



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Interacción entre rotenona y manganeso para
reproducir las características histológicas de la
Enfermedad de Parkinson en ratas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA OFELIA PÉREZ GONZÁLEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARISOL OROZCO IBARRA
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”

El presente trabajo fue elaborado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (LNMyC) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” (INNN), bajo la dirección de la Dra. Marisol Orozco Ibarra.

DEDICATORIAS

A mi padre:

Que siempre me brindaste tu apoyo incondicional a pesar de no estar completamente de acuerdo con el camino que elegí seguir. Por todas las pláticas, los regaños y discursos que si bien no aprecié en el momento, llegaba el día en el que se aplicaban.

Gracias por tanto, te amo hasta el infinito y más allá.

A mi madre:

Gracias por siempre creer en mí de esa manera tan única que tienes. Gracias por desvelarte conmigo, por acompañarme al autobús a las cinco de la mañana, gracias por pasear al perro mientras yo estaba haciendo ciencia. La fe que me tuviste me impulsó a seguir adelante todas las veces que quise renunciar.

Te amo muchísimo.

A Omar:

Gracias por todo el apoyo y el amor que me diste mientras realizaba la tesis. También agradezco la paciencia y todo el tiempo en el que me estuviste diciendo que sí me podía titular.

Eres un pedacito de cielo. Te quiero.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Marisol Orozco Ibarra:

En primer lugar, muchas gracias por aceptarme como alumna del taller hace ya casi dos años y no darse por vencido cuando las cosas no me salían tan rápido o tan bien como se esperaba. Gracias por los jalones de oreja, las pláticas en las que se notaba que estaba convencida de que saldría adelante y por todos los consejos para un mejor desempeño académico y laboral.

Sin todo su apoyo, esta tesis no hubiera sido posible. Muchas gracias.

A la M. en C., Norma Serrano García:

Normita, no sabes cuánto agradezco a la vida el que tú seas parte de este laboratorio. Todo lo que me enseñaste lo llevaré conmigo siempre y no importa dónde esté, siempre te voy a recordar y agradecer. Gracias por la paciencia, por el apoyo, por quedarte conmigo hasta tarde, por ir temprano al laboratorio porque tenía que hacer algo muy en la mañana.

¡Muchísimas gracias!

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS...	7
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN	
Enfermedad de Parkinson	11
Metales pesados... ..	12
Manganeso... ..	14
Parkinsonismo... ..	15
Rotenona... ..	16
ANTECEDENTES	
Manganismo... ..	17
Plaguicidas... ..	19
JUSTIFICACIÓN... ..	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS... ..	23
OBJETIVO GENERAL... ..	23
OBJETIVOS PARTICULARES... ..	23
MATERIALES Y MÉTODOS... ..	
Animales de experimentación... ..	24
Tratamientos de los animales.....	25
Conducta de reparo... ..	25

Análisis histológico.....	25
Inmunohistoquímica de tirosina-hidroxilasa.....	26
Hematoxilina-Eosina.....	26
Análisis estadístico.....	28
<i>RESULTADOS</i>.....	28
Peso corporal.....	28
Conducta de reparo.....	29
Expresión de tirosina hidroxilasa (TH).....	30
Tinción de hematoxilina-eosina.....	32
Discusión.....	35
Conclusión.....	37
Perspectivas.....	37
Referencias.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

MnCl₂	Cloruro de manganeso
TH	Tirosina.hidroxilasa
Rot	Rotenona
Mn	Manganeso
PBS	Amortiguador de fosfatos
BSA	Albúmina sérica bovina

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas	Página 19
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparación sustancia nigra.	Página 12
Figura 2. Diferencia entre manganismo y Parkinson	Página 18
Figura 3. Mecanismo de acción de la rotenona.	Página 21

Figura 4. Diseño experimental	Página 24
Figura 5. Demostración de conducta de reparo.	Página 25
Figura 6. Gráfica de cambio en el peso corporal	Página 28
Figura 7. Actividad motora en ratas Wistar.	Página 29
Figura 8. Expresión de tirosina hidroxilasa	Página 31
Figura 9. Cuantificación de núcleos dañados.	Página 33
Figura 10. Tinción de hematoxilina eosina	Página 34

RESUMEN

Introducción. Se conoce que la enfermedad de Parkinson es el resultado de interacciones complejas entre factores ambientales y genéticos. Dos estresantes ambientales químicamente distintos relevantes para esta enfermedad son la rotenona y el manganeso. Conocer si la exposición a la primera potencia la neurotoxicidad del segundo, contribuirá al conocimiento respecto de la interacción de factores ambientales para el daño de las estructuras cerebrales involucradas con la enfermedad de Parkinson.

Hipótesis. Si la rotenona y el manganeso actúan juntos entonces provocarán un parkinsonismo más marcado, reflejándose en una disminución de la conducta exploratoria y en la cantidad de neuronas dañadas tanto en estriado como en sustancia *nigra*.

Objetivo. Determinar si la exposición a rotenona potencia la neurotoxicidad del manganeso ($MnCl_2$).

Material y Métodos. Se usaron 24 ratas *Wistar* macho de 250-300 g, distribuidas en 4 grupos de 6 ratas cada uno para administrar: 1) vehículo, 2) $MnCl_2$ (15 mg/kg/24), 3) rotenona (3 mg/kg/24 h) o 4) $MnCl_2$ y rotenona por 8 días. La conducta de reparo se evaluó un día después. Más tarde, se obtuvo el cerebro fijado y se prepararon cortes coronales para análisis histológico con tinción de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH).

Resultados. El peso corporal y la conducta de reparo se afectaron con la administración de manganeso, tanto solo como en conjunto con rotenona. No se encontró diferencia significativa por efecto del tratamiento en la expresión de TH en sustancia *nigra pars compacta* entre ambos tratamientos. Pero sí se encontraron diferencias significativas cuando se realizó el análisis histológico en cuerpo estriado, globo pálido y sustancia *nigra*.

Discusión y conclusiones. La disminución del peso corporal es un efecto que se puede apreciar en tratamientos con diferentes metales pesados, debido a una disminución de masa muscular, como se ha reportado anteriormente. Además, la disminución en la conducta de reparo puede deberse a esa misma disminución de masa muscular. El no encontrar una diferencia significativa en la expresión de TH

puede deberse al tiempo que duró el tratamiento (8 días), pues se alcanza a observar una disminución, así que, si el tratamiento durara más, probablemente se podría observar una diferencia significativa. Esta disminución se esperaba en el grupo de rotenona y rotenona con manganeso, pues se ha reportado que el manganeso no afecta las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*.

Mientras que el análisis histológico nos muestra qué zonas fueron las más afectadas en cada tratamiento. Tomando en cuenta los resultados, sí hay un parkinsonismo más marcado en el grupo combinado de rotenona y manganeso pues es el grupo que presenta una mayor disminución en conducta exploratoria y presenta más núcleos dañados en todas las zonas, por lo tanto la hipótesis es correcta.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Parkinson

En 1817, James Parkinson describió esta enfermedad hoy en día considerada la segunda enfermedad neurodegenerativa más prevalente, después de la enfermedad de Alzheimer (Clarke, 2004). La edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, por lo que, teniendo en cuenta el envejecimiento progresivo de la población, su prevalencia continuará aumentado en los próximos años (Clarke, 2004). La enfermedad de Parkinson aumenta la mortalidad de dos a cinco veces y conlleva un deterioro de la calidad de vida de los pacientes que la padecen, además de suponer un importante costo socioeconómico (Lang, 1998).

Se produce como consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta y la consiguiente aparición de los signos cardinales de la enfermedad; es decir, el temblor en estado de reposo, la bradicinesia, rigidez e inestabilidad en la postura. El diagnóstico debe ser clínico y el principal tratamiento son los fármacos dopaminérgicos y la rehabilitación.

La pérdida de las neuronas dopaminérgicas es causada, probablemente, por la sobreexpresión de proteínas como la alfa sinucleína y por su mal plegamiento, lo que genera inclusiones intracelulares llamados cuerpos de Lewy (Chen, 2015). Esta anomalía lleva a la disfunción de la cadena respiratoria neuronal (Lansbury, 2002). Diferentes estudios han demostrado que la formación de cuerpos de Lewy se debe a un proceso de mal funcionamiento iniciado por la alfa-sinucleína que induce polimerización de la proteína TAU, conduciendo a la hiperfosforilación, la alfa-sinucleína hiperfosforilada se presenta hasta en un 90% de casos de Parkinson y solo en un 4% en casos normales (Waxman, 2011). El aumento de proteína TAU hiperfosforilada lleva a la interrupción del proceso de formación de microtúbulos, lo que causa aberraciones estructurales y funcionales de la neurona (Haggerty, 2011). El resultado de dicha neurodegeneración es la denervación dopaminérgica de las proyecciones de la SN hacia el núcleo estriado, lo que condiciona una alteración en la fisiología normal de los ganglios basales (GB) que origina las principales manifestaciones de la enfermedad.

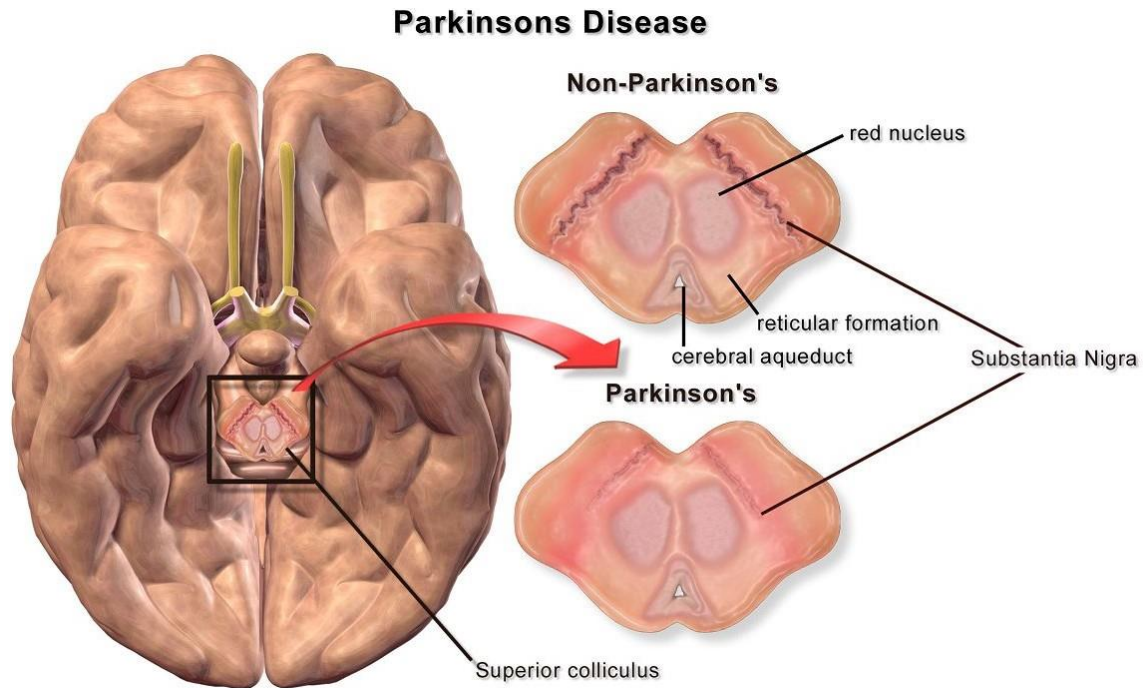


Figura 1. Comparación entre la sustancia *nigra* de una persona sana (arriba) y la sustancia *nigra* de una persona con enfermedad de Parkinson. Imagen tomada de <https://tratamientoyenfermedades.com>

Algunos factores genéticos y ambientales se han relacionado con la etiología de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos reportados (95%) las causas son de tipo desconocido (Mizuno, 2001), por lo que el padecimiento se conoce como Parkinson idiopático. Diversos estudios genéticos han permitido asociar ciertos genes específicos con la vulnerabilidad a desarrollar esta enfermedad. Además, se han descrito diversos factores de riesgo para la enfermedad, entre los que se encuentran factores ambientales, como metales pesados, plaguicidas y fármacos.

Metales pesados.

Los metales son componentes de la corteza terrestre y tienen un papel muy importante en los organismos pues son parte fundamental de las funciones biológicas, químicas y fisiológicas. Por ejemplo, en la defensa antioxidante, el metabolismo energético y la función inmune entre otras. Existen metales que son necesarios para que un organismo se mantenga saludable, por ejemplo, el hierro en la sangre. Pero también pueden actuar como potentes tóxicos, no sólo para los

seres vivos sino también para su ecosistema sin importar la vía de exposición, la dosis absorbida, la naturaleza química del metal, entre otras cosas (Llobet, 2000).

Como se mencionó, la mayoría de los metales suelen venir de la corteza, pero existen también por procesos antropogénicos, como las actividades industriales, agrícolas, minerales y ganaderas o inclusive, el propio tráfico, que también son considerados como fuente de metales pesados (Chapman, 2003).

Exposición a metales pesados

Los metales poseen un carácter acumulativo y de permanencia y con esto logran encontrarse en diversos compartimientos ambientales (tales como el aire, agua, suelos, flora y fauna) y son detectados en el organismo humano (Zhao, 2006). La población puede estar expuesta a estos metales como consecuencia de su amplia difusión en el ambiente. Una de las vías más importantes de exposición suele ser la alimenticia, es decir, consumir los alimentos que los contienen, ya sea de manera natural o por contaminantes (Bocio, 2005). Los metales no pueden ser degradados y por lo tanto se incorporan al organismo a través del agua potable, ya sea por ingestión o por medio de absorción dérmica al tomar un baño (Rodrigues, 2005) En cuanto al aire, la contaminación ambiental de partículas que contienen una gran variedad de metales, implica una variedad de potenciales efectos adversos para la salud (Bukowiecki, 2007).

Mecanismos de toxicidad de los metales pesados

Cada metal y cada elemento químico contaminante tiene un mecanismo de acción y un lugar de acumulación preferido. Por ejemplo, el manganeso puede inducir múltiples problemas neurológicos y a diferencia del manganeso ingerido, el manganeso inhalado es transportado directamente al cerebro antes de que pueda ser metabolizado en el hígado (Davis, 1998). Además, esta toxicidad es mediada por el daño a la mitocondria iniciando la muerte celular, ya sea por apoptosis o necrosis al formar especies reactivas de oxígeno.

Efectos tóxicos de los metales pesados

Entre estos efectos adversos encontramos: anemia, disfunción renal, cálculos renales, osteoporosis, osteomalacia, trastornos respiratorios, hipertensión, trastornos nerviosos, pérdida de peso, cáncer, lesiones en la piel, lesiones vasculares e incluso la muerte (Londoño, 2016). Uno de los metales pesados que podemos encontrar comúnmente en el ambiente o en los alimentos es el manganeso.

Manganeso.

Propiedades fisicoquímicas

El manganeso es el doceavo elemento más abundante en la corteza terrestre y está presente, de forma natural, en rocas, suelo y agua. Existe en componentes orgánicos e inorgánicos, siendo las formas inorgánicas las más comunes en el ambiente. El manganeso tiene 2, 3, 4, 6 y 7 de números de oxidación y 2 electrones de valencia. El manganeso es un elemento químico, símbolo Mn, de número atómico 25 y peso atómico 54.938 g/mol. el manganeso se caracteriza por su elevada dureza, el tener puntos de ebullición y fusión elevados y ser buenos conductores de la electricidad y el calor. El estado del manganeso en su forma natural es sólido (generalmente no magnético). El manganeso es un elemento químico de aspecto plateado metálico y pertenece al grupo de los metales de transición. El punto de fusión del manganeso es de 1517 grados Kelvin o de -272,15 grados celsius o grados centígrados. El punto de ebullición del manganeso es de 2235 grados Kelvin o de 1962,85 grados celsius o grados centígrados.

Usos

El manganeso inorgánico se usa en la producción de hierro y acero en la manufactura de baterías, la producción de permanganato de potasio, manufactura de vidrio, blanqueamiento de textiles, cerillos y fuegos pirotécnicos. Sustancias químicas que contienen manganeso presentan diversos usos, por ejemplo, el aditivo de combustible llamado metilciclopentadienilo tricarbonilo manganeso (MMT), algunos fungicidas como el maneb y mancozeb) y como agentes de contraste en las imágenes de resonancia magnética (Santamaria, 2007).

Absorción, distribución, metabolismo y excreción del manganeso

El manganeso se encuentra naturalmente en frutos secos, semillas, chocolate, leguminosas, almejas, frutas y vegetales con hojas (espinacas) y su consumo diario va de 0.9 a 10 mg/día para adultos (Farina, 2013), mientras que el consumo recomendado es de 2.3 y 1.8 mg/kg para hombre y mujeres, respectivamente (Sistrunk, 2007). Aproximadamente del 3-5% del manganeso ingerido se absorbe por el tracto gastrointestinal, y se transporta al hígado por la vena portal, el resto es excretado en las heces. Esta absorción está muy regulada y cualquier exceso de manganeso ingerido se excreta a través de la bilis (Au, 2008). Se sabe que el manganeso tiene once estados oxidativos (Takeda, 2003), aunque, en ambientes

biológicos, el manganeso existe comúnmente como Mn^{2+} y Mn^{3+} , el 80% de Mn^{2+} en plasma está unido a la β 1-globulina y albúmina (Foradori, 1967) y una fracción menor de manganeso se une a la transferrina. Cuando forma un complejo con transferrina, el manganeso se encuentra presente exclusivamente como Mn^{3+} (Aisen, 1969).

La absorción de manganeso a través de los pulmones ocurre principalmente por exposición ocupacional, que se considera la fuente principal de toxicidad de manganeso en humanos. Solamente las partículas con un diámetro aerodinámico menor que $5 \mu m$ llegan a los alvéolos pulmonares. Ahí, el manganeso se absorbe en forma iónica y pasa al flujo sanguíneo para ser transportado a diferentes tejidos. El estado de oxidación que se absorbe más rápido es Mn^{2+} (Andersen, 1999) y del 60 al 70% del manganeso inhalado es expulsado del pulmón por movimientos mucociliares y es tragado (Mena, 1974)

Papel biológico del manganeso

El manganeso es un ion metal ubicuo esencial necesario para un crecimiento normal, para un buen desarrollo y para la homeostasis celular (Erickson, 2005). Es importante para la mineralización de los huesos, energía celular y regulación del metabolismo, respuesta inmunológica, y protección celular contra especies reactivas de oxígeno. Tanto en humanos como en animales, el manganeso tiene un papel fundamental en el desarrollo y funcionamiento del cerebro como cofactor de varias enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de neurotransmisores, por ejemplo, la glutamina sintetasa (Takeda, 2003), arginasa (Shishova, 2009), piruvato descarboxilasa (Zwingmann, 2004) y superóxido dismutasa mitocondrial (Hearn, 2003).

Bioacumulación del manganeso

El manganeso se acumula principalmente en el cerebro, a donde puede entrar por tres rutas: 1) las células endoteliales de los capilares cerebrales de la barrera hematoencefálica (Rabin, 1993), 2), el plexo coroideo hacia el fluido cerebroespinal y después hacia el cerebro (Murphy, 1991), y 3) el nervio olfatorio hacia la cavidad nasal directo al cerebro (Brenneman, 2000).

Parkinsonismo

El parkinsonismo se refiere a un cuadro clínico caracterizado por temblor, bradicinesia y rigidez, que comprende una amplia gama de trastornos neurológicos; la importancia de conocerlo radica en distinguirlo de la enfermedad idiopática de Parkinson; tiene síntomas más diseminados que los de la

enfermedad idiopática de Parkinson ya que generalmente afecta diferentes sistemas y órganos. El parkinsonismo tiene sus bases anatómicas y fisiológicas en los circuitos de los ganglios basales y, sobre todo, en las vías dopaminérgicas (Tisch, 2004). Técnicamente, cualquier circunstancia que altera la función dopaminérgica en estos niveles de integración podrá semejar un cuadro clínico similar al de la enfermedad idiopática de Parkinson. El sistema nigroestriatal tiene receptores D1 y D2 para la dopamina, se encarga de la modulación y ejecución de programas motores y su lesión experimental produce lentitud en el movimiento y prolongación de los tiempos de respuesta, un cuadro de parkinsonismo (Missale, 1998). Estrictamente, la enfermedad idiopática de Parkinson explica el 80% de los casos (Hughes, 1992), se diagnostica incorrectamente en 25% (Rajput, 1991) y 10% de los que vivieron con este diagnóstico será reclasificado por autopsia (Hughes, 1992).

Existen diferentes tipos de parkinsonismo: parkinsonismo más demencia, parkinsonismo inducido por fármacos, parkinsonismo asociado a tóxicos, parkinsonismo asociado a otras causas. Se sospecha parkinsonismo cuando hay “características atípicas” de la enfermedad idiopática de la enfermedad de Parkinson como la falta de respuesta a la levodopa, alucinaciones en ausencia de fármacos alucinógenos, inestabilidad postural o demencia prominente durante el primer año de diagnóstico, suspensión abrupta de la marcha, disautonomías tempranas y severas, parálisis de la vista hacia arriba, y movimientos anormales diferentes al temblor (Joachim, 1987).

Entre los factores de riesgo asociados al parkinsonismo más ampliamente estudiados se encuentra la exposición a pesticidas y herbicidas, la exposición ocupacional a metales pesados, exposición a solventes y la exposición a múltiples infecciones virales (Castro, 2014).

Rotenona

Aunque esta sustancia natural está presente en diferentes plantas, la fuente más importante de la rotenona (Rot) es la raíz seca de *Derris sp.*, que viene de América Central y América del Sur. Se formula como polvos y aerosoles (menos del 5% del ingrediente activo) para su uso en jardines y en cultivos alimentarios. Varios productos contienen butóxido de piperonilo como sustancia sinérgica; en algunos productos comerciales, se incluyen otros pesticidas. La rotenona se degrada con rapidez en el ambiente. Las emulsiones de rotenona se utilizan en lagos y lagunas para eliminar peces.

ANTECEDENTES

El manganeso es esencial, pero a pesar de esto, la exposición excesiva a manganeso por períodos de seis meses a dos años está asociado con desordenes psiquiátricos, motores y cognitivos y a esta enfermedad se le conoce como manganismo (Perl y Olanow, 2007). La neurotoxicidad del manganeso puede ser causada por inhalación crónica de aire con concentraciones de manganeso mayores a 5 mg/m³ (Pal, 1999). También puede ser causada por nutrición parenteral (Hardy, 2009), consumo de agua potable con una alta concentración de manganeso (Bouchard, 2007) y en falla crónica del hígado (Rose, 1999).

Neurotoxicidad del manganeso

El primer registro que se tiene de la neurotoxicidad del manganeso data de 1837 por James Couper (1837), quien describió a cinco pacientes que trabajaban en una planta de extracción de manganeso en Francia que presentaban debilidad muscular, mala postura, hablaban con murmullo, temblor de extremidades y salivación (Couper, 1837). En 1941, se reportaron los primeros casos de intoxicación ambiental ocasionada por el consumo de agua contaminada (Kawamura, 1941). Después, varios casos de intoxicación por manganeso se reportaron en mineros, soldadores, fundidores, y trabajadores en fábricas de baterías (Greenhouse, 1971). Los síntomas de la toxicidad del manganeso se pueden observar hasta dos años después de la exposición y puede progresar lentamente (Calne, 1994).

Manganismo

A la primera fase de los síntomas psiquiátricos se le llama “locura mangánica”, la cual se caracteriza por manías, conducta compulsiva o violenta, alucinaciones, problemas para comer y dormir, problemas sexuales y muy pocos (o muy sutiles) efectos motores. Después, ocurre una fase conocida como “estable”, la cual se caracteriza por la aparición de síntomas motores como la bradiquinesia, rigidez junto con temblor, inestabilidad en la postura, problemas al hablar (Rodier, 1955), problemas al caminar que pueden ser seguidos por disartria y escritura deteriorada, así como distonía axial y en las extremidades (Calne, 1994). Una característica particular es lo que se conoce como “*cock walk*”, en la que los pacientes caminan sobre los dedos de sus pies, con los codos flexionados y la espalda derecha. Además, los pacientes con manganismo desarrollan un aumento en la disfunción neurológica mucho tiempo después de que cesó la exposición y el manganismo se volvió irreversible (Huang, 1993). Aunque el manganismo puede ser reversible si se diagnostica adecuadamente en etapas tempranas y se trata

con quelantes (Huang, 2007). El manganeso también se ha considerado como una neurotoxina potencial que participa en la patogénesis de encefalopatía hepática (Layrargues, 1998). En pacientes con enfermedad crónica de hígado, el manganeso se acumula en la sangre y en el cerebro, lo que se correlaciona con la presencia de síntomas extrapiramidales. Un trasplante de hígado hace que los síntomas desaparezcan.

Epidemiología del manganismo

Dentro de los estudios epidemiológicos, Lucchini *et al.* (1999) examinó los efectos neurotóxicos del manganeso en trabajadores italianos, encontrando una disminución en la función motora, en la memoria, en la función cognitiva y la presencia de temblores en comparación con sujetos control. Además, observaron una correlación positiva entre las concentraciones del manganeso transportado por aire en el polvo total y en manganeso en sangre. Debido a los síntomas que presenta, el manganismo se clasifica como un parkinsonismo asociado a tóxicos.

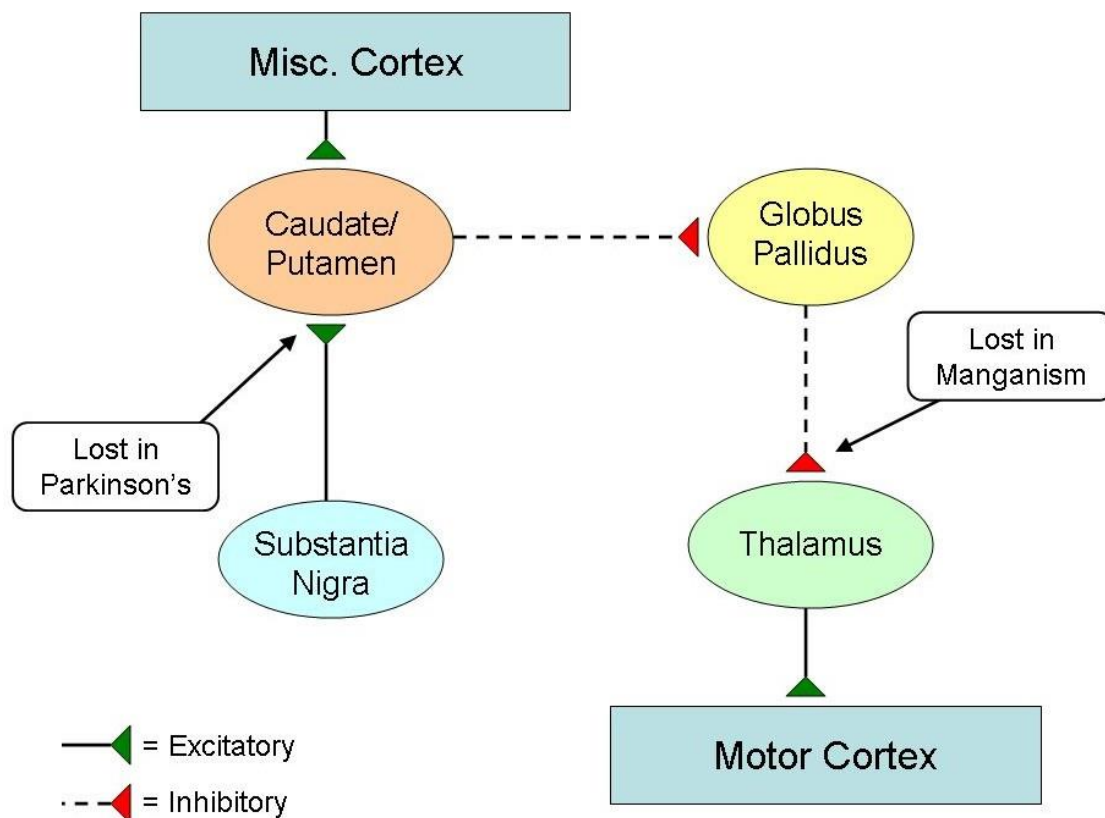


Figura 2. Esquema que muestra la diferencia entre la pérdida de vías tanto en manganismo como en Parkinson. En el manganismo, la vía inhibitoria es la más dañada pues el manganeso afecta a

las neuronas GABAérgicas mientras que en Parkinson es la vía excitatoria al dañar principalmente las neuronas dopaminérgicas.

Plaguicidas

Los plaguicidas, también conocidos como pesticidas, son sustancias destinadas a combatir plagas o pestes (FAO, 2011). El empleo de plaguicidas es la actividad más frecuente para controlar organismos no deseados en los campos agrícolas o en estanques pesqueros. Además de que su uso afecta a los trabajadores, de una manera menos notoria suele involucrar prácticamente a la totalidad de la población y por lo tanto, es un riesgo de salud pública como consecuencia de los residuos de pesticidas que pueden presentarse en los alimentos.

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo al organismo que controlan, al modo en el cuál actúan, a los usos a los que están destinados, o a su composición química. Químicamente se dividen a los plaguicidas en orgánicos, inorgánicos y biológicos. La siguiente tabla, tomada de Ortiz (2013) muestra una clasificación de los plaguicidas:

Organismos que controlan	Uso al que se destinan	Modo de acción	Compuestos químicos
Insecticida	Agrícolas	Por contacto	Orgánicos
Acaricida	Forestales	Por ingestión	Inorgánicos
Fungicida	Urbanos	Sistémico	Biológicos
Bactericida	Jardinería	Fumigante	
Antibiótico	Pecuarios	Repelente	
Herbicida	Domésticos	Defoliante	
Rodenticida	Industriales		
Molusquicida			

Tabla 1. Tomada de Ortiz, 2013. Clasificación de los plaguicidas.

Una de las principales fuentes de exposición a los plaguicidas y a sus residuos es el medio ambiente. Una vez que se realiza la fumigación, los residuos de plaguicidas se depositan en el suelo y a través de procesos de infiltración, los compuestos pueden ser arrastrados por la lluvia hasta alcanzar cuerpos de agua con la constante transferencia a los organismos acuáticos o eventualmente pueden llegar a mantos freáticos de donde pueden extraerse a través de pozos para el aprovechamiento humano. Por otro lado, a través de la dispersión por aire, los plaguicidas pueden entrar por contacto directo con los insectos, animales de granja, frutas, verduras, semillas y así incorporarse en la cadena alimenticia. Adicionalmente, debido a sus propiedades lipofílicas, algunos pesticidas tienen la capacidad de bioacumularse, por lo que el consumo de alimentos ricos en grasa representa otra ruta de exposición.

Sin embargo, el mayor riesgo se encuentra por la exposición directa; los trabajadores agrícolas y las personas que viven cerca de los sitios donde se realizan su aplicación en cultivos se encuentran en contacto con diversos plaguicidas de forma permanente y por periodos prolongados. Una vez que los plaguicidas entran en contacto con el ambiente, estos son susceptibles a procesos de degradación físicos, químicos y biológicos, sin embargo, bajo ciertas condiciones los productos químicos pueden mantenerse en el ambiente por largos períodos, por ejemplo, en las aguas freáticas o en los tejidos de los organismos incrementando el riesgo potencial al ambiente y a la salud humana (Sherine, 2010)

Un daño crónico se presenta cuando se ha estado en contacto con concentraciones bajas de un producto, el efecto se manifiesta después de varios meses e incluso años; por el contrario, un daño agudo se presenta cuando por algún evento extraordinario el organismo entra en contacto directo con la sustancia tóxica a altas concentraciones, tal es el caso de derrames e ingestión. Un ejemplo de plaguicida que tiene un gran efecto adverso sobre la salud es la rotenona.

Mecanismo de acción de la rotenona

La acción tóxica de la rotenona radica en su acción sobre la cadena de electrones mitocondrial, ya que tiene la capacidad de inhibir al complejo I de dicha cadena (el complejo NADH deshidrogenasa), y bloquea la respiración celular. Tal como la exposición prologada a manganeso produce un parkinsonismo conocido como manganismo, la rotenona también causa parkinsonismo y debido a esto, se utiliza para generar un modelo experimental de Parkinson. El modelo de Parkinson producido por la rotenona provee ciertas ventajas, como la inhibición sistémica del complejo I mitocondrial, afectación de diferentes vías (estrés oxidativo, agregación

y cuerpos de Lewy), degeneración selectiva del sistema dopaminérgico nigroestriatal, al modelar la patogénesis de esta enfermedad (Betarbet et al, 2000). En este modelo, la inhibición del complejo I mitocondrial produce degeneración selectiva del sistema dopaminérgico nigroestriatal y reproduce características patológicas clave de la enfermedad de Parkinson, como la pérdida de neuronas dopaminérgicas en sustancia nigra. De hecho, la administración de rotenona resulta en: estrés oxidativo, fosforilación y agregación de alfa-sinucleína y degradación proteosomal de proteínas (Betarbet et al.,2006).

A pesar de que ya tiene algunos años, el modelo de Parkinson inducido por rotenona es relativamente nuevo en comparación con el modelo inducido por 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina) y el de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina) (Tadaiesky et al., 2008). Aunque estos modelos tienen un gran valor experimental, no imitan exactamente las características de la enfermedad de Parkinson y por lo tanto, no han sido exitosos para generar opciones terapéuticas capaces de prevenir o ralentizar la progresión de la muerte celular.

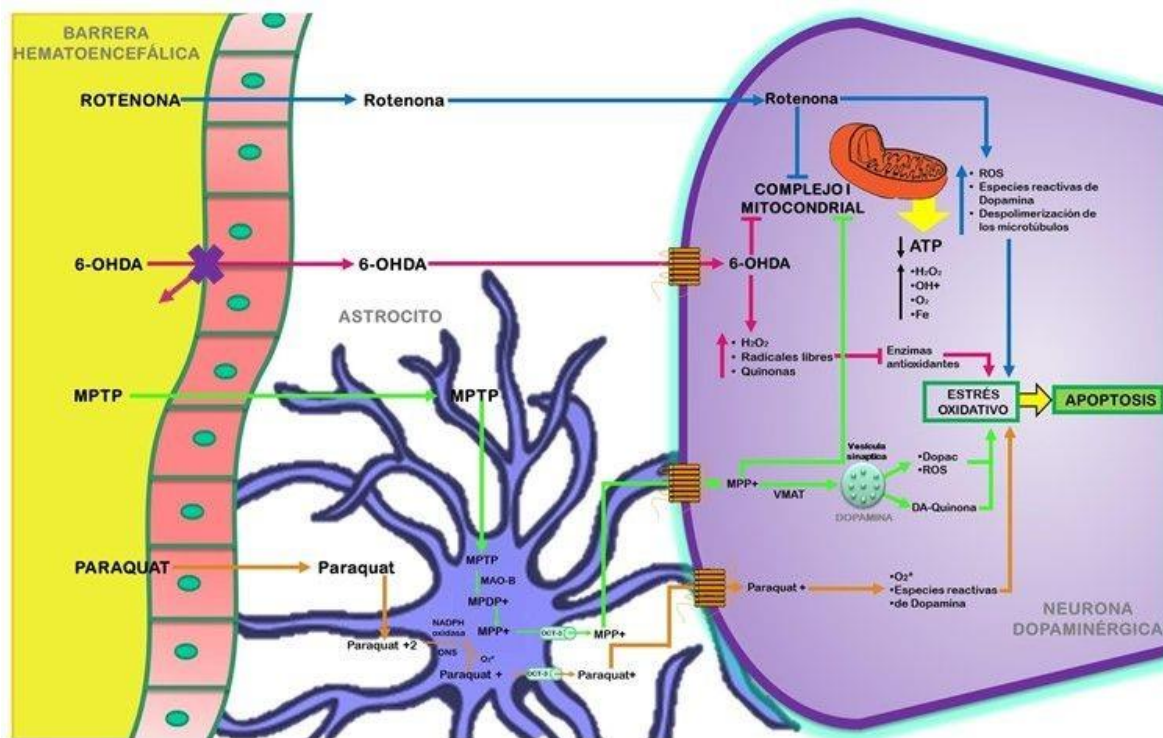


Figura 3. Mecanismos de acción de diferentes químicos que funcionan como modelos de la enfermedad de Parkinson, entre estos químicos encontramos la rotenona. Imagen obtenida de Castañeda- Achutiguí, 2010.

Así, sigue latente la necesidad de contar con modelos que permitan estudiar los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la eficacia de posibles tratamientos neuroprotectores (Obeso et al., 2017). Las principales limitaciones del modelo de rotenona son: 1) la variabilidad en el porcentaje de animales que desarrollan una lesión dopaminérgica nigroestriatal, 2) la magnitud de la lesión y 3) la ubicación de la lesión y la distribución en el cuerpo estriado.

La rotenona se ha utilizado previamente como potenciador para otros químicos en el estudio de la enfermedad de Parkinson, por ejemplo el estudio de Gao y colaboradores en 2003 donde la usaron junto con un lipopolisacárido inflamógeno y observaron que sí existe una sinergia entre ellos y por lo tanto, la etiología de la enfermedad de Parkinson es multifactorial. Así que es posible una sinergia entre la rotenona y el manganeso, pues ambos son dos factores de riesgo en la enfermedad de Parkinson.

En comunidades rurales, donde se practica la minería y la agricultura o el cultivo de camarón, podemos encontrar a la rotenona y al manganeso como factores de riesgo, así que la población está más expuesta a desarrollar un parkinsonismo asociado a tóxicos.

Tanner y colaboradores en 2011 realizaron un estudio en el que determinaron si los pesticidas pueden causar disfunción mitocondrial o estrés oxidativo y si esto está asociado con parkinsonismos en poblaciones humanas. Concluyeron que la los parkinsonismos en esa población sí están relacionados con el uso de los pesticidas estudiados: paraquat y rotenona.

Mientras que hay varios estudios en cuanto a la exposición humana al manganeso donde se muestran las distintas afectaciones que presentan los humanos al estar expuestos al manganeso. Por ejemplo, Khan y colaboradores en 2012 observaron que el agua potable contaminada con manganeso, provoca efectos adversos en las funciones cognitivas de los niños lo que puede indicar una neurotoxicidad debido a la exposición a manganeso.

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la enfermedad de Parkinson es el resultado de interacciones complejas entre factores ambientales y genéticos. Dos estresantes ambientales químicamente distintos relevantes para esta enfermedad son la rotenona y el manganeso. Conocer si la exposición a la primera potencia la neurotoxicidad del segundo, contribuirá al conocimiento respecto de la interacción de factores ambientales para el daño de las estructuras cerebrales involucradas con la enfermedad de Parkinson.

HIPÓTESIS

Si la rotenona y el manganeso actúan juntos entonces provocarán un parkinsonismo más marcado, reflejándose en una disminución de la conducta exploratoria y en la cantidad de neuronas dañadas tanto en estriado como en sustancia *nigra*.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Determinar si la exposición a rotenona potencia la neurotoxicidad del manganeso.

Objetivos particulares.

- Evaluar la conducta exploratoria en ratas tratadas con rotenona, manganeso y en combinación.
- Evaluar el daño neuronal en estriado, globo pálido y sustancia nigra en ratas tratadas con rotenona, manganeso y en combinación.
- Evaluar la expresión de TH en neuronas dopaminérgicas como indicativo de daño sobre la sustancia *nigra*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron 24 ratas macho de la cepa *Wistar*, con un peso de 250-300 gramos aproximadamente, mantenidas en condiciones controladas de luz-oscuridad (12 horas/ 12 horas), con agua y alimento *ad libitum*, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo en estos animales de experimentación se apegaron a la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

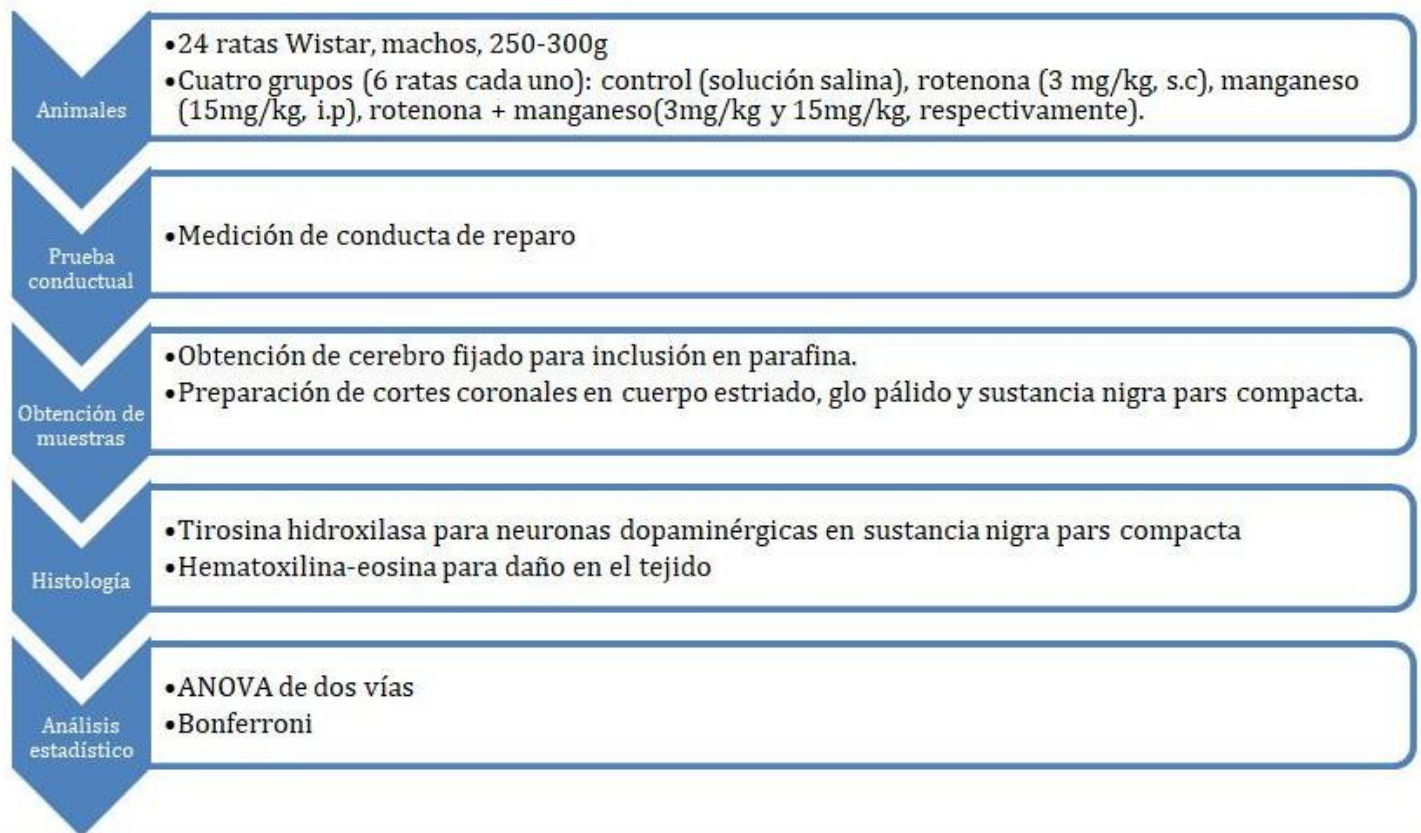


Figura 4. Diseño experimental

Tratamiento de los animales

Las 24 ratas se dividieron en cuatro grupos, con 6 ratas cada uno: 1) Control, al que se le administró 1 mL de solución salina (PISA, Ciudad de México, México); 2) Rot, al que se le administró rotenona (Sigma-Aldrich 45656, Darmstadt, Germany) 3 mg/kg/24 h por 8 días vía subcutánea; 3) Mn, al que se le administró cloruro de manganeso (Sigma-Aldrich 328146) 15 mg/kg/24 h por 8 días vía intraperitoneal y 4) Rot+Mn, al que se le administró tanto rotenona como manganeso en las dosis mencionadas. El tratamiento se administró durante ocho días a la misma hora (11:00-12:00 am) para lograr una diferencia de 24 horas entre cada inyección. La dosis de rotenona se eligió de acuerdo al diseño experimental de Serrano-García et al. (2018), mientras que la dosis de manganeso se eligió de acuerdo al diseño experimental de Sadeghi et al. (2018).

Medición de conducta de reparo



Figura 5. Imagen demostrativa de la conducta de reparo. El animal de estudio se coloca en un cilindro de acrílico por cinco minutos y se cuentan las veces que coloca las extremidades superiores en las paredes del cilindro.

Después de 24 horas de la última administración de rotenona y/o manganeso se midió la conducta de reparo utilizando un cilindro de acrílico de 20 cm de diámetro y 30 cm de alto, de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Gharbawre et al. (2004). La prueba se realizó en un cuarto oscuro a las 7 de la mañana, utilizando luz roja ya que la longitud de onda de la luz roja no es percibida por los animales. Cada animal se colocó individualmente dentro del cilindro por cinco minutos y se contó el número de veces que el animal colocó las extremidades delanteras en la pared del cilindro. El resultado se expresó como el número de levantamientos/5 minutos.

Análisis histológico

Después del tratamiento y de la medición de conducta de reparo, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (80 mg/kg, vía intraperitoneal) y se perfundieron vía intracardiaca con solución salina seguida de paraformaldehído (Sigma-Aldrich P6148) al 4% en PBS. El cerebro fijado se colocó en un frasco con

paraformaldehído al 4% en PBS, para posteriormente ser deshidratado por una serie de soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (Histokinette 2000, Leica, Wetzlar, Alemania) y finalmente ser incluido en parafina. Los cerebros incluidos en parafina, se cortaron con un micrótopo en las zonas de cuerpo estriado, globo pálido y sustancia *nigra*, obteniendo cortes coronales de 5 μm , en los que se analizó la morfología celular y la expresión de tirosina hidroxilasa.

Tinción de hematoxilina-eosina

Los cortes se colocaron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina. Se desparafinaron y permeabilizaron con una serie gradual de etanol a concentraciones crecientes y se mantuvieron en hematoxilina, que tiñe la cromatina del núcleo, durante 5 minutos. Después se lavaron con agua destilada, se sumergieron en agua amoniacal y nuevamente se lavaron con agua destilada. Se sumergieron en eosina, colorante ácido que se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular, por 30 segundos y se lavaron con agua destilada. Los cortes se montaron con medio de montaje (Merck, 107961, Darmstadt, Germany). Para la cuantificación, se capturaron imágenes usando una amplificación de 40X de las áreas de interés (cuerpo estriado, globo pálido y sustancia nigra) utilizando un microscopio Eclipse E200 adaptado software Q-Capture Pro-7 (Nikon Inc., Melville, NY, EUA). La cuantificación se hizo manualmente utilizando las fotografías tomadas, contando los núcleos celulares dañados en diferentes zonas de las regiones estudiadas. Se consideraron “núcleos dañados” aquellos que presentaban ciertas características como: deformación (alargamiento tanto del núcleo como de toda la célula), se percibe el núcleo roto, encogido (tanto el núcleo como la célula completa) y condensación de la cromatina.

Inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa (TH)

Para la detección de neuronas dopaminérgicas en sustancia *nigra*, los cortes se bloquearon con una solución de BSA 5% más tritón X-100 1% en PBS por 2 horas a temperatura ambiente y después se incubaron por 48 horas a 4°C con un anticuerpo primario policlonal anti-tirosina hidroxilasa (dilución 1:100). Después, se hicieron tres lavados con PBS y los cortes se incubaron por una hora con anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:500) del kit comercial ABC Vectastain (Vector, Laboratories, Burlingame, California, EUA) seguida de una hora con estreptavidina-HRP (una gota/mL) del mismo kit, haciendo tres lavados con PBS entre cada paso. La marca se visualizó utilizando diaminobencidina (Biogenex, HK 130-5K, Fremont, California, EUA). Para cuantificación, se capturaron imágenes

usando una amplificación de 40X del área de interés, sustancia nigra, utilizando un microscopio Eclipse E200 adaptado software Q-Capture Pro-7 (Nikon Inc., Melville, NY, EUA). La cuantificación se hizo manualmente, contando el número de neuronas con marca positiva a tirosina hidroxilasa a lo largo de la sustancia *nigra*. Para esto, se dividió la sustancia nigra en cinco partes y se contaron las neuronas con marca de TH en 12 diferentes cortes de un solo animal. Posteriormente, se sumó el total de neuronas por grupo experimental y se tomó el control como el 100%.

Análisis estadístico

Los datos son expresados como media \pm error estándar de la media (ESM) y se analizaron con una ANOVA de dos vías para los resultados del peso corporal y una ANOVA de una vía para los demás resultados seguida de una prueba *post hoc* Bonferroni, usando el software Prism 5.0 (Graphpad software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

Peso y conducta

Peso corporal

El peso corporal es un indicador importante para la intoxicación por sustancias químicas (Jacquier, 2014). Estudios previos han demostrado que la administración de nanopartículas tóxicas como AgNPs y ZnNPs disminuyeron significativamente la tasa de crecimiento del peso corporal en ratas (Jacquier, 2014). Por lo tanto, para investigar si la exposición a $MnCl_2$ y/o a rotenona disminuye la tasa de aumento en el peso corporal, las ratas se pesaron diario antes de la administración del tratamiento. Los resultados observados en la figura 2 muestran que la curva progresiva del peso corporal fue afectada con la administración de $MnCl_2$, ya sea administrado solo o junto con la dosis de rotenona, als er estos los grupos con diferencias significativas respecto al grupo control y que la disminución del peso corporal es dependiente del tiempo. Las ratas del grupo manganeso fueron las que mostraron una pérdida de masa muscular altamente visible, aunque el menor peso lo tuvieron las ratas del grupo Rot+Mn, lo que nos indica que sí hay una potenciación de daño con estos dos químicos.

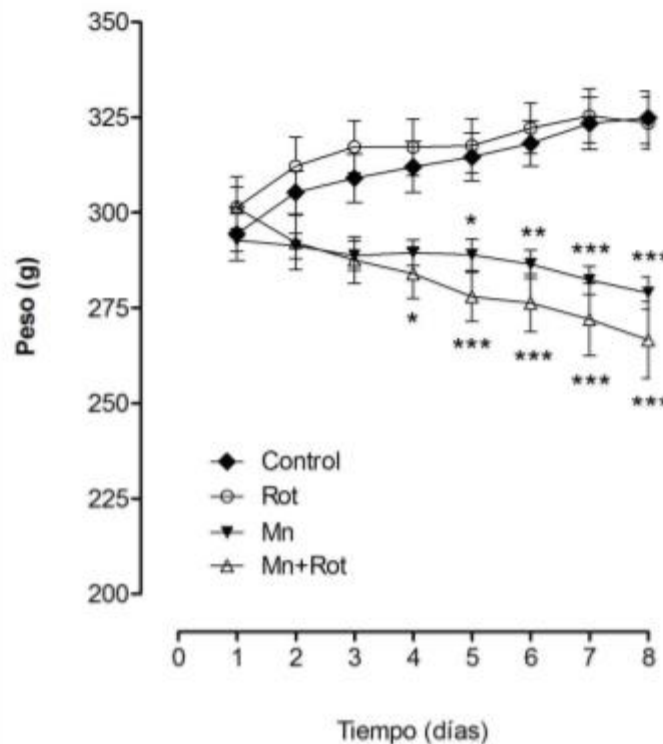


Figura 6. **Cambios en el peso corporal durante el tiempo que duró el tratamiento.** Los resultados muestran pérdida de peso en ratas tratadas con manganeso solo o en combinación con rotenona. Los datos se muestran con media \pm error estándar (ESM). * $p < 0.05$ vs control. ** $p < 0.01$ vs control. *** $p < 0.001$ vs control. F = 2.49

Conducta de reparo

La administración de manganeso afectó la conducta de reparo de los animales ya sea que la administración fuera solamente de manganeso o si también se administró rotenona, como se observa en la figura 3, donde las ratas tratadas con manganeso registraron un menor número de levantamientos. Se encontró una diferencia significativa en el grupo de Mn y Rot+Mn, donde se presentaron en promedio solo 17 levantamientos, mientras que para los animales del grupo control fue de alrededor de 35 levantamientos. Además, estos grupos también presentaron diferencias significativas contra el grupo de rotenona que tuvo en promedio 32 levantamientos.

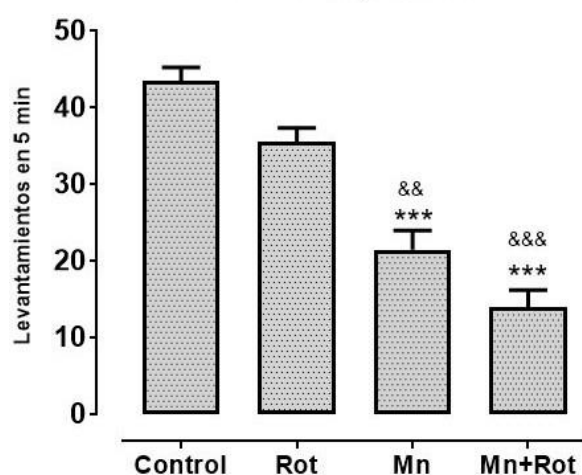


Figura 7. **Actividad motora de ratas Wistar tratadas con rotenona y/o manganeso.** La determinación se llevó a cabo 24 horas después de la última administración de rotenona y/o manganeso. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni. *** $p < 0.0001$ vs control. && $p < 0.001$ vs Rot. $F = 0.42$

Expresión de TH

Se analizó el efecto de la rotenona y el manganeso en el número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra*. Se realizó un análisis inmunohistoquímico de tirosina- hidroxilasa (TH), y se contaron las neuronas con marcaje positivo a TH para conocer qué tanto afectaron los tratamientos de rotenona y manganeso a las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en la sustancia *nigra*. Las imágenes representativas de neuronas positivas a TH en la sustancia *nigra* se muestran en la figura 4 A-D. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos comparados al control, o entre grupos experimentales. La cuantificación se hizo manualmente, contando el número de neuronas con marca positiva a tirosina hidroxilasa a lo largo de la sustancia *nigra*.

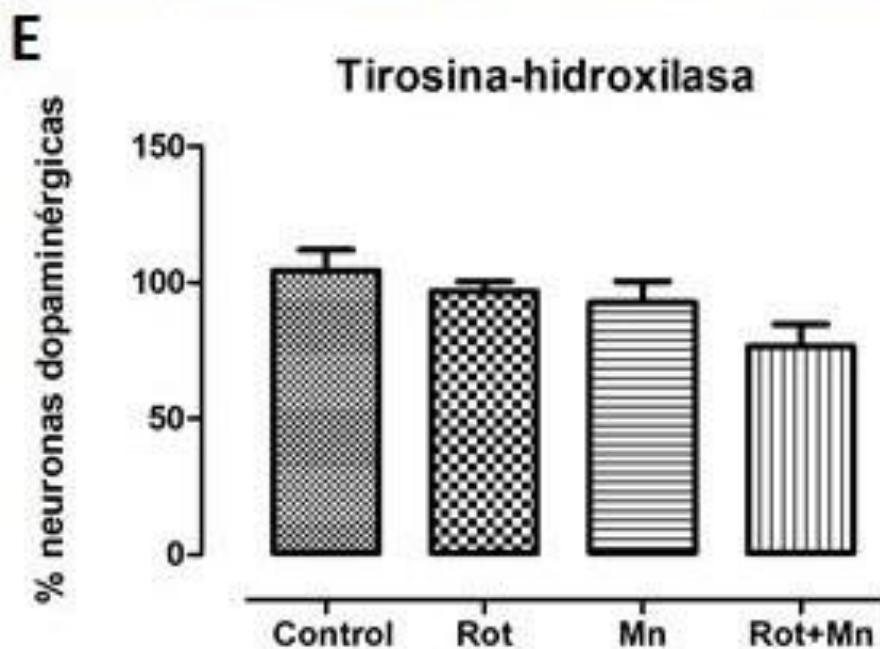
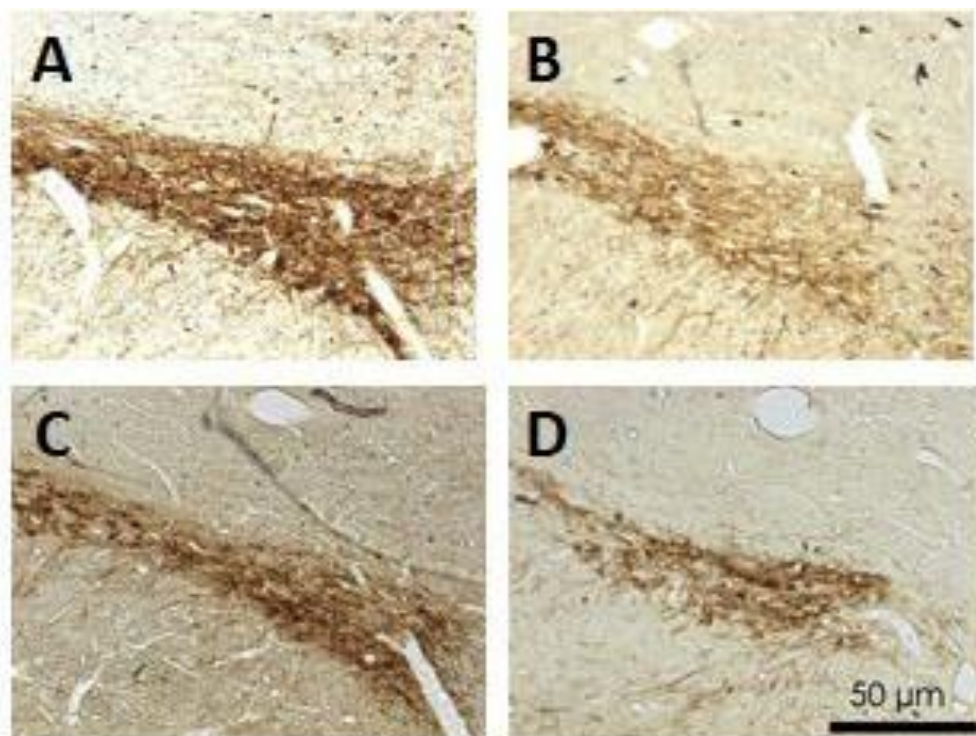


Figura 8. **Efecto de la administración de rotenona y manganeso en la expresión de tirosina-hidroxilasa.** Imágenes representativas: A) Control, B) Rotenona, C) Manganeso y D) Rotenona+ manganeso.

La cuantificación (E) muestra que no hay diferencias significativas (n= 4 por grupo). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Bonferroni. $F=2.82$

Tinción de hematoxilina-eosina

El análisis histológico de la tinción de hematoxilina-eosina mostró núcleos celulares dañados en cuerpo estriado, globo pálido y sustancia *nigra* en ratas tratadas con rotenona, manganeso o en combinación comparado con el grupo control, como se puede observar en la figura 5.

Al hacer la cuantificación de núcleos celulares dañados, se encontraron diferencias significativas en cuerpo estriado, para las ratas que pertenecían al grupo Mn y Rot+Mn, mientras que tanto para globo pálido como para sustancia *nigra pars compacta* las diferencias significativas fueron en los tres grupos experimentales: Rot, Mn y Rot+Mn, como podemos observar en las gráficas de la figura 6. Se consideraron “núcleos dañados” aquellos que presentaban ciertas características como: deformación (alargamiento tanto del núcleo como de toda la célula), se percibe el núcleo roto, encogido (tanto el núcleo como la célula completa) y condensación de la cromatina. Se puede observar en la imagen como tanto rotenona como manganeso causan necrosis en las células de cuerpo estriado y globo pálido mientras que en sustancia nigra se observa que las células empiezan a perder su forma característica.

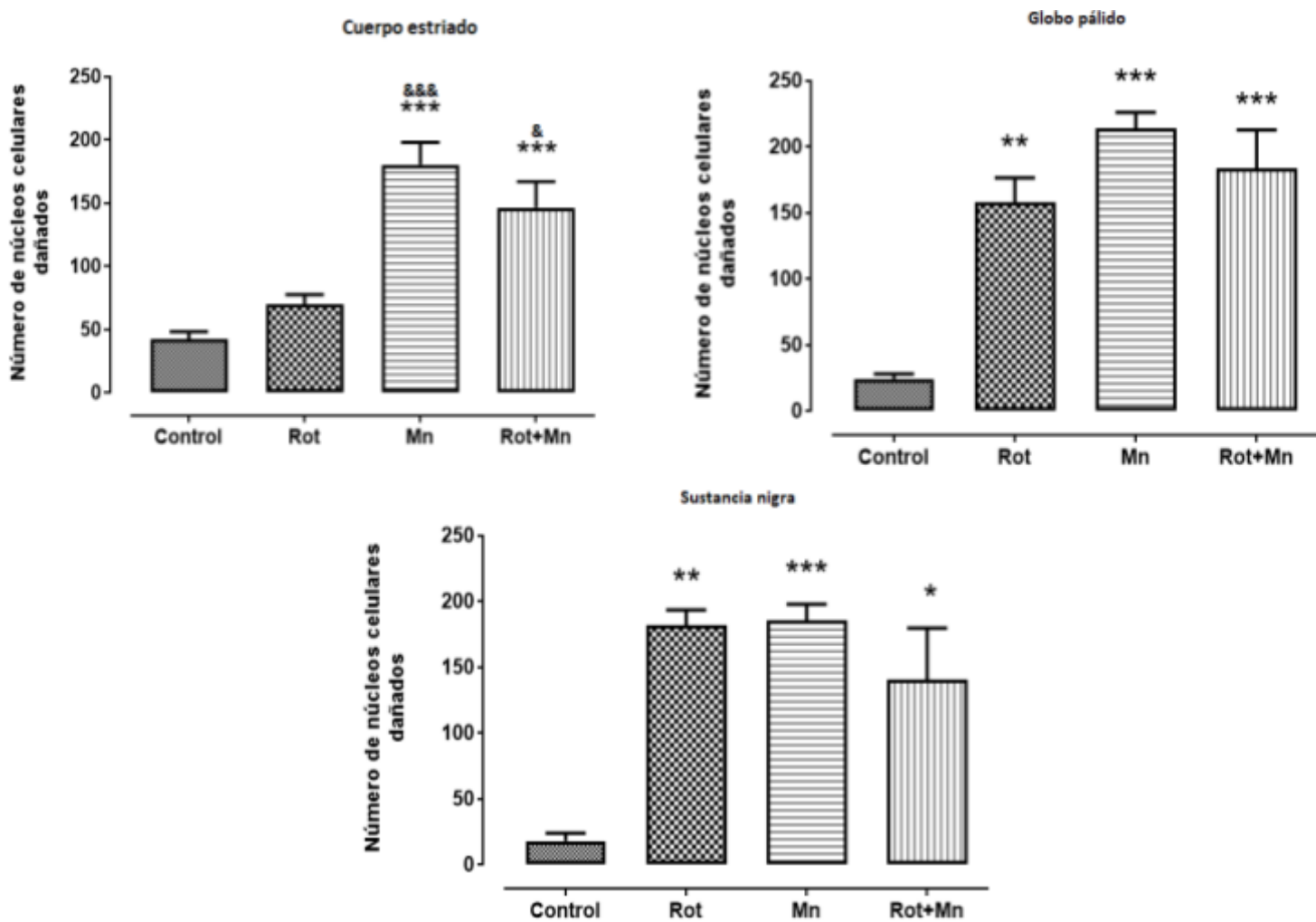


Figura 9. **Cuantificación de núcleos celulares dañados en cuerpo estriado, globo pálido y sustancia nigra.** Los datos se muestran con media \pm error estándar (ESM). * $p < 0.05$ vs control. ** $p < 0.01$ vs control. *** $p < 0.001$ vs control &&& $p < 0.0001$ vs Rot. Valor de F para cuerpo estriado= 18.65; para globo pálido= 16.56; para sustancia nigra= 10.47.

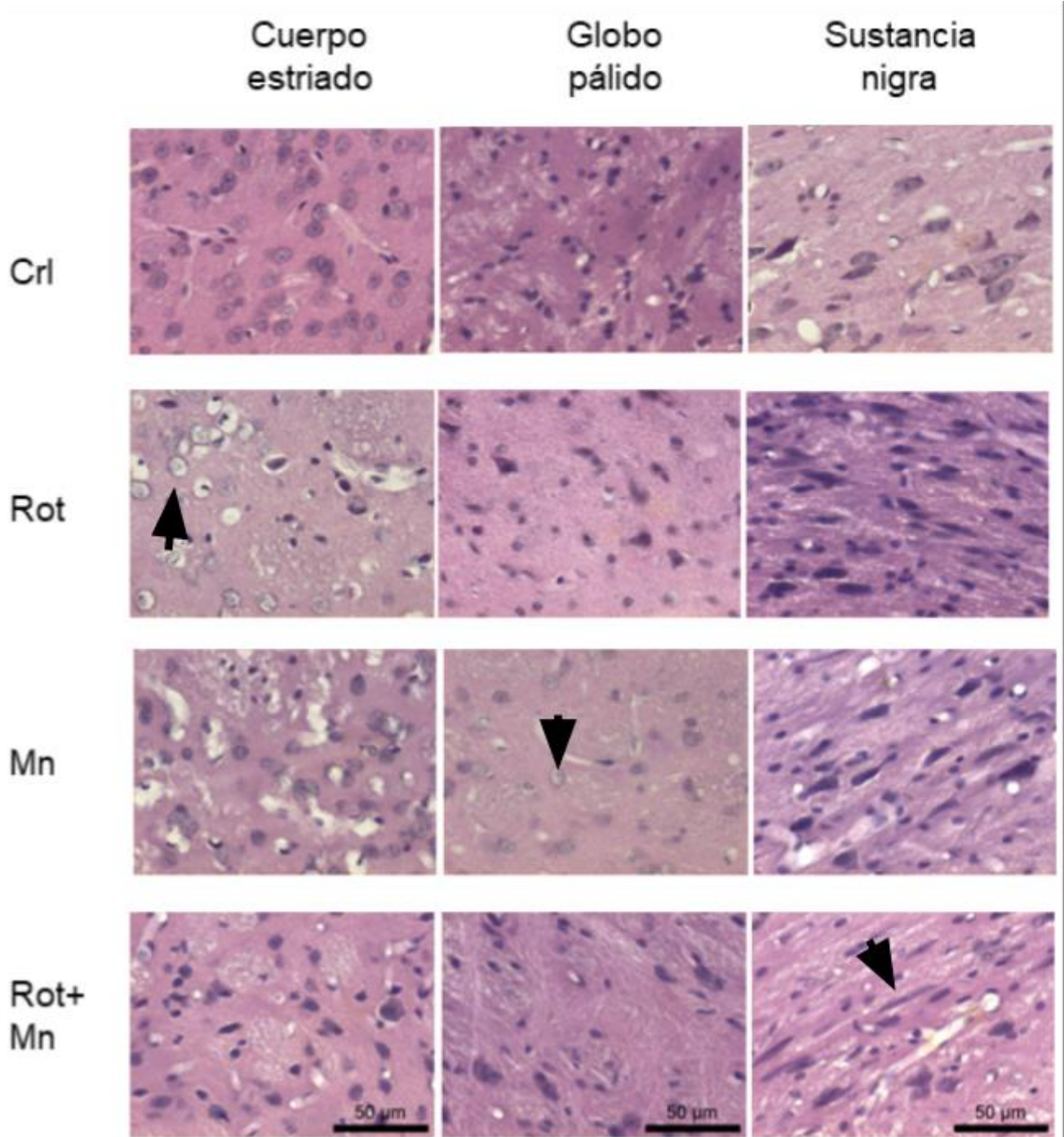


Figura 10. Tinción de hematoxilina-eosina. Cortes coronales de cuerpo estriado, globo pálido y sustancia nigra a un aumento de 40X. Las flechas indican núcleos celulares dañados.

DISCUSIÓN

El modelo de Parkinson inducido por la rotenona está asociado con daño neuronal en las zonas de sustancia nigra y cuerpo estriado, y esto se puede manifestar en una disminución en la función motora, cambios conductuales, pérdida del peso corporal y una morfología muscular alterada. El estudio realizado por Ablat y colaboradores en 2016, muestra una disminución en el peso corporal debido a que las ratas que fueron tratadas con la rotenona (2 mg/kg) consumían menor cantidad de alimento y de agua. Al igual que en nuestro estudio, Ablat hizo un seguimiento del peso todo el tiempo que duró la administración de rotenona. Aunque en nuestro estudio, en las ratas tratadas con rotenona (3 mg/kg) no se observó esa disminución significativa de peso corporal, las variaciones son muy bajas, lo que nos indica que en un tratamiento más largo o con un mayor número de ratas podríamos encontrar estos resultados.

El manganeso provoca pérdida de peso, reduce las funciones motoras, disminuye el número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra y activa la microglia. Un estudio realizado por Li y colaboradores en 2017, muestra una disminución de peso dependiente de la dosis de manganeso administrada. El presente estudio también mostró esta disminución en el peso corporal en las ratas que fueron administradas con manganeso. En el caso del grupo tratado con rotenona y manganeso, se observa una disminución en el peso corporal que puede ser adjudicada únicamente al manganeso pues es el grupo que más bajó de peso.

Mientras que en este modelo de Parkinson inducido por rotenona se ha reportado la disminución de la conducta de reparo como el estudio de Fleming y colaboradores en 2014, en nuestro estudio no se observan diferencias significativas en el grupo de rotenona y esto puede ser explicado por el tiempo del tratamiento, aunque se observó una tendencia a la disminución pero sin llegar a ser significativa. Por lo tanto, se recomienda utilizar un tratamiento más largo, para poder observar esta disminución con un número de animales reducido.

La exposición a manganeso acelera y exacerba déficits motores, como lo ha demostrado el estudio realizado por Langley y colaboradores en 2017, quienes mostraron una disminución significativa en la conducta exploratoria erguida en aquellos animales tratados con manganeso. En el presente trabajo, también se observó esta disminución significativa tanto en el grupo de manganeso como en el grupo manganeso-rotenona, lo que nos indica que el manganeso es el causante principal de esta disminución y no la rotenona como se dijo en la hipótesis.

En este estudio se analizaron específicamente las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y a diferencia de lo reportado previamente por Pan-Montojo en 2010, donde mencionan que encontraron una reducción significativa en el número de neuronas dopaminérgicas en ratones tratados con 5 mg/kg vía oral con rotenona por seis meses, en el presente estudio no se encontró esta reducción significativa. La diferencia puede deberse a las dosis utilizadas, los autores usaron una dosis mayor que la que se utilizó en el presente estudio (3 mg/kg) y el tratamiento duró 8 días, un tiempo mucho menor que el del estudio de Pan-Montojo.

En el caso del manganeso, se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, permanecen intactas en la exposición a manganeso (Guilarte, 2010), así que nuestros resultados en la inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa en las ratas tratadas con manganeso concuerdan con esto.

El número de núcleos dañados encontrados en las ratas tratadas con rotenona es evidencia de la importancia de la rotenona como modelo de estudio de las primeras etapas del Parkinson (Johnson et al, 2015). Sin embargo, estudios previos muestran que la mayor zona afectada en este tratamiento es el cuerpo estriado (Serrano-García et al. 2018) pues es la región del cerebro que recibe las proyecciones de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra. En las zonas de globo pálido sí se encontraron diferencias significativas pues es parte de la vía dopaminérgica nigroestriatal y la sustancia nigra también presenta esta diferencia por ser el lugar donde se encuentran las neuronas dopaminérgicas.

En las ratas tratadas con manganeso, se encontraron diferencias significativas en el número de núcleos dañados comparados con los núcleos sanos en el grupo control, en las tres zonas de estudio. Reportes previos (Huang, 2007) muestran que el manganeso se acumula en globo pálido, así que esto concuerda con lo encontrado en el análisis histológico. Sin embargo, falta conocer cómo afecta el manganeso a otros tipos celulares en cuerpo estriado o cómo afecta a neuronas dopaminérgicas en sustancia nigra pues se encontraron núcleos dañados mientras que no se encontró una disminución significativa al hacer la inmunohistoquímica de tirosina-hidroxilasa.

En el grupo de ratas tratadas con rotenona y manganeso, se encontraron diferencias significativas en las tres zonas, y esta diferencia es mayor que en los tratamientos individuales, así que puede deberse a una potenciación de ambos químicos.

Se sabe que tanto la rotenona como el manganeso causan un parkinsonismo por separado, y en este estudio se ha mostrado que en el grupo de ratas tratadas con rotenona y manganeso juntos sí se ven características de parkinsonismo más marcadas, como la conducta exploratoria y la cantidad de neuronas dopaminérgicas.

CONCLUSIÓN

En este estudio, analizamos el efecto del manganeso y la rotenona tanto por separado y en conjunto.

El peso corporal disminuyó significativamente en los grupos de Mn y Rot+Mn, y en estos mismos grupos se observó una disminución significativa en la conducta de reparo. En cuanto a la inmunohistoquímica de TH, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos pero en la tinción hematoxilina-eosina, las diferencias significativas nos indicaron qué región cerebral es la más afectada en cada tratamiento. Con los resultados obtenidos, se puede observar que el manganeso es el que potencia el efecto de la rotenona y no al revés como planteamos al inicio del trabajo así que sí hay un mayor efecto cuando están juntos.

PERSPECTIVAS

Estudios posteriores nos ayudarán a comprender qué tanto el manganeso potencia el efecto de la rotenona.

REFERENCIAS

- Ablat, N., Lv, D., Ren, R., Xiaokaiti, Y., Ma, X., Zhao, X., . . . Pu, X. (2016, 08). Neuroprotective Effects of a Standardized Flavonoid Extract from Safflower against a Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. *Molecules*, 21(9), 1107. doi:10.3390/molecules21091107
- Aisen, P., Aasa, R., and Reifield, A. (1969) The chromium, manganese and cobalt, complexes of transferrin *J. Biol. Chem.* 244. 4628-4633
- Andersen M., Gearhart, J, and Clewell H. (1999) Pharmacokinetic data needs to support risk assessments for inhaled and ingested manganese. *Neurotoxicology*. 20. 161-171
- Au, C., Benedetto, A., & Aschner, M. (2008, 07). Manganese transport in eukaryotes: The role of DMT1. *NeuroToxicology*, 29(4), 569-576. doi:10.1016/j.neuro.2008.04.022
- Betarbet, R., Canet-Aviles, R. M., Sherer, T. B., Mastroberardino, P. G., Mclendon, C., Kim, J., . . . Greenamyre, J. T. (2006, 05). Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: Effects of the pesticide rotenone on DJ-1, α -synuclein, and the ubiquitin–proteasome system. *Neurobiology of Disease*, 22(2), 404-420. doi:10.1016/j.nbd.2005.12.003
- Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000, 12). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301-1306. doi:10.1038/81834
- Bocio, A.; Nadal, M.; Domingo, J. L. *Biol Trace Elem Res.* 2005, 104, 193-201
- Bouchard, M. (2007, 09). Hair Manganese and Hyperactive Behaviors: Pilot Study of School-Age Children Exposed Through Tap Water. *Epidemiology*, 18(Suppl). doi:10.1097/01.ede.0000276837
- Breneman, K. A., Wong, B. A., Buccellato, M. A., Costa, E. R., Gross, E. A., & Dorman, D. C. (2000, 12). Direct Olfactory Transport of Inhaled Manganese (54MnCl₂) to the Rat Brain: Toxicokinetic Investigations in a Unilateral Nasal Occlusion Model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169(3), 238-248. doi:10.1006/taap.2000.9073
- Bukowiecki, N.; Gehrig, R.; Hill, M.; Lienemann, P.; Zwicky, C. N.; Buchmann B.; Weingartner, E.; Baltensperger, U (2007). Atmospheric environment. 41, 878-889.
- Calne, D. B., Chu, N., Huang, C., Lu, C., & Olanow, W. (1994, 09). Manganism and idiopathic parkinsonism: Similarities and differences. *Neurology*, 44(9), 1583-1583. doi:10.1212/wnl.44.9.1583
- Castañeda-Achutiguí, F., Tejeda-Martínez, A., Escalante-Castañeda, A., Sucres-Bernes, H. A., Monterrubio-Ledezma, E., & García-Lemus, R. (2010). Classical models of Parkinson's induction. *Neurobiología*, 1.

- Castro, A., Lemos, C., Falcão, A., Fernandes, A. S., Glass, N. L., & Videira, A. (2010, 04). Rotenone Enhances the Antifungal Properties of Staurosporine. *Eukaryotic Cell*,9(6), 906-914. doi:10.1128/ec.00003-10
- Chapman, P. M.; Wang, F.; Janssen, C. R.; Goulet, R.; Kamunde, C. (2003) Human and ecological risk assessment. 9, 641-697
- Couper, J (1837) On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *Brit. Ann. Med. Pharm. Vital Stat. Gen. Sci* 1 41-42
- Davis, J. M. (1998, 02). Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl: Health Risk Uncertainties and Research Directions. *Environmental Health Perspectives*, 106, 191. doi:10.2307/3433920
- Farina, M., Avila, D., da Rocha, J., and Aschner M (2013) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem. Int.* 62 575-594
- Fleming, S. (2004, 06). Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Experimental Neurology*, 187(2), 418-429. doi:10.1016/j.expneurol.2004.01
- Foradori, A. C. (1967, 10). The Discrimination between Magnesium and Manganese by Serum Proteins. *The Journal of General Physiology*,50(9), 2255-2266. doi:10.1085/jgp.50.9.2255
- Gao, H., Hong, J., Zhang, W., & Liu, B. (2003, 02). Synergistic Dopaminergic Neurotoxicity of the Pesticide Rotenone and Inflammogen Lipopolysaccharide: Relevance to the Etiology of Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 23(4), 1228-1236. doi:10.1523/jneurosci.23-04-01228.2003
- Greenhouse, A (1971) Manganese intoxication in the United States. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 96. 248-249
- Guilarte, T. R. (2010, 11). Manganese and Parkinson's disease: A critical review and new findings. *Ciência & Saúde Coletiva*,16(11), 4519-4566. doi:10.1590/s1413-81232011001200028
- Hardy, G. (2009, 11). Manganese in Parenteral Nutrition: Who, When, and Why Should We Supplement? *Gastroenterology*, 137(5). doi:10.1053/j.gastro.2009.08.011
- Hearn, A. S., Stroupe, M. E., Cabelli, D. E., Ramilo, C. A., Luba, J. P., Tainer, J. A., . . . Silverman, D. N. (2003, 03). Catalytic and Structural Effects of Amino Acid Substitution at Histidine 30 in Human Manganese Superoxide Dismutase: Insertion of Valine C γ into the Substrate Access Channel†. *Biochemistry*, 42(10), 2781-2789. doi:10.1021/bi0266481
- Huang, C., Lu, C., Chu, N., Hochberg, F., Lilienfeld, D., Olanow, W., & Calne, D. B. (1993, 08). Progression after chronic manganese exposure. *Neurology*,43(8), 1479-1479. doi:10.1212/wnl.43.8.1479
- Huang, C (2007) Parkinsonism induced by chronic manganese intoxication an experience in Taiwan *Chang Gung Med J.* 30. 385-395
- Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L., & Lees, A. J. (1992, 03). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological

study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 55(3), 181-184. doi:10.1136/jnnp.55.3.181

- Jacquier, M., Crauste, F., Soulage, C. O., & Soula, H. A. (2014, 06). A Predictive Model of the Dynamics of Body Weight and Food Intake in Rats Submitted to Caloric Restrictions. *PLoS ONE*, 9(6). doi:10.1371/journal.pone.0100073
- Joachim, C. L., Morris, J. H., Kosik, K. S., & Selkoe, D. J. (1987, 10). Tau antisera recognize neurofibrillary tangles in a range of neurodegenerative disorders. *Annals of Neurology*, 22(4), 514-520. doi:10.1002/ana.410220411
- Johnson, M. E., Lim, Y., Senthikumar, M., Zhou, X., & Bobrovskaya, L. (2015, 12). Investigation of tyrosine hydroxylase and BDNF in a low-dose rotenone model of Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 70, 33-41. doi:10.1016/j.jchemneu.2015.11.0
- Kawamura, R., Ikuta, S., Fukusumi, R., Yamada S, and Tsubaki, T (1941) Kodoma and Kurata S. Intoxication by manganese in well water. *Kitasato Arch. Exp.* 18. 145-169
- Khan, K., Wasserman, G. A., Liu, X., Ahmed, E., Parvez, F., Slavkovich, V., . . . Factor-Litvak, P. (2012, 01). Manganese exposure from drinking water and children's academic achievement. *NeuroToxicology*, 33(1), 91-97. doi:10.1016/j.neuro.2011.12.002
- Langley, M. R., Ghaisas, S., Ay, M., Luo, J., Palanisamy, B. N., Jin, H., . . . Kanthasamy, A. G. (2018, 01). Manganese exposure exacerbates progressive motor deficits and neurodegeneration in the MitoPark mouse model of Parkinson's disease: Relevance to gene and environment interactions in metal neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 64, 240-255. doi:10.1016/j.neuro.2017.06.002
- Layrargues G., Rose, C., Spahr, L., Zayed, J., Normandin, L and Butterworth, L. (1998) Role of manganese in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy *Metab. Brain Dis* 13. 311-317
- Li, H., Fan, X., Luo, Y., Song, S., Liu, J., & Fan, Q. (2017, 09). Repeated manganese administration produced abnormal expression of circadian clock genes in the hypothalamus and liver of rats. *NeuroToxicology*, 62, 39-45. doi:10.1016/j.neuro.2017.05.007
- Llobet, J. M.; Schuhmacher, M.; Domingo, J. L. (2000) Toxicological and environmental chemistry. 77, 119-129.
- Londoño, L., Londoño, P and Muñoz, F.(2016) Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 14. 145-153
- Lucchini, R., Apostoli, P., Perrone, C., Placidi, D., Albini, E., Migliorati, P., Mergler, D., Sassine, M., Palmi, S and Alessio, L. (1999) Long-term exposure to "low levels" of manganese oxides and neurofunctional changes in ferroalloy workers. *Neurotoxicology*. 20. 287-297
- Mena I., Horiuchi, K., and Lopez, G. (1974) Factors enhancing entrance of manganese into brain: iron deficiency and age. *J. Nucl. Med.* 15 516

- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78(1):189-225
- Murphy, V. A., Wadhvani, K. C., Smith, Q. R., & Rapoport, S. I. (1991, 09). Saturable Transport of Manganese(II) Across the Rat Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*, 57(3), 948-954. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb08242.x
- Obare, S. O., De, C., Guo, W., Haywood, T. L., Samuels, T. A., Adams, C. P., . . . Fletcher, K. (2010, 07). Fluorescent Chemosensors for Toxic Organophosphorus Pesticides: A Review. *Sensors*, 10(7), 7018-7043. doi:10.3390/s100707018
- Obeso, J., Stamelou, M., Goetz, C., Poewe, W., Lang, A., Weintraub, D., . . . Stoessel, A. (2017, 09). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264-1310. doi:10.1002/mds.27115
- Ortíz, I., Avila, M., y Torres, L (2013) Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. 4. 26-46
- Pal, P., Samii, A., and Calne, D (1999) Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20. 227-238
- Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., Jung, R., . . . Funk, R. H. (2010, 01). Progression of Parkinson's Disease Pathology Is Reproduced by Intragastric Administration of Rotenone in Mice. *PLoS ONE*, 5(1). doi:10.1371/journal.pone.0008762
- Perl, D. P., & Olanow, C. W. (2007, 08). The Neuropathology of Manganese-Induced Parkinsonism. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 66(8), 675-682. doi:10.1097/nen.0b013e31812503c
- Rabin, O., Hegedus, L., Bourre, J., & Smith, Q. R. (2006, 10). Rapid Brain Uptake of Manganese(II) Across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurochemistry*, 61(2), 509-517. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb02153.x
- Rajput, A., Rozdilsky, B., & Rajput, A. (1991, 08). Accuracy of Clinical Diagnosis in Parkinsonism — A Prospective Study. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 18(3), 275-278. doi:10.1017/s0317167100031814
- Rodier, J. (1955, 01). Manganese Poisoning in Moroccan Miners. *Occupational and Environmental Medicine*, 12(1), 21-35. doi:10.1136/oem.12.1.21
- Rodrigues, M.; Formoso, M. (2005) Environmental geochemistry and health. 27, 397-408
- Rose, C., Butterworth, R. F., Zayed, J., Normandin, L., Todd, K., Michalak, A., . . . Pomier-Layrargues, G. (1999, 09). Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology*, 117(3), 640-644. doi:10.1016/s0016-5085(99)70457-9

- Sadeghi, L., Tanwir, F., & Babadi, V. Y. (2018, 09). Physiological and Biochemical Effects of Echium Amoenum Extract on Mn²⁺-Imposed Parkinson Like Disorder in Rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 8(4), 705-713. doi:10.15171/apb.2018.079
- Santamaria, A. B., Cushing, C. A., Antonini, J. M., Finley, B. L., & Mowat, F. S. (2007, 08). State-of-the-Science Review: Does Manganese Exposure During Welding Pose a Neurological Risk? *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 10(6), 417-465. doi:10.1080/15287390600975004
- Serrano-García, N., Fernández-Valverde, F., Luis-Garcia, E. R., Granados-Rojas, L., Juárez-Zepeda, T. E., Orozco-Suárez, S. A., . . . Jiménez-Anguiano, A. (2018, 12). Docosahexaenoic acid protection in a rotenone induced Parkinson's model: Prevention of tubulin and synaptophysin loss, but no association with mitochondrial function. *Neurochemistry International*, 121, 26-37. doi:10.1016/j.neuint.2018.10.015
- Shishova, E. Y., Costanzo, L. D., Emig, F. A., Ash, D. E., & Christianson, D. W. (2009, 01). Probing the Specificity Determinants of Amino Acid Recognition by Arginase†‡. *Biochemistry*, 48(1), 121-131. doi:10.1021/bi801911v
- Sistrunk, S. C., Ross, M. K., & Filipov, N. M. (2007, 05). Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: An in vitro study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(3), 286-296. doi:10.1016/j.etap.2006.11.004
- Tadaiesky, M., Dombrowski, P., Figueiredo, C., Cargnin-Ferreira, E., Cunha, C. D., & Takahashi, R. (2008, 10). Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 156(4), 830-840. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.08.
- Takeda, A. (2003, 01). Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, 41(1), 79-87. doi:10.1016/s0165-0173(02)00234-5
- Tanner, C. M., Kamel, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., . . . Langston, J. W. (2011, 06). Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), 866-872. doi:10.1289/ehp.1002839
- Tisch, S., Silberstein, P., Limousin-Dowsey, P., & Jahanshahi, M. (2004, 12). The basal ganglia: Anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatric Clinics of North America*, 27(4), 757-799. doi:10.1016/j.psc.2004.06.004
- Zhao, B.; Maeda, M.; Zhang, J.; Zhu, A. Ozaki, Y .(2003) Environmental science and pollution research. 13, 90-97
- Zwingmann, C., Leibfritz, D., & Hazell, A. S. (2004, 06). Brain Energy Metabolism in a Sub-Acute Rat Model of Manganese Neurotoxicity: An Ex Vivo Nuclear Magnetic Resonance Study Using [1-¹³C]Glucose. *NeuroToxicology*, 25(4), 573-587. doi:10.1016/j.neuro.2003.08.002