



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**MICRO-INYECCIÓN INTRACEREBRAL DE LA
MEZCLA DE $MnCl_2$ Y $Mn(OAc)_3$ COMO MODELO DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

B I Ó L O G A

PRESENTA :

NADIA MICHEL RODRÍGUEZ NIETO



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

**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de
México, 2019.**



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.

DEDICATORIAS

A mi México, espero algún día devolverte todo lo que has hecho por mí.

A la UNAM, mi alma mater.

A Iztacala, no pude tener mejor ni más hermosa casa.

A todos mis maestros, por la pasión por enseñar, por su paciencia y por su honorable labor.

A la ciencia, pese a que no la elegí, supo cómo enamorarme profunda y apasionadamente.

A todos los cucos que hicieron posible este trabajo.

A mi familia y amigos, que me han acompañado en este viaje llamado vida.

*Por mi raza
hablará el espíritu*

“El bienestar público y los intereses de la Humanidad ennoblecen la labor más despreciable y sólo permiten a los hombres cultos darse cuenta del entusiasmo y de la perseverancia que se necesita para vencer los obstáculos”. Antoine Lavoisier

“La vida vive a costa de la vida misma; es cruel, pero es la voluntad de Dios. Y es para nuestro bien, indudablemente”. Anton van Leewenhoek

“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y de las bibliotecas. Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? Y después, a medida que vayáis progresando: ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis tener la íntima satisfacción de pensar en que habéis contribuido de alguna manera al progreso y al bienestar de la Humanidad”. Louis Pasteur

Cada fracaso le enseña al hombre algo que necesitaba aprender. Charles Dickens

“La Astronomía definió nuestro hogar como un pequeño planeta escondido en una esquina de una galaxia entre millones; la Biología nos quitó el estatus de arquetipo creado bajo la imagen de Dios; la Geología nos dio la inmensidad del tiempo y nos enseñó el poco tiempo que nuestra especie ocupó”. Stephen Jay Gould

“Nothing in Biology makes sense except in the light of Evolution”. Theodosius Dobzhansky

“La vida no es sino una continua sucesión de oportunidades para sobrevivir”. Gabriel García Márquez

“Estamos aquí para reírnos del destino y vivir tan bien nuestra vida que la muerte tiemble al recibirnos”. Charles Bukowski

“Es muy fácil vivir haciendo el tonto. De haberlo sabido antes me habría declarado idiota desde mi juventud, y puede que a estas fechas hasta fuera más inteligente. Pero quise tener ingenio demasiado pronto, y heme aquí ahora hecho un imbécil”. Fiódor Dostoievski

AGRADECIMIENTOS

A la Vida, a la Naturaleza, al Universo, a Dios.

A mi mamá, porque gracias a tu fortaleza, tenacidad, sabiduría y valentía, estamos aquí. Mi admiración, respeto, amor y apoyo siempre estarán para ti.

A mi papá, porque me enseñaste a trabajar y por tu apoyo constante, gracias.

A mi lker, Fany y Javs, por su cariño y compañía. Siempre estaré para ustedes.

A mi abue, a mis tías Luli, V y Chilito, por todo su apoyo, consejos, por aceptarme en su casa.

A la señora Lupita, por abrirme las puertas de su casa, por todas las pláticas, recetas y sobre todo por su confianza y cariño.

Al apestoso, por los ánimos, apoyo, regaños, por creer en mí, por todo lo que aprendí de ti y contigo... Por todo y por tanto, gracias.

Al CCH, por bajarme de mi nube, por la ABU y por darme los mejores años de mi vida.

A mis amigos: Ángel, Adán, Beca, Chacho, Clara, mis amigos de CU, Dámian, Dulce, Ed, Estefanía, mis amigos de la fábrica, Mafer y su familia, Marcos, Monse y su familia, Negro, Panda, Pedro, Pity, Rodrigo, mis amigos de Vans... Gracias por su amistad, los buenos momentos, viajes, aventuras, fiestas, risas, consejos, regaños, pláticas, por todo lo que aprendí de ustedes... nunca tendré ni sabré como agradecerles, sólo me queda decir: Para eso estamos.

Al laboratorio de Neuromorfología, a Ana, María Rosa, Enrique, Chucho, Pati, Vero, José Luis y Lichita. No podría pedir un mejor laboratorio ni podría imaginarlo sin alguno de ustedes, gracias por sus enseñanzas, charlas y convivencias.

A Ana, este trabajo se hizo posible gracias a ti, por todo lo que me enseñaste, por tu paciencia, por escucharme, por los ánimos, por estar al pie del cañón junto conmigo. Por todo esto y más, mil gracias.

Quiero agradecer especialmente a mi asesora Dra. María Rosa Avila Costa y a mis sinodales Dra. Norma Laura García Saldívar, Dr. José Luis Ordoñez Librado, M. en C. Enrique Montiel Flores y al Lic. Alfonso Reyes Olivera, por su apoyo constante y observaciones para que este trabajo se hiciera posible y, sobre todo, agradezco sus enseñanzas y conocimientos que compartieron conmigo.

Finalmente, a mí, a las buenas y malas decisiones que he tomado, a todas las experiencias que he tenido y que me han forjado en lo que soy; por no tirar la toalla, por cada vez que me caí y me levanté, por los sueños, metas, aprendizajes, aventuras y éxitos que faltan.

CRISALIDA

Hay momentos en la vida, en que después de la tormenta, debes recoger del suelo tu espíritu lastimado, agotado, medio roto y llevarlo a descansar.

Así que le construyes una crisálida, un lugar donde pueda lamerse las heridas, donde poco a poco pueda recuperarse, armarse, descansar y, sobre todo, aprender de la tormenta, que muchas veces es lo que toma más tiempo.

Alguna vez dije que después de la tormenta no viene la calma, viene la lucha por surgir de los escombros y volver a construir todo lo que quedó en ruinas... y justamente, eso es lo que hacía mi espíritu en su crisálida: reconstruirse.

Y mientras, durante la espera, uno se da la oportunidad de dejarse cuidar por otro, se permite cometer esos “pecadillos” que en otro momento y en otras circunstancias habrían estado prohibidos. Simplemente, uno se vuelve loco de amor y se deja llevar a esos lugares donde no pensó algún día regresar.

Enloquecer no es malo, tampoco dejarse llevar. El problema es perderse y no poder encontrar el camino de regreso a casa. Ese es el verdadero peligro; aunque siempre se encuentra la manera de regresar, nunca será del mismo modo en el que se fue.

Cuando regresas, te das cuenta que la crisálida está pronta a abrir, el espíritu está recuperado, ha aprendido y aceptado sus cicatrices con orgullo, ahora es más sabio, no te reprochará haberte vuelto un poco loco y apreciará lo aprendido en su ausencia.

Ya viene el momento del reencuentro, es emocionante, estoy ansiosa. No sé qué vendrá después. Pero sin lugar a dudas, iré completa y decidida a entrar a ese nuevo huracán que avecina mi vida.

RODNIE

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
1.1 Enfermedad de Parkinson	3
1.2 Ganglios basales.....	4
1.3 Etiología de la EP	6
1.3.1 Factores ambientales.....	6
1.3.2 Factores genéticos.....	6
1.3.2 Estrés oxidativo.....	7
1.3.3 Excitotoxicidad.....	7
1.4 Modelos de la EP	8
1.4.1 Rotenona.....	8
1.4.2 Paraquat.....	9
1.4.3 MPTP.....	10
1.4.4 6 hidroxidopamina (6-OHDA).....	10
1.4.5 Modelo de inhalación con manganeso.....	11
1.5.1 Manganeso (Mn)	12
1.5.2 Manganismo.....	14
1.5.3 Absorción del Manganeso.....	14
1.5.4 Mn y daño celular.....	15
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODO	18
Prueba de la viga de equilibrio.....	18
Prueba de “reaching task” para evaluar lesión bilateral.....	19
Prueba de la escalera para evaluar lesión unilateral.....	20
Cirugía esterotáxica.....	21
Perfusión e inmunohistoquímica positiva a TH	23
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	40
PERSPECTIVAS DEL MODELO	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central, caracterizada por pérdida de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta, decremento en la concentración de dopamina en el núcleo estriado y presencia de inclusiones proteicas intracitoplásmicas llamadas cuerpos de Lewy. Los procesos bioquímicos relacionados con la EP, pueden ser reproducidos selectivamente por fármacos como reserpina, plaguicidas como rotenona y paraquat, toxinas como 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y MPTP y metales como el manganeso; por lo cual se han empleado para modelar esta condición patológica, con la finalidad del estudio propio de la enfermedad o el desarrollo de técnicas y moléculas que coadyuven a la terapéutica de ésta.

En este trabajo se propone la microinyección unilateral y/o bilateral de la mezcla de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) y acetato de manganeso ($Mn(OAc)_3$) en el haz medial del cerebro anterior como un nuevo modelo de la EP.

Para ello se utilizaron ratas macho Wistar de 180 a 200 g $n= 46$ ratas, las cuales fueron divididas en cuatro grupos (control unilateral, control bilateral, lesión unilateral y lesión bilateral) y entrenadas durante siete días previos a la lesión en la prueba de la viga (todos los grupos), prueba de escalera (lesión unilateral) y "reaching task" (lesión bilateral); posterior a la evaluación control las ratas fueron lesionadas con la microinyección en el haz medial del cerebro anterior (unilateral o bilateralmente) con la mezcla de $Mn(OAc)_3$ a 0.02 M y $MnCl_2$ a 0.04 M. Dos semanas después de la lesión todas las ratas fueron evaluadas semanalmente en las pruebas motoras y en el caso de las ratas con lesión unilateral se realizó la prueba de giro inducido con apomorfina. A los dos meses de la lesión todas las ratas fueron sacrificadas por perfusión intracardiaca, se extrajeron los cerebros y éstos fueron procesados con la técnica inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH).

De acuerdo a nuestros resultados no se pudo evaluar el grado de depleción dopaminérgica con la conducta de giro inducido con apomorfina, debido a que la pérdida neuronal no fue suficientemente extensa. Las ratas con lesión bilateral presentaron incremento considerable en el tiempo total del recorrido en la prueba de la viga. Además, presentaron disminución progresiva en el número de aciertos obtenidos en la prueba de "reaching task". Las ratas con lesión unilateral no presentaron diferencias significativas en el tiempo de recorrido en la prueba de la viga respecto al grupo control; sin embargo, mostraron alteraciones en la conducta motora evidenciadas por la disminución estadísticamente significativa en el número de pellets comidos en comparación con el grupo control en la prueba de escalera. En el grupo con lesión unilateral se encontró pérdida de NDA en el lado ipsilateral de 68.7% y de 42.01% en el lado contralateral. Mientras que en el grupo con lesión bilateral se encontró pérdida de NDA en el hemisferio izquierdo de 63.99% y de 58.3% en el hemisferio derecho. Ambos grupos lesionados, presentaron diferencias significativas respecto al grupo control.

Nuestros datos indican que la lesión bilateral representa la EP de poco tiempo de evolución, con alteraciones motoras significativas. Con este modelo se podría probar cualquier tratamiento para los estadios iniciales de la enfermedad.

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ANOVA	Análisis de varianza
BI	Bilateral
CB	Control bilateral
CE	Cuerpo estriado
Cu	Cobre
CU	Control unilateral
D	Derecha
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DMT 1	Transportador de metales divalentes tipo 1
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GP	Globo pálido
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GSH	Glutación
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
I	Izquierda
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ip	Intraperitoneal
LB	Lesión bilateral
LU	Lesión unilateral
MAO-B	Monoamino oxidasa B
MDA	Malondialdehído
MFB	Haz medial del cerebro anterior
MMT	Metil-cliclopentadineil manganeso tricarbonilo
Mn	Manganeso
Mn(OAc) ₃	Acetato de manganeso
MnCl ₂	Cloruro de Manganeso
MPTP	1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
NDA	Neuronas dopaminérgicas
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NST	Núcleo subtalámico
O ₂ ⁻	Superóxido
OH•	Hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PB	Buffer de fosfatos
PPN	Núcleo pedúnculo pontino
PQ	Paraquat
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SN	Sustancia nigra
SNc	Sustancia nigra compacta
SNr	Sustancia nigra reticulada
SOD-Mn	Superóxido dismutasa de manganeso
SPCA1	Ca-ATPasa 1
TH	Tirosina hidroxilasa
UNI	Unilateral

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Parkinson

La EP es una enfermedad degenerativa del sistema nervioso central. Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida del 50 al 70% de las neuronas dopaminérgicas (NDA) en la sustancia nigra compacta (SNc), reducción en los niveles de dopamina (DA) en el cuerpo estriado (CE) y la presencia de inclusiones intracitoplásmicas llamadas cuerpos de Lewy, que se componen principalmente de α -sinucleína y ubiquitina (Blesa et al., 2012).

La EP es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes en el adulto mayor, siendo la segunda más frecuente después del Alzheimer (Secretaría de salud, 2010). En la actualidad, México no cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia o incidencia de la enfermedad; sin embargo, se estima de forma mundial que se presenta entre el 1 y 2% de la población mayor a 60 años de edad (Rodríguez-Violante et al., 2011) y se ha calculado que la duración media de la enfermedad es de 10 a 13 años (Secretaría de salud, 2010). De acuerdo al conteo de población y vivienda realizado en 2005; por parte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) el 8.1% de la población en México se encontraba en este grupo de edad, lo cual implicaría una prevalencia aproximada de 83,000 y 166,600 personas con EP en México (Rodríguez-Violante et al., 2011). Mientras que para el año 2015 el porcentaje incrementó a 10.5% (INEGI Encuesta Intercensal, 2015). Se calcula que para el año 2030 esta cifra será duplicada por lo que conlleva a un problema de salud pública. (Secretaría de salud, 2010)

Además, se ha reportado alta prevalencia de casos en países industrializados, entre sujetos que trabajan o han trabajado en cultivo de vegetales donde se emplean pesticidas (por ejemplo, paraquat y rotenona) e industrias metalúrgicas. Estudios de cohorte retrospectivos han correlacionado la exposición a pesticidas con un 8.1% de probabilidad de presentar la EP, mientras que la exposición al plomo y al cobre confiere un 3.9% de probabilidad (Hurtado et al., 2016).

Los primeros síntomas de la EP son evidentes posteriores a la depleción dopaminérgica de aproximadamente el 80% (Tanner, 1989; Shoulson et al., 2002). Esto sugiere gran neurodegeneración antes de que los primeros síntomas de la enfermedad se hagan presentes. Por lo general esta neurodegeneración inicia varios años antes de ser sintomática siendo entonces muy difícil discriminar con exactitud las causas (Hurtado et al., 2016).

Los signos cardinales de la EP son acinesia (ausencia sustancial de movimientos), temblor en reposo, rigidez, aumento de la tensión muscular y resistencia al movimiento, incapacidad para iniciar movimientos e inestabilidad de la postura por pérdida del equilibrio, que lleva a frecuentes caídas y algunos otros síntomas que incluyen disartria (dificultad para articular sonidos y palabras) y bradicinesia (disminución en la velocidad de los movimientos) (Hurtado et al., 2016)

Se pueden observar otros síntomas como la micrografía y dificultad para realizar tareas finas. Estos síntomas inician de forma asimétrica y gradualmente se va afectando el lado contrario. El síntoma inicial más frecuente es el temblor en reposo con frecuencia de 4 a 6 ciclos por segundo y aunque es el síntoma más visible no es el más incapacitante (Secretaría de salud, 2010).

Por otra parte, diversos reportes señalan que en algunos casos la pérdida dopaminérgica se acompaña de deficiencias colinérgicas y de otros neurotransmisores que implican la expresión de otros síntomas no motores, principalmente en estadios avanzados afectándose funciones ejecutivas, habilidades visoespaciales, memoria, lenguaje e inclusive pueden llegar a presentarse cuadros demenciales (Castañeda-Achutigui et al., 2015). Los síntomas no motores son frecuentes en el 90% de los casos y en particular la hiposmia (reducción en la capacidad de percibir olores), trastornos del sueño, trastornos neuropsiquiátricos y síntomas gastrointestinales disautonómicos que pueden preceder a las manifestaciones motoras. El resto de los síntomas no motores de la EP correlacionan con la edad y severidad de la enfermedad (Rodríguez-Violante et al., 2011; Blesa et al., 2012).

1.2 Ganglios basales

Los ganglios basales (GB) constan de cuatro núcleos, los cuales desempeñan una función importante en el movimiento voluntario. Sin embargo, al contrario de la mayoría de los demás componentes del sistema motor, no tienen conexiones directas de entrada o de salida con la médula espinal. Estos núcleos reciben información de la corteza cerebral y envían señales al tronco encefálico y, a través del tálamo, de nuevo a las cortezas prefrontal, pre-motora y motora. Las funciones motoras de los GB por lo tanto están reguladas, en gran parte, por áreas motoras de la corteza frontal. Los trastornos en los GB pueden provocar reducción de los movimientos (como en la EP) o movimientos excesivos (como en la enfermedad de Huntington). Además de las alteraciones del movimiento, se han asociado con trastornos neuropsiquiátricos cognitivos y del comportamiento, que reflejan relaciones funcionales más amplias de estos núcleos en relación con las funciones de los lóbulos frontales (Kandel, 2001).

Los cuatro núcleos principales de los GB son: Cuerpo estriado (CE), el cual tiene tres importantes subdivisiones: Núcleo caudado, Putamen y Estriado ventral (el cual incluye al Núcleo accumbens), Globo pálido (GP) que es una estructura compuesta por dos segmentos: el segmento interno (GPi) y el externo (GPe), Sustancia nigra (SN) la cual consta de una parte reticulada (SNr) y una parte compacta (SNc) y el Núcleo subtalámico (NST) (Kandel, 2001).

En los primates, el CE está dividido en núcleo caudado y putamen por la *cápsula interna*, un importante conjunto de fibras que conectan funcionalmente la neocorteza y el tálamo en ambas direcciones. El CE recibe aferencias procedentes de la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico. Sus neuronas envían prolongaciones al GP y la SN. Aunque el CE contiene varios tipos diferentes de células, del 90% al 95% de ellas son neuronas GABAérgicas de proyección, llamadas neuronas espinosas medianas (Kandel, 2001).

El GP se encuentra fuera de la cápsula interna, como se mencionó, se divide en un segmento externo (GPe) y otro interno (GPi), mientras que en mamíferos inferiores se presentan el GP y el núcleo entopeduncular (De Long y Georgopoulos, 1981). El GPi está relacionado funcionalmente con la SNr, la cual se encuentra en el mesencéfalo, en el lado interno de la cápsula interna. Las células del GPi y la SNr sintetizan ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor (Kandel, 2001).

La SNc está en el mesencéfalo, junto a la SNr, sus neuronas son dopaminérgicas, sólo en el caso de los primates contienen neuromelanina, un pigmento oscuro derivado de la DA oxidada y polimerizada, este pigmento brinda el color característico de esta estructura, aunque se desconoce si el pigmento tiene alguna función (Coté y Crutcher, 1991). También se encuentran células dopaminérgicas en el área ventral tegmental, la cual es una extensión interna de la SNc (Kandel, 2001).

El GPi y la SNr, cuyos cuerpos celulares son morfológicamente similares, forman las principales prolongaciones de salida de los GB (Kandel, 2001).

El NST está conectado anatómicamente con ambos segmentos del GP y la SN. Se encuentra por debajo del tálamo y por encima de la parte anterior de la SN. Las células glutamatérgicas de este núcleo son las únicas con prolongaciones excitadoras de los GB (Kandel, 2001).

1.3 Etiología de la EP

La etiología aún no ha sido dilucidada, en más del 90% de los casos se ha establecido como esporádica o idiopática (Secretaría de salud, 2010; Hurtado et al., 2016; Rodríguez-Violante et al., 2011). Algunos factores genéticos y ambientales han sido relacionados con la etiología de la enfermedad (Hurtado et al., 2016).

1.3.1 Factores ambientales. Estudios epidemiológicos han indicado que hay varios factores que pueden aumentar el riesgo de desarrollar EP. Estos incluyen la exposición al agua de pozo, pesticidas, herbicidas, químicos industriales, fábricas de pasta de madera, agricultura y vivir en un entorno rural. Varias toxinas exógenas se han asociado con el desarrollo del parkinsonismo, incluidos los metales traza, cianuro, diluyente de lacas, disolventes orgánicos, monóxido de carbono y disulfuro de carbono. Así mismo ha ido en aumento los reportes del posible papel de las toxinas endógenas, tales como tetrahydroisoquinolinas y β -carbolinas (Olanow y Tatton, 1999).

Los reportes indican que la exposición a factores ambientales desempeña un papel importante en la etiología de la EP. Específicamente, estudios epidemiológicos han demostrado que rotenona, paraquat y organoclorados se han vinculado con la EP (Chhillar et al., 2013; Weisskopf et al., 2010; Firestone et al., 2005; Nandipati y Litvan, 2016). Dichos estudios sugieren, que el dedicarse a la actividad agrícola por largo tiempo se puede asociar con el desarrollo de la EP en los agricultores. Sin embargo, es necesario entender que la exposición prolongada a un determinado agente es peligrosa, porque la mayoría de los datos que se tienen están limitados a exposiciones altas y sustanciales y no a tasas de exposición más bajas; además, de si los efectos de los tóxicos pueden ser o no sinérgicos (Nandipati y Litvan, 2016;).

1.3.2 Factores genéticos. Se han localizado algunos genes relacionados con la enfermedad, hasta la fecha se han identificado 13 loci (Rodríguez-Violante et al., 2011). Cabe mencionar que después del criterio de edad, la historia familiar permanece como el riesgo mayor para desarrollar EP. Se ha descrito que más del 15% de los pacientes con EP tienen historia familiar positiva (Secretaría de salud, 2010). Esto sugiere que los factores genéticos son importantes en pacientes con inicio temprano de la enfermedad, pero no es probable que desempeñen un papel importante en pacientes con EP esporádica (Olanow y Tatton, 1999).

Algunos estudios han determinado polimorfismos. en los genes que codifican CYP2D6, MAO-A y MAO-B. Sin embargo, estos marcadores genéticos representan sólo un pequeño número de casos de EP, ya que las frecuencias alélicas son relativamente poco comunes. Recientemente, se han demostrado las correlaciones

entre la EP y la presencia de un fenotipo acetilador lento; esta asociación fue más evidente en pacientes con EP familiar en comparación con pacientes con EP esporádica, lo que sugiere mayor carga génica (Olanow y Tatton, 1999).

Lo anterior indica que los factores ambientales o genéticos pueden causar EP. Sin embargo, es poco probable que en la mayoría de los casos la EP sea explicada por una sola causa. Este concepto ha dado lugar a la "hipótesis de doble acierto", que sostiene que la EP puede resultar de la interacción entre múltiples mutaciones genéticas y/o la combinación de un gen mutante y una o varias toxinas ambientales (Olanow y Tatton, 1999).

1.3.2 Estrés oxidativo. El estrés oxidativo ha recibido la mayor atención en la EP, debido al metabolismo oxidativo de la DA para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otras especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Halliwell y Gutteridge, 1985; Olanow, 1990; 1993). El estrés oxidativo y la consiguiente muerte celular podrían desarrollarse en la SNc en circunstancias en las que se produce aumento en el recambio de DA, lo que resulta en la formación excesiva de H_2O_2 ; además de la baja concentración de enzimas antioxidantes como glutatión (GSH), lo que disminuye la capacidad del cerebro para eliminar el H_2O_2 ; y el aumento en el hierro reactivo, puede promover la formación de radicales hidroxilos ($OH\bullet$). De hecho, estudios *postmortem* en cerebros de pacientes con EP muestran aumento de hierro, disminución de GSH y daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, lo que sugiere que la SNc se puede encontrar en un estado de estrés oxidativo (Jenner y Olanow, 1996).

Hay evidencia de daño oxidativo en los cerebros de los pacientes con EP. Se han encontrado altos niveles de productos de la peroxidación de lípidos como malondialdehído (MDA) e hidropéroxido de lípidos en la SNc (Dexter et al., 1994).

Además, se ha encontrado incremento de grupos carbonilo en las proteínas y 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, reflejan el daño oxidativo a las proteínas y al ADN, respectivamente, en la SNc, así como en otras regiones cerebrales de pacientes con EP (Alam et al., 1997). Estos resultados sugieren que el daño oxidativo se generaliza en la EP. Sin embargo, aún queda por determinar si el daño oxidativo que se produce en la EP es un evento primario o si se produce de forma secundaria a una etiología alternativa, el uso de medicamentos o a eventos *postmortem* (Olanow y Tatton, 1999).

1.3.3 Excitotoxicidad. Es una posible causa de neurodegeneración que se ha visto implicada en la EP basándose en dos posibles mecanismos. El primero resulta de la liberación descontrolada de glutamato; las NDA de la SNc son ricas en receptores a glutamato, ya que reciben extensas inervaciones de la corteza y el NST, además,

fisiológicamente presentan un patrón de disparo en ráfaga en respuesta al glutamato administrado de forma exógena (Rothstein et al 1994). La lesión de la SNc conlleva a la disminución en el nivel de DA en el CE, lo que provoca la desinhibición del NST aumentando la velocidad de disparo de las neuronas excitadoras. Se puede postular que a medida que las fibras del NST aumentan su actividad glutamatérgica sobre la SNc lesionada, hay disminución progresiva en la concentración de DA estriatal, lo cual hace que la depleción de DA promueva daño excitotóxico adicional (Rodríguez et al., 1998).

Beal en 1992 sugirió que disminución en el metabolismo energético, provocado por alteraciones en la función mitocondrial da como resultado pérdida del bloqueo de magnesio dependiente de ATP en los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), así como incremento en la concentración y permeabilidad del calcio hacia la célula (Olanow y Tatton, 1999).

Se ha reportado que el daño excitotóxico está regulado, a través del óxido nítrico (NO), ya que éste se forma por la conversión de arginina en citrulina en una reacción catalizada por la óxido-nítrico sintasa (NOS, por sus siglas en inglés). El aumento en el calcio citosólico regulado por el glutamato da como resultado la activación de NOS con mayor producción de NO. El NO reacciona con el radical superóxido (O_2^-) para formar el peroxinitrito ($ONOO^-$) y radicales OH^\bullet , ambos agentes pro-oxidantes. El NO también podría contribuir a la degeneración celular al desplazar el hierro de los sitios de unión a la ferritina, de modo que pueda participar en la reacción de Fenton, y por inhibición del complejo IV mitocondrial, convierte un defecto reversible del complejo I en un defecto irreversible de la cadena respiratoria (Olanow y Tatton, 1999).

1.4 Modelos de la EP

Se ha demostrado que la EP está relacionada con estrés oxidativo comúnmente a consecuencia de daño o alteraciones mitocondriales, procesos neuroinflamatorios, excitotoxicidad, alteración del citoesqueleto neuronal y disfunción proteosomal que conllevan a la muerte celular. Estos procesos bioquímicos pueden ser reproducidos selectivamente por algunos plaguicidas como rotenona y paraquat, toxinas como 6-hidroxdopamina (6-OHDA) y MPTP y metales como el manganeso; motivo por el que se han empleado para reproducir rasgos de la EP, con la finalidad del estudio propio de la enfermedad o el desarrollo de técnicas y moléculas que coadyuven a la terapéutica de ésta (Castañeda-Achutiguí et al., 2015).

1.4.1 Rotenona. Es un isoflavonoide de origen vegetal derivado de raíces de plantas tropicales de los géneros *Derris* y *Lonchocarpus*. Se utiliza como plaguicida e

insecticida natural, también se ha empleado para controlar poblaciones de peces en lagos y reservas naturales (Alarcón et al., 2010). Presenta alta liposolubilidad por lo que se facilita su transporte a través de barreras biológicas y membranas celulares (Castañeda-Achutiguí et al., 2015). La rotenona es ampliamente conocida como inhibidor del complejo I mitocondrial, además, la acumulación de daño por estrés oxidativo conduce a la apoptosis dependiente de la caspasa 3 en las NDA (Alarcón et al., 2010).

Dentro de las características que comparte con la EP se encuentra la acumulación y agregados endógenos de α -sinucleína, α -sinucleína poliubiquitinizada, cuerpos y neuritas de Lewy, activación de microglía temprana y sostenida, modificación oxidativa y translocación de la proteína DJ-1 (la cual se localiza en el citoplasma, se asocia con la mitocondria y el núcleo tras la oxidación, se ha demostrado que participa en la protección frente al estrés oxidativo), acumulación de hierro en la SNc a través del transportador transferrina y su receptor 2, déficit en las funciones gastrointestinales ocasionados por desórdenes de la α -sinucleína en neuronas entéricas, cuya acumulación en el duodeno e íleon ocasionan gastroparesis característica de la enfermedad. Se ha reportado que la administración sistémica de rotenona puede presentar además otras afecciones características de la EP, como alteraciones en la retina, pérdida de testosterona y algunos trastornos del sueño. El modelo se ha podido reproducir exitosamente en murinos, insectos (*Drosophila*) y nematodos (*Caenorhabditis elegans*), aunque aún se discute si la rotenona presenta o no, toxicidad selectiva de las NDA (Castañeda-Achutiguí et al., 2015).

Es importante señalar que la tasa de mortalidad es muy alta, ya que la rotenona es altamente tóxica para varios órganos como el corazón, hígado, riñones y el tracto intestinal. También se ha descrito que la rotenona no sólo afecta a las neuronas dopaminérgicas de la SNc, sino que también induce la muerte celular de neuronas de otros núcleos dentro de los GB (Blandini y Armenteno, 2012).

1.4.2 Paraquat. (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un compuesto cuaternario de amonio utilizado ampliamente como herbicida. Actualmente, sigue siendo uno de los herbicidas más utilizados, a pesar de que los reportes lo relacionan con la EP (Alarcón et al., 2010). El paraquat (PQ) produce cambios subcelulares ligados a la EP disminuye la actividad del complejo I mitocondrial y por consecuencia aumento en la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés), agregados de α -sinucleína que forman los cuerpos de Lewy y muerte de las NDA de la SNc; lo que ocasiona el cuadro clínico característico de la EP (Castañeda-Achutiguí et

al., 2015). Se ha propuesto que el PQ en su estado de catión divalente (Paraquat++) participa en la vía redox en la microglía a través de diaforasas como la NADPH oxidasa y NOS, lo que da como resultado un catión monovalente (paraquat+) acompañado de la producción de superóxido que conlleva a estrés oxidativo y por ende puede causar citotoxicidad (Castañeda-Achutiguí et al., 2015). Sin embargo, el vínculo molecular entre el estrés oxidativo y la muerte celular en este modelo aún se desconoce. Por lo tanto, la importancia del PQ en la investigación de la EP a menudo se limita al estudio del proceso de formación de los cuerpos de Lewy en las neuronas DA, así como al papel de la α -sinucleína (Blesa et al., 2012).

1.4.3 MPTP. (1-metil-4fenil,6-tetrahidropiridina) es un compuesto altamente liposoluble que atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y es oxidado en las células de la glía, principalmente en los astrocitos. La enzima responsable de este proceso es la monoamino-oxidasa-B (MAO-B), la cual convierte el MPTP en MPDP+, que a su vez se transforma en MPP+ por oxidación no enzimática. El MPP+ sale de los astrocitos y es selectivamente incorporado por las NDA a través del transportador de dopamina (DAT), inhibe el complejo I mitocondrial. Una de las limitantes iniciales de este compuesto es que no se observan los característicos cuerpos de Lewy, aunque recientemente se ha visto que la administración continua de dosis bajas de MPTP durante largos periodos sí logra producir dichas marcas histopatológicas. (Alarcón et al., 2010).

Además, se han observado diferencias individuales en respuesta a dosis similares de MPTP, lo que limita la comparación entre diferentes estudios, se han establecido diferencias en la susceptibilidad a la neurotoxina entre especies, ya que el ratón es más susceptible que la rata, los animales con lesión de leve a moderada muestran recuperación espontánea, que es inconsistente con las características progresivas de la EP (Morrow et al., 2012).

1.4.4 6 hidroxidopamina (6-OHDA). Es la neurotoxina más utilizada en el desarrollo de modelos experimentales de la EP en roedores. La inyección intracerebral produce destrucción selectiva de las NDA (Ungerstedt, 1968), su especificidad se debe a la alta afinidad por el sistema de transporte de catecolaminas. Diversos estudios han demostrado que la 6-OHDA posee acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial, su efecto neurotóxico está ligado fundamentalmente a la formación de H_2O_2 , $OH\cdot$ y la producción de quinonas en su eliminación. Las alteraciones neuroquímicas producidas por la 6-OHDA en el CE se caracterizan por el descenso en los niveles de DA, serotonina, encefalina y sustancia P (Alarcón-Aguilar et al., 2010).

Después de la lesión unilateral en el haz medial del cerebro anterior (MFB, por sus siglas en inglés) o bien en la SNc con la 6-OHDA, las ratas comienzan a girar hacia el lado lesionado después de la administración de medicamentos que aumentan la actividad dopaminérgica del sistema nigrostriatal. Incluso con la administración unilateral directa de DA en el CE las ratas muestran asimetrías motoras (Ungerstedt y Arbuthnott, 1970).

La administración de apomorfina (agonista dopaminérgico), estimula los receptores de DA e induce giro en la dirección opuesta a la lesión en comparación con la anfetamina. Por lo tanto, el estriado denervado es más sensible a la apomorfina que el innervado, lo que se interpreta como una supersensibilidad post-sináptica, debido a la sobreexpresión de receptores a DA, que se produce como resultado de la denervación nigroestriatal (Ungerstedt, 1971a; 1971b).

De acuerdo a esto, si a un animal con depleción unilateral de DA se le administra apomorfina y se registran 200 giros o más durante 30 minutos, se puede afirmar que la denervación de DA estriatal es de un 95% o más (Gutiérrez-Valdez, 2007).

A pesar de que es uno de los modelos más utilizados, la 6-OHDA no reproduce varias características neuropatológicas de la EP, esta toxina no induce la agregación de inclusiones eosinófilas que contienen proteínas ubiquitinizadas como la α -sinucleína (Dauer y Przedborski, 2003), por lo que no es un modelo apropiado para explorar algunos de los mecanismos moleculares asociados a la degeneración de las NDA. Además, no muestra alteraciones progresivas ya que se considera un modelo agudo. La administración bilateral de 6-OHDA en el MFB aumenta la tasa de mortalidad debido a que los animales presentan afagia y adipsia (Armentero et al., 2006), por lo que frecuentemente sólo es administrada de forma unilateral.

1.4.5 Modelo de inhalación con manganeso. En nuestro laboratorio se desarrolló el modelo de inhalación de la mezcla de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) y acetato de manganeso ($Mn(OAc)_3$) en roedores. El modelo es bilateral y progresivo (5 meses de inhalación para ratones y 6 meses de inhalación para ratas). Los animales expuestos presentaron pérdida del 67.58% de las NDA en la SNc en ratones (Ordoñez-Librado et al., 2008) y del 75.95% en ratas (Sánchez-Betancourt et al., 2012), además, no se encontró pérdida celular en el globo pálido y en el CE (Ordoñez-Librado et al., 2008; Sánchez-Betancourt et al., 2012).

Los animales presentaron alteraciones en la coordinación motora y mejoría significativa tras la administración de L-DOPA, lo que afirma que las alteraciones son de origen dopaminérgico (Ordoñez-Librado et al., 2010). Ultraestructuralmente,

presentaron alteraciones del neuropilo, disminución de los contactos sinápticos axoespinosos, aumento en las sinapsis perforadas en el CE, alteraciones nucleares, necrosis y apoptosis en la SNc y en menor medida en el estriado (Ordoñez-Librado, 2012). Finalmente, se encontró disminución significativa en los niveles de DA y sus metabolitos en la SNc, el CE y el globo pálido tras la inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. Dichas alteraciones son similares a lo reportado en pacientes parkinsónicos. De esta manera, la inhalación de la mezcla de compuestos de manganeso es un modelo adecuado para el estudio de la EP, sensible, reproducible, económico y de fácil aplicación (Ordoñez-Librado et al., 2008; Sánchez-Betancourt et al., 2012).

Desafortunadamente, en algunos casos no es viable para el investigador esperar hasta 6 meses para obtener los resultados sobre el trabajo que esté realizando, además, los animales utilizados envejecen, lo cual puede entorpecer su habilidad para realizar las evaluaciones que el investigador haya elegido, de esta forma los resultados obtenidos no serían 100% confiables ya que las deficiencias motoras por el envejecimiento podrían confundirse con las ocasionadas por el modelo.

1.5.1 Manganeso (Mn)

Es un metal pesado paramagnético que se distribuye ampliamente en el ambiente, está presente en el aire, el agua y los alimentos. Es el doceavo elemento más común en la corteza terrestre y el cuarto metal más usado en el mundo. Más de 8 millones de toneladas de Mn son extraídas anualmente, y más del 90% es utilizado en la manufactura de acero para aumentar su dureza, también se utiliza para la manufactura de baterías, purificación del agua, como agente bactericida y fungicida (Olanow, 2004), como oxidante en la producción de hidroquinonas, en la manufactura de vidrio y cerámica, fósforos y pirotecnia, blanqueamiento textil, como agente oxidante en el recubrimiento de electrodos en varillas para soldadura, curtido de cuero y decolorante de vidrio (Kwakye et al., 2015).

La exposición a Mn en la población puede ocurrir por el consumo de agua de pozo que contiene niveles altos del metal, por fórmulas infantiles a base de soya y posiblemente de Mn liberado a la atmósfera como resultado de la adición a la gasolina de metilciclopentadienil manganeso tricarbonilo (MMT) como agente “*anti-knock*” (Aschner et al., 2009). La exposición a Mn es la principal causa de intoxicación humana en individuos que trabajan en industrias tales como la minería y la fabricación de baterías secas, acero, aluminio, metales de soldadura y fungicidas organoquímicos (Aschner et al., 2009; Racette et al., 2017).

El Mn es un nutriente traza, se puede encontrar en todos los tejidos y se requiere para el metabolismo normal de aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos. Las familias de enzimas Mn-dependientes incluyen a la arginasa, glutamino sintasa, fosfoenolpiruvato descarboxilasa y SOD-Mn. Se ha relacionado con la función de diversos sistemas orgánicos, como la función inmune normal, regulación de azúcar en sangre y energía celular, reproducción, digestión, crecimiento óseo y como auxiliar en los mecanismos de defensa contra los radicales libres. Además, el Mn junto con la vitamina K ayuda en la coagulación de la sangre (Kwakye et al., 2015; Aschner et al., 2005; 2009).

El Mn presenta 11 estados de oxidación diferentes. Los estados de oxidación con importancia ambiental son el Mn^{2+} , Mn^{4+} y Mn^{7+} . En tejido vivo el Mn se puede encontrar como Mn^{2+} o Mn^{3+} y posiblemente como Mn^{4+} ; el Mn^{5+} , Mn^{6+} , Mn^{7+} y otros complejos de Mn con un alto estado de oxidación, generalmente sólo se reconocen en materiales inorgánicos (Mahalakshmi et al., 2014).

El Mn, se ha relacionado con la formación acelerada de ROS a los estados divalentes y trivalentes del metal (De Rycker y Halliwell, 1978; Soliman et al., 1995). Sin embargo, otros reportes han mostrado que el ion de Mn divalente (Mn^{2+}) elimina las ROS, las especies reactivas de superóxido y $OH\cdot$ cuando la actividad de la SOD-Mn está inhibida; inclusive disminuye la toxicidad del oxígeno en el *Lactobacillus planetarium* y en bacterias con deficiencia de la enzima SOD-Mn (HaMai et al., 2001; Archibald y Fridovich, 1982).

Así mismo se ha reportado que concentraciones muy bajas de ion Fe^{3+} atenúan el potencial oxidativo de Mn^{2+} , mientras que cantidades pequeñas de Mn^{3+} promueven la capacidad del Mn^{2+} para generar ROS (HaMai et al., 2001).

El Mn puede inducir reacciones no deseadas para generar radicales libres, sin embargo, la dinámica redox entre sus estados de valencia difiere de la de otros metales pro oxidantes. Es necesario resaltar, que la presencia de un ion metálico trivalente en cantidades traza, es necesaria para la actividad pro-oxidante asociada con el exceso de Mn^{2+} . El efecto catalítico de las concentraciones nanomolares del ion trivalente sobre la oxidación de Mn^{2+} y el ciclo redox, podría explicar las propiedades oxidativas de las sales de Mn (HaMai et al., 2001).

Lo anterior llevó a tomar la decisión de utilizar la mezcla de Mn en el modelo de inhalación, con la cual se obtuvieron buenos resultados. Por lo cual, en este trabajo se utilizó la misma mezcla de Mn en las siguientes concentraciones: acetato de manganeso ($Mn(OAc)_3$) al 0.02 M y cloruro de manganeso ($MnCl_2$) al 0.04 M.

1.5.2 Manganismo.

La exposición constante y excesiva al Mn que se encuentra en el ambiente es un riesgo ocupacional bien documentado, puede provocar el síndrome extrapiramidal referido como manganismo. El manganismo está asociado con niveles elevados de Mn en el cerebro, principalmente en áreas donde hay concentraciones altas de hierro no hemo, especialmente en el CE, GP, SNc y NST (Mahalakshmi et al., 2014).

Múltiples líneas de evidencia, han revelado que la exposición a largo plazo en el entorno laboral a niveles altos de Mn, induce alteraciones cognitivas tempranas como: depresión y alucinaciones; seguidas de trastornos del movimiento como: rigidez, postura flexionada, distonia y deterioro de la marcha (Cersosimo y Koller, 2006; Aschner et al., 2009).

El manganismo puede tener algunas características clínicas que ocurren con menos frecuencia en la EP, como temblor cinético, alteraciones específicas de la marcha, alteraciones del equilibrio y del habla. Los signos clínicos tienden a ser bilaterales, mientras que la EP comienza en un lado del cuerpo y, además, los pacientes con parkinsonismo inducido por Mn lo presentan en edades tempranas (Cersosimo y Koller, 2006).

1.5.3 Absorción del Manganeso.

La incorporación de Mn hacia el cerebro es regulada por numerosos sistemas fisiológicos, entre ellos la función normal del tracto gastrointestinal, el sistema hepatobiliar, transferrina y otras proteínas transportadoras de la sangre y la barrera hematoencefálica. La alteración en los niveles de Mn puede ocurrir cuando los sistemas reguladores son parcialmente anulados como en el caso de la inhalación, o cuando los sistemas de control están saturados debido a la ingestión por niveles extremadamente altos de Mn en el agua potable. También puede aumentar la concentración de Mn cuando hay compromiso hepatobiliar u otra enfermedad que pueda alterar la homeostasis normal de Mn (Aschner et al., 2009).

El Mn es transportado dentro de las células por numerosos transportadores, incluyendo el transportador de metales divalente tipo I (DMT1), el transportador de solutos ZIP-8, el receptor de transferrina, canales de Ca^{2+} , entre otros. Pero ninguno de esos transportadores parece ser específico para Mn (Kwakye et al., 2015).

Al entrar al cerebro, el Mn puede ser llevado dentro de los astrocitos y las neuronas. Los astrocitos funcionan como los principales reguladores homeostáticos y sitios de

almacenamiento de Mn en el cerebro. Sin embargo, el incremento en la acumulación de Mn en los astrocitos puede inducir la liberación excesiva de glutamato provocando excitotoxicidad. La captación neuronal de Mn involucra a la transferrina y el sistema de transporte específico de dopamina el DAT (Suarez y Eriksson, 1993; Anderson et al., 2007; Chen et al., 2006). A nivel celular el Mn se acumula preferentemente en la mitocondria, donde interrumpe la fosforilación oxidativa e incrementa la generación de ROS (Milatovic et al., 2009).

A la fecha, se han reportado tres transportadores o bombas con capacidad de regular el flujo de Mn: el transportador de solutos, ferroportina y SLC30A10 y la vía secretora de ATPasa tipo P Ca^{2+} -ATPasa 1 (SPCA1). El SLC30A10 desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de los niveles celulares de Mn, así como en la protección contra la toxicidad del mismo en todo el organismo (Kwakye et al., 2015).

1.5.4 Mn y daño celular.

Los reportes indican que la neurodegeneración dopaminérgica asociada con la exposición al Mn y la EP comparten múltiples mecanismos moleculares, como disfunción mitocondrial, disminución de la energía celular, transducción de señales aberrantes, estrés oxidativo, agregación de proteínas y activación de vías de muerte celular necrótica y apoptótica (Milatovic et al., 2009).

Aunque los mecanismos que conducen a la neurodegeneración inducida por Mn aún no se conocen bien, los iones metálicos multivalentes en particular Mn^{2+} y Mn^{3+} , son capaces de reaccionar con aminas biogénicas (como la DA) a través de la reacción de Fenton y de esta manera producir ROS, lo que llevaría al daño oxidativo. Se han propuesto varios mecanismos de la auto oxidación de DA catalizada por Mn, que involucran semiquinonas y compuestos intermedios de aminocromo, L-cisteína o cobre y facilitación de NADH (Benedetto, 2009).

La especificidad de la acumulación de Mn conferida por DMT1 y su capacidad para reaccionar con DA puede explicar la selectividad por las NDA en el parkinsonismo inducido por Mn (Benedetto, 2009).

Los efectos tóxicos del Mn han sido descritos en las NDA, ya que el Mn induce decremento en los contenidos de peroxidasa, catalasa y grupos tioles en la SNC. Este metal produce ROS como O_2^- , H_2O_2 y OH^\bullet , 6-OHDA y otras catecolaminas tóxicas. El Mn induce la auto-oxidación de la DA, seguida de la formación de (semi)quinonas tóxicas y depleción de DA (Takeda, 2003; Archibald y Tyree, 1987).

Además, el Mn activa los receptores glutamatérgicos NMDA, el cual puede contribuir a la degeneración neuronal (Brouillet et al., 1994). Centonze y colaboradores en el 2001, sugirieron que los mecanismos excitotóxicos secundarios juegan un papel crucial en el desarrollo de la neurodegeneración inducida por Mn en el CE; observaron que la excitación anormal de las neuronas estriatales durante la intoxicación por Mn, ocasiona la hiperactividad de las neuronas corticoestriatales.

En resumen, el Mn causa en las células neuronales estrés oxidativo por el aumento descontrolado en la cantidad de ROS, disfunción mitocondrial y neuroinflamación (Milatovic et al., 2009).

JUSTIFICACIÓN

Los modelos utilizados muestran varios rasgos característicos de la EP, sin embargo, los modelos agudos bilaterales llegan a ser tan agresivos que los animales presentan adiposidad y afagia y por lo tanto aumenta la tasa de mortalidad. Mientras en otros casos, como en la inhalación de Mn es necesaria la exposición continua y por periodos de hasta 6 meses para inducir el daño requerido, desafortunadamente este tiempo en ocasiones no es viable para algunas investigaciones.

Es por ello que proponemos la microinyección tanto unilateral como bilateral de la mezcla de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) y acetato de manganeso ($Mn(OAc)_3$) en el haz medial del cerebro anterior como un nuevo modelo de la EP.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo, es evaluar la micro-inyección de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ en el haz medial del cerebro anterior como modelo de la EP analizando el grado de lesión a nivel conductual y citológico.

Objetivos particulares:

- Determinar cuál es la concentración adecuada para producir la lesión en el haz medial del cerebro anterior, mediante una curva dosis-respuesta para producir un modelo de la EP.
- Analizar el grado de depleción dopaminérgica con la conducta de giro inducido con apomorfina.
- Analizar la conducta motora de los animales con lesión bilateral con las pruebas de la viga y "reaching task".
- Analizar la conducta motora de los animales con lesión unilateral con las pruebas de la viga y la escalera.
- Determinar el número de neuronas inmunopositivas a tirosina hidroxilasa (TH) en la SNc de los animales control y los que recibieron la micro-inyección de la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ en el haz medial del cerebro anterior, unilateral o bilateralmente.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron ratas machos (n= 46) de la cepa Wistar de 180-200 g al inicio del experimento. Los animales fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad 12:12 h, con libre acceso al agua/alimento (con excepción de los días de evaluación en las pruebas de escalera y “reaching task”).

Con la finalidad de evaluar la conducta motora, antes de lesionarlos, los animales fueron entrenados para las siguientes pruebas:



Fig. 1 Aparato para prueba de viga de equilibrio

Prueba de la viga de equilibrio: Todas las ratas fueron entrenadas en la viga de equilibrio por 7 días previos a la lesión, se utilizó un artefacto de madera con dos pedestales, a los cuales va unida una viga de madera de 2 metros de largo con una inclinación de 15° (Fig. 1). Se utilizaron dos vigas de diferentes grosores: 12 y 6 mm (Fig. 2), por donde los animales debían de caminar desde el extremo inferior hasta el extremo superior del dispositivo donde se encontraba su caja hogar (Fig. 3). Se registró con cronómetro el tiempo en que las ratas tardaban en recorrer la viga (tiempo total). Se esperaba como tiempo máximo 120 segundos, y si al término de ese tiempo la rata no cruzaba se daba por terminada la actividad, asignando el valor de 120 segundos a su evaluación. En esta prueba se evalúa el deterioro motor en términos de lentitud, balance y rigidez muscular, además del uso alternado de las extremidades para el desplazamiento (Sánchez-Betancourt, 2016).



Fig. 2 Diferentes grosores de vigas (6 mm y 12 mm).



Fig. 3 Rata realizando la prueba de la viga.

Para las siguientes pruebas motoras: las ratas se dividieron en dos grupos de acuerdo a la lesión (lesión unilateral o lesión bilateral) para ser entrenadas durante una semana previa a la lesión con las pruebas correspondientes a cada tipo de lesión. Para el entrenamiento, el alimento fue restringido a 10-15 g para mantener el peso corporal de las ratas al 90%. Al final del entrenamiento se realizaron las evaluaciones control. Todas las ratas fueron evaluadas y video grabadas semanalmente.

Prueba de “reaching task” para evaluar lesión bilateral: Cada rata se colocó dentro de una caja de acrílico cuyas dimensiones son 20 cm de alto, 15 cm de ancho y 30 cm de largo (Fig. 4). La parte frontal de la caja cuenta con una abertura de 1cm por la cual la rata tiene que alcanzar un pellet con la pata delantera y comerlo (Fig. 5). Se contó como acierto cada vez que el animal tomaba el pellet y lo llevaba hasta su boca y como error si se le caía o no lo podía sujetar. Se hicieron 20 ensayos por evaluación. En esta prueba se evalúa la secuencia de movimientos motores finos de las extremidades delanteras, se inicia a partir de que la rata huele el pellet en la parte delantera de la caja de evaluación, levantan la extremidad delantera, ajustan la postura para proyectar la extremidad por la abertura, toman el pellet y lo sujetan, encojen la pata, voltean el pellet, lo huelen y lo introducen a la boca (fig. 6). En esta prueba se puede observar el deterioro motor en términos de lentitud en la realización de los movimientos secuenciados, temblor en las extremidades, disminución en la fuerza y precisión empleadas para la manipulación del pellet (Sánchez-Betancourt, 2016).

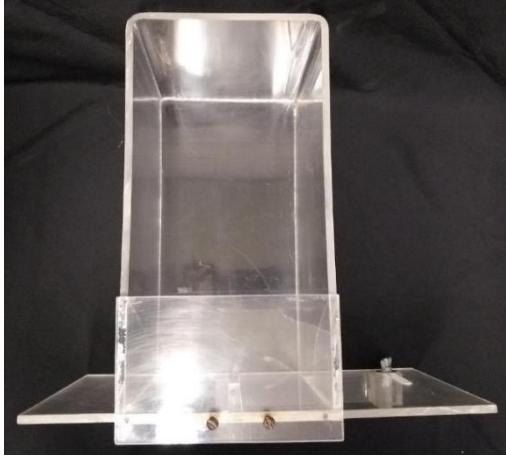


Fig. 4: Vista superior de la caja de "reaching task".

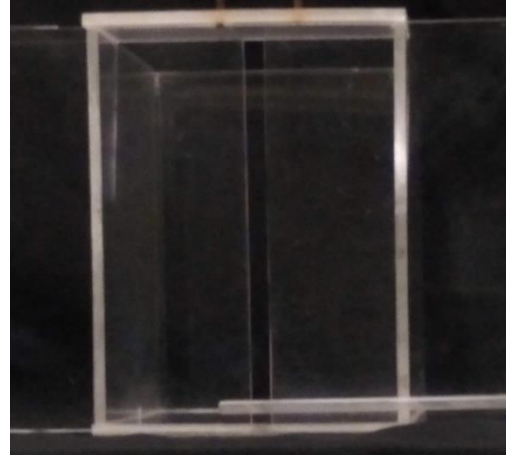


Fig. 5: Vista frontal de la caja de "reaching task".

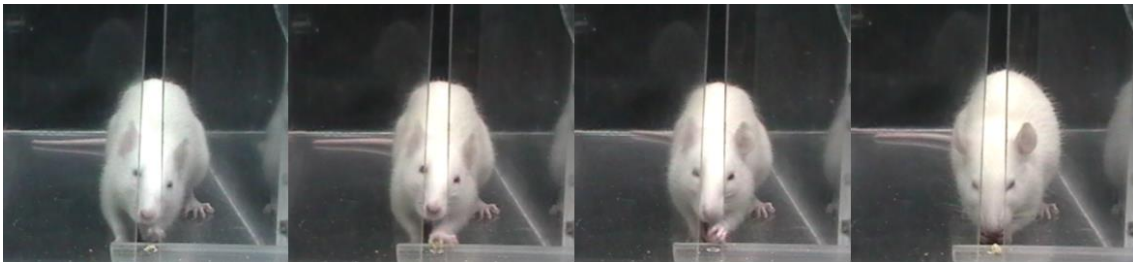


Fig. 6: Secuencia de movimientos en "reaching task".

Prueba de la escalera para evaluar lesión unilateral: La escalera es un dispositivo plástico con dos cajas de acrílico de diferente ancho conectadas entre sí (Fig. 7), la caja de menor área (parte frontal) contiene una plataforma intermedia, la cual a cada lado posee una escalera con 6 escalones a diferente profundidad (Fig. 8), en cada escalón se coloca un pellet del tamaño suficiente para ser tomado por la extremidad anterior de la rata. La evaluación dura 10 minutos, una vez dentro del dispositivo, la rata se dirige a la parte frontal y se coloca sobre la plataforma intermedia, ello le permite introducir la extremidad delantera a la escalera correspondiente para tomar los pellets y comerlos (Fig. 9). En esta prueba se cuentan los pellets sujetados con cada extremidad, con ello se analiza de forma independiente el movimiento de los miembros anteriores; también se puede observar la presencia de temblor y la disminución progresiva de la fuerza y precisión requeridas para realizar los movimientos (Montoya et al., 1991).

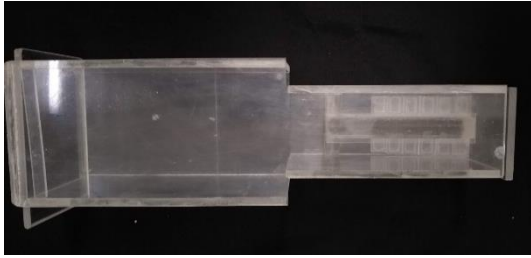


Fig. 7: Vista superior de la caja para la prueba de escalera.

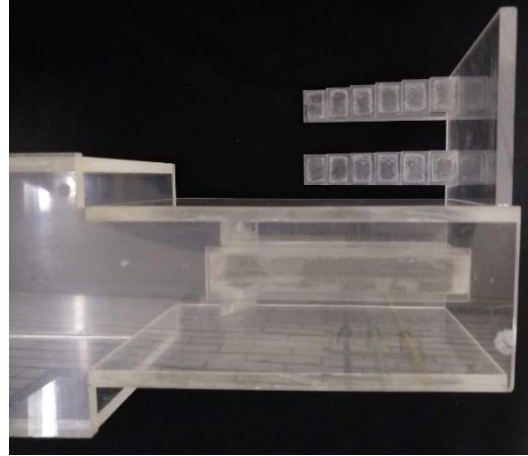


Fig. 8: Componentes de la caja para la prueba de escalera.

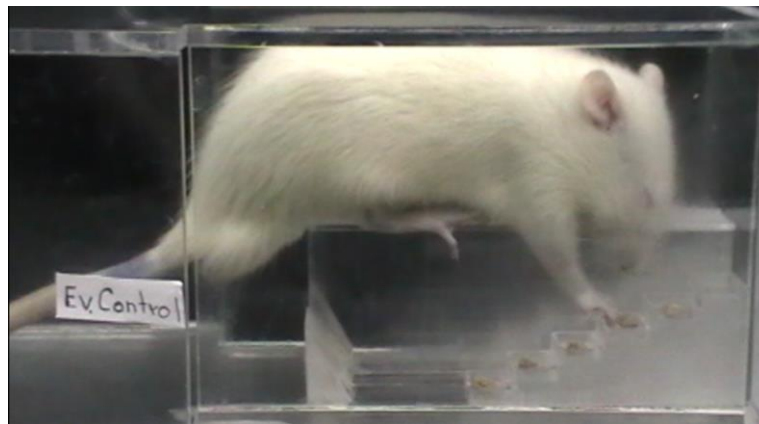


Fig. 9: Rata realizando prueba de escalera.

Cirugía esterotáxica: Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de 17.5 mg/Kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (ip), posteriormente se colocaron en la cámara de inducción anestésica regulando el vaporizador al 1-3% de isoflurano (anestésico) y flujo de oxígeno (100%) a 0.5-1.0 l/min. Una vez anestesiadas, las ratas fueron sacadas de la cámara de inducción y fijadas en el aparato estereotáxico (Fig. 10) (Kopf instruments, EUA) donde se les colocó la mascarilla para continuar con la anestesia. La cabeza de las ratas fue afeitada y desinfectada con yodo para proceder a hacer una incisión longitudinal en la parte superior de la cabeza, se separó y sujetó la piel para dejar expuesto el cráneo y se limpió el área de bregma.



Fig. 10: Rata colocada en el aparato estereotáxico.

Se procedió a hacer uno o dos pequeños trépanos (dependiendo si era lesión unilateral o bilateral), para ello, se usó un taladro manual para perforar el cráneo con las siguientes coordenadas: AP= -3 mm respecto a la línea interaural, L= ± 1.6 mm respecto a bregma (Paxinos y Watson, 1998) y con la coordenada V= -7.6 mm respecto a la duramadre (Paxinos y Watson, 1998), posteriormente se introdujo la micropipeta hasta el MFB para inyectar la mezcla de Mn.

La mezcla de Mn se preparó de la siguiente manera: el $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ a 0.02 M se disolvió en agua bidestilada y se dejó en agitación por 12 h continuas, posteriormente se adicionó el MnCl_2 a 0.04 M, ya mezclados se dejaron en agitación hasta su administración.

Se administraron dos diferentes volúmenes (4 μl y 5 μl) de la mezcla de Mn a la misma concentración y 4 μl al doble de la concentración estándar. Con el fin de determinar el volumen y la concentración adecuadas para inducir la lesión se utilizaron 3 ratas para cada grupo. De acuerdo al conteo de neuronas dopaminérgicas (inmunopositivas a TH), se determinó que para los grupos con lesión unilateral o bilateral se utilizarían 4 μl por hemisferio de la mezcla de Mn, utilizando una micro-jeringa Hamilton de 10 μl . La jeringa se mantuvo en el lugar durante 5 minutos después de la administración de la mezcla para asegurar la difusión de ésta. Después de retirar la jeringa, las ratas se suturaron y se dejaron recuperar. Se hizo cambio a dieta blanda y electrolitos durante las dos primeras semanas post cirugía, con el fin de evitar la pérdida excesiva de peso.

Quince días después de la lesión se evaluó la conducta de giro administrando apomorfina ip (0.25 mg/kg), la cual es un agonista dopaminérgico, (Ungerstedt et al., 1968). Esto con el propósito de seleccionar los animales con pérdida de NDA en la SNc; ya que se ha reportado que los animales que presenten más de 200 giros en

media hora tienen pérdida neuronal del 80% aproximadamente (Moore et al., 2001). La evaluación se realizó a los 15, 30, 45 y 60 días después de la lesión, para determinar la pérdida neuronal progresiva.

Perfusión e inmunohistoquímica positiva a TH: Al mes y a los dos meses post lesión, todos los animales fueron perfundidos por vía intracardiaca, para ello se les administró una dosis letal de pentobarbital sódico ip (Fig. 11). Primero se perfundió con solución salina al 0.9% y después con solución fijadora de paraformaldehído al 2% en solución buffer de fosfatos (PB) 0.1 M (Fig. 12). Posteriormente los cerebros fueron removidos y embebidos en la misma solución fijadora por una hora.



Figura 11: Perfusión intracardiaca de ratas lesionadas con la mezcla de Mn.



Figura 12: Soluciones y bomba utilizados para la perfusión intracardiaca.

Se obtuvieron cortes histológicos coronales del mesencéfalo ventral a nivel de la SNc de 50 μm de grosor con un microtomo de congelación (Leica SM2010R) posteriormente los cortes fueron procesados con la técnica inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), empleándose el anticuerpo anti TH (1:1000, Chemicon International Inc. CA, EUA) y se complementó con el método ABC (Vector Lab MI, EUA) para la detección de NDA. Para determinar el número de NDA remanentes en la SNc se contaron las neuronas inmunopositivas a TH en la SNc del lado ipsi y contralateral a la lesión por microscopía de luz, se utilizó una cámara (Cannon PC1087) acoplada a un microscopio óptico (Nikon, Japón). Se tomaron 10 cortes al azar de la SNc a nivel del mesencéfalo ventral de cada hemisferio por rata (Fig. 15). Esto nos permitió cuantificar el número de neuronas dopaminérgicas remanentes en toda la SNc (Fig. 13).

Los datos obtenidos en las pruebas conductuales y de inmunohistoquímica se analizaron con el programa GraphPad Prism V5, donde se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con $\alpha = 0.05$, seguido de la prueba *post hoc* de Tukey; se consideraron como diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

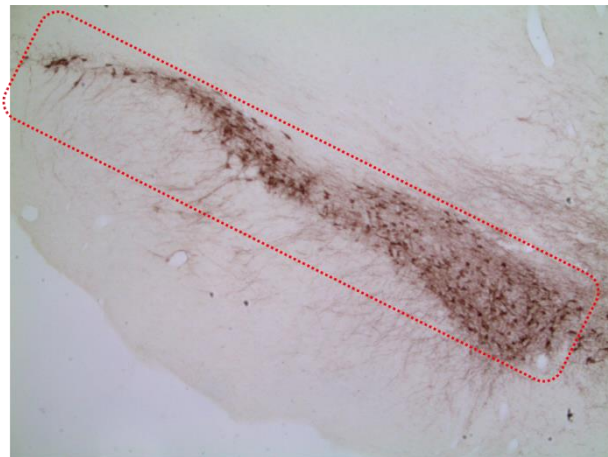
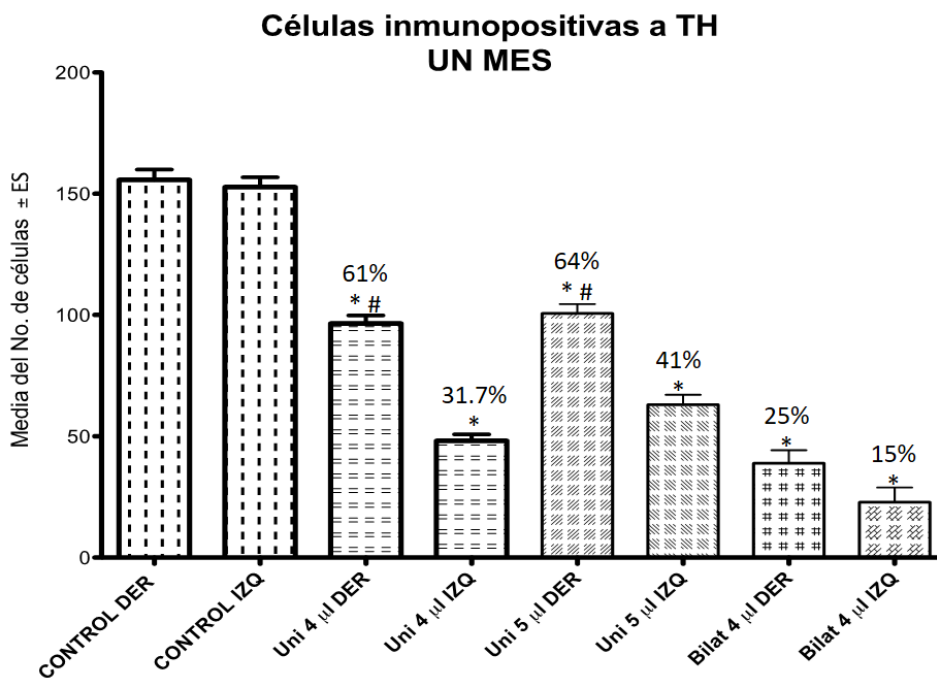


Fig. 13: Área donde se realizó el conteo de las neuronas remanentes de la SNc en cortes de mesencéfalo ventral (10x).

RESULTADOS

Para determinar la concentración y volumen adecuados de la mezcla de Mn para producir la lesión nigroestriatal se realizó una curva dosis-respuesta. Se administró unilateralmente 4 μ l y 5 μ l de la mezcla de Mn(OAc)₃ al 0.02 M y MnCl₂ al 0.04 M en el haz medial del cerebro anterior y un mes después, con el volumen de 4 μ l se encontró el 37.7% de neuronas remanentes en el hemisferio ipsilateral (lado lesionado) y el 61% de neuronas remanentes en el hemisferio contralateral (lado no lesionado), mientras que con el volumen de 5 μ l se encontró 41% de neuronas remanentes en el hemisferio ipsilateral y el 64% de neuronas remanentes en el hemisferio contralateral, no mostrando diferencias estadísticamente significativas con el volumen de 4 μ l (Gráfica 1). Posteriormente, con el propósito de inducir mayor pérdida neuronal se administraron unilateralmente 4 μ l de la mezcla de Mn al doble de la concentración estándar (0.04 M de Mn(OAc)₃ y 0.08 M de MnCl₂), al mes observamos que esta concentración fue demasiado agresiva ya que la SNc estaba perforada, por ello este tejido no se procesó para inmunohistoquímica para TH; también observamos que los cerebros presentaron dilatación considerable del ventrículo lateral izquierdo (Fig. 14).



Gráfica 1: Media (\pm ES) del número de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc izquierda y derecha con las cuatro dosis probadas.

En donde: * = $p < 0.05$ entre Experimental vs Grupo control. # = $p < 0.05$ entre UNI der 4 μ l y UNI der 5 μ l vs UNI izq 4 μ l, UNI izq 5 μ l, BI der 4 μ l y BI izq 4 μ l.



Figura 14: Fotografía donde se observa dilatación del ventrículo lateral izquierdo en ratas lesionadas con 4 μ l con concentración de 0.04M de $Mn(OAc)_3$ y 0.08 M de $MnCl_2$.

De acuerdo con estos resultados, la concentración de $Mn(OAc)_3$ a 0.02 M y $MnCl_2$ a 0.04 M en un volumen de 4 μ l es el más adecuado para inducir la lesión en la vía nigroestriatal. Además, con el propósito de evaluar la pérdida dopaminérgica estriatal se realizó la prueba de giro inducido con apomorfina, sin embargo, las ratas con lesión unilateral de 4 μ l y 5 μ l no presentaron conducta de giro (Tabla 1).

Tabla 1: Conducta de giro inducido con apomorfina en ratas con lesión unilateral.

Mezcla de Mn (volumen y concentración)	Número de Giros a los 3 días	Número de Giros a los 15 días	Número de Giros a los 30 días
4 μ l de $Mn(OAc)_3$ al 0.02 M y $MnCl_2$ al 0.04 M	0	0	5
	2	1	16
	16	2	17
5 μ l de $Mn(OAc)_3$ al 0.02 M y $MnCl_2$ al 0.04 M	3	2	1 contralateral 2 ipsilaterales
	0	0	4 contralateral 1 ipsilateral
	0	0	4 contralateral 5 ipsilateral
4 μ l de $Mn(OAc)_3$ al 0.04 M y $MnCl_2$ al 0.08 M	54	No se realizó la prueba	24 contralaterales 1 ipsilateral
	0	11 ipsilaterales	1 ipsilateral

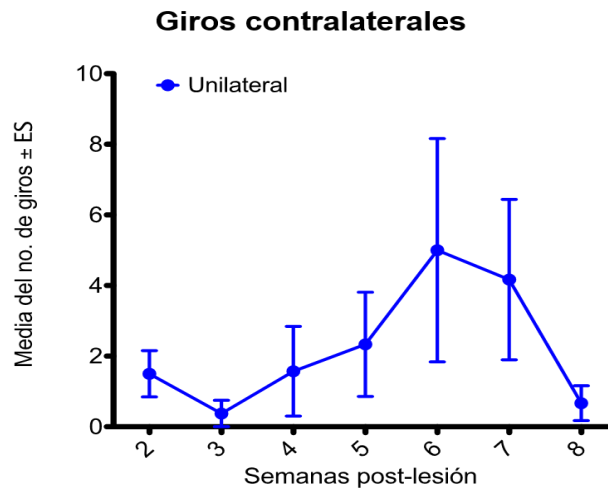
Con estos resultados, observamos que la lesión con la mezcla de compuestos Mn no es tan agresiva en comparación con otros modelos agudos, por ello decidimos hacer también lesiones bilaterales con 4 μ l de $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ al 0.02 M y MnCl_2 al 0.04 M, en las cuales se encontró 15% de neuronas remanentes en el hemisferio izquierdo y 25% de neuronas remanentes en el hemisferio derecho (Gráfica 1), así como aumentar el tiempo de exposición a dos meses, para observar si la pérdida neuronal aumentaba con el tiempo. Debido a que ninguno de los casos se observó conducta de giro inducido, se emplearon las pruebas motoras para determinar el grado de daño motor ocasionado por este modelo.

Después de determinar la concentración de la mezcla de Mn, dosis, y tiempo, se procedió a realizar los entrenamientos en las pruebas conductuales para los grupos: lesión unilateral, lesión bilateral y control, para posteriormente realizar la lesión con la mezcla de Mn; quince días después de la lesión, una vez por semana se evaluó la conducta motora de las ratas de los 4 grupos.

Prueba de giro inducido con apomorfina.

Los giros hacia el lado contralateral a la lesión presentan una ligera tendencia al incremento conforme avanza el tiempo post lesión, sin embargo, no se observó conducta de giro, a partir de la semana 7 se observa decremento y en la semana 8 se observa casi como en la semana 3 (Gráfica 2).

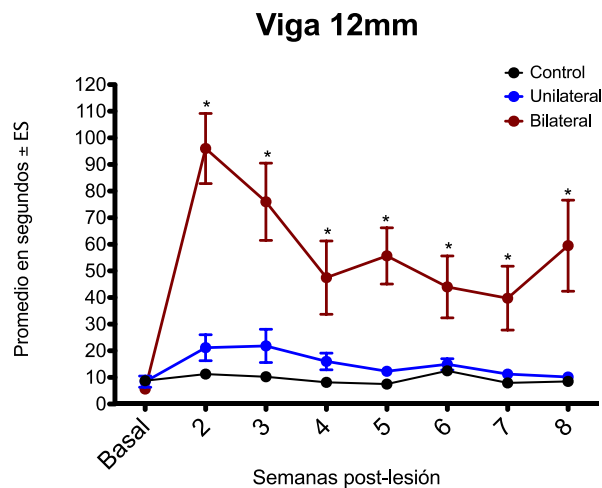
Durante las evaluaciones semanales se observó que las ratas presentaban tendencia a girar hacia alguno de los lados (ipsilateral o contralateral) pero no completaban los giros, se quedaban dormidas durante el periodo de observación después de la administración de la apomorfina. Además, se pudo identificar que todas las ratas lesionadas presentaban movimientos orolinguales y temblor en extremidades delanteras; tras observaciones detalladas, las ratas presentaban pérdida del pelaje en las patas, lo cual podría atribuirse al aumento del acicalamiento por la presencia de temblor.



Gráfica 2: Media (\pm ES) en el número de giros contralaterales en ratas con lesión unilateral con 4 μ l de la mezcla de Mn.

Prueba de la viga.

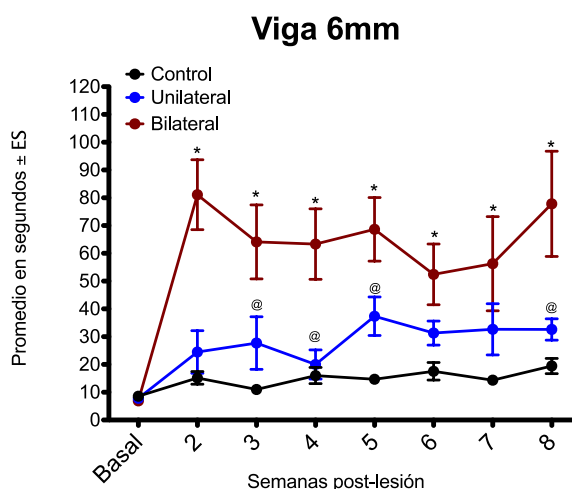
En la prueba de equilibrio se observó rigidez muscular, alteración en la alternancia en de las patas al avanzar y fuerza de agarre. En la viga de 12 mm de grosor las ratas con lesión unilateral presentaron tiempos de recorrido similares a los del grupo control, no mostrando diferencias estadísticamente significativas. Las ratas lesionadas bilateralmente incrementaron significativamente el tiempo de recorrido con respecto al grupo control y lesión unilateral, es importante mencionar que en la semana 8 las ratas parecían olvidar cómo completar la prueba, ya que se dirigían a la meta, paraban a la mitad de la viga y volvían al punto de salida (Gráfica 3).



Gráfica 3: Promedio (\pm ES) en segundos del tiempo en el que las ratas tardaron en recorrer la viga de equilibrio.

*= $p < 0.05$ entre Grupo control y Lesión unilateral vs Lesión bilateral.

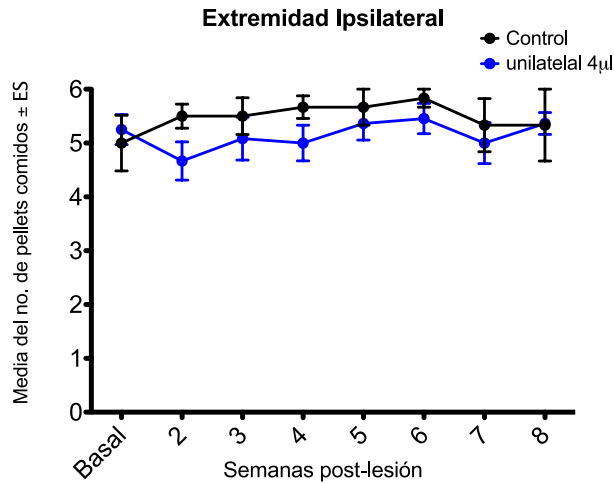
En la viga de 6 mm se observó nuevamente que las ratas lesionadas unilateralmente no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Las ratas con lesión bilateral presentaron un comportamiento similar a la viga de 12 mm, es decir, incrementaron el tiempo de recorrido significativamente durante las 8 semanas en comparación con el grupo control y el grupo lesión unilateral. En estos animales se observó rigidez, resbalones al caminar, torpeza en sus movimientos, en lugar de mover las patas traseras las arrastraban (Gráfica 4).



Gráfica 4: Promedio (\pm ES) en segundos del tiempo en el que las ratas tardaron en recorrer la viga de equilibrio.
 * = $p < 0.05$ entre Grupo control vs Lesión bilateral.
 @ = $p < 0.05$ entre Lesión unilateral vs Lesión bilateral.

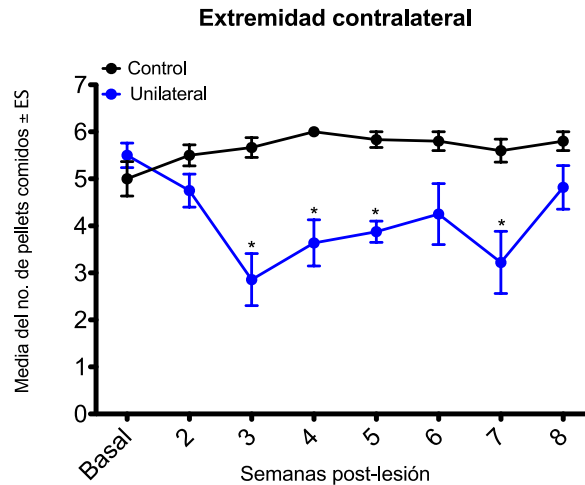
Prueba de escalera (lesión unilateral).

Como se ha reportado la respuesta motora es cruzada, es por ello que si se lesiona el hemisferio izquierdo se verán afectados los movimientos de la extremidad derecha. En la gráfica 5 se muestra la media de pellets tomados con la extremidad ipsilateral (lado lesionado) y después comidos, se observa que las ratas del grupo control y la extremidad ipsilateral a la lesión mantuvieron en promedio el mismo número de aciertos a los basales de 5-5.3 aproximadamente durante todo el estudio y no presentaron diferencias significativas. Asimismo, cualitativamente observamos que las ratas lesionadas y las del grupo control, presentaron los movimientos típicos para lograr tomar los pellets: 1) se preparaba para tomar el alimento, 2) estiraba la extremidad, 3) tomaba el pellet (movimiento de pronación), 4) retiraba y giraba la muñeca (supinación) y 5) comía el pellet (Gráfica 5).



Gráfica 5: Media (\pm ES) del número de pellets tomados y comidos con la extremidad ipsilateral a la lesión unilateral en la prueba de la escalera.

Con respecto a la extremidad contralateral (gráfica 6) las ratas lesionadas unilateralmente mostraron alteraciones en la conducta motora evidenciadas por la disminución estadísticamente significativa en el número de pellets tomados y comidos en comparación con el grupo control. De manera cualitativa observamos que dichos animales realizaban pocos esfuerzos para alcanzar los pellets, sus movimientos eran torpes al intentar tomar el alimento de los escalones, presentaban alteraciones al orientar el pellet para llevarlo hacia la boca y carecían de fuerza suficiente para hacerlo, parecían incapaces de extender los dígitos, en vez de sujetar el pellet lo arrastraban lanzándolo a la parte baja de la escalera, utilizaban los dientes y la lengua para tomar el pellet en lugar de las extremidades. Mientras que en la semana 8 presentaron comportamiento similar al grupo control (Gráfica 6).

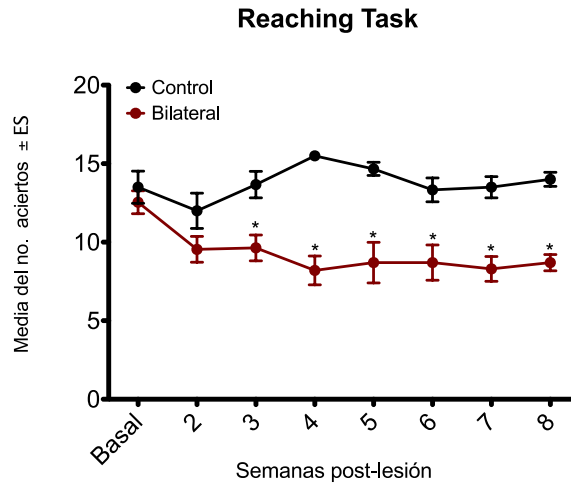


Gráfica 6: Media (\pm ES) del número de pellets tomados y comidos con la extremidad contralateral a la lesión en la prueba de escalera.

* = $p < 0.05$ entre Grupo control vs Lesión unilateral.

“Reaching task” (lesión bilateral).

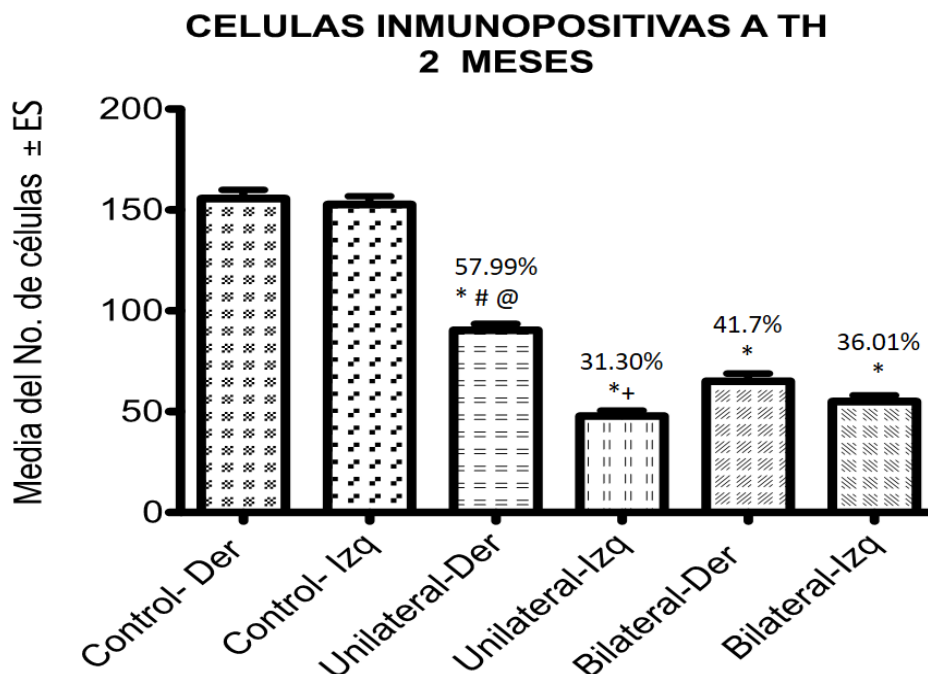
En esta prueba se evalúa la secuencia de movimientos que las ratas realizan para llevarse el pellet a la boca, en la gráfica 7, se observa la media del número de aciertos obtenidos. Los animales del grupo control presentaron 14 aciertos en promedio durante todo el estudio en comparación con las ratas del grupo lesionado bilateralmente, donde se observó disminución estadísticamente significativa en el número de aciertos con respecto al grupo control, dicha disminución se observó a partir de la semana 3 posterior a la lesión y hasta la última semana de evaluación. Las ratas lesionadas bilateralmente se observaban indiferentes al alimento, al intentar tomarlo no podían sujetarlo con los dedos y sólo lo tocaban con la palma repetidas veces sin lograr tomarlo, sacaban la extremidad más allá del lugar donde estaba el pellet e incluso sacaban ambas extremidades para conseguir tomarlo, jalaban el pellet hacia ellas arrojándolo dentro de la caja, cuando tomaban el pellet se les caía antes de llegar a la boca, intentaban tomar el pellet con la lengua en repetidas ocasiones (Gráfica 7).



Gráfica 7: Media (\pm ES) del número de aciertos en la prueba de "Reaching Task". * = $p < 0.05$ entre Grupo control vs Lesión bilateral.

Conteo de neuronas TH+.

En el grupo con lesión unilateral se encontró pérdida en el lado ipsilateral de 68.7% y del 42.01% en el lado contralateral. Mientras que en el grupo con lesión bilateral se encontró pérdida en el hemisferio izquierdo de 63.99% y del 58.3% en el hemisferio derecho (Gráfica 8 y figura 15). Los grupos lesionados presentan diferencias significativas respecto al grupo control.



Gráfica 8: Media (\pm ES) del número de células inmunopositivas a TH dos meses después de la lesión.

* = $p < 0.05$ entre Grupo experimental vs Grupo control.
= $p < 0.05$ entre UNI der vs UNI izq.

@ = $p < 0.05$ entre UNI der vs BI der.
+ = $p < 0.05$ entre UNI izq vs BI der.

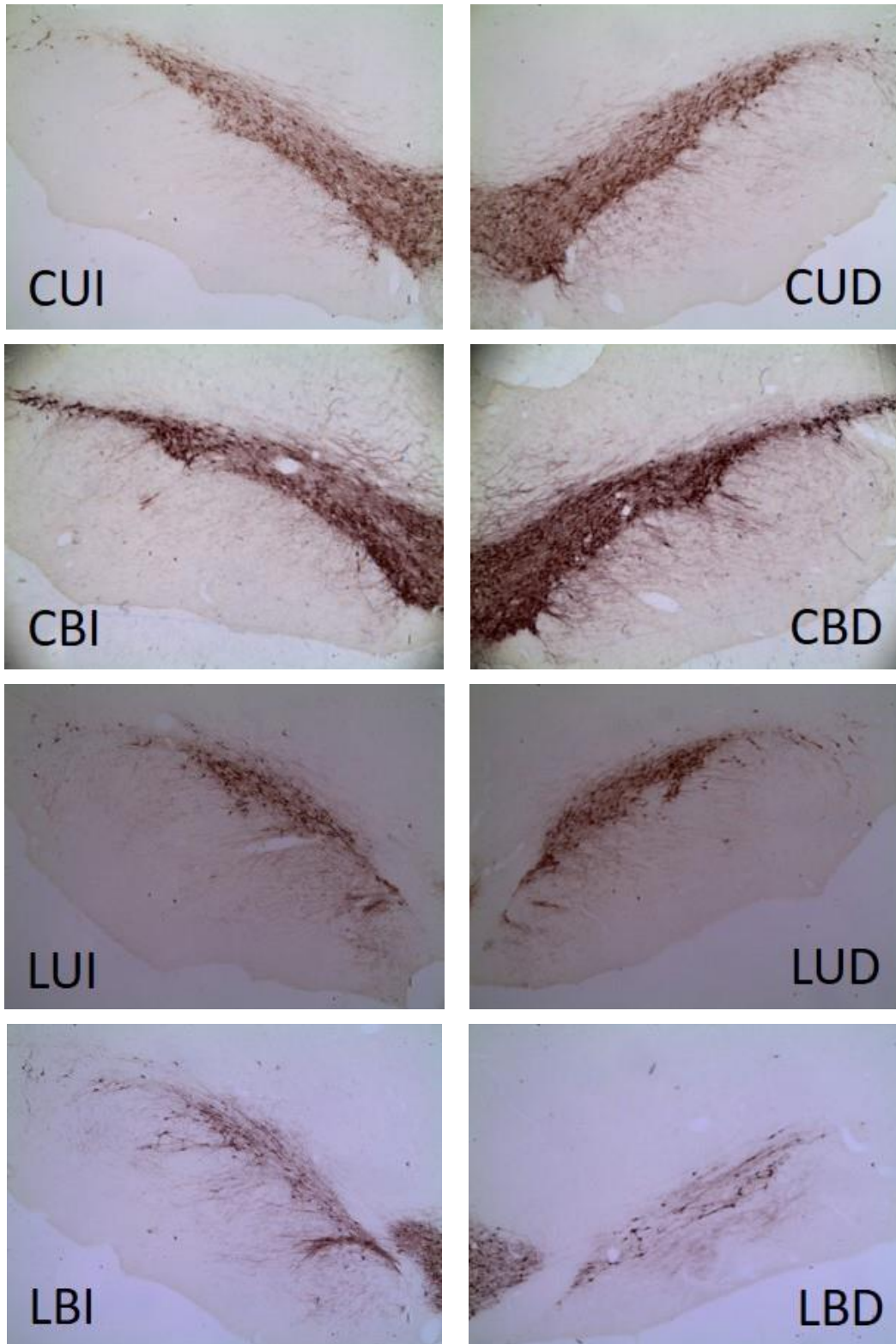


Figura 15: Cortes representativos de la SNc ipsilateral (I= izquierda) y contralateral (D=derecha) del mesencéfalo ventral en cerebros de ratas de los grupos: control unilateral (CU), control bilateral (CB), lesión unilateral (LU) y lesión bilateral (LB). Magnificación 3.2X

DISCUSIÓN

Giro inducido con apomorfina.

En este trabajo no se observó conducta de giro. Sin embargo, en las evaluaciones los animales mostraron cierta tendencia al giro (sin dirección determinada) aunque estos no llegaban a completarse.

Esta prueba conductual es una de las más ampliamente utilizadas, ya que se fundamenta en la hipersensibilidad de los receptores a DA estriatal que se sobre expresan en el lado donde se realizó la administración de la toxina (comúnmente con la administración de 6-OHDA), ya que involucra la pérdida unilateral de la proyección dopaminérgica ascendente (LaHoste y Marshall, 1990). Los animales con este tipo de lesión giran hacia el lado con la menor actividad dopaminérgica, cuando se administran agonistas dopaminérgicos (como apomorfina), ya que existe asimetría hemisférica en la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos (Moore et al., 2001; Hudson et al., 1993; Truong et al., 2006).

La hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos del estriado, se evalúa a través de la inducción del giro después de la administración de apomorfina, la cual sólo ocurre cuando se destruyeron del 80 al 90% o más de las neuronas nigrostriatales y se relaciona con más de 200 giros en media hora (Hefti et al., 1980; Moore, 2001).

En los cerebros con lesiones nigrostriatales menores al 60% no hay una distribución desigual de DA ni supersensibilidad unilateral de los receptores de DA; por lo tanto, la apomorfina afecta a ambos hemisferios sin causar la conducta de giro (Moore, 2001). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que no se obtuvo pérdida mayor al 68%, por lo cual no hubo denervación suficiente para que las ratas lesionadas presentaran hipersensibilidad de los receptores dopaminérgicos y, por lo tanto, el giro esperado.

Viga de equilibrio.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control vs lesión unilateral en ambas vigas; sin embargo, las ratas con lesión bilateral incrementaron considerablemente el tiempo total del recorrido, el cual presenta diferencias significativas con el grupo control y lesión unilateral.

Dado que la EP es un trastorno motor, esta prueba es útil para examinar los déficits en la locomoción y la capacidad de iniciar el movimiento en los modelos experimentales de la enfermedad. Con esta prueba se puede observar el tiempo que requieren los animales para iniciar el movimiento cuando se colocan en la viga (como índice de acinesia en animales parkinsonianos) y también el tiempo necesario para cruzar la viga (como medición de bradicinesia, equilibrio e inestabilidad postural en animales parkinsonianos) (Allbut y Henderson 2007).

Nuestros resultados concuerdan con lo observado por Allbut y Henderson (2007), quienes reportan que en la comparación del grupo lesionado con 6-OHDA y el grupo control, tanto la latencia como el tiempo total para cruzar la viga fueron cuatro veces mayores en el grupo lesionado. También observaron que las ratas lesionadas inician la prueba, pero se detienen y luego la reinician o permanecen sin movimiento, lo cual es similar a las conductas de congelación observadas en los pacientes con EP.

Sánchez-Betancourt en el 2016 reporta que en las pruebas de viga de 6 y 12 mm, hay incremento en el tiempo de ejecución en los animales expuestos a la mezcla de Mn. Mientras que los animales del grupo control presentan 20 segundos en promedio para atravesar la viga durante todas las evaluaciones, los animales expuestos a la mezcla de Mn llegaron a tardar en el traslado por la viga hasta 120 segundos a partir de la décima semana. En esta prueba se identificaron alteraciones motoras como dificultad para iniciar el movimiento, alteraciones de la marcha, así como periodos en los que las ratas se quedaban inmóviles.

Allbut y Henderson (2007) sugieren que la depleción de DA en el estriado causa mayor retraso en el inicio del movimiento y menor velocidad en el cruce de la viga, lo que sería compatible con la acinesia y la bradicinesia observadas en los pacientes con esta enfermedad.

De igual manera, Truong y colaboradores (2006) reportan que los animales lesionados con 6-OHDA con pérdida neuronal del 40 al 85%, mostraron en la prueba de la viga de equilibrio, evidentes dificultades en la locomoción, equilibrio y postura, lo cual está correlacionado con la pérdida de células dopaminérgicas.

Prueba de la escalera.

Como se pudo observar en este trabajo, las ratas lesionadas unilateralmente mostraron alteraciones en la conducta motora en la extremidad contralateral a la lesión.

Las pruebas para evaluar la conducta motora fina son necesarias para detectar deficiencias sutiles que no se pueden observar en las pruebas estándar, estas deficiencias en humanos, podrían afectar de manera negativa el rendimiento de habilidades manuales importantes (Samsam et al., 2004).

Se ha reportado, que la prueba de escalera, es una prueba simple y eficiente para evaluar las preferencias de cada pata y las medidas cuantitativas de alcance específico para las dos extremidades anteriores de forma independiente (Montoya et al., 1991).

Olson y colaboradores en 1995, observaron que al lesionar ratas con 6-OHDA en la vía mesoestriatal dopaminérgica ascendente, éstas presentaron deficiencias marcadas en la función de la pata contralateral a la lesión, el déficit fue estadísticamente significativo en comparación con los del grupo control. Por otro lado, la pata ipsilateral a la lesión, no presentó diferencias significativas respecto al grupo control.

Whishaw y colaboradores en 1997, reportaron que las ratas con lesión unilateral en el MFB con 6-OHDA, presentaron dificultades para alcanzar los pellets del lado contralateral a la lesión; mientras que en los movimientos del lado ipsilateral no se presentó ninguna alteración comparado con el grupo control. Asimismo, reportan que se observaron conductas compensatorias, es decir, que las ratas con depleción dopaminérgica unilateral, usaron principalmente las extremidades ipsilaterales para realizar ajustes posturales y también usaron la lengua para alcanzar los pellets del lado contralateral a la lesión.

Klein y Dunnet en el 2012, reportaron que ratas no lesionadas, primero intentaron tomar los pellets con la lengua, sólo los pellets de los primeros escalones se pueden alcanzar de esta manera, para el resto de los escalones es indispensable el uso de las patas anteriores para tomar los pellets. El tomar los pellets de los primeros escalones con la lengua en los modelos de ratas hemiparkinsonicas, proporciona una medida simple acerca de si los animales mantienen la motivación básica para responder a esta prueba.

Lo anterior, concuerda con lo encontrado en este trabajo, ya que sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el lado contralateral a la lesión; además

se observaron posturas compensatorias y el uso de la lengua para tomar los pellets de los primeros escalones.

Reaching Task.

Se observaron diferentes alteraciones motoras en los animales lesionados bilateralmente que los incapacitaban para realizar la prueba de forma adecuada.

Desde los primeros experimentos de Peterson (1932-1937), dirigidos a establecer la localización cortical del uso de las extremidades, el “reaching task” se ha adoptado como una forma de evaluación que analiza el desarrollo y la lateralización del control motor, la recuperación funcional después del daño cerebral y el control neuronal del movimiento especializado (Whishaw et al., 1990, 1991).

Sánchez-Betancourt (2016) reportó alteraciones motoras en ratas expuestas a la inhalación de la mezcla de compuestos de Mn y evaluadas en la prueba de “reaching task”, mientras que los animales del grupo control tuvieron una ejecución normal durante todo el experimento, los animales del grupo experimental disminuyeron el promedio de aciertos a medida que incrementaban las inhalaciones.

Whishaw y colaboradores (1991) sugieren que el deterioro aparente en el uso de los dígitos probablemente está relacionado con alteraciones en la orientación de la pata para tomar el alimento. Cada vez que la pata entraba en contacto con el alimento, el agarre con los dedos parecía normal, así mismo, se sugiere que la rata pierde ciertos movimientos y que cualquier coordinación exitosa del uso de la extremidad que reaparece después de lesiones muy extensas se logra mediante una variedad de ajustes posturales compensatorios para sustituir completamente los movimientos perdidos.

Lo anterior podría explicar las observaciones hechas en este trabajo, ya que para tomar el alimento las ratas presionaban el pellet con la palma antes de tomarlo con los dígitos. En nuestros resultados se muestra que la disminución en el número de aciertos no aumentó drásticamente respecto al tiempo, ello puede deberse, a que las ratas aprendieron a compensar la destreza pérdida del miembro contralateral a la lesión.

Número de neuronas inmunopositivas a TH.

Sánchez-Betancourt (2016) reportó que en los animales que inhalaban la mezcla de Mn presentaron pérdida del 75% de neuronas inmunopositivas a TH en comparación con el grupo control. La pérdida de las NDA de la SNc es el rasgo histopatológico más representativo de la EP y, se ha establecido que, con la aparición de los primeros síntomas, se observa degeneración neuronal de al menos 60% en la SNc, por lo tanto, ya hay depleción dopaminérgica del 80% en el (Dauer y Przedborski, 2003).

Por otro lado, Roedter y colaboradores (2001) reportaron que la administración unilateral intraestriatal de 6-OHDA produce pérdida del 80% de NDA en la SNc. Mientras que las lesiones bilaterales intraestriatales con 6-OHDA resultaron en una extensión similar de la degeneración nigroestriatal en comparación con los animales con lesiones unilaterales, pero, ocasionaron déficit de comportamiento más extensos, como reducción en la actividad locomotora y el comportamiento exploratorio, pérdida temporal de peso debido a la reducción del consumo de comida y deterioro significativo a largo plazo en la habilidad de las extremidades bilaterales.

En este trabajo, la pérdida neuronal encontrada en el lado ipsilateral a la lesión unilateral (68.7%) y la pérdida en el hemisferio izquierdo en la lesión bilateral (63.99%) son muy similares, de igual manera, las pruebas motoras mostraron que las ratas con lesión bilateral tienen más alteraciones motoras que las ratas con lesión unilateral.

Roedter y colaboradores (2001) proponen que hay regulación interdependiente entre el sistema nigroestriatal derecho e izquierdo, el cual puede proporcionar una especie de apoyo compensatorio para el desempeño en el comportamiento y la función del lado lesionado a través del lado no lesionado, dicha compensación se pierde en animales con lesiones bilaterales del sistema nigroestriatal.

Por otro lado, Avila-Costa (1996) reportó que en ratas lesionadas unilateralmente con 6-OHDA en el MFB, presentaron alteraciones ultra estructurales en el CE contralateral, como: incremento en el tamaño de los botones sinápticos, alteración en la distribución de las vesículas sinápticas e incremento en el número de contactos dobles. Lo anterior podría deberse a las evidencias de que la vía dopaminérgica nigroestriatal proyecta tanto ipsi como contralateralmente, siendo la proyección contralateral aproximadamente del 5 al 10% (Fass y Butcher, 1981; Loughlin y Fallon, 1982). Por lo cual la lesión unilateral podría provocar alteraciones en el CE contralateral a través de la pequeña proporción de células que proyectan al CE no lesionado.

Aunado a ello, la disminución en el número de NDA en el lado contralateral a la lesión unilateral, puede deberse a la conexión entre la SNc derecha e izquierda que se da a través del núcleo pedúnculo pontino (PPN) el cual, está involucrado en el control del movimiento y constituye la parte central de la "región locomotora mesencefálica", además de que establece conexiones recíprocas con los ganglios basales (Mena-Segovia et al., 2004).

CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestros resultados podemos resumir que:

- El volumen y la concentración para inducir la muerte de neuronas dopaminérgicas fueron 4 μ l de la mezcla de acetato de manganeso al 0.02 M y cloruro de manganeso al 0.04 M.
- Debido a que la pérdida de neuronas dopaminérgicas fue del 68.7%, los animales con lesión unilateral no mostraron giro inducido con apomorfina.
- Las ratas con lesión bilateral presentaron incremento considerable en el tiempo total del recorrido en la prueba de la viga, también presentaron ciertas características motoras como: rigidez, lentitud y torpeza en los movimientos al recorrer las vigas. Además, presentaron disminución en el número de aciertos en la prueba de “reaching task”.
- Las ratas con lesión unilateral no presentaron diferencias significativas en el tiempo de recorrido en la prueba de la viga con respecto al grupo control. Sin embargo, mostraron alteraciones en la conducta motora en la prueba de la escalera, la cual fue evidenciada por la disminución estadísticamente significativa en el número de pellets comidos en comparación con el grupo control.
- En el grupo con lesión unilateral se encontró pérdida de neuronas dopaminérgicas en el lado ipsilateral del 68.7% y del 42.01% en el lado contralateral a la lesión. Mientras que en el grupo con lesión bilateral se encontró pérdida del 63.99% en el hemisferio izquierdo y del 58.3% en el hemisferio derecho.

De acuerdo con lo anterior, podemos concluir que la inyección bilateral de la mezcla de $MnOAc_3$ y $MnCl_2$ en el haz medial en ratas representa un modelo de la EP de poco tiempo de evolución con pérdida de neuronas dopaminérgicas que conlleva a alteraciones motoras significativas; este modelo podría brindar una herramienta para el estudio de la EP así como para probar diferentes tratamientos en etapas iniciales de la enfermedad.

PERSPECTIVAS DEL MODELO

Con el fin de aumentar la muerte neuronal y conocer los resultados del modelo bajo nuevas condiciones, se sugiere variar el volumen (reducir a 3 μ l), la concentración aumentarla de 0.04 a 0.06 de MnCl_2 y de 0.02 a 0.03 de MnOAc_3 ; y que el sitio de lesión sea en la SNc o en el CE; asimismo se podría buscar otra sustancia que facilite la disolución de las sales de manganeso y que no sea neurotóxica para lograr mejor difusión intracerebral. Por otro lado, se recomienda evaluar el giro con D-anfetamina, la cual requiere pérdidas neuronales menores para provocar esta conducta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón A.A., Santamaría A.A. y Königsberg F.M. (2010). Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*. 29:92-100.
- Alam Z.I., Jenner A., Daniel S.E., Lees A.J. y Cairns N. (1997). Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain; a selective increase in 8-hydroxyguanine in substantia nigra?. *Journal Neurochemistry*. 69:1196-1203.
- Allbutt H.N. y Henderson J.H. (2007). Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods* 159:195-202.
- Anderson J.G., Cooney P.T. y Erikson K.M. 2007. Inhibition of DAT function attenuates manganese accumulation in the globus pallidus. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23:179-184.
- Archibald F.S. y Fridovich I. (1982). The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 214:452-463.
- Archibald F.S. y Tyree C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of biochemistry and biophysics*. 256:638-650.
- Armentero M.T., Levandis G., Nappi G., Bazzini E. y Blandini F. (2006). Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology Disease*. 24:492-505.
- Aschner M., Erikson K. y Dorman D. (2005). Manganese dosimetry: Species differences and implications for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 35:1-32.
- Aschner M., Erikson K., Herrero-Hernández E. y Tjalkens R. (2009). Manganese and its role in Parkinson's disease: From transport to neuropathology.

Neuromolecular Medecine. 11:252-266.

- Avila-Costa M.R.L. (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 para obtener el grado de Maestra en Neurociencias. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.
- Beal M.F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses?. *Annals of Neurology*. 31:119-30.
- Benedetto A., Au C. y Aschner M. (2009). Manganese induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. *Chemical Reviews*. 109: 4862-4884.
- Blandini F. y Armentero M.T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 279:1156-1166.
- Blesa J., Phani S., Jackson-Lewis V. y Przedborski S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012:1-10.
- Brouillet E.P, Shinobu L., McGarvey U., Hochberg F. y Beal M.F. (1994). Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Experimental Neurology*. 120:47-65.
- Castañeda-Achutiguí F., Tejeda-Martínez A., Escalante-Castañeda A., Sucres-Bernes H.A., Monterrubio-Ledezma E. y García-Lemus R. (2015). Modelos clásicos de inducción de Parkinson. *Neurobiología Revista Electrónica*. 6:020915.
- Centonze D., Gubellini P., Bernardi G. y Calabresi P. (2001) Impaired excitatory transmission in the striatum of rats chronically intoxicated with manganese. *Experimental Neurology*. 172:469-476.
- Cersosimo M.G. y Koller W.C. (2006). The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *NeuroToxicology*. 27:340-346.

- Chen M.K., Lee J.S., McGlothan J.L., Furukawa E., Adams R.J., Alexander M., Wong D.F. y Guilarte T.R. 2006. Acute manganese administration alters dopamine transporter levels in the non-human primate striatum. *Neurotoxicology*. 27:229-236.
- Chhillar N., Singh N.K., Banerjee B.D., Bala K., Mustafa M., Sharma D. y Chhillar M. (2013). Organochlorine pesticide levels and risk of Parkinson's disease in North Indian population. *International Scholarly Research Notices: Neurology*. 2013:1-6.
- Côté 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 Jessell T.M. (eds). *Principles of neural science*. Elsevier. U.S.A.
- Dauer W. y Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39:889-909.
- De Rycker J. y Halliwell B. (1978). Oxidation of thiol compounds by catalase and peroxidase in the presence of manganese (II) and phenols. *Biochemical Society Transactions*. 6:1343-1345.
- DeLong M.R. y Georgopoulos A.P. (1981). Motor Functions of the basal ganglia. En: Brookhard J., Mounscatle V.B., Brooks V.B. y Geiger S.R. (eds). *Handbook of physiology*. American Physiological Society.
- Dexter D.T., Sian J. y Rose S. (1994). Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Annals of Neurology*. 35:38-44.
- Fass B. y Butcher L.L. (1981) Evidence for a crossed nigrostriatal pathway in rats. *Neuroscience Letters*. 22:109-113.
- Firestone J.A., Smith-Weller T., Franklin G., Swanson P., Longstreth W.T. y Checkoway H. (2005). Pesticides and risk of Parkinson disease: A population-based case-control study. *Archives of Neurology*. 62:91-95.
- Gutiérrez-Valdez A. L. (2007). Comparación del efecto de diferentes fármacos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Tesis para obtener el título de

Maestra en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

- Halliwell B. y Gutteridge J. (1985). Oxygen radicals and the nervous system. *Trends in Neurosciences*. 8:22-29.
- HaMai D., Cambell A. y Bondy S.C. (2001). Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Radical Biology and Medicine*. 31:763-768.
- Hefti F., Melamed E. y Wurtman R.J. (1980). Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: Biochemical characterization. *Brain Research*. 195:123-137.
- Hudson J.L., van Horne C.G., Strömberg I., Brock S., Clayton J., Masserano J., Hoffer B.J. y Gerhardt G.A. (1993). Correlation of apomorphine and amphetamine induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Research*. 626:167-174.
- Hurtado F., Cardenas M.A.N., Cardenas F.P. y León L.A. (2016). La enfermedad de Parkinson: Etiología, tratamientos y factores preventivos. *Universitas Psychologica*. 15:1-26.
- Instituto Nacional de Estadística, geografía e informática de México. INEGI. (2015). Consultado en diciembre 2018, disponible en: <http://www.inegi.org.mx>
- Jenner P. y Olanow C.W. (1996). Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*. 47:161-706.
- Kandel E. (2001) *Principios de Neurociencia*. Cuarta edición. España. (pp:853-856).
- Klein A. y Dunnet S.B. (2012). Analysis of skilled forelimb movement in rats: The single pellet reaching test and staircase test. *Current Protocols in Neuroscience*. 58:1-15.
- Kwakye G.F., Paoliello M.M.B., Mukhopadhyay S., Bowman A.B. y Aschner M. (2015). Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease: Shared and

distinguishable features. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12:7519-7540.

- LaHoste G. y Marshall J.F. (1990). Nigral D1 and striatal D2 receptors mediate the behavioral effects of dopamine agonists. *Behavioural Brain Research*. 38:233-242.
- Loughlin S.E. y Fallon J.H. (1982). Mesostriatal projections from ventral tegmentum and dorsal raphe: Cells project ipsilaterally or contralaterally but not bilaterally. *Neuroscience Letters*. 32:11-16.
- Mahalakshmi A.M., Ramesh B.N. y Suresh B. (2014). Is manganese induced neurotoxicity a potential model for Parkinson's disease? An overview on its complications. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6:6-15.
- Mena-Segovia J., Bolam J.P. y Magill P. (2004). Pedunclopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family?. *Trends in Neurosciences*. 27:585-588.
- Milatovic D., Zaja-Milavitic S., Gupta R.C., Yu Y. y Aschner M. (2009). Oxidative damage and neurodegeneration in manganese induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 240:219-225.
- Montoya C.P., Campbell-Hope L.J., Pemberton K.D. y Dunnett S.B. (1991). The "staircase test" a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *Journal of Neuroscience Methods*. 36: 219-228.
- Moore A.E, Cicchetti F., Hannen J. y Isacson O. (2001). Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional A9/A10 dopamine neuron degeneration in the rat. *Experimental Neurology*. 172:363-376.
- Morrow B.A., Roth R.H., Redmond D.E., Diano S. y Elsworth J.D. (2012). Susceptibility to a parkinsonian toxin varies during primate development. *Experimental Neurology*. 235:273-281.

- Nandipati S. y Litvan I. (2016). Environmental Exposures and Parkinson's Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13:881-900.
- Olanow C.W. (1990). Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*. 40:32-37.
- Olanow C.W. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends in Neuroscience*. 16:439-44.
- Olanow C.W. (2004). Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1012:209-223.
- Olanow C.W. y Tatton W.G. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*. 22:123-144.
- Olsson M., Nikkhah G., Bentlage C. y Björklund A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of Neuroscience*. 15:3863-3875.
- 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 para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios superiores Iztacala. UNAM.
- Ordoñez-Librado J.L., Anaya-Martinez V., Gutierrez-Valdez A.L., Montiel-Flores E., Corona D.R., Martinez-Fong D., Avila-Costa M.R. (2010). L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neuroscience Letters*. 471:79-82.
- Ordoñez-Librado J.L., Gutierrez-Valdez A.L., Colín-Barenque L., Anaya-Martínez V., Díaz-Bech P. y Avila-Costa M.R. (2008). Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience*. 155:7-16.

- Paxinos G. y Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd. Edn. Academic Press. New York.
- Peterson G.M. (1932-1937). Mechanisms of handedness in the rat. *Comparative Psychological Monographs*. 9:21-43.
- Racette B.A., Nielsen S.S., Criswell S.R., Sheppard L., Seixas N., Warden M.N. y Checkoway H. (2017). Dose-dependent progression of parkinsonism in manganese-exposed welders. *Neurology*. 88:344-351.
- Rodríguez M.C., Obeso J.A. y Olanow C.W. (1998). Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a possible target for neuroprotection. *Annals of Neurology*. 44:175-188.
- Rodríguez-Violante M., Villar-Velarde A., Valencia-Ramos C. y Cervantes-Arriaga A. (2011). Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencia en México. *Archivos de Neurociencias*. 16:64-68.
- Roedter A., Winkler C., Samil M., Walter G.F., Brandis A. y Nikkhah G. (2001). Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *The Journal Of Comparative Neurology*. 432:217-229.
- Rothstein J.D., Bristol L.A., Hosler B., Brown R.H. Jr. y Kuncl R.W. (1994). Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:4155-4159.
- Samsam T.E., Gadrinab L.G. y Bushnell P.J. (2004). Toxicological evaluation of the staircase test for assessing fine motor movements. *Neurotoxicology and Teratology*. 26:113-120.
- Sánchez-Betancourt J. (2016). Caracterización de un modelo de la Enfermedad de Parkinson en rata por inhalación de manganeso. Tesis para obtener el título de Doctor en Psicología. Programa de Maestría y Doctorado en Psicología.

Neurociencias de la conducta. UNAM.

- Sánchez-Betancourt J., Anaya-Martínez V., Gutierrez-Valdez A.L., Ordoñez-Librado J.L., Montiel-Flores E., Espinosa-Villanueva J., Reynoso-Erao L. y Avila-Costa M.R. (2012). Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *NeuroToxicology*. 33:1346-1355.
- Secretaría de Salud. (2010). Guía de Práctica Clínica: Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención, México. Disponible en:
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/305_SSA_10_PARKINSON_3ER_NVL/EyR_Parkinson.pdf
- Shoulson I., Oakes D., Fahn S., Lang A., Langston J.W., LeWitt P., Olanow C.W., Penney J.B., Tanner C., Kieburtz K. y Rudolph A. (2002). Impact of sustained deprenyl (selegiline) in levodopa-treated Parkinson's disease: a randomized placebo-controlled extension of the deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism trial. *Annals of Neurology*. 51:604-612.
- Soliman E.F., Slikker W.Jr. y Ali S.F. (1995). Manganese-induced oxidative stress as measured by a fluorescent probe: an in vitro study. *Journal of Neuroscience Research Communications*. 17:185-193.
- Suarez N. y Eriksson H. (1993). Receptor-mediated endocytosis of a manganese complex of transferrin into neuroblastoma (SHSY5Y) cells in culture. *Journal of Neurochemistry*. 61:127-131.
- Takeda A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*. 41:79-87.
- Tanner C.M. (1989). The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends in Neuroscience*. 12:49-54.
- Truong L., Allbutt H., Kassiou M. y Henderson J.M. (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: A study of behaviour in rats with graded 6-OHDA

lesions. Behavioural Brain Research. 169:1-9.

- Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxydopamine induced degenerayion of central monoaminergic neurons. European Journal of Pharmacology. 5:107-110.
- Ungerstedt U. (1971a). Striatal dopamine reléase after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. Acta physiologica Scandinavica Supplementum. 367:49-68.
- Ungerstedt U. (1971b). Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. Acta physiologica Scandinavica Supplementum. 367:69-93.
- Ungerstedt U. y Arbuthnott G.W. (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats. Brain Research. 24:485-493.
- Weisskopf M.G., Knekt P., O'Reilly E.J., Lyytinen J., Reunanen A., Laden F., Altshul L. y Ascherio A. (2010). Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease. Neurology. 74:1055-1061.
- Whishaw I.Q. y Pellis S.M. (1990). The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. Behavioural Brain Research. 41:49-59.
- Whishaw I.Q., Pellis S.M., Gorny B.P. y Pellis V.C. (1991). The impairments in reaching and the movements of compensation rats with motor cortex lesions" an endpoint, videorecording, and movement notation analysis. Behavioral Brain Research. 42:77-91.
- Whishaw I.Q., Woodward N.C., Miklyaeva E. y Pellis S.M. (1997). Analysis of limb use by control rats and unilateral DA-depleted rats in the Montoya staircase test: movements, impairments and compensatory strategies. Behavioural Brain Research 89:167-177.