



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA  
ENFERMEDAD DE PARKINSON POR INHALACIÓN DE  
MANGANESO

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

JOSÉ LUIS ORDÓÑEZ LIBRADO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA

Estado de México

Enero, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Agradezco el apoyo brindado para la realización de este trabajo a:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) # de becario 189795

Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (**COMECyT**), Becas Tesis para Posgrado

**PAPIIT-DGAPA-UNAM** proyectos 213705 y 200606

Del mismo modo, agradezco al comité de tesis por el apoyo y la disposición para revisar mi trabajo.

Dra. María Rosa Avila Costa

Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes

Dra. Limei Zhang Ji

Dra. Laura Colín Barenque

Dr. José Pedraza Chaverri

A la Dra. Verónica Anaya Martínez por todos sus comentarios y la revisión de esta tesis.

*Dedico este trabajo a mis padres, porque siempre han sido mi principal apoyo, de ellos he aprendido a no rendirme aún cuando el camino parezca muy difícil. Gracias por estar siempre conmigo.*

*A mis hermanos Jorge Alberto, Oscar, Héctor y Nora, Miguel y Leo por todo su apoyo, con quienes he pasado los mejores momentos de mi vida, juntos aprendimos a luchar por lo que deseamos. A Fernanda y Ángel, la alegría de nuestras vidas.*

*A mis abuelitos Margarita y Pedro, por todos los consejos y su cariño.*

*A Michelle, por todo tu apoyo, porque sé que siempre cuento contigo, pero sobre todo gracias por tu cariño, te quiero mucho, demasiado.*

*A Rose, pues ha sido un ejemplo de tenacidad, de quien he aprendido que no hay reto ni dificultad tan grande que no pueda ser superada. Pero sobre todo, agradezco tu amistad y hacernos parte de tu familia.*

*A Tere, por todo tu cariño y apoyo, por confiar siempre en mí.*

*A Arturo, Aurora, Ana, Araceli, César, Israel, Erika, Liliana, Adriana mis amigos de toda la vida, con quienes he compartido grandes momentos, YA 10 AÑOS.*

*A mis amigos del laboratorio de Neuromorfología: Vero, Enrique, Laura, Chucho, Paty, Lichita, Luisa, Ricardo, Erick, Luis Clemente, César y Fidencio. De quienes he aprendido muchas cosas.*

*A Gabito y Marce por el apoyo, la confianza y todos los buenos momentos que hemos pasado juntos.*

*A mis amigos la Facultad de Medicina: Vianey, Paty Bizarro, Paty Mussali, Paty Díaz, Kriz, Sandy, Miguel, José. Por todo su apoyo y hacer más ameno el trabajo en el laboratorio.*

## Abreviaturas

<b>6-OHDA</b>	<b>6-Hidroxidopamina (2,4,5 trihidroxifeniletamina)</b>
<b>CAT</b>	<b>Catalasa</b>
<b>DA</b>	<b>Dopamina</b>
<b>DAT</b>	<b>Sistema de recaptura de dopamina</b>
<b>DMT-1, DCT-1, nramp-2</b>	<b>Transportador de metales divalentes</b>
<b>EP</b>	<b>Enfermedad de Parkinson</b>
<b>EROs</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>FCE</b>	<b>Fluido cerebroespinal</b>
<b>GABA</b>	<b>Ácido gamma aminobutírico</b>
<b>GB</b>	<b>Ganglios basales</b>
<b>GFAP</b>	<b>Proteína ácida glial fibrilar</b>
<b>GPe</b>	<b>Globo pálido externo</b>
<b>GPi</b>	<b>Globo pálido interno</b>
<b>GSH-Px</b>	<b>Glutación peroxidasa</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peroxido de hidrógeno</b>
<b>IL-1β</b>	<b>Interleucina 1β</b>
<b>INF-γ</b>	<b>Interferón γ</b>
<b>MAO</b>	<b>Monoaminooxidasa</b>
<b>Mn</b>	<b>Manganeso</b>
<b>Mn<sup>+2</sup></b>	<b>Ion manganeso</b>
<b>Mn<sup>+3</sup></b>	<b>Ion mangánico</b>
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloruro de manganeso</b>
<b>AcMn<sub>3</sub></b>	<b>Acetato de manganeso</b>
<b>MPTP</b>	<b>1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina</b>
<b>NE</b>	<b>Núcleo estriado</b>
<b>NF-κB</b>	<b>Factor nuclear-κB</b>
<b>NO</b>	<b>Oxido nítrico</b>
<b>NOSn</b>	<b>Óxido nítrico sintasa neuronal</b>
<b>NST</b>	<b>Núcleo subtalámico</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	<b>Anión superóxido</b>
<b>OH<sup>·</sup></b>	<b>Radical hidroxilo</b>
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	<b>Peroxinitrito</b>
<b>SN</b>	<b>Sustancia nigra</b>
<b>SNe</b>	<b>Sustancia nigra compacta</b>
<b>SNr</b>	<b>Sustancia nigra reticular</b>
<b>SOD</b>	<b>Superóxido dismutasa</b>
<b>SQ</b>	<b>Semiquinona</b>
<b>TH</b>	<b>Tirosina hidroxilasa</b>
<b>TNF-α</b>	<b>Factor de necrosis tumoral-α</b>
<b>TNFR1</b>	<b>Receptor para TNF-α</b>

# Índice

Pag.

Resumen	
Introducción-----	01
• Ganglios basales-----	04
• Organización funcional-----	05
• Patogénesis en la enfermedad de Parkinson-----	10
• Etiología de la enfermedad de Parkinson-----	12
Manganeso (Mn) -----	15
• Absorción del Mn-----	16
• Transporte de Mn al cerebro-----	17
- Barrera hemato-encefálica-----	18
- Plexos coroideos-----	19
- Nervio olfatorio-----	20
• Mn y ganglios basales-----	20
Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson-----	22
• MPTP-----	22
• 6-OHDA-----	24
• Paraquat-----	25
• Rotenona-----	25
Justificación-----	27
Hipótesis-----	27
Objetivo general-----	28
• Objetivos particulares-----	28
Método-----	29
Resultados-----	30
• Conducta motora-----	30
• Inmunohistoquímica-----	32
• Análisis ultraestructural-----	35
Discusión-----	41
• Conducta motora-----	41
• Inmunohistoquímica-----	43
• Ultraestructura-----	50
Conclusión -----	55
Referencias bibliográficas-----	58
Apéndices-----	77

## Resumen

En las últimas décadas las enfermedades neurodegenerativas han mostrado un incremento en su prevalencia a nivel mundial, se ha propuesto que la tasa de incidencia aumentará de 120 al 230 % en las próximas décadas, siendo la Enfermedad de Parkinson (**EP**) y las demencias el mayor componente de este incremento. La **EP** fue descrita en 1817 por James Parkinson, como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo. Posteriormente se demostró que estos signos clínicos eran el reflejo de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc). Por lo que el estudio de esta enfermedad se ha hecho en animales de laboratorio mediante agentes químicos que destruyen selectivamente estas neuronas. Entre las neurotoxinas que han sido utilizadas en los modelos experimentales se encuentran la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y el 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), sin embargo ninguno de ellos representa las complejas características neurodegenerativas crónicas de la enfermedad en humanos.

Por otra parte, se ha establecido que la exposición a manganeso (Mn) resulta en un desorden neurológico similar a la EP. El sistema nervioso central es blanco de este metal, el cual lo requiere para diferentes funciones, ya que es un componente de varias enzimas. Sin embargo, la sobreexposición a Mn causa neurotoxicidad que resulta en síntomas extrapiramidales que podrían estar relacionados con la alteración de la función dopaminérgica en los ganglios basales. Por lo que el objetivo de este trabajo es caracterizar un modelo para el estudio de la EP mediante la inhalación de Mn.

Los experimentos se llevaron a cabo con 20 ratones macho de la cepa CD1 con peso inicial de 35 g. Antes de la exposición a Mn, los animales se entrenaron para las pruebas conductuales durante una semana. Posteriormente se formaron dos grupos: 10 ratones fueron expuestos a agua desionizada (grupo control), mientras que el otro grupo compuesto por 10 ratones fueron expuestos a una mezcla de cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ) 0.04 M y acetato de manganeso ( $AcMn_3$ ) 0.02 M vía inhalada en una caja de acrílico 1 hora 2 veces por semana. Cada semana se evaluó la conducta de todos los animales mediante las pruebas de viga de equilibrio y reaching task. Con base a los resultados obtenidos en la evaluación conductual se decidió sacrificar a todos los animales después de haber sido expuestos a 40 inhalaciones (5 meses de exposición) bajo anestesia profunda con pentobarbital sódico dosis letal i.p., posteriormente los ratones se perfundieron vía aórtica con solución salina isotónica al 0.9 % y se fijó el tejido con una mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 2% en amortiguador de cacodilato al 0.1 M. Una vez perfundidos, se extrajeron los cerebros y se tomaron fragmentos del núcleo caudado y de la sustancia nigra para el análisis ultraestructural, asimismo se hicieron cortes histológicos del mesencéfalo ventral (SNc) y del núcleo estriado, y se realizó inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), así como inmunohistoquímica GFAP, para hacer conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc y determinar gliosis reactiva en la SNc y núcleo estriado (NE) respectivamente.

De acuerdo a nuestros resultados la exposición a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  provocó alteraciones a nivel conductual tanto en la prueba motora fina como en la viga de equilibrio, además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de aproximadamente el 63 % en los animales expuestos. El número de células gliales aumentó en el NE y en la SNc 443 % y 126 % respectivamente, y se presentaron importantes alteraciones ultraestructurales en dichos núcleos. Estos cambios se relacionan con alteraciones descritas en tejido obtenido de pacientes con EP.

Por lo que podemos concluir que la inhalación de la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  es un buen modelo para el estudio de la enfermedad de Parkinson, el cual representa algunas ventajas sobre los modelos ya establecidos, ya que la exposición a Mn por vía inhalada, es un modelo no invasivo, que no requiere cirugía estereotáxica o inyecciones intraperitoneales, y ya que las inhalaciones fueron dos veces por semana, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas se llevó a cabo de manera gradual y bilateral, muy parecido a lo que se observa en los pacientes con dicha enfermedad.

## Summary

In the last decades the neurodegenerative diseases have shown an increase in their prevalence world-wide, it has purposed that the rate of incidence will increase from 120 to 230 % in the next decades, being Parkinson's disease (PD) and dementias the greater component of this increase. PD was described in 1817 by James Parkinson as involuntary movements and decrease in the muscular strength in those members that are in rest. Later, was demonstrated that these clinical signs were linked to the loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra pars compacta* (SNc). For this reason the study of this disease has been carried out in laboratory animals with the use of chemical agents which selectively destroy those neurons. The neurotoxins that have been used in experimental models are the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), nevertheless none of them represents the complex characteristics of the chronic neurodegeneration that it is observed in humans.

On the other hand, it has been settled down that the exposition to manganese (Mn) produces a neurological disorder similar to PD. The central nervous system is a target of this metal, and requires this metal for different functions, since it is a component of several enzymes. Nevertheless, overexposure to Mn causes neurotoxicity, that result in extrapyramidal symptoms that could be related to the alteration of the dopaminergic function in the basal ganglia. Thus, the objective of this work was to characterize a model for the study of PD trough the inhalation of Mn.

The experiments were carried out in 20 CD1 male mice with an initial weight of 35 g. Before the exposition to Mn, the animals were trained for the behavioral tests during one week. Two groups were formed: 10 mice were exposed to deionized water (control group), and 10 were exposed to a mixture of manganese chloride ( $\text{MnCl}_2$ ) 0.04 M and acetate of manganese ( $\text{AcMn}_3$ ) 0.02 M in an acrylic box 1 hour 2 times a week. Every week we evaluated the behavior of all animals in the narrow beam and in the reaching task tests. According to the results obtained in the behavioral evaluation it was decided to sacrifice all the animals after 40 inhalations (5 months of exposition) under deep anesthesia with lethal dose of sodic pentobarbitone i.p., later the mice were perfused via aorta with 0.9 % isotonic saline solution and fixed with a mixture 2 % of glutaraldehyde and paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Once perfused, the brains were extract and fragments from the caudate nucleus and substantia nigra were taken for ultrastructural analysis, also histological slices of ventral mesencephalon (SNc) and caudate nucleus were made for tirosine hydroxylase (TH) and for GFAP immunohistochemistry, in order to count TH-immunoreactive neurons in the SNc and to determine reactive gliosis in the SNc and caudate nucleus respectively.

According to our results the exposition to the mixture of  $\text{MnCl}_2$  and  $\text{AcMn}_3$  caused behavioral alterations in the fine motor tests (narrow beam and reaching task), in addition to the loss of dopaminergic neurons of approximately 63 %. The number of glial cells increase in the caudate nucleus and SNc 443 % and 126 % respectively, and appeared important ultrastructural alterations in these nuclei. These changes are related to the alterations observed in the tissue obtained from PD patients.

With those results we can conclude that the inhalation of the mixture of  $\text{MnCl}_2$  and  $\text{AcMn}_3$  is a useful model for the study of the Parkinson disease. This model represents some advantages over the established models, since the inhalation of Mn is a noninvasive model, that does not require stereotaxical surgery or i.p. injections, and since the inhalations were twice a week, the degeneration of the dopaminergic neurons was bilateral and gradual, very similar to which it is observed in the patients with this disease.

## Introducción

En las últimas décadas las enfermedades neurodegenerativas han mostrado un incremento en su prevalencia a nivel mundial por el aumento en la esperanza de vida. En México, debido al incremento en las expectativas de vida de la población, se espera que en las próximas décadas aumente la proporción de habitantes mayores de 60 años y por consiguiente, las enfermedades asociadas a la senectud (Góngora-Alfaro *et al.*, 2005). Según datos obtenidos del INEGI durante el periodo de 1995 al 2000 la cantidad de personas mayores de 60 años en la República Mexicana creció entre el 16 y el 17 % (INEGI, 2004). En este contexto se ha propuesto que la tasa de incidencia de las enfermedades neurodegenerativas aumentará de 120 al 230 % en las próximas décadas, siendo la Enfermedad de Parkinson (**EP**) y las demencias el mayor componente de este incremento (Otero-Siliceo, 1996).

En nuestro país, a pesar de que la prevalencia de la enfermedad de Parkinson no se ha explorado con precisión, se ha estimado sobre los datos obtenidos por el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS, que existen al menos 500, 000 personas con EP en el país. Situándola en un rango de 50 a 100 pacientes por cada 100, 000 habitantes. Sin embargo, es evidente que existe un subregistro, ya que los pacientes de las áreas rurales tienen poco acceso a los centros de atención hospitalaria (Góngora-Alfaro *et al.*, 2005).

Actualmente la EP ocupa el segundo lugar entre las enfermedades neurodegenerativas, esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia entre los 55 y 65 años y el riesgo de presentarla aumenta con la edad. Afecta al 2 % de la población general en países desarrollados y al 2.5 % de las personas mayores de 75 años.

Esta enfermedad fue descrita por James Parkinson en 1817, en su publicación *Essay on the shaking palsy* (Ensayo sobre la parálisis agitante), como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo. El paciente con EP desarrolla temblor, rigidez, acinesia y alteraciones de los reflejos posturales. El temblor generalmente se presenta cuando el paciente está en reposo y es la manifestación inicial más frecuente, se inicia generalmente en una mano, y en menor frecuencia en los labios, mandíbula,

lengua o en una extremidad inferior. El temblor desaparece durante el movimiento, y reaparece cuando la extremidad vuelve al reposo; el clásico movimiento de “contar monedas” suele desaparecer cuando el temblor avanza y se extiende hacia el brazo, con el tiempo suele extenderse a la pierna del mismo lado y por último a las extremidades contralaterales (Pastor y Tolosa, 2001). La rigidez es causada por el aumento del tono muscular que afecta a todos los grupos musculares (flexores, extensores, músculos axiales o de extremidades) y se refiere a la resistencia que presentan algunas partes del cuerpo al movimiento (el miembro del cuerpo no funciona a pesar de que el sujeto desea que se mueva); Al igual que el temblor, la rigidez suele ser asimétrica a lo largo de la evolución de la enfermedad, aunque en estadios avanzados es casi siempre bilateral (García-Martínez, 2003). La acinesia se manifiesta con dificultad para iniciar y efectuar movimientos secuenciales voluntarios del tipo más común, incluyendo ponerse de pie, caminar, comer, escribir, entre otros. Las líneas de la cara del paciente son lisas, su expresión es fija, y casi no hay prueba manifiesta de respuesta emocional espontánea. Alteración de los reflejos posturales: postura encorvada del tronco con la cabeza y los hombros caídos, así como enlentecimiento de la marcha, los pasos son cortos y arrastrando los pies, los brazos se mantienen a los lados y no se balancean rítmica ni automáticamente con las piernas como debería suceder. Aunque el paciente tiene dificultad para dar los primeros pasos, una vez iniciada la marcha, los pasos son cada vez más rápidos, y tiene dificultad para detenerse cuando ha alcanzado su meta, a esta anomalía para caminar se le llama marcha festinante (Gilmans-Winans, 1994).

También se han reportado manifestaciones no motoras, así en los estadios iniciales de la enfermedad se han encontrado déficit cognitivos leves o moderados afectando la función visoespacial, la atención, y la fluidez verbal (Levin *et al.*, 1992). La demencia en la EP sigue un patrón de afección predominantemente subcortical, la cual puede afectar al 20-30 % de los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (Brown y Marsden, 1984). Mientras que la depresión es el trastorno afectivo más frecuente en la EP y afecta a un 50 % de los pacientes; en algunos casos es consecuencia de la limitación motora (Gotham *et al.*, 1986). También son habituales los trastornos del sueño; es frecuente la reducción en el sueño de ondas lentas, múltiples despertares y disminución del sueño REM (Kales *et al.*, 1971).

En 1986 Hornykiewicz analizó cerebros de pacientes con EP y encontró una reducción significativa de la Dopamina (DA), la serotonina y la noradrenalina principalmente en el cuerpo estriado y la sustancia *nigra* (SN), además puntualizó que de las tres aminas biogénicas, la más reducida es la DA. Posteriormente se demostró que las neuronas que estaban degenerando principalmente eran las neuronas dopaminérgicas de la porción compacta de la sustancia *nigra* (SNc) (Yurek y Sladek, 1990; Gibb y Less, 1991), con pérdida moderada de la porción dorsal de la misma (Gibb y Less, 1991).

Así, la EP se caracteriza anatomopatológicamente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc, con típicas inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas, denominadas cuerpos de Lewy (Otero-Siliceo, 1996) los cuales están constituidos por neurofilamentos que se acumulan tras su fragmentación y fosforilación anormal (López-Pousa *et al.*, 2003). Se han observado algunas alteraciones ultraestructurales en el núcleo estriado de pacientes con EP, en el cual, las dendritas de las neuronas en este núcleo están hinchadas y con marcado decremento de espinas dendríticas (McNeill *et al.*, 1988), también se observa disminución en el porcentaje en los botones sinápticos que contienen vesículas granulares pequeñas (Hökfelt y Ungerstedt, 1969), alteración en el tamaño de los botones sinápticos (Avila-Costa *et al.*, 1998) presencia de cuerpos multivesiculares, mitocondrias hinchadas y células oscuras (Jedrzejewska *et al.*, 1990), cambios en los tipos de contactos sinápticos (Forno y Norville, 1979; Ingham *et al.*, 1993; Avila-Costa *et al.*, 1998) además de la proliferación astrocítica, degeneración axónica y neuritas densas (Forno y Noville, 1979; Machado *et al.*, 1990).

De esta manera, la EP es reflejo de las alteraciones en los ganglios basales, los cuales son considerados el mayor eslabón subcortical entre las áreas sensoriales y motoras de la corteza cerebral, y al igual que el cerebelo son un sitio de convergencia e integración de diversas aferencias. La importancia de los ganglios basales es la integración sensoriomotora, que se hace evidente al observar los déficit de movimiento, postura y tono muscular que presentan los pacientes con desórdenes de estos núcleos (DeLong, 1974).

## Ganglios basales

El término ganglios basales es utilizado para referirse a un grupo de núcleos anatómica y funcionalmente relacionados, localizados en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo. Este grupo de núcleos incluye al: núcleo estriado (NE) que en los primates esta dividido por la cápsula interna en una porción dorsomedial (núcleo caudado) y en una porción ventrolateral (putamen) los cuales se desarrollan de la misma estructura mesencéfala, por lo que estos núcleos se componen del mismo tipo de células (Carpenter, 1976;1981); núcleo subtalámico (NST) el cual se encuentra en la región ventral del diencefalo, en la unión con el mesencéfalo (Carpenter, 1976; DeLong y Georgopoulos, 1981); globo pálido (GP) compuesto por el segmento interno (GPi) y el externo (GPe) (Reiner *et al.*, 1984); en el mesencéfalo se encuentra la sustancia nigra (SN) dividida en una región ventral denominada *pars reticulata* (SNr), y una región dorsal *pars compacta* (SNc) (Coté y Crutcher, 1991). El caudado-putamen es considerado como los núcleos de entrada, mientras que el GPi y la SNr constituyen los núcleos de salida de los ganglios basales (Carpenter, 1976; 1984; Alexander y Crutcher, 1990).

Se ha reportado (Wilson, 1998) que la mayor composición celular (aprox. 95 %) en el estriado esta dado por las llamadas “neuronas espinosas medianas de proyección” las cuales se caracterizan principalmente por presentar una gran densidad de espinas que cubren a sus dendritas. Estas células tienen un cuerpo celular de entre 12-20  $\mu\text{m}$  de diámetro, ultraestructuralmente presentan un núcleo relativamente grande con pocas indentaciones y pocos agregados de cromatina en la membrana nuclear, también presentan poca cantidad de citoplasma y pocos organelos (Fox *et al.*, 1975). Aunque su morfología es homogénea, además de contener ácido gamma aminobutírico (GABA) como neurotransmisor, expresan diferentes neuropéptidos (Penny *et al.*, 1986), incluyendo substancia P (Christenson-Nylader *et al.*, 1986) y dinorfina (Davies y Dray, 1976). También se ha reportado otro tipo de neurona espinosa menos común, que tiene pocas pero largas ramificaciones dendríticas (Bolam *et al.*, 1981; Graveland *et al.*, 1985). El 5 % restante de la población total del estriado está conformado por varios tipos de interneuronas, cuya característica principal es la de carecer de espinas dendríticas. Se han identificado de 7-8 tipos de interneuronas con base a su morfología (Bolam *et al.*, 1984; DiFiglia *et al.*, 1982; Kawaguchi *et al.*, 1995; Wilson, 1998).

La complejidad del estriado, entre todas las estructuras de los ganglios basales es ejemplificada por la rica diversidad de neurotransmisores y neuromoduladores que se han detectado ya sea entre las neuronas estriatales o entre las aferencias del estriado. Las evidencias muestran que las neuronas estriatales contienen GABA, acetilcolina, sustancia P, somatostatina y péptidos opiáceos, mientras que las aferencias que reciben estas neuronas incluyen aquellas que contienen glutamato provenientes de la corteza, DA de la SNc, acetilcolina de las interneuronas y 5-hidroxitriptamina (serotonina) del rafe dorsal (Angulo y Mc Ewen, 1994; White *et al.*, 1994). Como se mencionó, el estriado recibe aferencias excitatorias de la corteza cerebral con excepción de la corteza visual y auditiva primaria, estas aferencias corticales utilizan glutamato como neurotransmisor y hacen sinapsis en la cabeza de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas (Fiala *et al.*, 2002; Kasai *et al.*, 2003; Yuste y Bonhoeffer, 2004), dichas sinapsis son asimétricas, asociadas con vesículas sinápticas esféricas (Sheperd, 1996), las espinas dendríticas también reciben una segunda entrada sináptica la cual se establecen con el cuello de estas estructuras, generalmente son pequeñas y con especialización de membrana simétrica; estas sinapsis corresponden a las terminales dopaminérgicas (Groves, 1994; Ingam *et al.*, 1998). Mientras que las interneuronas colinérgicas establecen contactos sinápticos simétricos con el soma, dendritas proximales y con las espinas dendríticas (Chang y Kitai, 1982; DiFiglia *et al.*, 1982; Wilson, 1998), asimismo se establecen contactos asimétricos con las dendritas dístales secundarias y terciarias de las neuronas espinosas medianas de proyección (DiFiglia *et al.*, 1982; Bolam, 1984; Kawaguchi *et al.*, 1995).

## **Organización funcional**

Existen evidencias de que las funciones de los ganglios basales no solamente incluyen aspectos sensoriomotores de programación de movimientos también están involucrados en la planeación de los movimientos, selección y memoria motora (De Long y Georgopoulos, 1981; Parent y Hazrati, 1995).

Las complejas conexiones de los ganglios basales se pueden simplificar con base a circuitos intrínsecos, los cuales están organizados funcional y estructuralmente, además aparentemente trabajan en paralelo y están funcionalmente segregados, relacionándose corteza-ganglios basales-tálamo-corteza. A la fecha se conocen 5 circuitos principales:

1. Circuito motor, que proyecta a regiones corticales motoras precentrales, tálamo, núcleos ventral lateral *pars oralis*, ventral anterior *pars parvocellularis*, y ventral anterior *pars magnocellularis*.
2. Circuito oculomotor, que proyecta a regiones corticales visuales frontal, suplementaria y tálamo.
3. Circuito prefrontal, que proyecta a la corteza prefrontal dorsolateral y tálamo.
4. Circuito orbitofrontal lateral, que proyecta hacia la corteza prefrontal orbitofrontal lateral y al tálamo.
5. Circuito límbico, que proyecta a la corteza cingulada anterior, a la corteza orbitofrontal medial y tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Smith *et al.*, 1998).

El circuito motor, corteza-ganglios basales-tálamo-corteza (Figura 1) es visto como una vía de reentrada, a través de la cual la inervación proveniente de las áreas sensoriomotoras de la corteza precentral y postcentral (área motora suplementaria, corteza premotora, corteza motora y corteza somatosensorial) van de regreso a ciertas áreas motoras precentrales después de procesos intermedios dentro de los ganglios basales y el tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Wichmann y DeLong, 1993).

Las áreas específicas de la corteza envían proyecciones glutamatérgicas (y posiblemente aspartérgicas) excitatorias (Graybiel, 1990; Carlsson y Carlsson, 1990; McGeer y McGeer, 1993) a regiones específicas del estriado (caudado y putamen), los cuales representan los núcleos de entrada de los ganglios basales. Por otra parte, los núcleos de salida de los ganglios basales (GPi y SNr) ejercen efectos inhibitorios mediados por GABA sobre los núcleos del tálamo (Graybiel, 1990; McGeer y McGeer, 1993; White *et al.*, 1994). Dentro de cada circuito, dicho flujo inhibitorio está modulado por dos vías opuestas pero paralelas, que van desde el estriado hasta los núcleos de salida de los ganglios basales (Alexander y Crutcher 1990).

El circuito motor incluye una vía "directa" que inicia en el estriado, cuyas eferencias inhibitorias, las cuales contienen GABA y sustancia P, proyectan directamente a los núcleos de salida (GPi/SNr) de los GB (Reiner y Anderson, 1990; Alexander y Crutcher, 1990), la activación de esta vía tiende a desinhibir la etapa talámica del circuito (Alexander y Crutcher, 1990; Coté y Crutcher, 1991). El circuito motor también incluye una vía "indirecta", en la cual, las neuronas estriatales de proyección, que contienen GABA y encefalina (DiFiglia *et*

*al.*, 1982; Angulo y McEwen, 1994), proyectan al GPe (Graybiel y Ragsdale, 1983), ahí las eferencias GABAérgicas del GPe proyectan al NST cuyas proyecciones glutamatérgicas excitatorias conectan con los núcleos de salida GPi/SNr (Nakanishi y Kita, 1987; Smith y Parent, 1988). La tasa espontánea de descarga de las neuronas del GPe ejerce una influencia inhibitoria sobre el NST. La activación de la proyección inhibitoria GABA/enkefalina, proveniente del estriado, tiende a suprimir la actividad de las neuronas del GPe y por lo tanto a desinhibir al NST, incrementando la excitación sobre los núcleos de salida e incrementando la inhibición sobre los núcleos del tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Coté y Crutcher, 1991).

Así, la activación de ambas vías produce efectos opuestos, es decir, al incrementar la actividad de las neuronas de la vía directa, se inhibe tónicamente a las neuronas de los núcleos de salida, disminuyendo la inhibición sobre las neuronas del tálamo. Mientras que al incrementar la actividad de las neuronas de la vía indirecta, se inhibe tónicamente la actividad del GPe, este decremento conlleva a la desinhibición de las neuronas del NST y éstas a su vez incrementan la actividad de las neuronas de los núcleos de salida, inhibiéndose las neuronas del tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; DeLong, 1990; Smith *et al.*, 1998).

Esta aparente oposición de los efectos inducidos en conjunción por ambas vías es regulada por la DA; que en el estriado tiene efectos diferenciales sobre la actividad de las vías directa e indirecta (Gerfen y Young, 1988; Gerfen, 1992), facilitando la transmisión de la vía directa y decrementando la actividad de la vía indirecta. Esta actividad diferencial de la DA esta posiblemente regulada por los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos existentes, de los cuales se han encontrado al menos 7 subtipos genéticamente diferentes, divididos en dos familias: D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>) y D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>1C</sub> y D<sub>1D</sub>) (Schwartz *et al.*, 1992, Sidhu, 1998; Missale *et al.*, 1998), en donde los receptores D<sub>2</sub> se han encontrado preferencialmente en las neuronas que proyectan al GPe (vía indirecta) y los receptores D<sub>1</sub> en las neuronas que proyectan al GPi (vía directa) (Gerfen, 1992); bajo condiciones normales, la actividad de la vía directa incrementa las eferencias de los ganglios basales hacia las neuronas tálamo-corticales (figura 1A), las cuales a su vez, modulan la actividad de las áreas motoras precentrales (Wichmann y DeLong, 1993). La influencia de la inhibición tónica de las eferencias de los ganglios basales sobre la actividad de las neuronas tálamo-corticales, podrían ayudar a suprimir el movimiento, mientras que la reducción fásica de las eferencias de los ganglios basales, permitiría la actividad motora voluntaria.

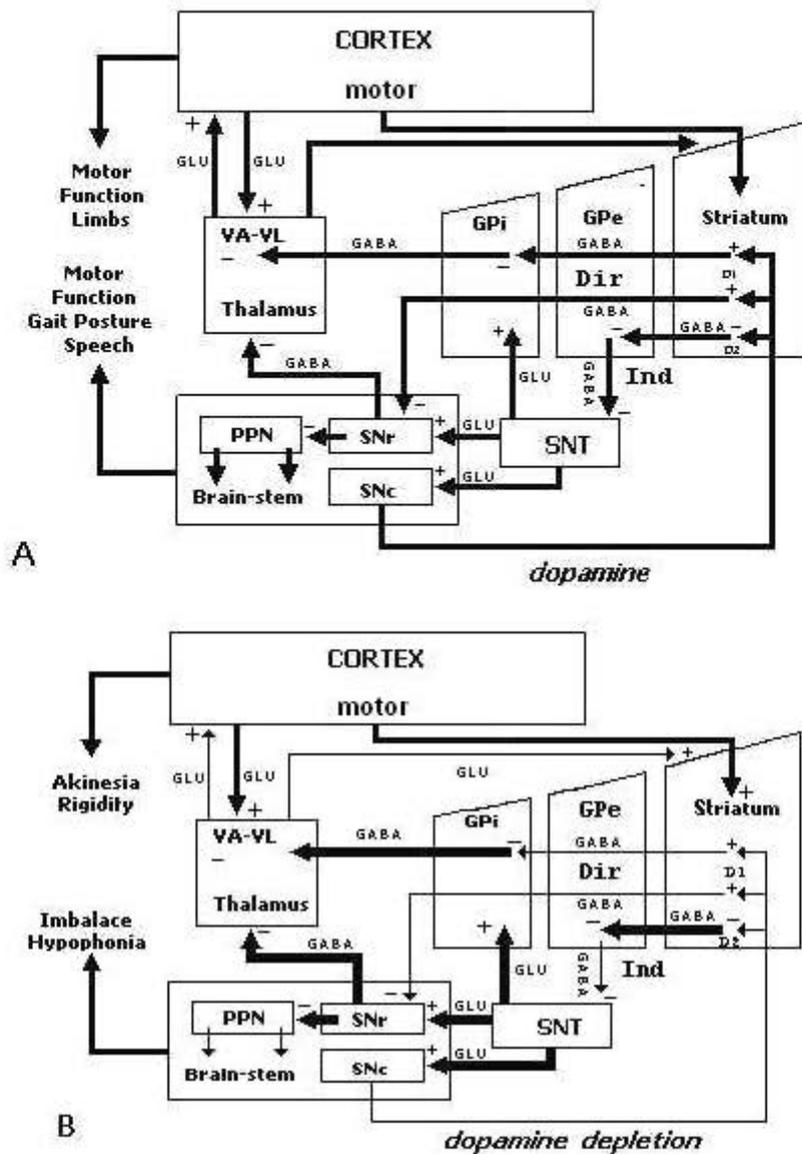


Figura 1.- (A) Modelo esquemático que ilustra el circuito motor normal (Corteza-ganglios basales-tálamo-corteza). El estriado el cual es considerado el núcleo de entrada a los ganglios basales, modula la actividad de GPi/SNr (núcleos de salida) mediante dos vías paralelas, directa (Dir) e indirecta (Ind). La vía directa proyecta del estriado al GPi/SNr, mientras que la vía indirecta proyecta del estriado al GPe y este al STN antes de alcanzar al GPi/SNr. Debido al hecho de que los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> actúan diferencialmente sobre la vía directa e indirecta, el resultado de una entrada dopaminérgica apropiada al estriado, produce la inhibición de GPi/SNr y así facilita la actividad del sistema motor tálamo-cortical. Las conexiones excitatorias están marcadas por (+) y las inhibitorias por (-). (B) Modelo esquemático que ilustra las modificaciones del circuito motor en la Enfermedad de Parkinson, así como la lesión de la vía nigroestriatal. La depleción de Dopamina a el estriado, provoca la reducción de la actividad de la vía directa, y la hiperactividad glutamatérgica del SNT, que se traduce en un aumento de la acción inhibitoria de los núcleos de salida GPi/SNr causando la depresión del sistema tálamo-cortical; lo cual es la posible causa de los síntomas parkinsónicos. El resultado de las alteraciones que se presentan después de la pérdida dopaminérgica en todo el circuito está indicado por el grosor de las flechas (Bjarkam *et al.*, 2001).

Como se menciono, los signos clínicos observados en la EP se deben a la denervación dopaminérgica, causados por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, dicha pérdida dopaminérgica tiene efectos sobre la función del circuito motor, así como de su estructura, síntesis y liberación de neurotransmisores. Algunos de estos cambios producidos por la depleción de DA son:

### **Aspectos funcionales**

La denervación dopaminérgica estriatal provoca que aumente la densidad de los receptores D<sub>2</sub> y la disminución de los receptores D<sub>1</sub> (Joyce, 1991), estas alteraciones inducen cambios funcionales dentro de la circuitería de los ganglios basales (Albin *et al.*, 1989; Calabresi *et al.*, 1993). Se ha propuesto que debido a que la DA ejerce funciones diferenciales sobre la frecuencia de disparo en las neuronas espinosas de proyección, la vía directa decrementa su actividad, mientras que la vía indirecta aumenta la frecuencia de disparo (DeLong, 1990; Greenamyre, 1993; Calabresi *et al.*, 1993).

### **Aspectos neuroquímicos**

La depleción de la DA altera la expresión del RNAm de algunos neuropéptidos (Sivam *et al.*, 1987); se incrementa la síntesis del RNAm de las enzimas encargadas de la síntesis de GABA y serotonina (Descarries *et al.*, 1992). Así mismo aumentan, por un lado los niveles de RNAm de preproencefalina-A (vía indirecta) y por otro lado, disminuyen los niveles de preproencefalina-B (vía directa; Henry *et al.*, 1999). También se ha observado que se incrementa la liberación de acetilcolina y los sitios de recaptura (DeBoer *et al.*, 1993), y se pierde el control inhibitorio que ejerce la serotonina sobre la liberación de acetilcolina (Joyce, 1991).

Los cambios antes mencionados se deben a la disminución de dopamina, sin embargo, el umbral exacto de la disfunción dopaminérgica nigroestriatal para la expresión clínica del parkinsonismo aún no es conocida, ya que la pérdida de las neuronas nigrales empieza varios años antes de que la enfermedad se manifieste. Por lo que se ha propuesto que en la EP existen varias fases (Barrio *et al.*, 1997): **a)** un estado libre de enfermedad en donde los

factores de riesgo están presentes; **b)** una fase presintomática o subclínica caracterizada por la iniciación y progresión de la enfermedad, la cual es debida a mecanismos compensatorios para la supervivencia de las neurona de la SNc y de las células postsinápticas en el estriado, que ayudan a mitigar la pérdida progresiva de la inervación dopaminérgica (Anglade *et al.*, 1995); se ha reportado un aumento metabólico del recambio de DA, y por lo tanto una elevada actividad de las neuronas dopaminérgicas remanentes, así como un incremento de la densidad de los receptores dopaminérgicos postsinápticos (sensibilización) (Seeman y Niznik, 1990). Presumiblemente el sistema nigroestriatal tiene una considerable capacidad para resistir un déficit dopaminérgico de alrededor del 50 % sin presentar manifestación clínica y **c)** la fase sintomática donde la enfermedad cruza el umbral, cuando el grado de deficiencia dopaminérgica no permite mantener la función normal; se ha observado que los síntomas clínicos aparecen cuando hay una disminución de DA de por lo menos el 70-80 % y pérdida de neuronas dopaminérgicas de al menos el 50 % (Pery y Young, 1986, Hornykiewicz, 1986; Orr *et al.*, 2002).

### **Patogénesis en la enfermedad de Parkinson**

La EP se caracteriza por un problema clínico mayor causado por la disminución de DA (Bové *et al.*, 2005). El patrón anatómico de la neurodegeneración en la EP provee importantes conclusiones acerca de la patogénesis que son la base de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas y sugieren vías finales comunes (Lotharius y Brundin, 2002).

- Se ha detectado que en la SNc de los pacientes con EP la actividad de la superóxido dismutasa (MnSOD) se encuentra elevada; mientras que se ha descrito disminución en los niveles de ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, catalasa, glutatión peroxidasa (GSH-Px) y de la forma reducida del glutatión (GSH); estos niveles reducidos de las enzimas antioxidantes no han sido detectados en otras áreas del cerebro, ni han sido reportados en ningún otro desorden degenerativo. Se sabe que la reducción del GSH afecta la eliminación del  $H_2O_2$  y promueve la formación de radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) particularmente en presencia de hierro (Jenner y Olanow, 1996).
- Ha sido encontrado un decremento selectivo de un 30-40 % en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en las neuronas de la SNc (Schapira *et al.*, 1990), al

igual que en las plaquetas y biopsias de músculo esquelético de pacientes con EP (DiMauro, 1993). Dicho defecto en la cadena respiratoria puede contribuir a la degeneración celular en la EP debido a la disminución en la síntesis de ATP, o mediante la generación de radicales libres en este sitio directamente o como un incremento compensatorio de la respiración en el complejo II. Otra posibilidad es que el defecto del complejo I produzca apoptosis, ya que hay evidencias de que la reducción en el potencial de membrana mitocondrial puede llevar a la apertura del poro de permeabilidad transitorio mitocondrial y propiciar la liberación de proteínas que señalizan el inicio de la apoptosis (Olanow y Tatton, 1999).

- También se ha observado que tanto el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) protegen a las neuronas de la SNc de ratas de los efectos de la transección de los axones nigroestriatales (Lin *et al.*, 1993). El GDNF ha demostrado que promueve la sobrevivencia y crecimiento de las neuronas nigroestriatales en ratones y monos lesionados. En un estudio de hibridación *in situ* no se encontraron niveles detectables de RNAm para la expresión de GDNF en cerebros obtenidos de enfermos de Parkinson. Es poco probable que la disminución en la expresión de GDNF inicie la pérdida de neuronas dopaminérgicas, sin embargo reduce un importante mecanismo de defensa, y de esta manera contribuye a la degeneración celular (Olanow y Tatton, 1999).
- Se ha reportado que en pacientes con EP hay un incremento en la translocación del Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 70 veces mayor que en personas sin la enfermedad; el NF- $\kappa$ B es un heterodimero que se unen a secuencias de DNA y que modulan la expresión de genes. Dicho factor puede ser activado por  $Ca^{2+}$ , especies reactivas de oxígeno (EROs) o factores tróficos (Segura *et al.*, 2003), una vez activo puede regular la transcripción de genes que contengan el motivo  $\kappa$ B (Lee *et al.*, 1997; 1998; Ramesh *et al.*, 2002) como citocinas proinflamatorias (Aktan, 2004), estos mediadores inflamatorios están implicados en la etiología de la EP (Chang y Liu, 1999). Al respecto se ha observado que los niveles de interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interferón  $\gamma$  (INF-  $\gamma$ ), y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) están incrementados en la SNc de pacientes con EP de un 760-1570 % en comparación con los pacientes control. Como se mencionó, la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo esta asociado la transcripción del receptor para TNF- $\alpha$  (TNFR1), y se ha observado que la activación de estos receptores promueve la apoptosis en cultivos de neuronas dopaminérgicas (Hunot *et al.*, 1996).

## **Etiología de la enfermedad de Parkinson**

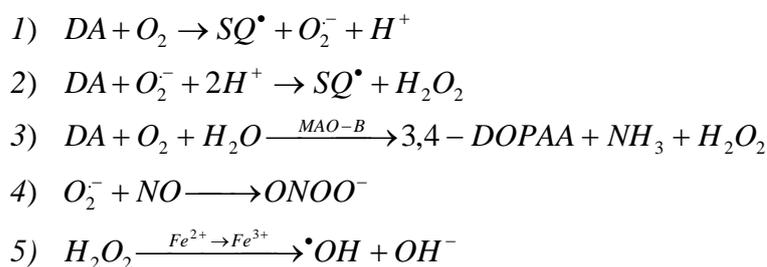
La etiología específica de esta enfermedad aún no es clara, estudios epidemiológicos indican un gran número de factores que pueden incrementar el riesgo de desarrollar este padecimiento (Tanner y Langton, 1990). En los últimos años se ha hecho hincapié en el papel etiopatogénico, tanto de tóxicos endógenos, como de toxinas ambientales, además de la excesiva formación de radicales libres, y el estrés oxidativo que esto conlleva, estos factores se han propuesto como la causa de la muerte de las neuronas dopaminérgicas que tiene lugar en la EP (Olanow y Tatton, 1999).

- **Excitotoxicidad:** es una causa establecida de la neurodegeneración que ha sido implicada en la EP basada en dos posibles mecanismos. El primero resulta del incremento en la liberación de glutamato. Las neuronas de la SNc son ricas en receptores para glutamato, y reciben una extensa inervación glutamatérgica proveniente de la corteza y del NST. En la EP, la falta de dopamina provoca la desinhibición del NST lo cual incrementa la tasa de disparo en las aferencias excitatorias a la SNc, provocando daño excitotóxico (Rodríguez *et al.*, 1998). Un segundo mecanismo sugiere que la reducción de la energía por defecto del complejo I mitocondrial, resulte en la pérdida del Mg-bloqueador dependiente de ATP de los receptores NMDA, lo cual permite que una concentración fisiológica de glutamato medie un aumento en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula (Olanow y Tatton, 1999). El  $\text{Ca}^{2+}$  es un ion fundamental en procesos intracelulares, interviene en la producción del potencial de acción, la liberación de neurotransmisores, la plasticidad neuronal y probablemente en la adquisición de memoria. Sin embargo, la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  o el fallo de los mecanismos que regulan su concentración intracelular desencadenan una serie de acontecimientos que conllevan a la muerte neuronal (Yu *et al.*, 2001). Ya que dicho aumento puede conducir a la activación de rutas moleculares, entre las que se incluyen a las proteínas cinasas, la fosfolipasa A2, la óxido nítrico sintasa y las proteasas (Segura *et al.*, 2003).
- **Estrés oxidativo:** En condiciones metabólicas normales, existe un balance entre los eventos oxidativos (producto de los radicales libres) y los sistemas de defensa antioxidantes (Cadet y Brannock, 1998). Cuando este balance no se mantiene, ya sea por una pérdida o disminución del sistema protector o por el aumento en la producción de los radicales libres, el tejido entra en “estrés oxidativo”; dicho estado provoca la destrucción indiscriminada de

macromoléculas celulares como proteínas, ADN, carbohidratos y lípidos (Oyama *et al.*, 1996; Clarke, 1999; Leist y Nicotera, 1999).

En la EP el estrés oxidativo ha recibido atención principal, debido al potencial que tiene la DA para oxidarse y formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras especies reactivas de oxígeno (EROs). Así el estrés oxidativo y la consecuente muerte neuronal se puede dar en la SNc cuando: **a)** incrementa el recambio de DA, resultando un exceso en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **b)** deficiencia de la glutatión peroxidasa, por lo que disminuye la capacidad de limpiar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o **c)** un incremento en el hierro reactivo, el cual promueve la formación de OH<sup>•</sup> (Olanow y Tatton, 1999); en la actualidad no se conoce ningún sistema enzimático o de protección posible para la eliminación del OH<sup>•</sup>, excepto la que provee la evolución de la vida “el continuo recambio celular de las moléculas dañadas”, ello implica que una vez que se forma el OH<sup>•</sup>, el daño celular es inminente a no ser por la actividad eficiente de la célula para eliminar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (González-Fragela *et al.*, 1998).

Durante su auto-oxidación, la DA es convertida a semiquinona “SQ<sup>•</sup>” y anión superóxido “O<sub>2</sub><sup>-</sup>” (1), el cual puede reaccionar con otras moléculas de DA y formar SQ<sup>•</sup> y peróxido de hidrógeno “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>” (2) o reaccionar con óxido nítrico y formar el altamente tóxico peroxinitrito “ONOO<sup>-</sup>” (4). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también es formado mediante el metabolismo enzimático de la DA por la monoaminooxidasa “MAO” (3), así el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante estas reacciones en presencia de Fe<sup>2+</sup> (5), genera radical hidroxilo “OH<sup>•</sup>” a lo cual se le denomina reacción de Fenton, (Barzilai *et al.*, 2001).



- Factores ambientales: Diversos estudios han encontrado una asociación entre la EP y determinados factores ambientales, como son: habitar en ambiente rural, consumo de agua de pozo, exposición a pesticidas y preservativos de la madera (Gorell *et al.*, 1999). La principal evidencia de un factor ambiental de la EP esta relacionado con la toxina MPTP (1-metil-4-fenil-2,3,6-tetrahidroxipiridina); adictos a drogas quienes tomaron accidentalmente

este compuesto desarrollaron un síndrome que reseñaba estrechamente a esta enfermedad. El MPTP induce toxicidad a través de su conversión en los astrocitos al ión piridinium (MPP<sup>+</sup>) en una reacción catalizada por la monoaminooxidasa B (MAO-B) (Singer *et al.*, 1987). El MPP<sup>+</sup> es tomado por las neuronas dopaminérgicas y causa defectos a nivel del complejo I, similar a lo que se observa en los pacientes con EP (Olanow y Tatton, 1999)

Otras toxinas exógenas que han sido asociadas con el desarrollo del parkinsonismo incluyen al monóxido de carbono, solventes orgánicos y bisulfito de carbono. Algunos metales traza se han relacionado como un factor de riesgo en el desarrollo de la EP, por ejemplo, el cobre o la exposición combinada a plomo, cobre y hierro (Olanow y Tatton, 1999; Duran y Chacon, 2001), además, la exposición prolongada a manganeso (Mn), el cual se acumula en el cerebro, especialmente en los ganglios basales, resultando en un desorden neurológico similar a la enfermedad de Parkinson (Takeda, 2003).

La neurotoxicidad por Mn fue descrita en 1837 en 5 personas que trabajaban en la extracción de Mn en Francia (Archivald y Tyree, 1987; Duran y Chacon, 2001; Olanow, 2004). Se reportó que estos pacientes presentaban debilidad muscular, postura inclinada, temblor, salivación y susurraban al hablar. Varios casos de neurointoxicación por Mn fueron reportados en los siguientes 150 años, particularmente en mineros, fundidores y trabajadores involucrados en la manufactura de baterías secas (Olanow, 2004).

## **Manganeso (Mn)**

El manganeso (Mn) es un elemento traza esencial que se encuentra en todos los tejidos (Dobson *et al.*, 2004), y es requerido para muchas reacciones enzimáticas, incluyendo síntesis de aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos. Familias de enzimas dependientes de Mn incluyen a oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, además este metal es requerido para las reacciones catalizadas por la arginasa, glutamino sintetasa y la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn; Takeda, 2003; Aschner *et al.*, 2005).

La deficiencia de Mn puede causar un amplio rango de problemas, incluyendo déficit en el crecimiento, defectos esqueléticos, reducción de la fertilidad, defectos al nacimiento, tolerancia anormal a la glucosa, alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Keen, 1999). Sin embargo estos efectos fueron observados únicamente en animales de laboratorio, la deficiencia de Mn no ha sido reconocida clínicamente en humanos (Dobson *et al.*, 2004).

Por otro lado, bajo ciertas condiciones de exposición a altas dosis de Mn, se acumula en el cerebro y puede inducir efectos neurológicos adversos. La intoxicación por Mn se refiere comúnmente como “manganismo” en donde se observan las mismas características de la EP (Harte *et al.*, 1991), lo cual está asociado con niveles altos del metal, especialmente en el caudado-putamen, globo pálido, sustancia nigra y núcleo subtalámico (Calne *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1999).

Los signos clínicos de la neurotoxicidad por Mn incluyen: alteraciones psiquiátricas, parkinsonismo y distonía. Se reporta que personas con exposición extrema a Mn tienen perturbaciones de la conducta, alucinaciones y psicosis, referidos como “locura mangánica”, que reseñan a la esquizofrenia. Algunas manifestaciones iniciales de la neurotoxicidad por Mn incluyen fatiga, dolor de cabeza, pérdida del apetito, debilidad muscular, apatía, insomnio y disminución de la libido. Si la exposición continúa y la enfermedad progresa los pacientes pueden desarrollar contracción muscular prolongada (distonía), decremento del movimiento (hipocinesia), rigidez y temblor muscular (Pal *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2001). Otras manifestaciones extrapiramidales comunes incluyen alteraciones de la marcha con propensión a caer de espalda, inestabilidad postural, micrografía, rostro inexpresivo y alteraciones en el

habla (Huang *et al.*, 1993; Erikson *et al.*, 2005), estos signos están asociados con disfunción dopaminérgica dentro de los ganglios basales (Chun *et al.*, 2001; Tapin *et al.*, 2006) y aunque se ha propuesto que el sitio de lesión neurológica primaria es el globo pálido, se han acumulado algunas evidencias que sugieren que la toxicidad del Mn puede causar daño a la SNc (Chun *et al.*, 2001). En este sentido, se ha reportado que la inyección intraestriatal de Mn en animales de laboratorio, provoca la disminución de la concentración de dopamina (Witholt *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2001), además, se ha descrito que tanto en el manganimismo como en la EP, la cantidad de neuromelanina se reduce en la SNc debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Archivald y Tyree, 1987; Tapin *et al.*, 2006).

### **Absorción de Mn**

Solo alrededor del 1 al 5 % del Mn ingerido por el humano es absorbido por el tracto gastrointestinal bajo condiciones normales (Finley *et al.*, 1994). Los detalles moleculares de la absorción de Mn enteral no se han dilucidado completamente, hay evidencias que sugieren un transporte activo (García-Aranda *et al.*, 1983), mientras que algunos grupos han demostrado que su absorción es a través de difusión pasiva simple (Bell *et al.*, 1989).

Se han encontrado muchos factores que afectan la absorción de Mn, los cuales incluyen el nivel de Mn en la dieta (Britton y Cotzias, 1966), concentración de varios minerales (Lai, 1999), edad y estado de desarrollo del individuo (Zlotkin *et al.*, 1995) y especialmente el estado del hierro; se ha observado una relación inversa entre el almacén corporal de hierro y la absorción de Mn, lo cual se debe probablemente a la competencia por la maquinaria de transporte como son los transportador de metales divalentes (DMT-1), también conocidos como DCT-1 o nramp-2 (Gunshin *et al.*, 1997).

Por otro lado, la disponibilidad de Mn que puede entrar al cerebro es regulada por varios mecanismos fisiológicos que incluyen la absorción en el tracto gastrointestinal, la excreción por el sistema hepatobiliar, unión a transferrina y otras proteínas transportadoras en la sangre, además de las barreras cerebrales. La acumulación excesiva de Mn en el cerebro puede ocurrir cuando estos sistemas regulatorios son sobrepasados parcialmente, como en el caso de la inhalación (Mergler *et al.*, 1994; Calne *et al.*, 1994; Pal *et al.*, 1999). Así, cuando el Mn es inhalado puede alcanzar la profundidad del árbol bronquial, absorberse directamente al

torrente sanguíneo y alcanzar la vasculatura cerebral sin tener la oportunidad de pasar primero por la excreción biliar (Maleki *et al.*, 1999).

Existe un número limitado de estudios que han evaluado la absorción de Mn en los pulmones, los cuales muestran que hay una gran cantidad de factores que influyen la deposición de las partículas del Mn inhalado. Entre ellos están el tamaño de las partículas, el área de superficie, la especie de Mn, la distribución de la partícula, su toxicidad a los macrófagos y la solubilidad. Todos estos factores influyen fuertemente el sitio donde el Mn es depositado dentro del tracto respiratorio y la cantidad que es absorbida (Dorman *et al.*, 2001; Dobson *et al.*, 2004). Al respecto se ha observado que mientras que el cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ), una sal soluble, es rápidamente tomada dentro del torrente sanguíneo, el óxido de manganeso insoluble ( $\text{MnO}_2$ ) a una dosis similar es absorbido lentamente y en menor cantidad (Roels, 1997), este reporte también muestra que la sal soluble se acumuló en mayor cantidad en el cerebro. Dorman (2001) demostró que el sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) inhalado fue “limpiado” más rápidamente de los pulmones en comparación con los compuestos menos solubles como el fosfato o tetraóxido de manganeso.

De esta manera, la cantidad de Mn que es absorbido de los pulmones al torrente sanguíneo, determina la concentración del metal que alcanza al cerebro y a otros órganos (Dobson *et al.*, 2004).

### **Transporte de Mn al cerebro**

El Mn se ha encontrado en todos los tejidos de mamíferos, en concentraciones entre los 0.3 a 2.9  $\mu\text{g}$  de Mn/g de tejido fresco y hay pequeñas diferencias en la concentración de este metal entre especies (Keen y Zidenberg-Cherr, 1994). Los tejidos que presentan abundantes mitocondrias y pigmentos tienden a tener mayor concentración de Mn (Gavin *et al.*, 1992).

El Mn existe en su forma divalente ( $\text{Mn}^{+2}$ ; ion manganeso) y trivalente ( $\text{Mn}^{+3}$ ; ion mangánico), y su afinidad por ciertos ligandos en el plasma es importante para entender el transporte de Mn al interior del cerebro (Takeda, 2003). En el plasma, alrededor del 80 % del  $\text{Mn}^{+2}$  es unido a  $\beta$ -globulina y albúmina, mientras que el  $\text{Mn}^{+3}$  es unido a transferrina (Critchfield y Keen, 1992; Ueda *et al.*, 1993).

Se ha observado que posterior a la inyección intravenosa de Mn, este metal es rápidamente retirado de la circulación sanguínea y una porción es transportada al cerebro en un periodo corto, lo cual podría deberse a un mecanismo de captura independiente de transferrina. Este sistema parece que transporta Mn al interior del cerebro más rápidamente que el Mn unido a transferrina (Sotogaku *et al.*, 2000). Existe la posibilidad de que el  $Mn^{+2}$  y  $Mn^{+3}$  no unidos a proteínas sean capturados por los plexos coroideos, y que aproximadamente el 30 % de este Mn inyectado no unido a proteínas sea transportado rápidamente al cerebro probablemente como ion libre. De esta manera, se ha reportado que varios sistemas de transporte participan en la captura de Mn, por ejemplo los canales de  $Ca^{2+}$  (Narita *et al.*, 1990), intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (Frame y Milanick, 1991), canal uniporte de  $Ca^{2+}$  (Gavin *et al.*, 1990) y el antiporte de  $Na^+/Mg^+$  (Gunther *et al.*, 1990).

Por otra parte, Gunshin y cols. (1997) demostraron que el DMT-1 es expresado en las células endoteliales de los capilares cerebrales y en las células epiteliales coroideas. Este transportador podría estar envuelto en el transporte de Mn a través de las barreras cerebrales (Takeda, 2003). Por lo que se ha sugerido que el Mn entra al cerebro a través de los capilares cerebrales y/o el fluido cerebroespinal (transportado por los plexos coroideos) o vía el nervio olfatorio. A concentraciones normales en plasma el transporte a través de los capilares predomina, mientras que a altas concentraciones, el transporte a través de los plexos coroideos parece prevalecer (Murphy *et al.*, 1991; Rabin *et al.*, 1993). A la fecha el estudio del transporte de Mn a través de las barreras cerebrales se ha enfocado a la transferrina y a los DMT-1 (Roth *et al.*, 2000).

### **Barrera hemato-encefálica**

El endotelio capilar tiene la mayor densidad de receptores para transferrina en el cerebro; dicha molécula y su receptor se han implicado en el transporte de  $Mn^{+3}$ , ya que cada molécula de transferrina tiene 2 sitios de unión de alta afinidad para cationes trivalentes (Moos, 1996), por lo que la transferrina une  $Mn^{+3}$  y es transportada dentro del cerebro a través de la barrera hemato-encefálica vía la endocitosis mediada por su receptor (Aschner y Gannon, 1994), de esta manera el  $Mn^{+3}$  puede ser transportado en las regiones que expresan altas densidades de receptores para transferrina. De acuerdo con lo anterior, se sabe que tanto el núcleo acumbens y el caudado-putamen, dos núcleos con gran cantidad de receptores para transferrina, tienen

fibras aferentes a áreas en las cuales el Mn se acumula, como son el globo pálido y la sustancia nigra (Aschner *et al.*, 2005).

Por otro lado, en estudios utilizando la inyección intravenosa de Mn, se ha demostrado un transporte eficiente de  $Mn^{+2}$  a través de la barrera hemato-encefálica independiente de transferrina, este hecho sugiere el transporte de  $Mn^{+2}$  al interior del cerebro como ion libre (Sotogaku *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2000). Estos estudios proponen que el transporte de  $Mn^{+2}$  a través de la barrera hemato-encefálica se da por un mecanismo activo o un mecanismo pasivo, ambos saturables (Murphy *et al.*, 1991; Wadhvani *et al.*, 1992).

### **Plexos coroideos**

Los plexos coroideos es un tejido altamente vascularizado cuya función principal es la producción y el mantenimiento de la homeostasis del fluido cerebroespinal (FCE). La regulación de la entrada de sustratos al cerebro vía la síntesis del FCE por los plexos coroideos es diferente al de la barrera hemato-encefálica. Los capilares de los plexos coroideos son fenestrados y las sustancias pueden ser tomadas por este epitelio, el cual, secreta entonces el FCE; de esta manera las neuronas capturan sustancias del líquido cerebroespinal producido por las células endoteliales (Aposhian *et al.*, 1999).

Los plexos coroideos son un sitio potencialmente importante en la entrada de Mn al cerebro; en esta estructura es donde aparece primero el  $^{54}Mn$  después de su inyección intravenosa (Takeda *et al.*, 1998a). Además, se reporta la rápida localización de Mn en los plexos coroideos observado mediante imagen por resonancia magnética. Estudios similares con Mn radio-marcado inyectado intracerebroventricularmente, revelan que este metal se localiza en los plexos coroideos dentro de la primera hora posterior a su inyección (Gianutsos *et al.*, 1997). Además, las células endoteliales de los plexos coroideos tienen una densidad de receptores para transferrina intermedia entre los capilares cerebrales y las neuronas (Moos, 1996); como se mencionó la transferrina está implicada en el transporte de  $Mn^{+3}$  al interior del cerebro.

## **Nervio olfatorio**

El sistema olfatorio forma una interfase directa entre el sistema nervioso y el ambiente externo. Algunos xenobióticos pueden sobrepasar la circulación sistémica y tener acceso directo al cerebro o al fluido cerebroespinal seguido de la administración intranasal. Tres vías principales pueden facilitar el movimiento de xenobióticos de la nariz al cerebro incluyendo: *a*) al nervio olfatorio, *b*) vía el epitelio olfatorio (independiente a los receptores de las neuronas olfatorias, resultando en un transporte al cerebro a través del espacio perineuronal alrededor del nervio olfatorio) y *c*) una vía sistémica, secundaria al movimiento del epitelio nasal a la sangre en el espacio submucosal (Mathison *et al.*, 1998).

Se ha reportado que después de la deposición intranasal de Mn, este metal puede migrar a varias partes del cerebro mediante su habilidad para pasar a través de las sinapsis y viajar hacia neuronas secundarias y terciarias (Tjälve *et al.*, 1996). Dependiendo de la dosis, el transporte de Mn del epitelio nasal al bulbo olfatorio fue demostrado seguido de la administración intranasal de MnCl<sub>2</sub> (Henriksson *et al.*, 1999), y esta propiedad de viajar a través de neuronas secundarias y terciarias del Mn no se ha observado con otros metales (Tjälve y Henriksson, 1999). Por otro lado, después de múltiples administraciones intranasales se observó aumento en la concentración de Mn en el estriado, demostrando que este metal es capaz de alcanzar a este núcleo bajo ciertas condiciones de exposición (Gianutsos *et al.*, 1997).

## **Mn y ganglios basales**

Como se mencionó anteriormente, el Mn tiende a acumularse en regiones ricas en DA. Se ha examinado el posible papel de la DA y sus mecanismos de recaptura en el transporte de Mn al interior de las neuronas dopaminérgicas. Los resultados experimentales soportan la idea de que la concentración de Mn en el mesencéfalo ventral es dependiente del sistema de recaptura de DA dependiente de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (DAT) (Calne *et al.*, 1994; Nagatomo *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 1992, 2005). Ingersoll y cols. (1999) examinaron el efecto de la inhibición del DAT sobre la captura de Mn, ellos administraron cocaína (un inhibidor del DAT) a ratas a las cuales se les inyectó posteriormente Mn intracerebralmente. De esta manera, las ratas expuestas a Mn que fueron pretratadas con cocaína mostraron decremento significativo en la acumulación de

Mn en los ganglios basales. También, ratones KO, que no expresaban el transportador para dopamina (DAT-KO) acumulaban menos Mn en el estriado comparados con los ratones silvestres (WT; Erikson *et al.*, 2005). Del mismo modo, se reporta que la concentración de Mn en la SNc es dependiente de la concentración de DA. Para disminuir la concentración de DA, se trató a ratas con reserpina (i.p.), de esta manera, se observó que la reserpina disminuyó la concentración de Mn en los ganglios basales después de su inyección intracerebral (Aposhian *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 2005).

Estos experimentos sugieren que la recaptura y/o el metabolismo de la DA contribuyen en el transporte de Mn. Estas observaciones llevan a la hipótesis que el Mn puede unirse a DA y transportarse como un complejo al interior de las neuronas vía el DAT y/o el Mn puede competir con el  $\text{Na}^{+2}$  para su cotransporte con la DA a través del DAT (Aposhian *et al.*, 1999).

Por otra parte, hay reportes contradictorios acerca del potencial toxico del Mn dentro de los ganglios basales, mientras que algunos autores reportan un papel antioxidante del Mn, otros estudios reportan un papel pro-oxidante este metal.

En apoyo al papel antioxidante, se ha demostrado que a bajas concentraciones el  $\text{Mn}^{+2}$  protege a las células en contra del estrés oxidativo, y que este efecto neuroprotector deriva del hecho de que el  $\text{Mn}^{+2}$  puede catalizar la dismutación del  $\text{O}_2^-$  y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  bajo condiciones fisiológicas (Oubrahim *et al.*, 2001; HaMai *et al.*, 2001; HaMai y Bondi, 2004), en cuanto al papel pro-oxidante otros estudios reporta que el  $\text{Mn}^{+2}$ , produce el aumento en la generación de EROs, sin embargo su actividad pro-oxidante fue bloqueada en la presencia de DFO, un quelador de metales trivalentes. Por lo que se ha propuesto que aún cuando el  $\text{Mn}^{+2}$  no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de  $\text{Mn}^{+3}$  en cantidades traza es suficiente para promover la formación de radicales libres y quinonas tóxicas producto de la auto-oxidación de la DA mediada por Mn (Sava *et al.*, 2004; HaMai y Bondi, 2004). De esta manera, se ha sugerido que el  $\text{Mn}^{+3}$  es la forma activa en los mamíferos (Ali *et al.*, 1995), y que además es requerido en cantidades traza para la aparente actividad pro-oxidante asociada con la actividad del  $\text{Mn}^{+2}$ , indicando que el  $\text{Mn}^{+3}$  podría tener un efecto catalítico sobre la oxidación del  $\text{Mn}^{+2}$  (HaMai *et al.*, 2001).

## Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson

Desde hace mucho tiempo el estudio del Sistema Nervioso se ha realizado mediante investigación análoga en animales de laboratorio bajo procedimientos generales que posibilitan la demostración de ciertos padecimientos. El experimento consiste en producir por algún medio, una lesión específica que permita demostrar que la ausencia de cierta área provocará alteraciones específicas (Avila-Costa, 1996), o la utilización de ciertas sustancias químicas neurotóxicas que permiten estudiar los mecanismos básicos que regulan la función neural tanto a nivel celular, molecular o conductual de diferentes organismos, la finalidad de estos modelos es recrear algunos de los eventos que suceden en las enfermedades neurodegenerativas (Anaya, 1997). Los modelos animales de degeneración nigral, han adquirido gran importancia, ya que se puede definir la naturaleza anatómica, ultraestructural, fisiológica, bioquímica y conductual de esta degeneración. La alteración dopaminérgica, puede ser evaluada de diversas maneras: cuantificando la reducción de células de la SNc, midiendo la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH) la enzima limitante en la síntesis de catecolaminas (figura 2), midiendo la concentración de dopamina en el estriado, etc. (Alexi *et al.*, 2000).

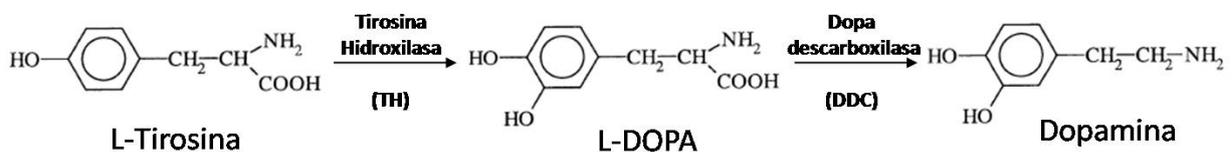


Figura 2.- La dopamina se sintetiza en una serie de pasos que comienzan a partir del precursor L-tirosina, aminoácido esencial presente en todos los tipos celulares. La primera reacción, se cataliza por la tirosina hidroxilasa (TH), la cual necesita tres cofactores para realizar su función: tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), hierro y oxígeno. El segundo paso se cataliza por la dopa descarboxilasa (DDC), que utiliza piridoxal 5' fosfato (PLP) como cofactor (García-Miniet *et al.* 2003).

Por lo que el desarrollo de agentes químicos que selectivamente destruyen neuronas dopaminérgicas nigroestriales en animales de laboratorio, proporcionó un nuevo periodo de investigación en el área (Winn, 1991), entre ellos tenemos:

- **MPTP:** En humanos y monos el MPTP produce un síndrome parkinsoniano agudo irreversible caracterizado por todos los signos clínicos de la EP, incluyendo el temblor, la rigidez, enlentecimiento de los movimientos, inestabilidad postural y el congelamiento (freezing; Dauer y Przedborski, 2003), degeneración de las neuronas dopaminérgicas y

agregación de  $\alpha$ -sinucleína (pero no típicos cuerpos de Lewy), además, respuesta positiva al tratamiento con Levodopa (Shimohama *et al.*, 2003).

Después de la administración sistémica, el MPTP, el cual es altamente lipofílico, cruza la barrera hemato-encefálica en pocos minutos. Una vez dentro del cerebro es metabolizado en la glia por la MAO-B a  $MPP^+$  (la forma tóxica), para entonces ser liberado al espacio extracelular. Debido a que el  $MPP^+$  es una molécula polar depende de los transportadores en la membrana plasmática para entrar a la célula; el  $MPP^+$  tiene gran afinidad por el sistema de recaptura de alta afinidad para dopamina (DAT) (Bezard *et al.*, 1999; Alexi *et al.*, 2000; Dauer y Przedborski, 2003)

Dentro de las neuronas dopaminérgicas el  $MPP^+$  afecta a las mitocondrias, dañando el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual lleva a un rápido decremento en el contenido de ATP y aumento en la producción de EROs, especialmente  $O_2^-$  (Alexi *et al.*, 2000; Dauer y Przedborski, 2003; Shimohama *et al.*, 2003). La administración sistémica de MPTP reduce entre el 80 y 85 % el número de neuronas dopaminérgicas, al igual que la concentración de DA y sus metabolitos (Langston *et al.*, 1984; Hallman *et al.*, 1985).

En monos la infusión unilateral de MPTP, a través de las arterias carótidas produce hemiparkinsonismo, el cual se caracteriza por presentar rigidez de los miembros, temblor en reposo, bradicinesia, dificultad para iniciar movimientos y heminegligencia (Burns *et al.*, 1983) además de presentar giro espontáneo ipsilateral, que puede ser revertido con la aplicación sistémica de agonistas dopaminérgicos (Davis y Dray, 1976; Bankiewicz *et al.*, 1986). La administración sistémica bilateral de MPTP en monos, provoca severas deficiencias motoras como la bradicinesia, acinesia, rigidez muscular, temblor y postura encorvada, síntomas semejantes a los que presentan las personas con EP (Langston *et al.*, 1984; Carlman *et al.*, 1991). Sin embargo, algunas dificultades con el uso del MPTP como modelo, es que su toxicidad es un modelo agudo o subagudo, mientras que la EP es un padecimiento lento y progresivo, además, roedores como ratones y ratas son menos sensibles que los primates a la neurotoxicidad inducida por MPTP, en ellos se requieren altas dosis de esta toxina para producir la depleción de DA y los signos conductuales permanentes del parkinsonismo aparecen raramente (Shimohama *et al.*, 2003).

- 6-OHDA: La 6-hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifeniletilamina; 6-OHDA) fue el primer modelo animal de la EP asociada con la muerte de neuronas dopaminérgicas, introducido por Ungerstedt en 1968. Es un análogo hidroxilado de la DA, la cual produce depleción selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y sus terminales en el estriado (Blum *et al.*, 2001). Debido a que la 6-OHDA no puede cruzar la barrera hemato-encefálica, debe ser administrada localmente mediante su inyección esterotáxica dentro de la SNc, el haz medial o el núcleo estriado bilateral o unilateralmente; la elección de uno u otro sitio de inyección depende del objetivo del experimento (Dauer y Przedborski, 2003). Así, posterior a su inyección, la neurotoxina es transportada selectivamente vía el DAT (Thoenen y Tranzre, 1973), una vez dentro de las neuronas dopaminérgicas la 6-OHDA actúa de la siguiente forma: bajo condiciones fisiológicas la 6-OHDA es rápidamente oxidada no enzimáticamente por el oxígeno molecular (Soto-Otero *et al.*, 2000) produciendo radicales libres,  $H_2O_2$  y productos de oxidación de quinonas los cuales también están involucrados como intermediarios de radicales libres inestables (León, 1996). El  $H_2O_2$  resultante de la auto-oxidación de la 6-OHDA puede ser fácilmente reducido en presencia de hierro ( $Fe^{2+}$ ) vía la reacción de Fenton, formando  $OH^\bullet$  el cual es considerado el más dañino de los radicales libres para las células; las neuronas dopaminérgicas son ricas en hierro debido a la neuromelanina que contienen (Enochs *et al.*, 1994), lo que facilita la formación del  $OH^\bullet$ . También se ha reportado que la 6-OHDA puede actuar directamente, por inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo I (Glinka *et al.*, 1998). Debido al déficit metabólico (depleción de ATP intracelular), las neuronas no pueden ejercer sus funciones fisiológicas normales y consecuentemente mueren (Blum *et al.*, 2001).

Animales con lesión bilateral muestran elementos esenciales de los síntomas motores parkinsonianos. Sin embargo la lesión bilateral no es un modelo comúnmente utilizado, debido a que los animales lesionados de esta manera necesitan de cuidados intensivos ya que mueren fácilmente debido a que presentan marcada adipsia y afagia (Halbach, 2004; Bové *et al.*, 2005). Por ésta razón el modelo animal que indudablemente ha contribuido en la mayoría de investigaciones preclínicas de la EP es la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc o el haz medial en ratas (Deumens *et al.*, 2002), la cual produce cerca de la depleción total de la DA en el cuerpo estriado dentro de las primeras 24 hrs. Por lo que después de la inyección unilateral de 6-OHDA, las terminales dopaminérgicas degeneran del lado de la lesión, el animal presenta giro espontáneo ipsilateral y disminuye su conducta exploratoria espontánea (Ungerstedt, 1971; Miller y Beninger, 1991; Fornaguera *et al.*,

1993). Sin embargo, este modelo no mimetiza las características clínicas y patológicas de la EP, ya que este modelo induce exclusivamente efectos agudos, los cuales son diferentes de la progresión lenta natural de los enfermos con Parkinson (Betarbet *et al.*, 2002).

- Paraquat: El paraquat (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinium) es un herbicida que produce un modelo tóxico de la EP; muestra similitud estructural con el MPP<sup>+</sup>, sin embargo, esta toxina no penetra fácilmente la barrera hemato-encefálica (Shimizu *et al.*, 2001). La toxicidad por paraquat parece que es mediada por la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Day *et al.*, 1999). La administración sistémica de paraquat a ratones lleva a la degeneración de neuronas dopaminérgicas acompañado de la formación de inclusiones que contienen  $\alpha$ -sinucleína (McCormack *et al.*, 2002). Aún no se ha determinado si la toxicidad del paraquat es selectiva para las neuronas dopaminérgicas o si otras células son afectadas de manera similar (Dauer y Przedborski, 2003).
- Rotenona: Es un compuesto citotóxico natural que se extrae de plantas tropicales, es usado ampliamente como insecticida. Es altamente lipofílico por lo que tiene acceso a todo el organismo (Talpade, 2000). Se une e inhibe al complejo I mitocondrial. En un principio se pensaba que la inyección intravenosa a dosis bajas producía la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales, acompañado de inclusiones parecidas a cuerpos de Lewy positivas para  $\alpha$ -sinucleína (Betarbet *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios subsiguientes en donde se trató crónicamente a ratas con dosis bajas de rotenona, mostraron disminución de neuronas colinérgicas y células positivas para NADPH diaforasa. Estos resultados demuestran que la rotenona tiene una toxicidad más amplia de lo que originalmente se pensaba (Hoglinger *et al.*, 2003). Ratas de la cepa Lewis expuestas crónicamente a través de la canulación de la vena yugular, mostraron varias características de la EP, incluyendo la degeneración de la vía nigroestriatal y la formación de inclusiones intracitoplasmáticas en las neuronas dopaminérgicas que son reminiscencias de cuerpos de Lewy. Estas ratas mostraron bradicinesia, inestabilidad postural y algunas evidencias de temblor, sin embargo, la patología parkinsoniana fue observada solo en la mitad de las ratas a las cuales se les administró rotenona y estos síntomas no fueron observados en otras cepas de ratas (Shimohama *et al.*, 2003)

Como se mencionó, se ha reportado un aumento de la prevalencia de la enfermedad de Parkinson en las últimas décadas a nivel mundial. El estudio de esta enfermedad se ha realizado sistemáticamente desde la primera descripción hecha por James Parkinson en 1817 en humanos y en modelos animales, sin embargo aun no hay respuestas concluyentes acerca de su origen, evolución o tratamiento. Por lo que se requieren nuevos modelos que puedan contribuir al conocimiento de los mecanismos degenerativos de la enfermedad, además de servir en la búsqueda de nuevos tratamientos.

## **Justificación**

Existen varios modelos para el estudio de la EP, los cuales muestran características específicas de la enfermedad, cada uno con ventajas y desventajas. Sin embargo ninguno representa las complejas características neurodegenerativas crónicas de ésta enfermedad en humanos. El Mn es uno de los pocos elementos que se han podido relacionar directamente como un factor de riesgo para el desarrollo de la EP debido a su capacidad para acumularse en los ganglios basales y producir un síndrome parkinsonico, más aún, consideramos que la exposición por vía inhalada representa una ventaja sobre los otros modelos experimentales, ya que es un modelo no invasivo, que no requiere cirugía estereotáxica o inyecciones intraperitoneales, y ya que las inhalaciones son dos veces por semana, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas se llevará a cabo de manera gradual y bilateral, similar a lo que se observa en los pacientes con enfermedad de Parkinson.

## **Hipótesis**

Se ha descrito que el Mn se acumula dentro de los ganglios basales causando neurotoxicidad, por lo que la inhalación crónica a Mn propiciara la muerte de las neuronas dopaminérgicas, mismas neuronas que mueren en la EP, provocando un síndrome similar a esta enfermedad en los ratones expuestos.

## **Objetivo general**

Caracterizar un modelo para el estudio de la enfermedad de Parkinson en ratones mediante la inhalación de Mn.

## **Objetivos particulares**

- Evaluar la coordinación motora de los animales control, así como de los animales que han inhalado Mn mediante las pruebas de viga de equilibrio y motora fina (Reaching Task).
- Determinar el número de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta mediante inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) en animales control y en animales que han inhalado Mn.
- Determinar gliosis reactiva mediante inmunohistoquímica para GFAP en animales control y animales que han inhalado Mn.
- Realizar un análisis ultraestructural del estriado y de la sustancia nigra de los animales control y expuestos.

## Metodología

Los experimentos se llevaron a cabo con un total de 20 ratones macho de la cepa CD1 con peso inicial de  $33 \pm 2$  g, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12, con agua y alimentación *ad libitum*. Antes de la exposición a Mn los animales se entrenaron para las pruebas de coordinación motora durante una semana. Posteriormente se formaron dos grupos: 10 ratones fueron expuestos a agua desionizada (grupo control), mientras que el otro grupo de 10 ratones fueron expuestos a una mezcla de cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2$ ) 0.04 M y acetato de manganeso ( $\text{AcMn}_3$ ) 0.02 M, por vía inhalada en una caja de acrílico 1 hora 2 veces por semana. Cada semana se evaluó la coordinación motora de todos los animales mediante las pruebas de viga de equilibrio y motora fina (reaching task; apéndice 1).

En base a los resultados obtenidos en las evaluaciones conductuales se determinó sacrificar a todos los animales después de haber sido expuestos a 40 inhalaciones (5 meses de exposición) bajo anestesia profunda con Pentobarbital sódico dosis letal i.p. (0.2 mg), posteriormente los ratones se perfundieron vía aórtica con solución salina isotónica al 0.9 % y se fijó el tejido con una mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 2 % en amortiguador de cacodilato al 0.1 M pH 7.4. Una vez perfundidos, se extrajeron los cerebros y se colocaron en el mismo fijador por dos horas, posteriormente se tomaron fragmentos del núcleo caudado y de la sustancia nigra para el análisis ultraestructural (apéndice 2), el cual consistió en la medición del diámetro de 50 botones presinápticos realizado directamente en la pantalla del microscopio, conteo de contactos con el cuello o con la cabeza de la espina dendrítica y el número de sinapsis perforadas.

Se hicieron cortes histológicos del mesencéfalo ventral a nivel de la SNc y del núcleo estriado, y se realizó la técnica inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH), así como inmunohistoquímica para GFAP (apéndice 3), para poder hacer el conteo de las neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc, y determinar gliosis reactiva en la SNc y NE respectivamente.

El análisis de resultados se realizó de la siguiente manera: Para las pruebas de coordinación motora se utilizó ANOVA seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para el diámetro de los botones sinápticos, el número de neuronas DA y gliosis reactiva se realizaron pruebas de T; finalmente, para las características del botón sináptico (contacto con el cuello o con la cabeza de la espina dendrítica y el número de sinapsis perforadas) se utilizó la prueba de Wilcoxon.

## **Resultados**

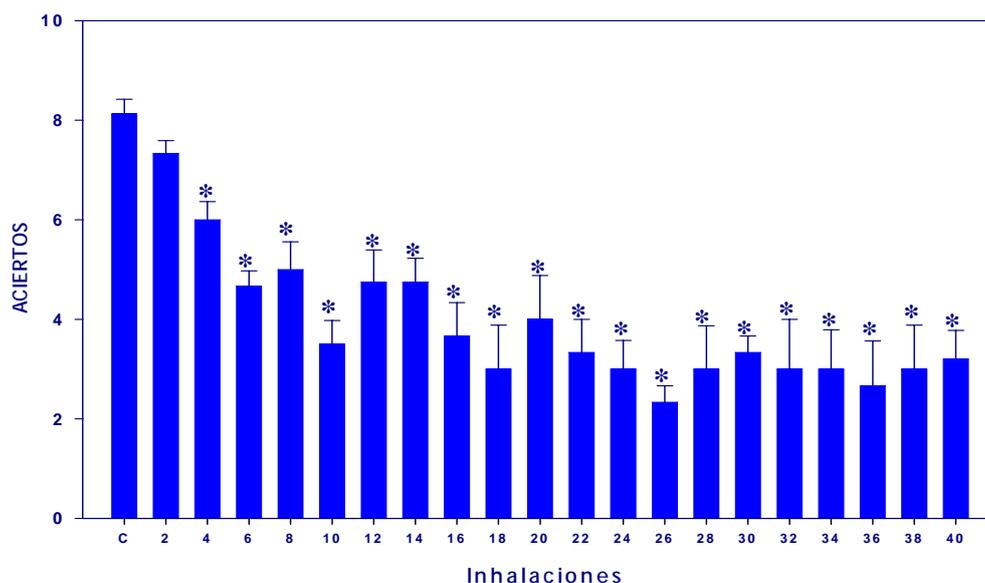
La inhalación de Mn produjo cambios funcionales y morfológicos importantes en los animales expuestos, como disminución de las neuronas dopaminérgicas y aumento en el número de células gliales, además de cambios ultraestructurales en el núcleo estriado y en la SNc, los cuales no fueron observados en el grupo control después de la inhalación de agua desionizada.

### **Conducta motora**

Se evaluó la coordinación motora (reaching task), mediante el conteo de aciertos y errores de los animales que conformaron los grupos control y expuestos a Mn. Como se observa en la grafica 1 en promedio los animales control obtuvieron 8 aciertos, mientras que los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ , a partir de la cuarta y hasta la cuadragésima inhalación mostraron disminución significativa en el número de aciertos.

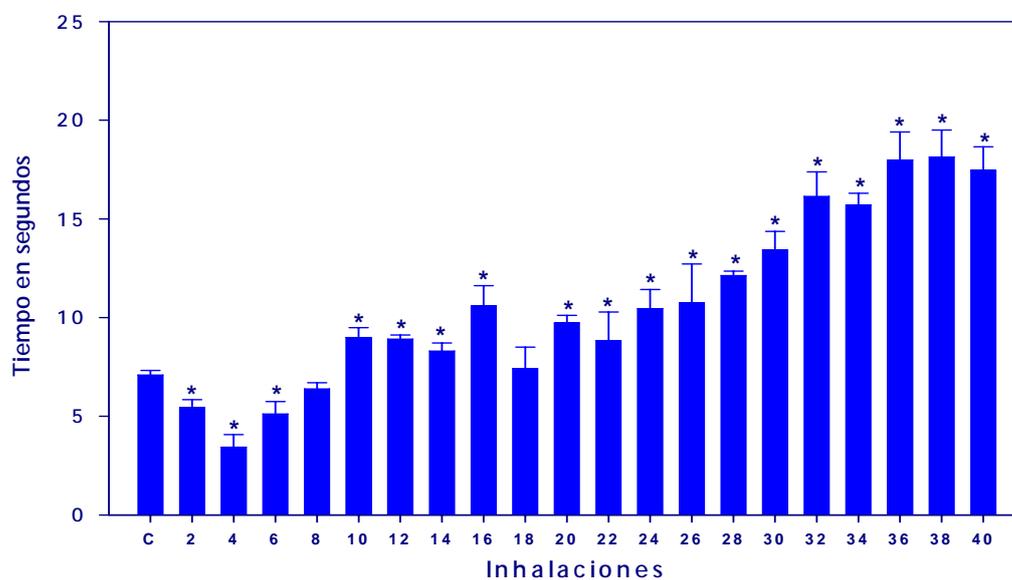
En cuanto a la prueba de la viga de equilibrio (grafica 2), se observa que el tiempo promedio que tardaron los animales control en atravesar la viga fue de 7 segundos, mientras que los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ , desde la segunda y hasta la octava inhalación mostraron disminución en el tiempo en el cual la recorrían con respecto al tiempo de los animales del grupo control, lo cual, probablemente corresponde a actividad motora hiperactiva, sin embargo, a partir de la décima y hasta la cuadragésima inhalación los animales expuestos mostraron aumento en el tiempo de realización de la prueba de manera tiempo – dependiente. Cabe señalar que durante la realización de las pruebas de coordinación motora pudimos observar que algunos de los animales expuestos a la inhalación de Mn presentaban un leve temblor que se hacia mas evidente al ponerlos sobre la viga de equilibrio.

### Prueba de coordinación motora fina (Reaching Task)



Gráfica 1: Media del número de aciertos tanto del grupo control (c), así como de los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . \* =  $P < 0.05$  vs grupo control

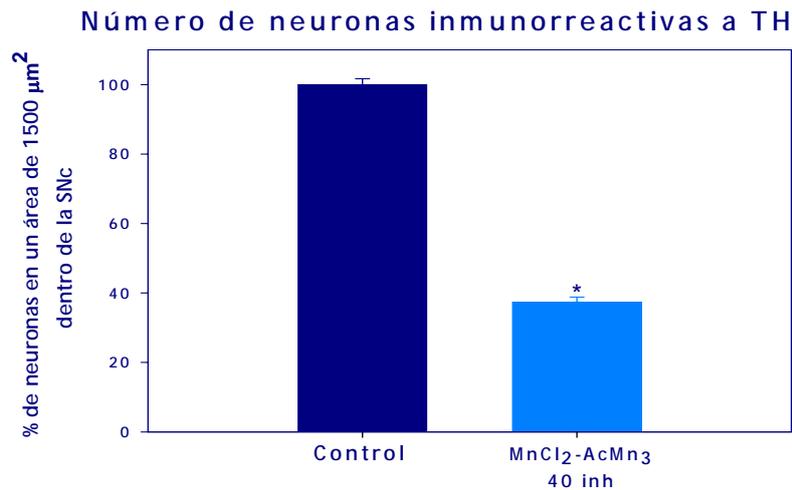
### Prueba de coordinación motora en la viga de equilibrio



Gráfica 2: Media del tiempo en segundos que tardaron los ratones en cruzar la viga de equilibrio, tanto del grupo control (c), así como de los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  durante las 40 inhalaciones. \* =  $P < 0.05$  vs grupo control

## Inmunohistoquímica

Como se mencionó, se realizó la técnica inmunohistoquímica anti-TH en el mesencéfalo ventral (SNc). La gráfica 3 muestra que en el grupo expuesto a Mn hay disminución del 63 % en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc con respecto al grupo control. Las figuras 3 A,B corresponden al mesencéfalo de animales control; en los animales expuestos a Mn como lo muestra la figura 3 C,D, se puede observar una clara disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc.



Gráfica 3.- Porcentaje de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc). La media del grupo control se tomó como el 100 %, se observa la reducción del 63 % en el número de neuronas TH positiva remanentes en el grupo de ratones expuestos a 40 inhalaciones de la mezcla de MnCl<sub>2</sub> y AcMn<sub>3</sub>. El conteo de las neuronas se realizó en un área de 1500 µm<sup>2</sup> dentro de la SNc. \* = P < 0.001 vs grupo control.

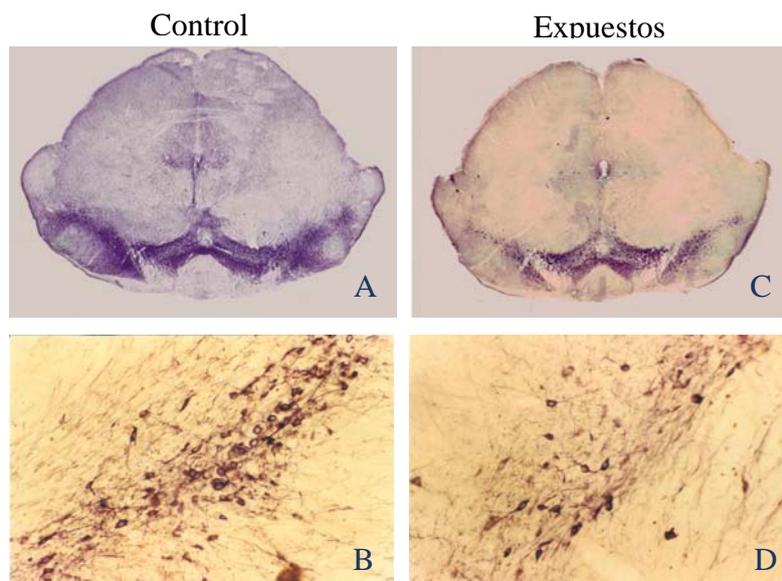
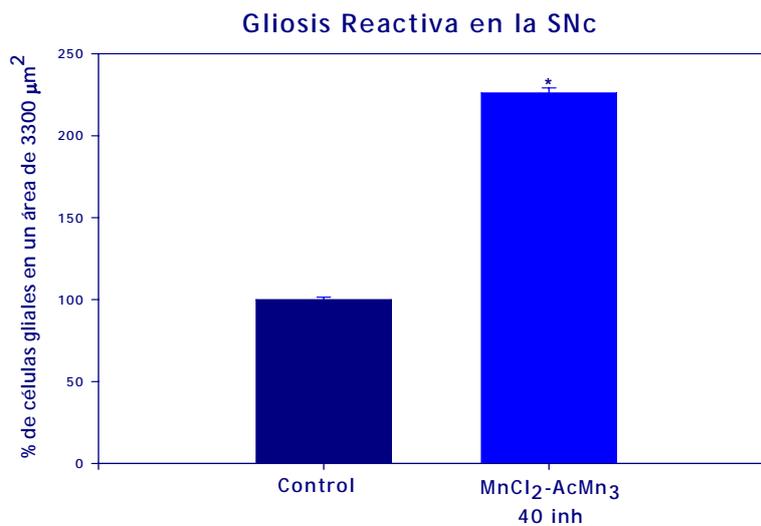


Figura 3.- Neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc

A y B control, 4X y 40X respectivamente

C y D expuestos a MnCl<sub>2</sub> y AcMn<sub>3</sub>, 4X y 40X, respectivamente

Como se señalo previamente se realizó la técnica de inmunohistoquímica anti-GFAP para determinar gliosis reactiva. La gráfica 4 muestra los resultados obtenidos al hacer el conteo en la SNc, se observa el aumento significativo del 126 % en el número de células gliales en los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  al comparar con el grupo control. En las figuras 4 A,B se observa la cantidad de células gliales en la SNc en los animales control, mientras que en las figuras 4 C,D se puede observar el aumento de estas células en esta estructura en los animales expuestos a Mn.



Gráfica 4.- Gliosis reactiva en la SNc. La media del grupo control se considero como el 100 %, se observa aumento del 126 % en el número de células gliales en el grupo de ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . \* =  $P < 0.001$  vs grupo control

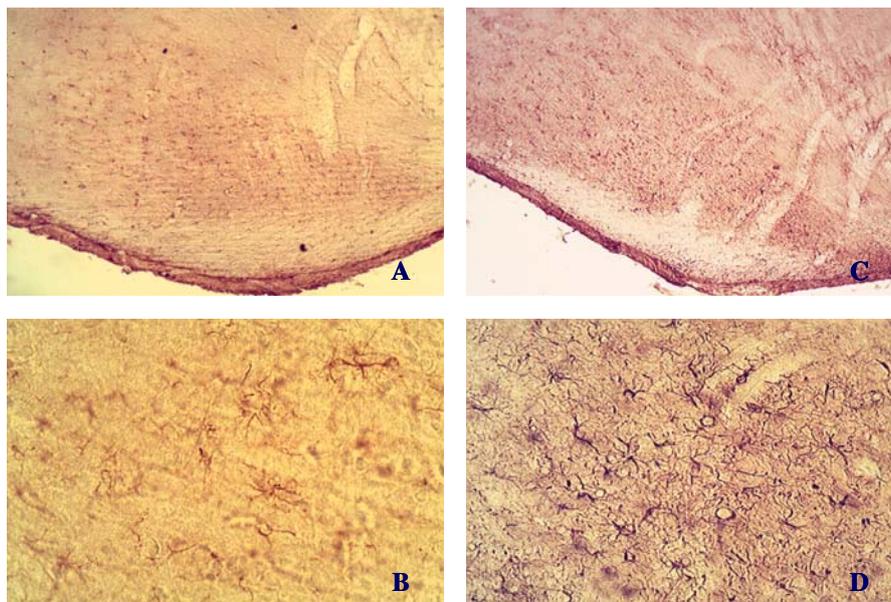
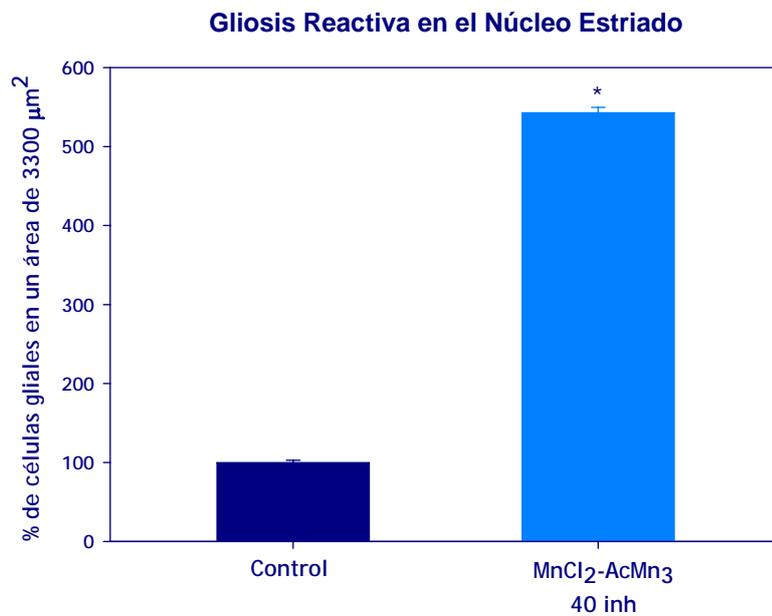


Figura 4.- Células inmunorreactivas a GFAP en la SNc

A y B control, 4X y 40X respectivamente

C y D expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ , 4X y 40X, respectivamente

También se realizó inmunohistoquímica anti-GFAP en el NE; la gráfica 5 muestra el aumento del 443 % en el número de células gliales en el estriado de los animales expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  con respecto al grupo control. En la figura 5A se observa la glia en el estriado de los animales control, mientras que en la figura 5B se aprecia el gran aumento en la cantidad de estas células en los animales expuestos a Mn.



Gráfica 5.- Gliosis reactiva en el núcleo estriado. La media del grupo control se tomó como el 100 %, se observa aumento del 443 % en el número de células gliales en el grupo de ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . \* =  $P < 0.001$  vs grupo control

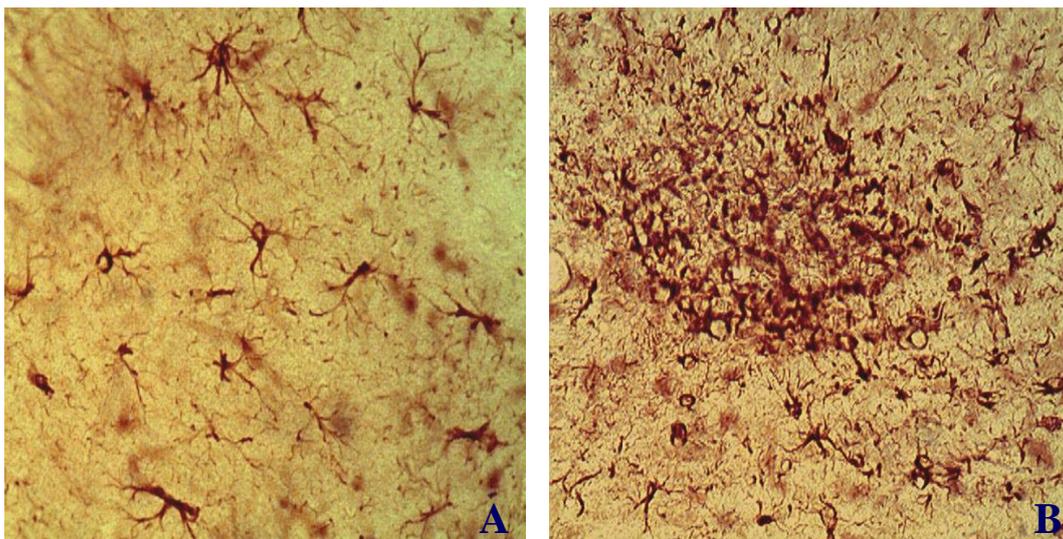


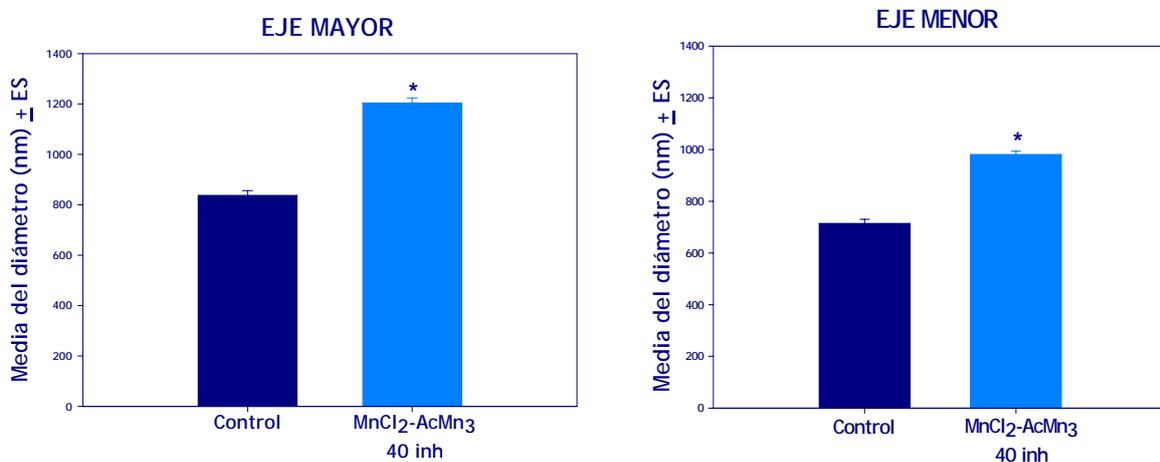
Figura 5.- Células inmunorreactivas a GFAP en el núcleo estriado

A.- control, 40X

B.- expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ , 40X

## Análisis ultraestructural

Se realizó el análisis ultraestructural del tejido estriado obtenido de los animales de los grupos control y expuestos a Mn, ya que se ha reportado el aumento en el diámetro de los botones presinápticos en el NE de pacientes con EP, así como en modelos experimentales de la enfermedad. La gráfica 6 muestra que hay aumento significativo en el diámetro de los botones sinápticos del grupo expuesto a la mezcla de  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{AcMn}_3$ . La media de la longitud, es de  $1203 \pm 19 \mu\text{m}^2$  en el eje mayor y  $980 \pm 13 \mu\text{m}^2$  en el eje menor, comparado con el grupo control cuya media fue de  $837 \pm 19 \mu\text{m}^2$  y  $713 \pm 16 \mu\text{m}^2$  respectivamente. En la figura 6A se observa un botón característico del estriado de los animales del grupo control, mientras que la figura 6B muestra un botón con edema observado en los animales expuestos a Mn.



Gráfica 6.- Media del diámetro de los botones sinápticos en  $\mu\text{m} \pm \text{ES}$ , tanto eje mayor como eje menor en el grupo de animales control y ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{AcMn}_3$ . \* =  $P < 0.001$  vs grupo control

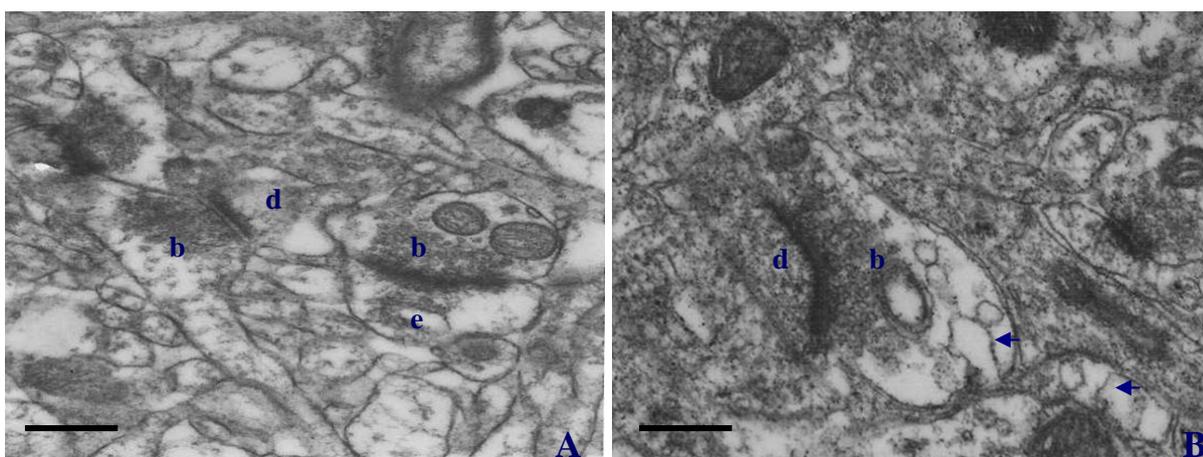
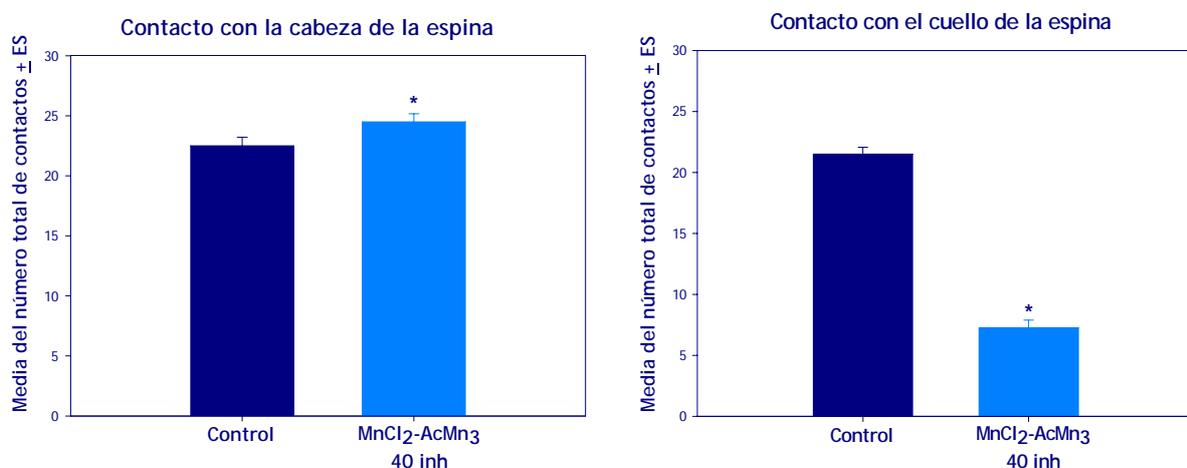


Figura 6.- Micrografía Electrónica en donde se observa el tejido estriado de: A.- Animal control, donde un botón presináptico (b) establece contacto con una dendrita (d), además de otro botón haciendo contacto con una espina dendrítica (e). También se puede observar el neuropilo bien conservado. B.- Animal expuesto a mezcla de  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{AcMn}_3$ , donde se observa un botón presináptico (b) haciendo contacto con una dendrita (d). Se observa el botón hinchado, así como botón y neuropilo vacuolado (←). Barra=  $0.25 \mu\text{m}$ .

Con respecto a la estructura posináptica se observó que el grupo expuesto presentó pérdida de contactos sinápticos con espinas dendríticas. Sin embargo, en los casos en los que se mantuvo esta estructura se observa cambio en el sitio de sinapsis (gráfica 7), aumentando el número de contactos con la cabeza de la espina y disminuyendo en el número de contactos con el cuello de la espina dendrítica en el tejido proveniente del núcleo estriado de los animales expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  con respecto a los animales del grupo control. En la figura 7A se observa un contacto sináptico con el cuello de una espina dendrítica de un animal del grupo control, mientras que en la figura 7B se observa un contacto con la cabeza de la espina de un animal expuesto a Mn.



Gráfica 7.- Media del número de contactos sinápticos que se realizan con la cabeza y con el cuello de la espina dendrítica en el tejido estriado de los ratones control y expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . \* =  $P < 0.001$  vs grupo control

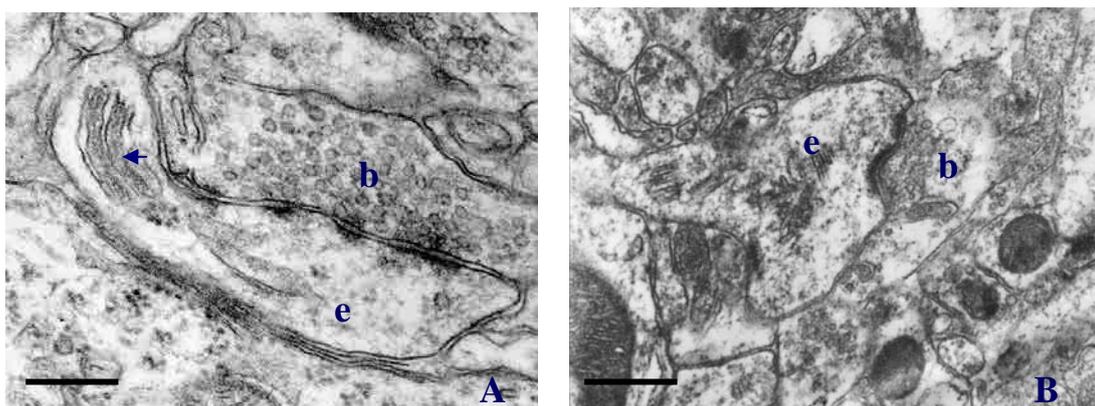
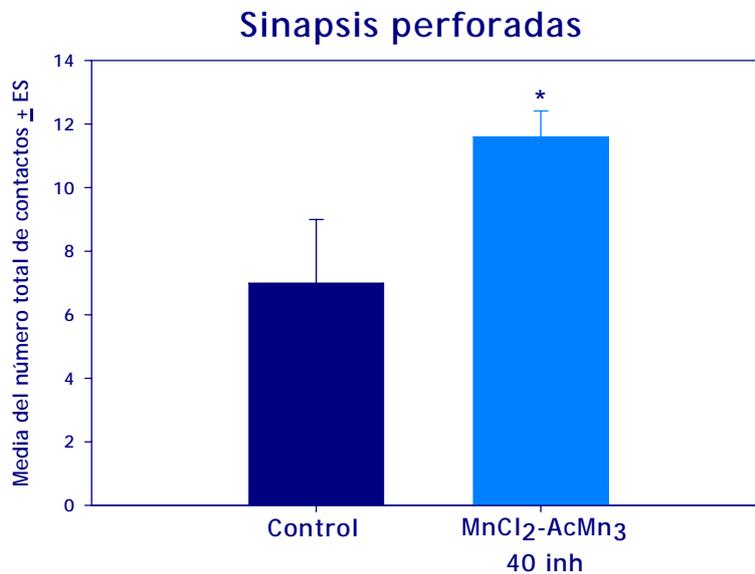


Figura 7.- Micrografía Electrónica en donde se observa: A.- Estriado de un animal control, donde un botón presináptico (b) establece contacto con el cuello de una espina dendrítica (e), se aprecia perfectamente el aparato espinoso (←). B.- Estriado de un animal expuesto a mezcla de Mn, donde se muestra un botón presináptico (b) haciendo contacto con la cabeza de una espina dendrítica (e). Barra= 0.25  $\mu m$ .

También se analizó el número de sinapsis perforadas. La gráfica 8 muestra aumento significativo en el número de este tipo de contactos en los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  comparados con los animales del grupo control. La figura 8 muestra una sinapsis perforada, la cual se caracteriza por la invaginación de la membrana del botón posináptico hacia el botón posináptico.



Gráficas 8.- Media del número de sinapsis perforadas contadas en tejido estriatal proveniente de los ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ , comparados con los animales control. \* =  $P < 0.05$  vs grupo control

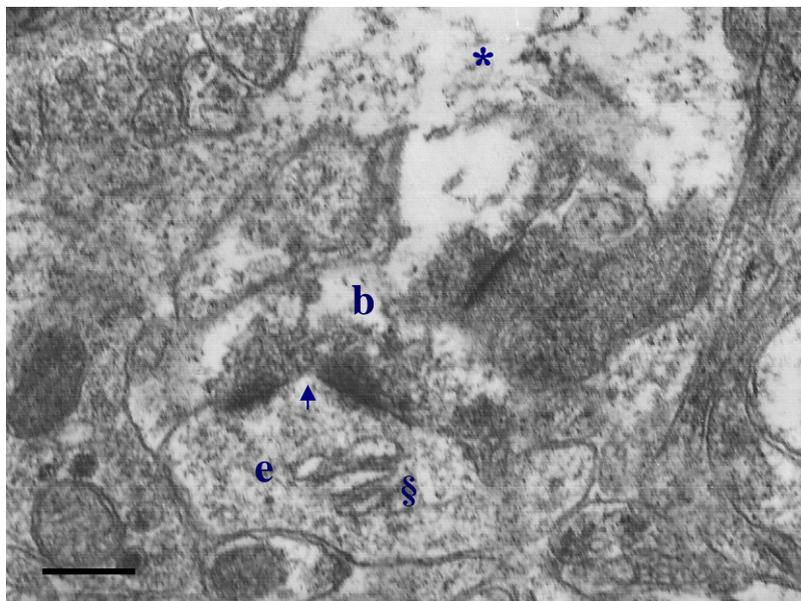


Figura 8.- Micrografía Electrónica en donde se observa una sinapsis perforada en el tejido estriatal de un ratón expuesto a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . El botón sináptico (b) establece contacto con la cabeza de una espina dendrítica (e). Se observa la invaginación del botón posináptico hacia el botón presináptico ( $\leftarrow$ ), el aparato espinoso (§) y el neuropilo dañado (\*). Barra= 0.25  $\mu m$ .

Además del análisis cuantitativo, se realizó un análisis ultraestructural cualitativo del tejido obtenido de los estriados de los animales de ambos grupos, encontrándose que las neuronas espinosas medianas en el núcleo estriado de los animales control presentan un núcleo relativamente grande con pocas indentaciones y agregados de cromatina en la membrana nuclear, también presentan poca cantidad de citoplasma y pocos organelos (figura 9A), el neuropilo bien conservado con una gran cantidad de contactos sinápticos (figura 9B); mientras que el neuropilo de los animales expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  presenta vacuolas y axones con mielina desorganizada (figura 9 C,D,J). También se observó una gran cantidad de células necróticas en los animales expuestos, comparados con los animales del grupo control (figura 9 E,F). Otro cambio observado fue la presencia de cuerpos multivesiculares y acúmulos de lipofucsina (figura 9 G,H), además el aparato de Golgi de las células estriatales y el retículo endoplásmico presentaba edema, lo cual se observa como dilatación de las cisternas.

### **Cambios Ultraestructurales en la SNc**

Las neuronas dopaminérgicas de la SNc se caracterizan por tener una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y membrana nuclear aparentemente lisa sin invaginaciones (figura 10A). En el tejido obtenido de la SNc de los animales expuestos se observó distribución anormal de la cromatina, la cual se acumula cerca de la membrana nuclear, aspecto característico de las células en apoptosis (figura 10 G,H), además de alteraciones nucleares muy evidentes al compararlas con las neuronas del grupo control, cuyos núcleos carecen de invaginaciones (figura 10 C,D,E,F). También se observaron células necróticas (figura 10 I,J) y dendritas con una gran cantidad de mitocondrias (figura 10 B).

## Cambios ultraestructurales en el Núcleo Estriado

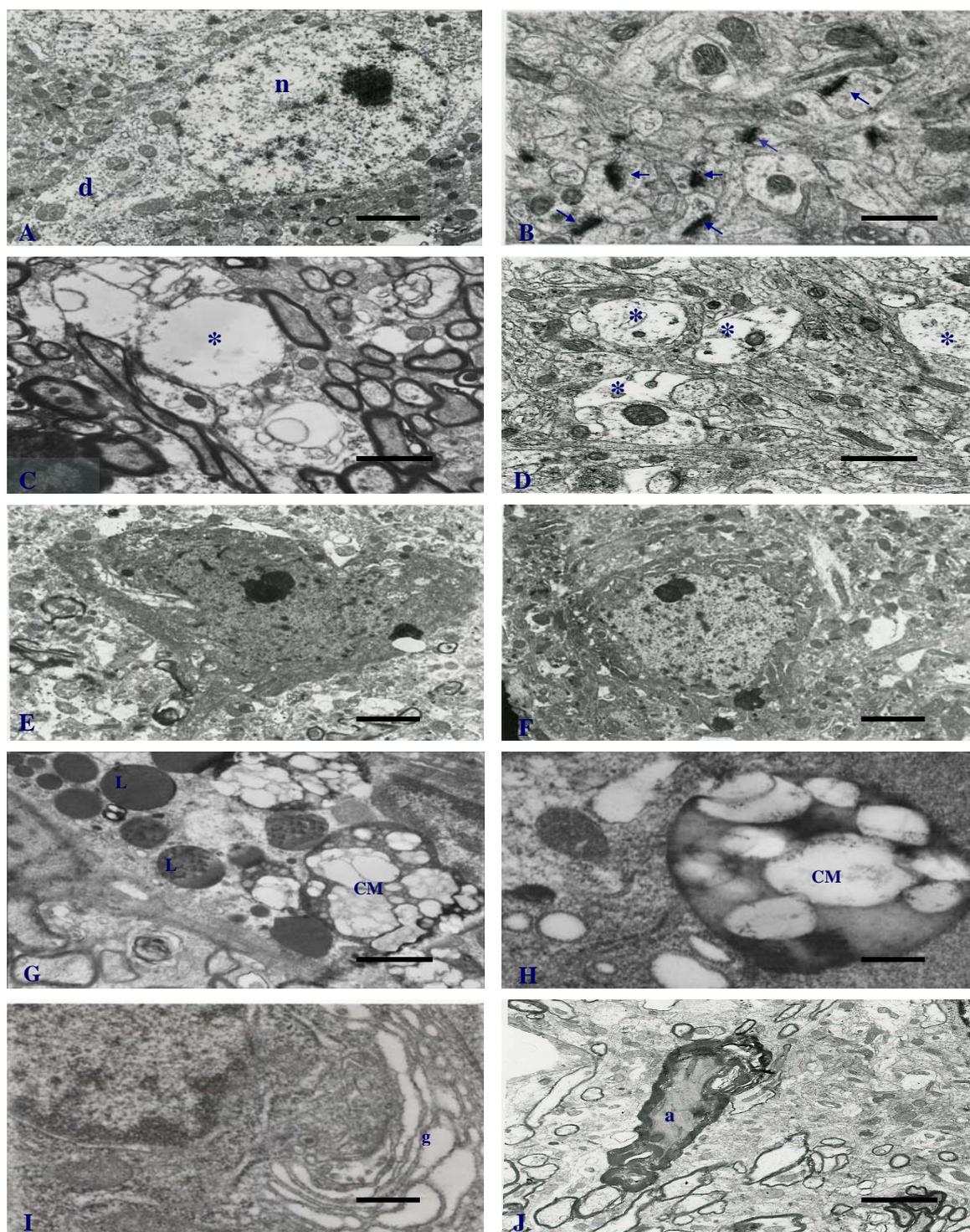


Figura 9.- Micrografía Electrónica en donde se observa: A.- Soma de una neurona espinosa mediana del tejido estriado de un animal del grupo control (d) dendrita, (n) núcleo (Barra= 1 $\mu$ m). B.- estriado de un animal del grupo control donde se observa neuropilo bien conservado y varios contactos sinápticos ( $\leftarrow$ ) (Barra= 0.5 $\mu$ m). C y D.- neuropilo dañado del grupo expuesto a Mn con una gran cantidad de vacuolas (\*) y axones con mielina desorganizada (Barra= 0.75 $\mu$ m). E y F.- Necrosis neuronas del tejido obtenido del estriado de los animales expuestos (Barra= 1 $\mu$ m). G y H.- Lipofuscina (L) y cuerpos multivesiculares (CM) (Barra= 0.25  $\mu$ m y 0.5 $\mu$ m respectivamente). I.- Aparato de Golgi dañado y J.- axón dañado con la mielina desorganizada (Barra= 0.5 $\mu$ m).

### Cambios ultraestructurales en la SNc

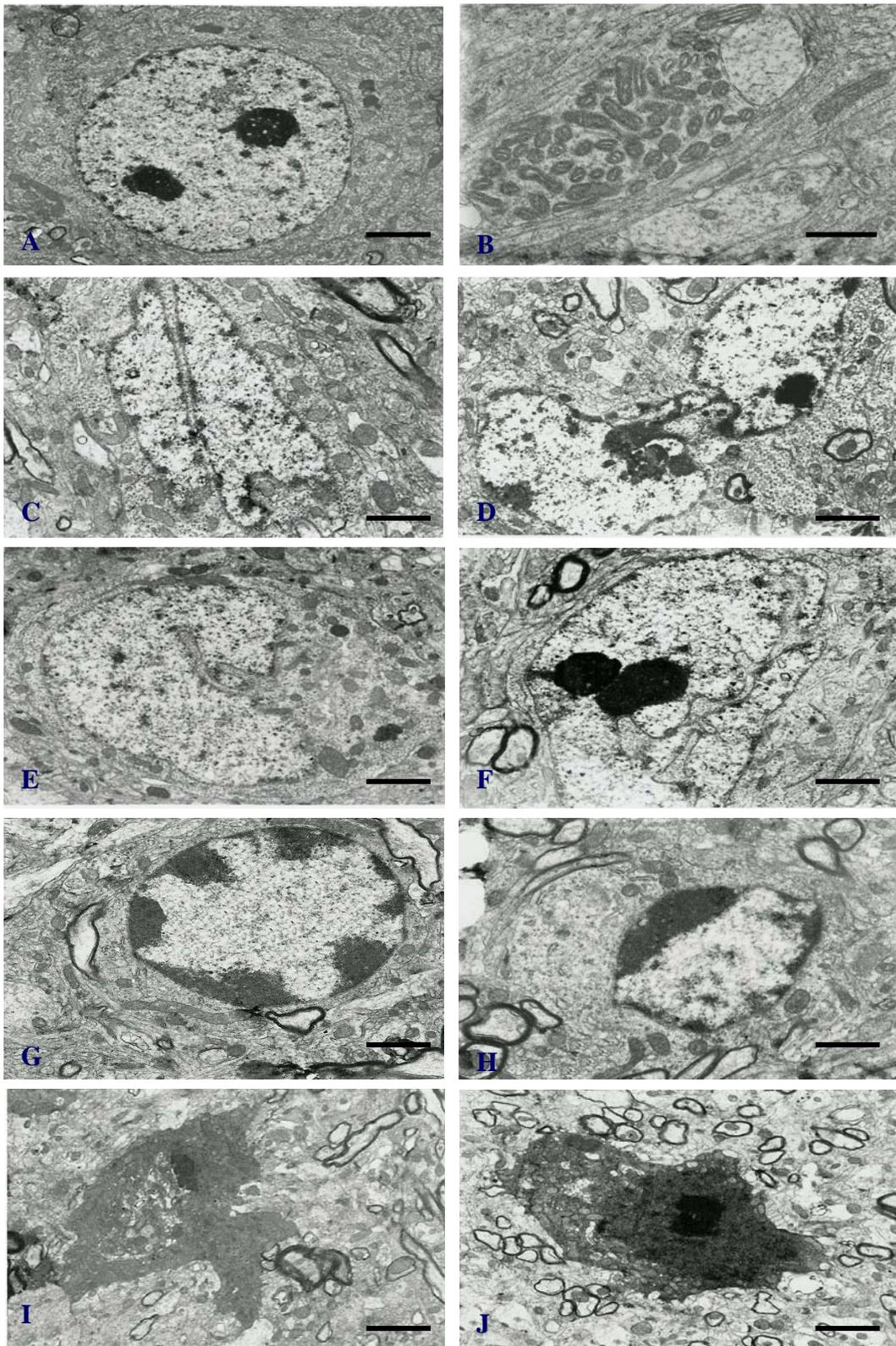


Figura 10.- Micrografía Electrónica en donde se observa: A.- Soma de una neurona dopaminérgica de la SNc de un animal del grupo control (Barra= 1  $\mu$ m). B.- Dendrita con una gran cantidad de mitocondrias (Barra= 0.25 $\mu$ m). C,D,E,F.- Alteraciones nucleares. G,H.- distribución anormal de la cromatina, apoptosis. I,J.- Necrosis (Barra= 1 $\mu$ m).

## Discusión

Nuestros resultados muestran que la exposición a la mezcla de Mn provocó alteraciones a nivel conductual tanto en la prueba de coordinación motora fina como en la viga de equilibrio, gliosis reactiva en el NE y en la SNc, además de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, así como alteraciones ultraestructurales importantes en dichos núcleos. Estos cambios se relacionan con las alteraciones descritas en pacientes con EP.

## Conducta

La alta sensibilidad de los diferentes tipos de conducta y la integración de las diferentes funciones conductuales (motor, sensorial, de atención y motivación) son especialmente importantes en las pruebas para determinar posibles factores neurotóxicos (Vezér *et al.*, 2005). Se ha establecido que la toxicidad del Mn en humanos y animales puede llevar a desórdenes de los movimientos, con manifestación clínica muy similar a los síntomas observados en la EP (Mergler *et al.*, 1999).

Como se describe en nuestros resultados, los ratones expuestos a la mezcla de MnCl<sub>2</sub> y AcMn<sub>3</sub>, muestran decremento de la coordinación motora (Reaching Task; gráfica 1). Al respecto algunos autores han observado que la inyección de MnCl<sub>2</sub> en la SNc de ratas, lleva al decremento significativo de la concentración de DA estriatal, asociado con la inhibición de la actividad motora espontánea (Chang y Liu, 1999). Ponzoni y cols. (2000) han descrito que la microinyección unilateral de MnCl<sub>2</sub> en la SNc de roedores causa cambios conductuales similares a los inducidos por la administración de 6-OHDA, provocando giro hacia el lado lesionado después de la administración de apomorfina. De la misma forma, Aposhian y cols. (1999) demostraron que la inyección intratecal de Mn a ratas, resulta en un rápido decremento en la actividad motora espontánea, sugiriendo un mecanismo selectivo y específico de concentración de Mn en el mesencéfalo ventral, región relacionada con el control motor y producción de DA. Ingersol y cols. (1995) observaron hipoactividad espontánea posterior a la inyección intratecal de MnCl<sub>2</sub> en ratas, mientras que Dorman y cols. (2000) mostraron alteración en la respuesta a un estímulo acústico (*acoustic startle response*, ARS) en ratas neonatos que recibieron 25 y 50 mg/kg de peso de MnCl<sub>2</sub>. Del mismo modo, Vezér y cols. (2005) encontraron que ratas expuestas a MnCl<sub>2</sub> mostraron disminución de la actividad

espontánea vertical y horizontal en la prueba de campo abierto a las 10 semanas de tratamiento. Mientras que ratas con exposición crónica a  $MnCl_2$  presentaron un decremento en la actividad total, junto con debilitamiento de la adquisición de reacciones de evitación en respuesta a estímulos condicionados e incondicionados (Shukakidze *et al.*, 2003). Además, estudios de exposición a largo plazo a una dosis equivalente a 40 mg/Kg de peso de  $MnCl_2$ , la cual produjo temblor en los animales expuestos, similar al observado en algunos de nuestros animales.

En contraste, Calabresi y cols. (2001) describieron cambios conductuales asociados con el incremento en la actividad y conducta hiperactiva en ratas las cuales fueron tratadas durante 10 semanas con  $MnCl_2$  en el agua para beber, estudios similares mostraron un aumento significativo en la actividad motora espontánea, sin embargo estos animales mostraron actividad normal entre los primeros 2 a 5 meses de exposición, con un decremento significativo en la motricidad del sexto al octavo mes (Bonilla, 1984). Salehi y cols. (2003) reportan que ratas expuestas a una mezcla de sulfato y fosfato de manganeso vía inhalada mostraron un incremento en la distancia recorrida en el grupo expuesto con respecto al grupo control. En el mismo sentido, Tapin y cols. (2006) demostraron que ratas con exposición subcrónica a sulfato de manganeso vía inalada, mostraron incremento en la distancia recorrida en la prueba de campo abierto.

La diferencia respecto a la actividad motora puede ser explicada por la alteración en la transmisión de la DA relacionada con la toxicidad del Mn. La toxicidad aguda del Mn está asociada con el incremento en la neurotransmisión dopaminérgica, que se manifiesta como hiperactividad, mientras que la exposición a largo plazo resulta en la pérdida de las neuronas dopaminérgicas, lo cual está relacionado con pérdida de la coordinación motora (Salehi *et al.*, 2003). Esto concuerda con nuestros datos obtenidos en la prueba de la viga de equilibrio (gráfica 2), en donde se observó un aumento en la actividad de los ratones expuestos desde la segunda y hasta la octava inhalación (4 semanas), y posteriormente disminución en dicha actividad, a partir de la décima y hasta la cuadragésima inhalación (20 semanas) de manera tiempo-dependiente.

Acerca de los efectos adversos que tiene el Mn sobre la actividad motora, se han propuesto varios mecanismos para explicarlos, como son, la influencia que tiene sobre los sistemas de neurotransmisión (Gwiazda *et al.*, 2002) o bien, sobre los elementos estructurales como los

ganglios basales (Aschner, 1996; Erikson y Aschner, 2002), el daño a estas estructuras puede llevar a alteraciones en el movimiento (Salehi *et al.*, 2003). Se ha descrito una relación significativa entre las alteraciones neurotóxicas, neurotransmisores, neuromoduladores y la exposición a Mn; así tras la exposición prolongada a Mn, este metal se acumula en la vía dopaminérgica nigroestriatal (Tomas-Camardiel, 2002; Vettori *et al.*, 1999), por lo que el resultado de la alteración de la interacción entre del glutamato y la dopamina está envuelto en los efectos del Mn sobre las funciones extrapiramidales motoras e indirectamente en la integración sensoriomotora (Calabresi *et al.*, 1997).

## **Inmunohistoquímica**

### **TH**

Se sabe que el Mn se acumula en los ganglios basales, particularmente en el globo pálido, el núcleo estriado y la SNc en donde causa neurodegeneración; la exposición crónica a Mn puede inducir parkinsonismo similar a la EP (Vezér *et al.*, 2005). Los pacientes con esta enfermedad presentan rigidez, temblor, acinesia y alteraciones de la postura, estos signos, son el reflejo de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Otero-Siliceo *et al.*, 1996). En esta enfermedad hay un umbral, en donde los síntomas aparecen cuando la depleción de DA en el estriado es de alrededor del 80 % y cuando aproximadamente el 60 % de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se han perdido (Dauer y Przedborski, 2003; Sherer *et al.*, 2003). Esto concuerda con nuestros resultados, los cuales muestran que a las 40 inhalaciones de MnCl<sub>2</sub> y AcMn<sub>3</sub> hay disminución del 63 % en el número de neuronas TH positivas de las SNc (gráfica 3), lo cual podría explicar las alteraciones motoras observadas en las evaluaciones conductuales.

Ponzoni y cols. (2000) observaron que la microinyección unilateral de MnCl<sub>2</sub> en la SNc de ratas reduce la concentración de DA y el número de células positivas a TH. Además, algunos pacientes con exposición crónica a Mn pueden responder al tratamiento con levodopa. Este hecho propone la posible lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal (Chin-Chang, 2003), además, el grado de pérdida de terminales dopaminérgicas en el estriado es más pronunciada que la pérdida de neuronas en la SNc, lo que sugiere que las terminales nerviosas estriatales son el blanco principal en el proceso neurodegenerativo producido por el Mn, y la muerte

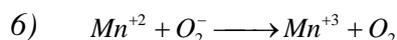
neuronal resulta en un proceso de degeneración retrógrada (Dauer y Przedborski, 2003). Takeda y cols. (1998b) demostraron que posterior a la inyección de  $^{54}\text{Mn}$  en el estriado, este metal puede ser transportado a la SNc vía el haz medial; además la inyección de colchicina en dicho tracto, inhibió el transporte de  $^{54}\text{Mn}$  hacia la SNc después de la inyección intraestriatal del metal. Lo cual sugiere que el Mn puede ser transportado a través de la vía GABAérgica estriatonigral y/o las fibras dopaminérgicas nigroestriatales.

Actualmente, se ha establecido que el Mn tiene acceso a las neuronas dopaminérgicas a través del sistema de recaptura de alta afinidad para dopamina (DAT) (Calne *et al.*, 1994; Nagatomo *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 1992; 2005) e intracelularmente, se acumula específicamente dentro de la mitocondria vía el canal uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gavin *et al.*, 1990; Gunter *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Se ha demostrado que en la mitocondria, el Mn puede inhibir al complejo I, propiciando la formación de radicales libres, principalmente  $\text{O}_2^-$  (Erikson *et al.*, 2004). Por lo que la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en los animales expuestos podría ser explicada por el hecho de que la toxicidad del Mn ha sido asociada con la propensión general de los metales de transición para producir niveles citotóxicos de radicales libres durante ciclos redox. Se han atribuido propiedades pro-oxidantes, tanto al estado divalente ( $\text{Mn}^{+2}$ ) como trivalente ( $\text{Mn}^{+3}$ ) de este metal. Se pensaba que si el hierro puede generar  $\text{OH}^\bullet$ , es posible que también el  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+3}$  puedan generarlo mediante reacciones similares, con la subsiguiente neurotoxicidad causada por el estrés oxidativo (Ali *et al.*, 1995).

Sin embargo hay datos contradictorios, algunos estudios han descrito un papel antioxidante del Mn en su estado divalente, ya que muestra actividad de barredor de radicales libres como el  $\text{O}_2^-$  y  $\text{OH}^\bullet$  aun cuando la SOD es inhibida (HaMai *et al.*, 2001; HaMai y Bondi, 2004). Además, se ha reportado que la forma divalente no reacciona con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  para formar  $\text{OH}^\bullet$ , lo cual no sustenta la propuesta acerca de que el Mn puede producir  $\text{OH}^\bullet$  y  $\text{O}_2^-$  mediante reacciones tipo Fenton (Brouillet *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2004; HaMai y Bondi, 2004), y aunque el  $\text{Mn}^{+2}$  mostró habilidad aparente para promover la formación de EROs dentro de la fracción sinaptosomal de mitocondrias corticales, su actividad pro-oxidante fue bloqueada en la presencia de un quelador de metales trivalentes. Por lo que se ha propuesto que, aún cuando el  $\text{Mn}^{+2}$  no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de  $\text{Mn}^{+3}$  en cantidades traza es suficiente para promover ciclos redox tipo Fenton con  $\text{Mn}^{+2}$  o  $\text{Fe}^{+2}$  (HaMai y Bondi, 2004), aunque como se mencionó, hay informes acerca de que el Mn no participa en la reacción de Fenton (Brouillet *et al.*, 1993). De esta manera, se ha sugerido que el  $\text{Mn}^{+3}$  es la forma activa

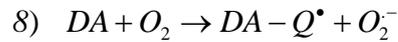
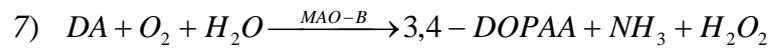
en los mamíferos (Ali *et al.*, 1995), y que además es requerido en cantidades traza para la aparente actividad pro-oxidante asociada con la actividad del  $Mn^{+2}$ , indicando que el  $Mn^{+3}$  podría tener un efecto catalítico sobre la oxidación del  $Mn^{+2}$  (HaMai *et al.*, 2001).

En nuestro modelo empleamos una mezcla de Mn en su estado divalente como trivalente ( $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ ). Así, este metal es transportado al interior de las neuronas dopaminérgicas, almacenándose en las mitocondrias; se ha descrito que el  $Mn^{+3}$  tiene mayor afinidad por el complejo I mitocondrial, mientras que el  $Mn^{+2}$  es la especie predominante *in vivo* (Aschner *et al.*, 2005), además el  $Mn^{+2}$  es oxidado a el estado trivalente reaccionando con el  $O_2^-$  (Chen *et al.*, 2001; Gunter *et al.*, 2004). Por lo que es posible que el  $Mn^{+3}$  desacople la cadena de transporte de electrones generando  $O_2^-$ , el cual es capaz de reaccionar con el  $Mn^{+2}$  y ser oxidado a  $Mn^{+3}$ , aumentando la disponibilidad de éste ión para dañar a otras mitocondrias. Esto produciría un ciclo de oxidación del Mn (6), en donde el  $Mn^{+3}$  provoca el evento inicial, y el  $Mn^{+2}$  más el  $O_2^-$  amplifican este efecto mediante la producción de EROs, lo cual llevaría a las neuronas a un estado de estrés oxidativo, con las subsiguiente muerte neuronal.



Del mismo modo, las neuronas dopaminérgicas, en particular, presentan un ambiente propicio para la generación de EROs ya que el metabolismo de la DA genera  $H_2O_2$  (7), mientras que su auto-oxidación produce  $O_2^-$  y DA-quinona (8), una molécula que daña proteínas por su reacción con los residuos de cisteína (Dauer y Przedborski, 2003). De esta manera, se ha reportado que el Mn estimula la auto-oxidación de DA en las neuronas dopaminérgicas, en un proceso acompañado de la formación de quinonas (Malecki, 2001), y que además, el  $Mn^{+3}$  oxida con mayor eficiencia a la DA comparado con el  $Mn^{+2}$ , y la oxidación DA por el  $Mn^{+3}$  no produce ni necesita  $O_2$  y es más eficiente que el  $Mn^{+2}$ ,  $Mn^{+4}$ ,  $O_2$  o el  $H_2O_2$  oxidando catecolaminas. También se ha demostrado que las catecolaminas oxidadas, incluyendo a la 6-OHDA, pueden formar  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y  $OH^\bullet$  (Archivald y Tyree, 1987; Sava *et al.*, 2004). Incluso, se ha demostrado que el Mn induce la liberación de DA de las vesículas sinápticas, lo cual se suma a las fallas de energía, relacionadas con los daños a las mitocondrias producidos por este metal, lo cual pueden interrumpir el almacenaje vesicular de DA, incrementando el contenido de esta molécula tanto al interior de la neurona, así como en el espacio sináptico, aumentando la posibilidad de que la DA sea oxidada por el Mn o metabolizada por la MAO

(Takeda *et al.*, 2002), por lo que aumentan las reacciones que dañan a las macromoléculas celulares mediadas por DA (Dauer y Przedborski, 2003).



Hay reportes acerca de que el Mn no reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar OH<sup>•</sup> (Brouillet *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2004; HaMai y Bondi, 2004), sin embargo, tomando en consideración que el Mn se acumula en los ganglios basales, áreas cerebrales con altos contenidos de Fe<sup>+2</sup> (Sloot *et al.*, 1994), cabe la posibilidad de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado del metabolismo de la DA por la MAO, o bien por su auto-oxidación mediada por Mn, reaccione con hierro promoviendo la formación de OH<sup>•</sup> (Spencer *et al.*, 1994) desencadenándose así el daño a las células nerviosas por estrés oxidativo (Ogawa *et al.*, 1994)

Se ha propuesto que uno de los mecanismos que influyen la susceptibilidad específica de las neuronas dopaminérgicas a varias sustancias es la recaptura de DA por el DAT, ya que varias moléculas tienen acceso a estas neuronas por medio de este transportador (Thoenen y Tranzre, 1973; Shimizu *et al.*, 2001; Dauer y Przedborski, 2003), entre ellas, el Mn, ya que se sabe que su concentración en la SNc depende de su captura a través del DAT (Calne *et al.*, 1994; Nagatomo *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 1992; Ingersoll *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 2005). En contraste con este hecho, las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas en el área ventral tegmental (VTA), cuyos cuerpos neuronales son adyacentes a la SNc, son mucho menos afectadas en la EP (Uhl *et al.*, 1985). En la corteza prefrontal, el sitio primario de proyección para estas neuronas, se encuentran otros transportadores monoaminérgicos y enzimas como la catecol-O-metiltransferasa (COMT), los cuales están involucrados en la terminación de la acción de la DA, mientras que en el núcleo estriado, el mecanismo de “limpieza” de DA del espacio sináptico parece ser más dependiente del DAT (Mundorf, *et al.*, 2001). Estas diferencias son importantes para entender la resistencia relativa de las neuronas dopaminérgicas del VTA a la neurodegeneración en comparación con las neuronas de la SNc (Dauer y Przedborski, 2003)

## GFAP

En nuestros resultados observamos un aumento en el número de células inmunorreactivas a GFAP, tanto en el NE así como en la SNc, del 443 y 126 % respectivamente, en los animales expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$  comparados con el grupo control (gráficas 4 y 5). La microglia son células inmunocompetentes que se encuentran en el sistema nervioso, las cuales son activadas en respuesta a alteraciones en el ambiente, como trauma, isquemia o infección. En el cerebro, los mediadores inflamatorios son liberados principalmente por estas células y están implicados en la etiología de la EP, así como en los modelos de esta enfermedad. Se ha observado activación glial en el NE y SNc de pacientes con EP, no así, en estas mismas estructuras, en personas de la misma edad sin enfermedad (Chang y Liu, 1999). Por lo que se propone que la microglia activada contribuye de manera importante a la neurotoxicidad de las neuronas dopaminérgicas. Su importancia aumenta por la distribución diferencial, reactividad a estímulos y su relativa insensibilidad a los productos potencialmente tóxicos que genera. En este sentido, se sabe que la microglia no se encuentra distribuida uniformemente en el cerebro, la sustancia nigra, el núcleo estriado y el hipocampo contienen gran cantidad de estas células (Filipov *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el Mn se acumula selectivamente dentro de los ganglios basales (Vettori *et al.*, 1999; Aschner *et al.*, 2005), en donde podría interferir con la actividad de las células gliales (microglia y astrocitos) residentes en estos núcleos. Tomas-Camardiel y cols. (2002) cuantificaron la densidad de Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP) en varias estructuras cerebrales de ratas tratadas intraperitonealmente con Mn, estos autores reportan que en los animales tratados con Mn, aumentó la densidad de GFAP en el NE y en la SNc, no así en el VTA, el núcleo acumbens y el globo pálido. Por lo que el Mn produce cambios específicos en la vía nigroestriatal, ya que no se observan cambios en las otras áreas analizadas de los animales expuestos a este metal.

Evidencias recientes sugieren que la neurotoxicidad del Mn involucra al óxido nítrico (NO) producto de la activación de la microglia y/o astrocitos (Filipov *et al.*, 2005). Se ha reportado que el NO generado por la microglia activada es la fuente de su neurotoxicidad, ya que esta molécula puede reaccionar con el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), el cual es un anión altamente reactivo, que puede nitrar o hidroxilar aminoácidos aromáticos, además de reaccionar con lípidos, proteínas y DNA (Barzilai *et al.*, 2001; Filipov *et al.*,

2005). Además se ha reportado que las neuronas, en contraste con la microglia y los astrocitos, son más susceptibles a la exposición de NO y ONOO<sup>-</sup> (Filipov *et al.*, 2005). Spranger y cols. (1998) reportan que el Mn incrementa la producción de NO en astrocitos; en sus experimentos utilizaron cultivos primarios de astrocitos murinos los cuales fueron estimulados por una combinación de citocinas (IL-1 $\beta$  + INF- $\gamma$ ) y MnCl<sub>2</sub>, y se analizó la generación de NO, la expresión de la Oxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) y su RNAm. Estos autores mostraron aumento en la producción de NO asociado con el incremento de la expresión iNOS. De igual forma, Chang y Liu (1999) utilizaron células N9 (línea de células microgliales murinas) las cuales fueron estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) y MnCl<sub>2</sub>, estos autores reportan un incremento en la producción de NO dosis-dependiente, además se obtuvieron resultados similares con MnSO<sub>4</sub>. Sin embargo, sin LPS, ni el MnCl<sub>2</sub> ni el MnSO<sub>4</sub> fueron capaces de generar NO. Además, estos autores indican que el Mn puede aumentar la producción de NO significativamente activando a la microglia, sin afectar la viabilidad de estas células; esto podría potencialmente llevar a la producción sostenida del NO neurotóxico, y dañar al tejido neuronal circundante. También, se ha reportado que la estimulación de las células N9 con LPS y MnCl<sub>2</sub>, además del aumento en la producción de NO, incrementó la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 de forma dosis dependiente a ambas sustancias (Filipov *et al.*, 2005).

Del mismo modo, se ha propuesto que el Mn aumenta la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y NO en cultivo de células microgliales murinas (N9), activadas por los LPS y que la translocación del Factor Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) al núcleo es el evento central (Filipov *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006). El NF- $\kappa$ B está presente en el citosol y es un complejo de subunidades inducibles de 50 kDa (p50), 65 kDa (p65) acoplados con una subunidad inhibitoria I $\kappa$ B $\alpha$ , la cual controla débilmente a NF- $\kappa$ B. Para la activación de NF- $\kappa$ B, es necesario que I $\kappa$ B $\alpha$  se disocie del heterodímero sufriendo fosforilaciones secuenciales por proteínas cinasas (Yeung *et al.*, 2001) y posteriormente se degrade, liberando a NF- $\kappa$ B para su translocación nuclear y facilitando su unión al DNA, regulando la transcripción de genes que contengan el motivo  $\kappa$ B (Lee *et al.*, 1997;1998; Ramesh *et al.*, 2002) como las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6, además del promotor de la iNOS (Aktan, 2004). En este sentido, se ha reportado que los metales pesados activan a NF- $\kappa$ B a través de la activación de MAPK K (Ramesh *et al.*, 1999; Yeung *et al.*, 2001) y se ha demostrado que el Mn induce la fosforilación y degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , activando las vías de señalización tanto de JNK-ERK MAPK como de PI3K/Akt (Jae-Hoon *et al.*, 2006), este hecho provoca que la estimulación con Mn de manera dosis dependiente

active al NF- $\kappa$ B, y por lo tanto permita su unión al DNA (Ramesh *et al.*, 2002). Así, como resultado del incremento de la activación de NF- $\kappa$ B, aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias y la producción de NO por la iNOS (Filipov *et al.*, 2005)

Los estudios anteriores se han realizado en cultivos primarios o en líneas celulares de microglia y/o astrocitos; en todos ellos se reporta que el Mn aumenta la producción de NO y citocinas proinflamatorias; además, se ha observado que es necesaria la coestimulación con LPS o IL-1 $\beta$  + INF- $\gamma$  para producir el aumento de estas moléculas, y que en ausencia de estos factores el Mn no tiene efecto en la producción de NO y citocinas proinflamatorias por las células gliales.

A diferencia de los estudios anteriores, nuestro modelo se realizó *in vivo*, por lo que es importante tomar en cuenta la relación que guardan los tipos celulares que residen en el cerebro. Tradicionalmente se ha asociado un efecto directo del Mn sobre las células neuronales, varias líneas de investigación indican que este metal se acumula dentro de las mitocondrias generando un exceso de EROs, y por consiguiente estrés oxidativo (Maleki 2001; Ramesh *et al.*, 2002; Filipov *et al.*, 2005). Se sabe que la exposición a dosis altas de EROs provocan muerte celular por necrosis (Kamata y Hirata 1999; McConkey y Orrenius 1996), la cual se caracteriza por dilatación del citoplasma, con lisis de la célula y liberación de su material citoplasmático al medio, el cual frecuentemente dispara una respuesta inflamatoria (Pavón *et al.*, 1998). De esta manera, proponemos que en nuestro modelo, el evento inicial es la acumulación del Mn al interior de las neuronas, provocando su acumulación en las mitocondrias, lo cual genera estrés oxidativo a través de la generación de EROs por el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, esto induce muerte celular por necrosis (como se observa en las figuras 9 E,F en el NE y 10 I,J en la SNc), de esta manera las neuronas dañadas liberan sustancias reactivas que pueden activar a la microglia y astrocitos, cuyo efecto es amplificado por el Mn. Por lo que una respuesta inflamatoria crónica incontrolada podría perpetuar el daño al tejido neuronal, y como consecuencia causar neurodegeneración. En este sentido se ha encontrado aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias en estudios *postmortem* en cerebros de pacientes con EP y en modelos animales de esta enfermedad (Filipov *et al.*, 2005).

## Ultraestructura

En nuestros resultados se observan cambios ultraestructurales en el NE de los ratones expuestos a  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ , en donde, el neuropilo mostró gran cantidad de vacuolas y axones con mielina desorganizada (figura 9 C,D,J), el aparato de Golgi de las células estriatales presentaba edema, lo cual se observa como dilatación de las cisternas de este organelo (figura 9I), así como la presencia de cuerpos multivesiculares y cúmulos de lipofucsina (figura 9 G,H), además de una gran cantidad de células necróticas (figura 9 E,F). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Colín-Barenque (2000) quien analizó cerebros de personas con enfermedad de Parkinson y observó que las neuronas estriatales de estos pacientes mostraban núcleos distorsionados, axones degenerados, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico, vacuolas y gránulos de lipofucsina. Otros autores han reportado la presencia de cuerpos multivesiculares, mitocondrias hinchadas y células oscuras (Jedrzejewska *et al.*, 1990), cambios en los tipos de contactos sinápticos (Forno y Norville, 1979; Ingham *et al.*, 1993; Avila-Costa *et al.*, 1998) además de la proliferación astrocítica, degeneración axónica y neuritas densas (Forno y Norville, 1979; Machado-Salas *et al.*, 1990).

Otras alteraciones que pudimos observar, fue el aumento del diámetro de los botones sinápticos con respecto a los botones del grupo control (gráfica 6), así como incremento en el número de sinapsis perforadas (gráfica 8). Estudios realizados en núcleo caudado de pacientes con EP (Colín-Barenque, 2000) mostraron aumento de tamaño y vacuolas en los botones sinápticos, además de incremento en el número de sinapsis perforadas. Del mismo modo, ratas con depleción dopaminérgica con 6-OHDA a diferentes tiempos postlesión presentaron aumento en el tamaño de los botones presinápticos, cambios en los blancos postsinápticos y aumento en el número de sinapsis perforadas (Hökfelt y Ungerstedt 1969; McNeill *et al.*, 1988; Avila-Costa, 1996; Avila-Costa *et al.*, 1998).

También observamos cambios en el sitio de sinapsis (gráfica 7), en donde hay mayor cantidad de contactos con la cabeza con respecto a los contactos con el cuello de las espinas dendríticas. En el NE, la mayoría de las sinapsis excitatorias se establecen con la cabeza de las espinas dendríticas, las cuales son largas con especialización de membrana asimétrica. Las espinas dendríticas reciben también una segunda entrada sináptica, la cual, usualmente es pequeña con especialización de membrana simétrica; se ha propuesto que este tipo de sinapsis es dopaminérgica (Freud *et al.*, 1984; Groves *et al.*, 1994; Ingham *et al.*, 1998), además, se ha

demostrado que terminales sinápticas inmunoreactivas para TH, establecen contactos simétricos con el cuello de las espinas dendríticas en el NE de ratas (Linder *et al.*, 1995). Ingham y cols. (1998) reportaron que la lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal con 6-OHDA, produjo la disminución de las sinapsis simétricas de las espinas dendríticas en el neostriado de ratas. En nuestro modelo observamos la disminución del 63 % en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc, además de la disminución de las sinapsis con el cuello de las espinas dendríticas, por lo cual podríamos inferir que los contactos sinápticos que se perdieron corresponden a la innervación dopaminérgica de la SNc al NE.

Respecto al aumento en el número de sinapsis perforadas, se ha sugerido que ocurre un incremento en la proporción de las sinapsis perforadas con respecto a las no perforadas en el putamen de pacientes con EP y después del bloqueo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol (Meshul y Tan, 1994; Anglade *et al.*, 1996). Existen evidencias acerca de que las sinapsis perforadas incrementan la eficiencia de la transmisión y han sido implicadas en la remodelación sináptica en el hipocampo donde su número aumenta con el LTP (long-term potentiation) incrementando el área del contacto sináptico (Lisman y Harris, 1993; Harris y Kater, 1994).

Sin embargo, la pérdida de las sinapsis dopaminérgicas acompañado del aumento de las sinapsis perforadas podría tener consecuencias funcionales importantes, las cuales participan en el desarrollo de la EP. Si tomamos en cuenta que hay sobreactividad de la vía corticoestriatal posterior a la denervación dopaminérgica (Lindefors y Ungersted, 1990; Greenamyre y O'Brien, 1991) ya que los receptores D<sub>2</sub> localizados en las terminales de las neuronas corticales regulan la liberación de glutamato, por lo tanto, la depleción de DA en este núcleo, propicia la liberación excesiva de glutamato de las neuronas de la corteza cerebral (Calabresi *et al.*, 2001), aunado al aumento en la cantidad de receptores glutamatérgicos como resultado en el incremento del área de contacto, indicado por las sinapsis perforadas, las cuales corresponden a sinapsis glutamatérgicas, cuya estimulación lleva al incremento en el contenido de Ca<sup>2+</sup> intraneuronal, provocando muerte de las neuronas estriatales por excitotoxicidad (Calverley y Jones, 1990; Geinisman *et al.*, 1991; Lisman y Harris, 1993; Harris y Kater, 1994). Además, se ha reportado que el Mn se acumula en los astrocitos, los cuales son esenciales para neutralizar la acción del glutamato liberado por las sinapsis glutamatérgicas (Normandin y Hasell, 2002); se ha demostrado que la captura de glutamato es atenuada significativamente en cultivos primarios de astrocitos posterior a la adición de Mn

en el medio de cultivo. Por lo que se ha sugerido que el Mn afecta a los genes de los transportadores de glutamato (por ejemplo el GLAST) posiblemente a través de la generación de EROs (Erikson *et al.*, 2002; Erikson y Aschner, 2003). De esta manera, estos eventos propician la degeneración neuronal, disparada por la estimulación excesiva, producto del aumento de glutamato en el espacio sináptico, así como de su receptor (Mehta y Dawson, 2001).

El glutamato es el principal aminoácido excitatorio en el sistema nervioso central y está implicado en una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas (Urushitani *et al.*, 2001; Kihara *et al.*, 2002), actúa principalmente a través de sus receptores ionotrópicos del tipo NMDA y AMPA/kainato (El Iridisi y Trenkner, 1999; Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). La excesiva estimulación, principalmente de los receptores glutamatérgicos NMDA, desencadenan una serie de eventos que incrementan la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Saransaari y Oja, 2000)

Se ha sugerido que un mecanismo excitotóxico secundario juega un papel crucial en la neurotoxicidad inducida por Mn en el estriado, ya que el  $\text{Mn}^{+2}$  puede sustituir al  $\text{Ca}^{2+}$  en el proceso excitotóxico o inducir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares (Takeda *et al.*, 2002). Como se ha mencionado, el Mn se acumula en la mitocondria preferencialmente, mediante el canal uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Maleki, 2001; Brouillet *et al.*, 1993). Además, se ha demostrado que el Mn inhibe la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los mecanismos dependientes e independientes de  $\text{Na}^+$ , y no se intercambia con el  $\text{Na}^+$  a través de la membrana interna de las mitocondrias, por lo que hay una saturación tanto de Mn y  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de las mitocondrias debido a la acción combinada del aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y Mn al interior de la mitocondria y la extremadamente lenta salida de estos iones (Gavin *et al.*, 1990).

Urushitani y cols. (2001) han reportado que la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial juega un papel crucial en la neurotoxicidad inducida por glutamato. La excesiva elevación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  causa muerte celular por reducción en la producción de ATP, despolarización del potencial de membrana mitocondrial con la subsiguiente generación de especies reactivas de oxígeno. O bien, dicha sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  podría promover la formación del poro de permeabilidad transitorio mitocondrial (PPTM), el cual es un mecanismo alternativo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria, ya que bajo estas condiciones la mitocondria no puede almacenar  $\text{Ca}^{2+}$  indefinidamente. La apertura del PPTM produce la permeabilidad de las membranas

mitocondriales, contribuyendo a la disminución del potencial electroquímico, con la subsiguiente baja de ATP, hinchamiento de la mitocondria debido a la entrada de agua, que produce la ruptura de la membrana externa, liberando moléculas del espacio intermembranal con conocida actividad proapoptótica (Tornero *et al.*, 2002).

Otra posible explicación es que la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  debida a la sobreestimulación de los receptores NMDA y a la mencionada acción del Mn, desencadene una serie de eventos que llevan a la activación de rutas moleculares, entre ellas la óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn), esta enzima es calcio/calmodulina dependiente y está encargada de la producción de NO (Yu *et al.*, 2001; Segura *et al.*, 2003) el cual recientemente se describió como un mensajero biológico (Trabace y Kendrick, 2000). Su acción no puede ser terminada por recaptura ni por catabolismo enzimático, así que su control es únicamente mediante la síntesis. De esta forma la excesiva activación de la NOSn, resulta en la sobreproducción de NO, el cual reacciona rápidamente con el  $\text{O}_2^-$ , formado a causa de la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial por el  $\text{Mn}^{+3}$ , o por la auto-oxidación de catecolaminas por este ion (Archivald y Tyree, 1987; Sava *et al.*, 2004); la interacción de estas dos moléculas lleva a la formación de  $\text{ONOO}^-$  (Barzilai *et al.*, 2001), al cual se le ha atribuido un papel principal en el daño de células nerviosas (Hilgier *et al.*, 2003). De esta manera, la reacción entre el NO y el  $\text{O}_2^-$  para formar  $\text{ONOO}^-$  depende de la concentración de NO y  $\text{O}_2^-$  en la célula (Flint-Beal, 2003).

Por otra parte, además de analizar al NE, realizamos un análisis ultraestructural de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En 1983 Domesick y cols. (1983) realizaron una descripción ultraestructural de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, ellos muestran que estas neuronas se caracterizan por tener una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso bien organizado en pilas y membrana nuclear aparentemente lisa (sin invaginaciones), similar a lo que encontramos en los animales control (figura 10A); por otro lado, observamos alteraciones nucleares en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de los animales expuestos a Mn (figura 10 C,D,E,F) las cuales se hacen muy evidentes al compararlos con los animales control. Dichos cambios observados en los animales expuestos a Mn podrían ser explicados por la interacción de este metal con algunas proteínas encargadas de la organización del citoesqueleto. Evidencias farmacológicas y bioquímicas indican que el Mn inactiva a RhoA, la cual es una GTPasa que funciona como molécula switch, quien hace converger señales intra y extracelulares para la reorganización del citoesqueleto. De esta manera la disrupción de la

arquitectura del citoesqueleto por el Mn, indica el decremento de la actividad de RhoA (Chun-Jung *et al.*, 2005)

También se observaron dendritas con una gran cantidad de mitocondrias (figura 10 G). Stanic y cols. (2003) reportan que ratas lesionadas con 6-OHDA presentan incremento en la cantidad de mitocondrias en las terminales sinápticas, como un mecanismo regulador que asegura que la concentración de DA esté cercana a lo normal. Se ha sugerido que presumiblemente el sistema nigroestriatal tiene una considerable capacidad para resistir un déficit dopaminérgico de más del 50 % sin presentar manifestación clínica, lo cual es debido a mecanismos compensatorios (Anglade *et al.*, 1995), se ha reportado un aumento metabólico del recambio de DA, y por lo tanto una elevada actividad de las neuronas dopaminérgicas remanentes (sensibilización) lo cual requiere de la generación de energía (Seeman y Niznik, 1990).

Además, se observó distribución anormal de la cromatina en las neuronas dopaminérgicas de la SNc en los animales expuestos a Mn, la cual se acumula cerca de la envoltura nuclear, característico de las células en apoptosis (figura 10 G-H). Algunos estudios postmortem en humanos, han reportado que las neuronas dopaminérgicas mueren por apoptosis en la EP (Hartmann y Hirsch, 2000), además, se ha observado células apoptóticas en modelos experimentales de esta enfermedad como el del MPTP y el de la 6-OHDA (Ochu *et al.*, 1998; Spoooren *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 1998; Lotharius *et al.*, 1999). De igual manera se ha propuesto que el Mn produce muerte celular por apoptosis, como ocurre en la EP idiopática (Mochizuki *et al.*, 1994; Tatton y Kish, 1997; Hirata *et al.*, 1998). Hay varias evidencias de que este tipo de muerte celular es debida a la toxicidad del Mn, ya que muchas de las vías clásicas de señalización asociadas a la muerte por apoptosis son activadas en las células tratadas con Mn, se ha observado que estas células muestran un incremento en la marca del TUNEL, ruptura internucleosomal, activación de proteínas cinasas como JNK y p38, además de caspasa 3 (Roth y Garrick, 2003). También, se ha demostrado que la caspasa 12 media la apoptosis inducida por el estrés del Retículo Endoplásmico (RE). La caspasa 12 es localizada en este organelo como proenzima y es activada por inductores de estrés de RE, y se ha demostrado que el Mn produce muerte apoptótica, tras la activación inmediata de la caspasa 12 en células SN741 (línea celular de neuronas dopaminérgicas) tratadas con este metal (Chun *et al.*, 2001).

Se ha propuesto que la muerte celular por apoptosis de las neuronas dopaminérgicas, podría estar mediada por la activación de la vía dependiente de TNF. Se ha detectado que las neuronas dopaminérgicas de la SNc de sujetos control así como pacientes con EP, son positivas para el receptor TNF (TNFR1) (Boka *et al.*, 1994), además, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el Mn aumenta la producción de TNF- $\alpha$  por células gliales (Filipov *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006) más aún, se ha descrito que la densidad de células gliales positivas para TNF- $\alpha$  en la SNc de pacientes con EP, es sustancialmente alta en comparación con los sujetos control. De esta manera el sistema TNF receptor/ligando puede participar en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en la EP (Boka *et al.*, 1994) de la misma forma que en nuestro modelo. Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que en nuestro modelo observamos cambios morfológicos correspondientes a muerte celular por apoptosis en la SNc como lo muestra la figura 10 G,H.

Por lo que estos mecanismos podrían explicar los cambios que ocurren en los animales expuestos a la mezcla de  $\text{AcMn}_3$  y  $\text{MnCl}_2$ , en los cuales observamos disminución del número de neuronas dopaminérgicas en la SNc, producto del daño causado por la acumulación de Mn en sus dos estados de oxidación ( $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+3}$ ) al interior de las mitocondrias de estas células; lo que podría provocar la inhibición de la cadena de transporte de electrones, generando EROs, depleción de ATP y auto-oxidación de DA, o bien por el aumento de glutamato en el NE, aunado a una respuesta inflamatoria sostenida por la activación de las células gliales. De tal manera, estos eventos pueden llevar a la muerte de las neuronas del NE y las de la SNc como se observa en el análisis ultraestructural.

## **Conclusión**

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc, junto con la disminución del contenido de DA estriatal representan las alteraciones histológicas más importantes en la EP y se consideran responsables de la mayoría de las alteraciones motoras que presentan los pacientes parkinsonianos. Por ello, todos los modelos de esta enfermedad están basados en el concepto de que los signos clínicos se relacionan con la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigrales, por lo que el desarrollo de modelos animales para el estudio de la EP se ha orientado a inducir modificaciones ultraestructurales o funcionales de la transmisión dopaminérgica nigroestriada (Luquin, 2000).

Similar a la EP, los modelos animales deben mostrar el deterioro conductual y el déficit neuroquímico asociados con la degeneración patológica de las células dopaminérgicas de la SNc (Fig. 11). Un modelo ideal de la enfermedad puede ser descrito por presentar la patología que reseñe a la enfermedad incluyendo el curso temporal. Varios de los modelos muestran algunos de los signos característicos, sin embargo, ninguno mimetiza la complejidad de la degeneración crónica de la enfermedad en humanos (Emborg, 2004).

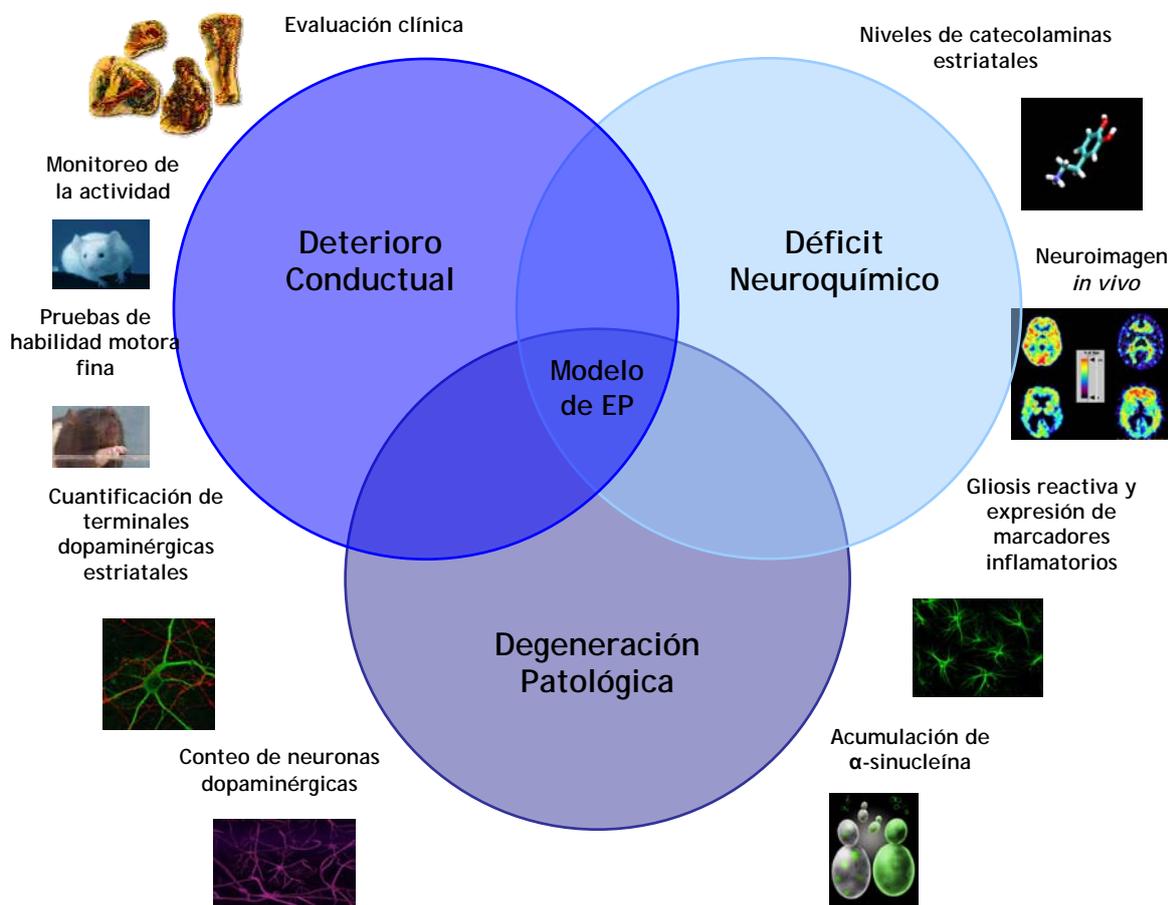


Figura 11.- Aspectos que se deben tomar en consideración en un modelo para el estudio de la EP. Es necesario el monitoreo de la actividad o realización de pruebas motoras, la cuantificación de las neuronas dopaminérgicas de la SNc así como de sus terminales estriatales, además de la determinación de los niveles de dopamina en el núcleo estriado y algunas características patológicas como gliosis reactiva o la presencia de inclusiones intraneuronales (Emborg, 2004)

De acuerdo a los parámetros propuestos por Emborg (2004; Figura 11) para la evaluación de modelos para el estudio de la EP, podemos decir que nuestros resultados muestran un claro deterioro de la actividad motora, observado tanto en la prueba de la viga de equilibrio, así como en la prueba de actividad motora fina (reaching task) en los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . Además de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc el aumento en el número de células gliales, así como alteraciones ultraestructurales en el Núcleo Estriado y en la SNc, muy similares a las observadas en biopsias de pacientes con EP. Otro aspecto muy importante, es que debido a que la administración de la mezcla de Mn fue vía inhalada, la neurodegeneración es bilateral, no es invasivo, además el periodo de exposición que fue de 5 meses (40 inhalaciones), la degeneración de las neuronas dopaminérgicas se llevó a cabo de manera gradual y bilateral, muy parecido a lo que sucede a los pacientes con EP, a diferencia de los modelos ya establecidos los cuales son agudos o subagudos.

Por lo que podemos concluir que la inhalación de la mezcla de Mn es un buen modelo para el estudio de la Enfermedad de Parkinson, mejor aún, consideramos que permite nuevas aproximaciones al estudio del funcionamiento de los ganglios basales, la actividad antiparkinsoniana de determinadas sustancias, el estudio de los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la eficiencia de posibles tratamientos neuroprotectores.

## Apéndices

1.- Para evaluar la coordinación motora se utilizó la prueba de la viga. Todos los animales fueron entrenados durante una semana en un aparato de madera con dos pedestales a los cuales va unida una viga de madera de 1m de largo, elevada del suelo, con inclinación de 15°, la cual tiene un grosor de 3 mm. Se registró con un cronometro el tiempo en que los animales tardaron en atravesar la viga (tiempo total).



Prueba de la viga de equilibrio

Paralelo al entrenamiento en la viga, se entrenó a los animales en la prueba motora fina “reaching task“ empleando una caja de acrílico, la cual tiene al frente una abertura de 1 cm. por la cual el animal tiene que alcanzar un pellet y comerlo, se cuentan como aciertos cada vez que el animal toma el trozo de alimento y lo lleva hasta su boca, y como error si se le cae o no lo puede sujetar, a cada animal se le dieron 10 oportunidades, es decir, se les puso 10 pellets y se cuantificó aciertos y errores. La evaluación en ambas pruebas se realizó periódicamente, una vez por semana durante 5 meses (20 semanas de inhalación de la mezcla de Mn).

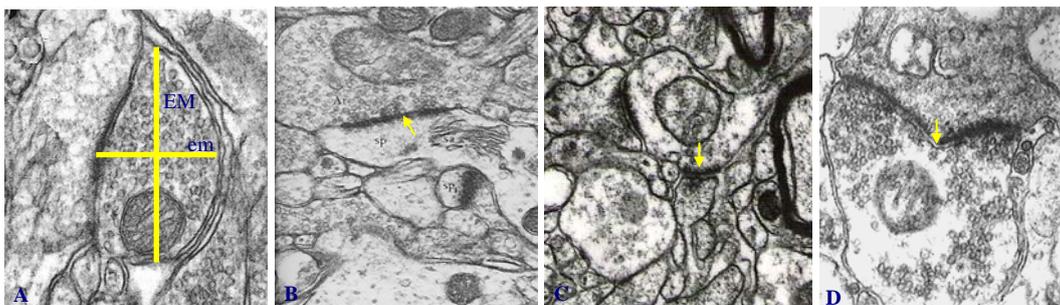


Prueba motora fina (reaching task)

## 2.- Microscopia Electrónica

Los fragmentos del cuadrante dorsomedial de la cabeza del NE y de la SNc se lavaron en PBS, y fueron colocados durante una hora en tetraóxido de Osmio al 1% preparado con PBS para la postfijación; posteriormente los fragmentos se lavaron con PBS en tres cambios de 10 minutos cada uno. El segundo paso consistió en la deshidratación del tejido con alcoholes en concentraciones crecientes (del 50 al 96 %) durante lapsos de 10 minutos cada uno y finalmente, el tejido fue puesto en alcohol al 100 % por tres ocasiones de 10 minutos cada una para colocar el tejido en tolueno durante dos períodos de 10 minutos cada uno. Los tejidos fueron infiltrados en una mezcla de resina 1:1 araldita-tolueno a 60 °C. Se mantuvieron por 12 horas en una mezcla 3:1 de araldita-tolueno a temperatura ambiente, los fragmentos ya infiltrados se incluyeron en araldita pura a 60 °C durante 24 horas.

Una vez que se polimerizó la resina, se procedió a realizar los cortes finos de 900 Å en un ultramicrotomo Reichert-Jung utilizando cuchillas de diamante. Se montaron los cortes en rejillas de cobre y se contrastaron en acetato de uranilo al 5 % durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0.4 % por 5 minutos. Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico Jeol Jem 100 CX II y se llevó a cabo el análisis ultraestructural, realizando las mediciones directamente en la pantalla.



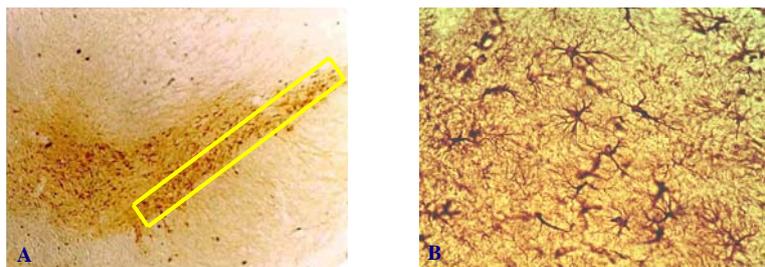
Análisis ultraestructural: A.-eje mayor (EM) y el eje menor (em); tipo de contacto sináptico, con la cabeza (B), o con el cuello de la espina dendrítica (C); y número de sinapsis perforadas (D).

Las pruebas estadísticas que se utilizaron para el análisis de resultados fueron: Para el diámetro de los botones sinápticos se utilizó ANOVA. Para las características del botón sináptico (contacto con el cuello o con la cabeza de la espina dendrítica y el número de sinapsis perforadas) se utilizó la prueba de Wilcoxon.

3.- Inmunohistoquímica: Se realizaron cortes histológicos del mesencéfalo ventral (SNc) y del núcleo estriado de los animales control y expuestos, y se realizó inmunohistoquímica para TH y GFAP. Para lo cual se realizaron cortes de entre 50-100  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se hicieron lavados sucesivos en el siguiente orden: En amortiguador PBS 3 veces por 10 minutos; 3 lavados en amortiguador TRIS de 10 minutos; amortiguador TRIS y peróxido de hidrógeno 0.3 % (30 minutos); amortiguador TRIS y borohidrido de sodio 0.01 % (30 min); amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra y 0.3 % de tritón (durante 1 h), todos con agitación, posteriormente se incubaron los cortes en una alícuota de anticuerpo primario anti-TH o anti-GFAP (según el caso) en amortiguador TRIS 1:1000 con 1 % de suero normal de cabra por 3 días a 4 °C. Posteriormente se lavaron los cortes 3 veces en amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra durante 10 min con agitación. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario. Anti-IGg de conejo 1:200 en TRIS con 1 % de suero normal de cabra. Se hizo un lavado en TRIS con 1 % de suero normal de cabra, para después incubar en Abidina-Biotina (2 Hrs) a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en TRIS con agitación se reveló la tinción en los tejidos con 3-3 Diaminobencidina (DAB) al 0.05 % y 0.003 % de peróxido de hidrógeno. El tejido se lava una última vez en TRIS por 10 min y se montan en portaobjetos previamente gelatinizados, se dejan secar un día. Para cubrir con resina se realizó la deshidratación de los cortes con alcoholes en concentraciones crecientes (60, 70, 80, 90 y 96 %) diez minutos en cada uno y 3 cambios en alcohol de 100 % de 10 min. y finalmente dos cambios en tolueno de 10 min. cada uno.

Para su posterior análisis en un fotomicroscopio, haciendo un conteo de las neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc en un área de 1500  $\mu\text{m}^2$  en 10 cortes por animal a partir del inicio del núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio; para determinar gliosis reactiva se hizo el conteo de células inmunorreactivas a GFAP en la SNc y en el núcleo estriado en un área de 3300  $\mu\text{m}^2$ , empleando 25 campos por animal. Todos los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA.

NOTA: en la inmunohistoquímica para GFAP se utilizó amortiguador de fosfatos (PBS) en lugar de amortiguador TRIS.



Conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en un área de 1500  $\mu\text{m}^2$  (A); conteo de células inmunorreactivas a GFAP en un área de 3300  $\mu\text{m}^2$  (B).

## Referencias Bibliográficas

- Aktan F. (2004) **iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation.** *Life Science* 75: 639–653.
- Albin R.L., Young A.B. y Penney J.B. (1989) **The functional anatomy of basal ganglia disorders.** *Trends in Neuroscience* 12, 10: 366-375
- Alexander G. y Crutcher M.D. (1990) **Functional architecture of basal ganglia circuits. Neural substrates of parallel processing.** *Trends in Neuroscience* 13(7): 266-271.
- Alexi T., Borlongan C.V., Faull R.L.M., Williams C.E., Clark R.G., Gluckman P.D. y Hughes P.E. (2000) **Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases.** *Progress in Neurobiology* 60: 409-470.
- Ali S.E., Duhart H.M., Newport G.D., Lipe G.W. y Slikker W.Jr (1995) **Manganese-induced reactive oxygen species: Comparison between Mn<sup>+2</sup> and Mn<sup>+3</sup>.** *Neurodegeneration* 4: 329-334.
- Anaya M.V (1997) **Estudio morfofuncional comparativo entre los trasplantes de la médula adrenal colocados en el ventrículo lateral o en el parénquima estriatal.** Tesis para obtener el título de Maestra en Neurociencias. ENEP Iztacala UNAM.
- Anglade P.S., Tsuji F., Javoy-Agid y Hirsch E.C. (1995) **Plasticity of a nerve aferent to nigrostriatal neurons in Parkinson's disease.** *Annals of Neurology* 37: 265-272.
- Anglade P., Mouatt-Prigent A., Agid Y. y Hirsch E.C. (1996) **Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease.** *Neurodegeneration* 5: 121–128.
- Angulo J.A. y McEwen B.S. (1994) **Molecular aspects of neuropeptide regulation and fuction in the corpus striatum and nucleus accumbens.** *Brain Research Reviews* 19: 1-28.
- Aposhian H.V., Ingersoll R.T. y Montgomery E.B. (1999) **Transport and control of manganese ions in central nervous system.** *Environmental Research* section A 80: 96-98.
- Archivald F.S. y Tyree C. (1987) **Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256(2): 638-650.
- Aschner M. y Gannon M. (1994) **Manganese (Mn) transport across the rat blood–brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms.** *Brain Research Bulletin* 33: 345–349.
- Aschner M. (1996) **The functional significance of brain metallothioneins.** *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 10: 1129-1136.
- Aschner M., Erikson K.M. y Dorman D.C. (2005) **Manganese dosimetry: species differences and implication for neurotoxicity.** *Critical Reviews in Toxicology* 35: 1-32
- Avila-Costa M.R. (1996). **Evolución de las alteraciones ultraestructurales del neurópilo del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6-Hidroxidopamina.** Tesis de Maestría. ENEP-I. UNAM. Mex. D.F.

- Avila-Costa R.M., Colín-Barenque L., Espinosa V.J. y Machado S.J. (1998). **Degeneración del neurópilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis ultraestructural comparativo.** *Patología México* 36:297-301.
- Bankiewicz K.S., Oldfield E.H., Chieueh C.C., Doppman J.L., Jacobwitz D.M. y Kopin I.J. (1986) **Hemiparkinsonism in monkey after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenil-1,2,3,6,-tetrahydropyridine (MPTP).** *Life Science* 39: 7-16.
- Barrio J., Huang S.C. y Phelps E. (1997) **Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic disease.** *Biochemical Pharmacology* 54: 341-348.
- Barzilai A., Melamed E. y Shirvan A. (2001) **Is there a rationale for neuroprotection against Dopamine toxicity in Parkinson's disease?** *Cellular and Molecular Neurobiology* 21(3): 215-230.
- Bell J.G., Keen C.L. y Lonnerdal F. (1989) **Higher retention of manganese in suckling than in adult rats is not due to mutational differences in manganese uptake by rat small intestine.** *Journal of Toxicology and Environmental Health* 26: 387-398.
- Betarbet R., Sherer T.B. y Greenamyre J.T. (2002) **Animal models of Parkinson's disease.** *Bioassays* 24: 308-318.
- Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., García-Osuna M., Panov A.V. y Greenamyre J.T. (2000) **Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease.** *Nature Neuroscience* 3: 1301-1306.
- Bezard E., Gross C.E. Fournier M.C., Dovero S., Bloch B. y Jaber M. (1999) **Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter.** *Experimental Neurology* 155: 268-273.
- Bjarkam C.R., Sørensen J.C., Sunde N. Å. Geneser F.A. y Østergrd K. (2001) **New strategies for the treatment of Parkinson's disease hold considerable promises for the future management of neurodegenerative disorders.** *Biogerontology* 2: 193-207.
- Blum D., S. Torch N., Lambeng M., Nissou A. L., Benabid R., Sadoul y Verna J.M. (2001) **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease.** *Progress in Neurobiology* 65: 135-172.
- Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y. y Hirsch E.C. (1994) **Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease.** *Neuroscience Letters* 172: 151-154.
- Bolam J.P., Somogyi P., Totterdel S. y Smith A.D. (1981) **A second type of striatonigral neuron: a comparison between retrogradely labelled and Golgi stained neurons at light and electron microscopic levels.** *Neuroscience* 6(11): 2141-2157.
- Bolam J.P., Smith A.D. y Wainer B.H. (1984) **Characterization of cholinergic neurons in the rat neostriatum. A combined of choline acetyltransferase immunocytochemistry. Golgi impregnation and electron microscopy.** *Neuroscience* 12: 711-712.
- Bonilla E. (1984) **Chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats.** *Experimental Neurology* 84: 696-700.

- Bové J., Prou D., Perier C. y Przedborski (2005) **Toxin-induced models of Parkinson's disease.** *The Journal of American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2: 484-494.
- Britton A.A. y Cotzias G.C. (1966) **Dependence of manganese turnover on intake.** *American Journal of Physiology* 211: 203-206.
- Brouillet B.P., Shinobu L. y McGarvey U. (1993) **Manganese injection into the striatum produced excitotoxic lesion by impairing energy metabolism.** *Experimental Neurology* 120: 89-94.
- Brown R.G., Marsden C.D. (1984) **How common is dementia in Parkinson's disease?** *The Lancet* 2: 1262-1265.
- Burns R.S., Chiueh C., Markey S.P., Ebert M.H., Jacowitz D.M. y Kopin (1983) **A monkey model of parkinsonism: Selective destruction of dopaminergic neurons in *pars compacta* of the substantia nigra by MPTP.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* USA. 80: 4546-4550.
- Cadet J.L. y Brannock C. (1998) **Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems.** *Neurochemistry International* 32: 117-131.
- Calabresi P., Mercuri N.B., Sancesario G. Y Bernardi G. (1993) **Electrophysiology of dopamine-denervated striatal neurons. Implications for Parkinson's disease.** *Brain* 116: 433-452.
- Calabresi P., De Murtas M. y Bernardi G. (1997) **The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence.** *Neuroscience* 78: 39-60.
- Calabresi P., Ammassari M., Gubellini P., Sancesario G., Morello M., Centonze D., Marfia G., Saulle E., Passino E., Picconi B. y Bernardi G. (2001) **A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication.** *Neurobiology of Disease* 8: 419-432
- Calne D.B., Chu N.S., Huang C.C. Lu C.S. y Olanow W. (1994) **Manganism and idiopathic parkinsonism: Similarities and differences.** *Neurology* 44(9): 1583-1583.
- Calverley R.K.S. y Jones D.G. (1990) **Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity.** *Brain Research Reviews* 15: 215-249.
- Carlman L.S., Gage F.H., Schults W. (1991) **Partial lesion of substantia nigra. Relation between extent of lesion and rotation behavior.** *Brain Research.* 553: 275-283.
- Carlson M. y Carlson A. (1990) **Interaction between Glutamatergic and monoaminergic system withing the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease.** *Trends in Neuroscience.* 13, 7: 272-276.
- Carpenter M.B. (1976) **Anatomical organization of the corpus striatum and related nuclei.** En: Melvin, D. y Yahr. M.D. (Eds.) *The basal ganglia.* Ravens Press, N.Y.
- Carpenter M.B. (1981) **Anatomy of the corpus striatum and brain stem integrating systems.** En: Rooks V. (Ed) *Handbook of Physiology: The nervous system, motor control.* American Physiological Society, Bethesda MD.

- Carpenter M.B. (1984) **Interconnections between the corpus striatum and brain stem nuclei.** En: *The basal ganglia* (McKenzie J.S., KemmR.E. y Wilcock L.N. eds). 1–68 pp. Bethesda, MD: Plenum.
- Chang H.T. y Kitai S.T. (1982) **Large neostriatal neurons in the rat: An electron microscopic study of gold-tone Golgi-stained cells.** *Brain Research Bulletin* 8: 631-643.
- Chang J.Y. y Liu L. (1999) **Manganese potentiates nitric oxide production by microglia.** *Molecular Brain Research* 68: 22–28
- Chen J.Y., Tso G.C., Zhao Q. y Zheng W. (2001) **Differential cytotoxicity of Mn(III): Special references to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes.** *Toxicology Applied Pharmacology* 175(2): 160-168.
- Chen C.J., Ou Y.C., Lin S.Y., Liao S.L., Chen S.Y. y Chen J.H. (2006) **Manganese modulates pro-inflammatory gene expression in activated glia.** *Neurochemistry international* 49(1): 62-71.
- Chin-Chang H., Yi-Hsin W., Chin-Song L., Nai-Shin C. y Tzu-Chen Y. (2003) **Dopamine transporter binding in chronic manganese intoxication.** *Journal of Neurology* 250: 1335-1339.
- Christersson-Nylander M., Herrera-Marschitz M., Staines W., Hökfelt T., Terenius L., Ungerstedt U., Cuello C., Oertel W.H. y Goldstein M. (1986) **Striato-nigral dynorphin and substance P pathways in the rat. Biochemical and immunohistochemical studies.** *Experimental Brain Research* 64: 169-192.
- Chun, H.S., Lee, H. y Son, J.H. (2001) **Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741.** *Neuroscience Letters* 316: 5-8.
- Chun-Jung C., Su-Lan L., Yong-San H. y An-Na C. (2005) **RhoA inactivation is crucial to manganese-induced astrocytes stellation.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 873-879.
- Clarke P.G.H. (1998) **Apoptosis versus necrosis. How valid a dichotomy for neurones?** En: Koliatsos V.E., Ratan R.R. (eds). *Cell death and diseases of the nervous system.* 3–28 pp.
- Colín-Barenque L., Avila-Costa M.R., Espinosa-Villanueva J., Machado-Salas J. (2000) **Análisis Ultraestructural Comparativo en Pacientes con Enfermedad de Parkinson y Ratas Viejas.** *Archivos de Neurociencias* 5(4):168-173.
- Coté L. y Crutcher M.D. (1991) **Motor function of the basal ganglia and diseases of transmitter metabolism.** En: Kandel E.R., Chward, J.H. y Jessell T.M. (Eds) *Principles of Neural Sciences.* Elsevier USA.
- Critchfield J.W. y Keen C.L. (1992) **Manganese +2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma.** *Metabolism* 41(10): 1087-1092.
- Dauer W. y Przedborski S. (2003) **Parkinson`s disease: Mechanisms and models.** *Neuron* 39: 889-909.
- Davies J. y Dray A. (1976) **Substantia P in substantia nigra.** *Brain Research* 107:623-627.
- Day B.J., Patel M., Calavetta L., Chang L.Y. y Stamier J.S. (1999) **A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12760-12765.

- De Long M.R. (1974) **Motor functions of the basal ganglia: Single unit activity during movement.** En: *Neuroscience, 3th study program.* Schmit, F.O. y Wonder, F.G. (eds). Cambridge. MIT Press. 319-324 pp.
- De Long M.R. y Georgopoulos A.P. (1981) **Motor functions of the basal ganglia.** En: Brookhart J.M., Mouncastle V.B., Brooks V.B. y Geiger S.R. (eds). *Handbook of Physiology. Sect. 1. The Nervous system Vol. 2. Motor control. Part. 2.* American Physiology Society, Bethesda, M.A. 1017-1061 pp.
- De Long M.R. (1990) **Primate models of movement disorders of basal ganlia origin.** *Trends in Neuroscience* 13(7) : 281-285.
- DeBoer P., Abercrombie E.D., Heeringa M. y Westerink B.H.C. (1993) **Differential effect of systemic administration of Bromocryptine and L-dopa on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats.** *Brain Research* 608: 198-203.
- Descarries L., Soghomonian J., García S., Doucet G. y Bruno J.P. (1992) **Ultrastructural analysis of serotonin hyperinnervation in adult rat neostriatum following neonatal dopamine denervation with 6-hydroxydopamine.** *Brain Research* 569: 1-13.
- Deumens R., Blokland A. y Prickerts J. (2002) **Modeling Parkinson´s disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesion of the nigrostriatal pathway.** *Experimental Neurology* 175: 303-317.
- DiFiglia M., Aronin N.Y. y Martin J.B. (1982) **Light and electron microscopic localization of immunoreactive Leu-enkephalin in the monkey basal ganglia.** *Neuroscience* 2(3): 303-320.
- DiMauro S. (1993) **Mitochondrial involvement in Parkinson´s disease: The controversy continues.** *Neurology* 43: 2170-2172.
- Dobson A.W., Erikson K.M. y Aschner M. (2004) **Manganese Neurotoxicity.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012: 115-128.
- Domesick V.B., Stinus L. y Paskevich (1983) **The cytology of dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat: Light and electron-microscopic study.** *Neuroscience* 8(4): 743-765.
- Dorman D.C., Stuve M.F., Vitarella D., Byerly F.L., Goetz J. y Miller R. (2000) **Neurotoxicity of manganese chloride in neonatal and adult CD rats following subchronic (21-day) high-dose oral exposure.** *Journal of Applied Toxicology* 20: 179-187.
- Dorman D.C. (2001) **Influence of dietary manganese on the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate in male CD rats.** *Toxicological Sciences* 60: 242-251.
- Dorman D.C., Struve M.F., James R.A., Marshall M.W., Parkinson C.U., y Wong B.A. (2001) **Influence of particle solubility on the delivery of inhaled manganese to the rat brain: manganese sulfate and manganese tetroxide pharmacokinetics following repeated (14-day) exposure.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 170: 79-87.
- Durán E. y Chacon (2001) **Parkinsonismo probablemente inducido por manganeso.** *Revista de Neurología* 33(5): 434-436.

- El Iridisi A. y Trenkner E. (1999) **Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism.** *Journal of Neuroscience* 19(21): 9459-9468.
- Emborg M.E. (2004) **Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies.** *Journal of Neuroscience Methods* 139:121-143
- Enochs W. S., Sarna T., Zecca L., Riley P.A. y Swartz H.M. (1994) **The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis.** *Journal of Neural Transmission* 7: 83-100.
- Erikson K.M., Tedroff J., Thuomas K.A., Aquilonius S.M., Hartvig P., Fasth K.J. Bjurling P., Langstrom B., Hedstrom K.G. y Heibronn E. (1992) **Manganese induced brain lesion in *Macaca fascicularis* as revealed by positron emission tomography and magnetic resonance imaging.** *Archives of Toxicology* 66(6): 403-407.
- Erikson K. y Aschner M. (2002) **Manganese causes differential regulation of glutamate transporter (GLAST) taurine transporter and metallothionein in cultured rat astrocytes.** *Neurotoxicology* 23: 595-602.
- Erikson K.M., Suber R.L. y Aschner M. (2002) **Glutamate/aspartate (GLAST), taurine transporter, and metallothionein mRNA levels are differentially altered in astrocytes exposed to manganese chloride, manganese phosphate, and manganese sulfate.** *Neurotoxicology* 23: 281-288.
- Erikson K.M. y Aschner M. (2003) **Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction.** *Neurochemistry International* 43: 475-480
- Erikson K.M., Dobson A., Dorman D. y Aschner M. (2004) **Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain.** *Science of the Total Environment* 334(335): 409-416
- Erikson K.M., John C.E., Jones S.R. y Aschner M. (2005) **Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter.** *Experimental Toxicology and Pharmacology* 20: 390-394.
- Fiala J.C., Spacek J. y Harris K.M. (2002) **Dendritic spine pathology: Cause or Consequence of neurological disorders?** *Brain Research Reviews* 39(1): 29-54.
- Filipov N.M., Seegal R.F. y Lawrence D.A. (2005) **Manganese potentiates *in vitro* production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism.** *Toxicological Sciences* 84: 139-148.
- Finley J.W., Johnson P.E. y Johnson L.K. (1994) **Sex affects manganese absorption and retention by humans from a diet adequate in manganese.** *American Journal of Clinical Nutrition* 60: 949-955.
- Flatmark T. (2000) **Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells.** *Acta Physiologica Scandinavica* 168: 1 - 17.
- Flint Beal M (2003) **Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease.** *Annals of New York Academy of Sciences* 991: 120-131.

- Fornaguera J., Schwarting R.K.W., Boix F. y Huston J.P. (1993) **Behavioral indices of moderate nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesion: A preclinical Parkinson's model.** *Synapse* 143: 179-185.
- Forno L.S. y Norville R.L. (1979) **Ultrastructure of the neurostriatum in Huntington's and Parkinson's disease.** *Advances in Neurology* 23: 123-135.
- Fox C.A., Rafols J.A. y Cowan W.M. (1975) **Computer measurements of axis cylinder diameters of radial fibers and "comb" bundle fibers.** *The Journal of Comparative Neurology* 159: 201-224.
- Frame M.D. y Milanick M.A. (1991) **Mn and Cd transport by the Na-Ca exchanger of ferret red blood cell,** *American Journal of Physiology* 261: 467-475.
- Freund T.F., Powell J.F. y Smith A.D. (1984) **Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines.** *Neuroscience* 13: 1189 - 1215
- García-Aranda J.A., Wapnir R.A. y Lifshitz F. (1983) **In vitro intestinal absorption of manganese in the rat.** *Annals of Nutrition & Metabolism* 113: 2601-2607.
- García-Martínez J.C. (2003) **La enfermedad de Parkinson vista por un afectado.** *Revista de Neurología* 7(4): 391-400.
- García-Miniet R., Alberti-Amador E., Castellano-Ortega M.R. (2003) **Terapia génica ex vivo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.** *Revista de Neurología* 36(11): 1073-1077.
- Gavin C.E., Gunter K.K. y Gunter T.E. (1990) **Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity.** *The Biochemical Journal* 266: 329-334.
- Gavin C.E., Gunter K.K. Y Gunter T.E. (1992) **Mn<sup>2+</sup> sequestration by mitochondria and inhibition of phosphorylation.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 115: 1-5.
- Geinisman Y., de Toledo-Morrell L. y Morrell F. (1991) **Induction of longterm potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities.** *Brain Research* 566: 77- 88.
- Gerfen C.R. y Young W.S. (1988) **Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: An in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study.** *Brain Research* 460: 161-167.
- Gerfen C.R. (1992) **D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons.** *Seminars in the Neurosciences* 4(2): 109-119.
- Gianutsos G., Morrow G.R. y Morris J.B. (1997) **Accumulation of manganese in rat brain following intranasal administration.** *Fundamental and Applied Toxicology* 37(2): 102-105.
- Gibb W.R.G. and Less A.J. (1991) **Anatomy, pigmentation ventral and dorsal suboculations of the substantia nigra and differential cell death in Parkinson's disease.** *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 54: 388-396.

- Gilgun-Sherki Y., Rosenbaum Z., Melamed E. y Offen D. (2002) **Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: Current state.** *Pharmacological Reviews* 54: 271-284.
- Gilmans-Winans N.S. (1994). **Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gats.** El manual moderno S.A. de C.V. (3 ed). México D.F. 183-192 pp.
- Glinka Y., Tipon K.F. y Youdim M.B.H. (1998) **Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex 1 by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine.** *European Journal of Pharmacology* 351: 121-129.
- Góngora\_Alfaro J.L., Moo-Puc R.E., Villanueva-Toledo J., Arankowsky-Sandoval G., Álvarez-Cervera F.J., Pineda- Cortés J.C., Heredia-López F.J. y Bata-García (2005) **La cafeína y los antagonistas de los receptores A2a de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson.** *Revista Biomédica* 16: 99-111.
- González-Fragela M.E., Céspedes E.M., Arencibia R., Broche F., Gómez A.A., Castellano O. y García J.C. (1998) **Indicadores de estrés oxidativo y efecto del tratamiento antioxidante en pacientes con enfermedad de Parkinson primaria.** *Revista de Neurología* 26(149): 28-33.
- Gorell J.M., Rybicki B.J., Johnson C.C. y Peterson E.L. (1999) **Smoking and Parkinson's disease. A dose-response relationship.** *Neurology* 52: 115-119
- Gotham A.M., Brown R.G. y Marsden C.D. (1986) **Depression in Parkinson's disease. A quantitative and qualitative analysis.** *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 49: 381-389.
- Graverland G., Williams R.S., DiFiglia M. (1985) **A Golgi study of the human neostriatum neurons and afferents fibers.** *The Journal of Comparative Neurology* 234: 317-333.
- Graybiel A.M. y Ragsdale W. (1983) **Biochemical anatomy of the striatum.** En: Emson, P.C. (Ed) *Chemical Neuroanatomy Raven Press.* 427-504.
- Graybiel A.M. (1990) **The basal ganglia and the initiation of movement.** *Reviews in Neurology* 146(10): 570-574.
- Greenamyre y O'Brien (1991) **N-Methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease.** *Archives of Neurology* 48:977-981.
- Greenamyre J.T. (1993) **Glutamate-dopamine interactions in the basal ganglia relationship to Parkinson's disease.** *Journal of Neural Transmission* 91: 286-291.
- Groves P.M., Linder J.C. y Young S.J. (1994) **5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum.** *Neuroscience* 58: 593- 604.
- Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L. y Hediger M.A. (1997) **Cloning and characterization of a mammalian protein-coupled metal-ion transporter.** *Nature* 388: 482-488.

- Gunther T., Vormann J. y Cragoe E.J. (1990) **Species-specific Mn<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> antiport from Mg<sup>2+</sup> loaded erythrocytes.** *Federation of European Biochemical Societies Letters* 261: 47-51.
- Gunter t., Miller L., Gavin C., Eliseev R., Salter J., Buntinas L., Alexandrov A., HammondS. y Gunter K.(2004) **Determination of the oxidation states of manganese in brain, liver, and heart mitochondria.** *Journal of Neurochemistry* 88: 266-280
- Gwiazda R.H., Lee D., Sheridan J. y Smith D.R. (2002) **Low cumulative manganese exposure affects strial GABA but not dopamine.** *Neurotoxicology* 23: 69-76.
- Halbach O.B., Schober A. y Krieglstein (2004) **Genes, proteins and neurotoxins involved in Parkinson`s disease.** *Progress in Neurobiology* 73: 151-177.
- Hallman H., Lange J., Olson L. y Stromberg I. (1985) **Neurochemical and histological characterization of 1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse.** *Journal of Neurochemistry* 44: 117-127.
- HaMai D., Campbell 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.
- HaMai D. y Bondy (2004) **Pro - or anti-oxidant manganese: a suggested mechanism for reconciliation.** *Neurochemistry International* 44: 223-229.
- Harris K.M. y Kater S.B. (1994) **Dendritic spines: Cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function.** *Annual Review of Neuroscience* 17: 341-371.
- Hartmann A. y Hirsch E.C. (2000) The **apoptosis theory in Parkinson`s disease-revisited.** *Advances in Neurology* 86: 143-153.
- Harte J., Holden C., Scheneider R. y Shirey C. (1991) **Toxics A to Z. A guide to everyday pollution hazards.** University of California Press.
- Henriksson J., Tallkvist J. y Tjälve (1999) **Transport of manganese via olfactory pathway in rats: Doseage dependency of the uptake and subcellular distribution of the metal in the olfactory epithelium and the brain.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 156(2): 119-128.
- Henry B., Crossman A.R. and Brotchie M.J. (1999) **Effect of repeated L-dopa, Bromocriptine, or Lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B mRNA levels in the striatum of the 6-Hydroxydopamine-lesioned rat.** *Experimental Neurology* 155: 205-220.
- Hilgier W., Anderzhanova E., Oja S.S., Saransaari P. y Albrectht J. (2003) **Taurine reduces ammonia and N-metil-D-Aspartate- induced accumulation of cyclic GMP and hydroxyl radical in microdialysates of rat striatum.** *European Journal of Pharmacology* 468: 21-25
- Hirata Y., Adachi K. y Kiuchi K. (1998) **Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells.** *Journal of Neurochemistry* 71: 1607-1615.

- Hoglinger G.U., Feger J., Annick P., Michel P.P., Karine P., Champy P., Ruberg M., Wolfgang W.O. y Hirsch E. (2003) **Chronic systemic complex I inhibition induces hypokinetic multisystem degeneration in rats.** *Journal of Neurochemistry* 84: 1-12.
- Hökfelt T. y Ungerstedt U. (1969). **Electron and fluorescence microscopical studies on the nucleus caudatus putamen of the rat after unilateral lesions of ascending nigrostriatal dopamine neurons.** *Acta Physiologica Scandinavica* 76: 415-426.
- Hornykiewicz O. (1986) **Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: Possible neurochemical mechanism.** *Advances in Neurology* 60: 140-147.
- Huang C.C., Lu C.S. y Chu N.S. (1993) **Progression after chronic manganese exposure.** *Neurology* 43: 1479-1483.
- Hunot S., Bernard V., Faucheux B., Boissiere F., Leguern E., Brana C., Gautris P.P., Guerin J., Bloch B., Agid Y. y Hirsch E.C. (1996) **Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) gene expression in the human brain: a post-mortem in situ hybridization study with special reference to Parkinson's disease.** *Journal of Neural Transmission* 103: 1043-1052.
- Ingersoll R.T., Montgomery E.B. y Aposhian H.V. (1995) **Central nervous system toxicity of manganese I. Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal administration of manganese chloride.** *Fundamental and Applied Toxicology* 27: 106-113.
- Ingersoll R.T., Montgomery Jr. y Aposhian H.V. (1999) **Central nervous system toxicity of manganese II. Cocaine or reserpine inhibit manganese concentration in the rat brain.** *Neurotoxicology* 20: 467-476
- Ingham C.A., Hood S.H., VanMaldengen B., Weenink A. y Arbuthnot G.W. (1993) **Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injection into the nigrostriatal pathway.** *Experimental Brain Research* 93: 17-27.
- Ingham C.A., Hood S.H., Taggart P. y Arbuthnot G.W. (1998) **Plasticity of Synapses in the Rat Neostriatum after Unilateral Lesion of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway.** *Journal of Neuroscience* 18(12): 4732-4743
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática de México. INEGI (2004) disponible en: [URL:http://www.inegi.gob.mx/inegidefault.asp](http://www.inegi.gob.mx/inegidefault.asp).
- Jae-Hoon B., Byeong-Churl J., Seong-Il S., Eunyoung H., Hyung H.B., Sung-Soo K., Mi-young L. y Dong-Hoon S. (2006) **Manganese induces inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via activation of both MAP kinase and PI3K/Akt pathways in BV2 microglial cells.** *Neuroscience Letters* 398: 151-154
- Jedrzejewska A., Wierzbica-Bobrowicz T., Olejniczak P., Poszwinska Z. y Dymecki J. (1990). **Ultrastructure and immunocytochemistry of left and right nigrostriatal system after lesion of right side of substantia nigra of rat.** *Advances in Neurology* 53: 41-49.
- Jenner P. y Olanow C.W. (1996) **Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease.** *Neurology* 47: 161-170.

- Joyce N.J. (1991) **Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine I. Effects of intranigral or intracerebroventricular 6-hydroxydopamine lesion of mesostriatal dopamine system.** *Experimental Neurology* 113: 261-276.
- Kales A, Ansel R.D y Markhan C.H. (1971) **Sleep in patients with Parkinson's disease and in normal subjects prior to and following L-DOPA administration.** *Clinical Pharmacological Therapy* 12: 397-406.
- Kamata H. y Hirata H. (1999) **Redox regulation of cellular signalling.** *Cellular signalling* 11(1): 1-14.
- Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N. y Ankara H. (2003) **Structure-stability-function relationships of dendritic spines.** *TRENDS in Neuroscience* 26(7): 360-368.
- Kawaguchi Y., Wilson C.J., Augood S.J., Emson P.C. (1995) **Striatal interneurons: Chemical, physiological and morphological characterization.** *Trends in Neuroscience* 18 (12): 527-535.
- Keen C.L. y Zidenberg-Cherr S. (1994) **Manganese toxicity in humans and experimental animals.** En: *Manganese in the health and disease* Klimins-Tavantzis D.J. (ed). CRC Press, boca Raton. 193-205.
- Keen C. L. (1999) **Nutritional aspects of manganese from experimental studies.** *Neurotoxicology* 20: 213-223.
- Kihara T., Shimohama S., Sawada H., Honda K., Nakamizo T., Kanki R., Yamashita H. y Akaike A. (2002) **Protective effect of dopamine D<sub>2</sub> agonists in cortical neurons via the phosphatidylinositol 3 kinase cascade.** *Journal of Neuroscience Research* 70: 274-282.
- Lai J.C. (1999) **Manganese mineral interactions in brain.** *Neurotoxicology* 20: 433-444.
- Langston J.W., Forno L.S., Rebert C.S., Irwin I. (1984) **Selective nigral toxicity after systemic administration of MPTP in the squirrel monkey.** *Brain Research* 292: 390-394.
- Lee F.S., Hagler J., Chen Z.J. y Maniatis T. (1997) **Activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway.** *Cell* 88: 213-222.
- Lee F.S., Peters R.T., Dang L. y Maniatis T. (1998) **MEKK1 activates both I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  and I $\kappa$ B kinase  $\beta$ .** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9319-9324.
- Leist M. y Nicotera P. (1999) **Calcium and cell death.** En: Koliastos E.V. y Ratan R.R. (eds) *Cell death and diseases of the nervous system* Humana press, New Jersey 69-91 pp.
- León F.L.I. (1996). **Etiología de la enfermedad de Parkinson.** En Otero-Silíceo. *Parkinson, enfoque al futuro.* Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 25-34 p.
- Levin B.E., Tomer R. y Rey G. (1992) **Cognitive impairments in Parkinson's disease.** *Neurologic Clinics* 10: 471-485.
- Lin W.W., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S. y Collins F. (1993) **GDNF: a glial cell-line derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons.** *Science* 260: 1130-1132.

- Lindfors N. y Ungerstedt U. (1990) **Bilateral regulation of glutamate tissue and extracellular levels in caudate – putamen by midbrain dopamine neurons.** *Neuroscience Letters* 115: 248 –252.
- Linder J.C., Young S.J. y Groves P.M. (1995) **Electron microscopic evidence for neurotoxicity in the basal ganglia.** *Neurochemistry International* 26(2): 195-202.
- Lisman J.E. y Harris K.M. (1993) **Quantal analysis and synaptic anatomy: Integrating two views of hippocampal plasticity.** *Trends Neuroscience* 16: 141–147.
- López-Pousa S. Garre-Olmo A., Turon-Estrada E., Gelada-Batlle E., Lozano-Gallego M. Hernández-Ferrándiz M., Morante-Muñoz V., Peralta-Rodríguez V. y Cruz-Reina M.M. (2003) **Incidencia clínica de la demencia por los cuerpos de Lewy.** *Revista de Neurología* 36(8): 715-720.
- Lotharius J., Dugan L.L. y O'Malley KL. (1999) **Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons.** *Journal of Neuroscience* 19: 1284 –1293.
- Lotharius J. y Brundage P. (2002) **Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicle and  $\alpha$ -synuclein.** *Nature Reviews Neuroscience* 3: 932-942
- Luquin M.R. (2000) **Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson.** *Revista de Neurología* 31(1): 60-66.
- Machado-Salas J., Ibarra O., Martínez-Fong D., Cornejo A., Aceves y Kuri J. (1990) **Degenerative ultrastructural changes observed in the neuropil of the caudate nuclei from Parkinson's disease patients.** *Stereotactic Functional Neurosurgery* 54-55: 297-305.
- Maleki E.A., Devenyi A.G., Beard J.L y Connor J.R. (1999) **Existing and emerging mechanism for transport of iron and manganese to the brain.** *Journal of Neuroscience Research* 56: 113-122.
- Malecki, E.A. (2001) **Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons.** *Brain Research Bulletin* 55: 225-228.
- Mathison S., Nagalla R. y Kompella U.B. (1998) **Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: Fact or fiction?** *Journal of Drug Target* 5(6): 415-441.
- McCormack A.L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A.B., Thiffault C., Langston J.W., Cory-Slechta D-A. y Di Monte D.A. (2002) **Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat.** *Neurobiology of Disease* 10: 119-127.
- McConkey D.J y Orrenius S. (1996) **Signal transduction pathways in apoptosis.** *Stem Cells* 14: 619-631.
- McGeer P.L., y McGeer E.G. (1993) **Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia.** En: Narabayashi H., Nagatsu T., Yanagisawa N., y Mizuno Y. (eds) *Advances in Neurology* Vol 60 Raven Press, N.Y.
- McNeil T.H., Brown S.A., Rafols J.A. y Shulson I. (1988). **Atrophy of medium spiny striatal dendrites in advanced Parkinson's disease.** *Brain Research* 445: 148-152.

- Mehta T. R. y Dawson R. Jr. (2001) **Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture.** *Amino Acids* 20: 419-433
- Mergler D., Huel G., Bowler R., Iregren A., Belanger S., Balwin M., Tardif R., Smargiassi A. y Martin L. (1994) **Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese.** *Environmental Research* 64(2): 151-180.
- Mergler D., Baldwin M., Belanger S., Larribe F., Beuter A., Bowler R., Panisset M., Edwards R., de Geoffroy A., Sassine M.P. y Hudnell K. (1999) **Manganese neurotoxicity, a continuum of dysfunction: results from a community based study.** *Neurotoxicology* 20: 327-342.
- Meshul C.K. y Tan S-E (1994) **Haloperidol-induced morphological alterations are associated with changes in calcium/calmodulin kinase II activity and glutamate immunoreactivity.** *Synapse* 18: 205-217.
- Miller R. y Beninger R.J. (1991) **On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonist in animals with unilateral depletion of striatal dopamine.** *Progress in Neurobiology* 36, 229-256.
- Missale C., Nash R.S., Robinson W.S., Jaber M. y Caron G.M. (1998) **Dopamine receptors: From structure to function.** *Physiological Reviews* 78 (1): 189-225.
- Mochizuki H., Nakamura N., Nishi K. y Mizuno Y. (1994) **Apoptosis is induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in ventral mesencephalic-striatal coculture in rat.** *Neuroscience Letters* 170: 191-194.
- Moos T. (1996) **Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system.** *Journal of Comparative Neurology* 375: 675-692.
- Mundorf M.L., Joseph J.D., Austi C.M., Caron M.G. y Wightman R.M. (2001) **Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex.** *Journal of Neurochemistry* 79: 130-142.
- Murphy V.A., Wadhvani K.C., Smith Q.R. y Rapoport S.I. (1991) **Saturable transport of manganese (II) across the rat blood-brain barrier.** *Journal of Neurochemistry* 57(3): 948-954.
- Nagatomo S., Umehara F., Hanada K., Nobuhara Y., Takenaga S., Arimura K. y Osame M. (1999) **Manganese intoxication during total parenteral nutrition: Report of two cases and review of the literature.** *Journal of Neurological Sciences* 162(1): 102-105.
- Nakanishi H. y Kita S.T. (1987) **Intracellular study of rat substantia nigra *pars reticulata* neurons in an vivo slice preparation: Electrical membrane properties and response characteristic to subthalamic stimulation.** *Brain Research* 437: 45-55.
- Narita K., Kawasaki F. y Kita H. (1990) **Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminal are prevented by verapamil frogs.** *Brain Research* 510: 289-295.
- Normandin L. y Hazell A.S. (2002) **Manganese neurotoxicity: An update of pathophysiologic mechanisms.** *Metabolic Brain Disease* 17: 375-387.

- Ochu E.E., Rothwell N.J. y Waters C.M. (1998) **Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells.** *Journal of Neurochemistry* 70: 2637-2640.
- Ogawa N., Tanaka K., Asanuma M., Hawai M., Masumizu T., Koho M. y Mori A. (1994) **Bromocriptine protects mice against 6-hydroxydopamine and scavenges hydroxyl free radicals in vitro.** *Brain Research* 657: 207-213.
- Olanow C.W., y Tatton W.G. (1999) **Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.** *Annual Reviews in Neuroscience* 22:123-144.
- Olanow C.W. (2004) **Manganese-Induced parkinsonism and Parkinson's disease.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012:209-223.
- Orr C.F., Rowe D.B. y Halliday G.M. (2002) **An inflammatory review of Parkinson's disease.** *Progress in Neurobiology* 68:325-340
- Otero-Siliceo E., Abascal-Arias M.R., Alanís-Quiroga M. (1996) **Parkinson enfoque al futuro.** *Fondo de Cultura Económica*, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.
- Oubrahim H., Stadtman E.R. y Chock P.B. (2001) **Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 98: 9505-9510.
- Oyama Y., Okasaki E., Chikaisha L., Nagano T. y Sadakata C. (1996) **Oxidative stress induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-induced increase in oxidative stress: An experimental model using dissociated rat brain neurons.** *Japan Journal of Pharmacology* 72: 381-385.
- Pal P.K., Samii A. y Calne D.B. (1999) **Manganese neurotoxicity: A review of clinical features, imagin and pathology.** *Neurotoxicology* 20(2-3): 227-238.
- Parent A. y Hazrati L.N. (1995) **Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortical-basal ganglia-thalamo-cortical loop.** *Brain Research Reviews* 20: 91-127.
- Pastor P. y Tolosa E. (2001) **La enfermedad de Parkinson: diagnóstico y avances en el conocimiento de la etiología y en el tratamiento.** *Medicina Integral* 37(3): 104-117.
- Pavón N., Vidal L., Blanco L., Álvarez-Fonseca P., Torres-Montoya A., Lorigados L., Álvarez-González L. y Macías R. (1998) **Factores que desencadenan la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas.** *Revista de Neurología* 26 (152): 554-560.
- Penny G.R., Aesharous S. y Kitai S.T. (1986) **The glutamate descarboxylase, leucine-enkepaline, methionine-enkephalin and substantia P Immunoreactive neurons in the neostriatum of the rat and cat: Evidence for partial population overlap.** *Neuroscience* 17(4): 1011-1045.
- Pery T.L., Young V.W. (1986) **Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of the patients.** *Neuroscience Letters* 67: 269-74.
- Ponzoni S., Guimaraes F.S., Del Bel E.A. y Garcia-Cairasco N. (2000) **Behavioral effects of intra-nigral microinjections of manganese chloride: Interaction with nitric oxide.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 24: 307-325.

- Rabin O., Hegedus L., Bourre J.M. y Smith Q.R. (1993) **Rapid brain uptake of manganese (II) across the blood-brain barrier.** *Journal of Neurochemistry* 61(2): 509-517.
- Ramesh G.T., Ghosh D. y Gunasekar P.G. (2002) **Activation of early signalling transcription factor, NF- $\kappa$ B following low-level manganese exposure.** *Toxicology Letters* 136: 151-158
- Ramesh G.T., Manna S.K., Aggarwal B.B. y Jadhav A.L. (1999) **Lead activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B, activator protein-1, and amino-terminal c-Jun kinase in pheochromocytoma cells.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 155(3): 280-286.
- Reiner A., Brauth S.E. y Karten H.J. (1984) **Evaluation of the amniote Basal ganglia.** *Trends in Neuroscience* 7(9): 320-325.
- Reiner A. y Anderson K.D. (1990) **The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: Conclusions based on recent findings.** *Brain Research Reviews* 15: 251-265.
- Rodriguez M.C., Obeso J.A. y Alanow C.W. (1998) **Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection.** *Annals of Neurology* 44(1): S175-S188.
- Roels H. (1997) **Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl<sub>2</sub>, MnO<sub>2</sub>) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats.** *Archives of Toxicology* 71: 223-230.
- Roth J.A., Horbinski C., Feng L., Dolan K.G., Higgins D. y Garrick M.D. (2000) **Differential localization of divalent metal transporter I with and without iron response element in rat PC12 and sympathetic neuronal cells.** *Journal of Neuroscience* 20(20): 7595-7601.
- Roth J.A. y Garrick M.D. (2003) **Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese.** *Biochemical Pharmacology* 66(1):1-13.
- Salehi F., Krewski D., Mergler D., Normandin L., Kennedy G., Philippe S., y Zayed J. (2003) **Bioaccumulation and locomotor effects of manganese phosphate/sulfate mixture in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 191: 264-271
- Saransaari P. y Oja S.S. (2000) **Involvement of metabotropic glutamate receptors in ischemia-induced taurine release in the developing and adult hippocampus.** *Neurochemical Research* 25(8): 1067-1072.
- Sava V., Mosquera D., Song S., Cardozo-Pelaez F. y Sánchez-Ramos J. (2004) **Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons.** *Free Radical Biology and Medicine* 36(9): 1144-1154
- Schapira A.H.V., Cooper J.M. y Dexter D. (1990) **Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.** *Journal of Neurochemistry* 54: 823-827.
- Schwartz J., Giros B., Martres M. y Sokoloff P. (1992) **The dopamine receptor family: Molecular biology and pharmacology.** *Seminars in the Neurosciences* 4(2): 99-108.
- Seeman P. y Niznik. (1990) **Dopamine receptors and transporters in Parkinson disease and schizophrenia: The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal** 4:2737-2744.

- Segura T., Galindo M.F., Rallo-Gutiérrez B., Ceña V. y Jordán J. (2003) **Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas.** *Revista de Neurología* 36 (11): 1047-1057.
- Shepherd G. M. (1996) **The dendritic spine: A multifunctional integrative unit.** *Journal of Neurophysiology* 75(6): 2197-2210.
- Sherer T.B., Betarbet R., Kim J. y Greenamyre J.T. (2003) **Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease.** *Neuroscience Letters* 341: 87-90.
- Shimizu K., Ohtaki K., Matsubara K., Aoyama K., Uezono T., Saito O., Suno M., Ogawa N. Hayase N., Kimura K. y Shiono H. (2001) **Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat.** *Brain Research* 906: 135-142.
- Shimohama S., Sawada H., Kitamura Y. y Taniguchi T. (2003) **Disease model: Parkinson's disease.** *Trends in Molecular Medicine* 9(8): 360-365.
- Shukakidze A., Lazriev I. y Mitagvariya N. (2003) **Behavioral Impairments in Acute and Chronic Manganese Poisoning in White Rats.** *Neuroscience and Behavioral Physiology* 33(3): 263-267.
- Sidhu A. (1998) **Coupling of D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> dopamine receptors to multiple G proteins.** *Molecular Neurobiology* 16 (2): 125-134.
- Singer T.P., Castagnoli N. Jr., Ramsay R.R. y Trevor A.J. (1987) **Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.** *Journal of Neurochemistry* 49: 1-8.
- Sivam S.P., Breese J.R., Krause J.E., Napier T.C., Mueller R.A. y Hong J.S. (1987) **Neonatal and adult 6-hydroxydopamine-induced differentially alter tachkinin and enkephalin gene expression.** *Journal of Neurochemistry* 49: 1623-1633.
- Sloot W.N., vander Sluijs-Gelling A.J. y Gramsbergen J.B.P. (1994) **Selective lesions by manganese and extensive damage by iron after injection into rat striatum or hippocampus.** *Journal of Neurochemistry* 62: 205-216.
- Smith Y. y Parent, A. (1988) **Neurons of the subthalamic nucleus in primates display glutamate but not GABA immunoreactivity.** *Brain Research* 453: 353-356.
- Smith Y., Bevan M.D., Shink E. y Bolam J.P. (1998) **Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia.** *Neuroscience* 86 (2): 353-387.
- Sotogaku N., Oku N. y Takeda A. (2000) **Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection.** *Journal Neuroscience Research* 61: 350-356.
- Soto-Otero R., Mendez-Alvarez E., Herminda-Ameijeiras A., Muñoz-Patiño A.M. y Labandeira-García J.L. (2000) **Autoxidation and neurotoxicity of 6-H-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: Potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease.** *Journal of Neurochemistry* 74: 1605-1612.

- Spencer T.S., Parker W.D. y Bennet J. (1994) **L-Dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity?** *Neuroreport* 5: 1009-1011.
- Spranger M., Schwab S., Desiderato S., Bonmann E., Krieger D. y Fandrey J.(1998) **Manganese augments nitric oxide synthesis in murine astrocytes: A new pathogenetic mechanism in manganism?.** *Experimental Neurology* 149: 277-283.
- Spooren W., Gentsch C. y Wiessner C. (1998) **TUNEL-positive cells in the substantia nigra of C57BL/6 mice after a single bolus of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.** *Neuroscience* 85: 649-651.
- Stanic D., Parish C.L., Zhu W.M., Krstew E.V., Lawrence A.J., Drago J.,Finkelstein D.I. y Horne M.K. (2003) **Changes in function and ultrastructure of striatal dopaminergic terminals that regenerate following partial lesions of the SNc.** *Journal of Neurochemistry* 86: 329-343.
- Takai N., Nakamishi H., Tanabe K., Nishioku T., Sugiyama T., Fujiwara M. y Yamamoto K (1998) **Involvement of caspase-like proteinases in apoptosis of neuronal PC12 cells and primary cultured microglia induced by 6-hydroxydopamine.** *Journal of Neuroscience Research* 54: 214 -222.
- Takeda A., Ishiwatari S. y Okada S. (1998a) **Manganese concentration in the rat brain: Manganese transport from the peripheral tissues.** *Neuroscience Letters* 242(1): 45-48.
- Takeda A., Kodama Y., Ishiwatari S. y Okada S. (1998b) **Manganese transport in the neural circuit of rat CNS.** *Brain Research Bulletin* 45(2): 149-152.
- Takeda A., Ishiwatari S. y Okada S. (1999) **Manganese uptake into rat brain during development and aging.** *Journal of Neuroscience Research* 56(1): 93-98.
- Takeda A., Ishiwatari S. y Okada S. (2000) **Influence of transferrin on manganese uptake in rat brain.** *Journal of Neuroscience Research* 59(4): 542-552.
- Takeda A., Sotogaku N. y Oku O. (2002) **Manganese influences the levels of neurotransmitters in synapses in rat brain.** *Neuroscience* 114(3): 669-674.
- Takeda A. (2003) **Manganese action in brain function.** *Brain Research Reviews* 41: 79-87.
- Talpade D.J., Greene J.G., Higgins D.S. y Greenamyre J.T. (2000) **In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenona.** *Journal of Neurochemistry* 75: 2611-2621.
- Tanner C.M. y Langton J.W. (1990) **Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review.** *Neurology* 40: 17-30.
- Tapin D., Kennedy G. y Zayed J. (2006) **Bioaccumulation and locomotor effects of manganese sulfate in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 211: 166-174.

- Tatton N.A. y Kish S.J. (1997) **In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining.** *Neuroscience* 77: 1037-1048.
- Thoenen H. y Tranzer J.P. (1973) **The Pharmacology of 6-Hydroxydopamine.** *Annual Review of Pharmacology* 13: 169-180
- Tjälve H., Henriksson J., Tallkvist J., Larsson B.S. y Lindquist N.G. (1996) **Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathway in rats.** *Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology* 79(6): 347-356.
- Tjälve H. y Henriksson J. (1999) **Uptake of metals in the brain via olfactory pathways.** *Neurotoxicology* 20(2-3): 181-195.
- Tomas-Camardiel M., Herrera A.J., Venero J.L., Cruz Sanchez-Hidalgo M., Cano J. y Machado A. (2002) **Differential regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats.** *Molecular Brain Research* 103: 116-129.
- Tornero D., Ceña V., González-García C. y Jordán J. (2002) **Papel del poro de permeabilidad transitorio mitocondrial en los procesos neurodegenerativos.** *Revista de Neurología* 35 (4): 354-361.
- Trabace L. y Kendrick K.M. (2000) **Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation.** *Journal of Neurochemistry* 75: 1664-1674.
- Ueda F., Raja K.B., Simpson R.J., Trowbridge I.S. y Bradbury M.W. (1993) **Rate of <sup>59</sup>Fe uptake into the brain and cerebrospinal fluid and the influence thereon of antibodies against the transferrin receptor.** *Journal of Neurochemistry* 60(1): 106-113.
- Uhl G.R., Hedreen J.C. y Price D.L. (1985) **Parkinson's disease: Loss of neurons from ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesion.** *Neurology* 35: 1215-1218.
- Ungerstedt U. (1968) **6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoaminergic neurons.** *European Journal Pharmacology* 5: 107-110.
- Ungerstedt U. (1971) **Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed birotational behavior.** *Acta Physiologica Scandinavica Sup.* 367: 69-93.
- Urushitani M., Nakamizo T., Inoue R., Sawada H., Kihara T., Honda K., Akaike A. And Shimohama S. (2001) **N-Metil-D-Aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca<sup>2</sup> overload in acute excitotoxic motoneurons death: A mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca<sup>2+</sup> influx.** *Journal of Neuroscience Research* 63: 377-387.
- Vettori M.V., Gatti R., Orlandini G., Belletti S., Alinovi R., Smargiassi A. y Mutti A. (1999) **An *in vitro* model for assessment of manganese neurotoxicity.** *Toxicology in vitro* 13: 931-938.
- Vezér T., Papp A., Hoyk Z., Varga C., Náráy M. y Nagymajtényi L. (2005) **Behavioral and neurotoxicological effects of subchronic manganese exposure in rats.** *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 797-810.

- Wadhvani K.C., Murphy V.A., Smith Q.R. y Rapoport S.I. (1992) **Saturable transport of manganese (II) across blood-nerve barrier of rat peripheral nerve.** *American Journal of Physiology* 262(2): 284-288.
- White L.E., Hodges H.D., Carnes K.M., Price J.L. y Dubinsky J.M. (1994) **Colocalization of excitatory and inhibitory neurotransmitter markers in striatal projection neurons in the rats.** *The Journal of Comparative Neurology* 339: 328-340.
- Wichmann T. y DeLong M.R. (1993) **Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities.** En: Narabayashi, H.; Nagatsu, T., Yanagisawa, N. y Mizuno, Y. (Eds) *Advances in Neurology* Vol. 60, Raven Press, Ltd. New York.
- Wilson J.C. (1998) **The basal ganglia.** In: Gordon M. Shepard (Ed.) *The synaptic organization of the brain.* Fourth edition. Oxford University Press. New York. pp. 329-375.
- Winn P. (1991) **Excitotoxins as tools for producing brain lesions.** En: Conn, P.M. (Comp) *Lesion and transplants. Methods in Neurosciences* Vol. 7 Academic Press Inc.
- Witholt R., Gwiazada, R.H. y Smith D.R. (2000) **The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism.** *Neurotoxicology and Teratology* 22: 851-861.
- Yeung K.C., Rose D.W., Dhillon A.S., Yaros D., Gustafsson M., Chatterjee D., McFerran B., Wyche J., Kolch W. y Sedivy J.M. (2001) **Raf Kinase Inhibitor Protein Interacts with NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase and TAK1 and Inhibits NF- $\kappa$ B Activation.** *Molecular and Cell Biology* 21(21): 7207-7217.
- Yu S.P., Canzoniero L.M., Choi D.W. (2001) **Ion homeostasis and apoptosis.** *Current Opinion in Cell Biology* 13: 405-411.
- Yurek D.M. y Sladek J.R. (1990) **Dopamine cell replacement: Parkinson's disease.** *Annual Reviews in Neuroscience* 13: 415-440.
- Yuste R. y Bonhoeffer T. (2004) **Genesis of dendritic spines: Insights from ultrastructural and imaging studies.** *Nature Review in Neuroscience* 5: 24-34.
- Zhang S., Fu J. y Zhou Z. (2004) **In vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain.** *Toxicology in Vitro* 18: 71-77
- Zlotkin S.H., Atkinson S. y Lockitch (1995) **Trace elements in nutrition for premature infants.** *Clinics in Perinatology* 22: 223-240.