



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Carrera de Biología

“Estudio comparativo sobre el efecto de la exposición a la mezcla de cloruro y acetato de manganeso en diferentes estructuras del cerebro de rata y de ratón.”

Trujillo Martínez Abraham

Tesis

Laboratorio de Neuromorfología

UIICSE

No. de cuenta

30619667-0

Firma de Vo. Bo.
Dra. María Rosa Avila Costa

Firma del alumno (a)
Trujillo Martínez Abraham



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

CARRERA DE BIOLOGIA

**ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE EL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A LA
MEZCLA DE CLORURO Y ACETATO DE MANGANESO EN DIFERENTES
ESTRUCTURAS DEL CEREBRO DE RATA Y DE RATÓN.**

Tesis

Que para obtener el título de Biólogo presenta:

Trujillo Martínez Abraham

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ROSA
AVILA COSTA**



Febrero 2017

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.”

Louis Pasteur

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como la oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado con toda mi gratitud y mi amor a mi madre, ella ha sido siempre el motor de mi vida, la persona que me ha enseñado a nunca rendirme y a siempre seguir adelante para cumplir mis sueños. Pasamos por momentos difíciles pero eso nunca te detuvo para darnos aliento a seguir adelante, muchas gracias mamá Te amo.

A mis hermanos Aldo, Bere e Ivan quienes siempre me cuidaron y me alentaron en todo momento, hemos vivido muchas cosas juntos y aún falta un camino muy largo pero sé que siempre podre contar con su cariño y apoyo, gracias hermanitos!.

A mis sobrinos Boyis, Milenita y Emilio porque desde que llegaron, mi vida cambio y la llenaron de felicidad y dicha, por ser unos niños tan hermosos, los quiero mucho.

A mis cuñados Sonia, Ber y Lupita porque gracias a ustedes la familia creció además de que sé que siempre tendré su apoyo al igual que siempre contarán con el mío.

A mi padre porque a pesar de que no estuvo conmigo mucho tiempo me enseñó a trabajar duro y gracias a ti pude lograr ver la vida de manera diferente, te quiero papá.

A ti mi amor Hanna, gracias por tanto apoyo y por tantos ánimos que me diste para poder seguir adelante, tu amor me fortalece y sé que aún nos falta un largo camino por recorrer juntos Te Amo!!!.

A mis amigos de la carrera Alejandro, Omar, Seltzin, Cannabis, Marco, Juanito, Gallo, Abuelo, Elenita, Fany, Aldo, Peque, Memo, Angel, Tuzas, Ferchis, Angeles, Aurora, Adrian, Mauricio y Platanito ya que ustedes siempre estuvieron ahí para apoyarme cuando más lo necesite y por brindarme siempre su amistad en todo momento y todo lugar, vivimos muchas aventuras que se quedaran en mi memoria por siempre.

A mis amigos del laboratorio Montse, Ari, Fer, May, Javier, Ana, Sandra, Carlos, Chucho, Paty y Lichita por su amistad y sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

Un agradecimiento muy especial a todo el comité de sinodales que revisaron este trabajo y me aportaron sus opiniones y enseñanzas para poder hacer esto posible

A la profesora Gabriela Sánchez Fabila por las enseñanzas que me dio no solo en el aula sino fuera de ella, valiosas lecciones de vida que usted me dio, muchas gracias.

Muchas gracias a la Dra. Verónica Anaya ya que no solo es una excelente profesora, sino que es una excelente persona que comparte su sabiduría con todos los que tenemos la dicha de conocerla, muchas gracias por darme la oportunidad Vero.

Finalmente y con todo mi cariño, admiración y respeto quiero agradecer infinitamente a la Dra. María Rosa Avila Costa, mi asesora y gran amiga, gracias por todo tu apoyo y por siempre creer en mí, este logro también es tuyo porque me diste la oportunidad de trabajar a tu lado, de enriquecerme con tu conocimiento y de contagiarme con tu fortaleza, muchas gracias Maria Rosa.

A todos y cada uno de ustedes que hizo posible este trabajo solo quiero decirles:

¡¡¡¡¡¡¡Gracias totales!!!!!!!!!!

Abreviaturas

EP	Enfermedad de Parkinson
OMS	Organización Mundial de la Salud
ENG	Enfermedades neurodegenerativas
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
SNpc	Sustancia nigra <i>pars compacta</i>
SNpr	Sustancia nigra <i>pars reticulada</i>
NE	Núcleo estriado
NST	Núcleo subtalámico
GPI	Globo pálido interno
GPe	Globo pálido externo
AVT	Área ventral tegmental
DA	Dopamina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
L-DOPA	Levodopa (L-3,4 dihidroxifenilalanina)
MAO-B	Monoamino-oxidasa B
DAT	Transportador activo de dopamina
6-OHDA	6-hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifeniletilamina)
TH	Tirosina hidroxilasa
Mn	Manganeso
MnCl₂	Cloruro de Manganeso
Mn(OAc)₃	Acetato de Manganeso
KMnO₄	Permanganato de potasio
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD-Mn	Super oxido dismutasa dependiente de manganeso
MMT	Manganeso metilciclopentadienil tricarbonilo
DMT-1	Transportador de metales divalentes 1
EROs	Especies reactivas al oxígeno
GABA	Acido-gamma-amino-butírico
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
O₂	Anión superóxido

Índice

1.- Resumen.....	5
2.- Abstract.....	6
3.- Introducción.....	7
4.- Enfermedad de Parkinson.....	10
5.- Ganglios basales.....	12
6.- Modelos experimentales de la EP.....	16
➤ MPTP.....	17
➤ 6-OHDA.....	18
➤ Rotenona.....	19
➤ Paraquat.....	20
7.- Manganeso (Mn).....	21
➤ Absorción y transporte.....	24
8.- Justificación.	27
9.- Hipótesis.....	27
10.- Objetivos.....	28
➤ General	
➤ Particulares.	
11.- Material y métodos.....	28
➤ Obtención del tejido.....	28
➤ Exposición al Mn.....	
➤ Inmunocitoquímicas (TH y Neu-N).....	29
➤ Cuantificación de neuronas.....	29
➤ Pruebas estadísticas.	30
12.- Resultados.....	31
➤ Rata.....	31
○ SNc.....	32
○ GP.....	33
○ NE.....	35
○ Hipocampo, Corteza motora y AVT.....	37
➤ Ratón.....	39
○ SNc.....	39
○ NE.....	41
○ GP.....	43
○ Hipocampo, Corteza motora y AVT.....	45
13.- Discusión.....	48
➤ SNc, AVT, GP y NE.....	48
➤ Corteza e Hipocampo.....	53
➤ Susceptibilidad al Mn entre especies.....	53
14.- Conclusión.....	56
15.- Referencias bibliográficas.....	57
16.- Anexos.....	69

29

Resumen

Los trastornos neurológicos son enfermedades del sistema nervioso central y periférico. Una patología que forma parte de las enfermedades neurodegenerativas (ENG) es la Enfermedad de Parkinson (EP). En la actualidad en México no se cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia o incidencia de la enfermedad; sin embargo, se estima de forma mundial que ésta se presenta entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años de edad.

La EP fue descrita en 1817 por James Parkinson en su publicación *Enssay on the shaking palsy*. Esta enfermedad es un padecimiento neurodegenerativo caracterizado principalmente por movimientos involuntarios temblorosos, rigidez muscular y lentitud en los movimientos voluntarios. La etiología específica de la EP aún no se conoce con exactitud pero diversos estudios han demostrado que existen factores (genéticos y ambientales) que pueden ser de gran importancia para el desarrollo de la EP. En el laboratorio de Neuromorfología experimental se demostró que la inhalación de manganeso (Mn), principalmente en sus formas de cloruro y acetato (MnCl_2 ; $\text{Mn}(\text{OAc})_3$) en ratas Wistar y ratones CD1, provoca un modelo experimental con características muy similares a las observadas en la EP.

En este experimento se expuso el tejido cerebral fresco de rata y ratón en una mezcla de 0.04M MnCl_2 y 0.02M $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ en solución durante una hora; para ello se utilizaron 10 ratas macho de la cepa Wistar y 10 ratones macho CD1, a los cuales se les extrajo el cerebro, se cortó en rebanadas y se incubó directamente a la mezcla de compuestos de Mn. Los cortes de tejido del grupo control fueron incubado en solución fisiológica de Krebs durante el mismo tiempo que las del grupo experimental. Se realizaron pruebas inmunocitoquímicas (TH y Neu-N) al tejido obtenido (Corteza, NE, GP, Hipocampo y SNpc) para poder cuantificar el número de neuronas sobrevivientes después del proceso.

Los resultados demostraron que la exposición del tejido cerebral fresco de ratas y ratones a la mezcla de MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ produce la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en ambas especies, además de afectar de manera muy particular a cada una de ellas; se observó que el Mn provoca disminución de neuronas en el globo pálido (GP) del cerebro de rata y en el Núcleo estriado (Ne) de los ratones después del tratamiento.

Abstract

Our group recently reported that mice and rats that were inhalationally exposed to a mixture of manganese chloride (MnCl_2) and manganese acetate (MnOAc_3) developed movement abnormalities, significant loss of Substantia nigra pars compacta (SNpc) dopaminergic neurons, dopamine depletion and improved behavior with L-Dopa treatment as Parkinson disease (PD) patients. However, it is not yet evaluated Mn selectivity for SNpc dopaminergic neurons. In the present study we directly exposed mice and rats brain slices to the Mn mixture. The brain slices contained the mesencephalon, striatum, Globus Pallidus, hippocampus and Parietal cortex. The slices were incubated for one hour in 0.02M MnOAc_3 and 0.04M MnCl_2 and the control tissue were exposed to Krebs solution for one hour. Afterwards, we performed immunohistochemistry for NeuN and Tyrosine hydroxylase (for SNpc and ventral tegmental area). We found in both, rats and mice, significant cell death mainly in SNpc, in comparison with control tissue and the other brain structures evaluated. Our findings strongly suggest that this Mn mixture specifically damage SNpc dopaminergic neurons.

Introducción

Los trastornos neurológicos son enfermedades de los sistemas nervioso central y periférico. Entre estos trastornos se cuentan la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, enfermedades cerebrovasculares, la migraña y otras cefalalgias, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson (EP), las infecciones neurológicas, los tumores cerebrales, las afecciones traumáticas del sistema nervioso y los trastornos neurológicos causados por la desnutrición. En el informe *Neurological Disorders: Public health challenges* se pone de manifiesto que en todo el mundo están afectadas unas mil millones de personas de las cuales, 50 millones tienen epilepsia; 62 millones padecen enfermedades cerebrovasculares; 326 millones sufren migraña; y 24 millones tienen la enfermedad de Alzheimer u otras demencias (OMS, 2007).

Por otro lado las enfermedades neurodegenerativas (ENG) son patologías que causan más del 50% de las consultas a nivel mundial en el área de neurología y están catalogadas dentro de los trastornos neurológicos por la organización mundial de la salud (OMS). La trascendencia de estas enfermedades causan cambios importantes en el ámbito económico, laboral y social de las personas enfermas. Las ENG provocan la muerte del 50% de las personas que las padecen y causan secuelas graves en el 25% de las personas que las presentan. Se estima que cada año mueren 6.8 millones de personas como consecuencia de estas enfermedades (OMS, 2007).

Los mecanismos mediante los cuales se originan las ENG no se conocen con precisión. Sin embargo algunos procesos celulares y moleculares que llevan a la muerte de las neuronas se tienen bien estudiados, como la muerte neuronal programada. La muerte neuronal en las ENG es un proceso que ocurre muy lentamente y de forma gradual e involucra la participación de diferentes eventos como: el estrés oxidante, alteraciones en las concentraciones de calcio dentro y fuera de las células, malformaciones en las estructuras de las proteínas y, en

algunos casos, la vulnerabilidad a la estimulación excitadora excesiva de las neuronas (Tovar-y-Romo, *et al.*, 2009).

Una patología que forma parte de las ENG es la EP. En la actualidad en México, no se cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia o incidencia de la enfermedad; sin embargo, se estima de forma mundial que ésta se presenta entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años de edad. De acuerdo al conteo de población y vivienda realizado en 2005 por parte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2010) el 8.1% de la población en México se encuentra en este grupo de edad, lo que implicaría una prevalencia aproximada de 83,000 y 166,600 personas con EP, además este desorden ocupa el séptimo lugar dentro de las enfermedades neurológicas en México (Corona-Vázquez, 2002; González-Torres y Armendáriz- Borunda, 2005; Rodríguez-Violante *et al*, 2011).

Enfermedad de Parkinson

La EP fue descrita en 1817 por James Parkinson en su publicación *An Enssay on the shaking palsy* (ensayo sobre la parálisis agitante), como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo. Esta enfermedad es un padecimiento neurodegenerativo caracterizado principalmente por movimientos involuntarios temblorosos, rigidez muscular y lentitud en los movimientos voluntarios. El inicio de la enfermedad es lento, progresivo y con pródromos de síntomas inespecíficos. El paciente con EP generalmente desarrolla temblor, rigidez, acinesia, alteraciones de la marcha e inestabilidad postural y en algunos casos pueden llegar a presentarse alteraciones orofaríngeas (Pastor y Tolosa, 2001). El temblor en reposo es la manifestación más frecuente presentándose en un 79-90% de los pacientes. Se inicia en la mayoría de los casos en la mano pero desaparece cuando se inicia el movimiento; el clásico movimiento de “contar monedas” suele desaparecer cuando el temblor avanza y se extiende hacia el brazo. Por otra parte la rigidez es causada por el incremento en el tono muscular y se manifiesta como el aumento de resistencia al movimiento pasivo; en pacientes con EP esta resistencia se percibe en todo el movimiento. La acinesia

es el signo más incapacitante de la enfermedad ya que los pacientes tienen gran dificultad para efectuar movimientos secuenciales y simultáneos, además de que son muy sensibles a estímulos externos que pueden llegar a impedir el movimiento. La alteración en la marcha se caracteriza por la disminución en el braceo al caminar, enlentecimiento en la marcha, pasos más cortos acompañados del arrastre de las piernas; la pérdida de los reflejos posturales se caracteriza por la dificultad para corregir rápidamente el equilibrio frente a un empujón de intensidad variable. Estos dos síntomas son normalmente, el último síntoma cardinal de la EP. En algunos casos los pacientes también pueden llegar a presentar alteraciones en el habla produciendo que el lenguaje se haga más lento y con el avance de la enfermedad puede llegar a ser incomprensible (Pastor y Tolosa, 2001).

La etiología específica de la EP aún no se conoce con exactitud, aproximadamente el 90% de los casos se consideran esporádicos o idiopáticos, pero estudios epidemiológicos han demostrado que un gran número de factores toxicológicos (endógenos y exógenos) intervienen en el desarrollo de este padecimiento. Esta enfermedad se manifiesta cuando se presenta la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas localizadas en el núcleo motor del cerebro medio llamado sustancia nigra pars compacta (SNpc), además de presentar inclusiones positivas de α -sinucleína conocidas como cuerpos de Lewy, las cuales están constituidas por neurofilamentos que se acumulan tras su fragmentación y fosforilación anormal (Olanow y Kordower, 2009).

También se ha descrito en la EP manifestaciones no motoras como dolor, fatiga, depresión, ansiedad, deterioro cognitivo, disfunción autonómica y trastornos del sueño. En conjunto estas manifestaciones pueden contribuir de manera significativa a la carga de síntomas motores, además de producir en los pacientes discapacidad y deterioro en la calidad de vida (Kurtis, *et al.*, 2013). A medida que la enfermedad va progresando los trastornos del sueño van afectando alrededor del 60-90% de los pacientes con esta enfermedad.

La muerte de las neuronas dopaminérgicas altera un complejo circuito neuronal en donde los somas que se encuentran en la SNpc envían proyecciones a otra estructura del cerebro llamada núcleo estriado (NE), produciendo las anomalías motoras características de la EP (Tovar y Romo., 2009). Es importante mencionar que además de estas estructuras las alteraciones presentadas en la EP también afectan todo un circuito donde se involucran a diferentes núcleos del cerebro llamados ganglios basales.

Ganglios basales

El término ganglios basales es utilizado para referirse a un grupo de núcleos anatómica y funcionalmente relacionados, localizados en el telencefalo, diencefalo y mesencefalo. Este grupo de núcleos incluye a: núcleo estriado (NE), que en los primates está dividido por el núcleo caudado y el putamen, los cuales se desarrollan de las mismas estructuras encefálicas y por lo tanto tienen el mismo tipo de células; núcleo subtalamico (NST) el cual se encuentra en la región ventral del diencefalo; el globo pálido (GP), compuesto por el segmento interno (GPi) y el externo (GPe) en humanos, además en el mesencefalo se encuentra ubicada la sustancia nigra (SN) dividida en una región ventral denominada *pars reticulata* (SNpr) y la región dorsal llamada *pars compacta* (SNpc); este núcleo esta compuesto en su mayoría por neuronas dopaminérgicas las cuales contienen en los primates, un pigmento oscuro polímero de la dopamina denominado neuromelanina (Fig. 1; Carpenter, 1976).

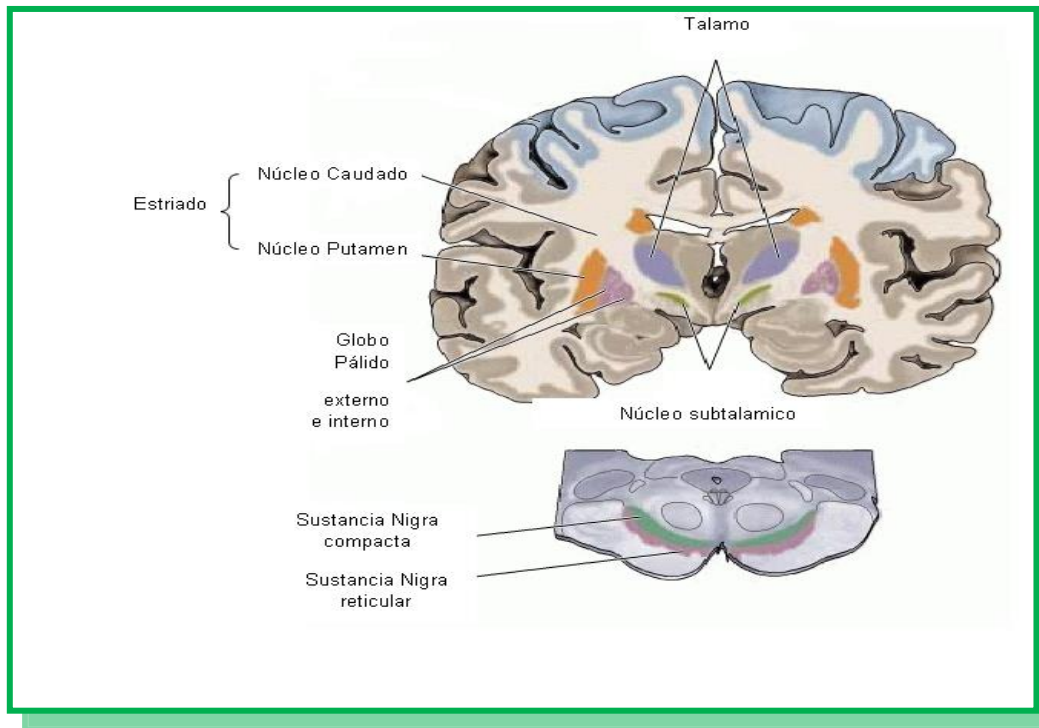


Figura 1: Organización anatómica de los ganglios basales; estos núcleos están relacionados con el control del movimiento, mandando proyecciones desde el GP hasta la SN (tomado y modificado de Purves, *et al.*, 2007).

Se ha reportado que la mayor composición celular (aprox. 95%) en el estriado está formada por las llamadas “neuronas espinosas medianas de proyección” las cuales

se caracterizan por tener un cuerpo celular que mide entre 10-20 μ además de presentar gran cantidad de espinas que cubren a sus dendritas (Fox et al., 1971; Wilson, 1998). También se ha reportado otro tipo de neurona espinosa menos común, que tiene pocas pero largas ramificaciones dendríticas (Bolam et al., 1981; Graveland et al., 1985). El 5% restante de la población neuronal del estriado está conformada por varios tipos de interneuronas cuya característica principal es la de carecer de espinas dendríticas (Wilson 1998).

Los ganglios basales no solo se limitan a aspectos sensoriales de programación de movimientos, sino que también se encuentran relacionados con aspectos de planeación de movimiento, selección y memoria motora (DeLong y Georgopolus, 1981; Coté y Crutcher, 1991; Parent y Hazrati, 1993; 1995).

Las complejas conexiones de los ganglios basales se pueden simplificar en base a circuitos intrínsecos, además aparentemente trabajan en paralelo y están funcionalmente segregados, relacionándose como corteza-ganglios basales-tálamo-corteza (Alexander y Crutcher, 1990; Smith, et al., 1998). A la fecha se tiene conocimiento de 5 circuitos principales:

- Circuito motor.
- Circuito oculomotor.
- Circuito prefrontal.
- Circuito orbitofrontal.
- Circuito límbico.

El circuito motor se basa en las “vía directa” y “vía indirecta”, para procesar, integrar y transmitir el flujo de información proveniente de la corteza cerebral, todo esto pasando por los ganglios basales. La vía directa se inicia en el estriado y proyecta directamente a los núcleos de salida (GPi-SNpr); asimismo del estriado, por otra vía (la indirecta) se hacen relevos en el GPe y el NST, para finalmente dirigirla hacia los núcleos de salida (GPi y SNpr; Chesselet y Graybiel, 1986; Crossman, 1990; Smith

et al., 1998). La integración de la información dentro del estriado se realiza a través de 2 subpoblaciones de neuronas espinosas medianas de proyección (Graybiel, 1990; Smith y Bolam, 1990).

Funcionalmente, la activación de ambas vías, produce efectos opuestos, es decir, al incrementar la actividad de las neuronas de la vía directa, se inhiben tónicamente a las neuronas de los núcleos de salida, disminuyendo la inhibición o bien presentándose la llamada “desinhibición” de las neuronas del tálamo. Por otra parte al incrementar la actividad de las neuronas de la vía indirecta se inhibe tónicamente la actividad del GPe, este decremento conlleva a la desinhibición de las neuronas del NST y éste a su vez incrementa la actividad de los núcleos de salida, inhibiéndose las neuronas del tálamo (Fig. 2; Alexander y Crutcher, 1990; DeLong, 1990; Smith *et al.*, 1998).

La influencia de la inhibición tónica de las eferencias de los ganglios basales sobre la actividad de las neuronas tálamo-corticales podría ayudar a suprimir el movimiento, mientras que la reducción fásica de las eferencias de los ganglios basales permitiría la actividad motora voluntaria (Alexander y Crutcher, 1990; Smith, *et al.*, 1998).

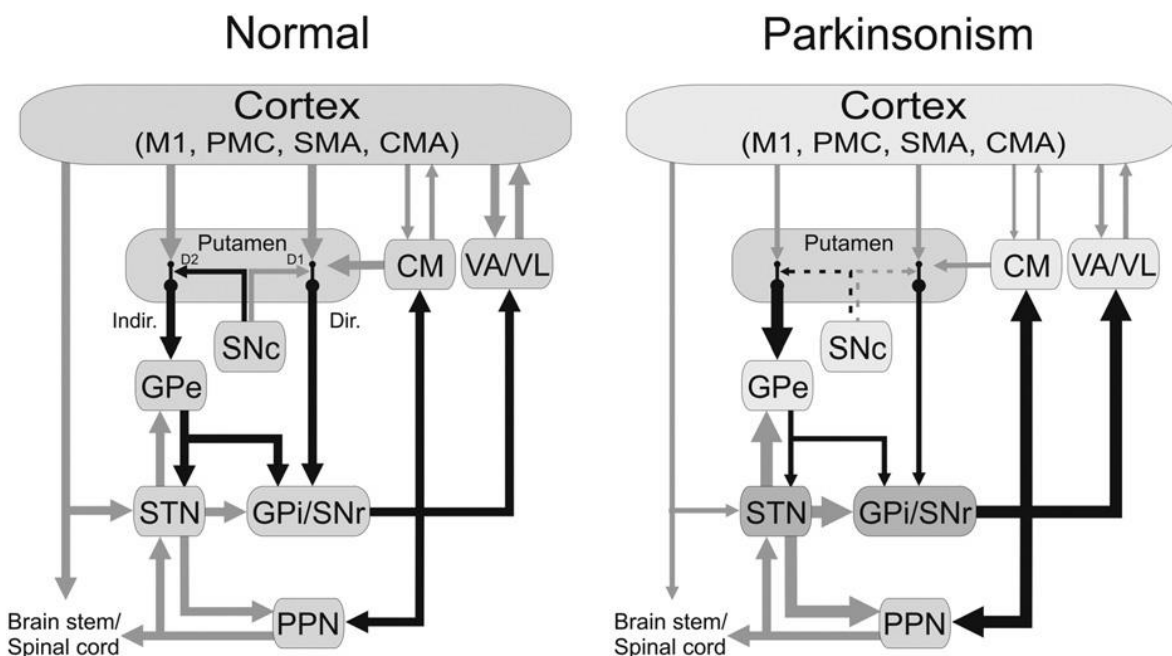


Figura 2: Modelo esquemático de la anatomía funcional del circuito motor corteza-ganglios basales-tálamo-corteza, mostrando las vías paralelas directa e indirecta. Las líneas grises representan las conexiones excitatorias, mientras que las líneas negras representan las conexiones inhibitorias. El primer esquema muestra el circuito normal en donde la vía directa incluye al GPi y a la SNr, mientras que la vía indirecta incluye al GPe y al NST. Por otra parte el segundo esquema muestra las alteraciones que sufren estos circuitos en una persona que presenta parkinsonismo. Las líneas más gruesas muestran la hiperactividad del NST, incrementando la actividad del GPi y la SNr y la sobreinhibición del circuito tálamo-cortical (tomado de Wichmann y Dostrovsky, 2011).

Con base a este modelo se puede tener un mejor panorama de la patofisiología de los desórdenes de movimiento, asociados con las enfermedades de los ganglios basales. De acuerdo a lo anterior se sugiere que la EP es el resultado de un desbalance de ambas vías (DeLong, 1990; Smith *et al.*, 1998).

Modelos experimentales de la EP

Los modelos animales en ratas y primates utilizados para el estudio de las enfermedades son una herramienta importante de la ciencia para entender mejor la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas en los humanos (Bertabet *et al.*, 2002). Esto se lleva a cabo produciendo por algún medio, una lesión específica que permita demostrar que la ausencia de cierta área provocará alteraciones específicas en el organismo (Avila-Costa, 1996); de esta manera se han desarrollado varios modelos experimentales en animales que puedan representar los efectos de la EP, apoyándose con distintas neurotoxinas y compuestos químicos (Fig. 3). La EP fue la primera enfermedad neurológica en ser modelada y posteriormente tratada (Bertabet *et al.*, 2002). Los modelos animales de degeneración nigral, han adquirido gran importancia, ya que se puede definir la naturaleza anatómica, ultraestructural, fisiológica, bioquímica y conductual de esta degeneración (Ordoñez- Librado, 2007).

La finalidad de generar estos modelos es recrear con ayuda de agentes tóxicos y neurotoxinas, algunos de los eventos que suceden en las enfermedades

neurodegenerativas y de esta manera probar nuevas estrategias terapéuticas (Gutiérrez-Valdez., 2007).

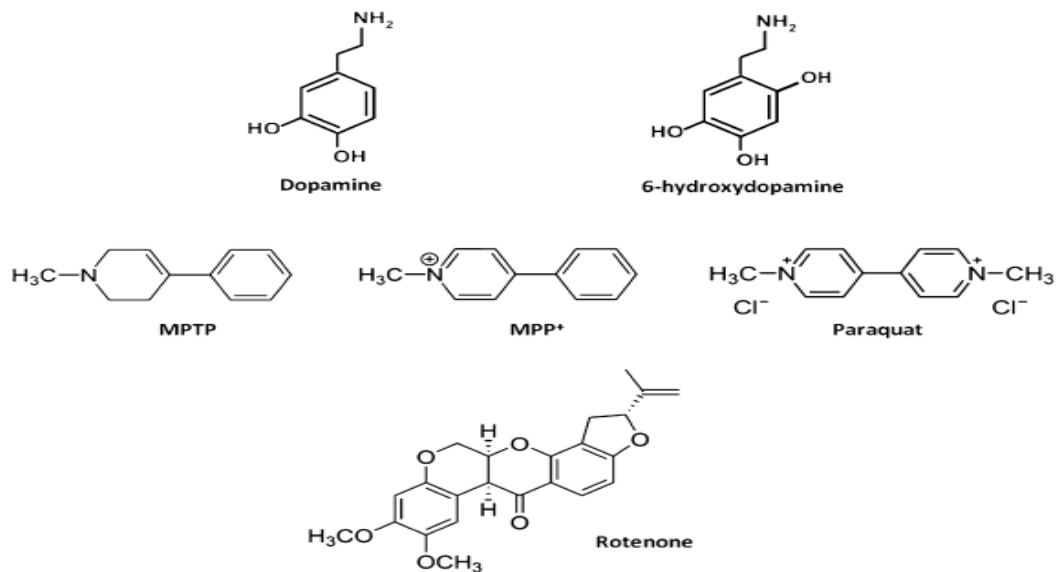


Figura 3: Estructura de la dopamina y las principales toxinas dopaminérgicas utilizadas para replicar las características de la enfermedad de Parkinson (EP) en los modelos animales (tomado de Tieu., 2011).

MPTP

El MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) es una neurotoxina que se produce de la síntesis de la meperidina o heroína sintética. En humanos y monos este compuesto produce un síndrome parkinsoniano agudo irreversible, caracterizado por presentar todos los signos clínicos de la EP, incluyendo el temblor en reposo, la rigidez, inestabilidad postural y enlentecimiento en los movimientos, así como la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la agregación de α -sinucleína y respuesta positiva al principal fármaco para tratar esta enfermedad, la Levodopa (L-DOPA). El MPTP es altamente liposoluble y fácilmente puede cruzar la barrera hematoencefálica; dentro del cerebro es metabolizado por la MAO-B (Monoamino-Oxidasa B) para transformarlo en el ion MPP⁺, su forma tóxica (Riederer y Youdin., 1987). El MPTP al entrar a las células mediante el sistema de recaptura de dopamina (DAT) inhibe el complejo 1 de la cadena respiratoria

mitocondrial, provocando estrés oxidativo y terminando en la muerte de las células (Betarbet, *et al.*, 2002).

La administración de MPTP es de manera sistémica, aunque también puede administrarse via oral, intracerebral o subcutánea; es uno de los modelos más utilizados para el estudio de la EP ya que la exposición a este compuesto da como resultado la degeneración de la vía dopaminérgica nigroestriatal de diferentes especies incluyendo ratones, gatos y primates.

Este modelo tiene algunas limitaciones ya que el uso de la neurotoxina de manera aguda o sub aguda provoca la muerte de las neuronas de la SNpc en un 99% después de su administración, mientras que la muerte en la EP es de manera lenta y gradual; además, los ratones, aunque son susceptibles, después de terminada su aplicación se recuperan y las ratas no son sensibles a esta toxina ya que no se presentan alteraciones en el movimiento después de su administración (Riederer y Youdin, 1987; Ortiz, *et al.*, 2011; Tieu, 2011; Blandini y Armentero 2012). No obstante, este modelo ha sido de gran utilidad para la realización de tratamientos con potencial neuroprotector, incluyendo los tratamientos con drogas y las alteraciones en la dieta para la prevención de la degeneración nigroestriatal dopaminérgica (Flint, 2001; Bertarbet., *et al.*, 2002).

6-OHDA

La 6-hidroxidopamina (2, 4, 5-trihidroxifeniletilamina; 6-OHDA) es un análogo hidroxilado de la DA, fue el primer modelo animal de la EP asociado con la muerte de las neuronas dopaminérgicas ya que es incorporado a la neurona por el DAT. Este modelo fue introducido por primera vez por Ungerstedt (1968). La molécula de 6-OHDA no puede cruzar la barrera hematoencefálica por ello es necesario la inyección intracerebral dentro de la SNpc o en el estriado. Cuando se realiza esta lesión se tiene como resultado la muerte aproximada del 60% de las neuronas que expresan la enzima tirosina hidroxilasa (TH), y la subsecuente pérdida de las terminales TH-positivas en el estriado (Jackson-Lewis, *et al.*, 2012).

La inyección de esta neurotoxina se realiza en el haz medial del cerebro anterior provocando la degeneración masiva anterógrada de la vía nigroestriatal, ya que esta vía recibe conexiones eferentes de la SNc con el cuerpo estriado (Blandini y Armentero, 2012)

Las neuronas de la SNpc comienzan a morir dentro de las primeras 12 horas después de la inyección, mientras que las terminales dopaminérgicas estriatales comienzan a agotar la DA en un rango de 2 ó 3 días. Este procedimiento da como resultado el más alto nivel de pérdida de las neuronas de la sustancia nigra y el agotamiento de la DA disponible en el estriado en un 90-100% (Blandini y Armentero, 2012).

La inyección se lleva a cabo generalmente de manera unilateral ya que hay una gran tasa de mortalidad cuando se realizan lesiones bilaterales (Jackson-Lewis, *et al.*, 2012). El mecanismo de acción de la 6-OHDA está muy ligado con sus propiedades peroxidantes. Una vez que entra la neurotoxina a la célula se acumula en el citosol y se somete a la auto-oxidación. Como un mecanismo adicional, la 6-OHDA se puede acumular en las mitocondrias donde actúa inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria (Bertabet, *et al.*, 2002).

La lesión unilateral causada por esta neurotoxina induce estereotipias típicas en respuesta a los fármacos que son capaces de estimular los receptores de DA en el estriado, ya sea directamente mediante la utilización de apomorfina, o indirectamente usando anfetamina. En el primer caso los animales giraran hacia el lado contralateral a la lesión, mientras que en el otro caso rotarán ipsilateralmente (Blandini y Armentero, 2012).

Sin embargo este modelo no simula las características clínicas y patológicas de la EP, ya que este modelo induce exclusivamente efectos agudos unilaterales, los cuales son diferentes de la progresión natural bilateral de los enfermos con Parkinson (Bertabet *et al.*, 2002).

Rotenona

La rotenona es un compuesto citotóxico natural que se extrae de las plantas tropicales, es usada ampliamente por sus propiedades lipofílicas como insecticida, además que la exposición a este insecticida en los humanos se ha asociado con la EP.

Bertarbet y cols. (2000) demostraron que la rotenona provoca la inhibición del complejo 1 mitocondrial en las neuronas de todo el cerebro, demostrando así que no hay una preferencia por las neuronas dopaminérgicas, aspecto distintivo de la EP. Sin embargo con el paso de los años se descubrió que la administración sistémica continua de rotenona en ratas de laboratorio produce los aspectos clave de la EP, que incluyen la degeneración selectiva del sistema dopaminérgico nigroestriatal, la formación de inclusiones citoplásmicas semejantes a los cuerpos de Lewy y la presencia de ciertos desórdenes del movimiento (Ortiz, et al., 2011). De igual forma, diversas investigaciones han sugerido que la rotenona también puede alterar la síntesis de la tirosina hidroxilasa (TH), la cual es la enzima limitante para la síntesis de DA; asimismo esta neurotoxina puede afectar la distribución y metabolismo de la DA en las neuronas (Sai et al., 2008; Qi, et al., 2014). La desventaja de este modelo es que es un modelo que tarda tiempo en poder desarrollarse además de que los animales tratados con este compuesto tiene una tasa muy alta de mortalidad (Betarbet et al., 2002).

Paraquat.

El paraquat es un herbicida de uso comercial, que produce un modelo tóxico de la EP; tiene similitudes estructurales con el MPP⁺ (Fig.4), sin embargo esta toxina no penetra tan fácilmente la barrera hemato-encefálica (Ortiz, et al., 2011).

En los seres humanos el paraquat produce lesiones pulmonares graves en sus etapas iniciales, ya que este compuesto produce daño celular por la generación de radicales libres que oxidan el tejido pulmonar. Por otro lado, diversas investigaciones (Ortiz, et al., 2011; Jackson-Lewis, et al., 2012) han demostrado que la exposición prolongada puede causar lesiones cerebrales graves dañando las membranas celulares de las neuronas causando peroxidación de lípidos; también

provoca la formación de radicales libres, facilita la fosforilación del α -sinucleína e induce la muerte celular por apoptosis; pudiendo observar estas alteraciones en diversas cepas de ratones y ratas de laboratorio (Ortiz, et al., 2011).

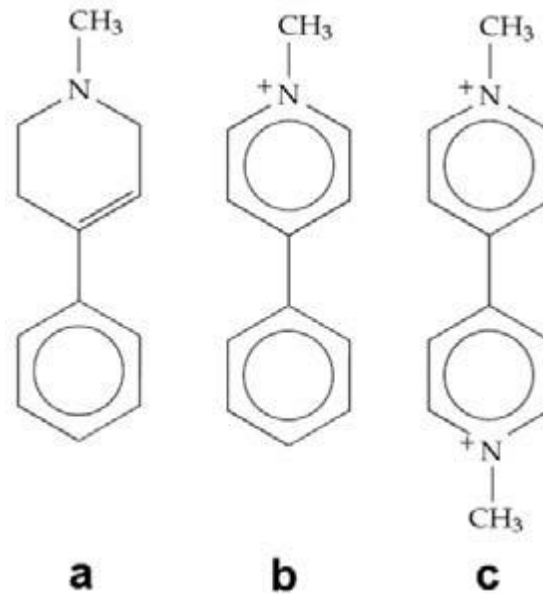


Figura 4: semejanza estructural del MPTP (a), el MPP (b) y el Paraquat (c) (tomado de Ortiz, et al., 2011).

Debido a que el Paraquat es utilizado ampliamente en la agricultura, la preocupación ha ido en aumento ya que se estima que la mayoría de las personas que están en contacto con este herbicida serán pacientes potenciales a desarrollar la EP; sin embargo, este compuesto no puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica lo que limita su extensión hacia el tejido cerebral (Betarbet et al., 2002).

De esta manera, factores de tipo ambiental pueden ser de gran importancia para el desarrollo de la EP (Gorell, et al., 1999). La exposición a altas concentraciones de pesticidas ha tomado mucha importancia en el área neurológica, ya que productos comerciales como el Maneb y el Mancozeb contienen elevadas cantidades de metales pesados entre los cuales destaca el manganeso (Mn) (ATSDR, 2001).

Manganeso

La toxicidad del Mn fue descrita por primera vez en 1837 en 5 pacientes que laboraban en una planta de trituración de Mn mineral en Francia. Estas personas presentaban un cuadro clínico caracterizado por debilidad muscular, postura encorvada, habla susurrante, temblor en las extremidades y salivación abundante. En los subsecuentes 150 años se describieron varios casos de intoxicación por este metal, particularmente en mineros, personas que se dedicaban a la industria fundidora y trabajadores relacionados con la manufactura de baterías (Olanow, 2004; Racette, *et al.*, 2011). Para estudiar los efectos que causa este metal en el organismo Ponzoni y cols. (2000) realizaron un modelo en el cual se llevó a cabo la microinyección de solución de cloruro de Manganeso ($MnCl_2$) en la SNpc, ellos observaron pérdida neuronal importante de las neuronas dopaminérgicas y gliosis reactiva. Zhao y cols. (2008) demostraron que la inyección intrastriatal en ratones con $MnCl_2$ produce disminución significativa de neuronas en la SNpc en un periodo de 7 días de tratamiento. Por otra parte, estudios posteriores llevados a cabo por Ordoñez-Librado y cols. (2008) consideran que al exponer ratones macho a la combinación de cloruro y Acetato de Mn ($MnCl_2/ AcMn_3$) por vía inhalada, se induce la pérdida significativa de neuronas en la SNc y una pérdida menor, no significativa en el area ventral tegmental (AVT). En estudios recientes Ordoñez-Librado (2012), demostró que ratones expuestos a la mezcla de los compuestos de Mn antes mencionados administrados por vía inhalada se observa pérdida neuronal en aéreas como el núcleo estriado y el globo pálido, pero en menor proporción que en la SNpc, además de disminución significativa de las espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del NE.

Iqbal y cols. (2012) reportaron un caso clínico de un hombre joven (30 años) el cual presentaba rigidez muscular y bradicinesia, además de temblor leve; esta sintomatología llevaba una evolución de 2 años. Los resultados del paciente fueron alarmantes, ya que esta persona desarrolló un cuadro parkinsoniano derivado de la ingesta de permanganato de potasio ($KMnO_4$).

Por otro lado se ha demostrado que la exposición prolongada a este metal causa daños toxicológicos en el SNC, sobre todo cuando se acumulan grandes cantidades en la SNpc, el GP y en el NE (Gunter, *et al.*, 2012). La exposición prolongada al Mn produce una enfermedad llamada Manganismo. Las manifestaciones clínicas causadas por la neurotoxicidad del Mn incluyen desórdenes psiquiátricos, defectos motores (parkinsonismo), rigidez muscular, distonia, bradicinesia así como deterioro temprano de la expresión, marcha y el equilibrio; síntomas extrapiramidales parecidos a la EP (Quintanar, *et al.*, 2011). Los pacientes expuestos de manera aguda a este metal, además de estas características, presentan alteraciones en el comportamiento, alucinaciones y psicosis; este conjunto de síntomas es referido como “locura mangánica” (Olanow, 2004).

Aunque se han descrito los daños que provoca el Mn en el organismo, este elemento es necesario para el buen funcionamiento del organismo en cantidades reguladas, asimismo es importante para el correcto funcionamiento del metabolismo celular.

El Mn es un ion metálico esencial y necesario para el funcionamiento adecuado del sistema nervioso central (SNC), se encuentra en muchos de los alimentos de consumo diario incluyendo las nueces, las legumbres, las semillas, el té, los cereales integrales y las verduras de hoja verde; es un cofactor de algunas enzimas por ejemplo la glutamino sintetasa la cual se encuentra en el cerebro, además de que es utilizado para la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos (Quintanar, *et al.*, 2011; Bowman, *et al.*, 2011; Roels, *et al.*, 2012). Mientras que este metal se inhala de la atmósfera, la dieta es normalmente mucho mayor fuente de exposición (Dobson, *et al.*, 2004). Familias de enzimas dependientes de Mn incluyen las oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, además este metal es requerido para las reacciones catalizadas por la arginasa y la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn) (Aschner, *et al.*, 2005).

Este metal se encuentra en diversas formas químicas en el organismo, incluyendo los estados de oxidación (Mn^{2+} , Mn^{3+} , Mn^{4+}), sales (sulfato y gluconato) y de forma

quelada (aspartato, fumarato y succinato). Las propiedades químicas versátiles del Mn han permitido su uso industrial en la fabricación de vidrio y cerámica, adhesivos, soldadura, pintura, gasolina aditivos antidetonantes (manganeso metilciclopentadienil tricarbonilo (MMT), y muchos otros.

La deficiencia de Mn, aunque es poco frecuente puede contribuir con algunos defectos de nacimiento, problemas en la fertilidad, malformaciones en los huesos, debilidad y mayor susceptibilidad a las convulsiones (Aschner, *et al.*, 2002).

Aunque el cobre y el magnesio pueden sustituir al Mn como cofactor para algunas enzimas, un subconjunto de enzimas con papel importante en la neurona y/o la función glial sólo es en presencia de Mn.

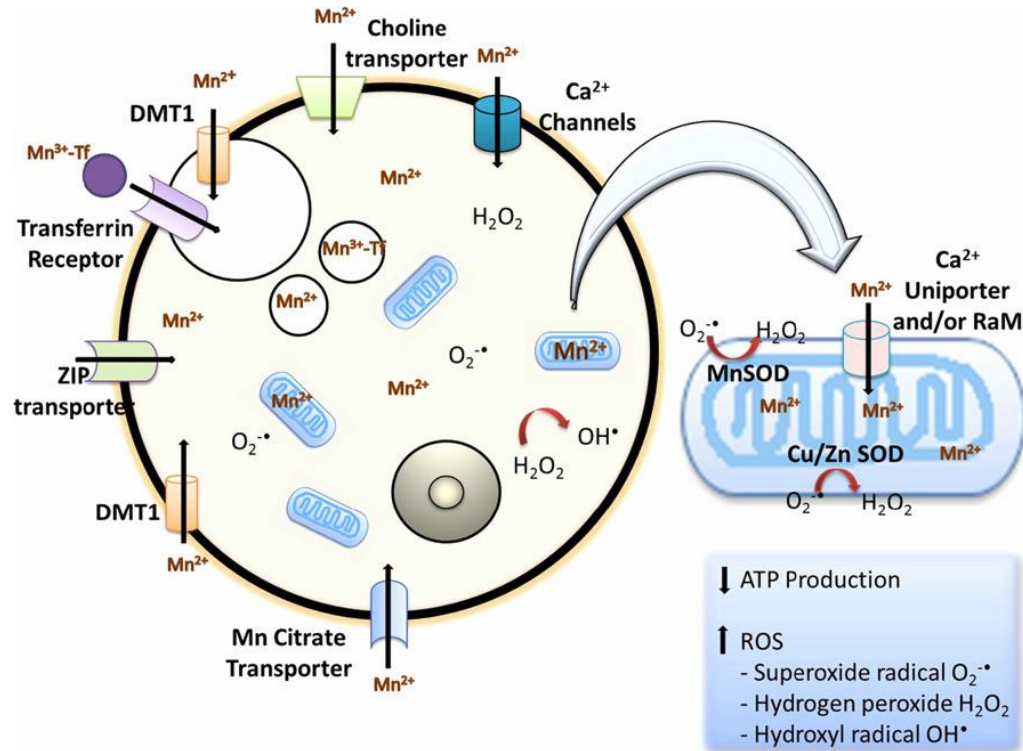
Absorción y transporte del Mn

El Mn puede cruzar la barrera hematoencefálica y la barrera cerebro-líquido cerebroespinal, a través de una serie de acarreadores y en diferentes estados de oxidación. Dada las funciones fisiológicas esenciales del Mn y la neurotoxicidad asociada con éste, los niveles de sobrecarga, la absorción, el transporte y el presente en el tejido, son estrictamente regulados por el metabolismo celular.

El Mn⁺² se introduce a las células a través de un cierto número de mecanismos de transporte; en el portal sanguíneo entra desde el tracto gastrointestinal por el plasma vía la α -2 microglobulina o la albúmina, vía el transportador de metales divalentes 1 (DMT1), por el transportador de citrato de Mn mediante una vesícula de un canal de Ca⁺² activado, por el mecanismo de las proteínas que interactúan con el zinc 8 (ZIP8) y el mecanismo 14 (ZIP14). En algunas ocasiones la acción de la ceruloplasmina oxida algunos iones transformándolos en Mn⁺³, cuando ocurre este proceso la proteína encargada de transportar este ion es la transferrina y entra a las neuronas vía el receptor de transferrina mediado por endocitosis (Martínez-Finley, *et al.*, 2013).(Fig. 5).

Por lo tanto la absorción del Mn depende de un mecanismo específico de absorción en cada una de las células y el estado de oxidación del Mn al llegar a éstas. Una vez adentro la mayor parte del Mn se encuentra en las fracciones mitocondriales y nucleares de la célula (Gunter, *et al.*, 2013; Martínez-Finley, *et al.*, 2013).

Figura 5: La imagen muestra los diversos mecanismos por los cuales entra el Mn a las células. La



entrada de este metal se debe a una gran gama de transportadores, además de que es dependiente del estado de oxidación del Mn. Es importante mencionar que al entrar a las neuronas el Mn se introduce en las mitocondrias y altera la cadena respiratoria. (tomado de Martínez-Finley, *et al.*, 2013).

En los últimos años se han realizado un limitado número de estudios que han evaluado la absorción de Mn por vía pulmonar, estas investigaciones muestran que hay una gran cantidad de factores que influyen en la deposición de las partículas del Mn inhalado. Entre estos factores se encuentran el tamaño de las partículas, el área de superficie, la distribución de las partículas, la solubilidad, entre otros. Todos estos factores influyen fuertemente el sitio donde el Mn es depositado dentro del

tracto respiratorio y la cantidad que es absorbido por el organismo (Ordoñez-Librado, et al., 2008). Avila-Costa y cols. (2007) mencionan que al exponer a los ratones a ciertas concentraciones de Mn inhalado, éstos muestran alteraciones en el movimiento. De esta manera la cantidad de Mn que es absorbido por los pulmones al torrente sanguíneo determina la concentración del metal que alcanza al cerebro y otros órganos (Dobson, et al., 2004).

Dentro del laboratorio de Neuromorfología experimental y aplicada de la UIICSE se ha observado que la inhalación de Mn, principalmente en sus formas de cloruro y acetato (MnCl_2 ; $(\text{Mn}(\text{OAc})_3)$) en rata y en ratón, causa la muerte de las neuronas de la SNpc dando como resultado un modelo experimental con características muy similares a las observadas en la EP, es decir, se puede observar que el Mn causa la muerte de las neuronas dopaminérgicas, además de provocar la disminución significativa de las concentraciones de dopamina en el estriado y en la SNpc, por otra parte también pueden observarse alteraciones conductuales como temblor, rigidez y alteraciones para iniciar el movimiento, aspectos que mejoran notablemente cuando se les trata con L-dopa, asegurando con esto último que las alteraciones son de origen dopaminérgico. Por esta razón consideramos importante establecer si el Mn es neurotóxico exclusivamente para las neuronas dopaminérgicas o si éste puede afectar a otro tipo de poblaciones neuronales, utilizando la variante de exposición directa del tejido fresco en solución con la mezcla de MnCl_2 y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$; además de demostrar si existe alguna diferencia de susceptibilidad entre el tejido de rata y el de ratón y realizar una comparación entre los núcleos afectados de cada especie ya que se ha reportado que existe diferente susceptibilidad entre especies de roedores (Avila-Costa et al. 2013; Sánchez-Betancourt et al. 2012).

Hipótesis

Es probable que si el tejido cerebral de ratas y ratones se expone de forma directa a la solución de (MnCl_2 ; $\text{Mn}(\text{OAc})_3$), estructuras susceptibles al estrés oxidativo como el hipocampo y la corteza podrían verse afectadas; pero como se ha demostrado que el Mn entra vía el DAT es posible que se observe mayor daño en las estructuras dopaminérgicas como la SNpc, el AVT, el GP y el Núcleo Estriado.

Objetivos

General

Evaluar la degeneración neuronal de algunos núcleos cerebrales (sustancia nigra, área ventral tegmental, globo pálido, hipocampo, corteza motora y núcleo estriado) provocada por la exposición directa a la mezcla de cloruro (MnCl_2) y acetato ($\text{Mn}(\text{OAc})_3$) de manganeso en rebanadas de tejido vivo de rata y ratón y realizar la comparación de los núcleos afectados entre cada una de las especies utilizadas.

Particulares

- Cuantificar mediante inmunocitoquímica anti-TH o anti-Neu-N el número de neuronas de la SNc, VTA, GP, NE, hipocampo y corteza motora provenientes del tejido de ratas y ratones de los grupos control y expuestos directamente a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$.
- Determinar si existe diferencia en la susceptibilidad a la toxicidad provocada por la exposición a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ entre ratas y ratones mediante la comparación del número de neuronas de los núcleos evaluados.

Material y métodos

Los experimentos se realizaron con 10 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de $180 \pm 20\text{gr}$ y con 10 ratones de la cepa CD1 con un peso de 30 ± 2 gramos.

Obtención del tejido

Los organismos utilizados (10 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 180 ± 20 g y 10 ratones macho de la cepa CD1 con un peso de 30 ± 2 g) se anestesiaron profundamente cuidando que no murieran, en una cámara de gas con éter etílico absoluto para facilitar su manejo, posteriormente se decapitaron y se les extrajo el cerebro, poniendo este último en solución fisiológica (solución Krebs) la cual tenía una temperatura de 2 a 4°C y tenía flujo constante con carbógeno (Ver anexos). Posteriormente el cerebro se cortó en el vibratomo (serie 1000, Technical Products International Inc), realizando cortes coronales de 100 μ m para la obtención de las siguientes estructuras: El mesencéfalo para obtener la SNc y el AVT, Hipocampo, Globo Pálido, corteza motora y núcleo estriado.

Exposición al manganeso (Mn)

Las rebanadas tanto del grupo control como las experimentales se incubaron durante una hora, el tejido experimental en la mezcla solución fisiológica $MnCl_2/(Mn(OAc)_3)$ (0.04M y 0.02M, respectivamente), mientras que el tejido control solamente en solución fisiológica Krebs para mantener su viabilidad, todas ellas con flujo constante de carbógeno. Posteriormente las rebanadas de los dos grupos se fijaron en paraformaldehído al 4% dejándolas en refrigeración por 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se colocaron las rebanadas del grupo control y del grupo tratado en solución buffer PBS (Ver anexos), para ser procesadas mediante técnicas inmunocitoquímicas.

Inmunocitoquímica (TH y Neu-N)

La técnica inmunohistoquímica para TH (Tirosina-Hidroxilasa) (Ver Anexos) se realiza para revelar y poder cuantificar las neuronas dopaminérgicas de la SNc y del AVT.

La inmunohistoquímica para núcleos neuronales (Neu-N) es una técnica utilizada para revelar la presencia de cualquier neurona presente en el cerebro, ya que esta técnica no va dirigida a alguna enzima específica y por lo cual marca indiscriminadamente todas las poblaciones neuronales.

Cuantificación de neuronas.

La cuantificación de las neuronas TH positivas se realizó de manera manual, posicionándose en el área de interés y contabilizando de manera rostro-caudal con aumento en el microscopio (40x). Se tomó un área total de $1500\mu^2$ de la SNc y del AVT, tanto de los grupos control como de los grupos experimentales.

Por otra parte, para cuantificar las neuronas marcadas con la inmunocitoquímica de Neu-N, se seleccionaron cortes tanto de los grupos control como de los experimentales de las áreas seleccionadas (Corteza, Hipocampo, GP y NE), se tomaron siete campos al azar y se contabilizaron el número total de neuronas presentes marcadas en esta zona utilizando el aumento 40x del microscopio óptico.

Pruebas estadísticas

Se realizó la prueba estadística de ANOVA de un factor para analizar el número de células sobrevivientes y así poder hacer la comparación de resultados respecto a los grupos controles y experimentales. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias de grupo a $P < 0.05$.

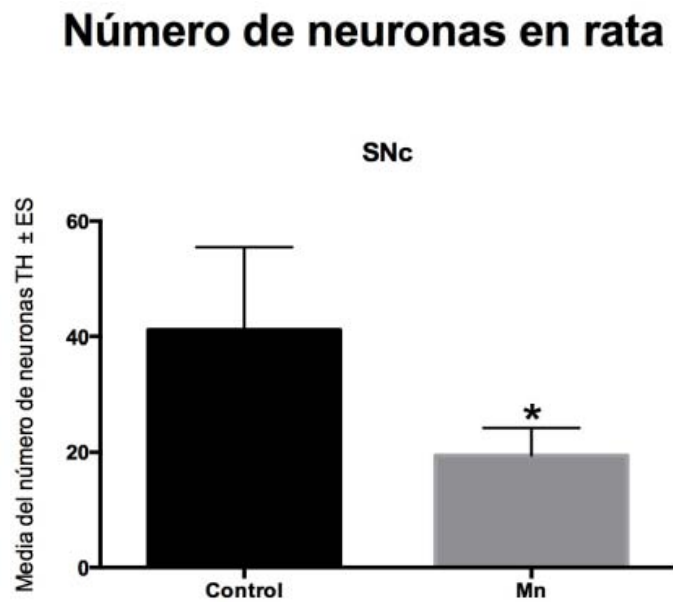
Resultados

Al término de la fase experimental se obtuvieron los siguientes resultados; se observó disminución significativa en el número de neuronas en algunas estructuras provocada por la exposición directa a la mezcla de Mn en el tejido cerebral experimental de rata y ratón.

➤ **Rata**

Sustancia nigra pars compacta (SNpc).

Este núcleo es pieza importante dentro del circuito motor, y se ha demostrado que la degeneración de las células en éste da como resultado el desarrollo de la EP o, de igual forma alteraciones motoras graves. Después de la incubación del tejido en la solución de $MnCl_2/ Mn(OAc)_3$, el número de neuronas sobrevivientes fue bajo, con respecto al tejido del grupo control, con lo que se afirma que el Mn es un metal que promueve la muerte neuronal sobre todo de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro de la rata. A continuación se muestra la gráfica de los resultados obtenidos. (Gráfica 1; Fig. 6)



Gráfica 1: La gráfica muestra la media del número de neuronas TH positivas sobrevivientes al tratamiento con $MnCl_2/ Mn(OAc)_3$, con respecto al grupo control. En donde $*= P \leq 0.05$ con respecto al grupo control.

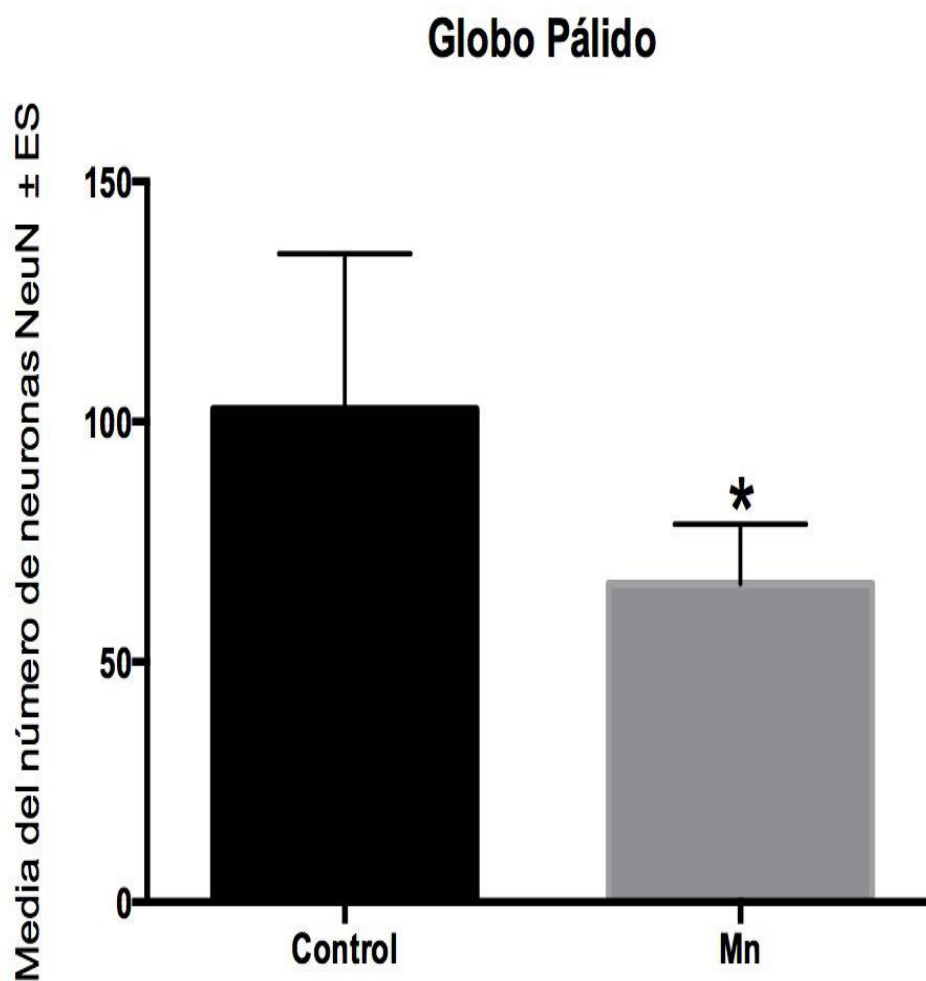


Figura 6. A: rebanada de tejido del grupo control donde se muestra la SNpc después de la exposición durante 1 hora en solución fisiológica de Krebs, visto a 4x.

B: rebanada de tejido del grupo expuesto después de la incubación por una hora a $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ donde se muestra la SNpc, nótese la disminución significativa provocada por la exposición a la mezcla de compuestos de Mn, visto 4x.

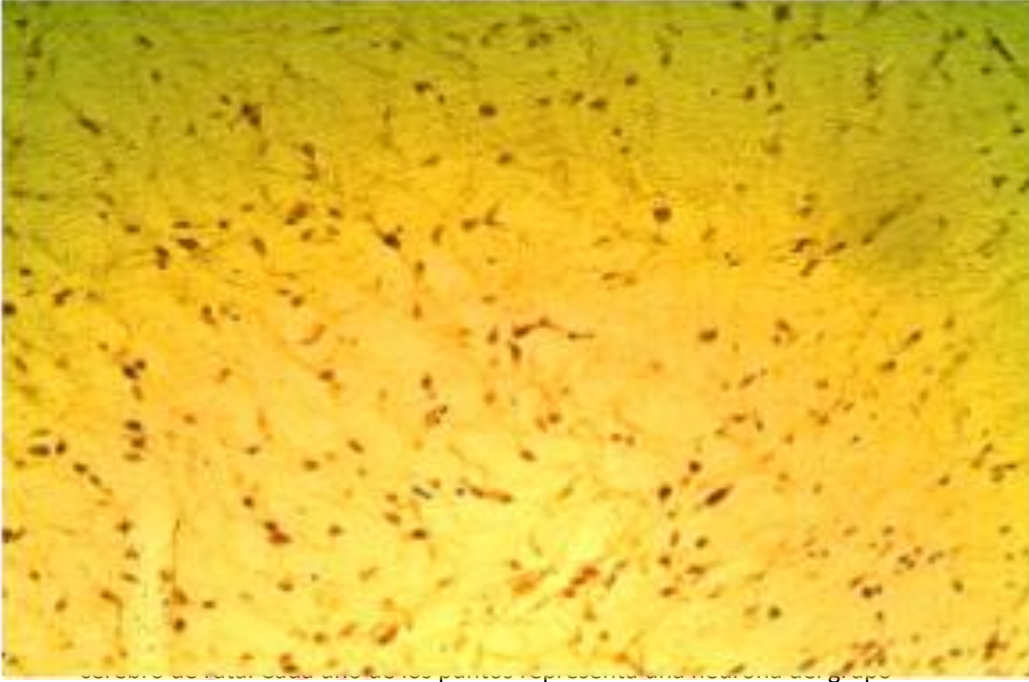
Globo pálido

Otra de las estructuras del cerebro de rata que se ve afectada por la mezcla de compuestos de Mn es el globo pálido, cabe mencionar que la pérdida neuronal es significativa con respecto al grupo control, observando una sobrevivencia de 65 ± 5 neuronas en esta estructura del grupo expuesto y un aproximado de 100 ± 5 neuronas sobrevivientes del grupo control. (Gráfica 2; Figs. 7 y 8).

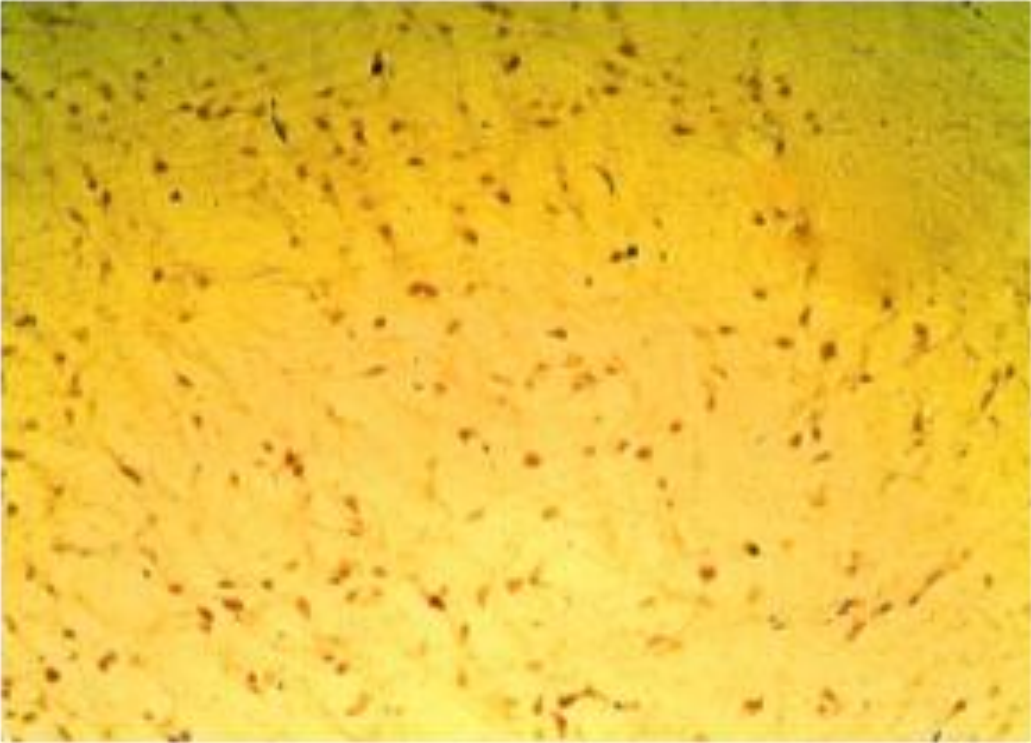


Número de neuronas en rata

Gráfica 2. Se muestra pérdida neuronal significativa en el tejido de ratas, entre el grupo control y el grupo experimental. En donde * = $P < 0.05$ con respecto al grupo control



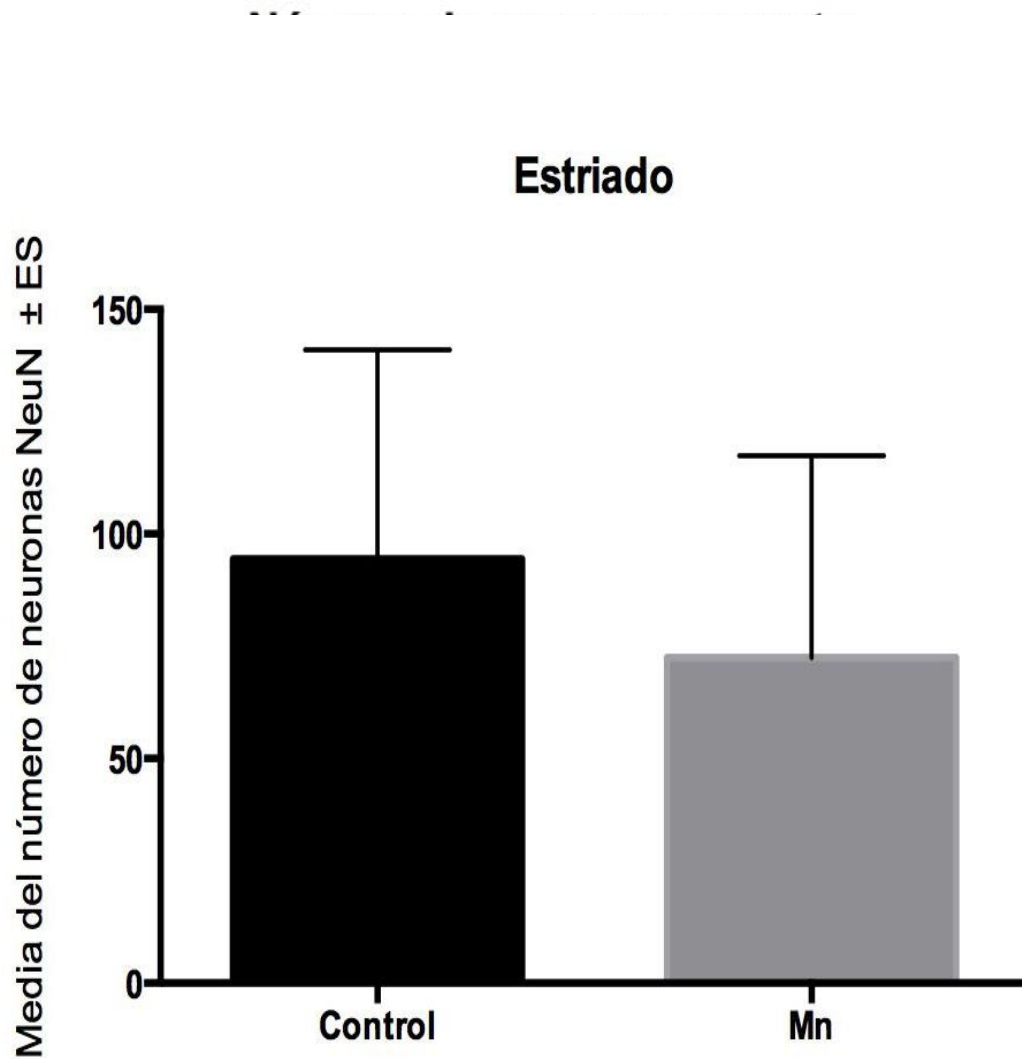
control. 40x.



do del
grupo

Núcleo Estriado (NE)

Otro de los núcleos que se ve afectado y en el cual podemos encontrar pérdida neuronal por la exposición a $MnCl_2$ / $Mn(OAc)_3$ es el estriado, sin embargo en el tejido cerebral de ratas no es significativa la pérdida neuronal en este núcleo, ya que se observan valores muy similares de neuronas sobrevivientes tanto del grupo control como del grupo experimental. (Gráfica 3; Figura 9).



Gráfica 3. La gráfica muestra que el tejido fresco de ratas las diferencias no son significativas y los valores son muy similares entre los dos grupos evaluados.

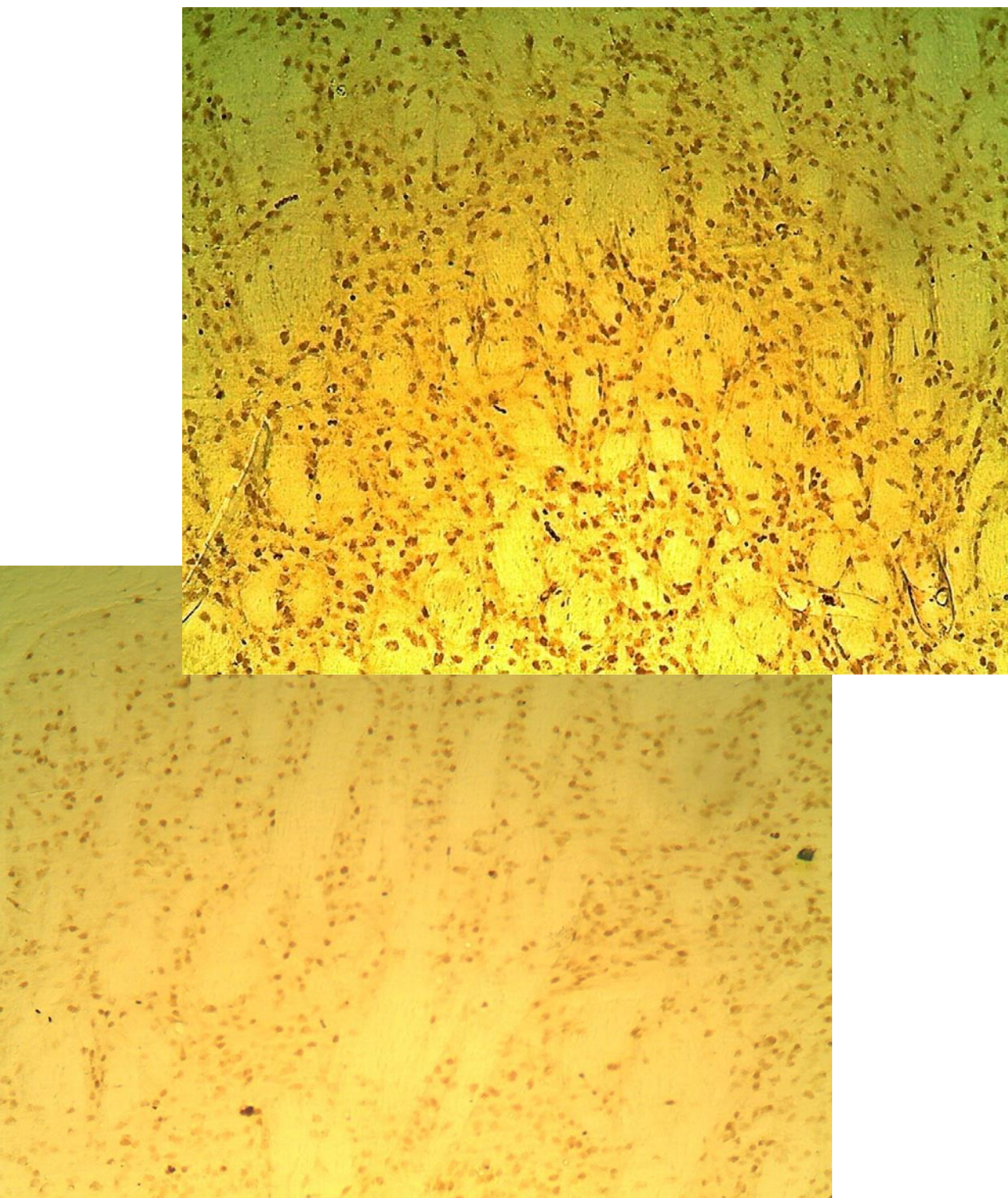


Figura 9: Imágenes representativas del NE del cerebro de ratas. En la imagen A se visualizan las neuronas presentes en este núcleo de los animales del grupo control; en la figura B se muestran las neuronas presentes en los animales del grupo expuesto después de la exposición a la mezcla de compuestos. En el NE de ratas núcleo no se observa diferencia significativa entre el grupo control y el experimental..

Hipocampo, Corteza y área ventral tegmental (AVT).

Las estructuras que no tuvieron diferencias significativas fueron la corteza cerebral motora, el hipocampo y el AVT. Estas estructuras mostraron niveles muy similares de sobrevivencia neuronal después de haber sido tratadas con la solución de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$, en el tejido cerebral de rata. (Figura 10 y 11).

Número de neuronas en rata

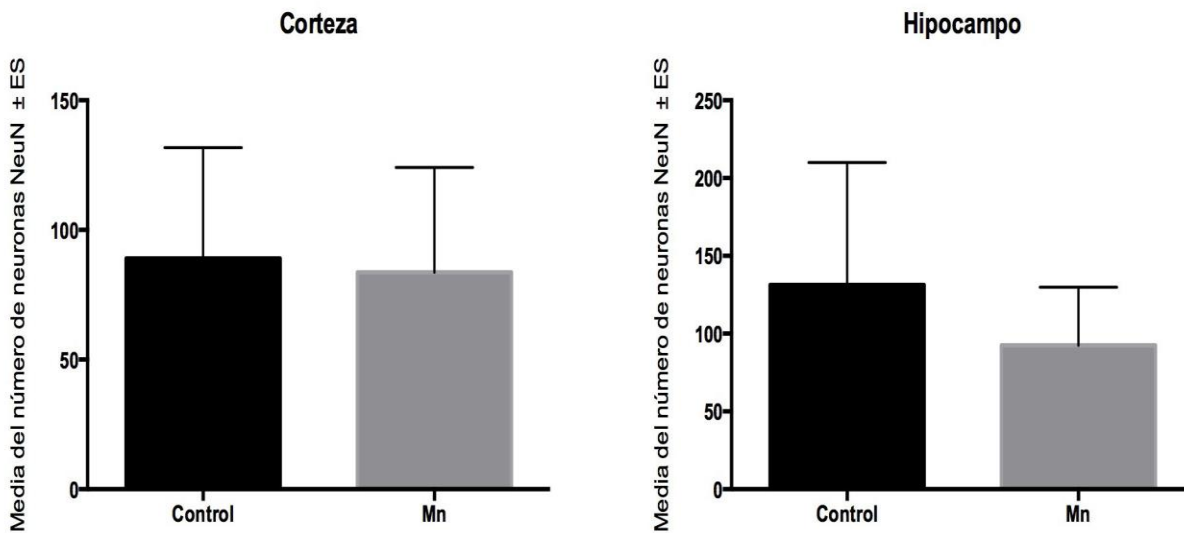
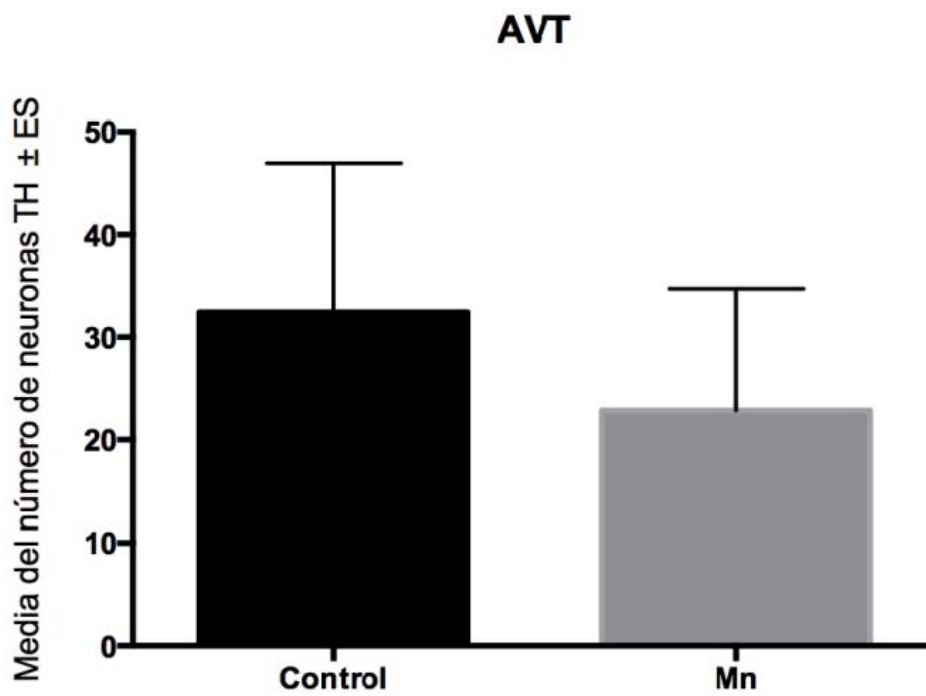




Figura 10: Células inmunoreactivas a Neu-N presentes en la corteza motora y el hipocampo del grupo control y el grupo expuesto a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos después de la fase experimental.



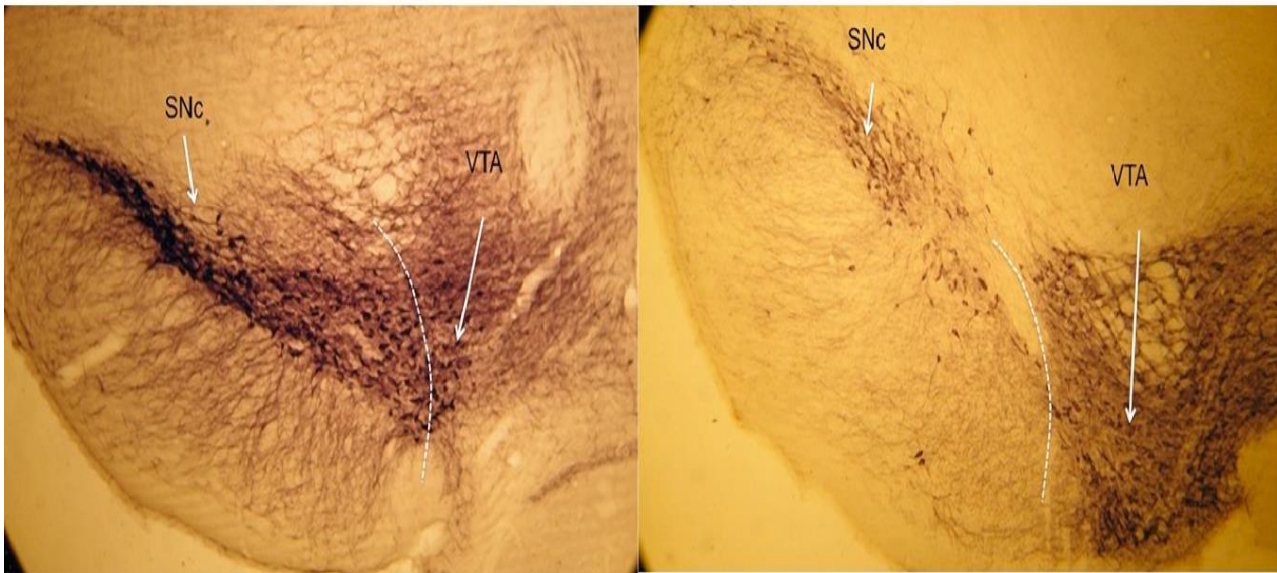


Figura 11: Células inmunoreactivas a Tirosina-Hidroxilasa presentes en el AVT del grupo control y el grupo expuesto. No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos después de la exposición a la mezcla de compuestos de Mn.

➤ **Ratón**

Sustancia nigra compacta

Cabe mencionar que el cerebro del ratón también se ve afectado por la solución de $MnCl_2 / Mn(OAc)_3$, ya que encontramos disminución significativa en el número de neuronas TH positivas en el grupo experimental comparadas con el grupo control (Grafica 4; Figura 12).

Número de neuronas en ratón



Gráfica 4. La gráfica muestra el número de neuronas inmunorreactivas a TH de la SNc del cerebro de ratón después de haber sido tratadas con la mezcla de cloruro y acetato de manganeso. Se muestra diferencia significativa del grupo experimental donde $* = <0.05$ respecto al grupo control.

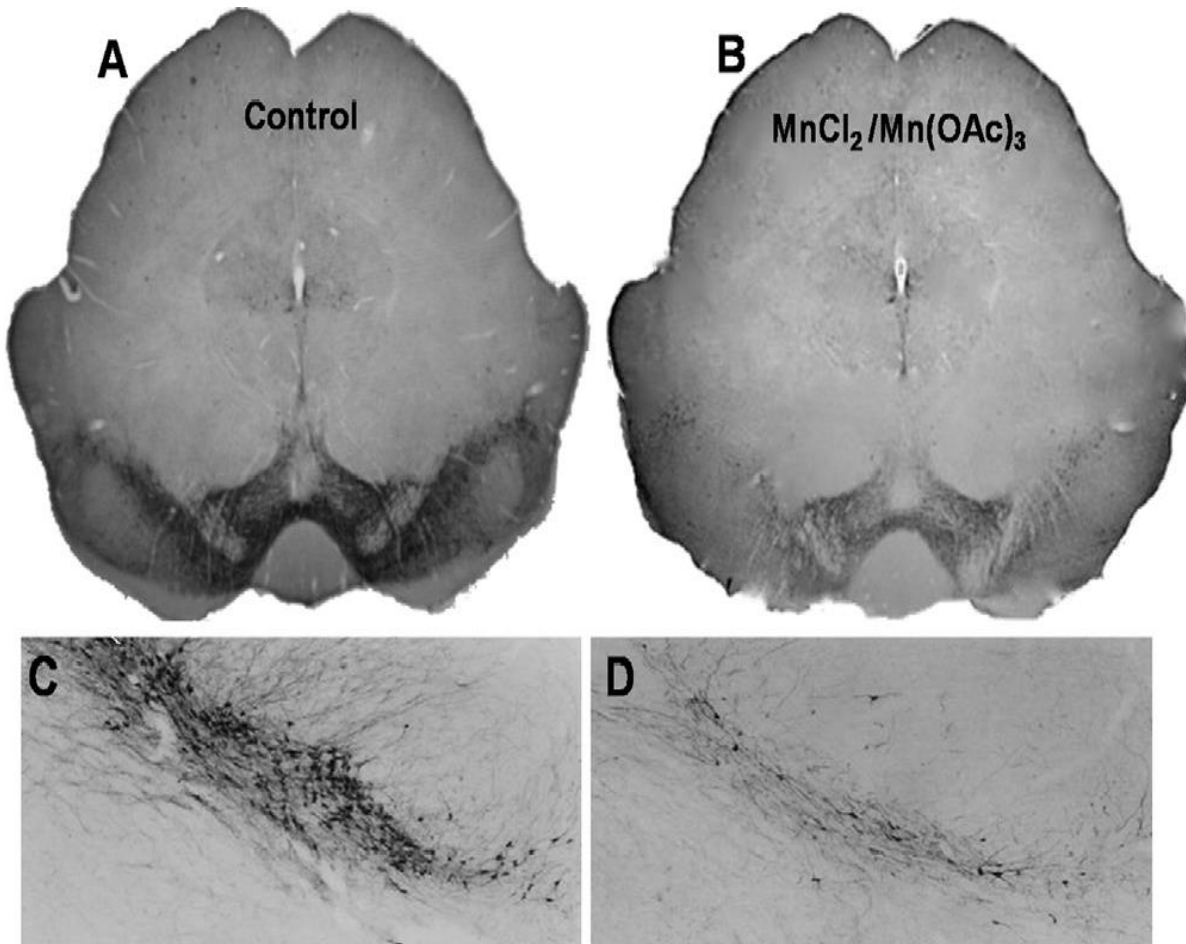


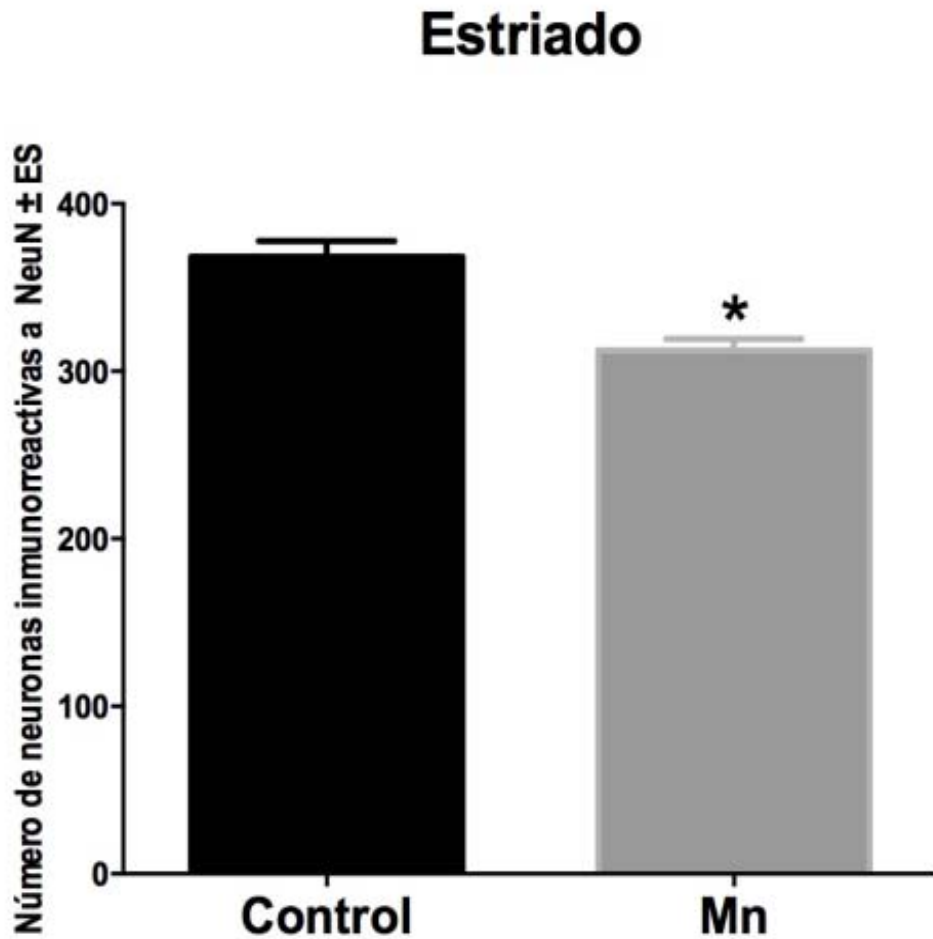
Figura 12: Imagen representativa de las neuronas de la SNc de ratones del grupo control (A y C) y de animales expuestos a la mezcla de MnCl₂/ Mn(OAc)₃ (B y D). Se observan pérdida significativas del número de neuronas sobrevivientes en la SNc del grupo control contra el grupo expuesto.

Núcleo estriado

De acuerdo a los resultados obtenidos después de la fase experimental encontramos que la mezcla de MnCl₂/ Mn(OAc)₃ afecta de manera distinta a las dos

NUMERO DE NEURONAS EN UN RATÓN

especies de roedores que se utilizaron, ya que mientras en el NE del cerebro de rata no observamos diferencia alguna después del tratamiento, en el cerebro de ratones además de la SNc, sí se observó pérdida neuronal significativa de los animales tratados con respecto al grupo control. (Gráfica 5; Figs. 13 y 14).



Gráfica 7. Se muestra que el tejido de los ratones expuestos a manganeso presenta diferencias significativas en cuanto al número de neuronas sobrevivientes en el estriado. En donde * = $P < 0.05$ con respecto al grupo control.

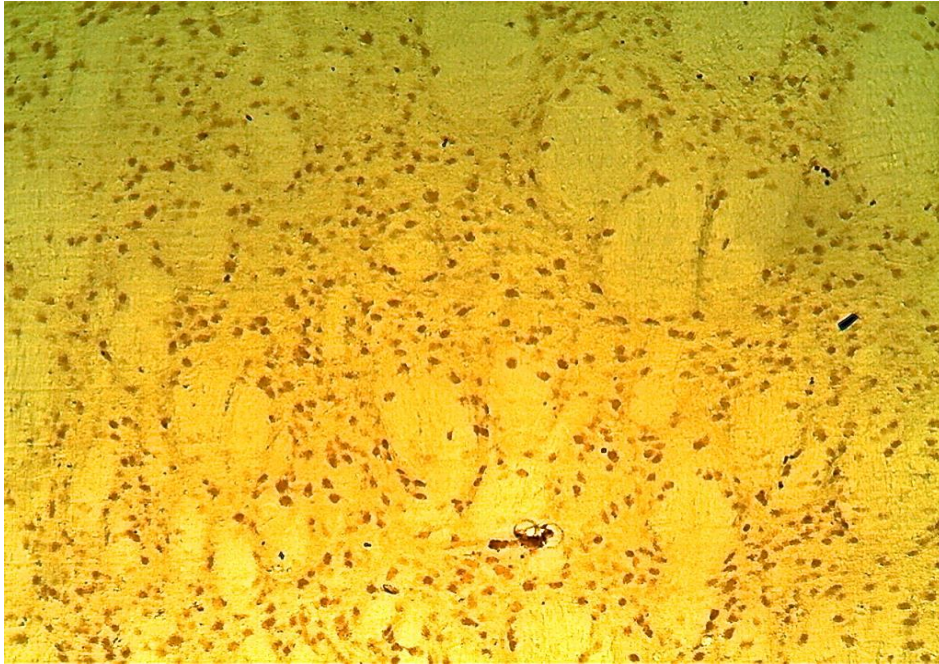


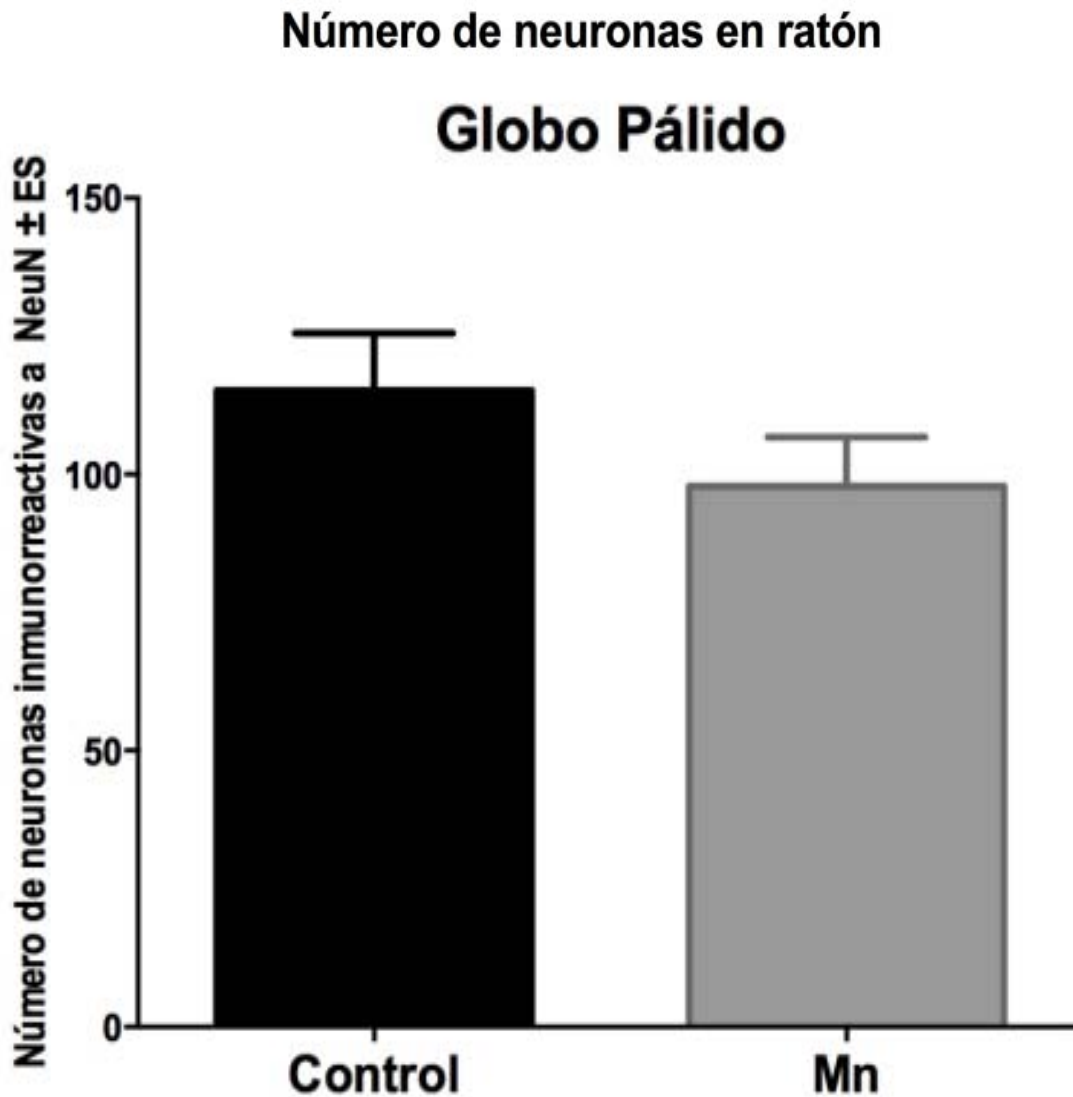
Fig. 13. Corte coronal representativo del núcleo estriado del cerebro de ratón donde pueden observarse las neuronas presentes, reveladas con la técnica Inmunohistoquímica para Neu-N. Grupo control 10x.



Fig.14: Corte coronal del estriado del cerebro de ratón después de haberse incubado con la mezcla de Mn. 10x.

Globo pálido

Finalmente la última de las estructuras donde se demostró pérdida neuronal significativa es el globo pálido de las ratas, sin embargo en el tejido cerebral de los ratones se observan niveles muy similares de neuronas sobrevivientes, tanto en el tejido control como en el experimental (Gráfica 6; Figura 15).



Gráfica 8. El número de neuronas sobrevivientes en el GP de los ratones es muy similar entre el grupo control y el experimental. En tejido cerebral de ratón no se observan diferencias significativas.



Figura 15. En la imagen A se observan las neuronas inmunoreactivas a Neu-N presentes en el GP de ratones del grupo control; mientras que en la imagen B se muestran las neuronas sobrevivientes de los animales tratados con la mezcla de compuestos de Mn. No se observan diferencias significativas entre los grupos después de la fase experimental del proyecto.

Hipocampo, Corteza y área ventral tegmental (AVT).

Es importante señalar que en estas estructuras aunque sí hubo menor número de neuronas sobrevivientes por corte, comparando las muestras control y las expuestas, estos datos no son significativos por lo que no se puede afirmar que el Mn actúa de manera nociva en ellos. (Figura 16, 17 y 18).

Número de neuronas en ratón

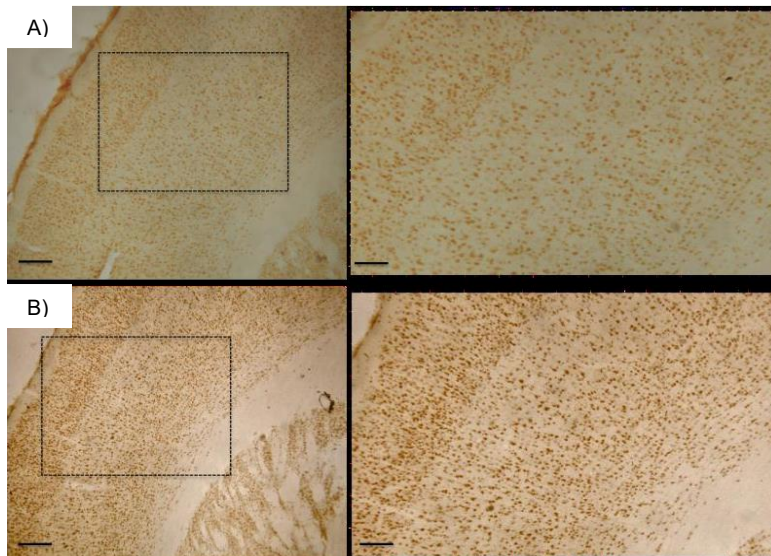
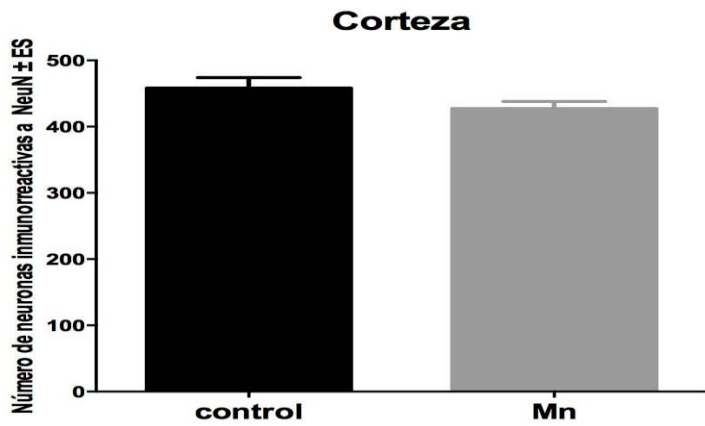


Figura 16: Número de celular inmunoreactivas a Neu-N presentes en la corteza motora; cabe señalar que las neuronas sobrevivientes del grupo control y el grupo expuesto son muy similares. En la imagen A se muestran las neuronas presentes en la corteza motora de animales del grupo control. En la imagen B son las neuronas presentes en este núcleo de animales expuestos.

n

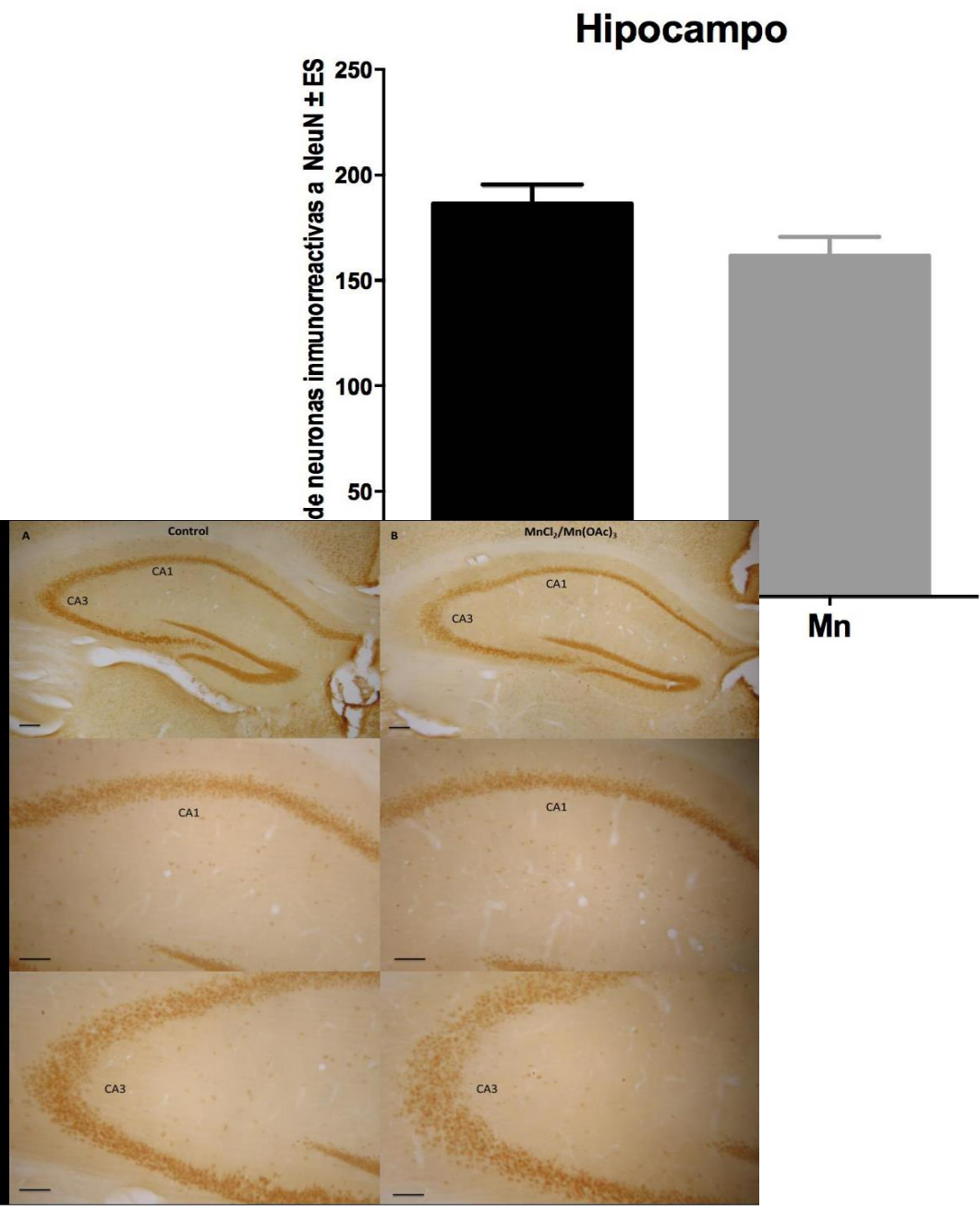


Figura 17: Numero de celulas inmunorreactivas a Neu-N presentes en el hipocampo. Los animales del grupo expuesto a la mezcla de MnCl₂/ Mn(OAc)₃ contra los animales de grupo control no presentan diferencias significativas en el número de neuronas sobrevivientes después de la exposición. En la imagen se muestran las neuronas presentes en el hipocampo en las áreas CA1 y CA3 de animales tanto del grupo control como de los animales expuestos.

Número de neuronas en ratón

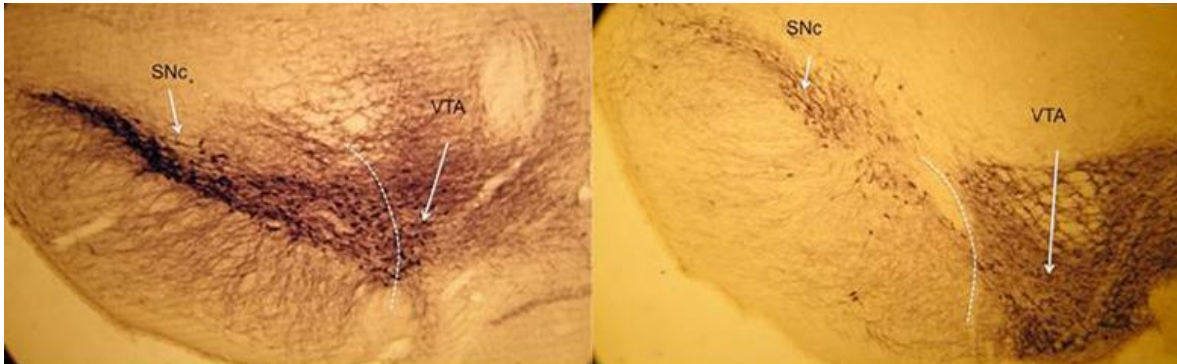
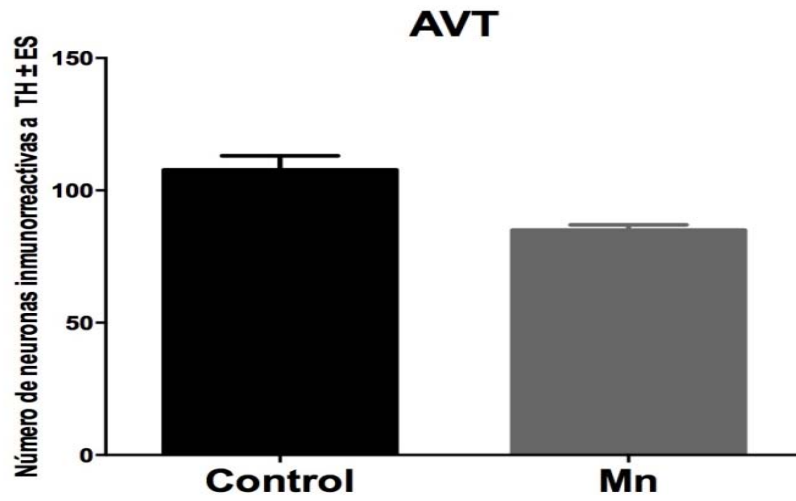


Figura 18. En la imagen se muestran las neuronas TH positivas del AVT de los ratones expuestos a la mezcla de compuestos de MN y los ratones del grupo control.

Discusión

Los modelos animales de la EP se han desarrollado con el fin de entender de una manera más completa los procesos por los cuales se desarrolla esta enfermedad; sin embargo un modelo experimental idóneo tiene que recrear las condiciones por las cuales se lleva a cabo la degeneración del sistema, esto quiere decir que debe ser un modelo donde se pueda observar la naturaleza progresiva de la enfermedad.

El Mn es un elemento esencial para el funcionamiento del metabolismo celular, pero se ha demostrado que la exposición a concentraciones excesivas provoca un síndrome similar a la EP (Erikson, *et al.*, 2005; Aschener, *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en la presente investigación afirman lo planteado en los objetivos, ya que se demostró que el Mn es un metal que afecta principalmente las neuronas dopaminérgicas de la SNpc tanto de ratas como de ratones. Esto concuerda con la investigación de Ordoñez-Librado (2012) quien demostró que la inhalación de $MnCl_2$ / $Mn(OAc)_3$ provoca pérdida neuronal en un 63% en la SNc de ratones; así mismo Sánchez-Betancourt y cols. (2012) demostraron que si las ratas inhalan la mezcla de $MnCl_2$ / $Mn(OAc)_3$ provoca pérdida neuronal en la SNc en un 48.53%. Esto puede dar evidencia más sólida de que el Mn es un metal selectivo que afecta de manera particular a las neuronas dopaminérgicas de la SNc sin afectar a las neuronas presentes en el AVT.

SNc, AVT, GP y NE.

Nuestros resultados demuestran que la exposición directa a $MnCl_2$ / $Mn(OAc)_3$, en el tejido cerebral fresco provoca pérdida neuronal significativa de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, en ambas especies, de igual manera encontramos que algunas estructuras son más sensibles a la toxicidad producida por el Mn, tal es el caso del GP en ratas y el NE en ratón.

Se ha reportado que las regiones cerebrales primarias a donde va dirigida la intoxicación por Mn son los ganglios basales, principalmente el GP y el cuerpo estriado (Bowman, *et al.*, 2011); mientras tanto en la EP la neurodegeneración se

produce de manera gradual en las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Aschner, *et al.*, 2007). De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestra investigación se pueden dar fundamentos más sólidos que el Mn es un metal selectivo el cual afecta principalmente a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc .

Ordoñez-Librado y cols. (2008) demostraron que la inhalación de la mezcla de compuestos de Mn produce cambios citológicos, neuroquímicos y funcionales en los animales expuestos, como la disminución de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, alteraciones motoras y pérdida de dopamina en el NE y SNc; de igual forma reportan que hay cambios ultraestructurales en el núcleo estriado y la SNc; dichos cambios no fueron observados en el grupo control después de la inhalación de agua desionizada. Sánchez-Betancourt y cols. (2012) observaron que al exponer las ratas a la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ presentaron alteraciones evidentes en la actividad locomotora y reducción significativa en el conteo de células TH+ de la SNc, pero no en el AVT ni en el GP y el NE. De igual manera Ordoñez-Librado y cols. (2010) observaron que ratones expuestos a la mezcla de compuestos de Mn, después de recibir tratamiento con L-DOPA recuperaron su actividad motora significativamente, demostrando con esto que las alteraciones provocadas por la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ están relacionadas con las función dopaminérgica nigroestriatal.

Actualmente se ha establecido que el Mn tiene acceso a las neuronas dopaminérgicas a través del DAT (Erikson, *et al.*, 2005) e intracelularmente se acumula específicamente dentro de la mitocondria via el canal uniporte de Ca^{+} (Gavin, *et al.*, 1990; Gunter, *et al.*, 2004; Zhang, *et al.*, 2004). Para validar esto Ingersoll y cols. (1999) examinaron el efecto de la inhibición del DAT sobre la captación de Mn por el DAT. Ellos administraron cocaína (inhibidor del DAT), a ratas que fueron expuestas a Mn (250 μ g de $MnCl_2$). Las ratas expuestas a cocaína tenían disminución significativa en la acumulación de Mn en el mesencéfalo ventral, polo occipital, lóbulo frontal y el núcleo estriado, lo que sugiere que el metabolismo y transporte de la dopamina tiene un papel fundamental para el transporte del Mn.

Como se ha reportado, una gran cantidad de Mn entra a las neuronas por la vía del DAT; las neuronas de la SNc son más susceptibles a la acumulación de este metal, puesto que estas neuronas presentan gran cantidad de DAT en su interior, a diferencia de las neuronas del AVT las cuales expresan niveles más bajos de este transportador (Alfonso -Oramas, *et al.*, 2009).

En nuestros resultados no encontramos daño significativo en las neuronas del AVT, sin embargo sí encontramos que la mezcla de Mn sólo produce alteraciones en las neuronas de la SNc, tomando en cuenta que estas dos poblaciones neuronales son dopaminérgicas.

Las neuronas dopaminérgicas, en particular, presentan un ambiente propicio para la generación de EROs (especies reactivas al oxígeno), ya que el metabolismo de la DA genera H_2O_2 , mientras que su auto-oxidación produce O_2^- y DA-quinona, una molécula que daña proteínas por su reacción con los residuos de cisteína (Dauer y Przedborski, 2003; Gomez-Chavarín, *et al.*, 2012; Fig 19). De esta manera se ha reportado que el Mn estimula la auto-oxidación de la DA en las neuronas dopaminérgicas, acompañado de la formación de quinonas (Malecki, 2001; Archivald y Tyree; 1987).

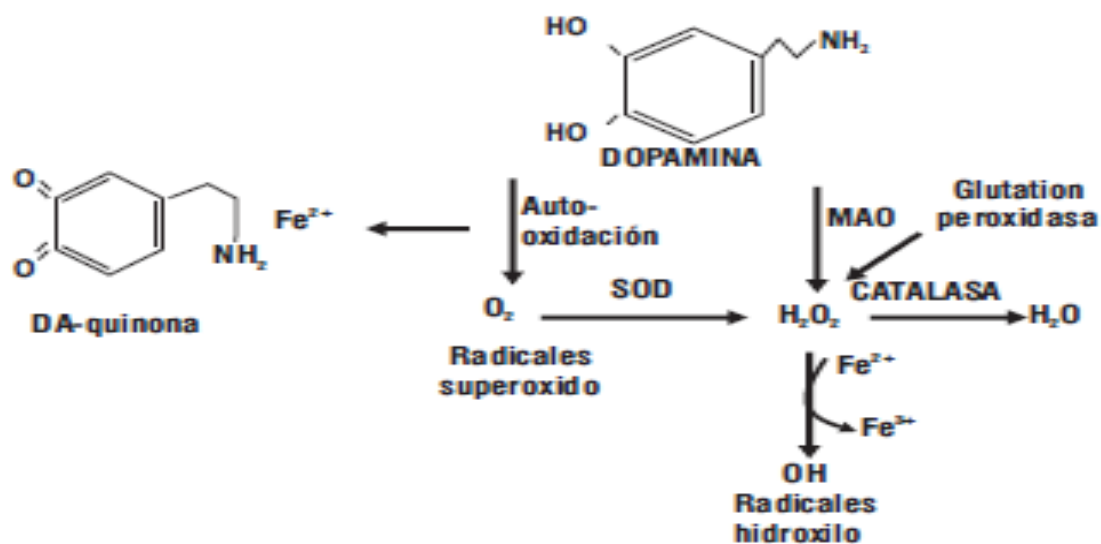


Figura 19: Generación del estrés oxidativo por la oxidación de la dopamina y su participación en el proceso neurodegenerativo. Las excesivas concentraciones de Mn provocan la auto-oxidación de la dopamina provocando la formación de radicales libres.

En nuestro experimento se utilizó la mezcla de dos compuestos, $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$, debido a que este metal depende en gran medida de su estado de oxidación para provocar toxicidad. Se ha reportado que *In vitro* el Mn^{+3} parece ser más citotóxico que el Mn^{+2} posiblemente porque este ion tiene mayor reactividad oxidativa y semejanza con la molécula de hierro (Tuschl, *et al.*, 2013) de esta manera el Mn es transportado al interior de la célula en su forma divalente y se oxida con la ayuda del anión superóxido a su forma trivalente causando daños importantes en el complejo I mitocondrial (Aschner, *et al.*, 2005). Cuando el Mn entra al cuerpo celular, inhibe la tasa de producción de ATP a través de los sitios de inhibición de la cadena transportadora de electrones en la respiración mitocondrial. La unión de Mn^{+2} en estos sitios intra-mitocondriales provoca la acumulación de este metal y la producción de O_2^- , dando como resultado el aumento en la producción de EROs y el consiguiente estrés oxidativo. La exposición a Mn induce gran variedad de cambios celulares incluyendo la depleción dopaminérgica, incremento en el estrés oxidativo y deterioro de la energía del metabolismo (Martínez-Finley, *et al.*, 2013).

Aschner (2007) asocia la toxicidad del Mn en zonas donde hay altas concentraciones del ion hierro (Fe), ya que una parte del Mn que llega al cerebro es conducido por el transportador dependiente de transferrina (Tf) llegando así a zonas ricas en este receptor como son el caudo-putamen, el GP y el NST. El GP se ve particularmente afectado por la intoxicación de Mn ya que causa la reducción de la glutamino sintetasa (GS) la cual es una enzima importante para la transformación del glutamato a glutamina, esto se observa principalmente en el cerebelo y el putamen de monos Rhesus expuestos a concentraciones de 1.5mg Mn/m^3 utilizando el compuesto de $MnSO_4$. (Martínez-Finley, *et al.*, 2013). El NE es una estructura importante en los ganglios basales, recibe aferencias excitatorias provenientes de la corteza y proyecciones dopaminérgicas de la SNpc Las neuronas

dopaminérgicas de la vía nigroestriatal parecen ser particularmente sensibles a la toxicidad por Mn, ya que se ha demostrado que la exposición prolongada a este metal, provoca reducciones a largo plazo en los niveles de DA e induce la pérdida del control sobre los autorreceptores de DA (Yang et al., 2011). De igual manera se ha reportado que el NE es una región rica en DMT-1 (Burdo, *et al.*, 1999). El DMT-1 es una importante proteína para el correcto transporte de hierro y manganeso al cerebro. Se han demostrado que los niveles elevados de Mn provocan el aumento de DMT-1, aumentando la absorción y acumulación de Mn en esta región (Erikson, *et al.*, 2004). De esta manera este mecanismo podría proponer una posible explicación para la degeneración observada en el NE del tejido cerebral de ratas expuestas a la mezcla de Mn.

Corteza e hipocampo

La corteza cerebral forma un revestimiento completo de los hemisferios cerebrales, en ella podemos encontrar, entre otras estructuras, a la corteza motora primaria y secundaria; en el área motora primaria se reciben proyecciones de la corteza frontal, el cerebelo y los ganglios basales y su función es la conversión final en el diseño de la ejecución del movimiento (Snell, 2001). De acuerdo a lo observado en nuestros resultados, no encontramos diferencias significativas en el número de neuronas presentes en esta área.

Por otro lado, uno de los objetivos era investigar si el Mn provoca alteraciones en el hipocampo ya que es un núcleo muy propenso a la producción de ERO's. Rodríguez y cols. (2013) realizaron una investigación en la cual exponían a ratas dentro de una cámara conectado a un generador de ozono (0.25 ppm de ozono). Demostraron que la exposición provoca el aumento significativo en las ERO's, además observaron aumento de la actividad de la enzima de SOD-Mn.

La producción de ERO's están ampliamente relacionadas con la exposición a Mn, ya que el Mn produce un desbalance en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria (Rodríguez, et al., 2013); sin embargo de acuerdo a nuestros resultados, no encontramos diferencias significativas en este núcleo entre los animales del grupo control y los del grupo experimental.

Susceptibilidad al Mn entre especies

Al igual que hay diferente susceptibilidad a la intoxicación por Mn entre las diferentes poblaciones celulares de las estructuras analizadas, ocurre un fenómeno similar al comparar esta toxicidad entre especies. Entre los roedores, comparando la rata con el ratón, hay diferente susceptibilidad al Mn. Sánchez-Betancourt y cols. (2012) describieron que las ratas muestran diferente susceptibilidad a la inhalación de $MnCl_2$ / $Mn(OAc)_3$ con respecto a los ratones; en su modelo experimental las ratas se expusieron tres veces por semana durante seis meses en lugar de dos veces por semana durante 5 meses como los ratones (Ordoñez-Librado et al. 2008). Esto se debe a que se ha demostrado que en la rata el Mn es absorbido probablemente por un proceso rápidamente saturable mediado por un sistema transportador de baja capacidad pero de alta afinidad sin embargo las alteraciones conductuales y citológicas que se manifiestan en la rata son muy similares a las que se observan en el ratón. (García-Aranda et al., 1983). Esto es comparable con nuestros resultados, ya que después de la exposición a la mezcla de compuestos de Mn se observó que en la rata se ven afectados el GP y la SNC y en el ratón se daña el NE y de la misma manera la SNC.

Los procesos por los cuales el Mn es absorbido por diferentes núcleos celulares aún

no es claro, sin embargo se ha demostrado que dependiendo de la vía de administración, este metal puede transportarse a diferentes áreas. Cuando se inyecta directamente Mn^{+2} de manera subcortical y cortical provoca diferentes patrones de captación Mn^{+2} sobre todo en capas específicas de corteza visual (Chan et al., 2014). De igual manera el estado de oxidación del metal es un factor importante para la distribución del Mn en diferentes núcleos cerebrales. El Mn al tener una valencia de Mn^{+2} provoca que sea semejante a la molécula de Fe^{+2} ; esto toma importancia ya que Erikson y cols. (2004) demostraron que el transportador de metales divalentes es fundamental para el transporte de Mn a regiones como el caudado putamen, el GP y la SNc supliendo a la molecula de Fe^{+2} . De esta manera una de las posibles explicaciones para entender la intoxicación por Mn en los diferentes núcleos cerebrales tanto de rata como de ratón planteados en la hipótesis del trabajo, es mediante el entendimiento de la investigación de Gauthier y cols (1999); Freeman y cols. (2001) y Prensa y Parent (2001) quienes describen que las neuronas dopaminérgicas arborizan en otras estructuras de los ganglios basales, por ejemplo la inervación dopaminérgica del talamo, el estriado y el GP por axones provenientes de la SNpc en cerebros de ratas y primates. Debeir y cols. (2005) encontraron evidencias que refutaron este hecho, además de que en su investigación el demostro que además de estos núcleos, la SNpc también manda proyecciones hacia la corteza cerebral. El mecanismo implicado en la degeneración neuronal en el NE y GP aún no es claro, sin embargo podría estar implicado un proceso excitotóxico, donde se ha sugerido que el Mn^{+2} puede sustituir al Ca^{+2} en el proceso excitotóxico o inducir la liberación de Ca^{+2} de los almacenes intracelulares de las neuronas afectadas (Takeda *et al.*, 2002).

Por último Klein y cols. (2012) en su revisión describen que los roedores y los primates comparten similitudes anatómicas en áreas del cerebro donde se producen los movimientos de las extremidades. Con esta información es importante mencionar que la utilización de los modelos experimentales en animales es una herramienta efectiva para la observación de algunas patologías como la EP. Particularmente, la utilización de roedores (rata o ratón) en nuestro experimento fue

de suma importancia ya que se logró hacer una comparación de cómo afecta el Mn a cada una de estas dos especies.

Conclusión

En conclusión los datos obtenidos en el presente estudio demuestran que la exposición directa a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ de tejido cerebral fresco de rata y de ratón, provoca disminución significativa en la supervivencia de las neuronas de algunos núcleos de los ganglios basales, afectando a la SNc en mayor proporción en ambas especies, el NE en ratas y GP en los ratones.

Esto proporciona evidencia suficiente para poder afirmar que el Mn es un elemento que al introducirse al sistema provoca la muerte específica de las neuronas que mueren en la EP.

Los datos obtenidos en esta investigación demuestran que el Mn es un metal que afecta específicamente a las neuronas dopaminérgicas, ya que de acuerdo a estudios anteriores realizados en el laboratorio de Neuromorfología experimental y aplicada, demuestran que por vía inhalada afecta a las neuronas DA de la SNpc, de esta manera este modelo experimental de exposición directa, complementa y afirma que este metal es un agente tóxico específico para las neuronas dopaminérgicas de la SNc y no las del AVT.

Por último hay que destacar que esta investigación fue de gran importancia para el desarrollo de nuevas estrategias de estudio sobre la EP, ya que al ser empleados modelos experimentales en roedores y en especial este modelo donde se utilizó la variante de exposición directa y en dos diferentes especies (rata y ratón) se logró observar cómo a cada especie le afecta de manera particular en diferentes estructuras cerebrales; de esta manera el siguiente paso a seguir es la investigación acerca de por qué la rata tiene diferente susceptibilidad en algunos núcleos con respecto al ratón y determinar los procesos por los cuales se podría frenar el desarrollo de la enfermedad, de la misma manera se podrían plantear tratamientos alternativos para poder controlar el desarrollo de la enfermedad.

Referencias bibliográficas.

Alexander, G. y Crutcher, H. M.D., (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. TINS. (137): 266-271.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Information of Manganese. (2001). Disponible en: <http://www.atsdr.gov/es/> en español.

Alfonso-Oramas, D., Cruz-Muros, I., Álvarez de la Rosa, D., Abreu, P., Giráldez, T., Castro-Hernández, J., Salas-Hernández, J., Lanciego, J., Rodríguez, M., González-Hernández, T. (2009). Dopamine transporter glycosylation correlates with the

vulnerability of midbrain dopaminergic cells in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. (36): 496-508.

Archivald F.S. y Tyree C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. (2): 638-650.

Aschner, M., Guilarte, T.R., Schneider, J.S., Zheng, W. (2007). Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. (221):131-147.

Aschner, M., Erikson, K.M., Dorman, D.C. (2005). Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. (1): 1-32.

Aschner, M., Shanker, G., Erikson, K., Yang, J., Mutkus, L. (2002). The uptake of manganese in brain endothelial cultures. *NeuroToxicology*. (23): 165-168.

Avila-Costa, M. R. (1996). Evolución de las alteraciones ultra estructurales del neuropilo del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6-Hidroxidopamina. Tesis de Maestría. ENEP-I. UNAM. Méx. D.F.

Avila-Costa M.R., Anaya M. V., Ordoñez Librado J.L., Gutiérrez Valdez A. L., Montiel F. E., Colín B. A., Aley M. P., Espinosa V.J., Reynoso E. L. y Fortoul T.I. (2007). Synaptic Alterations of the Striatum: Two Different Models of Dopamine Deafferentation. Nova Science Publishers, Inc. Chapter III.

Betarbet, R., Sherer, T.B. Mackenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. y Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticideexposure reproduces features of Parkinson's disease. *Natural neuroscience*. (3): 1301-1306.

Betarbet, R., Sherer T.B. y Greenamyre J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays* (24): 308-318.

Blandini, F., Armentero, M.T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *The Febs Journal*. (279): 92-101.

Bolam, J.P., Somogyi, P., Totterdel, S., Smith, A.D. (1981). A second type of striatonigral neurons: a Comparison between retrogradely labeled and golgi stained neurons at light and electron microscopic levels. *Neuroscience*. (11): 2141-2157.

Bowman, B.A., Kwakye, G. F., Hernández, H.E., Aschner M. (2011). Role of manganese in neurodegenerative diseases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. (25): 191– 203.

Burdo, J.R., Martin, J., Menzies, S.L., Dolan, K.G., Romano, M.A., Fletcher, R.J., Garrick, M.D., Garrick, L.M., Connor, J.R. (1999). Cellular distribution of iron in the brain of the Belgrade rat. *Neuroscience*. (93): 1189-1196.

Carpenter, M.B. (1976). Anatomical organization of the corpus striatum and related nuclei. En: Melvin, D. y Yahr, M.D. (eds). *The basal ganglia*. Reven press. New York.

Chan, C. K., Fan, S. J., Chan, W. R., Cheng, S. J., Zhou, Y. L., Wu, X. E. (2014). In vivo visuotopic brain mapping with manganese-enhanced MRI and resting-state functional connectivity MRI. *NeuroImage*. (90): 235-245.

Chesselet, M.F. y Graybiel, A.M. (1986). Striatal neurons expressing somatostatin-like immunoreactivity: evidence of a peptidergic interneuronal system in rat. *Neuroscience*. (17): 547-571.

Corona-Vázquez T. (2002). Las enfermedades neurológicas. *Gaceta medica de México*. (6): 533-546.

Crossman, A.R. (1990). A hypothesis on the pathophysiological mechanism that underlines levodopa or dopamine agonist-induced dyskinesia in Parkinson's disease: implication for future strategies in treatment. *Movement disorders*. (5): 100-108.

Coté, L. y Crutcher, M.D. (1991). Motor functions of the basal ganglia and diseases of transmitter metabolism. En: Kandel, E.R. Schwartz, J.H. y Jessel, T.M. (eds). *Principles of neural science*. Elsevier. Tomado de Gutiérrez-Valdez, A.L. (2007). Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis de Maestría en Ciencias biológicas. FES-I. México.

Dauer, W. y Przedboski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanism and models. *Neuron*. (39): 889-909.

Debeir, T., Ginestet, L., Francois, C., Laurens, S., Martel, J.C., Chopin, P., Marien, M., Colpaert, F., Raisman, R. (2005). Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Exp. Neurol*. (193):444-454.

Dobson, W.A., Erikson, M.K., Aschner, M. (2004). Manganese neurotoxicity. *Annals New York Academy Science*. (1012): 115-128.

DeLong, M.R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS*. (13): 281-285.

DeLong, M.R. y Georgopoulos, A.P. (1981). Motor function of the basal ganglia. En: Brookhard J: Manscastle, V.B: Brooks, V.B y Geiger, S.R. (eds). *Handbook of physiology*. American Physiology Society. Tomado de Gutiérrez-Valdez, A.L. (2007). Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis de Maestría en Ciencias biológicas. FES-I. México.

Erikson, M.K., John, E.C., Janes, R.S., Aschner, M. (2005). Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a

functional dopamine transporter.. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. (20): 390-394.

Erikson, M.K., Syversen, T., Stennes, E., Aschner., M. (2004). Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. *J. Nutri. Biochem.* (15): 335-341.

Flint, B.M. (2001). Experimental Models of Parkinson's disease. *Nature reviews*. (23): 252-332.

Freeman, A., Ciliax, B., Bakay, R., Daley, J., Miller, RD., Keating, G., Levey, A., Rye, D. (2001). Nigrostriatal collaterals to thalamus degenerate in parkinsonian animals models. *Ann Neeurol.* (50):321-329.

Fox, C.A., Andrade, A., Schwyn, R and Rafols, S.J.A. (1971). Computer diameters of radical fibers and "com" bundle fibers. *Comp. Neural.* 159: 201-224.

Gauthier, J., Parent, M., Levesque, M., Parent, A. (1999). The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res.* (834): 228-232.

Gavin, C.E., Gunter, K.K., Gunter, T.E. (1990). Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *The biochemical Journal.* (266): 329- 334.

Gomez, C.M., Roldan, R.G., Morales, E.R., Pérez, S.G., Torner, A.C. (2012). Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch. Neurocién. Mexico.* (17): 25-33.

González. T.L., Armendáriz-, B.J. (2005). Aspectos inmunológicos de la enfermedad de Parkinson. *México. Archivos de Neurociencias* (3): 168-169.

Gorell, J.M., Rybicki, B.J., Johnson, C.C. y Peterson, E.L. (1999). Smoking and Parkinson's disease. A dose-response relationship. *Neurology*. (52): 115-119.

Graverland, G., Williams, R.S., DiFigliua, M. (1985). A Golgi study of the human neostriatum neurons and afferents fibers. *J Comp. Neurol*. 234: 317-333.

Graybiel, A.M. (1990). The basal ganglia and the initiation of movement. *Res. Neurol*. 146 (10): 570-574.

Gunter, T. E., Gerstner, B., Gunter, K.K., Malecki, J.G., Glein, R., William, M.V., Aschner, M., Yule, I.D. (2013). Manganese transport via the transferrin mechanism. *NeuroToxicology*. 34: 881-886.

Gunter, T. E., Gerstner, B., Gunter, K. K., Malecki, J., Gelein, R., Valentine, W. M., (2012). Manganese transport via the transferrin mechanism. *Neurotoxicology*: 118–127.

Gunter, T., Miller, L., Gavin, C., Elissev, R., Salter, J., Buntias, L., Alexandrov, A., Hammonds, S., Gunter, K. (2004). Determination of the oxidation states of manganese in brain liver and heart mitochondria. *Journal of Neurochemistry*. 88: 266-280.

Gutiérrez-Valdez, A.L. (2007). Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis de Maestría en Ciencias biológicas. FES-I. Mexico.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (INEGI; 2010). Estadística de los servicios médicos y clasificación de los servicios médicos. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/>

Ingersoll, R.T., Montgomery, Jr. E.B., Aposhian, H.V. (1999). Central nervous system toxicity of manganese. II: Cocaine or reserpine inhibit manganese concentration in the rat brain. *Neurotoxicology*. (20):467-476.

Iqbal, M., Monaghan, T., Redmond, J. (2012). Manganese toxicity with ephedrone abuse manifesting as parkinsonism: a case report. *Journal of medical case reports*. (6): 52-56.

Jackson-Lewis, V., Blesa, J., Przedborski, S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Science Direct. Parkinsonism and Related Disorders*. (1851):183-185.

Just, N., Cudalbu, C., Lei, H., Gruetter, R. (2011). Effect of manganese chloride on the neurochemical profile of the rat hypothalamus. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. (31): 2324-2333.

Klein, A., Sacrey, R.L., Whishaw, I.Q., Dunnett, S.B. (2012). The use of rodent skilled reaching as a translational model for investigating brain damage and disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. (36): 1030-1042.

Kurtis, M. M., Rodriguez, B. C., Martinez, M. P. (2013). Relationship between sleep disorders and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related disorders*.(12): 1152–1155.

Martinez-Finley, E., Gavin, C., Aschner, M., Gunter, T. (2013). Manganese neurotoxicity and the role of the reactive oxygen species. *Radical biology and medicine*. (62):65-75.

Malecki, E.A. (2001). Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Research Bulletin*. (55): 225-228.

Milatovic, D., Milatovic, S.Z., Grupta, C.R., Yu, Y., Aschener, M. (2009). Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. (240): 219-225.

Organización mundial de la salud (OMS; 2007). Parkinson's disease and public health: educational and management implications. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/63572#sthash.xKUQBBAQ.dpuf>

Olanow, C.W., Kordower, H.J. (2009). Modeling Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*. (4): 432-435.

Olanow, C.W. (2004). Manganese induced Parkinsonism and Parkinson's disease. *Annals, N.Y. Academy. Science*. (1012): 209-223.

Ordoñez-Librado, J.L., Anaya-Martínez, V., Gutiérrez-Valdez A.L., Colín-Barenque, L., Montiel-Flores, E., Avila-Costa, M.R. (2010). Manganese inhalation as a Parkinson disease model. *Parkinson's Disease*. (2011): a-612989.

Ordoñez- Librado J. L. (2007). Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de manganeso. Tesis de maestría en Ciencias biológicas. FES-I. México.

Ordoñez-Librado J.L, Gutierrez-Valdez A.L, Colín-Barenque L, Anaya-Martínez V, Díaz-Bech P, Avila-Costa MR. (2008). Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: Immunocytochemical and Behavioral evidences. *Neuroscience*. (155): 7-16.

Ordoñez Librado J.L. (2012). Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de Manganeso: aspectos bioquímicos, morfológicos y conductuales. Tesis de Doctorado. FES-I. México.

Parent, A. y Hazratil, L.N. (1993). Anatomical aspects of information processing in primate basal ganglia. Trends in neuroscience. (3): 111-116.

Prensa, L., Parent, A. (2001). The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. J Neuroscience. (21): 7247-7260.

Ortiz Genaro G., Pacheco, M.M., Macias, M.A., Jimenez, G.F., Miranda, D.A., Flores, L.J., Cruz, J.A., Morales, S.E., Ramirez, R.V., Alatorre, J.M., Bitzer, Q.O. (2011). Toxicidad de plaguicidas y su asociación con la enfermedad de Parkinson. INNN. Archivos de Neurociencias. (1): 33-39

Parent, A. y Hazrati, L.N. (1995). Functional anatomy of the basal ganglia. The cortical-basal ganglia thalamo-cortical loops. Brain Research. Rev. (20): 91-127.

Pastor, P., Tolosa, E. (2001). La enfermedad de Parkinson: diagnóstico y avances en el conocimiento de la etiología y en el tratamiento. Medicina integral. (3): 104-117.

Ponzoni S., Guimares F.S., Del Bel E. A. y García- Cairasco N. (2000). Behavioral effects of intra-nigral microinjections of manganese-chloride: Interaction with nitric oxide. Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry. (24): 307-325.

Purves, Augustine, Fitzpatrick, Hall, LeMantia, Mc Namara y Williams. 2007. Neurociencia. Editorial. Panamericana. México.

Qi, Z., Miller, G.W., Voit, E.O. (2014). Rotenone and paraquat perturb dopamine Metabolism: A computational analysis of pesticide toxicity. *Toxicology*. (315): 92-101.

Quintanar, L., Montiel, T., Márquez, M., González, A., Massieu, L. (2011). Calpain activation is involved in acute manganese neurotoxicity in the rat striatum in vivo. *Experimental Neurology* (233): 182–192.

Racette, A.B., Aschener, M., Guilarte, R.T., Dydak, U.C., Susan, R., Zheng, W. (2011). Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicology. *Neurotoxicology*. (33): 881-886.

Riederer, P., Youdin, B.H. (1987). MPTP induced dopaminergic neurotoxicity—a useful model in the study of parkinson's disease?. *Neurochemistry International*. 11(4): 379-381.

Rodríguez, M. E., Martínez, F., Espinosa, G. M., Maldonado, P., Rivas, A. S. (2013). Mitochondrial dysfunction in the hippocampus of rats caused by chronic oxidative stress. *Neuroscience*. (252): 384-395.

Rodríguez, V.M., Villar, V. A., Valencia, R. C., Cervantes, A. A. (2011). Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Archivos de neurociencias. INNN*. (2): 64-68.

Roels, H.A., Bowler, R.M., Kim, Y., Claus-Henn, B., Mergler, D., Hoet, P., Gocheva, V., Bellinger, D.C., Wriqth, R.O., Harris, M.G., Chang, Y., Bouchard, M.F., Rioja, H., Menezes, J., Tellez, M.M. (2012). Manganese exposure and cognitive deficits: A growing concern for manganese neurotoxicity. *NeuroToxicology*. (33): 872-880.

Sanchez-Betancourt, J., Anaya-Martínez, V., Gutierrez-Valdez, A.L., Ordoñez-Librado, J.L., Montiel-Flores, E., Espinosa-Villanueva, J., Reynoso-Erazo, L., Avila-

Costa, M.R. (2012). Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neurotoxicology*. (33): 1346-1355.

Sai, Y., Wu, Q., Le, W., Ye, F., Li, Y., Dong, Z. (2008). Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. *Toxicology In Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 22: 1461–1468.

Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*. (2): 353-387.

Smith, A.D. y Bolam, J.P. (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *TINS*. 13 (7): 259-265.

Snell, S. Richard. (2001). *Neuroanatomía clínica*. Editorial Panamericana. Quinta edición. España. pp. 303-325.

Takaeda, A., Stogaku, N. y Oku, N. (2002) Manganese influences the levels of neurotransmitters in synapses in rat brain. *Neuroscience* (114): 669-674.

Tieu, Kim. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 1(1): a-009316.

Tovar y Romo, L. (2009). La muerte de las neuronas y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. México. *Archivo del Instituto de Geriátria*. pp. 128-133.

Tuschl, K., Mills, B.P., Clayton, T.P. (2013). Manganese and the brain. *International Review of Neurobiology*. (110): 277-312.

Ungerstedt, U. (1968). 6 Hidroxidopamine induced degeneration of ventral monoaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* (5): 107-110.

Verina, T., Schneider, S.J., Guilarte, R.T. (2013). Manganese exposure induces α -synuclein aggregation in the frontal cortex of non-human primates. *Toxicology letters*. (217): 177-183.

Villar-Valverde, A., Rodriguez, V.M., Cruz, S.K., Cervantes, A.A. (2013). Estado de la investigación sobre la enfermedad de Parkinson en Mexico: De 1988 a 2010. *INNN*. 18 (1): 27-38.

Wichmann, T., Dostrovsky, O.J. (2011). Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience*. (198): 232-244.

Wilson, J.C. (1998). The basal ganglia. En: Gordon, M., Shepard (Ed.). *The synaptic organization of the brain*. Fourth edition. Oxford University Press. New York. pp. 329-375.

Yang, Y., An, J., Wang, Y., Lou, W., Whang, W., Mei, X., Wu, S., Cheng, J. (2011). Intrastratial manganese chloride exposure causes acute locomotor impairment as well as partial activation of substantia nigra GABAergic neurons. *Environmental toxicology and pharmacology*. (31): 171-178.

Zhao, F., Cai, T., Liu, M., Zheng, G., Lou, W., Chen, J. (2009). Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of Manganism. *Toxicological sciences*. 107 (1): 156-164.

Zhang, D., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Kanthasamy, A. (2011). Effects of manganese on tyrosine hydroxylase (TH) activity and TH-phosphorylation in a dopaminergic neural cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*. (254): 65-71.

Zhang, S., Fu, J., Zho, Z. (2004). In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complex activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicology in Vitro*. 18: 71-77.

Zwingmann, C., Leibfritz, D., Hazell, A. (2004). Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1-13C] glucose. *Neurotoxicology*. (25): 573-587.

Anexos

Inmunocitoquímica para tirosina-hidroxilasa (TH)

Los cortes se lavan 3 veces con solución PBS durante 10 minutos cada uno con agitación. Después se sumergen en una mezcla de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 3% y metanol al 10% durante 30 minutos con agitación constante. El siguiente paso es sumergir el tejido en una solución de Borohidrido de sodio al 1% durante 30 minutos. Una vez finalizado el último lavado las muestras se sumergen en una mezcla de buffer PBS con suero normal de cabra al 3% y Tritón 0.3% durante una hora; este punto es muy importante ya que el Tritón provoca la formación de pequeños poros en la membrana celular, esto con la finalidad de que por estos pequeños poros el anticuerpo primario penetre fácilmente al interior de la neurona. Transcurrido ese tiempo el tejido se cambia a una mezcla de solución buffer con suero normal de cabra al 1% y una alícuota (1:1000) de anticuerpo primario anti-TH. Se deja incubar el tejido durante 3 días en refrigeración a 4°C.

Después de la incubación en el anticuerpo primario, se realizan 3 lavados de 10 minutos, cada uno con buffer PBS y 10µl de suero normal de cabra, con agitación constante a baja velocidad. El tejido se incuba por 2 horas a temperatura ambiente con 1% de suero normal de cabra y el anticuerpo secundario (anti-IGg de conejo (1:200)).

Posterior a los lavados se incubaba el tejido en Abidina-Biotina (1:200) por 2 horas a temperatura ambiente.

Las muestras se incuban en DAB (3-3 Diaminobenzidina) al 0.05% y 0.06% de H₂O₂ durante aproximadamente 15 minutos para que el tejido se torne de un color café y así puedan revelarse las neuronas presentes en cada corte (Fig. 20).

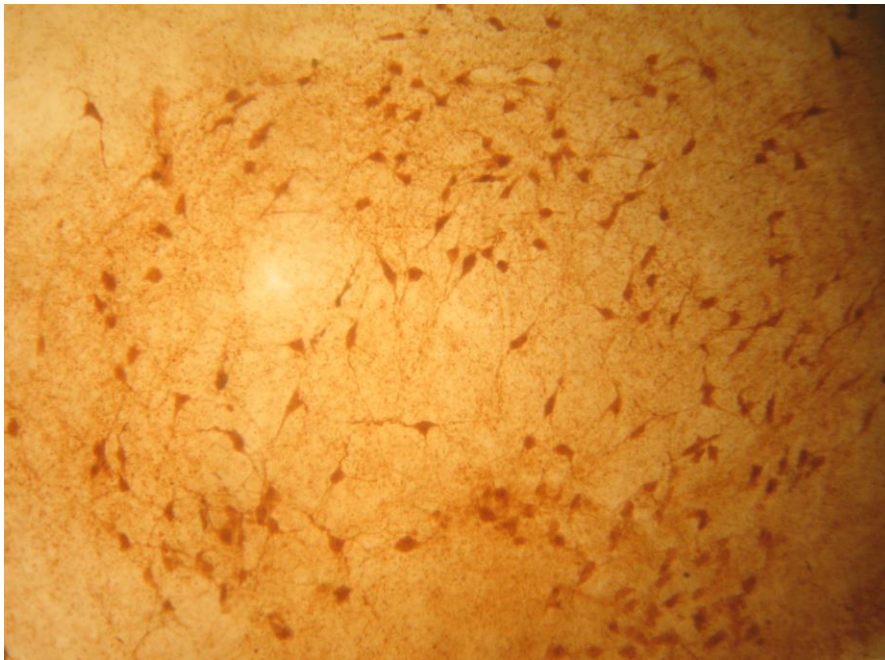


Figura 20. Imagen representativa de las neuronas presentes en la SNc después de realizar la técnica Inmunocitoquímica de TH. 10x.

Por último los cortes de tejido se montan en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejan secar durante un período de 7 días aproximadamente.

Para el montaje de los cubreobjetos se prepara una batería con alcoholes a diferentes concentraciones en orden creciente (70, 96, 100 y Xilol; dos recipientes de cada uno), los portaobjetos con el tejido se sumergen un minuto en cada alcohol y por último se pone resina y se coloca el cubreobjetos.

Inmunocitoquímica para núcleos neuronales (Neu-N)

Para comenzar la técnica el tejido ya se encuentra previamente cortado en rebanadas coronales de 100µm de grosor. El tejido se lava inicialmente 3 veces con buffer PBS; cada lavado es de 10 minutos y siempre con agitación a velocidad baja. Después de los lavados los cortes se sumergen en una mezcla de PBS y Borohidrido de sodio al 1% durante 30 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo se vuelven a realizar los tres lavados con buffer; los cortes se sumergen en H₂O₂ al 0.3% y metanol al 10% durante 30 minutos. El tejido se sumerge en una mezcla de buffer PBS con 3% de suero normal de caballo y 0.3% de Tritón durante una hora con agitación a baja velocidad en la mezcladora. Las muestras se incuban en anticuerpo primario anti-NeuN (1:250) con PBS y 10µl de suero normal de caballo durante 2 días, en el refrigerador a una temperatura de 4°C.

Se realizan tres lavados con buffer y 1% de suero normal de caballo durante 10 minutos con agitación; después los cortes se incuban por 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario (anti-IGg (1:200)) agregando 1ml de PBS y 10µl de suero normal de caballo.

Nuevamente el tejido se incubaba en Abidina-Biotina (1:200) durante una hora dejándolo a temperatura ambiente. Las muestras se incuban en DAB al 0.05% y 0.003% de H₂O₂, dejándolos aproximadamente 15 minutos hasta que se observen

con una tonalidad oscura. Los cortes se montan en portaobjetos previamente gelatinizados y se dejan secar por una semana.

Por último todas las muestras se deshidratan mediante la utilización de un tren de alcoholes en orden creciente (del 70, 96 y 100%) y Xilol sumergiéndolas 1 minuto en cada uno. Para su montaje se les agrega resina a cada uno y se les coloca el cubreobjetos teniendo cuidado de no dejar burbujas sobre cada corte. (Fig. 21)

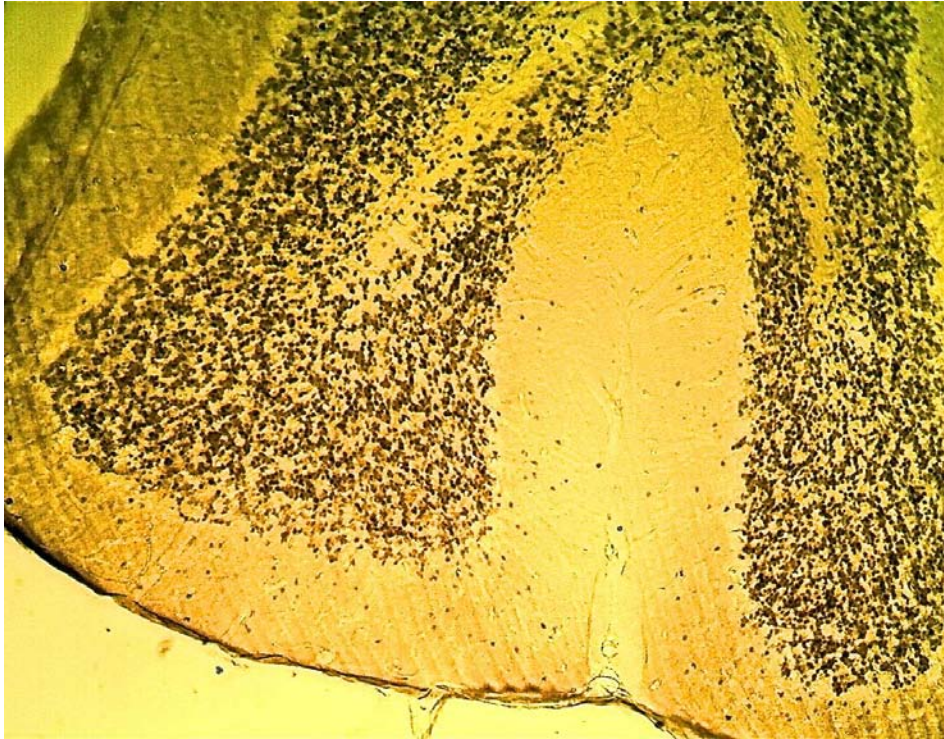


Figura 21. Imagen representativa de las neuronas presentes en el cerebelo de ratón después de haber sido tratadas con la técnica Inmunocitoquímica de Neu-N. 10x.

Buffer PBS

Para preparar el buffer PBS se necesita lo siguiente:

Agua destilada.....150ml

Fosfato monobásico.....0.612 g

Fosfato dibasico.....3.534g

Cloruro de sodio.....0.208g

Una vez que se han pesado todos los reactivos se mezclan perfectamente en un vaso de precipitados hasta tener una consistencia homogénea y que no haya partículas suspendidas.

Paraformaldehído

Se ponen 100ml de agua destilada en un vaso de precipitados y se calienta a 50°C, posteriormente se agregan 4 g de paraformaldehído y se deja disolver lo mejor posible; se agregan 2 o 3 hojuelas de hidróxido de sodio y se deja mezclar hasta que la solución quede transparente.

Posteriormente se deja enfriar hasta que llegue a los 24°C; ya obtenida la temperatura deseada está listo para utilizarse para la fijación de los tejidos. La solución final debe de tener una concentración de 0.1M y un pH de 7.4.

Solución fisiológica de liquido cerebrospinal artificial (KREBS)

La preparación de la solución fisiológica de KREBS es importante manteniendo la viabilidad de las neuronas mientras se realizan los cortes en el vibratomo, ya que esta solución recrea las condiciones que tiene el cerebro en el organismo.

Para su preparación se necesitan 1000ml de agua des ionizada, 0.373g de KCl (0.005M), 0.203g de $MgCl_2$ (0.001M), 2.184g de $NaHCO_3$ (0.026M), 7.358g de NaCl (0.126M), 0.035g de Acido ascórbico (0.0002M) y 1.8g de Glucosa (0.01M); todos estos reactivos se disuelven perfectamente y se pone esta solución en refrigeración.

Posteriormente se le agrega 0.294g de $CaCl_2$ (0.002M) y se mantiene con flujo de carbógeno; este último paso ayuda a la solución a mantenerse con oxigenación adecuada y así mantener vivas las neuronas al momento de cortar el tejido.

Es importante mencionar que de esta solución se extraen 50 ml para preparar la solución de $MnCl_2/(Mn(OAc)_3)$, en la cual se va a incubar el tejido experimental por 1 hora.