



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EFFECTO DEL MANGANESO (Mn) SOBRE  
LAS FUNCIONES MOTORAS Y  
MNÉMICAS EN UN MODELO DE DAÑO  
HEPÁTICO CRÓNICO EN RATAS.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I O L O G A**

P R E S E N T A

**MARTHA PATRICIA ALMAZÁN TEJEDA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

De manera especial agradezco a mi tutor Dr. Gabriel Roldán R. por su empeño, y buena disposición para la culminación de este proyecto.

A Dr.Sergio Montes L. por su asistencia técnica en la operación de las ratitas y la facilitación de los artículos. .

A Héctor González por la facilitación del software utilizado así como el haberme sacado de tantas dudas.

A mi compañero de laboratorio Oscar Calderón (Chaparrín) por su apoyo y compañía en los experimentos y por ser mi amigo.

Esta tesis se la dedico a mi hijo León “mi pequeño gran gigante”, y le agradezco enormemente a mi mamá Paty por su gran apoyo así como a mi padre, a Marianita y a Rigo. Y a mis amigas de la fac “la Nan”,y “la Fa”.

# ÍNDICE

I. Abreviaturas.....	2
II. Resumen.....	3
III. Antecedentes.....	4
IV. Introducción	
• 1 Acciones biológicas del Mn.....	6
• 2 Cinética del Mn.....	6
• 3 Transporte y control del Mn en el S.N.C.....	8
• 4 Neurotoxicidad del Mn.....	10
• 5 Mn y sistemas de neurotransmisión.....	12
• 6 Acción del Mn sobre la neurotransmisión sináptica.....	15
• 7 Mecanismos de neurotoxicidad.....	17
• 7.1 Estrés oxidativo.....	17
• 7.2 Susceptibilidad dopaminérgica.....	18
• 7.3 Disfunción mitocondrial.....	19
• 7.4 Excitotoxicidad mediada por glutamato.....	20
• 7.5 Oxido Nítrico.....	21
V. Hipótesis.....	22
VI. Objetivo.....	22
VII. Metodología	
• Animales y cirugía.....	22
Pruebas conductuales	
• Experimento 1.....	23
• Experimento 2.....	26
• Experimento 3.....	33
VIII. Conclusiones generales.....	37
IX. Referencias.....	38

## I. ABREVIATURAS

Acido desoxirribonucleico.....	ADN
Acido gamma-aminobutírico.....	GABA
Acido homovanílico.....	HVA
Adenosin trifosfato.....	ATP
Barrera hematoencefálica.....	BHE
Coordinación motora fina.....	CMF
3,4 dihidroxifenilacético.....	DOPAC
Dopamina.....	DA
Encefalopatía hepática.....	EH
Especies reactivas de oxígeno.....	ERO
6-fluorodopa.....	6-FD
Transportador de glutamato y aspartato.....	GLAST
Kruskal-Wallis.....	KW
Laberinto elevado en "T".....	LET
Latencia de adquisición.....	LA
Latencia de escape.....	LE
Latencia de retención.....	LR
Ligación del conducto biliar común.....	LCBC
Líquido cefalorraquídeo.....	LCR
N-metil-D-aspartato.....	NMDA
Norepinefrina.....	NE
Núcleo caudado.....	NC
Oxido nítrico.....	ON
Oxido nítrico sintasa.....	ONS
Prevención pasiva.....	PP
Radical hidroxilo.....	OH <sup>-</sup>
Radical superóxido.....	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Sistema nervioso central.....	SNC
Superóxido dismutasa.....	SOD
Tomografía de emisión de positrones.....	PET
Transferrina.....	Tf
Viga inclinada.....	VI

# **EFFECTO DEL MANGANESO (Mn) SOBRE LAS FUNCIONES MOTORAS Y MNÉMICAS EN UN MODELO DE DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO EN RATAS.**

## **II. RESUMEN**

El  $Mn^{2+}$  es un microelemento indispensable para una cantidad de procesos celulares; sin embargo también es un neurotóxico potencial. En alteraciones como la cirrosis, la exposición a Mn produce un aumento en la concentración de  $Mn^{2+}$  en estructuras de los ganglios basales del cerebro tales como, el globo pálido, putamen y núcleo caudado (NC). En los humanos, monos y roedores con elevados niveles de  $Mn^{2+}$  en la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR), se presenta una alteración en la concentración de catecolaminas en diferentes regiones cerebrales incluyendo el estriado, el NC y la sustancia nigra. Los cambios bioquímicos y morfológicos, en dichas estructuras, pueden condicionar alteraciones motoras, de la memoria y del temperamento. En el presente trabajo se simularon las condiciones que se presentan durante la EH, utilizando ratas macho Wistar divididas en 4 grupos. Tanto al grupo 1 (Control) como al grupo 2 (Mn) se les practicó una operación falsa a nivel abdominal; al grupo 3 (ligado) y grupo 4 (ligado/Mn) se les practicó una ligación del conducto biliar común (LCBC). Los grupos 2 y 4 se sometieron a un tratamiento crónico con  $Mn^{2+}$  (1 mg/ml) durante 4 semanas por la vía oral. Al final del tratamiento se realizaron diferentes pruebas para evaluar la coordinación motriz fina (CMF), usando el modelo de la Viga Inclínada (VI); la capacidad de aprendizaje y formación de la memoria utilizando la prueba de prevención pasiva (PP) y el laberinto elevado en "T" (LET), con el fin de evaluar el efecto de la intoxicación por  $Mn^{2+}$  durante estos procesos. Los resultados en la VI no mostraron diferencias significativas entre los grupos, lo cual indica que no se presenta una alteración severa en la coordinación motriz. En el LET no se obtuvieron cambios significativos entre los diferentes grupos, sin embargo, en la prueba de PP, el grupo ligado mostró un aprendizaje deficiente, lo cual indica que la LCBC podría afectar por sí sola los procesos cognitivos.

### III. ANTECEDENTES

Desde que se comprobaron los efectos neurotóxicos del Mn en humanos expuestos a este metal por actividad minera e industrial, se han realizado estudios para entender los mecanismos por los cuales causa alteraciones neuropsicológicas. Sin embargo, existen pocos reportes acerca de las alteraciones en los procesos de memoria o capacidades intelectuales tanto en pacientes con exposición al  $Mn^{+2}$  como en modelos animales experimentales. Algunas de las alteraciones reportadas son anomalías neuropsicológicas en estados tempranos, como excitación psicomotora, desórdenes en el lenguaje, conducta compulsiva, deterioro de la memoria [1,2]. Otras alteraciones incluyen problemas motores como son: dificultad para caminar, hipertonía muscular, rigidez facial, temblores, letárgica y disminución en los movimientos espontáneos, síntomas que son similares a los observados en la enfermedad de Parkinson e indicativas de destrucción de las vías dopaminérgicas [1,2,3].

A nivel celular, esta condición ha sido asociada con el aumento en la concentración de Mn en regiones específicas del cerebro, siendo las áreas más afectadas aquellas que conforman a los ganglios basales (caudado-putamen, globo pálido, sustancia nigra y núcleos subtalámicos) [4,5].

Asimismo, esta distribución diferencial de Mn cerebral se ha observado mediante estudios postmórtem en pacientes con patología como la cirrosis (principalmente pacientes cirróticos que murieron por coma hepático) [6,7], encefalopatía hepática, fase activa de hepatitis aguda, daño crónico [8] ó agudo al hígado [9] y en pacientes que recibieron nutrición parenteral, por lo que se ha observado una correlación significativa entre la concentración de Mn en sangre y la actividad enzimática del hígado.

En el desarrollo de modelos animales de neurotoxicidad inducida por Mn se ha reportado que, tras la administración intratecal o intracerebroventricular de  $MnCl_2$  en ratas, hay una disminución en la actividad motora espontánea que correlaciona con un declive de los niveles de dopamina (DA) en el núcleo caudado y el putamen, así como una severa pérdida neuronal en el globo pálido [10].

En un estudio en el cual se administró un tratamiento crónico de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (20 mg/Kg oralmente y de forma diaria durante 18 meses) a monos *Rhesus*, se estableció que la

concentración de  $Mn^{2+}$  fue mayor en la corteza cerebral, cerebelo, diencéfalo, cuerpo estriado, cerebro medio y puente [11]. Chandra (1981) expuso ratas al  $Mn^{2+}$  y observó un aumento en la conducta agresiva e hiperactividad así como un aumento en la concentración de DA y norepinefrina (NE) en el cuerpo estriado y el hipotálamo [12].

Bonilla et al. (1984) expusieron a ratas a  $MnCl_2$  en el agua para beber, en dosis de 1 y 0.5 mg/ml durante 8 meses y observaron que la actividad motora espontánea aumentaba durante el primer mes; sin embargo, ésta disminuía a partir del séptimo mes [13]. Así también, Nachtman et al. (1986) observó en ratas a partir de la 5<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> semana de exposición a 1.0 mg/ml de  $MnCl_2$  en el agua para beber, aumento en la actividad locomotora en un inicio, pero después ésta retorna al nivel normal [14]. Estos datos sugieren un lento desarrollo de respuestas bifásicas debidas al  $Mn^{2+}$ , donde se presenta hiperactividad seguida de hipoactividad, con un componente dopaminérgico [15].

De la misma forma se han reportado en humanos los efectos de la exposición a Mn sobre la adquisición del aprendizaje y, al parecer, existe una relación entre los diferentes parámetros de exposición (dosis, tiempo y ruta de exposición) y las alteraciones cognoscitivas. De esta manera se ha observado una disminución de la atención, deterioro de la memoria, principalmente de corto plazo, una coordinación anormal mano-ojo, una disminución en respuestas rápidas y una disminución en la velocidad de reacción no perceptual [16,17,18,19].

Se ha reportado en modelos experimentales con roedores, que una exposición a Mn durante 10 a 30 días produce un deterioro reversible de los procesos de aprendizaje. Asimismo, se ha observado un deterioro en la capacidad cognitiva como resultado de la exposición de  $Mn^{2+}$  en la prueba de laberinto en T y en el laberinto multivías, deterioro irreversible durante el número de días que dura el experimento [20].

Montes et al. (2001) reportaron en un modelo experimental de colestasis hepática por obstrucción biliar en ratas, un aumento en la concentración de Mn en cerebelo y estriado de 60 y 175% respectivamente, además de un aumento en el nivel de DA estriatal de 27%, bajo un tratamiento durante 4 semanas a dosis de 1 mg/ml de  $Mn^{2+}$  por la vía oral [21]. Cabe mencionar que este modelo experimental pretende simular la condición que se da en pacientes cirróticos con la finalidad de conocer más acerca del papel que desempeña el Mn en los ganglios basales. De esta



manera surge también la necesidad de evaluar el efecto del Mn (en dicho modelo) sobre las funciones motoras y cognitivas por medio de tareas dependientes de los ganglios basales.

## **IV. INTRODUCCIÓN**

### **1. Acciones biológicas del Mn**

El Mn puede asumir 11 diferentes estados de oxidación que van desde -3 a +7, siendo el de +2 (divalente) el prevaleciente en los tejidos biológicos. Esta capacidad del Mn para asumir diferentes estados de oxidación es de suma importancia ya que determina su potencial para actuar tanto como prooxidante o bien como antioxidante en un medio biológico [22].

El requerimiento biológico del Mn como metal traza esencial para el crecimiento y el desarrollo normal fue inicialmente reconocido alrededor de los años 70. En la actualidad, se sabe que este metal es necesario para una variedad de procesos fisiológicos responsables de la regulación de la reproducción, formación de tejido conectivo y óseo, metabolismo de lípidos y carbohidratos, y funcionamiento cerebral normal [23,24]. El Mn es un importante cofactor de una variedad de enzimas involucradas en la señalización de transducción, así como en la biosíntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) y de neurotransmisores.

El promedio en la toma de Mn es entre 2 y 9 mg/por día (para una persona de 70 Kg. de peso), sin embargo se ha recomendado una ingesta de 2 a 5 mg/por día para mantener un balance óptimo del metal y se ha calculado que sólo un 5% aproximadamente de la ingesta del Mn se absorbe. Algunos alimentos ricos en Mn son: el aguacate, moras, nueces, semillas, algas, frutas secas y hojas de vegetales verdes [25].

De manera normal, en los mamíferos, el principal reservorio del Mn es en hueso (25%), piel, hígado, riñón y cerebro. Se ha observado que la concentración de Mn en el cerebro humano es alta en el adulto (aproximadamente 0.25 µg/g peso húmedo) que en infantes menores a 1 año de edad [26].

## 2. Cinética del Mn

La vía oral es la principal vía fisiológica de ingreso del Mn al organismo. Se ha demostrado que el Mn proveniente de la dieta se absorbe en el tracto gastrointestinal, cuando se encuentra presente en diferentes formas químicas como son principalmente:  $\text{MnO}_2$  y  $\text{MnCl}_2$  [27].

El Mn es regulado sistémicamente por la velocidad de recaptura por los endocitos en el lumen intestinal. Otro órgano de suma importancia en esta regulación y del cual depende la biodisponibilidad y excreción del metal es el hígado, el Mn llega a él a través del plasma vía vena portal y entonces puede ser recapturado, almacenado celularmente, o bien eliminado a través de la bilis. Asimismo, en las células del hígado y durante el proceso de absorción algunos  $\text{Mn}^{2+}$  son oxidados a la forma más reactiva:  $\text{Mn}^{3+}$  [28, 29], probablemente por la ceruplasmina encontrada en el plasma [30, 31, 32]. Es importante mencionar que una vez que el Mn<sup>+</sup> se encuentra en plasma aproximadamente el 80% está ligado a  $\beta$ 1-globulina y albúmina [33], la fracción restante corresponde a  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{3+}$ , pero la proporción de estos no es clara.

Otra vía importante de absorción del Mn, es a través de los pulmones cuando la ruta de exposición es por inhalación [34]. Asimismo, se ha demostrado que este órgano es el sitio inicial y principal de almacenamiento de Mn cuando el organismo ha sido expuesto a la inhalación de altos niveles del metal.

Estudios realizados en primates expuestos a Mn por inhalación, han ayudado a elucidar acerca de la cinética del Mn, demostrando también que la absorción del metal en el cerebro es lenta. Se calculó una vida media de absorción de 10 días y un pico máximo a los 50 días de la administración continua; la cinética de eliminación es larga, con una vida media de 223-267 días; asimismo se demostró en estos animales una eliminación bifásica del Mn, con un componente rápido de eliminación de aproximadamente 3.9 días seguidos de un componente lento de 53 días, este último muy parecido al obtenido en el humano. La eliminación corporal total del Mn se ha calculado, con una vida media de la descarga rápida de aprox. 6 días; la vida media de la descarga lenta es de 95 días [35].

### 3. Transporte y control del Mn en el Sistema Nervioso Central (SNC).

La homeostasis del Mn está normalmente bajo un estrecho control para prevenir la deficiencia o el exceso tanto a nivel sistémico como celular; de acuerdo con esto, la alteración de algunos procesos sistémicos de control o recaptura celular o liberación del Mn tiene potencial para provocar un desbalance en Mn y toxicidad.

Se ha propuesto que el Mn, cuando se encuentra sistémicamente en concentraciones normales, entra al cerebro a través del plasma cruzando los capilares de la barrera hematoencefálica (BHE) mediante el complejo Tf-Mn<sup>3+</sup> (el cual se detalla mas adelante), mientras que en altas concentraciones cruza los plexos coroideos predominantemente [36]. Ingersoll et al. (1995) han demostrado que este sistema de barrera cerebral juega un papel importante para restringir el paso del Mn al LCR, por lo que la homeostasis del Mn en el cerebro parece estar influida directamente por la concentración de Mn en plasma [10, 37].

Mediante estudios de fraccionamiento celular en cerebro de la rata, se ha visto que en condiciones normales los niveles de Mn son altos en las mitocondrias, capilares y citosol, intermedios en microsomas y sinaptosomas y bajos en mielina y núcleo, sin embargo cuando el Mn plasmático se encuentra en altas concentraciones se multiplica la cantidad de este metal en las estructuras subcelulares que de por sí tenían un gran contenido [38].

Así, una excesiva exposición a Mn puede dar como resultado una acumulación cerebral del mismo, debido a una alteración de los diferentes mecanismos reguladores de la cinética del metal en la BHE que puede favorecer una entrada rápida y una salida más lenta del cerebro, ya que el Mn parece no producir directamente alteraciones histopatológicas en BHE y los plexos coroideos durante estados de toxicidad [27].

Se ha propuesto que los mecanismos potenciales de entrada del Mn al tejido cerebral son: a) difusión facilitada, b) transporte activo y c) transporte mediado por transferrina (Tf), sin embargo aún no están claros los mecanismos de salida del Mn del cerebro, pero se presume que pueden ser los mismos que aquellos de entrada [39].

El mecanismo de entrada del Mn al SNC más estudiado, ha sido el transporte mediado por Tf. Se ha determinado que el Mn<sup>3+</sup> se une a la (Tf), que es la principal proteína transportadora del hierro (Fe<sup>2+</sup>) en plasma, aunque el Mn<sup>3+</sup> compite con este metal para ganar los sitios de unión a

Tf y formar un complejo estable ( $\text{Tf-Mn}^{3+}$ ) que es transportado celularmente hacia tejidos extrahepáticos, incluyendo el cerebro mediante la internalización en vesículas endosomales y posterior endocitosis. No obstante una gran proporción de  $\text{Mn}^{2+}$  (aprox. 60%) parece no estar ligada a Tf en el plasma [40].

Asimismo se ha visto que el Mn podría estar vinculado al sistema de entrega de Fe al S.N.C vía la Tf, ya que su distribución en el cerebro corresponde a la distribución de las zonas con alto contenido de Fe, además de presentar transporte axónico para zonas con baja expresión de receptores a Tf [41].

Existe evidencia de que los plexos coroides y los oligodendrocitos son los dos únicos tipos celulares en el SNC capaces de producir Tf y ésta es sintetizada en las células epiteliales coroidales [42]; asimismo las neuronas expresan receptores a Tf en su superficie [43] por lo que el Mn ligado a Tf parece ser tomado por las neuronas vía receptor mediado por endocitosis (figura 1) [35].

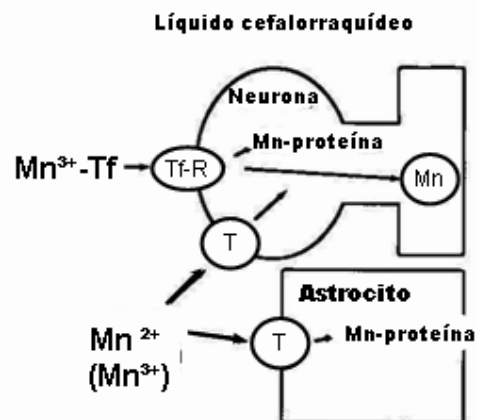


Figura 1. Esquema de la entrada del Mn hacia neuronas y células gliales, es posible que un transportador indefinido (T) y/o un receptor mediado por endocitosis intervengan en esta cinética. El Mn es recapturado en la neurona a través de su unión a una metaloproteína y probablemente sea secuestrado en vesículas sinápticas. Por otro lado una gran cantidad de Mn es recapturado en los astrocitos, donde el metal interactúa con la glutamina sintetasa. Modificado de Takeda A. (2003) [35].

Por otro lado, se ha sugerido la existencia de otro mecanismo de recaptura diferente al mediado por Tf en los sistemas de barrera cerebral debido a que en diversos estudios experimentales se ha visto que el Mn es removido rápidamente de la sangre y transportado

parcialmente al cerebro en un periodo corto, independientemente de la ruta de administración [44].

Gunshin et al. (1997) demostró que DMT1 es un transportador de diversos metales en forma divalente como son  $\text{Fe}^{2+3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  [43]. Dicho transportador es expresado tanto en células endoteliales capilares cerebrales y células epiteliales coroidales, por lo que este transportador puede estar involucrado en el transporte de  $\text{Mn}^{2+}$  en el cruce de los sistemas de barrera cerebral. Asimismo se ha reportado que el DMT1 está presente en células hipocampales piramidales y granulares, células cerebelares granulares, células del núcleo preóptico y células piramidales de la corteza piriforme, en altas densidades y es posible que este transportador este involucrado en la recaptura de iones de Mn de bajo peso molecular ligado en neuronas. Sin embargo no se ha descubierto el transportador del  $\text{Mn}^{3+}$  no mediado por Tf [43].

#### **4. Neurotoxicidad del Mn**

El S.N.C y los ganglios basales en particular, son considerados un importante blanco en la neurotoxicidad que causa la sobreexposición a Mn, ya que la permeabilidad de este metal hacia estos tejidos es más alta inclusive que la de otros metales como el  $\text{Fe}^{2+3+}$  o el  $\text{Zn}^{2+}$ . Asimismo, se ha observado que existe una gran susceptibilidad para que se llegue a una concentración anormal de Mn en regiones cerebrales ricas en mitocondrias y Fe, como son los ganglios basales, donde puede contribuir al desarrollo de desórdenes neurodegenerativos [45].

Se ha determinado que en el humano la absorción anormal de Mn se debe a su exposición en altas dosis que puede inducir a un estado de intoxicación llamado “manganismo” o “locura mangánica” y está caracterizado por una disfunción extrapiramidal similar a la enfermedad de Parkinson y donde eventualmente se presentan síntomas neuropsiquiátricos similares a los encontrados en la esquizofrenia. Este síndrome ha sido observado en mineros, trabajadores de la aleación de fierro, manufactura de baterías, reparación de automotores y en agricultores que estuvieron expuestos de manera accidental e inhalaron de manera prolongada partículas de Mn que contienen ciertos insecticidas [46, 47, 48, 49, 50, 51].

A menudo, estas personas en los estados tempranos de intoxicación muestran cambios conductuales como son: risas compulsivas, nerviosismo, ansiedad, irritabilidad, conductas

compulsivas, hostiles y agresivas [52], y en estados posteriores de la intoxicación puede además presentarse alteraciones motoras que van desde dificultad para caminar, desequilibrio en el paso, hipertonía muscular, rigidez facial, temblores, letargia y disminución en los movimientos espontáneos. Asimismo, se ha reportado una disminución en las capacidades sensoriales y cognitivas; disfunciones, de coordinación (por ejemplo mano-ojo) y una disminución en la ejecución de respuestas rápidas [20].

Otro posible origen de la acumulación anormal de Mn en el S.N.C y toxicidad clínica, ha sido identificado en pacientes con nutrición parenteral y personas con un deterioro severo del hígado, como ocurre durante la fase activa de la hepatitis aguda, la cirrosis posthepática y la encefalopatía hepática. En estas enfermedades el Mn se encuentra elevado en el plasma sanguíneo y esto se ha atribuido a una disminución en la excreción biliar del metal además de una alteración en las enzimas del hígado encargadas de la detoxificación de sustancias que son potencialmente neurotóxicas como es el Mn [6, 10]. Asimismo, estudios de imágenes de resonancia magnética en estos pacientes muestran que existe señales de hiperintensidad simétricas y bilaterales en el globo pálido como consecuencia de una acumulación anormal de Mn en dicha estructura y los estudios postmórtem de ésta estructura cerebral revelan un aumento de 7 veces mayor a lo normal en la concentración de Mn [6, 53]. De igual manera mediante técnicas de imagen como la tomografía por emisión de positrones (PET) con 6-fluorodopa (6-FD) es posible determinar que los pacientes con Parkinson idiopático tienen una menor recaptura de 6-FD en el estriado, especialmente en el putamen posterior [54]. Gracias a estas técnicas de imagen se determinó, en la intoxicación con Mn, tanto en primates como en pacientes, que el globo pálido es la zona con más daño, lo que sugiere que esta estructura es la que más Mn concentra y la más afectada en la exposición al metal [55].

En humanos intoxicados por Mn como en modelos animales de manganismo, la excesiva exposición al metal ha sido asociada con una declinación de los niveles estriatales de DA, la degeneración de terminales nerviosas dopaminérgicas, una pérdida celular masiva en el segmento interno del globo pálido, además de gliosis y edema en el extremo posterior de la cápsula interna [5, 8, 45, 55, 56, 57, 58]. También frecuentemente se ha encontrado de manera general que los ganglios basales presentan una marcada disminución de fibras mielinizadas,

una presencia ocasional de cuerpos de Lewis [45, 59], una proliferación irregular de astrocitos y usualmente el desarrollo de astrocitosis Alzheimer tipo II en el cuál estas células típicamente exhiben un núcleo pálido y alargado, marginación de la cromatina y a menudo un nucleolo prominente [60, 61], por lo que se ha propuesto que las características neuropatológicas encontradas en este tipo de astrocitos sugiere un rol importante de este tipo celular en la patofisiología de la neurotoxicidad del Mn.

Por otro lado, debido a que se han hallado cambios neuroquímicos previos a las alteraciones morfológicas en el manganismo tal parece que el síndrome neurológico característico de esta enfermedad, puede estar asociado con la degeneración del metabolismo de neurotransmisores en el SNC.

Adicionalmente se ha evidenciado en los modelos experimentales, que el tratamiento crónico de Mn provoca una alteración selectiva en la distribución regional en el S.N.C de otros metales traza como son  $Fe^{2+3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Se^{2+4+}$  [38].

Sin embargo, en lo que respecta al Fe varios estudios en la literatura demuestran que tanto el estado de oxidación en el que se encuentre el metal, así como la concentración del mismo puede tener un efecto directo sobre los niveles de Mn en el SNC [62, 63]. Se ha observado durante estados de deficiencia de Fe una intensificación en la acumulación de Mn en ciertas áreas cerebrales, lo cual indica que la relación entre ambos metales es de suma importancia para el desarrollo de la neurotoxicidad del Mn.

Sin duda, las consecuencias debidas a la acumulación excesiva de este metal tanto en el humano como en los modelos animales son graves, y al parecer la neurotoxicidad del  $Mn^{2+}$  depende de la dosis acumulativa del mismo, así como de la ruta y tiempo de administración .

## **5. Mn y sistemas de neurotransmisión**

En diferentes modelos de neurotoxicidad por Mn en roedores, se ha encontrado que dicho metal no siempre tiene los mismos efectos sobre la DA; por ejemplo, se ha reportado tanto una disminución significativa de DA en el estriado, como un aumento de dicha catecolamina que

posteriormente disminuye durante el tiempo de exposición, por lo que se ha concluido que la variación de estos efectos se debe al tiempo, ruta, dosis y tipo de Mn administrado [64].

No obstante, recientemente, Montes et al. (2001) en un modelo experimental de colestasis hepática por obstrucción biliar en ratas, reportaron un aumento en el contenido estriatal de Mn de 77 y 137% cuando se administra  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  por vía oral durante 4 semanas, a dosis de 0.5 y 1 mg/ml de  $Mn^{2+}$  respectivamente; asimismo, estos grupos presentaron una disminución del 30% de DA estriatal cuando se comparan con los grupos controles, y se observó un aumento significativo (69%  $p < 0.05$ ) en el recambio de DA a dosis de 1 mg/ml de  $Mn^{2+}$  [21].

Se ha reportado en pacientes cirróticos y en trabajadores expuestos accidentalmente al Mn [65], un incremento de varias veces de la concentración normal en la eliminación urinaria del ácido homovanílico (HVA) considerado el principal metabolito de la DA, lo cual sugiere un incremento en el recambio de la catecolamina causado por la acumulación anormal del Mn en regiones cerebrales específicas. Adicionalmente, en el estudio PET practicado a estos pacientes cirróticos se observó un daño en el estriado principalmente en las vías post-sinápticas de eferencias de la sustancia nigra [66], así como una disminución significativa en la densidad del receptor de DA postsináptico D<sub>2</sub>, en las regiones correspondientes al pálido y putamen [67]. De igual manera, cuando se realizó el estudio en monos intoxicados por Mn se encontró, aunado a la degeneración de las terminales nerviosas dopaminérgicas, una disminución del receptor D<sub>1</sub> postsináptico contenido en estructuras estriatales, sin embargo no se encontró una alteración en la densidad del receptores D<sub>2</sub>, receptores muscarínicos a acetilcolina o en los receptores GABA<sub>A</sub> también analizados [58].

Por otro lado, existe una inconsistencia en los reportes de la concentración de glutamato y del GABA en los ganglios basales después de una exposición a Mn en roedores. Por ejemplo, la exposición a 6 mg por día (10 veces más de la ingesta normal) lleva a un aumento en la concentración de Mn y a una disminución significativa en las concentraciones de GABA [68]. En otro reporte en el cual las ratas fueron expuestas a 20 mg Mn/Kg por día se encontró un aumento significativo en la concentración de Mn, GABA y glutamato [69].



Asimismo, cuando se perfunde el estriado de rata con 200 nM de  $MnCl_2$  se observa una disminución significativa en los niveles de GABA en estriado. Sin embargo, los niveles de glutamato, aspartato y glicina también analizados no muestran alteraciones en dicha estructura (figura 2) [70]. En cambio en un estudio similar cuando se perfunde el mismo componente de Mn a la misma concentración pero ahora en el hipocampo, se observó que existe una disminución del 50% en los niveles de glutamato y aspartato [71]. Por ello se postula que la acción del Mn sobre la liberación de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica puede variar dependiendo de la región cerebral, aunque la diferencia en la acción del Mn sobre la liberación de glutamato y aspartato en el estriado y el hipocampo es desconocida [70].

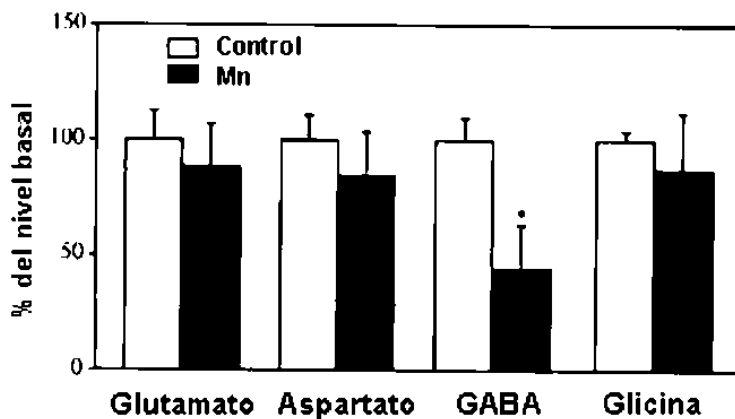


Figura 2. Efecto del Mn sobre la liberación de los neurotransmisores glutamato, aspartato, GABA y glicina en el estriado de rata. Se esquematiza el porcentaje en el nivel del neurotransmisor durante el perfundido. (\* $p < 0.001$ ). Modificado de Takeda A. et al. (2003) [70].

De igual manera, se ha demostrado que durante una exposición a bajas dosis de Mn, no parece afectarse el contenido de DA estriatal en ratas, aunque da como resultado un aumento significativo y bilateral de GABA; por consiguiente se ha propuesto que el efecto del Mn sobre los ganglios basales puede progresar cuando se incrementa la dosis acumulativa, iniciando con efectos GABAérgicos a una exposición baja y afectando los niveles de GABA y DA durante altas exposiciones [72]. Cabe mencionar que la alteración en el funcionamiento glutamatérgico y GABAérgico pueden contribuir a un deterioro en el metabolismo de la DA [73].

Se ha propuesto que los efectos tóxicos del Mn sobre la DA estriatal pueden estar mediados indirectamente por un metabolismo anormal del glutamato y/o del GABA, y que dichos cambios en áreas propensas a acumular el Mn preceden los efectos característicos del metal sobre la función dopaminérgica. Específicamente existe la hipótesis de que la acumulación de Mn en el

globo pálido causa una disminución del disparo eferente GABAérgico del globo pálido hacia los núcleos subtalámicos. Consecuentemente, las proyecciones glutamatérgicas dentro de la sustancia nigra que se originan de los núcleos subtalámicos pueden disparar de manera incontrolada causando una desregulación del impulso dopaminérgico del estriado hacia la sustancia nigra (figura 3) [73].

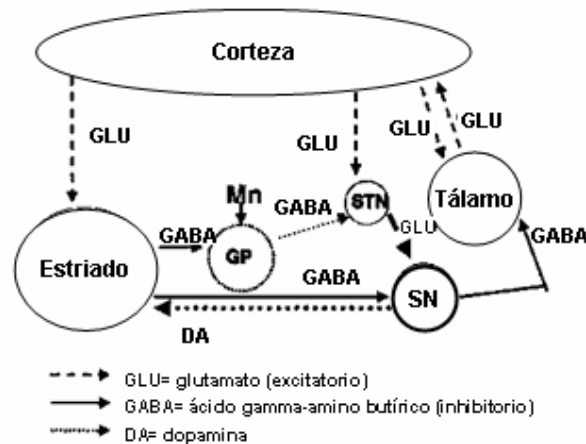


Figura 3. Diagrama esquemático de los ganglios basales durante el manganismo. Globo pálido (GP), núcleos subtalámicos (STN), sustancia nigra (SN). Modificado de Erikson K, M. et al. (2003) [73].

## 6. Acción del Mn sobre la neurotransmisión sináptica

Los mecanismos moleculares bajo los cuales el Mn tiene efectos tóxicos sobre las terminales nerviosas no han sido bien aclarados; se ha comprobado, *in vitro*, que los efectos de la toxicidad del Mn sobre la función sinaptosomal traen como consecuencia una inhibición de la recaptura de neurotransmisores y de este modo interfiere con la transmisión sináptica [68, 74, 75]. Narita et al. (1990) [76] sugiere que el  $Mn^{2+}$  puede entrar a las terminales nerviosas por medio de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje durante los potenciales de acción, esto fue demostrado en nervios motores en rana. En un experimento similar Drapeau y Natchen (1984) además demostraron que el  $Mn^{2+}$  induce una liberación de DA de las terminales nerviosas despolarizadas [77]. Asimismo, se ha visto que en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, el  $Mn^{2+}$  induce una potenciación a largo plazo en la liberación de acetilcolina de las terminales nerviosas cardíacas parasimpáticas después de una estimulación nerviosa tetánica [78]; de

igual manera se ha reportado una disminución en la actividad de la acetilcolinesterasa en modelos animales de exposición a Mn [79].

Por otro lado, después de una inyección intraestriatal e intranigral de  $^{54}\text{MnCl}_2$ , el  $^{54}\text{Mn}$  es detectado en el estriado y en la sustancia negra respectivamente [41, 80]. Cuando el  $^{54}\text{MnCl}_2$  es inyectado bilateralmente dentro del estriado después de una inyección unilateral de colchicina, un inhibidor del transporte axonal, se suprime el transporte de  $^{54}\text{Mn}$  hacia la sustancia negra por lo tanto, el Mn está sujeto a un transporte axonal en la vía GABAérgica estriato-nigral y/o vía dopaminérgica nigro-estriatal y este transporte parece reflejar una asociación con la actividad neuronal. [80], En el caso de una inyección de  $^{54}\text{MnCl}_2$  dentro de células mitrales y en el estrato plexiforme del bulbo olfatorio, el  $^{54}\text{Mn}$  es tomado por el soma de las neuronas olfatorias secundarias, en esos estratos es transportado hacia el área entorrinal; la corteza olfatoria secundaria a lo largo del tracto olfatorio [51]. Se considera que el Mn es liberado de las terminales de las células mitrales en la corteza piriforme y/o amígdala. A su vez, la liberación de  $^{54}\text{Mn}$  previamente captado por la amígdala se refuerza durante la estimulación con  $\text{K}^+$  [70]. Esta liberación dentro del espacio extracelular durante la estimulación con alto  $\text{K}^+$  es inhibida por tetrodotoxina un bloqueador de los canales de sodio. Por lo tanto los iones de Mn pueden estar dinámicamente vinculados a procesos de señalización neuronal en la amígdala [71]. Este reforzamiento de la liberación de  $^{54}\text{Mn}$  durante la estimulación con alto  $\text{K}^+$  fue observada en el hipocampo, pero no en la sustancia negra. De la misma forma se halló un incremento de glutamato en el espacio extracelular durante la estimulación con una alta concentración  $\text{K}^+$ , sugiriendo que este neurotransmisor está altamente correlacionado con el  $^{54}\text{Mn}$ , y que el Mn está liberado concurrentemente con glutamato de las terminales neuronales. Además se ha reportado que el Mn puede causar la activación de canales catiónicos que son activados por glutamato, por ejemplo receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA), el cual contribuye a la degeneración neuronal (figura 4) [35].

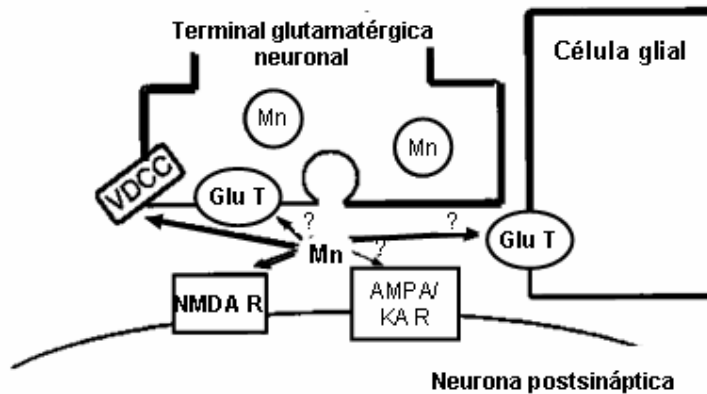


Figura 4. Esquema que representa la acción del Mn sobre la neurotransmisión sináptica. Canal de Ca<sup>2+</sup> dependiente de voltaje (VDCC), receptor a NMDA (NMDA R), transportador de glutamato (GLU T). Modificado de Takeda A. (2003) [35].

## 7. Mecanismos de neurotoxicidad

Los mecanismos de acción tóxica del Mn se han explorado principalmente en roedores; si bien no ha sido fácil debido a las propiedades químicas del metal en un medio fisiológico y específicamente en los sistemas neurales, se ha propuesto una hipótesis multifactorial donde se expone que el efecto del Mn puede ser mediado por alguno o varios de los siguientes procesos que pueden actuar sinérgicamente: estrés oxidativo, potenciación de la autooxidación de la DA, alteración en el metabolismo de neurotransmisores aminoácidos, disfunción mitocondrial y cambios en la actividad de enzimas dependientes del Mn.

### 7.1 Estrés oxidativo

La especificidad regional de esta neuropatología y la naturaleza oxidativa del daño celular inducido por el Mn, a menudo, han sido atribuidos a la capacidad del elemento esencial para estimular la generación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ERO) a niveles citotóxicos. Si bien el Mn en condiciones celulares normales es considerado un antioxidante, dicho metal es un poderoso pro-oxidante tanto en forma divalente como trivalente, y ésta capacidad puede ser potenciada por un desbalance en la concentración de metales traza en estado trivalente principalmente Fe, o inclusive el mismo Mn<sup>3+</sup> [68]. Además la elevada actividad oxidativa de algunas regiones cerebrales puede facilitar la oxidación de pequeñas

cantidades de  $Mn^{2+}$  para el estado trivalente, siendo este último considerado altamente reactivo y promotor de la catálisis de radicales libres generados en las reacciones del ciclo redox tipo Fenton. Cabe mencionar que las reacciones que se dan en este ciclo redox, conllevan a la transferencia de electrones generando radicales libres como son: el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^-$ ). Además, el peróxido de hidrógeno es considerado por sí mismo un origen de la formación de radicales libres bajo circunstancias apropiadas [81].

Se ha reportado en el manganismo, un deterioro en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), una disminución en el contenido de catalasa y glutatión peroxidasa en la sustancia negra, las cuales son responsables de la degradación de  $H_2O_2$  [82]; asimismo existe una disminución de los tioles protectores [59, 83, 84], por lo que este escenario favorece una modificación en la homeostasis oxidativa de los ganglios basales, que eventualmente da como resultado una peroxidación lipídica [85] y muerte neuronal [86], como lo han demostrado los estudios experimentales de cultivos neuronales.

Otro hallazgo indicativo de estrés oxidativo durante el manganismo, es una inhibición causada por el Mn al complejo mitocondrial  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa durante una exposición *in vitro*; éste es un complejo multi-enzima que cataliza un paso del ciclo de los ácidos tricarbónicos [87, 88]. Zheng y Graziano (1998) establecieron que el tratamiento de Mn *in vivo* induce una disminución de acotinasa en regiones cerebrales específicas (otra enzima del ciclo de los ácidos tricarbónicos), además establecieron que el Mn puede inhibir la actividad de esta enzima en mitocondrias cerebrales *in vitro* [37]

## **7.2 Susceptibilidad dopaminérgica**

Se ha observado que el Mn promueve y potencia la autooxidación de catecolaminas como son la epinefrina, NE y la DA, siendo esta última la más afectada, ya que el Mn puede destruir a su precursor: la L-DOPA.

La DA al igual que las aminas en general, son una fuente importante de radicales libres en el organismo, ya que por cada mol de amina oxidada se forma un mol de peróxido de hidrógeno; también, durante el proceso de auto-oxidación se da la formación semiquinonas y quinonas

que son por sí mismas tóxicas [61]. Pero es aún más decisivo el metabolismo enzimático de la DA que conduce no sólo a la producción de metabolitos deaminados como el ácido homovanílico (HVA) o el 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), sino también a la formación de potentes oxidantes celulares como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo [82, 89], los cuales se ha propuesto, pueden en su momento atacar a la DA, a sus receptores (principalmente al postsináptico) o bien a las neuronas dopaminérgicas [83, 90, 91]. Asimismo, como se ha mencionado antes, existen reportes de un aumento en el recambio de DA en condiciones de neurotoxicidad causada por el Mn por lo cual la producción de radicales libres tóxicos estaría muy incrementada.

Consecuentemente un alto contenido de DA estriatal en presencia de un aumento en la cantidad de Mn en dicha estructura cerebral, crea circunstancias favorables para el disparo de una aceleración catastrófica en la autoxidación de la catecolamina [55]. Asimismo, el Mn puede interactuar potencialmente con el  $H_2O_2$ , formado durante la deaminación de la DA por la monoamina oxidasa en neuronas de la sustancia nigra; bajo estas condiciones el metal puede llevar a estrés oxidativo y a una inducción subsecuente de señales de vías de transducción llevando a la muerte celular vía apoptosis [92].

### **7.3 Disfunción mitocondrial**

Un efecto causado indirectamente por Mn en la neurotoxicidad frecuentemente reportado es una disfunción mitocondrial en los ganglios basales, que inicia debido a que el metal tiene una alta afinidad por las mitocondrias de las vías dopaminérgicas nigroestriatales, donde se acumula principalmente en la membrana mitocondrial [77]; esta acumulación irregular tiene graves consecuencias inclusive para las mitocondrias astrocíticas, las cuales son muy vulnerables.

Se ha propuesto que el Mn promueve la acumulación de  $Ca^{2+}$  dentro de la mitocondria por la inhibición de los transportadores de Na; de esta manera activa el poro de transición permeable, el cual eventualmente lleva a la interrupción de la función mitocondrial [93, 94]. Además, el Mn

interfiere con la fosforilación oxidativa por la inhibición tanto de la F1-ATPasa mitocondrial [93, 94] y del complejo I [95], resultando una disminución en los niveles de ATP [95, 96]. En ese estado de disfunción mitocondrial la proporción de NADPH/NADP es incapaz de mantener un ciclo apropiado para la actividad de la glutatión peroxidasa, llevando finalmente a un aumento deletéreo en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y de ERO [98, 99] que promueven la peroxidación lipídica de la membrana celular e inclusive esta peroxidación puede ser potenciada por un exceso de  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  (figura 5), puesto que el Fe es capaz de generar ERO vía la reacción de Fenton [92] y agravar la degeneración neuronal en el globo pálido. Esta relación eleva la importancia de cómo el Fe puede ser un factor potencial de riesgo para la neurotoxicidad del Mn. Por lo que, es posible que la cascada de efectos adversos (ya antes mencionados), que provoca el Mn durante la neurotoxicidad en el organelo mitocondrial puedan finalmente inducir la muerte celular via apoptosis [92].

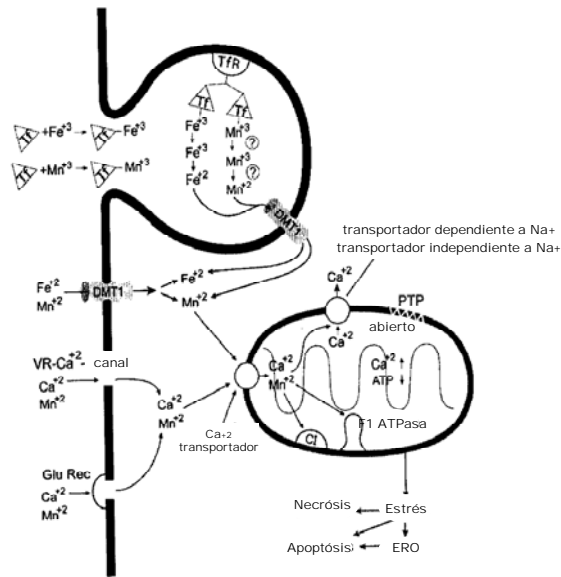


Figura 5. Se representan los mecanismos de regulación del transporte celular del Mn y toxicidad. Canal de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por voltaje ( $\text{VR-Ca}^{2+}$  canal), receptor a glutamato (Glu Rec), receptor a transferrina (TfR), poro de transición permeable (PTP), especies reactivas de oxígeno (ERO). Modificado de Roth J, A. et al. (2003) [92].

#### 7.4 Excitotoxicidad mediada por glutamato

Observaciones experimentales sugieren que los mecanismos excitotóxicos secundarios juegan un papel crucial en el desarrollo de la neurodegeneración inducida por el Mn en el estriado. Una excitación anormal de neuronas estriadales durante la intoxicación puede deberse

a la hiperactividad de neuronas corticoestriatales [86]. Por otra parte, estudios en autopsias en tejidos cerebrales de pacientes con encefalopatía hepática revelan que existe una expresión alterada de varios genes que codifican para proteínas que tienen roles clave en el control de la excitabilidad neuronal, así como una disminución en la expresión del transportador de glutamato, un aumento en la expresión de monoamina oxidasa y del receptor a benzodiazepinas tipo periférico, por lo que la alteración en la expresión genética puede estar asociada con una acción anormal del exceso de Mn en la sinapsis [2].

Por otro lado Hazell and Norenberg, [100] han atribuido las alteraciones en la recaptura de glutamato, así como en sus receptores, a los efectos de la producción desmedida de ERO, los cuales afectan los niveles de la proteína transportadora [101], y la actividad enzimática de la SOD y glutatión peroxidasa (24) siendo esta última una enzima astrocítica clave. Además es probable que el Mn disminuya la expresión del transportador de glutamato y aspartato (GLAST) posiblemente a través de la generación de ERO [4].

La modificación en los niveles extracelulares de glutamato es una alteración neuroquímica significativa en la neurotoxicidad del Mn, por lo que la disminución de la recaptura por los astrocitos se ha propuesto como una causa principal en el desorden [100], ya que el incremento en la concentración extracelular de glutamato es potencialmente citotóxico para neuronas cercanas, representando así una causa próxima de la neurotoxicidad del metal [73]. En conclusión, es factible que la captura del Mn dentro de los astrocitos de los ganglios basales y la subsecuente acumulación del metal en la mitocondria de esas células comprometa el metabolismo energético, daño oxidativo, deterioro de la comunicación astrocito-neurona, una alteración indirecta en las influencias excitatorias e inhibitorias, y un eventual desarrollo secundario de toxicidad mediada por el glutamato. Algunos de estos procesos pueden jugar un papel además en la transformación de los astrocitos normales en la forma patológica de Alzheimer tipo II. Finalmente, la vulnerabilidad selectiva de los ganglios basales puede ser debida a una combinación de diferentes efectos sobre los astrocitos de esta área, quizás aditivos, más que un simple proceso [81].



## **7.5 Óxido Nítrico**

En fechas recientes el papel que juega el óxido nítrico (ON) en la neurotoxicidad por el Mn ha tomado importancia, ya que interviene en la producción de daño oxidativo, y se ha observado que el ON es capaz de inhibir la cadena respiratoria mitocondrial fundamentalmente el complejo IV [102]. Asimismo, estudios recientes han demostrado que el tratamiento de astrocitos con Mn da como resultado un aumento en la recaptura del aminoácido L-arginina, el cual es sustrato para la formación del óxido nítrico a partir de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) constitutiva neuronal [103]; también existe un incremento de la proteína NOS inducible y en la expresión del gen correspondiente [103].

## **V. HIPÓTESIS**

La intoxicación crónica con  $Mn^{2+}$  en un modelo de encefalopatía hepática deteriora tanto la coordinación motriz como el aprendizaje y la consolidación de la memoria en dos tareas dependientes de los ganglios basales.

## **VI. OBJETIVO**

Evaluar el papel del  $Mn^{2+}$ , en un modelo de encefalopatía hepática inducida, durante los procesos mnémicos (adquisición, consolidación y evocación de la memoria) y de actividad motora fina.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **Animales y cirugía**

Se utilizaron ratas macho Wistar de 200 a 250 gr de peso, las cuales estuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, con ciclos de luz-oscuridad de 12 hrs.

El experimento consistió de 4 grupos:

2 controles:

- Grupo 1 **Control**
- Grupo 2 **Mn<sup>2+</sup>**

2 experimentales:

- Grupo 3 **Ligado**
- Grupo 4 **Ligado/Mn<sup>2+</sup>**

A ambos grupos controles (grupo 1 y grupo 2) se les realizó una falsa operación en la cavidad abdominal: los animales fueron anestesiados con pentobarbital 35mg/Kg., posteriormente se hizo una incisión de 1.5 cm en el abdomen, exponiendo el conducto biliar común y después se suturó la incisión.

Los grupos experimentales (grupo 3 y 4) fueron sometidos a una operación, por lo cual se anestesiaron con pentobarbital 35mg/kg. La operación consistió en la ligación de conducto biliar común (LCBC) mediante el método reportado por Montes *et al* (2002) [104]. Una vez operada, cada rata fue colocada en una caja individual, con libre acceso a comida y agua.

Los grupos 2 y 4 fueron sometidos a un tratamiento de Mn por la vía oral durante 4 semanas en el cual el agua disponible para beber consistió de una solución de Mn a una concentración de 1.0 mg/ml de Mn<sup>2+</sup>, para ello se preparó una solución de 1.6 g de MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O en 1 L de agua. Los grupos 1 y 3 tuvieron disponible agua para beber.

Diariamente se registró el peso y el consumo de la solución de Mn<sup>2+</sup> (para los grupos 2 y 4) para cada rata y posteriormente se estimó la dosis acumulativa de Mn<sup>2+</sup>, para reportar el resultado como mg de Mn<sup>2+</sup> por Kg de peso.

Una vez que concluyó el tratamiento se realizó, durante el ciclo de luz, a cada rata y por separado las pruebas para evaluar la coordinación motriz, mediante el método de viga inclinada, así como la adquisición, consolidación y evocación de la memoria mediante el uso de laberinto elevado en "T" y cámara de prevención pasiva. Cada una de las pruebas se describen a continuación.

## EFFECTO DEL MANGANESO (Mn) SOBRE EL APRENDIZAJE Y MEMORIA EN EL MODELO DE DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO.

### Experimento 1. Modelo de prevención pasiva

#### Aparato

Se utiliza una cámara de condicionamiento de madera, dividida en dos compartimentos del mismo tamaño (30x30x30 cm) dichos compartimentos se encuentran separados por una puerta deslizable. Uno de los compartimentos (de seguridad) está iluminado con un foco de 15 w y su piso está formado por barras de acero inoxidable. El piso del compartimiento oscuro (de castigo) está compuesto por dos placas de acero inoxidable conectadas a un generador de choques eléctricos (LVE/BRS modelo PG-901); cada placa se continúa en forma de V con las paredes del compartimiento lo cual permite que los sujetos se encuentren en contacto con ellas todo el tiempo y puedan recibir el choque eléctrico. La cámara de condicionamiento se localiza dentro de un cuarto oscuro y sonoamortiguado provisto de ruido de fondo (figura 6).

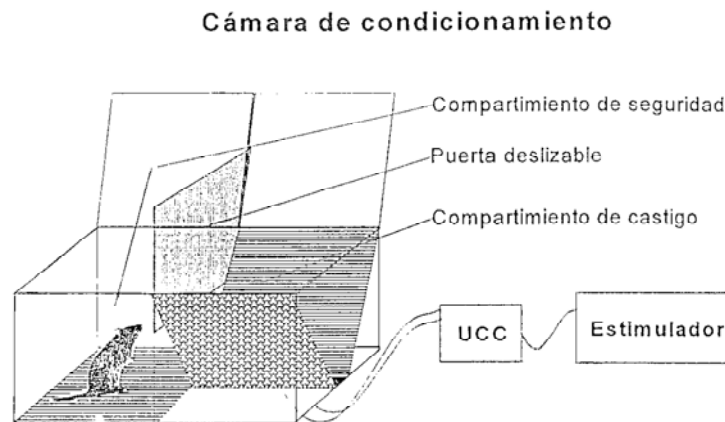


Figura 6. Cámara de condicionamiento utilizada para la prueba de prevención pasiva.

#### Procedimiento: Entrenamiento y prueba

Durante la única sesión de entrenamiento o de adquisición, cada sujeto se introduce en el compartimiento iluminado durante diez segundos; transcurrido este tiempo se abre la puerta y se mide el tiempo que tarda en cruzar al compartimiento de castigo (latencia de adquisición). En este momento se cierra la puerta y se aplica un choque de 2.5 mA durante cinco segundos inescapables. Posteriormente se abre la puerta y se registra el tiempo que tarda en regresar al

compartimiento iluminado (latencia de escape), en donde se mantiene al sujeto durante 30 segundos más para después retirarlo y devolverlo a su caja. 24 horas después, en la sesión de prueba o retención, en la cual se vuelve a introducir a cada sujeto al compartimiento iluminado de la misma manera que en la sesión de adquisición, sólo que sin aplicar el choque y se mide la latencia que tarda en pasar al compartimiento oscuro (latencia de retención). Si el sujeto no cruza en 600 segundos se da por terminada la sesión y se asigna una latencia de retención de 600, lo que indica una optima resolución de la prueba [105].

### **Estadística**

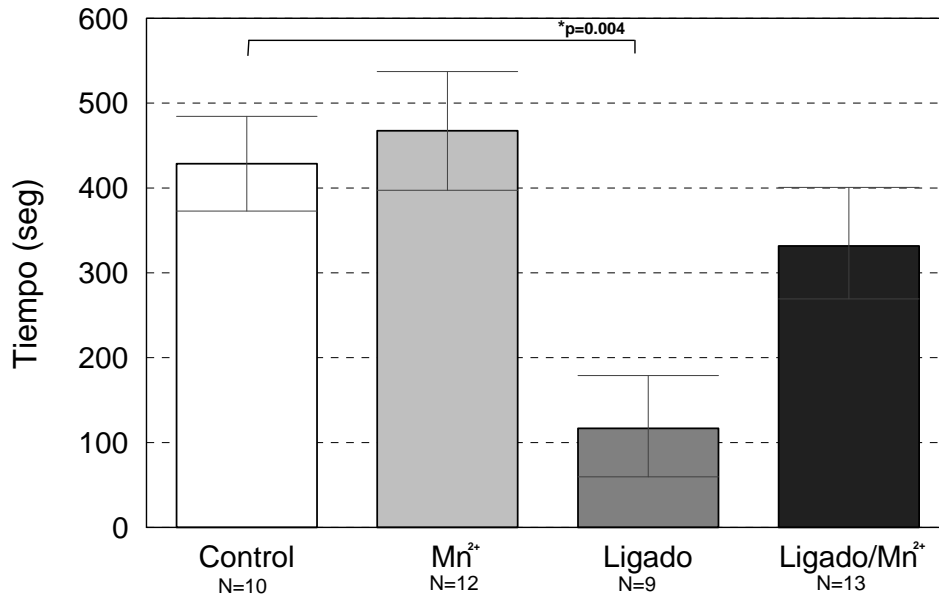
Los resultados de las latencias se analizaron comparando las latencias de adquisición y retención de los diferentes grupos. Debido a que las distribuciones de los registros fueron cortados a 600 segundos, se utilizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal- Wallis, seguido de la prueba de U de Mann Whitney para realizar comparaciones entre los grupos (Siegel, 1995), utilizando el programa de Graph Pad Prism (versión 4).

### **Resultados**

Una vez que se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos al llevar a cabo la prueba en la cámara de prevención pasiva, no se encontró ninguna variación significativa cuando se compara las latencias de adquisición. En cuanto a las latencias de retención (LR) de los distintos grupos experimentales, en la gráfica 1.1, se observan el promedio o media  $\pm$  el error estandar promedio (E. E. P). y se puede notar que el grupo ligado tuvo una reducción significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.004$ ). Esto demuestra un déficit en la retención del grupo ligado 24 horas después del entrenamiento. Sin embargo, el grupo ligado/ $Mn^{2+}$  que fue tratado con el metal y entrenado de la misma manera que los demás grupos, no muestra algún deterioro en la retención.

# Modelo Prevención Pasiva

## Latencias de retención



Gráfica 1.1 Comparación entre las latencias de retención (LR) de los diferentes grupos, LR=600 indica una óptima resolución de la prueba. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis: KW=11.6, P=0.0085, Seguida de U de Mann Whitney \*p=0.0043, U=10

### Discusión

La diferencia significativa que se encontró en el grupo ligado cuando se compara con el grupo control sugiere que la LCBC por sí sola puede dar como consecuencia un déficit significativo en la retención, sin embargo, se esperaba encontrar una diferencia significativa del grupo ligado/Mn<sup>2+</sup> con respecto al grupo control, ya que el grupo ligado/ Mn<sup>2+</sup> estuvo sometido a un tratamiento donde se potencia la concentración cerebral de dicho metal en regiones específicas de los ganglios basales (de acuerdo a lo reportado previamente por Montes et al. 2001) de ser así se hubiera evidenciando un deterioro en la retención de la tarea, sin embargo esto no ocurrió, por lo que se puede decir que el metal en el tratamiento utilizado para el grupo ligado/Mn<sup>2+</sup> no provoca alteración alguna asociada al aprendizaje, la consolidación o la evocación de la memoria en dicha tarea.

## Experimento 2. Prueba de laberinto elevado en "T".

### Aparato

El laberinto elevado consiste de 2 brazos abiertos opuestos que miden cada uno 50 x 10 cm. y de 1 brazo cerrado (50 x 10 x 40 cm.) que están elevados 50 cm del piso. Los brazos se extienden de la plataforma central, donde el sujeto puede entrar libremente tanto a los brazos abiertos como al cerrado (figura 7).

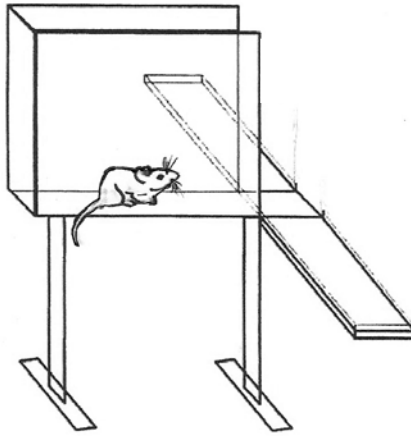


Figura 7. Laberinto elevado en "T".

### Procedimiento: Entrenamiento y prueba

En la sesión de entrenamiento la rata se coloca en la parte final del brazo cerrado y se mide el tiempo en que ésta sale (con las cuatro patas) al brazo abierto, siendo este tiempo la latencia de adquisición (LA); esto se repite durante 4 veces más (LA1, LA2, LA3, LA4), y en la quinta vez se coloca en el extremo del brazo abierto y se mide el tiempo en que tarda en llegar brazo cerrado siendo este tiempo la latencia de escape (LE).

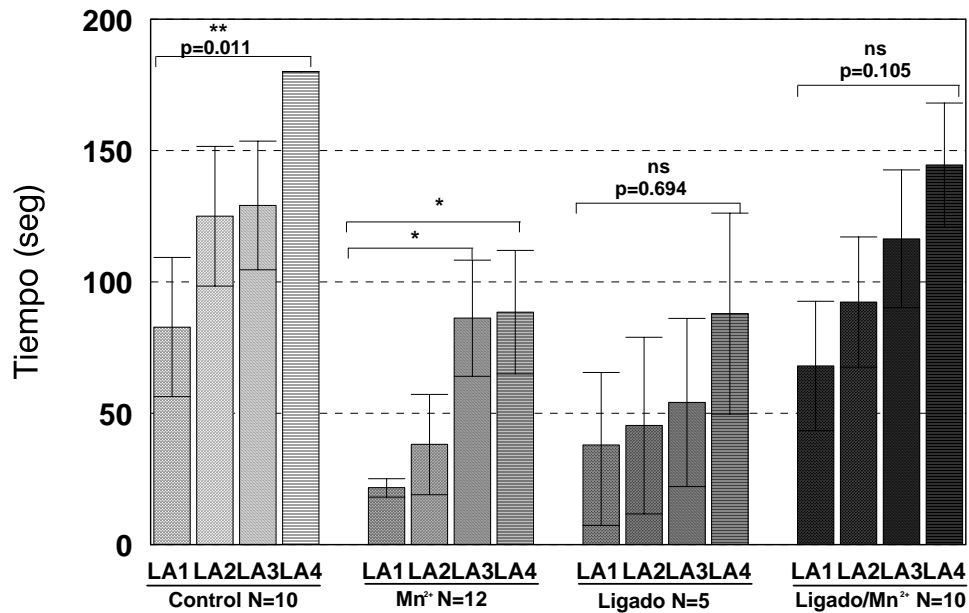
La sesión de prueba se realiza 48 hrs después, bajo las mismas condiciones de entrenamiento: la rata se coloca en la parte final del brazo cerrado y se mide el tiempo en que tarda de salir siendo éste la latencia de retención (LR), el tiempo límite para que salga es de 180 segundos y una LR=180 indica una óptima resolución de la prueba [106]. Esta prueba se basa en la aversión natural que tienen los sujetos por deambular por los brazos abiertos, debido a lo cual las LAs irán aumentando en cada ensayo ( $LA1 < LA2 < LA3 < LA4$ ) ya que los sujetos aprenden a no salir hacia los brazos abiertos.

## Resultados

En la gráfica 2.1 se muestra el promedio  $\pm$  el E. E. P de los datos correspondientes a las LA1, LA2, LA3 y LA4. Se llevó a cabo un análisis estadístico de ANOVA de mediciones repetidas seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls. Los resultados muestran que conforme aumenta el número de ensayos (LA1 a LA4) en la prueba de entrenamiento, el valor de la LA se incrementa progresivamente y ésta se acerca o es igual al valor máximo que es de 180, indicando un óptimo aprendizaje que se representa en la gráfica a través de una "curva de aprendizaje" de acuerdo a lo esperado. Asimismo resultó significativa la comparación en el grupo  $Mn^{2+}$  de la LA1 contra la LA3, y de la LA1 contra la LA4 ( $p < 0.05$  para ambos casos). Sin embargo, para los grupos ligado y ligado/ $Mn^{2+}$  los resultados no fueron significativos  $p > 0.05$ , no obstante como se puede apreciar en la gráfica los valores de las LA incrementaron gradualmente.

# Laberinto elevado en "T"

## Latencias de adquisición

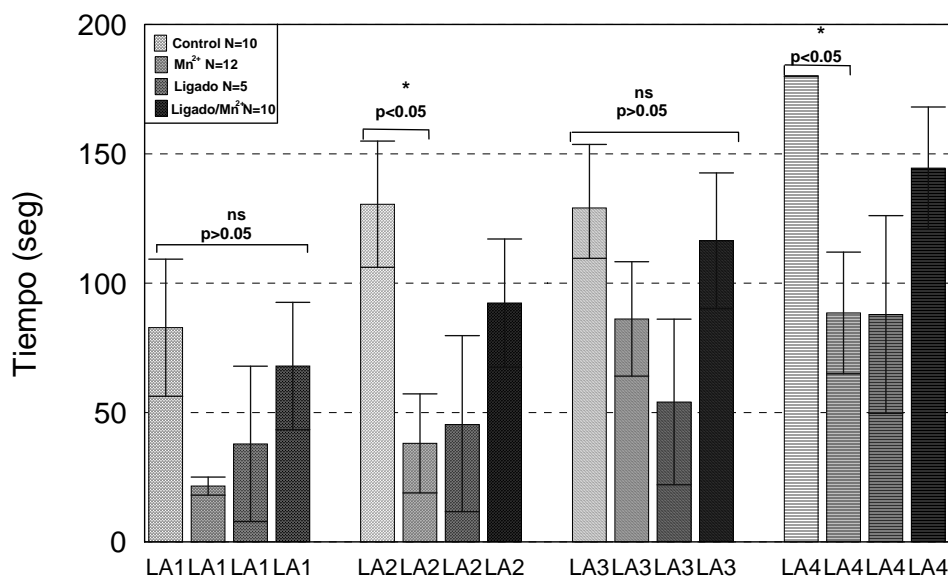


Gráfica 2.1 Curva de aprendizaje. Se muestra el transcurso de las latencias de adquisición LA1 a LA4 en la duración de la prueba. Los resultados representan el promedio  $\pm$  el E. E. P de la duración de la LA, el valor máximo es de 180 en la duración de la misma. Se realizó una prueba estadística ANOVA de mediciones repetidas, seguida de una Newman-Keuls. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ns=no significativo.

Para comparar la ejecución en cada grupo para cada ensayo durante la prueba de entrenamiento, se llevó a cabo una ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn's como post-hoc. Los resultados mostraron que cuando se comparan las LA1 de los diferentes grupos no existe una diferencia significativa (KW=4.934, P=0.2219), lo mismo ocurre cuando se comparan las LA3: KW=4.394, p=0.5296. Sin embargo, la comparación de las LA2 resultó significativa entre el grupo control y el grupo Mn<sup>2+</sup> KW=11.46, \*\*p=0.0095; de igual manera resultó significativa la comparación de la LA4 entre el grupo control y el grupo Mn<sup>2+</sup> KW= 8.657, \*p=0.034 (Gráfica 2.2).

## Laberinto elevado en "T"

### Latencias de adquisición



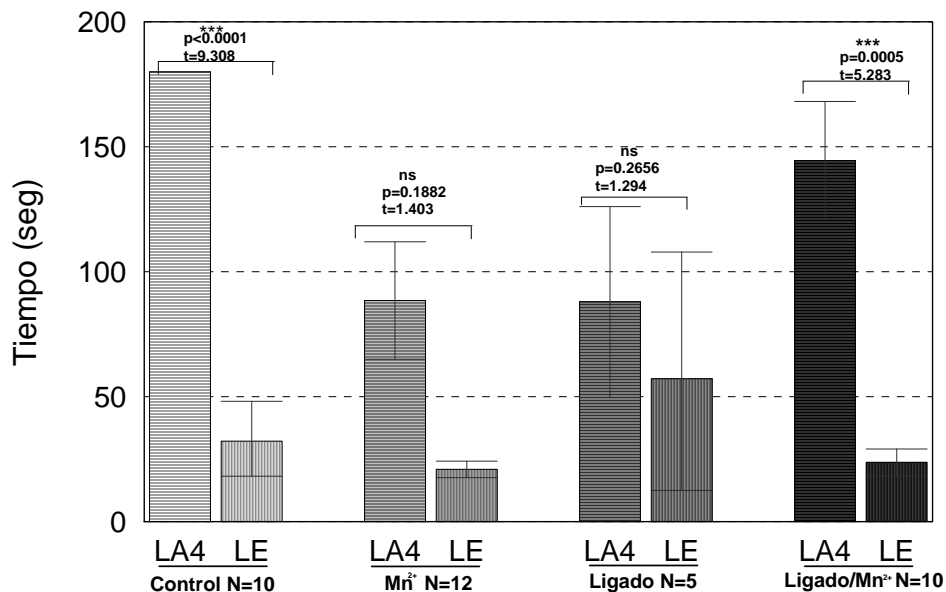
Gráfica 2.2 Comparación de las LA1, LA2, LA3 y LA4 de la prueba laberinto en "T" Se llevó a cabo una prueba ANOVA de Kruskal-Wallis seguida de una prueba post-hoc Dunn; LA1: KW=4.39, p=0.2219, LA2: KW=11.46, p=0.0095, LA3: KW=2.212, p=0.5296, LA4: KW=8.657, p=0.034. ns=no significativo, \*p<0.05 Dunn's.

En la gráfica 2.3 se presenta la comparación entre la LA4 y la LE para cada grupo experimental. Se realizó una prueba t de Student en la que resultaron significativos el grupo control p<0.0001, t=9.308 y ligado/Mn<sup>2+</sup> p=0.0005 t=5.283. En los grupos Mn<sup>2+</sup> y ligado la diferencia no resultó significativa p>0.05. Cabe mencionar que la LE es un parámetro importante para descartar efectos sobre procesos no mnemónicos (por ejemplo procesos motores) que pudieran afectar de manera inespecífica en la ejecución o desempeño de la



misma. Por lo que, a través de los datos obtenidos para este parámetro y su respectivo análisis se deduce que los sujetos ejecutaron de manera óptima la prueba y que no tuvieron algún impedimento motivacional o motriz severo que limitara su desempeño.

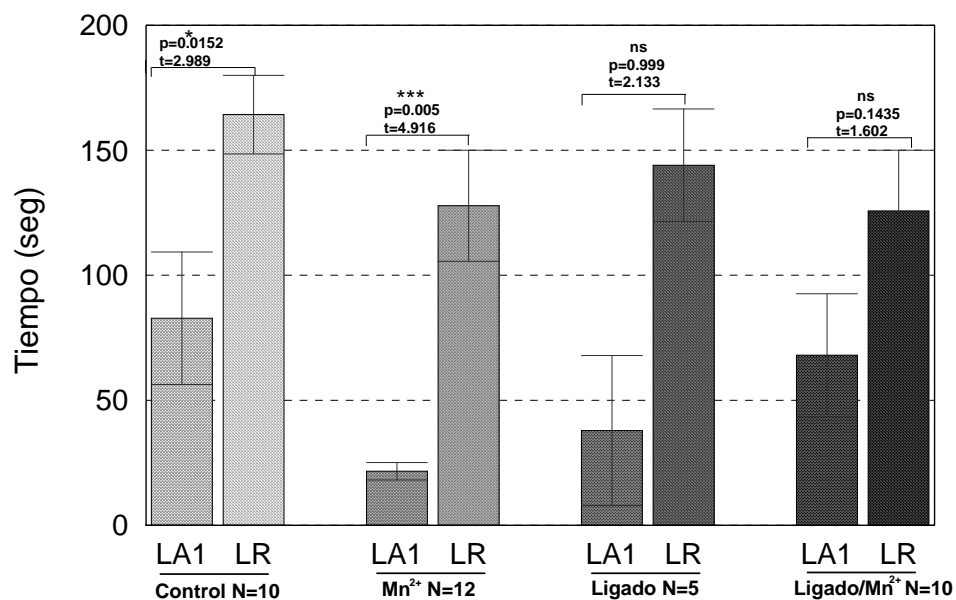
## Laberinto elevado en "T"



Gráfica 2.3. Comparación entre las LA4 y las LE para los diferentes grupos. Se llevó a cabo una prueba t de Student para cada grupo. \*\*\*p<0.0001, ns=no significativo.

Otro parámetro de suma importancia es la LR, que se mide en la sesión de prueba e indica la retención a largo plazo; el valor máximo es de 180 seg. En la gráfica 2.4, se muestra el valor de la LR expresado en media  $\pm$  E. E. P. Para el análisis entre la LA1 y la LR correspondiente a cada grupo experimental se utilizó una prueba t de Student. Los resultados muestran que existe una diferencia significativa  $p=0.0152$   $t=2.989$ , en el grupo control y el grupo  $Mn^{2+}$   $p=0.005$ ,  $t=4.916$ , pero no hubo diferencias en el grupo ligado  $p=0.999$ ,  $t=2.133$  ni ligado/ $Mn^{2+}$   $p=0.1435$ ,  $t=1.602$ .

## Laberinto elevado en "T"

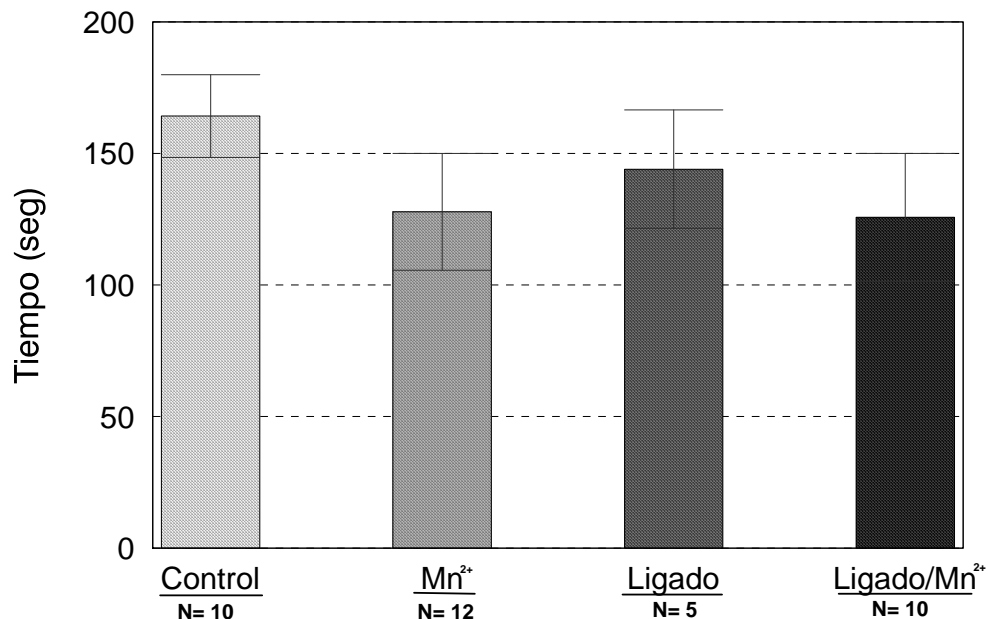


Gráfica 2.4 Comparación entre las LA1 y las LR de los diferentes grupos. Se llevó a cabo una prueba estadística t de Student \*p=0.0152, t=2.989, \*\*\*p=0.005, t=4.916, ns=no significativo.

Posteriormente se comparó únicamente las LR de los distintos grupos a través de un análisis de varianza (ANOVA) p=0.2873, lo que demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos. Por lo tanto, se concluye que en este modelo experimental, tanto el tratamiento con Mn<sup>2+</sup> como el daño hepático crónico como consecuencia de la LCBC no provocan un efecto grave sobre el aprendizaje y la memoria.

# Laberinto elevado en "T"

## Latencias de retención (LR)



Gráfica 2.5. Comparación de las LR para los diferentes grupos. Se llevó a cabo una ANOVA donde el valor de  $p=0.2873$ , no significativo.

### Discusión

Mediante los diferentes análisis estadísticos que se realizaron a los resultados de los parámetros medidos en éste modelo (LA1, LA2, LA3, LA4, LE y LR) se mostró que no existen diferencias significativas entre los grupos control,  $Mn^{2+}$ , ligado y ligado/ $Mn^{2+}$  por lo que se infiere que no existe algún daño severo en las capacidades cognitivas que conlleve a alguna alteración en la ejecución de la tarea: asimismo, es notable que los sujetos experimentales desarrollaron de una manera óptima la prueba, sugiriendo que los procesos de consolidación y de retención de la memoria están preservados.

## EFFECTO DEL MANGANESO (Mn) SOBRE LAS FUNCIONES MOTORAS EN EL MODELO DE DAÑO HEPÁTICO CRÓNICO.

### Experimento 3. Modelo de la viga inclinada

#### Aparato

Este sencillo instrumento consta de una viga de madera de 2 metros de largo colocada a 15 grados de inclinación con referencia al piso y tiene un ancho variable de 3, 6, 12, 18, 24 mm. que se ponen aleatoriamente durante la sesión. En el extremo alto de la viga se coloca sobre una base la caja hogar de la rata, para que ésta atraviese la viga y llegue a su destino. La viga inclinada se localiza dentro de un cuarto con iluminación media y sonoamortiguado provisto de ruido de fondo (figura 8).

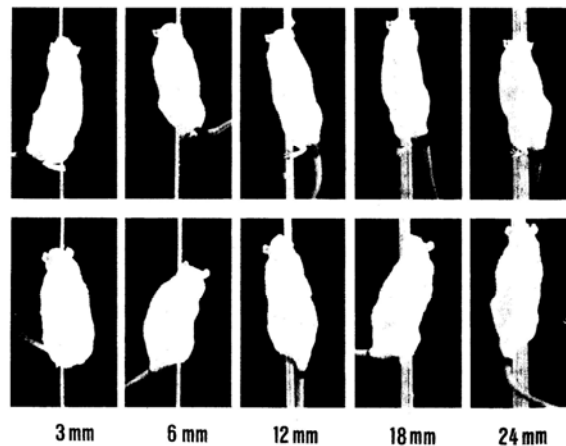


Figura 8. Modelo de la Viga inclinada. Vista superior de las ratas ejecutando la prueba en los diferentes grosores de la viga: 3, 6, 12, 18 y 24mm.

#### Procedimiento: Entrenamiento y prueba

La sesión de entrenamiento consistió en colocar a la rata en la parte baja de la viga para que precisamente la atravesara y llegara a su caja hogar situada al otro extremo; esta sesión se llevó a cabo siempre en el mismo horario y bajo las mismas condiciones de temperatura y luz. Los sujetos se entrenaron durante 4 días consecutivos en la viga de 24 mm de grosor y se realizaron tres ensayos por animal. La sesión de prueba se realizó 5 días después de que concluyó el entrenamiento, siguiendo el mismo procedimiento pero esta vez el grosor de la viga se cambió aleatoriamente en cada ensayo y se registró si el animal cruza o no la viga, el tiempo que utiliza en cruzarla y llegar a su caja (latencia de cruce), y el tiempo inmóvil (T. I) en un máximo de 120 segundos para la ejecución de la prueba [107].

El objetivo de utilizar esta prueba es identificar la coordinación locomotora fina.

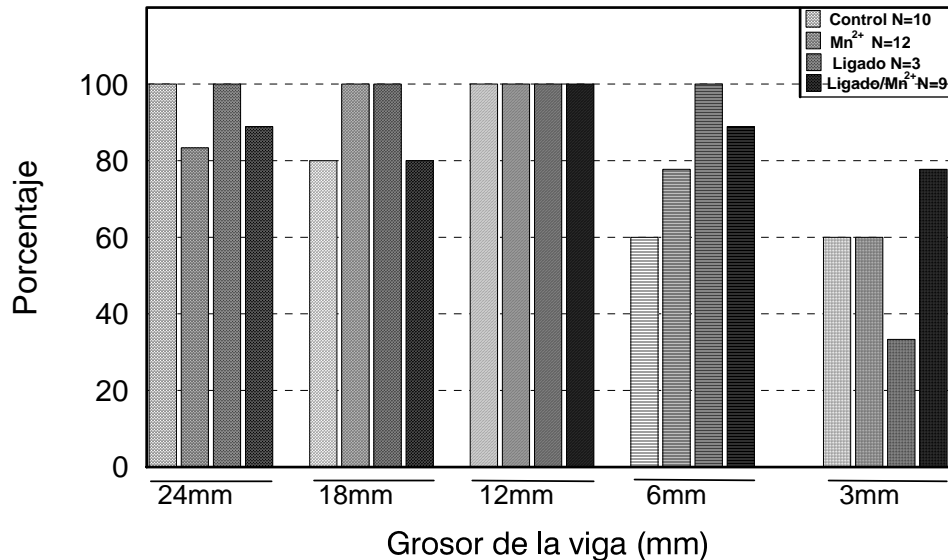
## **Resultados**

Cabe mencionar que debido al diseño que se siguió en este trabajo, éste fue el último experimento que ejecutaron los sujetos y cuando se realizó la sesión de prueba en el modelo de la viga inclinada, la duración del tratamiento para los grupos  $Mn^{2+}$ , ligado y ligado/ $Mn^{2+}$  había alcanzado cerca de 6 semanas, por lo que durante este tiempo, fue mayor la mortandad como consecuencia del desarrollo de la cirrosis. Debido a lo anterior la N se redujo a 3 sujetos para el grupo ligado.

Por otro lado, con los datos correspondientes al número de sujetos (por grupo experimental) que cruzaron la viga con diferente grosor: 3, 6, 12, 18 y 24 mm se obtuvo los porcentajes por grupo y se analizaron mediante una prueba de t de Student. El análisis demostró que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales  $p > 0.10$ . En la gráfica 3.1 podemos observar que, efectivamente, los valores para la latencia de cruce en el grosor de 24 y 18 mm son muy similares, y para la viga de 12 mm todos los sujetos de los distintos grupos, es decir el 100% realizaron el cruce llegando a su caja hogar. Sin embargo, se observó durante la sesión de prueba, que cuando los sujetos se probaron con la viga de grosor de 6 y 3 mm también les fue más difícil de cruzar ya que requieren de un mayor esfuerzo y de una habilidad motora compleja vinculada al movimiento coordinado. Observamos que para el grosor de 3 mm se registró un menor porcentaje de los sujetos que cruzaron la viga, sin embargo, esta diferencia no resultó significativa entre los grupos ( t de Student  $p > 0.10$ ).

# Modelo Viga Inclinada

Porcentaje de sujetos que cruzan



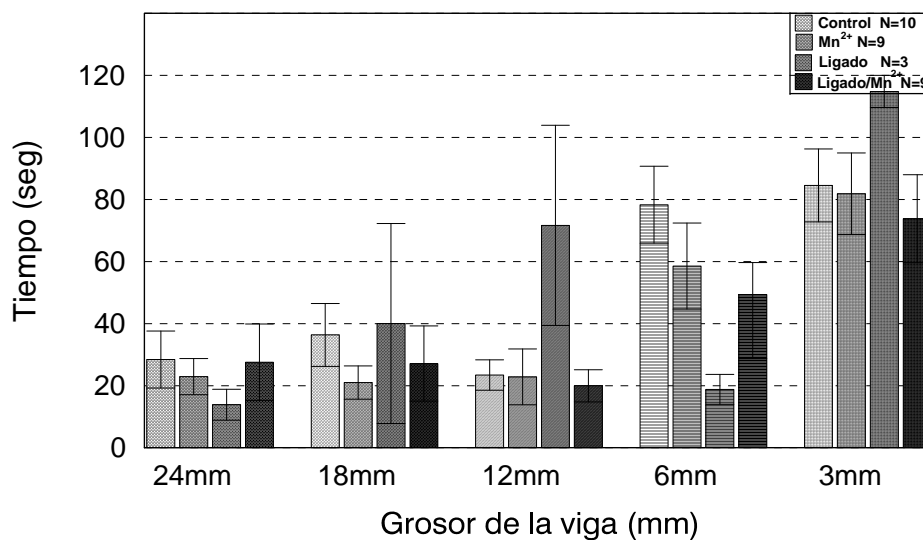
Gráfica 3.1 Comparación del porcentaje de sujetos que cruzan la viga a diferente grosor. Se llevó a cabo una prueba de t de Student  $p > 0.10$ , ninguno de los grupos es significativo.

Por otro lado, cuando se evalúa el parámetro T.I. mediante un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis  $KW=22.517$ ,  $p=0.2593$  no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Otro parámetro analizado fue la latencia de cruce, el cual nos indica el tiempo de esfuerzo que le llevó al animal para ejecutar la prueba. Los datos fueron evaluados con un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. En la gráfica 3.2 los datos se expresan como la media  $\pm$  el E. E. P del número de animales incluido en cada experimento. Los resultados de los análisis de varianza Kruskal-Wallis fueron; viga de grosor 24mm:  $KW=0.4968$ ,  $p > 0.05$ , grosor 18mm:  $KW=4.768$ ,  $p=0.1896$ , grosor 12mm:  $KW=3.316$ ,  $p=0.3454$ , grosor 6mm:  $KW=7.367$ ,  $p=0.0611$ , y por último para el grosor 3mm:  $KW=2.549$ ,  $p=0.4665$ . No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos, en el parámetro latencia de cruce, de la prueba de la viga inclinada.

# Modelo Viga inclinada

## Latencia de cruce



Gráfica 3.2. Comparación de la latencia de cruce para los diferentes grupos experimentales. Se llevó a cabo un análisis Kruskal Wallis,  $p > 0.05$ , no se encontraron diferencias significativas.

### Discusión

A pesar de los resultados reportados en éste modelo de encefalopatía hepática crónica por Montes et al (2001) [21]; donde se demuestra que el tratamiento crónico administrado en una dosis de 1.0 mg/ml de  $Mn^{2+}$  provoca una acumulación anormal del 57% en el estriado y por otro lado, de acuerdo a la literatura, donde se ha reportado que en mamíferos los ganglios basales han sido implicados en el funcionamiento no sólo motor sino también específicamente, la parte dorsal del estriado esta involucrado en tareas relacionadas al aprendizaje y memoria, por lo que, se tenía previsto encontrar una diferencia significativa en los grupos tratados que evidenciara una alteración severa en la coordinación motriz fina, esto no sucedió, por lo que, al parecer, este modelo de daño hepático crónico no repercute en las capacidades motoras de los sujetos experimentales.

## VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Las evaluaciones en las pruebas de Prevención Pasiva (experimento 1) demostraron que existe una deficiencia en la retención de la tarea para el grupo ligado, se presume que esto se deba al deterioro causado por el desarrollo de la cirrosis. Lo que indica que al parecer la LCBC practicada en dicho grupo puede provocar un efecto deletéreo que repercute en la ejecución de la tarea.

Sin embargo el análisis estadístico de los resultados correspondientes a los diferentes parámetros analizados en la prueba del laberinto elevado en "T" (experimento 2) no mostraron evidencias de un deterioro cognitivo entre los diferentes grupos.

Por otro lado, los resultados en la prueba Viga inclinada (experimento 3) mostraron que no existen diferencias significativas entre los grupos tratados y control ( $p > 0.05$ ) lo cual demuestra que no se presenta una alteración severa en la coordinación motriz fina. Cabe mencionar que esta prueba es sensible para medir alguna alteración en el movimiento locomotor fino indicativo de una anomalía en las vías dopaminérgicas. Los resultados obtenidos en esta prueba nos llevan a concluir que el efecto del  $Mn^{2+}$  en el modelo de daño hepático crónico no induce una alteración severa en el movimiento fino.

Con base en los resultados obtenidos de las pruebas experimentales antes mencionadas, concluimos que algunas manifestaciones conductuales que revelan funciones integrativas se preservan.



## IX. REFERENCIAS

- [1] Aisen P, Aasa R, Redfield A.G.(1969) The chromium, manganese and cobalt complex of transferrin. *J. Biol. Chem.* 244, 4628-4633.
- [2] Brouillet E.P, Shinobu L, Mc Garvey U, Hochberg F, Beal M.F, (1994) Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp. Neurol.* 120 89-94.
- [3] Carl G.F, Critchfield J.W, Thompson J.L, Holmes G.L, Gallagher B.B, Keen C.L, (1990) Genetically epilepsy-prone rats are characterized by altered tissue trace element concentrations. *Epilepsy* 31 247-252.
- [4] Erikson K. M, Aschner M. (2002) Manganese causes differential regulation of glutamate transporter (GLAST), taurine transporter, and metallothionein in cultured rat astrocytes. *Neurotoxicol.* 23; 595-602.
- [5] Komura J, Sakamoto M. (1994) Chronic oral administration of methyl-cyclopentadienyl manganese tricarbonyl altered brain biogenic amines in the mouse comparison with inorganic manganese. *Toxicol Lett.* 73; 65-73. En Aschner M. (2000) Manganese: Brain transport and emerging research needs. *Environmental Health Perspectives.* 3; 429-432.
- [6] Pomier Layrargues G, Spahr L, and Butterworth R.F. (1995) Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients: cause of manganic resonance hyperintensity?. *Lancet* 345-735
- [7] Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P, Theilmann L, Lichtnecker H. (1995) Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 346; 270-274.
- [8] Hauser R.A, Zeisiewicz T.A, Rosemurgy A.S, Martinez C, and Olanow C.W. (1994) Manganese intoxication and chronic liver failure. *Ann Neurol.* 36: 871-875.
- [9] Versieck J, Barbier F, Specke A and Hoste J. (1974) Manganese, copper and zinc concentrations in serum and packed blood cells during acute hepatitis, chronic hepatitis and posthepatic cirrhosis. *Clin. Chem.* 20; 1141-1145.
- [10] Ingersoll R.T, Montgomery E.B, and Aposhian H.V. (1995) Central nervous system toxicity of manganese. I. Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal administration of manganese chloride. *Toxicol, Appl. Pharmacol.* 27, 106-113.
- [11] Chandra S. V, Srivastava R. S, Shukla G. S. (1979) Regional distribution of metal and biogenic amines in the brain of monkeys exposed to manganese. *Toxicol. Lett.* 4; 189-192.
- [12] Chandra A.V, Ali M.M, Saxena D.K, and Murthy R. C. (1981) Behavioral and Neurochemical changes in rats simultaneously exposed to manganese and lead. *Arch Toxicol.* 49, No 1, 49-56.
- [13] Bonilla E. (1984) Chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats. *Exp. Neurol.* 84: 696-700.
- [14] Nachtman J.P, Tbben R.E, and Commisaris R.L (1986) Behavioral effects of chronic manganese administrations in rats: locomotor activity studies. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, No 6, 711-715.
- [15] Mitagvariya N, P. (1983) The stability of circulatory supply for brain functions. *Metsniereba.* Tbilisi. En: Shukakidze A, Lazriev I, and Mitagvariya N. (2003) Behavioral impairments in acute and chronic manganese poisoning in white rats. *Neuroscience and behavioral physiology.* 33: 263-268.
- [16] Wennberg A, Iregen A, Struwe G, Cizinsky G, Hagman M, Johansson L. (1991) Manganese exposure in steel smelters a health hazard to the nervous system. *Scand. J. Work Environ Health* 17: 255-262.
- [17] Roels H, Lauwerys R, Buchet J-P, Genet P, Sarham M. J, Hanotiau I, de Fays M, Bernard A and Stanescu D. (1987) Epidemiological survey among workers exposed to manganese: effects of lung, central nervous system, and some biological indices. *Am. J. Ind. Med.* 11; 307-327.
- [18] Lucchini R, Selis L, Folla D, Apostoli P, Mutti A, Vanoni O, Iregen A, Alessio L. (1995) Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure. *Scand. J. Work Env. Health* 21: 143-149.
- [19] Chia S. E, Foo S. C, Gan S. L, Jeyaratman J, and Tian C. S. (1993) Neurobehavioral functions among workers exposed to manganese ore. *Scand J. Work Environ Health* 19: 264-270.
- [20] Shukakidze A, Lazriev I, Magvariya N. (2003) Behavioral impairments in acute and chronic manganese poisoning in white rats. *Neuroscience and behavioral physiology.* 33: 263-268
- [21] Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Rios C. (2001) Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. *Brain Res.* 891: 123-129.
- [22] Ashner M. (1997) Manganese neurotoxicity and oxidative damage. In *Metals and oxidative damage in neurological disorders.* (J.R Connor, Ed) pp77-93, Plenum Press. New York

- [23] Shroeder H. A, Blassa J.J, Tripton I,H. (1996) Essential trace metals in man: manganese, A study in homeostasis. *J. Chronic Dis.* 19: 545-71.
- [24] Grieger J. L. (1999) Nutrients versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential markers. *Neurotoxicology* 20: 205-12.
- [25] Aschner M. (2000) Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environmental Health Perspectives*. June Vol 108 Supplement 3.
- [26] Markesbery W. R, Ehmann W. D, Alaudin M, Hossain I.M(1984) Brain trace element concentrations in aging: *Neurobiol.* 5: 19-28.
- [27] Zatta P, Lucchini R, Rensburg J. Van, Taylor A. (2003) The role of metals in neurodegenerative processes: aluminium, manganese and zinc. *Brain Research Bulletin* 62: 15-28
- [28] Brown D. R. (2000) Proceedings from the first international conference on metals and the brain: from neurochemistry to neurodegeneration. *J. Alzheimer's* 2: 339-340
- [29] Purdey M. (2000) Ecosystems supporting clusters of sporadic TSE demonstrated excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant cofactors Cu, Se, Fe, Zn. Does a foreign cation substitution at prion's Cu domain initiate TSE ? *Med Hypotheses* 54 278-306.
- [30] Alves G, Thebot J, Tracqui A, Delangre T, Gueaon C. Lerebours E. (1997) Neurological disorders due to brain manganese deposition in a jaundiced patient receiving long-term parenteral nutrition. *J. Pen.* 21: 41-45.
- [31] Aschner M, Aschner J.L. (1990) Manganese transport across the blood-brain barrier: relationships to iron homeostasis. *Brain Res. Bull.* 24 :857-860
- [32] Ducray A, Bondier J. R, Michael G, Bon K, Millot J.L, Propper A, Kastner A.(2002) Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *Eur. J. Neurosci.* 15; 1907-1917.
- [33] Foradori A. C, Bertichamps A, Gulibon J. M, Cotzias G. C. (1967) The discrimination between manganese and iron by serum protein. *J. Gen. Physiol.* 50: 2255-2266.
- [34] Aschner M, Aschner J.L. (1991) Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev* 15: 333-340
- [35] Takeda A. (2003) Manganese action in brain function (Review) 41: 79-87.
- [36] Murphy V. A, Wadhvani K. C, Smith Q. R, and Rapoport S. I. (1999) Saturable transport of manganese (II) across the rat blood-brain barrier. *J. Neurochemical.* 57 948-954. En Aschner M. (1999) Manganese homeostasis in the CNS. *Environmental Research Section A* 80, 105-109
- [37] Zheng W, Ren S, Graziano J. H. (1998) Manganese (Mn) exposure inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res.* 799: 334-342.
- [38] Lai C. K, Miski J, Chan W. K, Leung K. C, and Lim L. (1999) Manganese mineral interactions in brain. *Neurotoxicology* 20 (2-3) 433-444.
- [39] Hazell A. S, and Butterworth F.(199) Hepatic encephalopathy: an update of pathophysiologic mechanism. *Neuroscience Research Unit. (minireview)* vol 222 p. 99-110
- [40]
- [41] Sloot W. N, Gramsberg J. B. P. (1994) Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Res.* 657: 124-132.
- [42] Zheng W, Aschner M, and Ghersi-Egea J. F. (2003) Brain Barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 192; 1-13
- [43] Gunshin H, Mackenzie B, Berger U. V, Gunshin Y, Romero M. F, Boron W. F, Nussberg S, Gollan J. L Hediger M. A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian protein-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488.
- [44] Mena I. Manganese poisoning (Chapter 8). E.U.A pp 217-233
- [45] Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberg F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington: clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20: 415:455.
- [46] Cooper W. C. (1984) The health implications of increased manganese in the environment resulting from the combustion of fuel additives: a review of the literature. *Toxicol. Environ. Health.* 14: 23-46.
- [47] Ferraz H. B, Bertolucci H. F, Pereira J. S, Lima J. G, Andrade A. L, (1988) Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology* 38: 550-553.
- [48] Loranger S, Zayed J. (1995) Environmental and occupational exposure to manganese: a multimedia assessment. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 67: 101-110.
- [49] Miowitz S. A, Westrich T. J. (1992) Basal ganglia signal intensity alterations: reversal after discontinuation of parenteral manganese administration. *Radiology* 185: 535-536

- [50] Sierra P, Loranger S, Kennedy G, Zayed J. (1995) Occupational and environmental exposure of automobile mechanic and nonautomobile workers to airborne manganese arising from the combustion of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT). *Am. Ind. Hgg. Assoc. J.* 56: 713-716.
- [51] Wang D. X, Zhou W. M, Wang S. Z, Zheng W. (2001) Occupational exposure to manganese in welders and associates neurodegenerative diseases in China. *Toxicol. Sci.* 42: 24
- [52] Butterworth R. F. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: a new approaches and new findings. *Metab. Brain Dis.* 16: 55- 56
- [53] Butterworth R. F, Spahr L, Fontaine S, and Layrargues G: (1995) Manganese toxicity, dopaminergic disfunction and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain. Dis.* 4: 259-267.
- [55] Eriksson H, Morath C, Heilbronn E. (1984) Effects of manganese on the nervous system. *Acta Neurol Scand Suppl.* 100: 89-93. En Aschner M, Vranan K. E, and Zheng W. (1999) Manganese uptake and distribution in the Central Nervous System (CNS). *Neurotoxicology* 20; 173-180.
- [56] Eriksson H, Lenngren S, Helbronn E. (1987). Effect of long-term administration of manganese on biogenic amine levels in discrete striatal regions of the rat brain. *Arch. Toxicol.* 59: 426-431.
- [57] Eriksson H, Gillbers P. G, Aquilonius S. M, Hedstrom K. G, Heilbronn E. (1992) Receptor alterations in manganese intoxicated monkeys. *Arch. Toxicol.* 66: 359-364.
- [58] Heilbronn E, Eriksson H, and Haggablad J. (1982) Neurotoxic effects of manganese: studies on cell cultures, tissue homogenates and intact animals. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4: 655-658. En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [59] Yamada S, Olmo I, Okayasu R, Okeda S, Hatekeyama H, Watanabe. (1986) Chronic manganese poisoning: a neurophatological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol.* 70: 273-278
- [60] Pentschew A, Ebner F. F, Kovatch R, M. (1963) Experimental manganese encephalopathy in monkeys: a preliminary report. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 22, 488-499.
- [61] Olanow C. W, Good P. F, Shinotoh H, Hewitt K. A, Vingerhoets F, Snow B. J, Beal M. F, Calne D. B, Perl D. P. (1996) Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology.* 46: 492-508
- [62] Mena I, Horiuchi K, Burker K, Cotzias G C. (1969) Chronic manganese poisoning, individual susceptibility and absorption of iron. *Neurol.* 19:1000-1006
- [63] Malecki E. A, Devenyi A. G, Barron T. F, Mosher T. J, Eslinger P, Flaherty-Craig C. V, Rossaro L. (1999) Iron and manganese homeostasis in chronic liver disease: relationship to pallidal T1-weighted magnetic resonance signal hyperintensity. *Neurotoxicol.* 20; 652-677.
- [64] Calne D. B, Snow B. J. PET imaging in Parkinsonism Disease: from basic research to treatment, advances in Neurotoxicology, Vol 60 Narabayashi H, Nagatsu T, Yanagagisawa N, Mizuno Y. eds. New York, Raven Press, 1993 pp 484-487. En Pal P. K, Samii A and Calne D. B. (1999) Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20 (2-3) 227-238.
- [65] Smargiassi A, Mutti A, De Rosa A, De Palma G, Negrotti A, Calzetti S. (1998) A case-control study of occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease in the Emilia-Romagna region of Italy. *Neurotoxicology* 19 (4-5) 709-712.
- [66] Witholt R, Gwiazda R. H, Smith D. R. (2000) The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. *Neurotoxicology and Teratology* 22; 851-861
- [67] Mousseau D. D, Perney P, Pomier Layrargues G, Buttesrworth R. F. (1993) Selective loss of pallidal dopamine D2 receptor density in hepatic encephalopathy. *Neurosci. Lett.* 162: 192-196.
- [68] Lai J. C. K, Leug T. K. C, Lim L. (1984) Differences in the neurotoxic effects of manganese during developmental and aging: some observations on brain regional neurotransmitter and non-neurotransmitter metabolism in a developmental rat model of a chronic manganese encephalopathy. *Neurotoxicology.* 5: 37-48.
- [69] Hamai D, and Bondy S. (2004) Oxidative basis of manganese neurotoxicity, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1012; 129-141.
- [70] Takeda A, Sotogaku N, Oku N. (2003) Influence of manganese on the release of neurotransmitters in rat striatum. *Brain Res.* 965: 279-282.
- [71] Takeda A, Sotogaku N, Oku N. (2002) Manganese influences the levels of neurotransmitters in synapses in rat brain. *Neuroscience* 114: 669-674
- [72] Page G, Peeters M, Najimi M, Mabteaux J. M, Hermans E. (2001) Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. *J. Neurochem.* 76: 1282-1290.

- [73] Eriksson K. M, Aschner M. (2003) Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochem.* 43; 475-480.
- [74] Lai J. C. K, Leung T. K. C, Lim L. (1985) Effects of metal ions on neurotransmitter function and metabolism. In: *Metal ions in Neurology and Psychiatry*. Gabay S, Harrys J. edit Alan R Liss, New York pp 177-197.
- [75] Lai J. C. K, Chan A. W. K, Minsky M. J, Lim L. (1997) Relationship between manganese and other minerals. In: *mineral and metal neurotoxicology*. CRC Press. E.U.A. pp 297-303.
- [76] Narita K, Kawasaki F, Kita H. (1990) Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminal are prevented by verapamil in frogs. *Brain Res.* 510: 289-295.
- [77] Drapeu P. Nachsen D. A. (1984) Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 384: 493-510.
- [78] Kita H, Narita K, Van der Kloot W. (1981) Tetanic stimulation increases the frequency of miniature ebd-plate potentials at the frog neuromuscular junction in  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  saline solution: *Brain Res.* 205: 222-224.
- [79] Sitaramayya A, Nagar N, and Chandra S. V. (1974) Effect of manganese on enzymes in rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 35: 180-190.
- [80] Takeda A, Kodama Y, Ishiwatari S, Okada S. (1998) Manganese transport in the neural circuit of rat CNS. *Brain Res. Bull* 45: 149-152.
- [81] Hazell A. S. (2002) Astrocytes and manganese neurotoxicity. *Neurochem Intern* 41; 271-277.
- [82] Cohen G, Heikkila R. E. (1974) The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxidopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J. Biol. Chem.* 249: 2247-2452
- [83] En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [83] Donaldson J, and Barbeau A. (1985) in *metal ions in neurology and psychiatry*. pp. 259-285. Ed Alan R, Liss. E.U.A En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [84] Donaldson J. Mc Gregor D, and La Bella F. S. (1982) *Canad J. Physiol Pharmacol* (1982) 60: 1398-1405. En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [85] Sun A. Y, Yang W. L, and Kim H. D. (1993) Free radical and lipid peroxidation in manganese-induce neuronal cell injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 679: 358-363. En Aschner M, Vranan K. E, and Zheng W. (1999) Manganese uptake and distribution in the Central Nervous System (CNS). *Neurotoxicology* 20; 173-180.
- [86] Parenti M, Rusconi L, Cappabianca V, Parati E. A, Groppeti A. (1998) Role of dopamine in manganese neurotoxicity. *Brain Res.* 473; 436-440.
- [87] Lai J. C. K, Cooper A. J. L. (1986) Brain  $\alpha$ -Ketoglutarate dehydrogenase complex: Kinetic properties, regional distribution and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* 47:1376-1386
- [88] Du P, Buerstette C. R, Chan A. W. K, Minsky M. J, Bennett L, Lai J. C. K. (1997) Accumulation of manganese in liver can result in decreases in energy metabolism in mitochondria. *Conference on Hazaedous wastes and materials: 1-14*. En Lai J.C.K, Minsky M.J, Chang A.W.K, Leung T.K.C, and Lim L. (1999) Manganese mineral interactions in brain. *Neurotoxicology* 20: 433-444.
- [89] Graham D. G (1978) *Mol. Pharmacol.* 14; 633-643 En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [90] Graham D. G. (1984) *Neurotoxicology* 5; 83-96. En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [91] Graham D. G, Tiffany S. G, Bell W. R, and Gutnecht W. F. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14; 644-653. En Archibald F. S, and Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 26; 638-650.
- [92] Roth J. A, Garrick M. D. (2003) Iron interaction and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical Pharmacology.* 66; 1-13.
- [93] Gavin C. E, Gunter K. K, Gunter T. E, (1992)  $Mn^{2+}$  sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20; 445-454.
- [94] Gavin C. E, Gunter K. K, Gunter T. E, (1999) Manganese and calcium transport in mitochondria: implications for manganese toxicity. *Neurotoxicology.* 20: 445-454.

- [95] Galvani P, Fumagalli P, Santagostino A. (1995) Vulnerability of mitochondria complex I in PC12 cells exposed to manganese. *Eur. J. Pharmacol.* 293; 377-383.
- [96] Roth J. A, Walowitz J, Browne R. W. (1999) Manganese-induced rat pheochromocytoma PC12 cell death is independent of caspase activation. *J. Neurosci Res.* 57; 847-854.
- [97] Chen C. J, Liao S. L. (2002) Oxidative stress involves in astrocytic alterations induced by manganese. *Exp. Neurol.* 175; 216-225.
- [98] Brouillet E, Shinobu L, Mc Garvey U, Hochberg F, and Beal M. F. (1993) Manganese injection in the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp. Neurol.* 12; 89-94.
- [99] Gavin C. E, Gunter K. K, Gunter T. E, (1990) Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochem. J.* 266; 329-334.
- [100] Hazell A. S, Norenberg M. D. (1997) Manganese decreases glutamate uptake in cultures astrocytes. *Neurochem. Res.* 22; 1443-1447.
- [101] Hexum T. D, Fried R. Effects of superoxid radicals on transport (Na<sup>+</sup>, K) adenosine triphosphatase and protection by superoxide dismutase. *Neurochem. Res.* 4; 73-82
- [102] Hazell A. S, Norenberg M. D. (1998) Ammonia and manganese increase arginine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* 23; 869-873.
- [103] Spranger M, Schwab S, Deidernto S, Bonmann E, Krieger D, Fandrey J. (1998) Manganese augments nitric oxide synthesis in murine astrocytes: a new pathogenetic mechanism in manganism? *Exp Neurol.* 149; 277-283.
- [104] Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Rios C. (2002) A method to induce accumulation in the brain of the cirrhotic rat and its evaluation. *Brain Res. Protocols* 9; 9-15.
- [105]
- [106] Viana M. B, Tomaz C, Graeff F, G. (1994) The elevated T-maze: a new model of anxiety and memory. *Pharmacol Biochem.Behav.* 49 (3): 549-554.
- [107] Druker C. R, García H. F. (1991) A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *Journal of Neuroscience Methods.* 39; 153-161.