pacientes con Parkinson. Cada barra representa el promedio y el error estándar de UI de AST de cada grupo comparado con t test. ** $p < 0.05$; AST inicial (n: 5), 3 meses (n: 4), 6 meses (n: 3). Determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

La concentración de albúmina y proteínas totales en los pacientes durante el estudio no mostraron cambios significativos mediante la prueba T. Los valores se encuentran dentro del rango considerado como normal para sujetos sanos es decir no encontramos evidencia en este estudio de alguna alteración en estas proteínas.

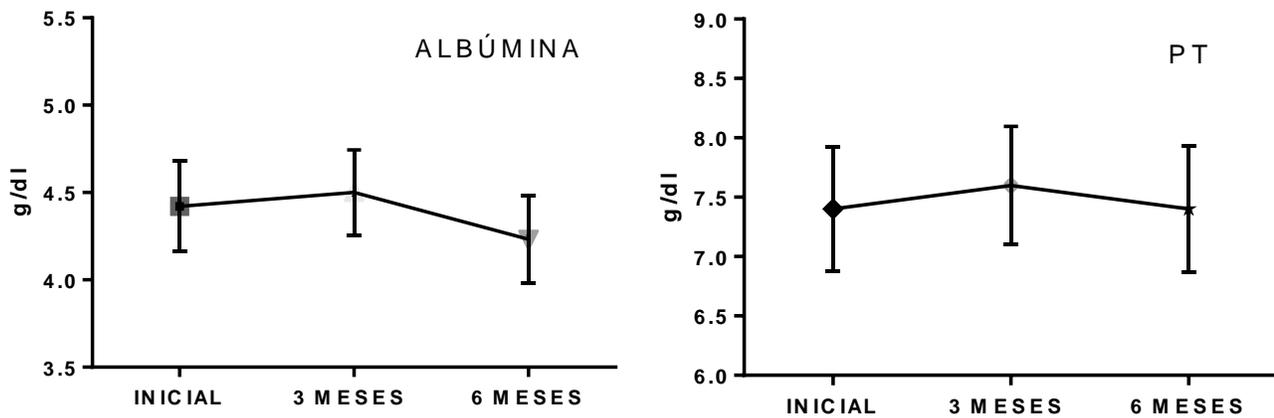


Figura 20. Concentración de Albúmina y Proteínas totales en pacientes con Parkinson. Cada barra representa el promedio y el error estándar de UI de ALB y PT de cada grupo comparado con t test. ** $p < 0.05$; PT inicial y ALB inicial (n: 5), 3 (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

8.5 Resultados pacientes suplementados vs placebo

Se determinó la variación de la concentración de GSH entre los grupos durante las visitas, de estos se hace evidente que el comportamiento en ambos grupos es muy similar en las tres determinaciones.

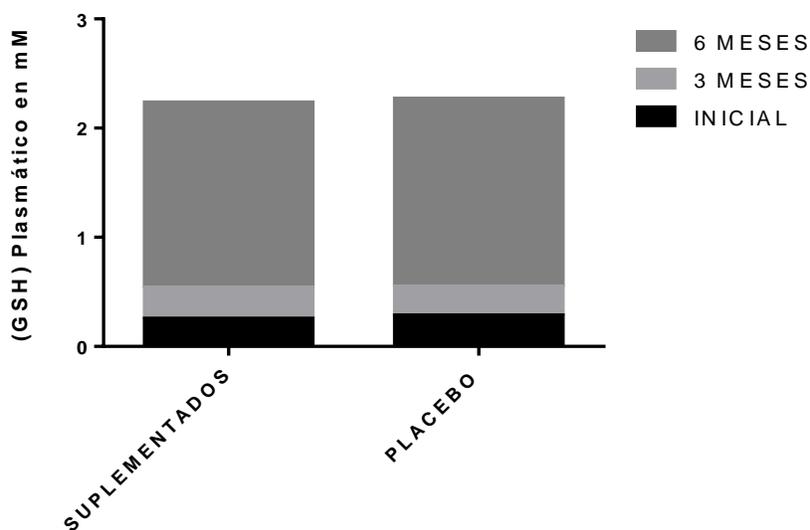


Figura 21. Suplementados vs Placebo GSH. Cada barra representa el promedio mM de GSH de cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

Los valores de glutatión oxidado se mantuvieron bajos hasta el tercer mes pues durante el sexto hubo un aumento considerable en ambos grupos de tal manera que no es posible visibilizar los resultados iniciales y de tres meses. En el grupo placebo se observa un ligero aumento en comparación con el grupo de pacientes suplementados. Figura 22.

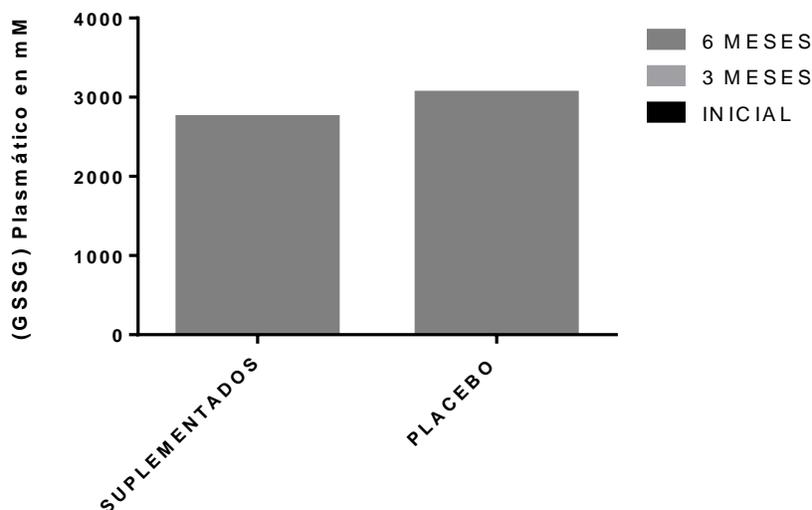


Figura 22. Suplementados vs Placebo GSSG. Cada barra representa el promedio mM de GSSG de cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de EDTA.

La relación de GSH/GSSG en el análisis de las muestras de los pacientes determinó que los pacientes suplementados a los 6 meses tuvieron una disminución en la concentración de los antioxidantes en comparación con los pacientes que tomaron el placebo.

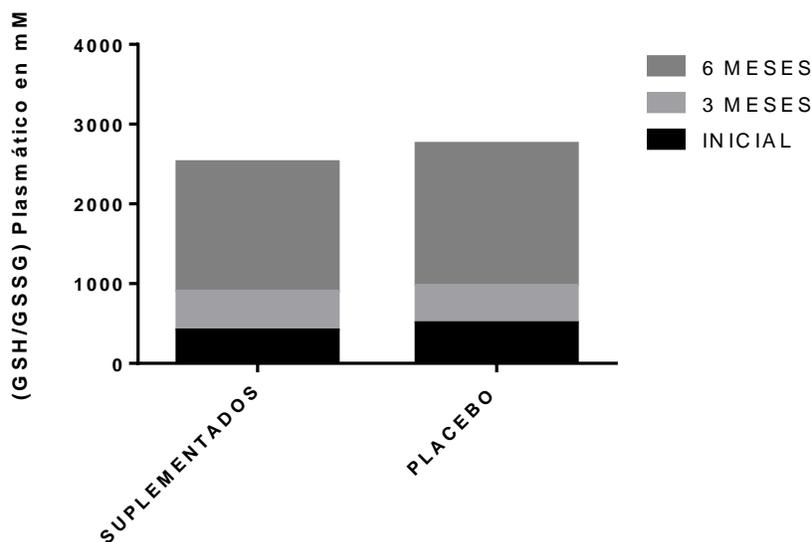


Figura 23. Relación de GSH/GSSG para Suplementados vs Placebo. Cada barra representa el promedio mM de GSH/GSSG de cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

La actividad de la enzima SOD en los pacientes suplementados con cobre, muestran a largo plazo un aumento de su actividad, de manera que la actividad dismutasa de la enzima es aumentada hasta el sexto mes, esto se hace evidente en la figura 34.

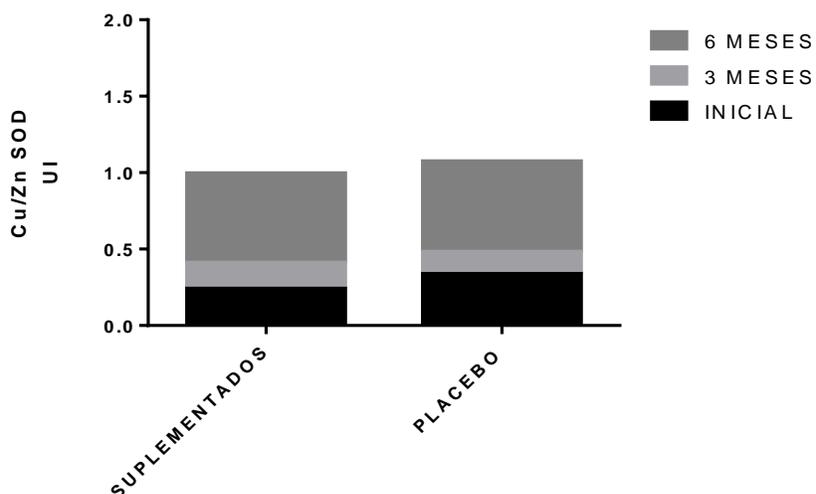


Figura 24. Actividad Cu/Zn SOD en Suplementados vs Placebo. Cada barra representa el promedio UI de Cu/ZnSOD de cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

La actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina presenta un aumento en la actividad a partir del tercer mes y al sexto mes el aumento persiste en el grupo de pacientes que fueron administrados con suplemento a diferencia de los pacientes que se administraron con placebo. (Ver la figura 25).

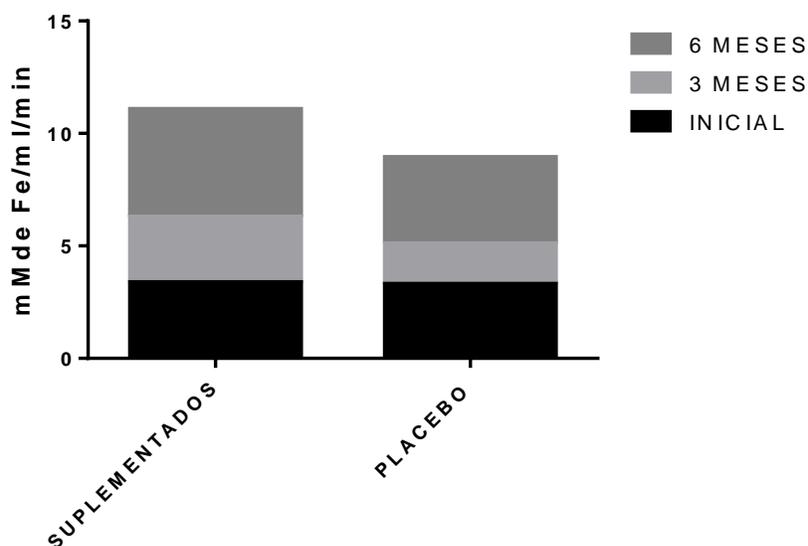


Figura 25. Actividad de la ceruloplasmina para Suplementados vs Placebo. Cada barra representa el promedio mM de Fe/ml/min de cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

Los resultados de cobre total en plasma en los pacientes suplementados con cobre, no muestran claras diferencias ni a corto ni a largo plazo, como se puede ver en la figura 36. Con referencia al cobre total en sangre se observan ligeros cambios a corto plazo (al tercer mes) en los pacientes suplementados con cobre, en cuanto a los pacientes con placebo su concentración se mantiene estable durante el tiempo del estudio.

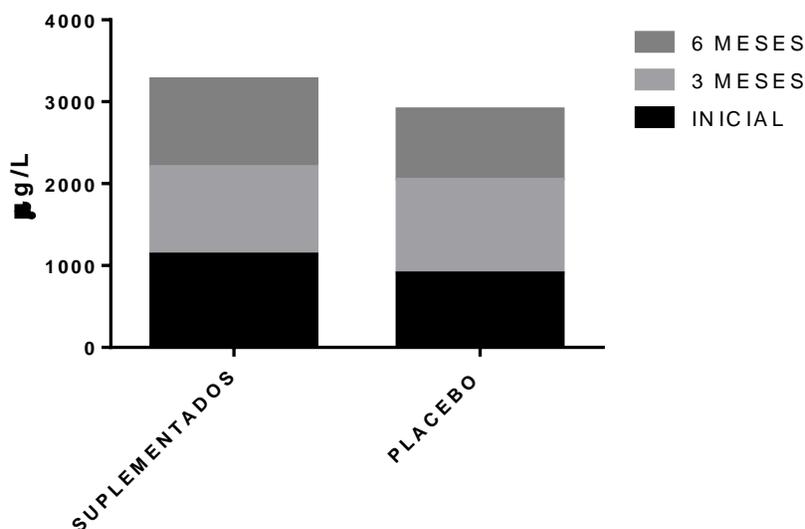


Figura 26. Concentración de cobre total en plasma para suplementados vs Placebo. Cada barra representa el promedio µg/L de cobre total en plasma cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

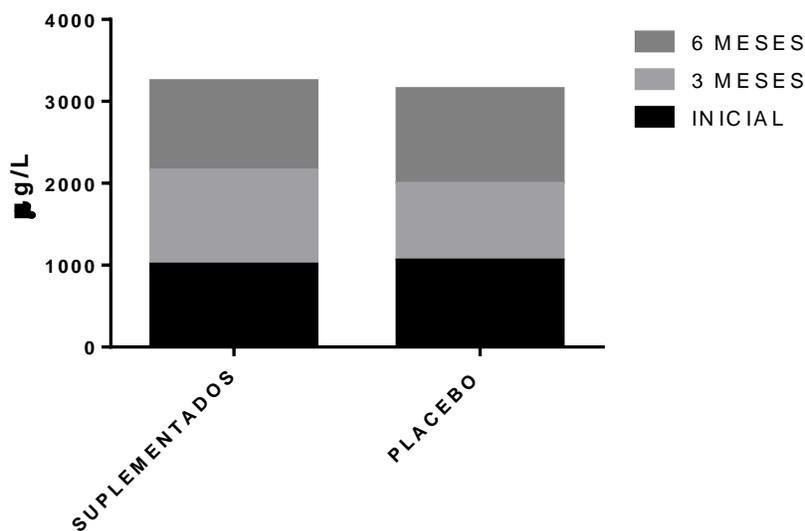


Figura 27. Concentración de cobre total en sangre para Suplementados vs Placebo. Cada barra representa el promedio µg/L de cobre total en sangre cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

El marcador principal en la concentración de cobre es el cobre libre, ya que en la bibliografía se demuestra que en los pacientes con Parkinson este está aumentado; los datos reflejan que el grupo suplementado con cobre obtuvo una disminución desde el tercer mes y disminuye aún más al sexto mes después de la toma, para el grupo placebo las concentraciones se mantienen estables durante el estudio. (Figura 28).

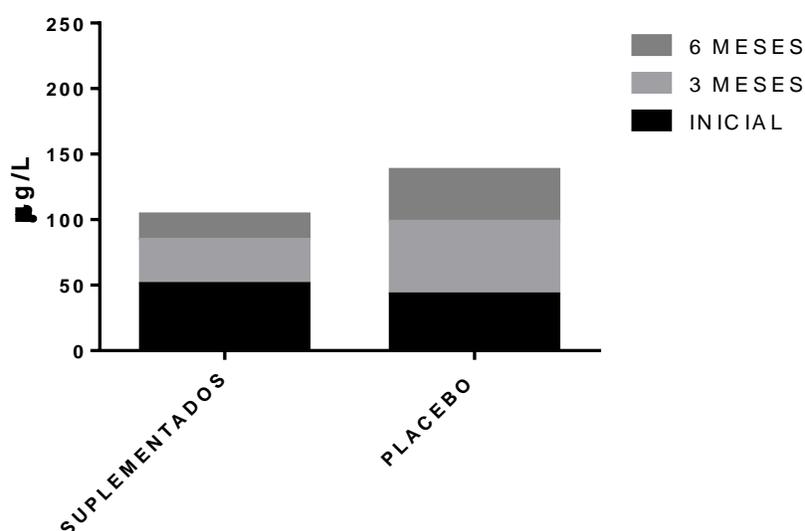


Figura 28. Cantidad de cobre libre para Suplementados vs Placebo. Cada barra representa el promedio µg/L de cobre total en sangre cada grupo comparado. Inicial (n: 5), 3 meses (n: 4) 6 meses (n: 3), determinadas por triplicado. Las muestras se realizaron en presencia de heparina.

9. DISCUSIÓN

9.1 Concentración plasmática de GSH/GSSG

En este estudio piloto se determinaron las actividades de metaloproteínas y las concentraciones de cobre libre y total. Hasta el momento debido al número de muestra tan pequeño y el periodo de estudio tan corto, los resultados son parciales y no permiten decir con certeza si el suplemento tiene efectos positivos en estos biomarcadores a largo plazo, por lo que el estudio solo es presentado para futuros análisis.

El resultado de los estudios en los niveles de GSH en plasma de pacientes con Enfermedad de Parkinson que fueron suplementados con sulfato de cobre, arrojaron una disminución de manera casi imperceptible en los niveles de los primeros meses, no así para el sexto mes ya que el análisis enzimático mostró un incremento significativo en los niveles de GSH. A pesar de que está aumentado este parámetro bioquímico, este resultado no es concluyente ya que los pacientes controles que fueron suplementados con placebo también mostraron aumento en las concentraciones de este antioxidante, por lo que este estudio inicial no relaciona la concentración de este antioxidante con la suplementación con cobre. Esta falta de diferencia podría estar relacionada a la administración de Levodopa ya que ambos grupos mantuvieron dicho tratamiento. Estudios clínicos anteriores reportan que las concentraciones de glutatión reducido en los pacientes con enfermedad de Parkinson se ven disminuida debido al desequilibrio del estrés oxidante como consecuencia de la edad, y a patologías como, la diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares por lo que es tomado como un marcador del estatus redox (Bharat et al,2002; Bloomer et al, 2005).

Respecto a los resultados de glutatión en su forma oxidada (GSSG), el análisis reflejó valores por debajo de cero en las muestras inicial y de tres meses, de manera contraria en el sexto mes la concentración de GSSG fue mayor, sugiriendo que el aumento se debe a el estrés oxidante y dicha suplementación de sulfato de cobre podrían no estar relacionado con las variación en la concentración de GSSG debido a que los pacientes suplementados con placebo también aumentaron los niveles de GSSG en el sexto mes; este aumento en la concentración también podría estar relacionado a el ajuste de dosis del tratamiento (Levodopa) durante el estudio, ya que se ha reportado que este el tratamiento de primera elección es un generador importante de especies reactiva de oxígeno (Elokda et al, 2010)

La relación entre el GSH/GSSG juega un papel importante en la fisiología de la célula por lo que un desequilibrio de este sistema enzimático podría repercutir en el aumento o disminución de la vaina mielina y por lo tanto en la buena conducción de los impulsos nerviosos (Maher, 2005). La disminución de esta relación GSH/GSSG en los pacientes

suplementados de este estudio podría sugerir una mejoría en el estado redox mediante una disminución las cantidad de especies reactivas en la células, pero de manera equivalente los resultados de los pacientes administrados con placebo misma como un posible efecto relacionado con el suplemento.

9.2 Actividad de las enzimas dependientes de cobre

Los valores de la actividad de la SOD1 que se determinaron en la visita inicial muestran una disminución a corto y esto se relaciona con el decremento de las especies reactivas aunque la disminución de las actividad también puede estar asociada a el aumento en la taza de las especies reactivas dando como consecuencia una inhibición de la enzima (Bray et al., 1974) de manera contraria a los 6 meses con la administración del suplemento se obtuvo un aumento del 59% lo que se podría a asociar a un aumento en las especies reactivas que generaron un aumento en la actividad para poder contrarrestar el efecto del estrés oxidante a largo plazo. También estos resultados revelan que es posible recuperar e incluso aumentar la actividad hasta en un 29% de esta y a pesar de que es un estudio piloto dicho aumento no estaría vinculado con el tratamiento de cobre, ya que los resultados de los pacientes que fueron administrados con placebo también presentan el aumento en la actividad de la SOD1 en el mismo periodo de tiempo. Como lo afirman varios estudios donde la suplementación con cobre de 8 mg por un periodo de 6 meses en personas sanas no tuvieron ningún cambio significativo en este marcador (Rojas-Sobarzo et al., 2013). Esto contrapone a lo presentado por otro equipo de investigación que reportó que en un modelo murino donde se administraban cobre se daba como efecto la elevación en la actividad de la SOD1 (Martínez-Lazcano et al., 2014), y de la misma contrapone al estudio clínico del año 2012 que suplementó con cobre a pacientes con enfermedades cardiovasculares y determinó que había un aumento en la actividad de esta enzima (Disilvestro, Joseph, Zhang, Raimo, & Kim, 2012b). El aumento de la actividad puede estar vinculado con el tipo de muestra y un aumento en los factores que desencadenan el estrés oxidante, además del número de muestras presentes en el estudio.

Múltiples estudios han reportado una disminución de la actividad de ferroxidasa de la ceruloplasmina en los pacientes con la enfermedad de Parkinson, en comparación con un grupo control (Boll et al, 2011; Kristinsson, et al,1999). Ya que para su funcionamiento necesita del cobre, se analizaron las muestras y se encontró que la actividad de los pacientes suplementados con cobre tuvieron un aumento de la actividad de la ceruloplasmina (6 meses) mientras que los pacientes tratados con placebo mantuvieron la

actividad estable. Estos datos que aunque no son concluyentes se puede confirmar que el uso de este suplemento de cobre podría reactivar la función oxidasa sin liberar las especies reactivas a la célula permitiendo depurar la concentración de fierro. Contrastando lo que Diviestro reportó en pacientes con enfermedades cardiovasculares tratados con cobre, en donde la actividad de esta enzima mostró un aumento significativo (Disilvestro et al, 2012).

9.3 Concentración de cobre total y libre

Las concentraciones de cobre libre inicial en los pacientes suplementados con cobre fue de 505 % para a los tres meses hubo una disminución de 168 % y el análisis a los 6 meses el porcentaje fue de 19 %, a diferencia de los pacientes que se administraron con placebo, los cuales presentaron concentraciones de cobre libre estables durante todo el estudio. Y a pesar de que el análisis no es concluyente debido al tamaño de la muestra y la duración se muestra un avance de los posibles efectos de la administración de cobre, lo que podría disminuir la cantidad de especies reactivas que interactúan en el sistema del paciente. Estos resultados sugieren que la suplementación con cobre podría asociarse al detrimento de las concentraciones de cobre libre. Esto en oposición a lo que reportó Rojas-Sobarzo (2013), donde los niveles de cobre libre en los pacientes suplementados con cobre por seis meses no tuvieron una disminución significativa. Asimismo, Milne reporta que el suplemento de cobre no modifica las concentraciones de cobre libre, ni de la ceruloplasmina en plasma y los considera biomarcadores poco confiables (Milne DB1, 1996). Nuestros resultados sin embargo, no pueden aún considerarse como definitivos debido a nuestro tamaño de muestra. El cobre total tanto en sangre como en plasma no tuvo modificaciones que pudieran considerarse de importancia tanto en el grupo suplementado con cobre como los de placebo.

9.4 Concentración de transaminasas hepáticas y estudios complementarios

Los estudios de seguridad al paciente se evaluaron mediante un perfil hepático de cuatro elementos; transaminasas, albúmina y proteínas totales. No obstante, estudios clínicos anteriores mostraron que a una dosis de 8 mg /24hrs, no se presentan reacciones adversas ni hepatotoxicidad (Rojas-Sobarzo et al., 2013). De las dos enzimas analizadas para descartar hepatotoxicidad la Alanino Aminotransferasa (ALT) y la Aspartato amino transferasa (AST) se mantuvieron en rangos considerados como normales lo que comprueba que el suplemento no presento efectos negativos relacionados con la administración durante este periodo.

Son pocos los estudios relacionan la concentración de albúmina con la Enfermedad de Parkinson, pero en ellos se ha determinado que la concentración de albúmina sérica en los pacientes esta disminuido en comparación con el grupo control y que además estas concentraciones están relacionadas a la evolución de la patología (Wang et al., 2017). Existen estudios que aseguran que la albúmina tiene propiedades antioxidantes, por lo que puede ejercer efectos de neuroprotección aunque el mecanismo aún no está claro (Zhang et al., 2012) Por lo que nuestros resultados preliminares no demostraron cambio durante el estudio como se había hipotetizado. Los resultados demuestran también que el contenido de proteínas totales tampoco cambió tras seis meses de tratamiento por efecto de la administración crónica de cobre,

10. CONCLUSIONES

El presente estudio es un protocolo piloto por lo tanto hasta el momento debido al número de muestra tan pequeño y el periodo de estudio tan corto, los resultados son parciales y no permite concluir si el suplemento tiene algún efecto directo en las metaloproteínas analizadas.

1. La administración de sulfato de cobre en pacientes mostró un aumento en la concentración del GSH.
2. La concentración de GSSG no disminuyó, por el contrario se elevó lo que puede sospechar que el cobre podría no ser el responsable de este efecto.
3. La actividad de la SOD1 no mostró un aumento después de la administración de cobre por 6 meses.
4. La actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina se reactivó con la suplementación con cobre a seis meses de tratamiento.
5. El cobre en su forma libre manifestó una disminución en la concentración y está podría estar relacionada directamente con la administración del sulfato de cobre hasta los 6 meses.
6. Las concentraciones del cobre total en plasma y en sangre no presentaron cambios en relación al tratamiento con cobre.
7. No se presentó alteración hepática a la dosis empleada del suplemento.
8. La albúmina sérica no cambió su concentración durante el estudio.

11. PERSPECTIVA

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, será de gran importancia aumentar el número de pacientes que sean suplementados con cobre, con el propósito de hacer más confiables los datos y de obtener una clara idea de cómo es que la mayoría de los pacientes reacciona ante el tratamiento.

1. Realizar análisis de marcadores finales de estrés oxidante, para garantizar que el cobre administrado funciona como un reductor de este (Lipoperoxidación. T-bars, entre otros).
2. Medir la cantidad de ceruloplasmina en plasma después de la administración de cobre, ya que la actividad dependerá también de la cantidad.
3. Hacer mediciones de ferritina y transferrina séricas durante en estudio, a manera de monitorear indirectamente el metabolismo del hierro.
4. Realizar la identificación de proteínas de choque térmico durante el estudio, para usarse como marcador de estrés oxidante y su progresión.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Arnaud P, Gianazza E, M. L. (1988). Ceruloplasmin. *Methods Enzymol*, 163:441-52.
- Azher, S. N., & Jankovic, J. (2005). Camptocormia: pathogenesis, classification, and response to therapy. *Neurology*, 65(3), 355–9.
<http://doi.org/10.1212/01.wnl.0000171857.09079.9f>
- Baccarini, D. P. (1978). Coupled oxidation of NADPH wigy thiols at neutral pH. *Arch. Biochem*, 191: 315-357.
- Balderas, I., Moreno-Castilla, P., & Bermudez-Rattoni, F. (2013). Dopamine D1 receptor activity modulates object recognition memory consolidation in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. *Hippocampus*, 23(10), 873–878.
<http://doi.org/10.1002/hipo.22143>
- Betancourt-Rule María Cristina; Miguel; Ortiz-Muñiz, R. (2000). *Bioquimia. Bioquimia* (Vol. 25). Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Retrieved from
<http://www.redalyc.org/html/576/57611797001/>
- Bharat S1, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN, A. J. (2002). Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology*, 479–86.
- Bloem, B. R. (1992). Postural instability in Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 94 Suppl, S41-5. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320515>
- Bloomer RJ1, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, C. L. (n.d.). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*, (2), 276–85.
- Boll, M.-C., Bayliss, L., Vargas-Cañas, S., Burgos, J., Montes, S., Peñaloza-Solano, G., ... Alcaraz-Zubeldia, M. (2014). Clinical and biological changes under treatment with lithium carbonate and valproic acid in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 340(1–2), 103–108.
<http://doi.org/10.1016/j.jns.2014.03.005>
- Boll, M.-C., Sotelo, J., Otero, E., Alcaraz-Zubeldia, M., Rios, C., Suarez ', N. V., & Mexico, M. (2011). Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease.
- Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., Murillo-Bonilla, L., & Rios, C. (2003a). Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochemical Research*, 28(5), 699–703.
<http://doi.org/10.1023/A:1022853531855>
- Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., Murillo-Bonilla, L., & Rios, C. (2003b). Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochemical Research*, 28(5), 699–703.
<http://doi.org/10.1023/A:1022853531855>
- Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., Murillo-Bonilla, L., & Rios, C. (2003c). Raised nitrate concentration and low SOD activity in the CSF of sporadic ALS patients. *Neurochemical Research*. <http://doi.org/10.1023/A:1022853531855>
- Boll, M. C., Alcaraz-Zubeldia, M., Montes, S., & Rios, C. (2008). Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NOx content in the CSF. A different

- marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochemical Research*, 33(9), 1717–1723. <http://doi.org/10.1007/s11064-008-9610-3>
- Boll, M. C., Sotelo, J., Otero, E., Alcaraz-Zubeldia, M., & Rios, C. (1999). Reduced ferroxidase activity in the cerebrospinal fluid from patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 265(3), 155–8. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00221-9](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00221-9)
- Boveris, A., Oshino, N. y Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxyde. *Biochem. J.*, 128: 617-630.
- Boveris, A., Cadenas, E., & Stoppani, A. O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 156(2), 435–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/182149>
- Bray, R. C., Cockle, S. A., Fielden, E. M., Roberts, P. B., Rotilio, G., & Calabrese, L. (1974). Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 139(1), 43–48. <http://doi.org/10.1042/bj1390043>
- Cahan, L. D., Young, R. F., & Li, F. (2018). Radiosurgical Pallidotomy for Parkinson's Disease. *Progress in Neurological Surgery*, 33, 149–157. <http://doi.org/10.1159/000481083>
- CENETEC. (2010). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA*. Retrieved from www.cenetec.salud.gob.mx
- Clarke, C., & Moore, A. P. (2005). Parkinson's disease. *Clinical Evidence*, (13), 1658–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135305>
- Cohen, G. (1984). Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology*, 5(1), 77–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326007>
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. <http://doi.org/S0896627303005683> [pii]
- Davies, K. M., Bohic, S., Carmona, A., Ortega, R., Cottam, V., Hare, D. J., ... Double, K. L. (2014). Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 35(4), 858–866. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.034>
- de la Asuncion, J. G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F. V., ... Viña, J. (1996). Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(2), 333–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641567>
- De Riquer, A. I. (2013). El trastorno de conducta del sueño rem. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(3), 463–472. [http://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70182-2](http://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70182-2)
- Deno, P. C. y I.H., G. (1982). Free radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bristanded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin. *Toxicol*, 311–332.
- Dexter, D. T., Wells, F. R., Lee, A. J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1989). Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 52(6), 1830–1836. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb07264.x>

- DGIS. (2010). Defunciones cifras oficiales definitivas. Retrieved August 29, 2017, from http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/bdc_defunciones_gobmx.htm
- Disilvestro, R. A., Joseph, E. L., Zhang, W., Raimo, A. E., & Kim, Y. M. (2012a). A randomized trial of copper supplementation effects on blood copper enzyme activities and parameters related to cardiovascular health. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(9), 1242–1246. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.02.002>
- Disilvestro, R. A., Joseph, E. L., Zhang, W., Raimo, A. E., & Kim, Y. M. (2012b). A randomized trial of copper supplementation effects on blood copper enzyme activities and parameters related to cardiovascular health. *Metabolism: Clinical and Experimental*. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.02.002>
- Donaldson J. and Barbeau. (1985). Manganese neurotoxicity: possible clues to the etiology of human brain disorders, in Neurology and Neurobiology. *Metal Ions in Neurology and Psy- Chiatry, Vol. 15*(New York.), 259–285.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Review*, 82, 47–95. <http://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Elokda, A., DiFrancisco-Donoghue, J., Lamberg, E. M., & Werner, W. G. (2010). Effects of exercise induced oxidative stress on glutathione levels in Parkinson's disease on and off medication. *Journal of Neurology*, 257(10), 1648–53. <http://doi.org/10.1007/s00415-010-5584-6>
- Figueiras-Méndez, R., Magariños-Ascone, C., Regidor, I., del Alamo-De Pedro, M., Cabañes-Martínez, L., & Gómez-Galán, M. (2009). [Deep brain stimulation: 12 years' experience and 150 patients treated with a follow-up of over a year]. *Revista de Neurología*, 49(10), 511–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19859873>
- Francois, J. G., Vingerhoets, Schulzer, M., Calne, D. B., & Snow, B. J. (1997). Which clinical sign of Parkinson's disease best reflects the nigrostriatal lesion? *Annals of Neurology*, 41(1), 58–64. <http://doi.org/10.1002/ana.410410111>
- Freeman, B. A., & Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(5), 412–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6290784>
- Gelb, D. J., Oliver, E., & Gilman, S. (1999). Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, 56(1), 33. <http://doi.org/10.1001/archneur.56.1.33>
- Giovannoni, G., van Schalkwyk, J., Fritz, V. U., & Lees, A. J. (1999). Bradykinesia akinesia inco-ordination test (BRAIN TEST): an objective computerised assessment of upper limb motor function. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 67(5), 624–9. <http://doi.org/10.1136/jnnp.67.5.624>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K., & Braak, H. (2012). 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology*, 9(1), 13–24. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.242>
- Goetz, C. G. (1986). Charcot on Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 1(1), 27–32. <http://doi.org/10.1002/mds.870010104>
- Goetz, C. G., Poewe, W., Rascol, O., & Sampaio, C. (2005). Evidence-based medical

- review update: Pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Movement Disorders*, 20(5), 523–539. <http://doi.org/10.1002/mds.20464>
- Grisham, M. B., Hernandez, L. A., & Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *The American Journal of Physiology*, 251(4 Pt 1), G567-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3020994>
- Grolez, G., Moreau, C., Sablonnière, B., Garçon, G., Devedjian, J.-C., Meguig, S., ... Devos, D. (2015). Ceruloplasmin activity and iron chelation treatment of patients with Parkinson's disease. *BMC Neurology*, 15, 74. <http://doi.org/10.1186/s12883-015-0331-3>
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, 344(8924), 721–724. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92211-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92211-X)
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634–1658. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>
- Halliwell, B. (2009). Free Radicals and Antioxidants: A Personal View. *Nutrition Reviews*, 52(8), 253–265. <http://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1994.tb01453.x>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*.
- Hanaki, A., & Odani, A. (2007). Transport of Cu(II) from an albumin mimic peptide, GlyGlyHisGly, to histidine and penicillamine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(10), 1428–1437. <http://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.05.014>
- Hare, D. J., & Double, K. L. (2016). Iron and dopamine: A toxic couple. *Brain*, 139(4), 1026–1035. <http://doi.org/10.1093/brain/aww022>
- Hellman, N. E., & Gitlin, J. D. (2002). C <scp>ERULOPLASMIN</scp> M <scp>ETABOLISM AND</scp> F <scp>UNCTION</scp>. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 439–458. <http://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457>
- Herrero, A., & Barja, G. (1997). ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29(3), 241–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298709>
- Hink, H. U., Santanam, N., Dikalov, S., McCann, L., Nguyen, A. D., Parthasarathy, S., ... Fukai, T. (2002). Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(9), 1402–1408. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000027524.86752.02>
- Hough, M. A., & Hasnain, S. S. (2003). Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 1.15 Å. *Structure*, 11(8), 937–946. [http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00155-2](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00155-2)
- Hozumi, I., Hasegawa, T., Honda, A., Ozawa, K., Hayashi, Y., Hashimoto, K., ... Inuzuka, T. (2011). Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 303(1–2), 95–99. <http://doi.org/10.1016/j.jns.2011.01.003>
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L., & Lees, A. J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis

- of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 55(3), 181–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1564476>
- Ingrid Estrada-Bellmann, B., & Héctor Ramón Martínez Rodríguez, B. (2011). Diagnostico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson. *Avances*, 25(8). Retrieved from http://www.cmzh.com.mx/media/108952/rev_25_diagn_stico_y_tratamiento_de_la_enfermedad_de_parkinson.pdf
- Iravani, M. M., & Jenner, P. (2011). Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. *Journal of Neural Transmission*, 118(12), 1661–1690. <http://doi.org/10.1007/s00702-011-0698-2>
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79(1957), 368–376. <http://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., & Agúndez, J. A. G. (2012). The relationship between Parkinson's disease and essential tremor: review of clinical, epidemiologic, genetic, neuroimaging and neuropathological data, and data on the presence of cardinal signs of parkinsonism in essential tremor. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements (New York, N. Y.)*, 2(5), 799–804. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3572635&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jones, A. A., Disilvestro, R. A., Coleman, M., & Wagner, T. L. (1997). Copper Supplementation of Adult Men: Effects on Blood Copper Enzyme Activities and Indicators of Cardiovascular Disease Risk.
- Köhler, H.-R., & Triebkorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science (New York, N. Y.)*, 341(6147), 759–65. <http://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Koller, W. C., Glatt, S., Vetere-Overfield, B., & Hassanein, R. (1989). Falls and Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 12(2), 98–105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2720700>
- Kumpulainen, J. T., & AnticarcSalonen, J. T. (1999). *Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health, and disease*. Royal Society of Chemistry. Retrieved from https://books.google.com.mx/books/about/Natural_antioxidants_and_antitumorogens.html?id=_WNRAAAAMAAJ&redir_esc=y
- L. GILAU*, R. D. G. (n.d.). FORMAREA RADICALILOR LIBERI IN SISTEME BIOLOGICE SI MECANISME ENZIMATICE DE NEUTRALIZARE. Retrieved September 11, 2017, from <http://www.scribub.com/medicina/FORMAREA-RADICALILOR-LIBERI-IN52862.php>
- Lan, A. P., Chen, J., Chai, Z. F., & Hu, Y. (2016). The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. *BioMetals*, 29(4), 665–678. <http://doi.org/10.1007/s10534-016-9942-4>
- Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979–980. <http://doi.org/10.1126/science.6823561>

- Levine, C., Fahrbach, K., Siderowf, A., Estok, R., Ludensky, V., & Ross, S. (2003). Diagnosis and Treatment of Parkinson's Disease: A Systematic Review of the Literature: Summary. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11895/>
- Lücking, C. B., Dürr, A., Bonifati, V., Vaughan, J., De Michele, G., Gasser, T., ... Brice, A. (2000). Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England Journal of Medicine*, *342*(21), 1560–7. <http://doi.org/10.1056/NEJM200005253422103>
- Maher, P. (2005). The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews*, *4*(2), 288–314. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2005.02.005>
- Martin, W. E., Loewenson, R. B., Resch, J. A., & Baker, A. B. (1973). Parkinson's disease. Clinical analysis of 100 patients. *Neurology*, *23*(8), 783–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4578348>
- Martínez-Hernández, R., Montes, S., Higuera-Calleja, J., Yescas, P., Boll, M. C., Diaz-Ruiz, A., & Rios, C. (2011). Plasma ceruloplasmin ferroxidase activity correlates with the nigral sonographic area in Parkinson's disease patients: A pilot study. *Neurochemical Research*, *36*(11), 2111–2115. <http://doi.org/10.1007/s11064-011-0535-x>
- Martínez-Lazcano, J. C., Montes, S., Sánchez-Mendoza, M. A., Rodríguez-Páez, L., Pérez-Neri, I., Boll, M. C., ... Pérez-Severiano, F. (2014). Sub-Chronic Copper Pretreatment Reduces Oxidative Damage in an Experimental Huntington's Disease Model. *Biological Trace Element Research*, *162*(1–3), 211–218. <http://doi.org/10.1007/s12011-014-0127-0>
- Mason, R. P. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. *New York, Academic Press*, 262–165.
- Massey, V.; Shopfer, L. M.; Nishino, T. y Nishino, T. (1989). Differences in protein structure of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase revealed by reconstitution with flavin active site probes. *J. Biol. Chem.*, *264*: 10567-10573.
- Meister, A. (1995). Glutathione metabolism. *Methods in Enzymology*, *251*(C), 3–7. [http://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)51106-7](http://doi.org/10.1016/0076-6879(95)51106-7)
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, *52*, 711–760. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Melamed, E., & Djaldetti, R. (2006). Camptocormia in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, *253*(S7), vii14-vii16. <http://doi.org/10.1007/s00415-006-7004-5>
- Miller, N. J. (1998). Nonvitamin plasma antioxidants. *Methods Mol. Biol.*, *108*, 285–297. <http://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:285>
- Milne DB1, N. F. (1996). Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.*, *63*(3), 358–64.
- Minsal. (2010). *Efermedad de Parkinson. Serie Guías cónicas Minsal*. Retrieved from <http://web.minsal.cl/portal/url/item/955578f79a0cef2ae04001011f01678a.pdf>
- Miyasaki, J. M., Martin, W., Suchowersky, O., Weiner, W. J., & Lang, A. E. (2002). Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of

- Neurology. *Neurology*, 58(1), 11–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781398>
- Müller, A., Reichmann, H., Livermore, A., & Hummel, T. (2002). Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 109(5–6), 805–11. <http://doi.org/10.1007/s007020200067>
- Murphy, L. M., Strange, R. W., & Hasnain, S. S. (1997). A critical assessment of the evidence from XAFS and crystallography for the breakage of the imidazolate bridge during catalysis in CuZn superoxide dismutase. *Structure (London, England : 1993)*, 5(3), 371–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9083106>
- Nicklas, W. J., Youngster, S. K., Kindt, M. V., & Heikkila, R. E. (1987). MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sciences*, 40(8), 721–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3100899>
- Olanow C. (2002). Surgical therapy for Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, vol: 9, 31–9.
- Otagiri, M., Suzuki, S., Yoshimura, T., & Maeda, H. (1999). Nitrosothiol Formation Catalyzed by Ceruloplasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 27069–27075. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10480920
- Packer, L., & Wirtz, K. W. A. (1995). *Signalling mechanisms-- from transcription factors to oxidative stress*. Springer-Verlag.
- Parkinson J, Sherwood Neely, J. (1817). An Essay on the shaking palsy. *A Bicentenary Volume of Papers Dealing with Parkinson's Disease., Reprinted*.
- Patel, B. N., & David, S. (1997). A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 20185–20190. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.32.20185>
- Pla Casamitjana, C. F., García, S., Zárate Méndez, A., Salazar, M. H., Sauri Suárez, S., Dávalos, E. M., ... Cosmes, J. J. (2007). Calidad de vida en pacientes con Enfermedad de Parkinson y estimulación cerebral profunda. *Medicina Interna de México Volumen Med Int Mex*, 2323(1), 7–14. Retrieved from http://www.cmim.org/boletin/pdf2007/MedIntContenido01_03.pdf
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 29(13), 1583–1590. <http://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Rios, C., Alvarez-Vega, R., & Rojas, P. (1995). Depletion of Copper and Manganese in Brain after MPTP Treatment of Mice. *Pharmacology & Toxicology*, 16(5), 348–352. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1995.tb00160.x>
- Rodríguez-Violante, M., & Cervantes-arriaga, A. (2014). La escala unificada de la enfermedad de Parkinson modificada por la Sociedad de Trastornos del Movimiento (MDS-UPDRS): aplicación clínica e investigación. *Archivos de Neurociencias*, 19(3), 157–163.

- Rojas-Sobarzo, L., Olivares, M., Brito, A., Suazo, M., Araya, M., & Pizarro, F. (2013). Copper supplementation at 8 mg neither affects circulating lipids nor liver function in apparently healthy Chilean men. *Biological Trace Element Research*, 156(1–3), 1–4. <http://doi.org/10.1007/s12011-013-9823-4>
- Rubio-Osornio, M., Montes, S., Pérez-Severiano, F., Aguilera, P., Floriano-Sánchez, E., Monroy-Noyola, A., ... Ríos, C. (2009). Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP+ in rats. *Neurochemistry International*. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.01.019>
- Seiffert P, Derejczyk J, Kawa J, Marcisz C, Czernek M, et al. (2017). Frailty phenotype and the role of levodopa challenge test in geriatric inpatients with mild parkinsonian signs. *Biogerontology*, 18, 641–650.
- Shulman, L. M., Singer, C., Bean, J. A., & Weiner, W. J. (1996). Internal tremor in patients with Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 11(1), 3–7. <http://doi.org/10.1002/mds.870110103>
- Siderowf, A., & Lang, A. E. (2012). Premotor Parkinson's disease: Concepts and definitions. *Movement Disorders*, 27(5), 608–616. <http://doi.org/10.1002/mds.24954>
- Stern, M. B., Lang, A., & Poewe, W. (2012). Toward a redefinition of Parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 27(1), 54–60. <http://doi.org/10.1002/mds.24051>
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., & Finkel, T. (1995). Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science (New York, N. Y.)*, 270(5234), 296–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7569979>
- Tapiero H Townsend D Tew K. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*.
- Tarsy, D. (2006). Initial treatment of Parkinson's disease. *Current Treatment Options in Neurology*, 8(3), 224–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569381>
- Tatton, W. G., Warner, T. T., Schapira, A. H. V, Chalmers-Redman, R., Brown, D., & Tatton, N. (2003). Genetic and Environmental Factors in the Cause of Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*, 53 Suppl 3, S61-70–2. <http://doi.org/10.1002/ana.10489>.Address
- Turrens, J. F., & Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *The Biochemical Journal*, 191(2), 421–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6263247>
- Visanji, N., & Marras, C. (2015). The relevance of pre-motor symptoms in Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(10), 1205–1217. <http://doi.org/10.1586/14737175.2015.1083423>
- Wang, L., Hu, W., Wang, J., Fang, F., Cheng, G., Jiang, Y., ... Wan, Q. (2017). Impact of serum uric acid, albumin and their interaction on Parkinson's disease. *Neurological Sciences*, 38(2), 331–336. <http://doi.org/10.1007/s10072-016-2738-z>
- Williams, D. R., Watt, H. C., & Lees, A. J. (2006). Predictors of falls and fractures in

bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 77(4), 468–73.
<http://doi.org/10.1136/jnnp.2005.074070>

- Y, G. T., Kristinsson, J., Sveinbjornsdttir, S., Snaedal, J., & Johannesson, T. (1999). Copper, Ceruloplasmin, Superoxide Dismutase and Iron in Parkinson's Disease Parameters. *Pharmacology*, 239–243.
- Yapur, V. M., Bustos, M. F., González, A. S., & Negri, G. A. (2007). Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(3), 347–351. Retrieved from
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572007000300008
- Yuan, Y., Tong, Q., Zhang, L., Jiang, S., Zhou, H., Zhang, R., ... Zhang, K. (2015). Plasma antioxidant status and motor features in de novo Chinese Parkinson's disease patients. *International Journal of Neuroscience*.
<http://doi.org/10.3109/00207454.2015.1054031>
- Zhang, H. N., Guo, J. F., He, D., Lei, L. F., Wang, Y. Q., Wang, C. Y., ... Tang, B. S. (2012). Lower serum UA levels in Parkinson's disease patients in the Chinese population. *Neuroscience Letters*, 514(2), 152–155.
<http://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.077>

13. ANEXOS

Nombre del paciente o ID	ID del Centro	(dd-mm-aaaa) Fecha de la evaluación	Iniciales del evaluador
--------------------------	---------------	--	-------------------------

MDS-UPDRS Hoja de Recogida de Puntuaciones

1.A	Fuente de información	<input type="checkbox"/> Paciente <input type="checkbox"/> Cuidador <input type="checkbox"/> Paciente + Cuidador	3.3b	Rigidez – MSD	
			3.3c	Rigidez – MSI	
Parte I			3.3d	Rigidez – MID	
1.1	Deterioro cognitivo		3.3e	Rigidez – MII	
1.2	Alucinaciones y psicosis		3.4a	Golpeteo de dedos (<i>tapping</i>) – Mano dcha.	
1.3	Estado de ánimo depresivo		3.4b	Golpeteo de dedos (<i>tapping</i>) – Mano izda.	
1.4	Estado de ánimo ansioso		3.5a	Movimientos de las manos – Mano dcha.	
1.5	Apatía		3.5b	Movimientos de las manos – Mano izda.	
1.6	Manifestaciones del SDD		3.6a	Pronación-supinación – Mano dcha.	
1.6a	¿Quién está cumplimentando el cuestionario?	<input type="checkbox"/> Paciente <input type="checkbox"/> Cuidador <input type="checkbox"/> Paciente + Cuidador	3.6b	Pronación-supinación – Mano izda.	
			3.7a	Golpeteo con los dedos de los pies – Pie derecho	
1.7	Problemas de sueño		3.7b	Golpeteo con los dedos de los pies – Pie izquierdo	
1.8	Somnolencia diurna		3.8a	Agilidad con las piernas – Pierna derecha	
1.9	Dolor y otras sensaciones		3.8b	Agilidad con las piernas – Pierna izquierda	
1.10	Problemas urinarios		3.9	Levantarse de la silla	
1.11	Problemas de estreñimiento		3.10	Marcha	
1.12	Mareo al ponerse de pie		3.11	Congelación de la marcha	
1.13	Fatiga		3.12	Estabilidad postural	
Parte II			3.13	Postura	
2.1	Hablar		3.14	Espontaneidad global de movimientos	
2.2	Salvación y babeo		3.15a	Temblo postural – Mano derecha	
2.3	Masticación y deglución		3.15b	Temblo postural – Mano izquierda	
2.4	Comer/manejar cubiertos		3.16a	Temblo de acción – Mano derecha	
2.5	Vestirse		3.16b	Temblo de acción – Mano izquierda	
2.6	Higiene		3.17a	Amplitud del temblor de reposo – MSD	
2.7	Escritura		3.17b	Amplitud del temblor de reposo – MSI	
2.8	Hobbies y otras actividades		3.17c	Amplitud del temblor de reposo – MID	
2.9	Darse la vuelta en cama		3.17d	Amplitud del temblor de reposo – MII	
2.10	Temblo		3.17e	Amplitud del temblor de reposo – Labio/mandíbula	
2.11	Levantarse de la cama		3.18	Persistencia del temblor de reposo	
2.12	Marcha y equilibrio			¿Discinesias presentes?	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI
2.13	Congelación al caminar			¿Estos movimientos interfirieron con la exploración?	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI
3a	¿El paciente toma medicación?	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI		Estadios de Hoehn y Yahr	
3b	Estado clínico del paciente	<input type="checkbox"/> Off <input type="checkbox"/> On	Parte IV		
3c	¿El paciente toma levodopa?	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI	4.1	Tiempo con discinesias	
3.c1	Tiempo desde la última dosis:		4.2	Impacto funcional de las discinesias	
Parte III			4.3	Tiempo en OFF	
3.1	Lenguaje		4.4	Impacto funcional de las fluctuaciones	
3.2	Expresión facial		4.5	Complejidad de las fluctuaciones motoras	
3.3a	Rigidez - Cuello		4.6	Distonias dolorosas en estado OFF	

Escala de Hoehn & Yahr Modificada

Estadio 1

Afectación exclusivamente unilateral, sin afectación funcional o con mínima afectación.

Estadio 1,5

Compromiso unilateral más afectación axial:

Estadio 2

Afectación bilateral o axial (línea media), sin alteración del equilibrio.

Estadio 2,5

Afectación bilateral con recuperación en el test de pulsión.

Estadio 3

Alteración de los reflejos de enderezamiento (al dar vueltas o en el test de pulsión). Restricción discreta de las actividades laborales, pero puede hacer algunos trabajos. Vida independiente.

Estadio 4

Enfermedad completamente desarrollada, gravemente incapacitante. El paciente aún es capaz de caminar y permanecer en pie sin ayuda.

Estadio 4,5

El paciente no puede salir de su domicilio sin ayuda.

Estadio 5

Confinamiento en cama o silla de ruedas, a menos que se le preste asistencia.

Escala de Actividades de la Vida Diaria de Schwab & England

	Porcentaje
Completamente independiente. Capaz de realizar cualquier tarea con o sin lentitud o dificultad.....	100
Completamente independiente. Puede tardar el doble de lo normal en realizar una tarea.....	90
Independiente en la mayoría de tareas. Tarda el doble. Consciente de su dificultad y enlentecimiento.....	80
No completamente independiente. En algunas tareas tarda tres o cuatro veces más de lo normal.....	70
Alguna dependencia. Puede hacer la mayoría de tareas, pero muy lentamente y con mucho esfuerzo.....	60
Más dependiente. Necesita ayuda en la mitad de las tareas cotidianas. Dificultad para todo.....	50
Muy dependiente. Sólo puede realizar algunas tareas sin ayuda. Con mucho esfuerzo puede realizar alguna tarea. Necesita mucha ayuda.....	40
Ninguna tarea solo. Grave invalidez.....	30
Totalmente dependiente. Puede ayudar algo en algunas actividades.....	20
Dependiente. Inválido.....	10
Postrado en cama. Ciertas funciones vegetativas (esfínteres) alteradas.....	0

CUESTIONARIO DE CALIDAD DE VDA EN ENFERMEDAD DE PARKINSON

(PDQ – 39) Autores: V.Peto et al, 1995 (Validada en España por P.Mariné Martín et al 1998)

Señale con qué frecuencia ha presentado, como consecuencia de la enfermedad de Parkinson y durante el último mes, las siguientes situaciones

	Nunca	Ocasional- mente	Alguna s veces	Frecuente- mente	Siempre o incapaz de hacerlo (si es aplicable)
1. Dificultad para realizar las actividades de ocio que le gustaría hacer					
2. Dificultad para realizar tareas de la casa (por ejemplo, efectuar reparaciones, cocinar, ordenar cosas, decorar, limpieza,...)					
3. Dificultad para cargar con paquetes o las bolsas de la compra					
4. Problemas para caminar una distancia de unos 750 metros					
5. Problemas para caminar unos 100 metros					
6. Problemas para dar una vuelta alrededor de casa con tanta facilidad como le gustaría					
7. Problemas para moverse en sitios públicos					
8. Necesidad de que alguien le acompañara cuando salía a la calle					
9. Sensación de miedo o preocupación por si se caía en público					
10. Permanecer confinado en casa más tiempo del que usted desearía					
11. Dificultades para su aseo personal					
12. Dificultades para vestirse solo					
13. Problemas para abotonarse la ropa o atarse los cordones de los zapatos					
14. Problemas para escribir con claridad					
15. Dificultad para cortar los alimentos.					

16. Dificultades para sostener un vaso o una taza sin derramar el contenido.				
17. Sensación de depresión				
18. Sensación soledad y aislamiento				
19. Sensación de estar lloroso o con ganas de llorar				
20. Sensación de enfado o amargura				
21. Sensación de ansiedad o nerviosismo				
22. Preocupación acerca de su futuro				
23. Tendencia a ocultar su Enfermedad de Parkinson a la gente				
24. Evitar situaciones que impliquen comer o beber en público				
25. Sentimiento de vergüenza en público debido a tener la Enfermedad de Parkinson				
26. Sentimiento de preocupación por la reacción de otras personas hacia usted				
27. Problemas en las relaciones personales con las personas íntimas				
28. No ha recibido apoyo de su esposo/a o pareja de la manera que usted necesitaba				
29. No ha recibido apoyo de sus familiares o amigos íntimos de la manera que usted necesitaba				
30. Quedarse inesperadamente dormido durante el día				
31. Problemas para concentrarse; por ejemplo, cuando lee o ve la televisión				
32. Sensación de que su memoria funciona mal.				
33. Alucinaciones o pesadillas inquietantes				
34. Dificultad al hablar				
35. Incapacidad para comunicarse adecuadamente con la gente				
36. Sensación de que la gente le ignora				

37. Calambres musculares o espasmos dolorosos

38. Molestias o dolores en las articulaciones o en el cuerpo

39. Sensaciones desagradables de calor o frío

--

Resultado Total