

La exposición crónica al cobre induce la pérdida de neuronas dopaminérgicas y autofagia *in vivo*

Alfredo González-Alcocer^a, Adolfo Soto-Domínguez^a, María de Jesús Loera-Arias^a, Aracely García-García^a, Humberto Rodríguez-Rocha^{a*}.

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Histología, Francisco I. Madero S/N, Monterrey, Nuevo León, México.

^bDepartamento de Genética Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Delegación Nuevo León, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México.

*E-mail de autor responsable: humberto.rodriguezrc@uanl.edu.mx

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, autofagia, neurona dopaminérgica, cobre, modelo animal.

Introducción

La multiplicación y la mutación puntual del gen de la α -sinucleína (α -Syn) se asocian con la enfermedad de Parkinson (EP) familiar y esporádica¹⁻³. Además, el líquido cefalorraquídeo y la sangre de los pacientes con EP han mostrado un aumento en los niveles de cobre (Cu)⁴. Asimismo, la exposición ocupacional al Cu se relaciona con un alto riesgo de desarrollar EP⁵⁻⁷. Recientemente, se ha demostrado *in vitro* que la α -Syn silvestre o mutada, requiere un factor ambiental, como la exposición al Cu, para aumentar su citotoxicidad⁸. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar el efecto del Cu sobre la muerte celular dopaminérgica en un modelo *in vivo*.

Metodología

Ratones C57BL/6J se trataron con CuSO₄ a 100, 250 y 500 ppm en agua purificada para beber *ad libitum* durante diez meses. Dado que en la EP la función motora se ve afectada debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas, realizamos la prueba de la marcha antes del sacrificio. Se realizó la perfusión cardiaca con PFA 4% y se extrajo el cerebro, del cual se obtuvieron cortes histológicos para evaluar la población de neuronas dopaminérgicas con un anticuerpo específico anti-tirosina hidroxilasa (TH) mediante inmunofluorescencia (IF) y se obtuvieron extractos de proteínas, los cuales fueron analizados por western blot (WB) para la detección de la tirosina hidroxilasa (TH), la α -Syn y el marcador de autofagia LC3-II.

Resultados y discusión

Una de las principales características de la EP es la pérdida de la coordinación motriz, por lo que se evaluó la función motora. Al término de los tratamientos experimentales, los ratones del grupo control, presentaron un movimiento normal, mientras que los ratones que fueron tratados con Cu, tuvieron un patrón anormal en la longitud y el ancho del paso, de manera dependiente de la concentración de Cu, lo que se relaciona con las alteraciones motoras de la EP. Una zona afectada en la EP es la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), donde radican las neuronas dopaminérgicas productoras del neurotransmisor dopamina. Dado que la muerte de estas neuronas es la responsable de la pérdida progresiva de la función motora, una vez concluido el modelo, los ratones se anestesiaron y perfundieron, para posteriormente extraer y analizar los cerebros mediante IF. Las neuronas dopaminérgicas fueron identificadas a través de la detección de la TH, una enzima que participa en la síntesis de dopamina. La

población de neuronas dopaminérgicas del grupo control no presentó alteraciones. En contraste, los grupos tratados con Cu se observó una notable reducción de las neuronas dopaminérgicas, de manera dosis-dependiente. Asimismo, esto se corroboró por WB, observando que el Cu disminuye los niveles del marcador de neuronas dopaminérgicas (TH). Además, evaluamos la α -Syn, que es una proteína neuronal característica de los cuerpos de Lewy, que se desarrollan en la EP. Encontramos que el Cu aumenta la expresión de α -Syn de manera dosis-dependiente. Posteriormente evaluamos el efecto del Cu sobre la proteína LC3-II, que es considerada el principal marcador de autofagia, y observamos un incremento en los niveles de LC3-II en respuesta al Cu de manera dosis-dependiente. Por lo tanto, pudimos determinar que el Cu afecta la función motora, induce la muerte de las neuronas dopaminérgicas y aumenta los niveles de α -Syn, así como de la autofagia.

Conclusiones

En conjunto, estos resultados muestran que la exposición crónica al Cu tiene un efecto neurotóxico que afecta la función motora e induce la autofagia, probablemente como mecanismo de protección para degradar la α -Syn y secuestrar al Cu en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.

Referencias

1. M. H. Polymeropoulos et al., Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *science* 276, 2045-2047 (1997).
2. T. Kitada et al., Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392, 605-608 (1998).
3. A. B. Singleton et al., alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841 (2003).
4. H. S. Pall et al., Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 238-241 (1987).
5. I. Hozumi et al., Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 303, 95-99 (2011).
6. B. A. Rybicki, C. C. Johnson, J. Uman, J. M. Gorell, Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan. *Mov Disord* 8, 87-92 (1993).
7. J. M. Gorell et al., Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 20, 239-247 (1999).
8. A. Anandhan et al., Overexpression of alpha-synuclein at non-toxic levels increases dopaminergic cell death induced by copper exposure via modulation of protein degradation pathways. *Neurobiol Dis* 81, 76-92 (2015).