



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS**

**EFEECTO DEL MANGANESO SOBRE LA
ACUMULACIÓN CEREBRAL DE AMONIO Y
GLUTAMINA DURANTE EL DAÑO HEPÁTICO EN
RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

Q.F.B. SUSANA YESENIA RIVERA MANCÍA

**TUTOR: DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA
COMITÉ TUTORAL:
DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ
DRA. LUZ NAVARRO ANGULO**



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.

Agradecimientos

Al CONACYT por el apoyo otorgado a este trabajo con la beca 203330 y el proyecto 51541.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por las facilidades brindadas para el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Camilo Ríos y al Dr. Sergio Montes por su valiosa asesoría.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Rolando Hernández Muñoz y la Dra Luz Navarro Angulo por sus valiosos comentarios y aportaciones.

Al Dr. Pablo Muriel y su equipo (Mario, Ramón y Benjamín) por las facilidades otorgadas para la realización de parte de los experimentos de este proyecto en su laboratorio.

A los Doctores Ana María López Colomé, Mauricio Díaz Muñoz, María Concepción Gutiérrez Ruiz y Claudia González Espinosa por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis.

A la Dra. Maricela Méndez Armenta por su apoyo técnico.

A los miembros del Departamento de Neuroquímica del INNN por sus contribuciones a este trabajo.

A la M. en C. Yessica Heras Romero del bioterio del INNN por su apoyo para la realización de este proyecto.

Al Sr. Maurilio por su gran apoyo para que tuviera siempre material de laboratorio limpio.

A Blanca Huerta y Azucena Ayala por su trato amable en la realización de mis trámites.

Dedicatoria

A la vida, por rodearme de seres maravillosos que me han inspirado y motivado a lo largo de los años para llegar a este punto.

A Carlos, el amor de mi vida. Gracias por tu apoyo, comprensión y gran amor.

A mis padres por enseñarme los valores del respeto, la tolerancia, el compromiso y la perseverancia y muchas otras cosas más; por su apoyo y su amor a lo largo de mi vida. Mamá, gracias por ser el ángel que me cuida desde el cielo.

A mis hermanos, por todo lo que hemos compartido y por todas esas palabras y actos que me motivaron a seguir.

A mis amigos del Departamento de Neuroquímica del INNN, por su apoyo y por hacer de estos años una muy agradable parte de mi vida.

A la UNAM por la gran oportunidad que me brindó.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	5
3. Marco teórico	8
3.1. Cirrosis	8
3.2. Encefalopatía hepática como complicación de la cirrosis	9
3.3. Ciclo glutamato-glutamina	12
3.4. Manganeso	14
3.4.1. Transporte de manganeso	15
3.4.2. Acumulación de manganeso en la cirrosis	20
3.5. Amonio	23
3.5.1. Transporte de amonio	23
3.5.2. Acumulación de amonio en la cirrosis	25
3.6. Edema cerebral en la encefalopatía hepática	27
4. Justificación	32
5. Antecedentes	33
6. Hipótesis	34
7. Objetivos	34
8. Material y métodos	35
8.1. Primera parte	35
8.1.1. Animales e inducción del daño hepático	35
8.1.2. Pruebas de funcionamiento hepático (PFH) y determinación de colágena	36
8.1.3. Histología (cerebro)	36
8.1.4. Histología (hígado)	37
8.1.5. Determinación de Mn	37
8.1.6. Análisis estadístico	37

8.2. Segunda parte	37
8.2.1. Animales y tratamientos	37
8.2.2. Determinación de Mn	38
8.2.3. Determinación de amonio	39
8.2.4. Contenido de agua	39
8.2.5. Cuantificación de glutamina cerebral	40
8.2.6. Prueba de Rotarod	40
8.2.7. Análisis estadístico	41
9. Resultados	42
10. Discusión	62
11. Conclusiones	75
12. Referencias	76
13. Apéndice. Diseño factorial: Análisis de varianza	87
14. Publicaciones	91

Abreviaturas

α -KG	α -cetoglutarato
α -KGDH	α -cetoglutarato deshidrogenasa
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ALT	Alanina aminotransferasa
ANDEVA	Análisis de varianza
BHE	Barrera hematoencefálica
CAT	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DMT1	Transportador de metales divalentes 1
EEM	Error estándar de la media
EH	Encefalopatía hepática
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FA	Fosfatasa alcalina
Ferroportina	Fpn
g.e.	Gravedad específica
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GGT	γ -glutamilttransferasa
Gln	Glutamina
H&E	Hematoxilina y eosina
IRM	Imagenología de resonancia magnética
LCB	Ligadura del conducto biliar
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido reducido
NKCC	Transportador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$
PDH	Piruvato deshidrogenasa
RhBG	Glucoproteína Rhesus B
RhCG	Glucoproteína Rhesus C
rpm	Revoluciones por minuto
Tf	Transferrina
UPDRS	Escala de clasificación unificada de la enfermedad de Parkinson

1. Resumen

La cirrosis es un problema de salud mundial que frecuentemente se complica a encefalopatía hepática, un síndrome que incluye diversas alteraciones neuropsiquiátricas. Los síntomas de esta complicación están asociados con la acumulación de sustancias en el cerebro, que el hígado cirrótico no puede tratar adecuadamente. Dentro de estas sustancias destacan el manganeso y el amonio, por afectar las funciones astrocíticas y, en consecuencia, las neuronales. Recientemente se planteó la posibilidad de que el manganeso y el amonio podrían actuar sinérgicamente en el desarrollo de los signos y síntomas asociados con la encefalopatía hepática.

Algunas de las características más importantes de la encefalopatía hepática son la presencia de astrocitosis Alzheimer tipo II, la acumulación de manganeso, amonio y glutamina en el cerebro, el edema cerebral y alteraciones motoras, entre otras.

Este estudio se realizó empleando un modelo de daño hepático inducido por ligadura del conducto biliar en ratas, para evaluar la participación del Mn en el desarrollo de algunos signos y síntomas presentes en la encefalopatía hepática. En la primera parte se evaluó la presencia de astrocitosis Alzheimer tipo II después de dos y cuatro semanas de obstrucción biliar y la influencia del manganeso, administrado en el agua de bebida, sobre dichos cambios morfológicos. Se estimó el número de astrocitos alterados y totales en la corteza, estriado y *globus pallidus* por campo óptico y se midieron los niveles de manganeso en estas mismas áreas cerebrales. Se obtuvieron diferencias significativas en el número de astrocitos alterados por efecto del daño hepático pero no por efecto de la exposición a manganeso.

En la segunda parte, se desarrolló un modelo para evaluar las posibles interacciones entre el manganeso y el amonio en el cerebro de ratas con daño hepático sobre diversos parámetros involucrados en la patogénesis de la encefalopatía hepática. Al igual que en la primera parte, se realizó la ligadura del conducto biliar y se administró

el manganeso en el agua de bebida, agregando al modelo una dieta alta en amonio (20% p/p acetato de amonio). Las diferentes combinaciones de los tres factores (daño hepático, manganeso y amonio) produjeron ocho grupos experimentales que se analizaron mediante un ANDEVA de tres vías.

Los resultados obtenidos mostraron que el amonio no influyó sobre la acumulación de manganeso; sin embargo, y como uno de los principales hallazgos del trabajo, el manganeso sí modificó los niveles de amonio al resultar significativa la interacción daño hepático-manganeso para este parámetro. Los niveles de glutamina también aumentaron significativamente por esta interacción. Además, se obtuvo correlación positiva entre la concentración de glutamina y el contenido de agua cerebral. En las ratas cirróticas el amonio y el manganeso afectaron la coordinación motora.

Aunque el manganeso no mostró efectos significativos sobre la morfología astrocítica bajo las condiciones del estudio es posible que, además de los efectos que produce por sí mismo, actúe como un potenciador de los efectos producidos por el amonio, al favorecer su acumulación y la de glutamina.

Actualmente, la gran mayoría de estrategias para mejorar la sintomatología y consecuencias de la encefalopatía hepática están enfocadas a disminuir los niveles de amonio. De acuerdo a los resultados que arrojó este estudio, sería conveniente considerar el ajuste del manganeso en la dieta de los pacientes cirróticos.

Summary

Liver cirrhosis is a worldwide health problem that is frequently complicated to hepatic encephalopathy, a syndrome including several neuropsychiatric alterations. Hepatic encephalopathy symptoms are associated with the accumulation of substances that cirrhotic liver cannot adequately manage. Manganese and ammonia are particularly important substances in this pathology, because they accumulate in high concentrations in the brain, affecting astrocytic function and, consequently, neuronal action. The possibility of manganese and ammonia acting synergistically in the development of signs and symptoms associated with hepatic encephalopathy was recently proposed.

Alzheimer type II astrocytosis, manganese, ammonia and glutamine brain accumulation, brain edema and motor alterations are some of the most important characteristics of hepatic encephalopathy.

This study was carried out by using a model of bile duct ligation-induced liver damage in rats, in order to evaluate the role of manganese in the development of some signs and symptoms of hepatic encephalopathy. In the first part, the presence of Alzheimer type II astrocytosis was evaluated after two or four weeks of bile duct obstruction and the influence of manganese, administered in the drinking water, on such morphological changes was also evaluated. The number of altered and total astrocytes by optical field in cortex, striatum and globus pallidus was estimated and manganese levels in the same areas were measured. Significant differences in the number of altered astrocytes were associated with liver damage but not with manganese exposure.

In the second part, a model to evaluate the possible interactions between manganese and ammonia in the brain of cirrhotic rats on diverse parameters involved in the pathogenesis of hepatic encephalopathy was developed. As in the first part, bile duct ligation was carried out and manganese was administered in the drinking water, plus a high ammonia diet (20% ammonium acetate w/w). The combination of the three factors

(liver damage, manganese and ammonia) resulted in eight experimental groups, which were analyzed by a three-way ANOVA design.

Ammonia did not influence manganese accumulation; however, and as one of the main findings of this work, manganese modified ammonia levels, as the liver damage-manganese interaction resulted statistically significant. Glutamine levels also increased significantly because of this interaction. Furthermore, a positive correlation between glutamine and brain water was obtained. In cirrhotic rats, ammonia and manganese affected motor coordination.

Although manganese did not show significant effects on astrocytic morphology under this study conditions, it is possible that, besides the effects produced by itself, it acts as an enhancer of the effects produced by ammonia, favoring its accumulation and also glutamine accumulation.

Currently, most strategies aimed to improve the symptoms and consequences of hepatic encephalopathy focus on reducing ammonia levels. According to the results obtained in the present study, it would be convenient for cirrhotic patients to control its manganese intake.

2. Introducción

La cirrosis hepática es una de las causas más comunes de muerte en el mundo, principalmente en personas en edad productiva (Bosetti et al., 2007). Un gran número de pacientes cirróticos (50-70%) pueden desarrollar encefalopatía hepática (EH) (Quero y Schalm, 1996), un síndrome complejo que incluye un amplio rango de alteraciones neuropsiquiátricas que van desde mínimos cambios en la personalidad y en los patrones del sueño y alteraciones motoras hasta el coma profundo y la muerte (Aguilar et al., 2008). Morfológicamente la EH se manifiesta con cambios astrocíticos conocidos como astrocitosis Alzheimer tipo II (Butterworth, 2003).

Estas alteraciones parecen estar asociados con diversas sustancias que se acumulan en el cerebro como consecuencia de las alteraciones en la función hepática. Dentro de estas sustancias el manganeso (Mn^*) y el amonio⁺ son particularmente relevantes (Jalan et al., 2003).

Es posible que el amonio y el Mn tengan efectos sinérgicos en la EH, como sugieren algunos estudios realizados *in vitro* que muestran que el Mn y el amonio producen efectos similares en los astrocitos (Rao y Norenberg, 2007).

Todos estos aspectos se describen con más detalle en el marco teórico de esta tesis, comenzando por un panorama de la importancia de la cirrosis y algunas de sus características, seguido de una descripción de la EH como una de sus principales complicaciones, continuando con el ciclo glutamato-glutamina como una parte fundamental del metabolismo cerebral del amonio. Posteriormente, se describe al Mn y al amonio como las principales sustancias tóxicas implicadas en el desarrollo de los signos y síntomas de la EH y, finalmente, se comenta sobre el edema cerebral como una de las complicaciones más severas en la EH.

* Debido a que se desconoce cuál es la especie química responsable de los efectos del manganeso en el sistema nervioso se utilizará el símbolo Mn para hacer referencia indistintamente a Mn^{+2} y Mn^{+3} . Sólo cuando se conozca la especie química que interviene en un proceso determinado se indicará su valencia.

⁺ Se utilizará indistintamente el término amonio para referirse a ambas especies químicas, NH_3 y NH_4^+ , a menos que se especifique.

En el presente trabajo se evaluó el papel del Mn en el desarrollo de astrocitosis Alzheimer tipo II así como la posibilidad de efectos sinérgicos entre este metal y el amonio sobre diversos parámetros implicados en la patogénesis de la EH, como son la acumulación de Mn, amonio y glutamina (Gln), el contenido de agua en el cerebro, así como la coordinación motora. Para ello se indujo daño hepático por ligadura del conducto biliar en ratas y se trabajó en la construcción de un modelo en el que estuvieran presentes al mismo tiempo los tres factores más relevantes que se consideran como desencadenantes de la EH: daño hepático, acumulación de Mn y acumulación de amonio. La acumulación cerebral de Mn se indujo por medio de la administración de $MnCl_2$ en el agua de bebida y la acumulación de amonio mediante la administración de acetato de amonio en los pellets de alimento.

La evaluación de la astrocitosis de Alzheimer tipo II se llevó a cabo realizando un conteo celular en tres regiones cerebrales, corteza, estriado y *globus pallidus*, y se midieron los niveles de Mn en dichas áreas para valorar la existencia de una relación causa-efecto entre la acumulación de Mn y cambios morfológicos en los astrocitos.

En la evaluación de las interacciones entre daño hepático, Mn y amonio se midieron los niveles cerebrales de Mn, amonio y Gln y se valoró la presencia de alteraciones en la coordinación motora con la prueba de rotarod.

El análisis estadístico utilizado en la primera parte, correspondiente a la evaluación de la astrocitosis Alzheimer tipo II consistió en un ANDEVA de dos vías, mientras que para el análisis de las interacciones entre el daño hepático, el amonio y el Mn se empleó un ANDEVA de tres vías (al final se encuentra un apéndice con una breve explicación del análisis estadístico).

En la discusión de los resultados se resaltan los aspectos más relevantes y que sirvieron como base para establecer las conclusiones y recomendaciones que se muestran en la sección 11.

A partir de este trabajo se publicaron dos artículos, un original y uno de revisión, además de un artículo que se encuentra en proceso de evaluación. Los artículos publicados se muestran al final de este escrito.

3. Marco teórico

3.1. Cirrosis

La cirrosis es una de las principales causas de muerte en el mundo, principalmente en personas en edad productiva. En estadísticas reportadas por Bosetti et al. (2007) la mortalidad por cirrosis en nuestro país fue de 50-60/100,000 en hombres y de 10/100,000 en mujeres por año en el periodo de 1970 a 1995. El subanálisis a edades de 35-64 años mostró que la mortalidad fue de alrededor de 120/100,000 en hombres y de alrededor de 30/100,000 en mujeres (Fig. 1). Lo anterior ubicó a nuestro país entre los primeros lugares de mortalidad por cirrosis en el mundo. En 2008, de acuerdo a estadísticas del INEGI las enfermedades hepáticas se encontraban como la segunda causa de muerte en nuestro país en personas de 15 a 64 años (INEGI y Secretaría de Salud, 2008).

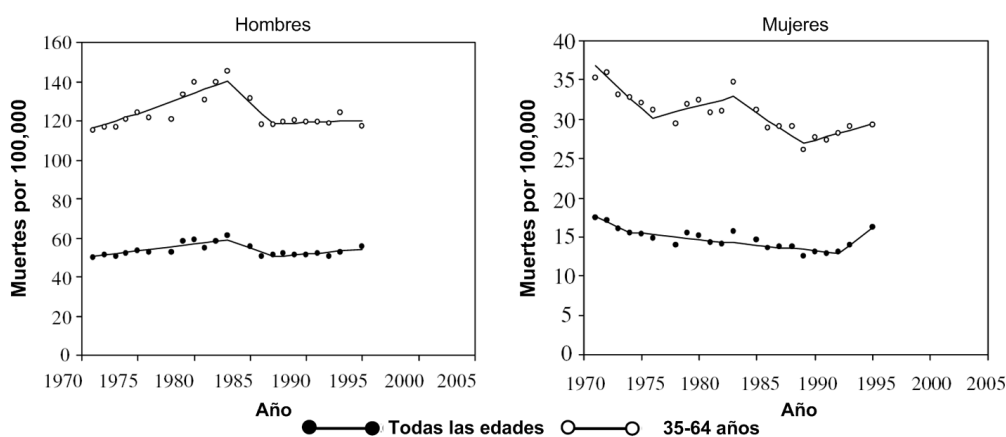


Fig. 1. Mortalidad por cirrosis en México (Tomado de Bosetti et al. 2007).

La cirrosis es una condición progresiva en la que se daña la arquitectura normal del hígado (Butterworth, 2003) y sus causas más comunes son el alcoholismo, la hepatitis C crónica y la obesidad, con la concomitante enfermedad de hígado graso no alcohólico (Crawford, 2005).

Aproximadamente 40% de los pacientes con cirrosis son asintomáticos, y la condición se descubre con frecuencia durante un examen de rutina, con estudios de laboratorio o radiográficos o durante la autopsia pues, en la mayoría de personas, 80 a 90% del

parénquima hepático debe estar destruido antes de que la falla hepática se manifieste clínicamente (Heidelbaugh y Bruderly, 2006).

La cirrosis temprana y bien compensada puede manifestarse con anorexia y pérdida de peso, debilidad, fatiga e incluso osteoporosis como resultado de malabsorción de vitamina D. La enfermedad descompensada puede resultar en complicaciones como ascitis, peritonitis bacteriana espontánea, EH y hemorragias de las várices por hipertensión portal (Heidelbaugh y Bruderly, 2006).

La cirrosis se caracteriza anatómicamente por nódulos rodeados de tejido fibroso (Hillaire y Voitot, 1999). La fibrosis excesiva altera la arquitectura y la función hepática (Brenner et al., 2000), pues el hígado está involucrado en casi todos los aspectos del metabolismo. El hígado es el principal órgano responsable de la detoxificación de compuestos tanto endógenos como exógenos (Chrzanowska et al., 2009), ya sea por metabolismo o excreción. De modo que, al estar alteradas estas funciones, se acumulan diversas sustancias en el organismo, dentro de las cuales son de particular importancia el amonio y el Mn (Butterworth, 2008).

3.2. Encefalopatía hepática como complicación de la cirrosis

La mayoría de pacientes con cirrosis hepática desarrollan por lo menos un episodio de EH durante el curso de la enfermedad (Johansen et al., 2007). La EH es un síndrome neuropsiquiátrico complejo que incluye desde alteraciones en la personalidad, en las funciones motoras e intelectuales, en la coordinación neuromuscular y en la conciencia, hasta edema cerebral y muerte; aunque existen también formas subclínicas de encefalopatía que se presentan sólo con ligero daño a la función intelectual (Wright et al., 2007; Aguilar et al., 2008).

La prevalencia reportada de la EH depende de los métodos de diagnóstico usados y de la población estudiada; puede ser hasta 50-70% de los pacientes cirróticos, si los

defectos psicométricos se incluyen en la definición diagnóstica de la EH (Quero y Schalm, 1996).

La EH, muy probablemente, es consecuencia de la acumulación de sustancias tóxicas en el cerebro como resultado del daño hepático. El amonio se destoxifica normalmente a través del ciclo de la urea, que se encuentra disminuido debido al daño al parénquima hepático (Chrzanowska et al., 2009). Por otro lado, el Mn se excreta normalmente en la bilis (Schroeter et al., 2011) y su excreción se afecta por la colestasis que acompaña a la degeneración hepática. De manera que, tanto los niveles de amonio como los de Mn aumentan en el organismo. Algunos otros factores precipitantes de EH son hiponatremia, el uso de sedantes, trauma e inflamación (Norenberg et al., 1997; Häussinger et al., 2000).

Los síntomas motores de la EH están asociados con alteraciones en los circuitos neuronales entre los ganglios basales y la corteza frontal (Weissenborn y Kolbe, 1998; Amodio et al., 2004). Los ganglios basales parecen ser las áreas más afectadas en la EH, hecho que parece tener influencia negativa en el circuito ganglios basales-tálamo-corteza (Deniau et al., 1994; Kha et al., 2001; Montaron et al., 1996; Timmerman y Westerink, 1997), lo que podría explicar algunas de las alteraciones motoras en la EH. La EH puede ocurrir tanto en pacientes con enfermedad aguda del hígado como en aquellos con enfermedad crónica. Los diferentes aspectos etiológicos de la EH se reflejan en una nomenclatura que divide a la EH en los tipos A (asociada con falla hepática aguda), B (asociada con derivación portosistémica) y C (asociada con cirrosis hepática) (Ferenci et al., 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de encefalopatía hepática

Tipo de EH	Nomenclatura	Subcategoría	Subdivisión	Características histopatológicas
A	Encefalopatía asociada con falla hepática aguda.			Hinchamiento de los astrocitos y edema citotóxico (conduce a herniación cerebral e hipertensión intracraneal).
B	Encefalopatía asociada con derivación portal-sistémica sin enfermedad hepatocelular intrínseca.			Edema de bajo grado y astrocitosis de Alzheimer tipo II, caracterizada por hinchamiento del núcleo celular, marginación de la cromatina y acumulación de glucógeno
C	Encefalopatía asociada con cirrosis e hipertensión portal o derivación portal-sistémica.	EH episódica	Precipitada	
			Espontánea	
			Recurrente	
		EH persistente	Moderada	
			Severa	
EH mínima	Dependiente de terapia			

La clasificación que se muestra es la acordada durante el 11vo. Congreso Mundial de Gastroenterología de 1998. Modificado de Ferenci et al., 2002 con datos de Córdoba et al., 2001.

Actualmente, el tratamiento de la EH incluye la identificación y remoción de los factores precipitantes y reducción de la carga de nitrógeno desde el intestino. La terapia está dirigida a la mejora del estado mental evitando la absorción de amonio desde el intestino con lactulosa vía oral o con enemas (Heidelbaugh y Sherbondy, 2006). En pacientes refractarios al tratamiento con lactulosa sola se adiciona neomicina (Strauss et al., 1992).

3.3. Ciclo glutamato-glutamina

Los astrocitos llevan a cabo diversas funciones esenciales para la actividad neuronal normal, incluyendo la captura de Glu y la liberación de Gln, mantenimiento del equilibrio iónico y transporte de agua (Erikson y Aschner, 2006).

El cerebro no cuenta con la maquinaria enzimática para realizar el ciclo de la urea y eliminar el amonio por esta vía, y son los astrocitos los que llevan a cabo esta función al representar el compartimiento celular predominante en la expresión de glutamina sintetasa (GS) en el cerebro (Martinez-Hernandez et al., 1977).

La reacción llevada a cabo por la GS para formar Gln a partir de glutamato y amonio por amidación, es cuantitativamente la forma más importante para disponer del exceso de amonio en el cerebro de los mamíferos (Albrecht et al., 2010). La GS se localiza de manera selectiva en los astrocitos (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979). Además, la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) mitocondrial (tanto en neuronas como en astrocitos) puede funcionar hasta cierto sentido para el mismo propósito al fijar amonio para formar glutamato a partir de α -cetoglutarato por amidación reductiva (Yudkoff, 2006).

Los astrocitos capturan el 80% del glutamato desde la sinapsis a través de transportadores de glutamato. El transportador de glutamato/aspartato (GLAST) y el transportador de glutamato (GLT-1) son abundantes en los astrocitos. Dentro de los astrocitos, por acción de la GS, el Glu se convierte a Gln. La GS es una proteína

octamérica que puede contener hasta 8 átomos de Mn^{+2} por octámero y se considera que contiene aproximadamente el 80% del Mn que se encuentra en el cerebro (Wedler y Denman, 1984). La Gln sale de los astrocitos a través de diversos sistemas de transporte (Fig. 2). Posteriormente, las neuronas capturan la Gln y la convierten a Glu por acción de la glutaminasa activada por fosfato (PAG) (Deng et al., 2009) (Fig. 2).

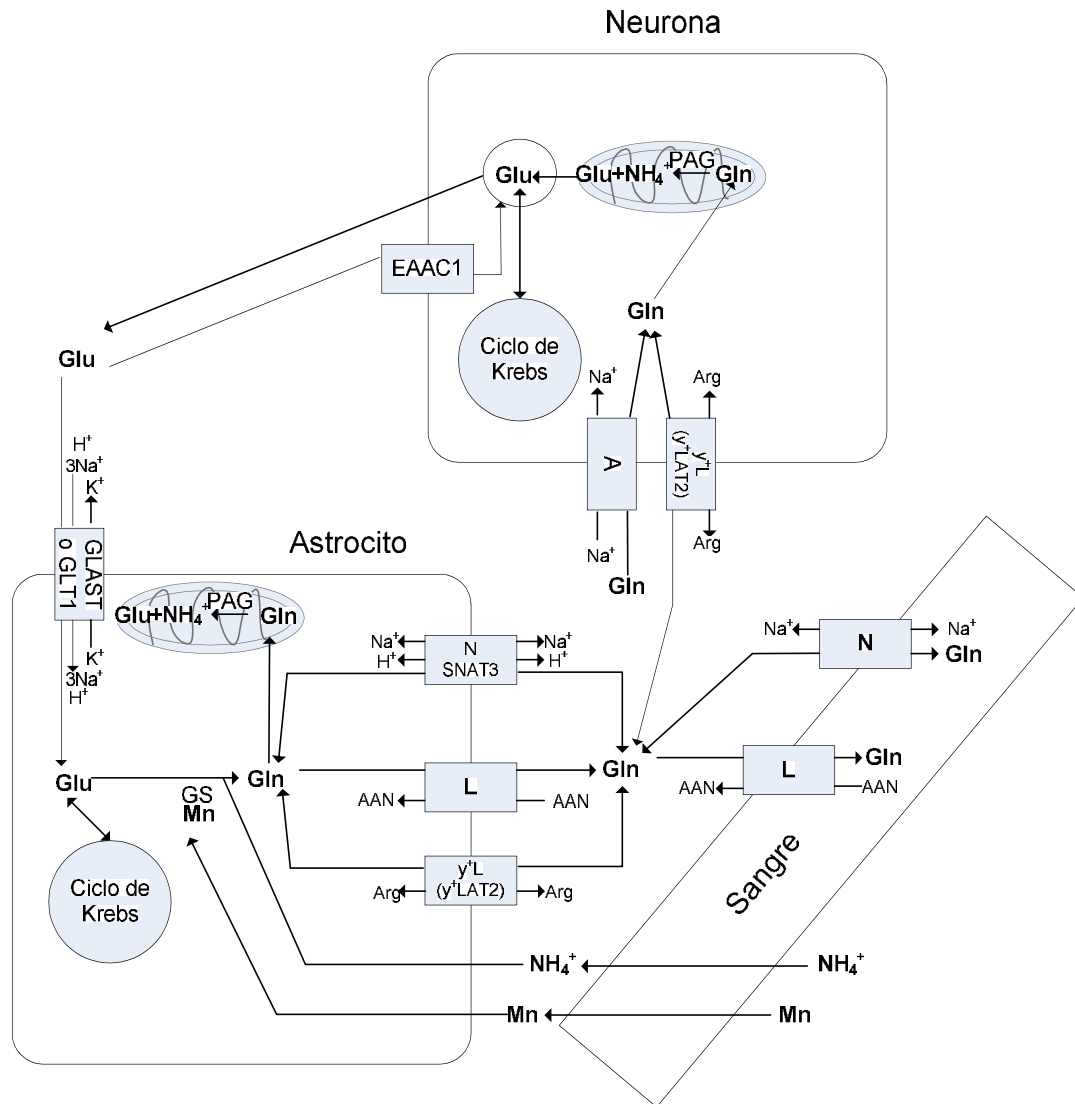


Fig. 2. Ciclo glutamato-glutamina. Los astrocitos capturan el glutamato liberado en las sinapsis a través de los transportadores GLAST (transportador de glutamato y aspartato) y GLT1 (transportador de glutamato). El glutamato (Glu) se convierte a glutamina (Gln) en una reacción catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS). La Gln se libera al espacio extracelular por medio de los sistemas de transporte N, L y γ^L . Las neuronas pueden capturar a la Gln por medio de los sistemas A y γ^L . En las mitocondrias tanto de neuronas (mayoritariamente) como de astrocitos la PAG (glutaminasa activada por fosfato) convierte la Gln en glutamato. La Gln puede ser liberada al torrente sanguíneo por los sistemas L o N. Las neuronas pueden recapturar al Glu por medio del EAAC1 (transportador de aminoácidos excitatorios).

El ciclo glutamato-glutamina juega un papel fundamental en la neurotransmisión, pues cualquier alteración en este ciclo puede conducir a daños en la transmisión glutamatérgica y gabaérgica, con las consecuentes alteraciones funcionales (Cauli et al., 2006). Algunos autores sugieren que la EH puede ser consecuencia, en gran medida, de una transmisión glutamatérgica alterada (Felipo y Butterworth, 2002). En un modelo de anastomosis portocava se encontró que la hipolocomoción observada podría ser el resultado de un incremento en el glutamato extracelular, como consecuencia de la reducción en la expresión de los transportadores GLT-1 y EAAC-1 (Cauli et al., 2006).

3.4. Manganeso

El Mn se encuentra tanto en compuestos orgánicos como en inorgánicos. Los compuestos orgánicos del Mn se utilizan como aditivos en los combustibles (tricarbonilo de metilciclopentadienilmanganeso, MMT), fungicidas (maneb y mancozeb) y como agentes de contraste en imagenología de resonancia magnética (IRM) (Santamaria et al., 2007). El consumo diario recomendado de Mn es de 2.3 y 1.8 mg/kg para hombres y mujeres respectivamente (Sistrunk et al., 2007).

El Mn es un elemento traza, componente de enzimas clave en el sistema SNC, como la GS, la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) y la piruvato carboxilasa (Gonzalez-Zulueta et al., 1998; Keen et al., 2000; McCord, 1976; Wedler y Denman, 1984).

Aunque la intoxicación por Mn es más frecuente que su deficiencia, ambas son perjudiciales para el organismo. La exposición a Mn, principalmente como partículas de polvo, se asocia con efectos a nivel respiratorio, reproductivo y neurológico (Iregren, 1999).

La principal vía fisiológica para la absorción de Mn es el tracto gastrointestinal (Au et al., 2008). La absorción a través de los pulmones es importante a nivel ocupacional

(Levy y Nassetta, 2003). Las principales formas de exposición ocupacional a Mn son la producción de baterías secas, la fabricación de acero y aluminio, la soldadura, la fundición, la minería y el uso de fungicidas derivados de Mn (Keen et al., 2000; Myers et al., 2003; Myers et al., 2009; Park et al., 2009). Otras situaciones que conducen a toxicidad por Mn son la nutrición parenteral total (Hardy, 2009), beber agua con alta concentración de Mn (Bouchard et al., 2007; Katsoyiannis y Katsoyiannis, 2006) y daño hepático crónico (Rose et al., 1999).

Las principales áreas cerebrales afectadas por el Mn son el *globus pallidus* y la sustancia nigra pars reticulata, con extensión del daño hacia el núcleo caudado y el putamen (Calne et al., 1994; Olanow et al., 1996; Stanwood et al., 2009; Yamada et al., 1986). Probablemente por esta razón la toxicidad por Mn puede causar alteraciones motoras similares a las que se presentan en la enfermedad de Parkinson idiopática (EPI) (Calne et al., 1994; Pomier-Layrargues, 2001).

El Mn es un metal con propiedades paramagnéticas, por lo que puede detectarse *in vivo* por IRM porque acorta el tiempo de relajación (T1) de los tejidos (Bock et al., 2008). La sobreexposición a Mn puede causar señales hiperintensas en T1 en el *globus pallidus*, en el estriado y, en menor grado, en la sustancia nigra (Krieger et al., 1995; Pal et al., 1999). Las hiperintensidades en el *globus pallidus* pueden observarse en trabajadores ocupacionalmente expuestos a Mn (Dietz et al., 2001; Jiang et al., 2006; Kim et al., 1999), en pacientes que recibieron nutrición parenteral total (Nagatomo et al. 1999) y en casos de daño hepático (Hazell y Butterworth, 1999). El 80% de los pacientes con cirrosis muestran este tipo de señales (Das et al., 2008) (Fig. 3).

3.4.1. Transporte de Manganeso

El Mn de la dieta es transportado del intestino a la circulación portal a través del transportador de metales divalentes 1 (DMT1). Existe evidencia de que la

ceruloplasmina oxida el Mn, generalmente absorbido como Mn^{+2} , a Mn^{+3} en el hígado y plasma para que posteriormente la transferrina (Tf) lo transporte en el torrente sanguíneo (Aschner y Aschner, 1991; Jursa y Smith, 2009).

La regulación del Mn en el organismo se encuentra estrechamente ligada a la regulación del Fe (Fitsanakis et al., 2010). La deficiencia de Fe potencia la absorción de Mn a través del tracto gastrointestinal, independientemente de las reservas de Mn (Chandra y Shukla, 1976). Es por esta razón que aunque la exposición a Mn no sea tan significativa, los individuos con deficiencia de Fe son susceptibles a acumular Mn en el cerebro (Erikson et al., 2004). Por otro lado, la exposición a Mn facilita la deficiencia de Fe (García et al., 2006), apoyando la hipótesis de que ambos metales compiten por los mismos mecanismos de transporte.

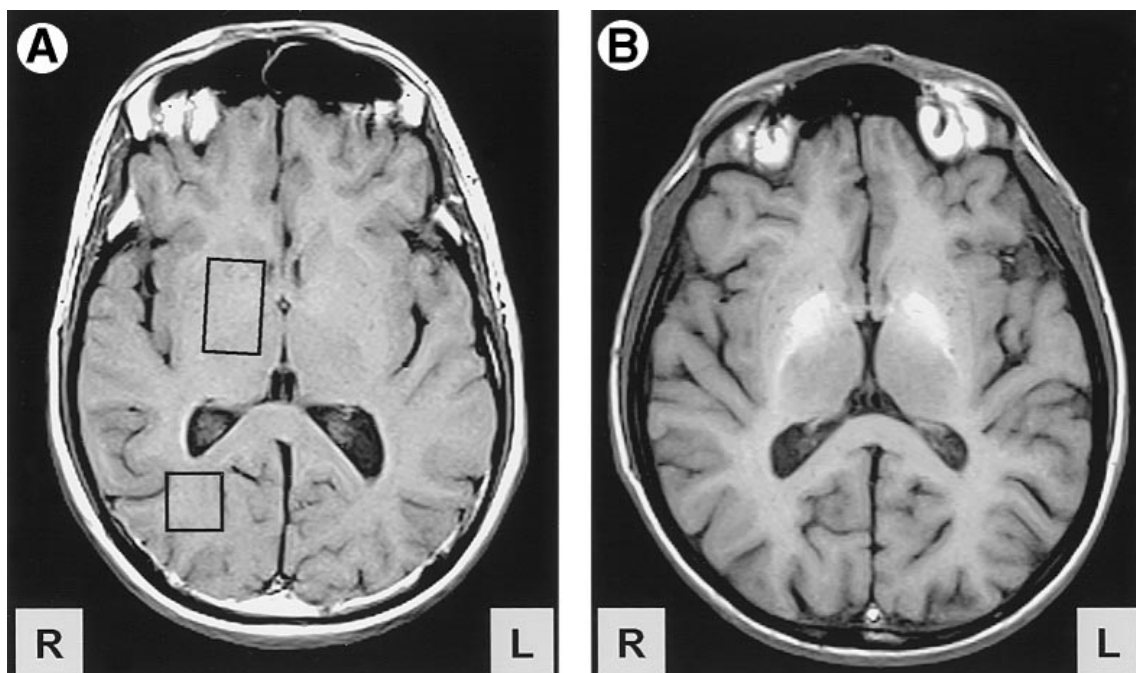


Fig. 3. Señales hiperintensas en el *globus pallidus* de un paciente cirrótico. Se muestra la comparación de un control sano (A) contra un paciente cirrótico (B). Tomado de Spahr et al. 2000.

Aunque existen muchas investigaciones sobre los mecanismos de transporte de Mn a través de la barrera hematoencefálica (BHE), todavía existe controversia acerca de los transportadores involucrados. En un estudio realizado por Fitsanakis et al. (2006), en

el que se empleó un modelo de BHE *in vitro*, se encontró que el transporte de Mn a través de la BHE se lleva a cabo por transporte activo, es dependiente del pH y de la temperatura. El DMT1 es el transportador de Mn con mayor afinidad que se conoce ($K_m = 1\mu\text{M}$) y su actividad es dependiente del pH y de la temperatura (Garrick et al., 2006). Además, el TfR (receptor de transferrina) es un transportador activo dependiente de pH (Fitsanakis et al. 2007). Por lo tanto, ambos mecanismos de transporte son generalmente aceptados.

Tanto el DMT1 como el TfR se expresan en los capilares del endotelio vascular y en los plexos coroideos (Gunshin et al., 1997; Siddappa et al., 2002). La Tf tiene la capacidad de unirse al Mn^{+3} y este complejo podría entrar en el SNC por endocitosis de TfR (Aschner y Aschner, 1991; Takeda, 2003) (Fig. 4).

El DMT1 colocaliza con el TfR, tanto en la membrana plasmática como en los endosomas. Esta colocalización sugiere un posible acoplamiento del transporte de Mn entre el TfR y el DMT1 (Fig. 4) (Au et al., 2008; Gruenheid et al., 1999).

La rápida distribución del Mn desde los plexos coroideos hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR) puede explicarse también por la prominente expresión del DMT1 en las células endocelulares que rodean al tercer ventrículo (Burdo et al., 2001). Adicionalmente, las uniones estrechas permeables entre las células endocelulares (Wolburg y Paulus, 2010) podrían permitir la difusión de moléculas hidrofílicas pequeñas desde el LCR hacia el líquido intersticial del cerebro y viceversa (Laterra et al., 1999), por lo que es posible que el Mn difunda entre las células endocelulares (Fig. 4).

Otra proteína que podría tener una participación importante en el transporte del Mn es la ferroportina (Fpn), pues la sobreexposición a Mn influye sobre la localización celular y la expresión de este transportador (Wang et al., 2008; Yin et al., 2008).

Una vez que el Mn cruza la BHE o la barrera sangre-LCR, las neuronas o los astrocitos pueden capturarlo. La Tf producida por los oligodendrocitos podría unirse al

Mn⁺³, de manera que, tanto el Mn libre como el Mn unido a Tf podrían estar presentes en el líquido extracelular (Takeda, 2003) (Fig. 4). Las neuronas expresan TfR, por lo que podrían capturar el Mn por endocitosis mediada por TfR. Los astrocitos expresan tanto DMT1 como TfR en sus procesos astrocíticos (Roth y Garrick, 2003) y actúan como los principales reguladores de la homeostasis del Mn en el cerebro y como un depósito del mismo (Aschner et al., 1999). El Mn se deposita preferencialmente en los astrocitos debido a sus mecanismos de transporte de alta afinidad (Gunter et al., 2006; Aschner et al., 1999), probablemente por la expresión del DMT1.

La GS se encuentra en los astrocitos y, como se mencionó anteriormente, esta enzima contiene alrededor del 80% del Mn cerebral. Los astrocitos tienen concentraciones de Mn 10 a 50 veces mayores que las neuronas (Erikson y Aschner, 2006). Esta acumulación preferencial sugiere que los astrocitos pueden ser más susceptibles a la toxicidad por Mn que otras células cerebrales. En apoyo a esta posibilidad, diversos modelos de intoxicación por Mn muestran alteraciones patológicas en los astrocitos, conocidas como astrocitosis de Alzheimer tipo II (Hazell et al., 2006; Olanow et al., 1996; Pentschew et al., 1963). Los astrocitos Alzheimer tipo II muestran núcleos pálidos y agrandados con marginación periférica de la cromatina (Butterworth, 2008) (Fig. 5). Estos cambios en la morfología astrocítica también pueden encontrarse en síndromes hiperamonémicos y en la enfermedad de Wilson, entre otras enfermedades (Ma, 2001). Los cambios nucleares van acompañados de hinchamiento de otros organelos, como la mitocondria y el retículo endoplásmico rugoso (Gregorios et al., 1985). El mecanismo exacto por el cual se desarrolla la astrocitosis de Alzheimer tipo II se desconoce; sin embargo se ha planteado que puede originarse por fallas energéticas debidas a la destoxicación de amonio (en el caso de hiperamonemia) (Gregorios et al., 1985) o bien por cambios en el citoesqueleto (en el caso de intoxicación por Mn) (Liao et al., 2001).

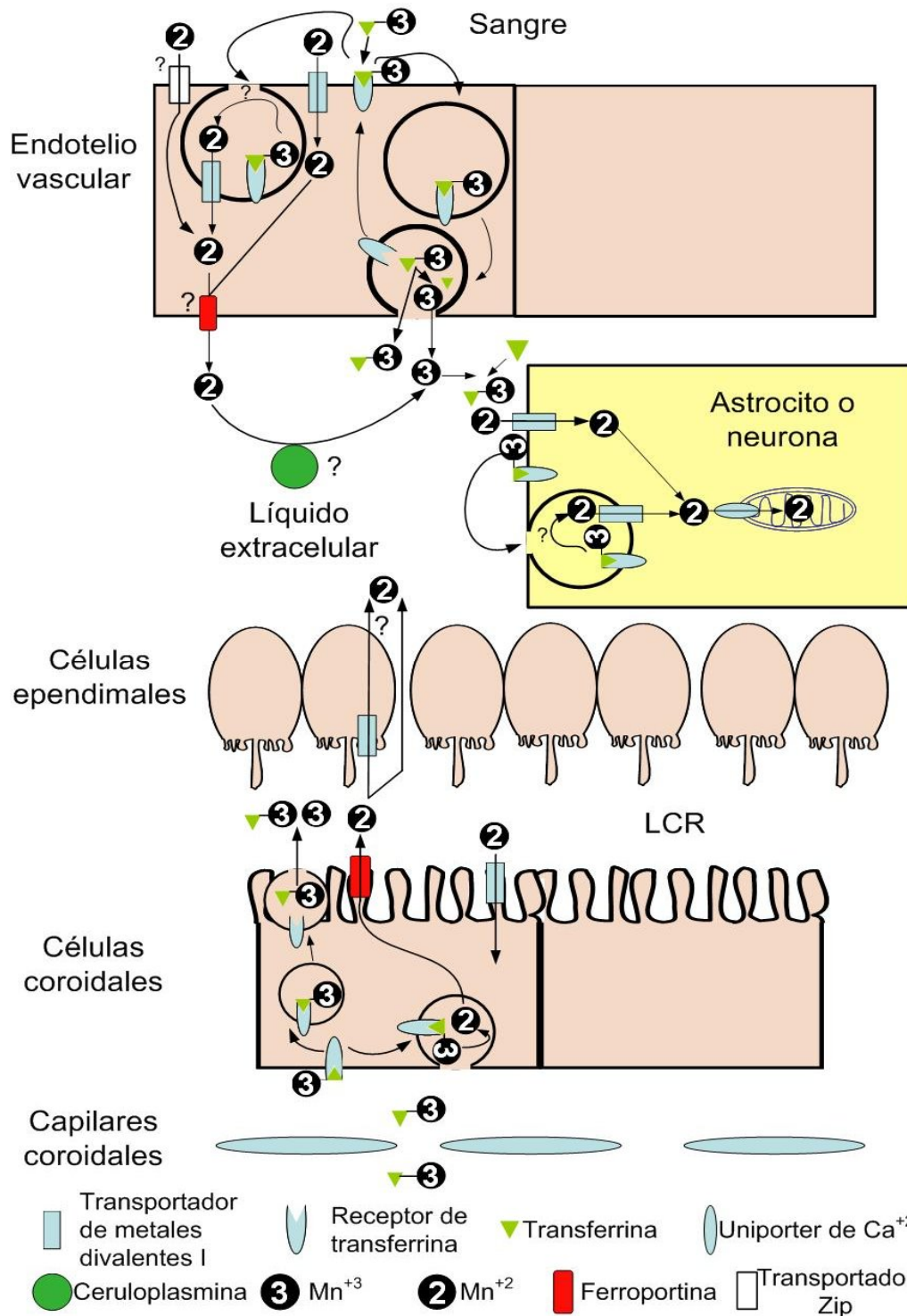


Fig. 4. Transporte de Mn en el SNC. El Mn puede penetrar la barrera hematoencefática a través del DMT1 como Mn^{+2} o por transporte mediado por TfR como Mn^{+3} unido a Tf. Debido a que el DMT1 colocaliza con el TfR es posible que ambos se localicen en la vesícula endocítica. El Mn^{+3} podría reducirse a Mn^{+2} por mecanismos desconocidos dentro de la vesícula y salir de ella por el DMT1. El Mn^{+3} alcanzaría el medio extracelular libre o unido a Tf y el Mn^{+2} podría oxidarse a Mn^{+3} en el medio extracelular por acción de la ceruloplasmina y, posteriormente, unirse a Tf. El Mn que penetra por las células coroidales puede liberarse en el LCR como Mn^{+3} o como Mn^{+3} unido a Tf. El Mn podría salir de las células coroidales vía DMT1 o a través de los espacios entre las células endodiales. El Mn entra en neuronas y astrocitos por medio de TfR y DMT1. Una vez dentro de las células el Mn entra en la mitocondria por medio del uniporter de Ca^{+2} . (Rivera-Mancía et al., 2011).

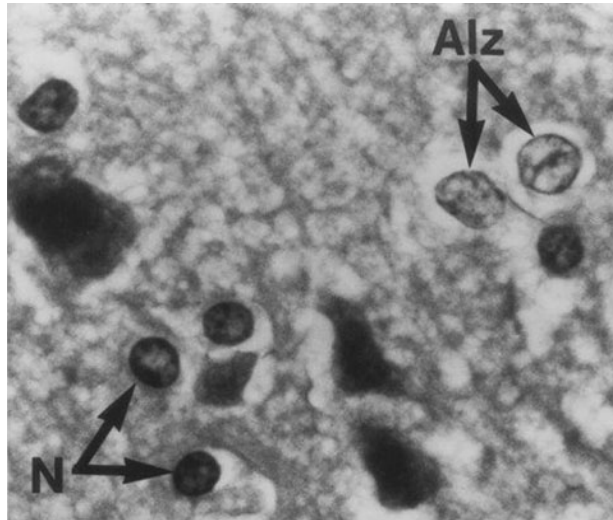


Fig. 5 Astrocitos Alzheimer tipo II. Astrocitos en el cerebro de un paciente que falleció por coma hepático. N: astrocitos normales; Alz: Astrocitos Alzheimer tipo II. Tomado de Butterworth 2010.

Es posible que la ceruloplasmina astrocítica oxide el Fe^{+2} a Fe^{+3} para que se una a la Tf (Burdo et al., 2001), tal y como ocurre en el hígado y en el plasma, (Takeda, 2003), facilitando el transporte mediado por Tf. Esto mismo podría ocurrir para el Mn.

Con respecto a la acumulación regional de Mn, el estriado es una región rica en DMT1 y también acumula Mn en altas concentraciones bajo condiciones de toxicidad (Burdo et al., 2001; Montes et al., 2001). Sin embargo, las áreas con alta densidad de Tf no coinciden con la distribución de Mn (o de Fe), un hecho que sugiere que los sitios con alta acumulación de Mn pueden acumularlo por transporte axonal (Sloot y Gramsbergen, 1994); por ejemplo, las áreas ricas en Mn del pálido ventral, el *globus pallidus* y la sustancia nigra reciben aferencias del núcleo accumbens y del caudado-putamen, dos áreas ricas en TfR.

3.4.2. Acumulación de Mn en la cirrosis

Los alimentos representan la principal fuente de Mn (Klos et al., 2006), un hecho que adquiere importancia en casos de daño hepático. Debido a que el Mn se excreta principalmente en la bilis (Levy y Nassetta, 2003; Papavasiliou et al., 1966) se acumula

en el organismo de pacientes cirróticos y sus niveles se encuentran aumentados hasta nueve veces en los cerebros *postmortem* de estos pacientes. Las mayores concentraciones de Mn se han encontrado en el *globus pallidus* (Pomier-Layrargues et al., 1995).

Dentro de los síntomas que se presentan en casos de EH en su forma crónica se encuentran movimientos anormales, incluyendo enlentecimiento psicomotor e hipocinesia (Cauli et al., 2006; Pomier-Layrargues, 2001). Entre 20 y 50% de los pacientes con falla hepática crónica presentan parkinsonismo de moderado a severo (Olanow, 2004) y esto puede estar asociado con la acumulación de Mn.

La astrocitosis de Alzheimer tipo II constituye una característica importante de la EH (vom Dahl et al., 2001) y se considera una marca distintiva de la toxicidad por Mn (Normandin y Hazell, 2002); se encuentra de manera predominante en los ganglios basales (Norenberg, 1981) y se observa tanto en sustancia blanca como en sustancia gris (Butterworth, 2000).

Las hiperintensidades en IRM en T1 se observan con frecuencia en los ganglios basales de pacientes con daño hepático crónico (Kulisevsky et al., 1993) y se atribuyen a la acumulación de Mn. Se sabe que existe una relación entre la magnitud de la hiperintensidad observada por IRM y el grado de daño hepático y el flujo portosistémico, pero no existe correlación con el grado de EH (Quero Guillén y Herrerías-Gutiérrez, 2006). Sin embargo, existe correlación entre la hiperintensidad del *globus pallidus* y las alteraciones motoras, lo que apoya la idea de que la disfunción de los ganglios basales está relacionada con la etiología de la EH y los síntomas extrapiramidales mostrados por los pacientes (Butterworth, 2008; Spahr et al., 2000) (Fig. 6). En pacientes cirróticos con hiperintensidad bilateral en el *globus pallidus* se observaron alteraciones motoras como temblor postural y de acción y alteraciones en la marcha, mientras que los pacientes cirróticos sin hiperintensidad no mostraron tales alteraciones. En un estudio *postmortem* se encontraron concentraciones de Mn 4.7

veces mayores en los pacientes cirróticos con hiperintensidad del *globus pallidus* que en los que no presentaban esta alteración. Esto sugiere una relación directa entre el Mn y el parkinsonismo observado en algunos casos de daño hepático crónico (Klos et al., 2006). En apoyo a esta hipótesis, después de varios meses de un transplante de hígado los pacientes con daño hepático, mejoran o normalizan sus funciones neurológicas y desaparecen las hiperintensidades del *globus pallidus* (Pomier-Layrargues, 2001; Pujol et al., 1993).

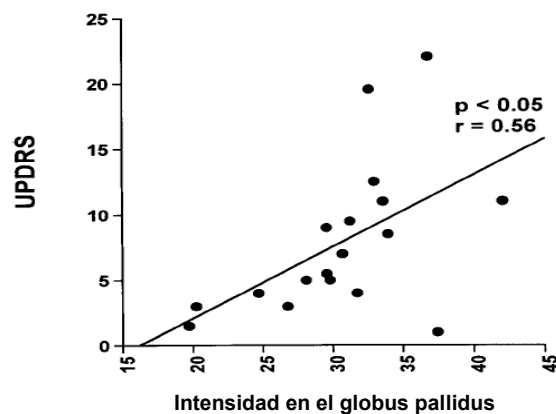


Fig. 6. Correlación entre hiperintensidad en el *globus pallidus* y síntomas de parkinsonismo. La hiperintensidad del *globus pallidus* en pacientes cirróticos correlaciona con el grado de los síntomas extrapiramidales medido por medio de la escala UPDRS (Escala de clasificación unificada de la enfermedad de Parkinson).

Una complicación importante de la EH es el edema cerebral, que en casos de falla hepática crónica se presenta como un edema de bajo grado (este tema se tratará más adelante). La presencia de altos niveles de Gln cerebral podrían jugar un papel importante en el desarrollo de esta condición (Jalan et al., 2003) y la acumulación de Mn se relaciona con el aumento de Gln en el cerebro de ratas cirróticas (Montes et al., 2003). Además, algunos autores proponen que el Mn podría actuar en sinergia con el amonio (Butterworth, 2008), debido a que el amonio y el Mn producen efectos similares *in vitro* como son, inhibición de la captura de glutamato (Bender y Norenberg, 1996; Hazell y Norenberg, 1997), inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial y estrés oxidante (Norenberg et al., 2004; Rao y Norenberg, 2004), así como hinchamiento celular (Panickar et al., 2007; Rao et al., 2007).

3.5. Amonio

El amonio es un metabolito que se produce, en su mayoría, dentro del intestino durante la digestión y desaminación de proteínas. El ciclo de la urea (Fig. 7) se lleva a cabo en el hígado y regula las concentraciones de amonio en la circulación sistémica para mantenerlas en un rango de 50 a 100 μ M. La reducción en la capacidad del hígado para remover el amonio conduce a hiperamonemia, a incremento en los niveles de amonio cerebral y, en consecuencia, a una serie de síntomas neuropsiquiátricos y neurológicos como, alteraciones en la memoria, convulsiones, ataxia y coma. Durante la falla hepática las concentraciones cerebrales de amonio pueden llegar hasta 1-5 mM (Bosoi y Rose, 2009). El cerebro no cuenta con la maquinaria enzimática necesaria para realizar el ciclo de la urea, por lo que el mecanismo alterno que emplea para combatir las altas concentraciones de amonio es el ciclo glutamato-glutamina.

3.5.1. Transporte de amonio

El amonio puede encontrarse en su forma gaseosa (amoniaco, NH_3) o en su forma iónica (amonio, NH_4^+) y ambas especies pueden transportarse a través de las membranas celulares (Bosoi y Rose, 2009). Su pKa a 37° C es 9.15, por lo que en condiciones fisiológicas más del 98% se encuentra como NH_4^+ .

El amoniaco es soluble en lípidos, lo que permite que pueda difundir hacia cerebro, mientras que el NH_4^+ , por poseer radio iónico y coeficiente de difusión similares al K^+ , compite con él por diversos transportadores. Algunos de estos transportadores son, las ATPasas de Na^+/K^+ y H^+/K^+ (Moser, 1987) y los cotransportadores $\text{NH}_4^+/\text{Cl}^-$ y $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ (NKCC) (Kelly et al., 2009; Nagaraja y Brookes, 1998). Otros transportadores para el amonio son las glucoproteínas Rhesus B y C (RhBG y RhBG) (Bakouh et al., 2006) y las acuaporinas 3,4,7,8 y 9 (Litman et al., 2009).

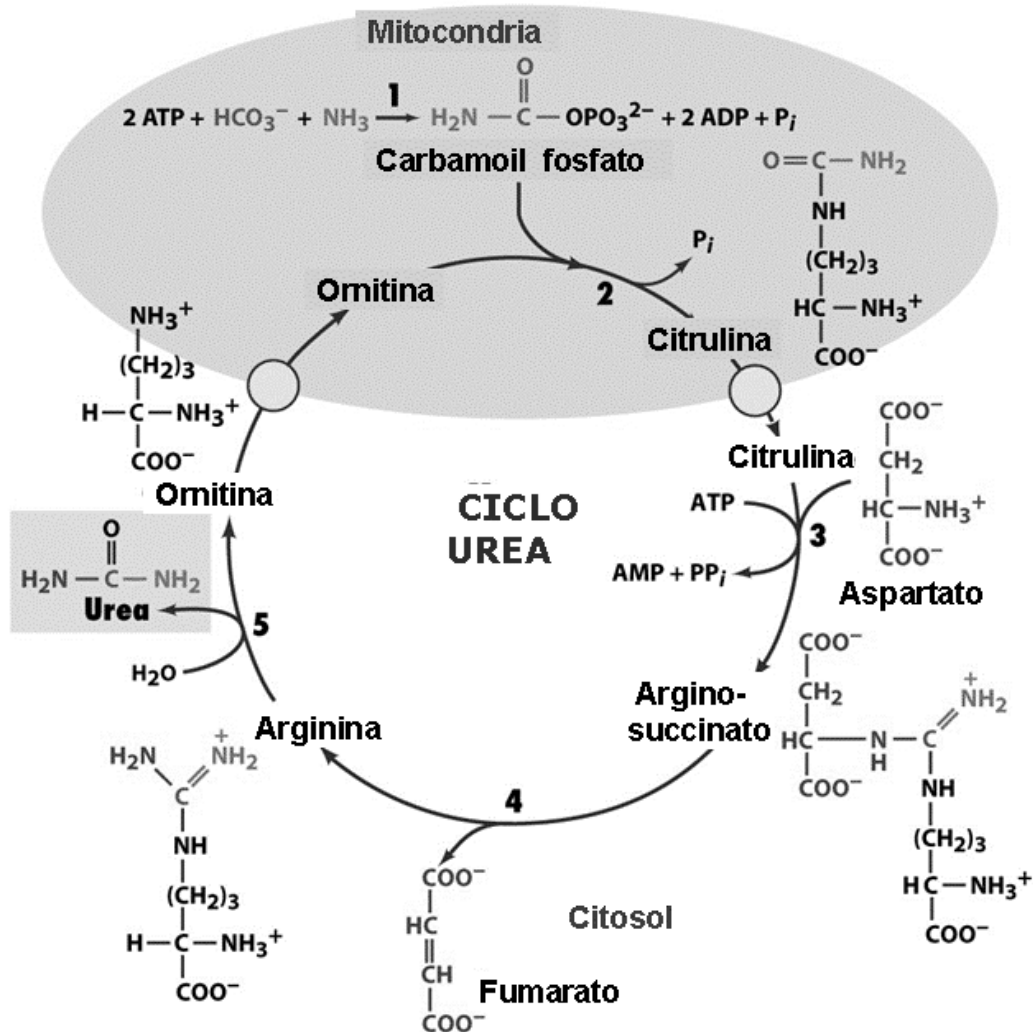


Fig. 7. Ciclo de la urea. Por cada mol de NH₄⁺ se obtiene un mol de urea. La primera parte del ciclo de la urea se lleva a cabo en la mitocondria y el resto en el citosol. 1: carbamoil fosfato sintetasa I; 2: ornitina transcarbamilasa; 3: argininosuccinato sintetasa; 4: argininosuccinato liasa; 5: arginasa.

A diferencia de lo que se pensaba acerca de un transporte mayoritario de la especie no ionizada por difusión, el amonio se transporta a través de la BHE principalmente como NH₄⁺ (hasta 66%) (Ott y Larsen, 2004). Esta conclusión se obtuvo a partir de datos de transporte de amonio en riñón. En los riñones existen múltiples transportadores de amonio y algunos de ellos se expresan en el cerebro. El NKCC1 se encuentra en la luz de la membrana capilar cerebral y en los astrocitos y es una isoforma del NKCC2, el cual se encarga del 50 al 65% de la reabsorción de NH₄⁺ del asa de Henle (Ott y Larsen, 2004). La entrada de amonio desde el espacio extracelular hacia el interior de los astrocitos, de acuerdo a experimentos *in vitro*, parece estar

mediada por canales rectificadores de K^+ (80%) y por el NKCC1 (20%) (Nagaraja y Brookes, 1998). La entrada de amonio a los astrocitos es de importancia fisiológica para el funcionamiento adecuado del ciclo glutamato-glutamina (Fig. 2).

3.5.2. Acumulación de amonio en la cirrosis

Los mecanismos celulares y moleculares de la EH son complejos, pero existe el consenso de que la acumulación excesiva de amonio en el cerebro es una causa primaria de esta patología (Felipo y Butterworth, 2002).

La medición de amonio tanto en sangre venosa como en sangre arterial correlaciona positivamente con el grado de EH (Ong et al., 2003) (Fig. 8). En la práctica clínica se utiliza la medición de amonio en sangre venosa aunque no refleja la concentración real a la que está expuesto el cerebro (Nicolao et al., 2003).

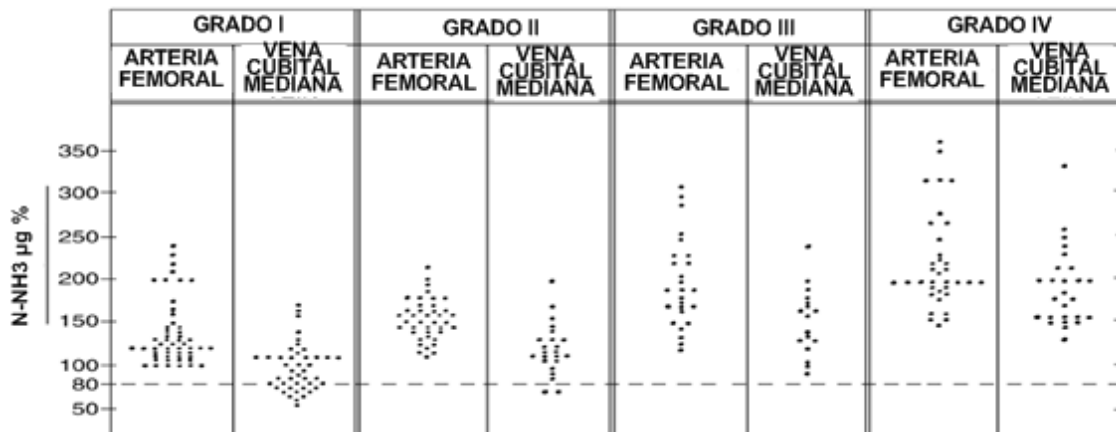


Fig. 8. Niveles arteriales de amonio en pacientes cirróticos antes de cualquier intervención terapéutica. Los niveles de amonio venoso pueden ser normales en un número de pacientes en los primeros grados de encefalopatía hepática, mientras que los niveles arteriales son elevados en todos los pacientes en todos los grados de encefalopatía hepática. Tomado de Stahl 1963.

Estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) y $^{13}NH_3$ revelan un incremento en la transferencia de amonio sangre-cerebro en pacientes cirróticos con EH mínima (EHM) (Loockwood et al., 1991). Es posible que la diferencia observada entre pacientes cirróticos y controles en este aspecto obedezca más a diferencias en el pH arterial que a cambios en la permeabilidad o superficie de la BHE (Ott y Larsen, 2004).

La proporción normal plasma:cerebro para el amonio es de 1:1.8, lo cual se explica por una pequeña diferencia de pH entre el plasma (7.42) y el pH intracelular de los astrocitos (7.16) (Ott y Larsen, 2004). En condiciones de hiperamonemia la concentración de amonio puede alcanzar una proporción cerebro:plasma de 3:1 (Cooper y Plum, 1987).

La exposición de los astrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* a concentraciones de amonio en el rango mM conduce a hinchamiento celular (exposición aguda) o a astrocitosis Alzheimer tipo II (exposición crónica), lo cual es consistente con la noción de un papel patofisiológico principal del amonio en la EH (Butterworth, 2008). Los mecanismos por los cuales el amonio puede causar hinchamiento de los astrocitos incluyen estrés oxidante, activación de cinasas de señalización, así como la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) y el daño energético asociado (Rao y Norenberg, 2007). El daño energético podría estar asociado con la inhibición del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT).

La hiperamonemia cerebral inhibe el CAT a nivel de las enzimas limitantes del metabolismo oxidativo, la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) (Fig. 9). Esto puede dar lugar a un incremento en la glucólisis. La inhibición del CAT ocurre en mayor grado en neuronas y afecta ligeramente a los astrocitos (Johansen et al., 2007).

En modelos de falla hepática e hiperamonemia se observa una reducción en la cantidad y en la activación de los receptores NMDA (Marcaida et al., 1995; Peterson et al., 1990; Hopkins y Oster-Granite, 1998).

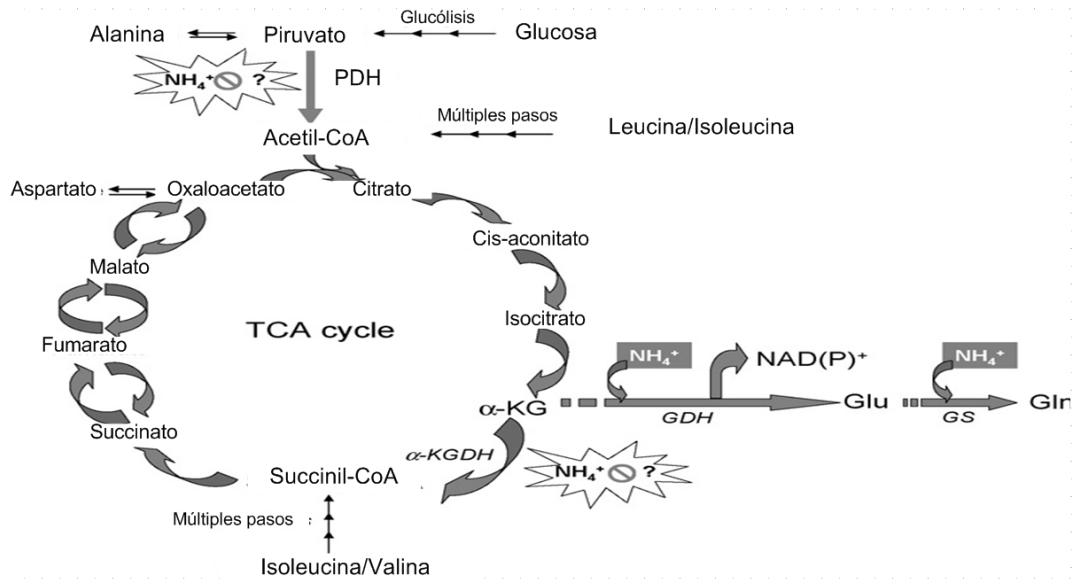


Fig. 9. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos e hiperamonemia. La hiperamonemia puede inhibir las reacciones catalizadas por la piruvato deshidrogenasa (PDH) y por la α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH).

3.6. Edema cerebral en la encefalopatía hepática

Algunos autores sugieren que la EH en la cirrosis es la manifestación clínica de un edema cerebral crónico de bajo grado, el cual se puede exacerbar bajo la influencia de factores precipitantes (Häussinger y Gerok, 1994; Häussinger et al., 2000). En este contexto, los astrocitos juegan un papel predominante, al ser el principal sitio para la detoxificación del amonio (Martinez-Hernandez et al., 1977) y cuya alteración funcional bajo la influencia de cambios en la hidratación y neurotoxinas puede alterar la comunicación glia-neurona (Norenberg, 1996).

Mientras el hinchamiento astrocítico representa un componente muy conocido del edema cerebral en la forma aguda de la EH (falla hepática fulminante), la presión intracraneal elevada y la herniación cerebral asociada con el hinchamiento de los astrocitos no suelen estar presentes en la EH crónica; sin embargo, existe un edema de bajo grado (Rao et al., 2007). En el caso de pacientes con cirrosis en los que se presenta una enfermedad precipitante severa, como hemorragia gastrointestinal descontrolada, inserción de una derivación portosistémica intrahepática transyugular o

sepsis severa, también es posible observar hipertensión intracraneal (Crippin et al., 1992; Jalan et al., 1997; Donovan et al., 1998).

El contenido de Gln cerebral correlaciona positivamente con el grado de EH y con la presión intracraneal (Laubenberger et al., 1997; Tofteng et al., 2006). Asimismo, el incremento en los niveles de Gln en el cerebro y en el LCR se reporta consistentemente en la falla hepática aguda y tales aumentos parecen estar relacionados con el mecanismo del edema cerebral. Existe la hipótesis de que en condiciones hiperamonémicas, la Gln generada en los astrocitos podría ejercer efectos osmóticos y contribuir al edema cerebral (Brusilow y Traystman, 1986).

La idea de que la Gln podría ejercer un efecto osmótico proviene del hecho de que con ¹H MRS se encontró un incremento en la resonancia de la Gln y una disminución en la del mioinositol, el cual actúa como osmolito. Se considera que los cambios en el mioinositol se dan como una compensación osmótica al incremento en los niveles de Gln (Quero Guillén and y Herrerías-Gutiérrez, 2006).

Apoiando la hipótesis de la Gln como factor desencadenante del edema cerebral, Takahashi et al. (1991) y Blei et al. (1994) reportaron que el tratamiento de ratas hiperamonémicas con el inhibidor de la síntesis de Gln, metionina sulfoximina (MSO), redujo significativamente el edema cerebral y disminuyó el grado de hinchamiento astrocítico. Sin embargo, existen estudios que muestran inconsistencias entre los niveles de Gln y la severidad del edema (Zwingmann et al., 2003; Zielinzka et al., 2003).

Algunos efectos comprobados de la Gln son la generación de radicales libres (Jayakumar et al., 2004) y la inducción de la TPM (Rao et al., 2003) en astrocitos en cultivo. Además, la inhibición de la síntesis de Gln por MSO suprime la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) inducida por amonio (Murthy et al., 2001). Cuando se agrega la Gln directamente a una preparación mitocondrial no sináptica o a astrocitos en cultivo se produce TPM e hinchamiento mitocondrial (Albrecht et al.,

2010).y son estos procesos los que podrían estar involucrados en el mecanismo del hinchamiento astrocítico inducido por el amonio y no precisamente efectos osmóticos. A diferencia de la Gln, el amonio no induce TPM o hinchamiento mitocondrial, indicando que su presencia no es suficiente para producir estos efectos (Zieminska et al., 2000). La captura de Gln hacia la mitocondria aumenta en presencia de niveles elevados de amonio (Dolinska et al., 1996). Esto indica que en condiciones hiperamonémicas, el exceso de amonio en compartimentos extramitocondriales puede potenciar la toxicidad por Gln al facilitar su entrada a la mitocondria (Albrecht et al., 2010).Esta evidencia generó lo que se conoce como la hipótesis del “caballo de Troya”, que plantea que el exceso de Gln que se acumula en el citoplasma del astrocito cruza la membrana mitocondrial y libera el amonio en el interior de la mitocondria por acción de la PAG, desencadenando disfunción astrocítica, hinchamiento y edema cerebral (Albrecht y Norenberg, 2006) (ver Fig. 2).

Recientemente se reportó que la histidina (inhibidor del transporte de Gln) es capaz de disminuir el edema cerebral en la EH. Este efecto se atribuyó a la inhibición de la captura de Gln hacia las mitocondrias (Rama Rao et al., 2010) y, como consecuencia, a la disminución del amonio producido por hidrólisis de la Gln.

En cultivos primarios de astrocitos expuestos a concentraciones patológicas de amonio, como era de esperarse, aumentaron los niveles intracelulares de Gln (Jayakumar et al., 2006) pero no hubo relación temporal entre los niveles de Gln y el volumen celular (Fig 10). En dicho experimento, no se midieron los niveles extracelulares de Gln, lo cual hubiera sido interesante para saber si de algún modo las células expulsaban Gln al medio. Posteriormente, se realizó el experimento con un pretratamiento de 30 min con 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON, un inhibidor de la glutaminasa activada por fosfato PAG), bloqueando la hidrólisis intramitocondrial de la Gln para inducir su acumulación intracelular y potenciar el hinchamiento astrocítico inducido por el amonio y, aunque efectivamente, los niveles de Gln aumentaron, no se

observó el mismo incremento en el volumen celular, por el contrario, hubo una disminución. Esto sugiere que el DON pudo haber bloqueado algún proceso dañino resultante del metabolismo de la Gln (En este caso ya no se realizó un curso temporal). Esto es congruente con lo hallado en el curso temporal pues mientras los niveles de Gln iban en descenso el volumen celular se incrementaba. Esto no descarta del todo la participación de la Gln en el desarrollo de edema, pues el incremento en el volumen celular se produjo después de inducir su acumulación.

El DON también bloqueó la generación de EROs y la TPM producidas por la Gln (Jayakumar et al., 2004; Jayakumar et al., 2006). Estas evidencias sugieren que la participación de la Gln en el edema cerebral podría no ser precisamente por acción osmótica, sino por otros mecanismos, como generación de radicales libres, pues algunos autores han demostrado que éstos son capaces de inducir hinchamiento celular en rebanadas de cerebro (Chan et al., 1982; Brahma et al., 2000) y en cultivos de astrocitos (Sharma, 1996).

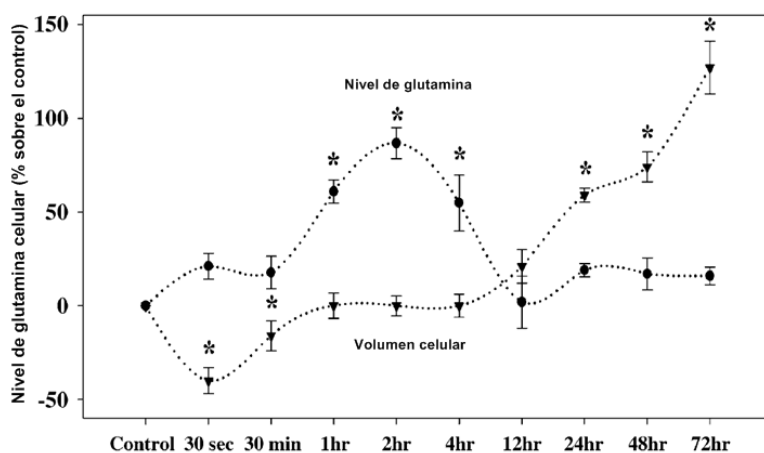


Fig. 10. Curso temporal de los niveles de Gln intracelular y el volumen celular después del tratamiento con NH_4Cl . Cultivos de astrocitos expuestos a NH_4Cl 5mM mostraron pocos cambios en el volumen celular antes de 240 min, mientras que los niveles de Gln aumentaron significativamente desde los 60min. Los cambios significativos en el volumen celular ocurrieron después de 24 h de la adición de NH_4Cl . Tomado de Jayakumar et al. 2006.

La TPM también podría contribuir a la generación de edema. La TPM se caracteriza por la apertura del poro de transición de la permeabilidad en la membrana mitocondrial interna, aumentando la permeabilidad a los protones, iones y otros solutos. El

incremento en la permeabilidad conduce al colapso del potencial de la membrana mitocondrial interna e hinchamiento osmótico, conduciendo a disfunción mitocondrial (Zoratti y Szabo, 1995). La ciclosporina A (inhibidor de la TPM) es capaz de bloquear la TPM inducida por la Gln (Rao et al., 2003), así como el hinchamiento astrocítico inducido por amonio. Esto indica que la TPM podría tener un papel importante en el hinchamiento astrocítico producido por amonio/Gln.

Aunque el edema cerebral sea de bajo grado en la cirrosis, el hinchamiento astrocítico puede tener efectos profundos sobre las propiedades de estas células debido a que el estado de hidratación celular representa un regulador clave de la función celular, incluyendo síntesis de aminoácidos y de proteínas, expresión de genes, control intracelular del pH y de las concentraciones iónicas (Häussinger et al., 2000). Tales anomalías metabólicas en los astrocitos podrían impactar sobre las interacciones astrocito-neurona conduciendo a función neuronal aberrante y síntomas neurológicos (Rao et al., 2007).

4. Justificación

La cirrosis hepática es una enfermedad de gran importancia tanto a nivel nacional como internacional, por ser una de las primeras causas de muerte en personas en edad ocupacional (Bosetti et al., 2007) y una de sus principales complicaciones es la EH (Butterworth 2003). Se sabe que en esta patología se acumulan Mn y amonio en el cerebro; sin embargo, aún falta mucho por conocer acerca del grado de participación de estas sustancias.

Existen diversos modelos de encefalopatía hepática, dentro de los cuales destacan la hiperamonemia crónica sin daño hepático y la anastomosis portocava (Rodrigo y Felipo, 2006). Estos modelos están dirigidos esencialmente al estudio de los efectos de la hiperamonemia. De hecho, de los estudios relacionados con la EH, el mayor número corresponden al análisis de situaciones de hiperamonemia, más que a la acumulación de manganeso, por lo que el papel de éste último es aún menos claro.

Actualmente no existe un modelo *in vivo* en el que se conjunten los tres principales factores involucrados en la EH, el daño hepático, el amonio y el manganeso. De aquí la necesidad de construir un modelo que permitiera estudiar las posibles interacciones entre estos factores y, al mismo tiempo, esclarecer el papel del Mn en la EH. Así mismo, un modelo con estas características permitiría conocer otros mecanismos patogénicos involucrados en la EH para desarrollar otras estrategias terapéuticas para el tratamiento de esta patología de una manera más integral.

5. Antecedentes

La encefalopatía hepática se presenta en 50 a 70% de los pacientes cirróticos (Quero y Schalm, 1996). Tanto el Mn como el amonio y la Gln se acumulan en el cerebro de estos pacientes (Butterworth, 2008).

En un modelo de daño hepático crónico por ligadura del conducto biliar en ratas, nuestro grupo ha logrado la acumulación de Mn en cantidades similares a las que se observan en los humanos (Montes et al., 2002); mientras que otros grupos han inducido la acumulación significativa de amonio al administrar acetato de amonio en ratas ligadas del conducto biliar (Jover et al., 2006). No se ha probado la combinación de estos factores *in vivo*.

Existe la hipótesis de que al amonio y el Mn podrían tener efectos sinérgicos para dar lugar a la presencia de EH (Butterworth, 2008). Diversos experimentos, sobre todo *in vitro*, han mostrado que el Mn y el amonio producen efectos similares como:

- Inhibición de la captura de glutamato (Bender y Norenberg, 1996; Hazell y Norenberg, 1997).
- Inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial y estrés oxidante (Norenberg et al., 2004; Rao y Norenberg, 2004).
- Hinchamiento celular (Panickar et al., 2007; Rao et al., 2007).

6. Hipótesis

La acumulación cerebral de Mn provocará astrocitosis de Alzheimer tipo II y un efecto sinérgico con el amonio sobre el desarrollo de edema cerebral, acumulación de glutamina y alteraciones motoras al administrar ambas sustancias en conjunto en ratas cirróticas.

7. Objetivos

General

Evaluar la influencia de la acumulación cerebral de manganeso sobre la morfología astrocítica, sus posibles interacciones con el amonio y la influencia de estas interacciones sobre los niveles de glutamina, el contenido de agua cerebral y la coordinación motora, así como el efecto de una sustancia sobre la otra, en ratas con daño hepático crónico.

Particulares

1. Evaluar la presencia de astrocitosis de Alzheimer tipo II en el cerebro de ratas cirróticas expuestas crónicamente a manganeso en el agua de bebida en el modelo de ligadura del conducto biliar.
2. Establecer un modelo experimental que permita evaluar las interacciones entre el Mn, el amonio y el daño hepático.
3. Evaluar los efectos del Mn sobre las concentraciones de amonio y viceversa en ratas con daño hepático.
4. Evaluar las interacciones daño hepático-manganeso-amonio sobre:
 - Las concentraciones cerebrales de glutamina
 - El contenido de agua cerebral
 - La coordinación motora

8. Material y Métodos

8.1 Primera parte

8.1.1. Animales e inducción del daño hepático

Se utilizaron ratas Wistar machos con un peso de 200 a 250 g del bioterio del Cinvestav Zacatenco y se distribuyeron aleatoriamente en uno de los siguientes grupos: Sham, Sham Mn, LCB o LCB Mn. Las ratas LCB se sometieron a la ligadura del conducto biliar para inducir daño hepático. Los grupos Mn con manganeso (1mg Mn/ml como $MnCl_2 \cdot 4H_2O$) en el agua de bebida desde el día de la cirugía. Los animales se alimentaron *ad libitum* con alimento estándar para ratas (Labdiet 5001) y se mantuvieron en un ciclo luz/oscuridad 12:12 h.

El daño hepático se indujo usando el modelo reportado por Kontouras et al. (1984). Utilizando como anestésico pentobarbital sódico (35 mg/kg), se realizó una incisión de aproximadamente un cm en la porción media del abdomen, debajo del apéndice xifoides, se cortó el músculo y, posteriormente, se expuso la porción del intestino a la que se une el conducto biliar. Se realizaron tres ligaduras en el conducto y se llevó a cabo el corte del mismo, dejando dos nudos del lado del hígado y uno del lado del intestino. En las ratas Sham se llevó a cabo el mismo procedimiento sin ligar ni cortar el conducto. Los tratamientos tuvieron una duración de dos o cuatro semanas, aunque algunas ratas fueron tratadas más allá de ese periodo con la finalidad de tratar de obtener datos a seis semanas.

El día del sacrificio, las ratas se anestesiaron y se obtuvo sangre por punción cardiaca. A continuación se extrajo el cerebro y se colocó sobre una placa fría para proceder a la disección. El hígado y el bazo se pesaron.

8.1.2. Pruebas de funcionamiento hepático (PFH) y determinación de colágena

Se llevó a cabo la cuantificación de la actividad de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA) y γ -glutamilttransferasa (GGT), así como la cuantificación de bilirrubinas en plasma.

Se obtuvo una porción segmento del hígado (aproximadamente 100 mg) para determinar el contenido de colágena a través del contenido de hidroxiprolina (Muriel, 1998).

8.1.3. Histología (cerebro)

Utilizando una matriz sagital para cerebro de rata (ASI instruments), se realizó un corte a tres mm de distancia de la línea media para obtener una zona del cerebro en la que fueran visibles la corteza frontal, el estriado y el *globus pallidus* (Paxinos y Watson, 1997). El tejido se fijó en formalina al 10% amortiguada con fosfatos durante 4 días (Norenberg et al., 1974), se embebió en parafina y se realizaron cortes de 4 μ m de espesor, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). Se prepararon tres laminillas por rata y se analizaron en el microscopio óptico. Se obtuvieron cinco imágenes aleatorias con el objetivo 100X, utilizando una cámara digital Leica, en cada área (corteza frontal, estriado y *globus pallidus*) en cada laminilla, dando un total de 15 imágenes por área por animal. Se realizó el conteo de astrocitos alterados y totales en cada imagen. Se consideraron como astrocitos alterados aquellos que mostraban marginación periférica de la cromatina y núcleo pálido. Los resultados se expresaron en % de astrocitos alterados, que resultó de dividir los astrocitos alterados entre los totales en los cinco campos contados en cada laminilla para cada área cerebral. El número total de astrocitos se expresó como el promedio de astrocitos por campo para cada área.

8.1.4. Histología (hígado)

Se obtuvieron fragmentos del hígado y se fijaron en formalina al 10%, se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 4 μm de espesor. Los cortes se tiñeron con H&E y con la tinción tricrómica de Masson y se observaron en un microscopio óptico para realizar la búsqueda de elementos propios de cirrosis.

8.1.5. Determinación de Mn

En el hemisferio izquierdo se llevó a cabo la disección de la corteza frontal, el estriado y el *globus pallidus*. Los fragmentos de tejido se digirieron en ácido nítrico redestilado por 30 min a 60° C. El contenido de Mn se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, modelo 3110) con una lámpara de cátodo hueco (Montes et al., 2002).

8.1.6. Análisis estadístico

Se realizó un ANDEVA de dos vías en bloques de tiempo utilizando el software SPSS V 13.0 y teniendo como factores la LCB (ligadura del conducto biliar) y el tratamiento con Mn. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$. Todos los resultados se expresaron como promedio \pm EEM.

8.2. Segunda parte

8.2.1. Animales y tratamientos

Se utilizaron ratas Wistar machos de 250 a 280g de peso del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (proyecto número INNN 024078). Los animales se distribuyeron aleatoriamente en uno de los siguientes grupos: Sham, Sham Am, Sham Mn, Sham Am Mn, LCB, LCB Am, LCB Mn y LCB Am Mn. A las ratas LCB se les realizó la ligadura del conducto biliar para inducir cirrosis siguiendo el

procedimiento que se explicó anteriormente. Los grupos Mn se trataron con Mn en el agua de bebida. A los grupos Am se les administró acetato de amonio (20% p/p) en el alimento de acuerdo a Jover et al. (2006), con algunas modificaciones. Por cada 100 g de la dieta con amonio, se pesaron 80 g de alimento para rata (5001 LabDiet) y se pulverizaron, se mezclaron con 20 g de acetato de amonio y 40 ml de agua. Se moldearon pellets y se secaron a 37° C durante 16-18h. El alimento con amonio se preparó diariamente. El tratamiento con Mn en el agua de bebida se realizó durante tres semanas y la dieta con amonio se suministró durante la tercera semana del tratamiento (Fig. 11). Se monitoreó el consumo de alimento y de agua diariamente, así como el peso de las ratas. Los animales se sacrificaron por decapitación tres semanas después de la cirugía. Su sangre se colectó en tubos heparinizados fríos.

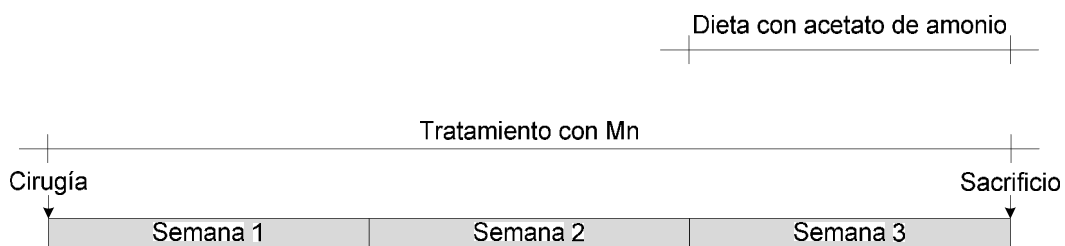


Fig. 11. Esquema de tratamientos.

Se usó un lote de ratas para determinar amonio en un hemisferio cerebral y Mn en el otro hemisferio. Otro lote fue usado para determinar Gln y el contenido de agua cerebral. A las ratas se les realizaron PFH y se analizaron preparaciones del hígado teñidas con la tinción tricrómica de Masson.

8.2.2. Determinación de Mn

Se realizó la disección del cerebelo, la corteza, el estriado y el *globus pallidus*. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente y el contenido de Mn se determinó en un espectrofotómetro Perkin Elmer AAnalyst 600 con una lámpara de cátodo hueco.

8.2.3. Determinación de amonio

La determinación de amonio se llevó a cabo con base en el método reportado por Sponner et al. (1975) con algunas modificaciones para un lector de microplacas (BioTek FLx800). Inmediatamente después del sacrificio, la sangre se colectó en tubos heparinizados fríos y se centrifugó a 700 g durante 10 min a 4 °C. Se mezclaron cinco volúmenes de plasma con un volumen de ácido perclórico 2.4 M frío. Por otro lado, se utilizó un hemisferio cerebral para determinar amonio en corteza, estriado y cerebelo. El tejido cerebral se homogenizó con cinco volúmenes de ácido perclórico 0.4 M. Tanto el plasma como el tejido cerebral se dejaron reposar durante 20 min después de la adición del ácido perclórico a 4 °C y se centrifugaron a 22 000 g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se conservaron a -70 °C hasta que fueron analizados. Se analizó una mezcla que contenía 70 µl de muestra y los reactivos en un volumen final de 170 µl a una longitud de onda de 360nm de excitación y 460nm de emisión. Las concentraciones finales de los reactivos fueron 80 mM de α -KG, 0.4 mM de ADP, 0.14 mM de NADH y 3.6 U/ml de GDH. La reacción se llevó a cabo durante 25 min después de agregar la GDH.

8.2.4. Contenido de agua

El contenido de agua cerebral se determinó por el método gravimétrico reportado por Marmarou et al. (1978). Inmediatamente después de extraer el cerebro se sumergió en una mezcla fría de keroseno-bromobenceno (g.e.=1.020) para evitar la evaporación del agua. Se tomaron muestras de aproximadamente 2 mm de diámetro de la corteza y se depositaron en una columna con un gradiente lineal de densidades de keroseno-bromobenceno (g.e. 0.975 a 1.020) calibrada previamente con estándares de K_2SO_4 de gravedad específica conocida. La posición en la columna, tanto de los estándares como de las muestras, se registró 2 min después de su contacto con la mezcla de disolventes en la columna. Dicho valor fue interpolado en la curva de calibración

elaborada con las soluciones de K_2SO_4 . Los resultados se expresaron como % de agua.

8.2.5. Cuantificación de glutamina cerebral

El tejido cerebral (corteza, estriado, *globus pallidus* y cerebelo) se homogenizó en 40 volúmenes de metanol HPLC al 85% v/v con un homogenizador de vidrio-teflón. Las muestras se centrifugaron a 4 000 g por 10 min a 4 °C y los sobrenadantes se conservaron a -70 °C hasta su análisis. El contenido de Gln se analizó usando un sistema CLAR (Agilent 1100) con un detector de fluorescencia y una columna adsorbosphere™ OPA (Alltech). La fase móvil estaba formada por (A) buffer de acetato de sodio 50 mM pH 5.9 con tetrahidrofurano al 1.5% y (B) metanol grado HPLC. El método de separación consistió en un gradiente lineal de 10 min comenzando en 10% y terminando en 14% de B. El procedimiento de derivatización precolumna se llevó a cabo mezclando 10 µl de muestra y 10µl de reactivo de orto-ftalaldehído (25 mg de orto-ftalaldehído disuelto en 625 de metanol, 5.6 ml de buffer de boratos y 25 µl de mercaptoetanol). El área bajo la curva se interpoló en una curva de calibración construida previamente con un estándar de Gln.

8.2.6. Prueba de Rotarod

El efecto de los tratamientos sobre la coordinación motora fue evaluado utilizando un aparato rotarod con aceleración (Panlab LE8500). Las ratas se entrenaron durante dos días consecutivos previos a la prueba. Las sesiones de entrenamiento consistieron en mantener a las ratas sobre el tambor giratorio por dos min a baja velocidad (8 rpm) en dos ocasiones. El día de la prueba, la velocidad del rotarod se incrementó gradualmente de 0 a 20 rpm en 5 min. Se registró el tiempo que tardaron los animales en caer del cilindro giratorio en tres pruebas y se obtuvo el promedio por cada rata (Chen et al., 2008).

8.2.7. Análisis estadístico

En todos los casos los resultados se expresaron como el promedio \pm EEM de por lo menos seis animales. Los datos se analizaron utilizando un ANDEVA de tres vías (siendo las tres vías el Mn, el amonio y la LCB) con el software SPSS v 13.0 para estudiar interacciones dobles (LCB x Mn, LCB x amonio y Mn x amonio) y triples (LCB x Mn x amonio), así como efectos principales (LCB, Mn, amonio) (para una descripción más detallada del análisis estadístico ver el apéndice que se encuentra al final). Se hicieron transformaciones logarítmicas cuando la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas resultaba en un valor de $p < 0.05$. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para expresar la correlación entre Gln y % de agua cerebral. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

9. Resultados

Primera parte

La mortalidad de las ratas con LCB a las 6 semanas fue de 95% para el grupo LCB y de 100% para las LCB Mn (Fig. 12), por lo que para el análisis de los datos sólo se consideraron los grupos tratados por 2 y 4 semanas.

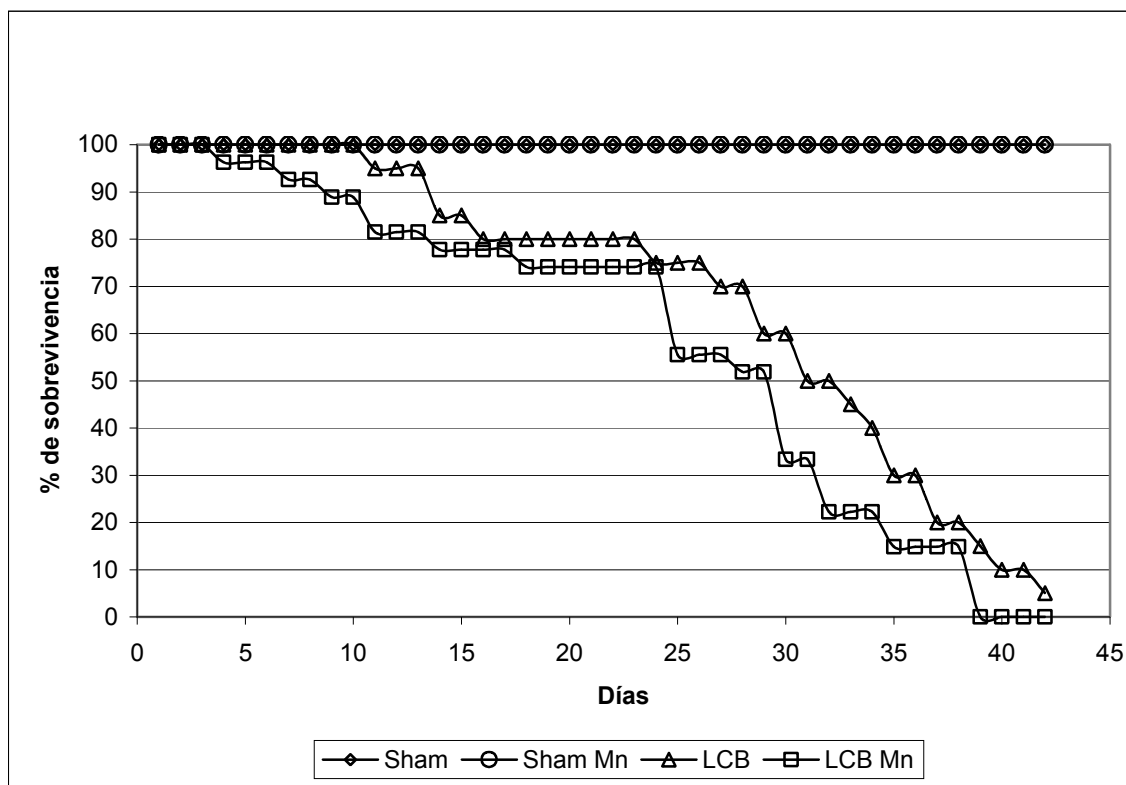


Fig. 12. Gráfica de supervivencia. Supervivencia de las ratas Sham, Sham Mn, LCB y LCB Mn durante seis semanas de tratamiento.

Los tamaños relativos del bazo y del hígado (peso del órgano/peso de la rata) se encontraron significativamente aumentados en las ratas LCB y LCB Mn con respecto a las Sham y Sham Mn (Tabla 1). No se encontró efecto del Mn en estos parámetros y lo mismo ocurrió para la cuantificación de colágena hepática.

Tabla 1. Comparación de los pesos relativos de hígado y bazo y niveles de colágena hepática.

Tratamiento (semanas)	(Peso hígado/peso rata) x100	(Peso bazo/peso rata) x 100	Colágena (mg/g hígado)
Sham (2)	3.66 ± 0.12	0.23 ± 0.01	0.99 ± 0.17
Sham (4)	3.35 ± 0.08	0.21 ± 0.02	1.52 ± 0.23
Sham Mn (2)	3.58 ± 0.07	0.23 ± 0.01	1.20 ± 0.06
Sham Mn (4)	3.42 ± 0.05	0.21 ± 0.01	1.02 ± 0.14
LCB (2)	6.13 ± 0.38 ⁺	0.50 ± 0.04 ⁺	1.70 ± 0.28 ⁺
LCB (4)	4.66 ± 0.50 ⁺	0.68 ± 0.06 ⁺	8.79 ± 1.03 ⁺
LCB Mn (2)	5.59 ± 0.24 ⁺	0.48 ± 0.05 ⁺	2.57 ± 0.23 ⁺
LCB Mn (4)	4.68 ± 0.41 ⁺	0.68 ± 0.02 ⁺	7.50 ± 1.04 ⁺

El único efecto que resultó significativo para los diferentes parámetros fue la ligadura del conducto biliar común. ⁺ p<0.05 para el efecto de la LCB.

En las preparaciones histológicas se observó arquitectura hepática alterada en las ratas LCB y LCB Mn a diferencia de las ratas Sham y Sham Mn (Fig. 13), mostrando los signos característicos de la cirrosis como son fibrosis, necrosis, inflamación, proliferación ductular y regeneración celular (Fig. 14). La fibrosis resultó mucho más extensa a las cuatro que a las dos semanas, como se corroboró por medio de la determinación de colágena (Tabla 1). Las actividades de la ALT, GGT y FA, así como los niveles de bilirrubinas en las ratas LCB y LCB Mn fueron significativamente mayores que los valores obtenidos para las ratas Sham y Sham Mn (Tabla 2). En todos los casos resultó estadísticamente significativo sólo el efecto de la LCB sin significancia para la acumulación de Mn ni para la interacción LCB-Mn.

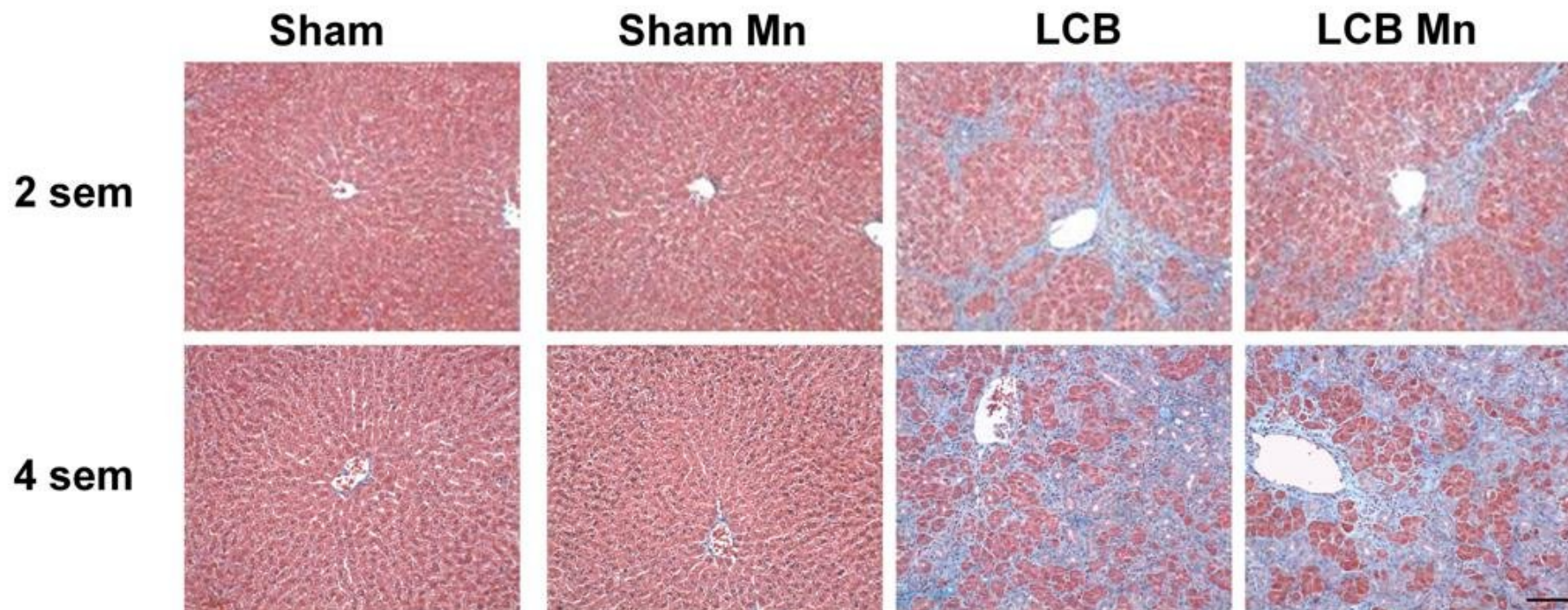


Fig. 13 Preparaciones histológicas de hígado después de dos y cuatro semanas de tratamiento. Se observa intensa coloración azul (colágena) en las ratas LCB y LCB Mn. El grado de fibrosis es mayor a las cuatro semanas. Tinción tricrómica de Masson. Aumento 100X, barra de calibración 50 μ m.

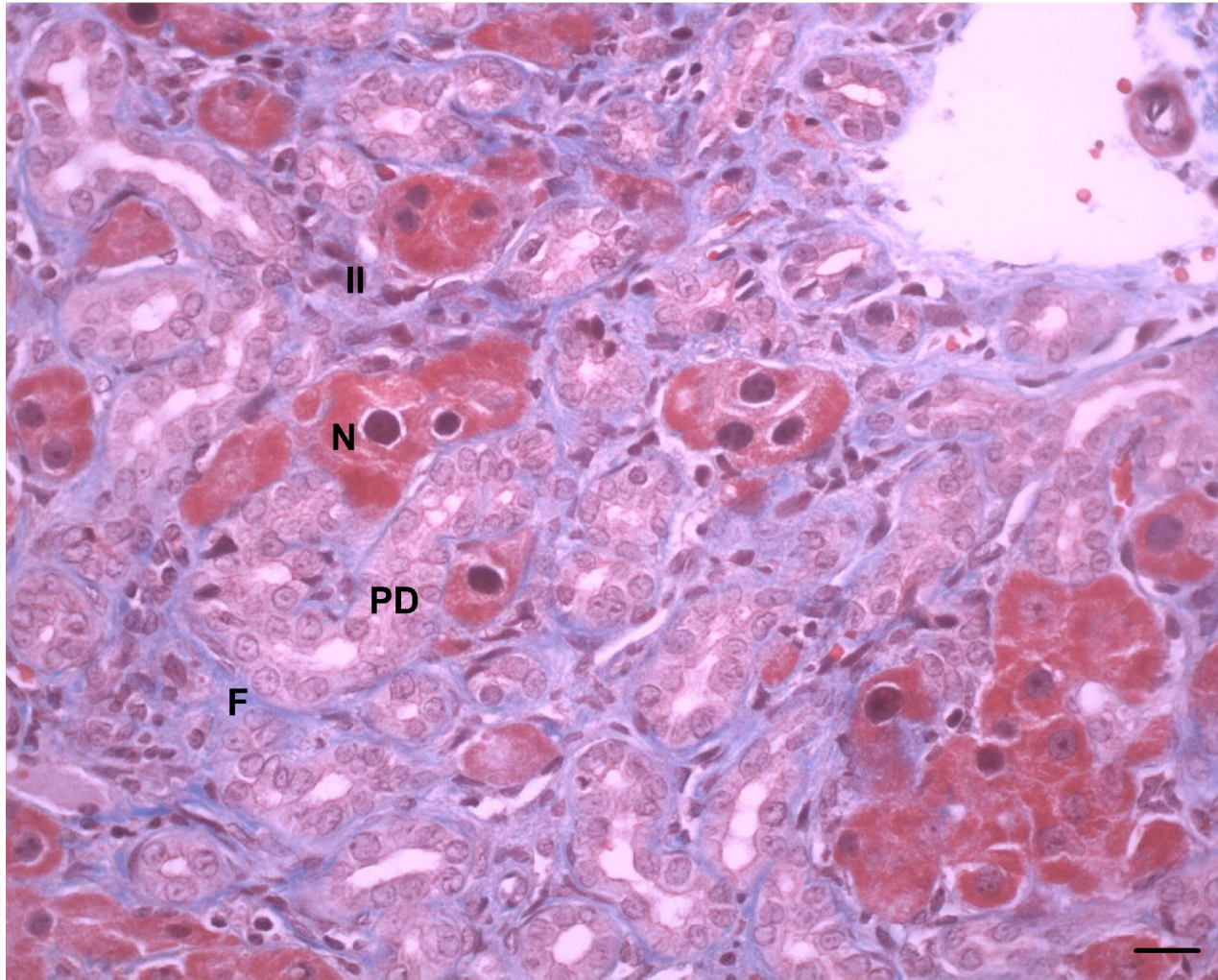


Fig. 14 Características de cirrosis observadas en las ratas con ligadura del conducto biliar. Se observa fibrosis (F) en color azul, áreas de necrosis (N), proliferación ductular (PD) e infiltrado inflamatorio (II). Tinción tricrómica de Masson. Aumento 400X, barra de calibración 20 μ m.

Tabla 2. Pruebas de funcionamiento hepático.

Tratamiento (semanas)	ALT (μmol sustrato/l/min)	GGT (μmol sustrato/l/min)	AP (μmol sustrato/l/min)	Bilirrubina total (μmol/l)	Bilirrubina directa (μmol/l)	Bilirrubina indirecta (μmol/l)
Sham (2)	30.58 ± 1.80	17.06 ± 3.38	117.43 ± 9.72	0.13 ± 0.08	N.D.	0.13 ± 0.08
Sham (4)	31.76 ± 1.72	7.01 ± 0.51	71.40 ± 4.60	0.26 ± 0.26	N.D.	0.26 ± 0.26
Sham Mn (2)	30.71 ± 3.10	7.55 ± 0.97	129.33 ± 8.99	0.35 ± 0.15	N.D.	0.35 ± 0.15
Sham Mn (4)	34.40 ± 1.90	4.04 ± 0.63	86.61 ± 7.48	0.97 ± 0.40	N.D.	0.97 ± 0.40
LCB (2)	42.78 ± 3.10 ⁺	115.88 ± 15.32 ⁺	173.19 ± 9.84 ⁺	51.24 ± 3.56 ⁺	39.72 ± 4.38 ⁺	11.51 ± 4.80 ⁺
LCB (4)	50.13 ± 6.11 ⁺	62.12 ± 5.75 ⁺	170.27 ± 12.98 ⁺	104.66 ± 12.04 ⁺	77.13 ± 9.58 ⁺	27.53 ± 4.02 ⁺
LCB Mn (2)	40.12 ± 3.50 ⁺	193.11 ± 18.85 ⁺	176.467 ± 33.10 ⁺	26.04 ± 3.34 ⁺	15.94 ± 0.81 ⁺	10.10 ± 2.32 ⁺
LCB Mn (4)	52.82 ± 1.47 ⁺	80.52 ± 6.18 ⁺	151.28 ± 9.81 ⁺	154.50 ± 7.72 ⁺	125.97 ± 6.94 ⁺	28.54 ± 3.03 ⁺

Sólo la ligadura del conducto biliar tuvo un efecto significativo sobre las pruebas de funcionamiento hepático. ND, no detectable. ⁺ p< 0.05 para el efecto de LCB.

En lo que se refiere a los niveles de Mn en cerebro, éstos fueron significativamente mayores desde las 2 semanas en las ratas LCB Mn en comparación con los demás grupos en las tres áreas analizadas. En todos los casos resultó significativa la interacción LCB-Mn. El *globus pallidus* mostró la mayor acumulación del metal (Fig. 15).

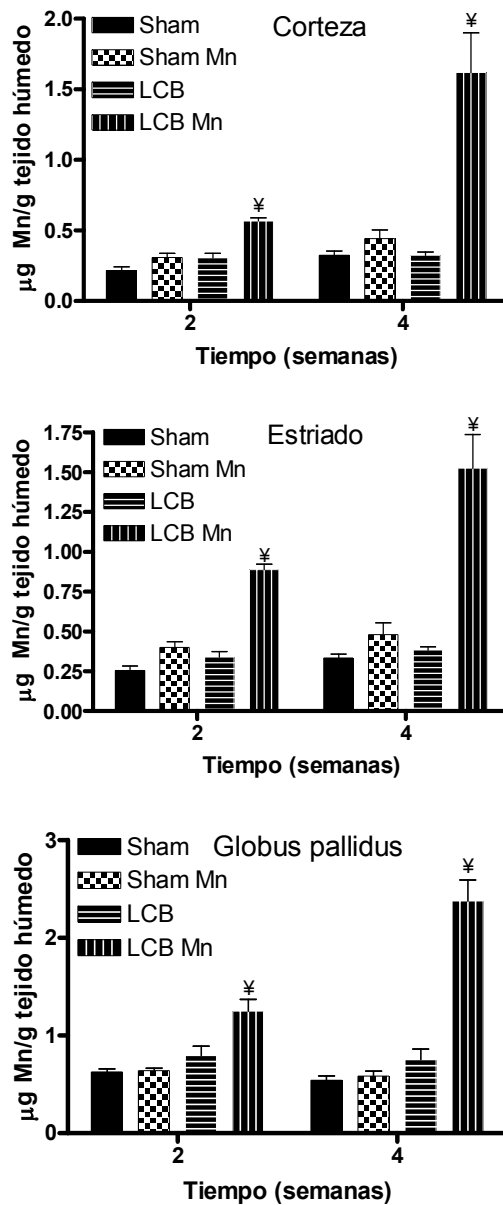


Fig. 15. Niveles de Mn en diferentes áreas cerebrales después de 2 y 4 semanas de tratamiento. Los mayores niveles de Mn se encontraron en las ratas LCB Mn. ANDEVA de dos vías ¥ $p < 0.05$ para la interacción LCB-Mn.

Tomando en cuenta las características propias de los astrocitos Alzheimer tipo II, como son núcleos pálidos y agrandados Mn con marginación periférica de la cromatina, en

las preparaciones cerebrales se observó un mayor porcentaje de astrocitos alterados en las ratas LCB y LCB Mn que en las ratas Sham y Sham Mn (Fig. 16 y 17). Sólo el efecto de la LCB sobre el número de astrocitos alterados en todas las áreas estudiadas resultó estadísticamente significativo, sin efecto del Mn.

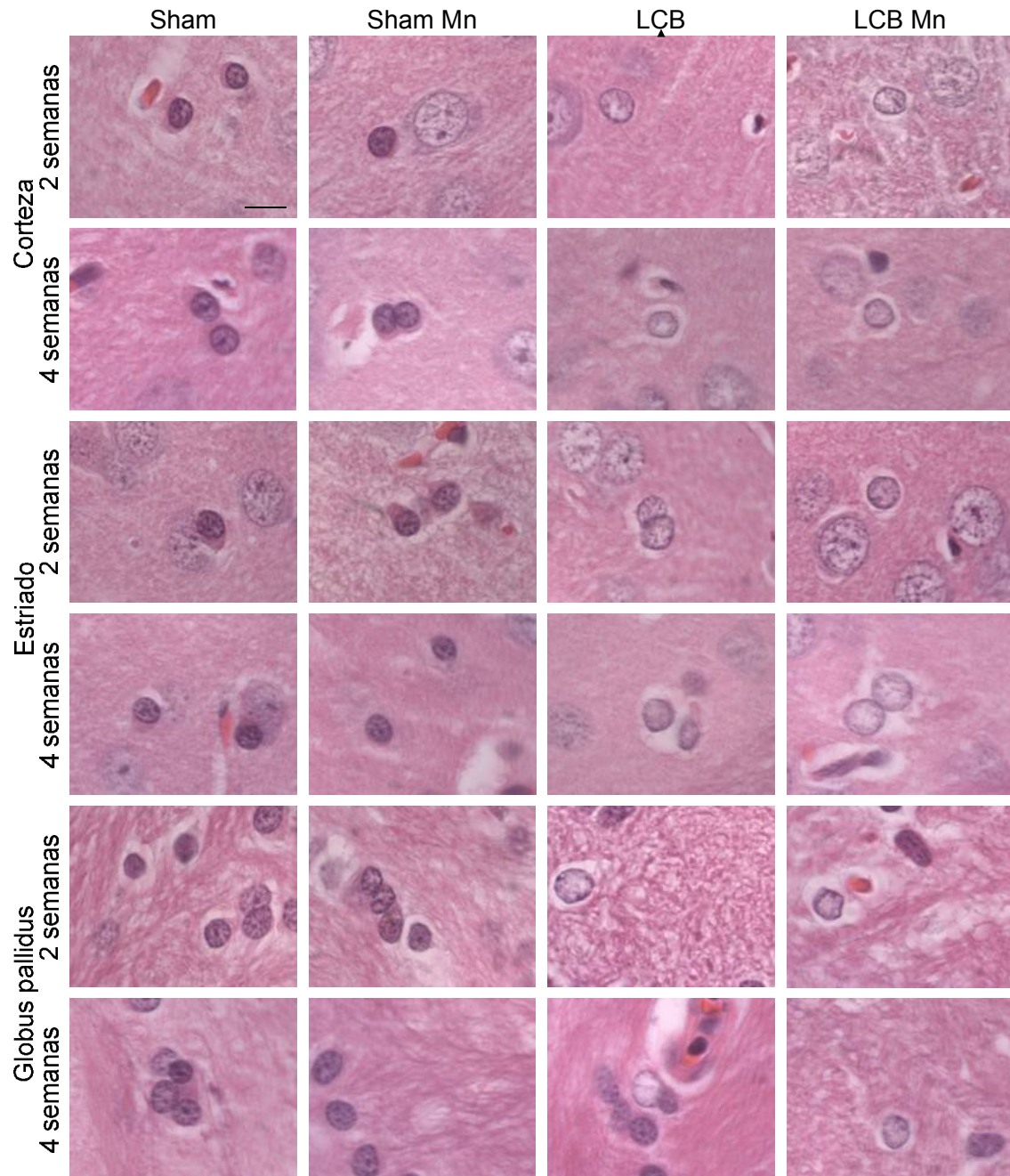


Fig. 16. Astrocitos en corteza, estriado y *globus pallidus*. En las ratas con daño hepático (LCB) se observó un mayor número de astrocitos alterados (núcleos agrandados con marginación periférica de la cromatina) después de dos y cuatro semanas de tratamiento. Tinción H&E, 1000X, barra de calibración 10 μ m.

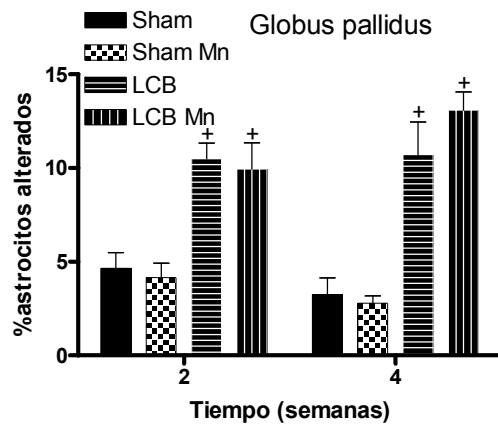
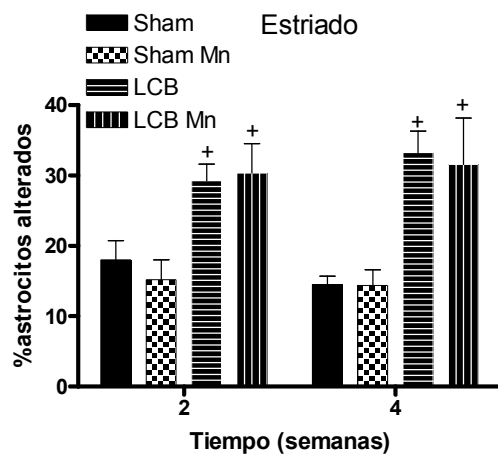
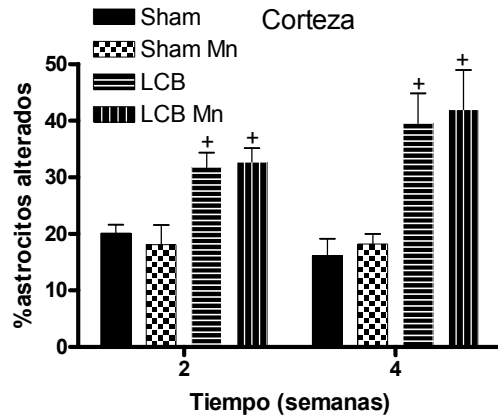


Fig. 17. Porcentaje de astrocitos alterados en corteza, estriado y *globus pallidus* por campo. Se contaron como astrocitos alterados aquéllos con núcleo pálido y marginación periférica de la cromatina con el objetivo de inmersión en cinco campos por rata. ANDEVA de dos vías ⁺ p<0.05 para el efecto de la ligadura del conducto biliar común.

El número de núcleos astrocíticos totales por campo no resultó afectado de manera significativa por ninguno de los tratamientos en ninguna de las tres áreas (Fig. 18).

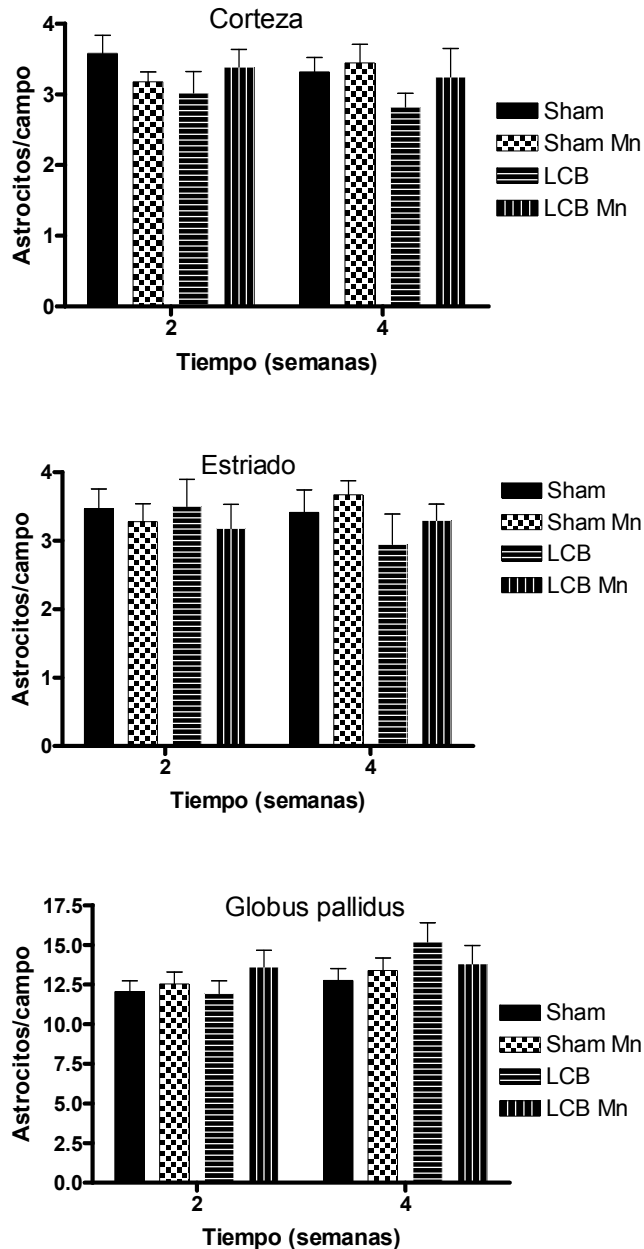


Fig. 18. Astrocitos totales por campo por rata. Se contaron todos los astrocitos en cinco campos, por área, por rata. No se encontraron diferencias significativas. ANDEVA de dos vías.

Segunda parte

Consumo de alimento

Para analizar si los tratamientos influyeron sobre el consumo de alimento en los diferentes grupos experimentales se realizó un ANDEVA de medidas repetidas tanto para los días previos como para los días en que a las ratas se les suministró alimento con amonio. En las primeras dos semanas posteriores a la cirugía (y previas al inicio

de la dieta con amonio) las ratas Sham y Sham Mn consumieron significativamente más alimento que las ratas LCB y LCB Mn por efecto de la LCB (Fig. 19). No se encontraron diferencias entre los grupos a partir del inicio del tratamiento con amonio. Se realizó una estimación del consumo de acetato de amonio y su equivalente en g de amonio a partir de los registros diarios de consumo de alimento (Tabla 3).

Tabla 3. Estimación del consumo de amonio en los grupos Am.

Tratamiento	g acetato de amonio/kg	g de amonio/kg
Sham Am	100.29 ± 6.48	23.42 ± 1.51
Sham Am Mn	107.76 ± 10.49	25.16 ± 2.45
LCB Am	93.36 ± 2.41*	21.72 ± 0.56*
LCB Am Mn	74.78 ± 5.54*	17.46 ± 1.29*

Sólo se encontró efecto significativo para el factor LCB en consumo de amonio *p<0.05 para el efecto de la LCB.

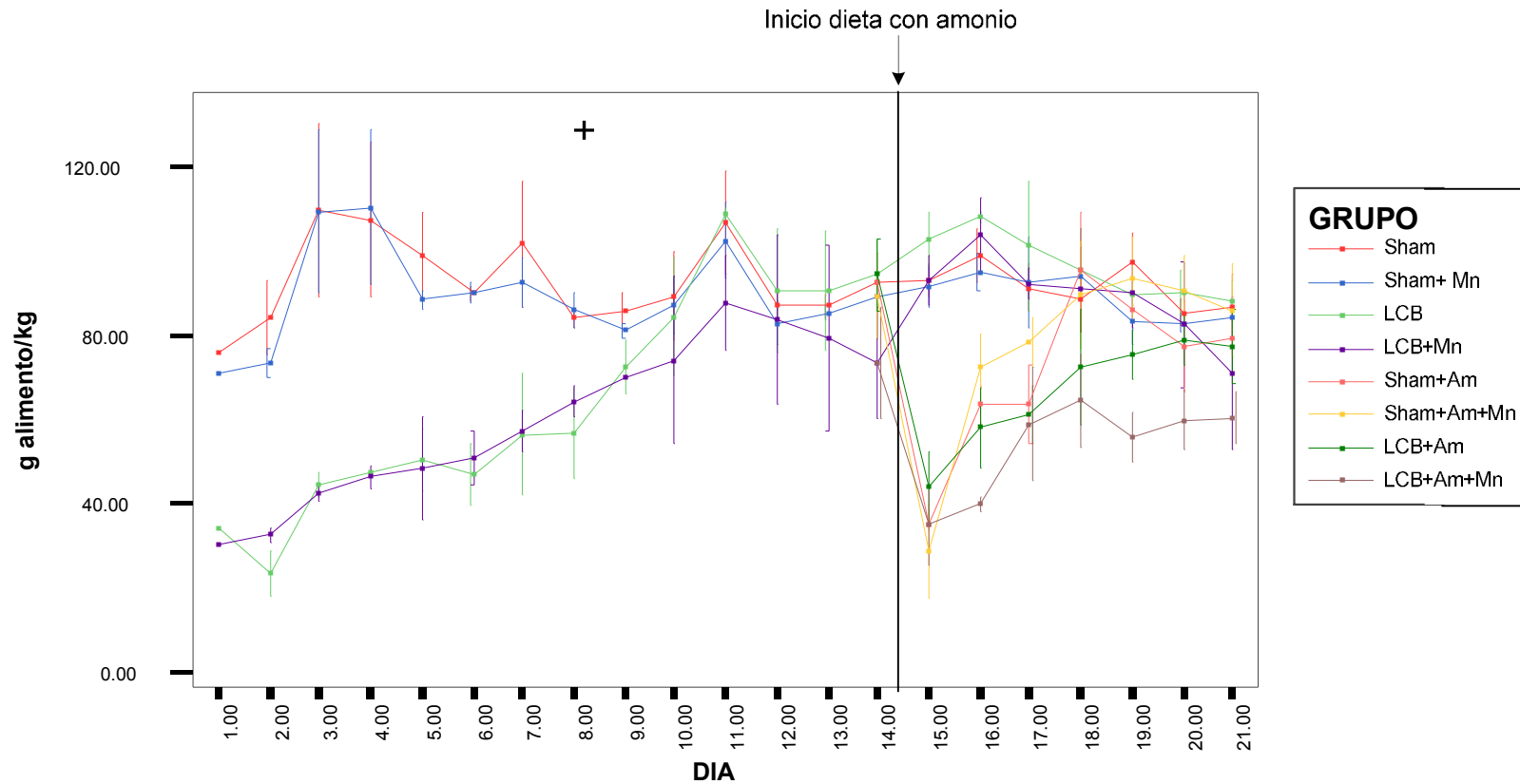


Fig. 19. Consumo de alimento antes y durante la dieta con acetato de amonio. Hasta el día 14 las ratas consumieron la dieta estándar y posteriormente los grupos Am consumieron la dieta con amonio al 20%. Las diferencias observadas en el consumo de alimento se debieron sólo al efecto del daño hepático durante las primeras dos semanas. Durante la última semana de tratamiento no hubo diferencias significativas por ninguno de los factores estudiados. ANDEVA de medidas repetidas + $p < 0.05$ para el efecto de la LCB.

Se realizó el ANDEVA de medidas repetidas para evaluar la influencia de los tratamientos sobre los pesos de las ratas (Fig 20). Las ratas LCB y LCB Mn durante todo el tratamiento mantuvieron su peso por debajo del de las ratas Sham y Sham Mn. A partir del día siguiente de iniciado el tratamiento con amonio las ratas sometidas a ese tratamiento no tuvieron el mismo aumento de peso que sus respectivos controles.

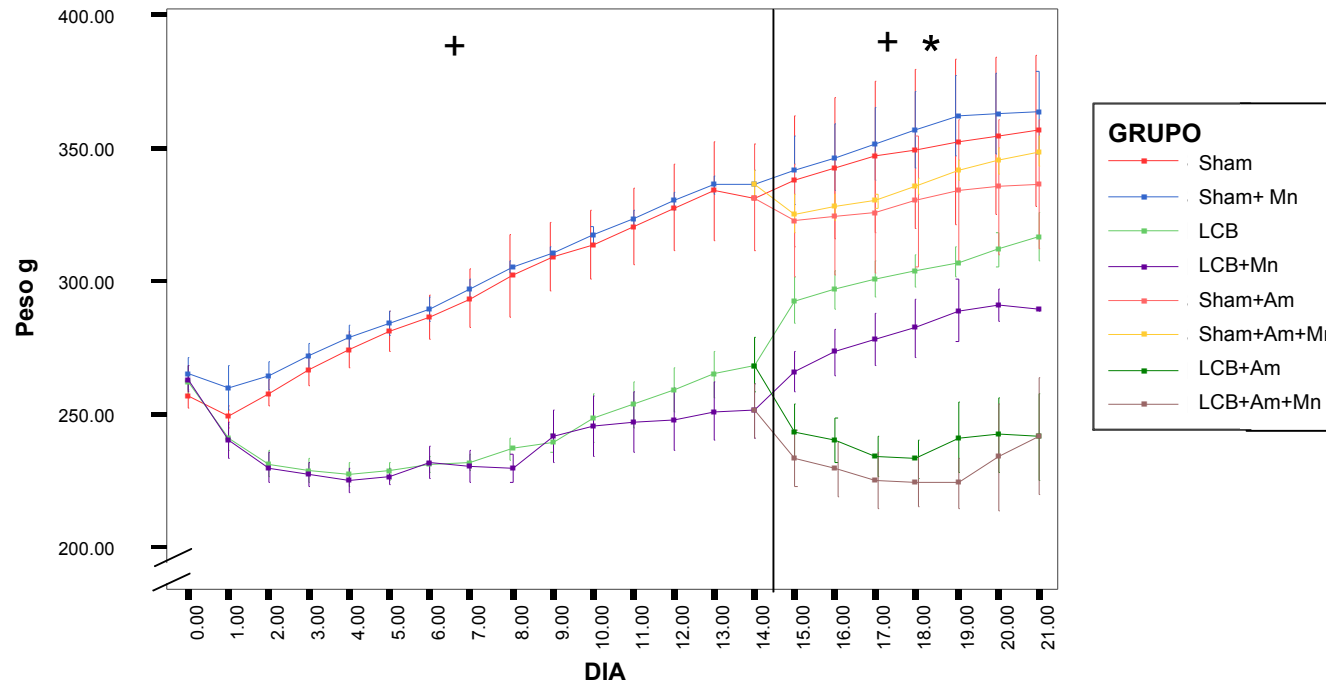


Fig 20. Pesos de las ratas antes y durante la dieta con acetato de amonio. Durante las primeras dos semanas fue significativo el efecto de la ligadura del conducto biliar. Durante la tercera semana (semana de tratamiento con amonio) el factor amonio también tuvo un efecto significativo. ANDEVA de medidas repetidas. + $p < 0.05$ para el efecto de la LCB, * $p < 0.05$ para el efecto del amonio.

Al igual que en la primera parte, se realizó el análisis histológico de los hígados de las ratas tratadas. Se observó extensa fibrosis en los grupos LCB, LCB Am, LCB Mn y LCB Am Mn a diferencia de los grupos sham (Fig. 21). No se observaron diferencias entre los grupos LCB.

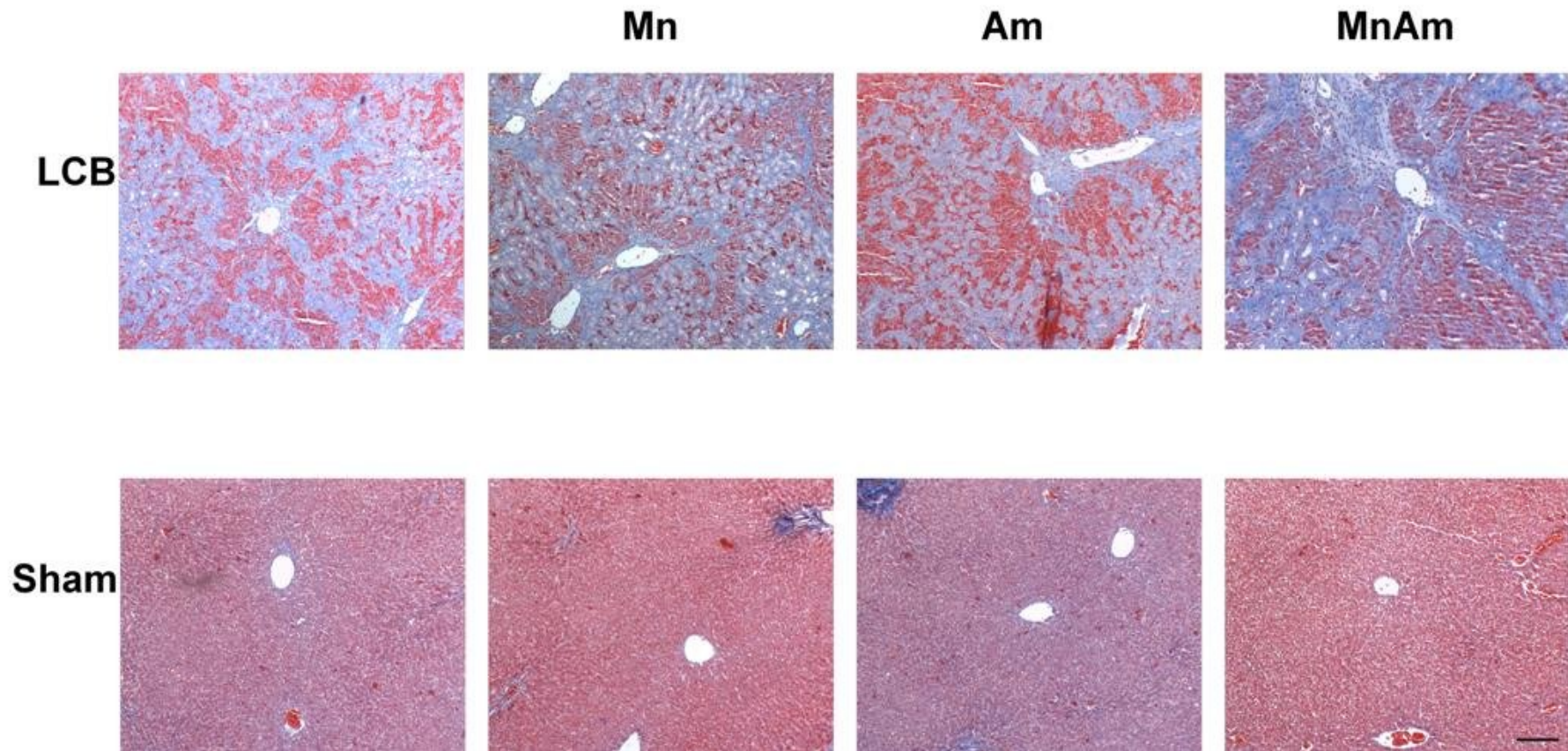


Fig. 21. Preparaciones histológicas del hígado. Después de tres semanas de tratamiento, en las ratas Sham no se observaron cambios en la arquitectura hepática, mientras que en los grupos con LCB se desarrolló fibrosis extensa. Tinción tricrómica de Masson 100X, barra de calibración 50 μ m.

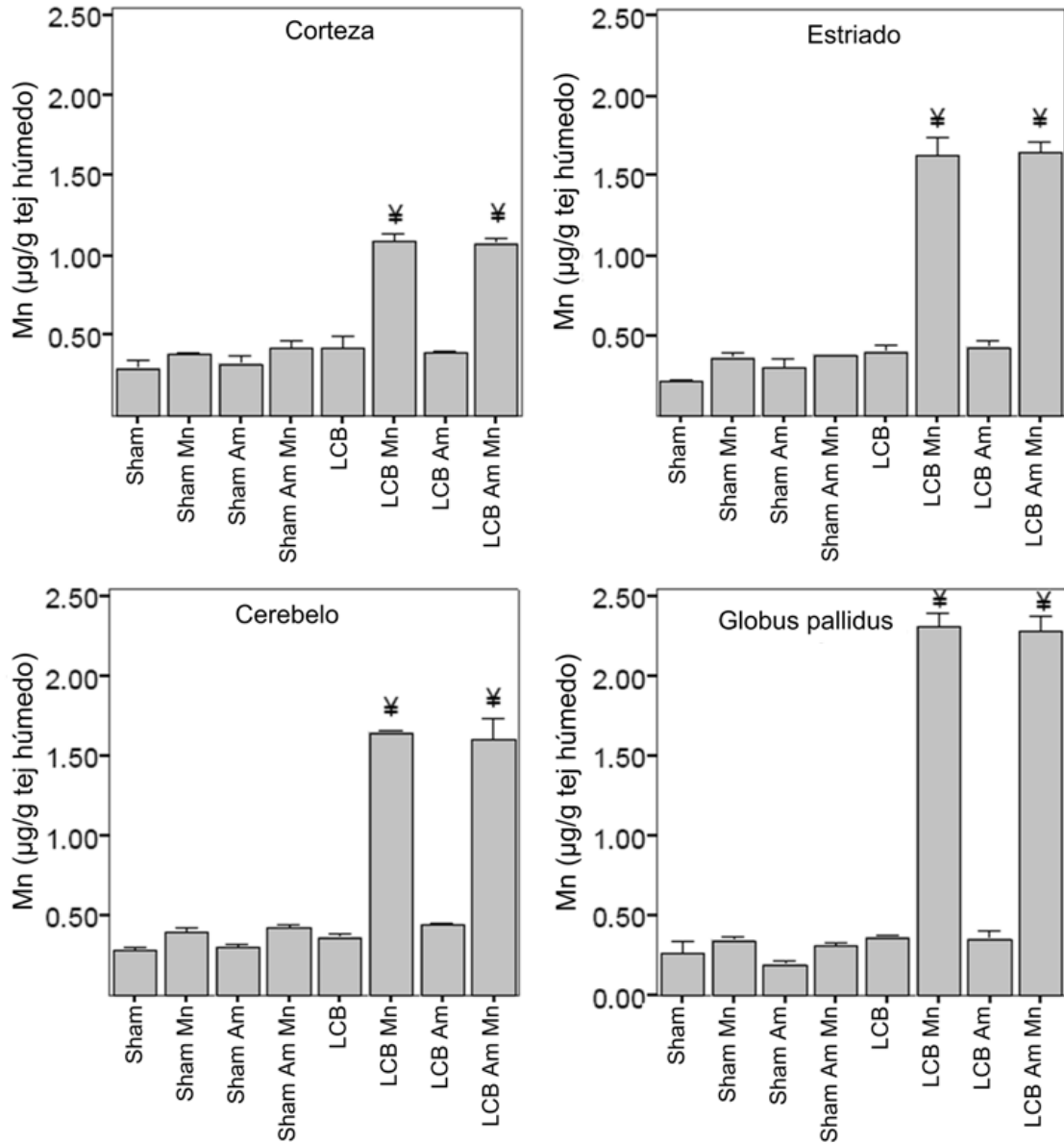
Tabla 4. Pruebas de funcionamiento hepático después de tres semanas de tratamiento.

Tratamiento	ALT (μmol substrato/l/min)	GGT (μmol substrato/l/min)	FA (μmol substrato/l/min)	(Peso hígado/peso rata) x100	(Peso bazo/peso rata) x 100
Sham	17.46 \pm 1.87	18.31 \pm 2.40	72.85 \pm 4.54	4.05 \pm 0.051	0.25 \pm 0.022
Sham Mn	20.27 \pm 1.96	16.39 \pm 2.73	66.18 \pm 5.69	3.98 \pm 0.148	0.25 \pm 0.009
Sham Am	14.71 \pm 1.73	21.56 \pm 2.07	60.83 \pm 4.14	4.04 \pm 0.109	0.22 \pm 0.011
Sham Am Mn	16.02 \pm 0.92	20.11 \pm 1.42	67.23 \pm 2.97	4.20 \pm 0.130	0.24 \pm 0.010
LCB	42.47 \pm 0.83 ⁺	70.92 \pm 11.41 ⁺	169.33 \pm 12.39 ⁺	7.81 \pm 0.329 ⁺	0.69 \pm 0.044 ⁺
LCB Mn	38.86 \pm 3.19 ⁺	75.30 \pm 3.13 ⁺	156.60 \pm 12.88 ⁺	7.99 \pm 0.553 ⁺	0.70 \pm 0.046 ⁺
LCB Am	38.66 \pm 4.17 ⁺	71.73 \pm 8.44 ⁺	160.12 \pm 11.27 ⁺	8.06 \pm 0.261 ⁺	0.68 \pm 0.049 ⁺
LCB Am Mn	36.71 \pm 4.20 ⁺	77.88 \pm 4.23 ⁺	154.99 \pm 15.35 ⁺	7.69 \pm 0.123 ⁺	0.63 \pm 0.032 ⁺

Para las pruebas de funcionamiento hepático resultó significativo sólo el efecto del daño hepático, sin influencia del tratamiento Mn o con amonio. ⁺p<0.05 para el efecto de la ligadura del conducto biliar.

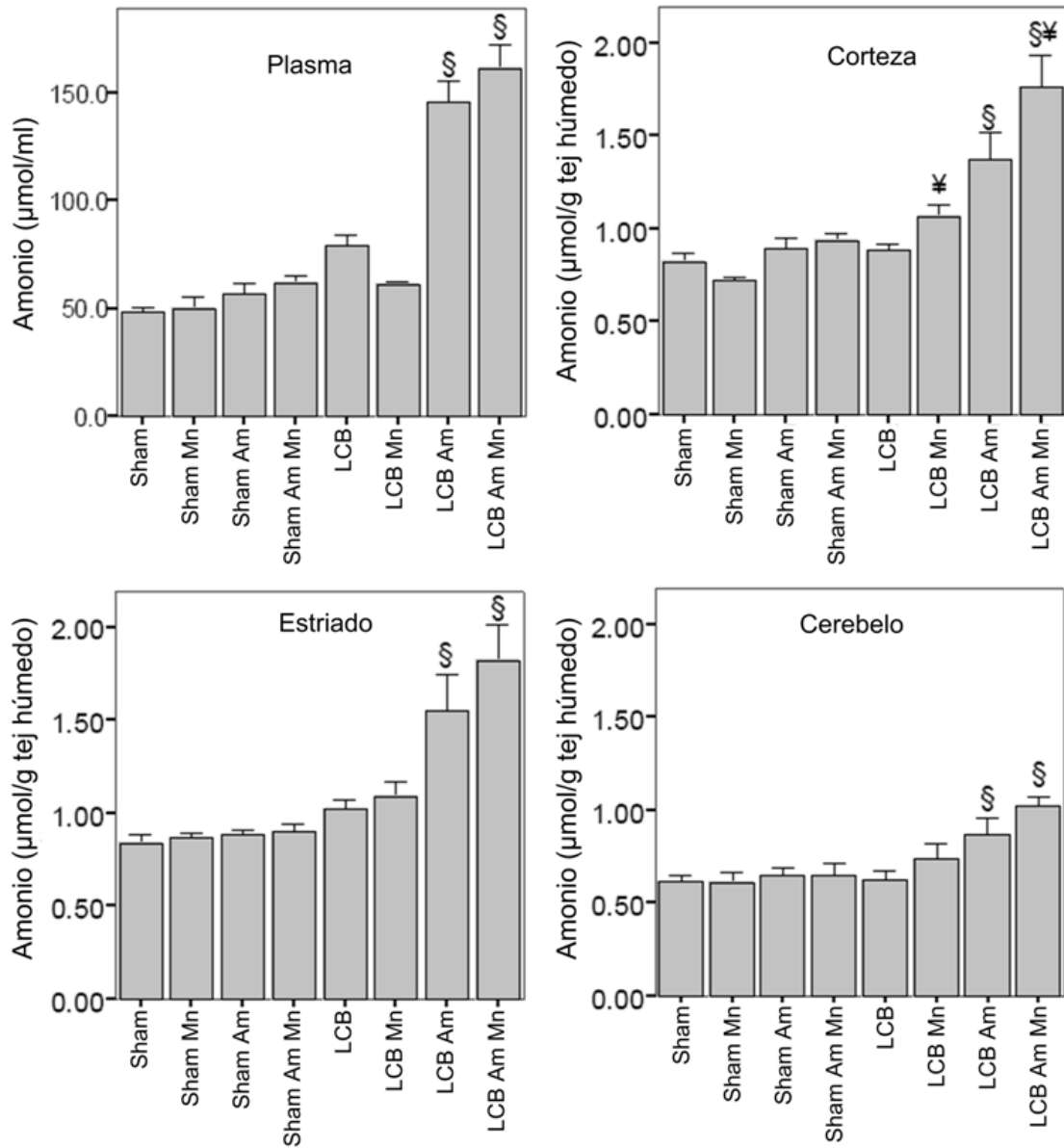
Al igual que en los experimentos realizados a dos y cuatro semanas de tratamiento, los niveles de Mn aumentaron en todas las áreas estudiadas por efecto de la interacción de la LCB y el Mn y no hubo influencia del tratamiento con acetato de amonio sobre esta variable (Fig. 22). Los grupos LCB Mn y LCB Am Mn fueron los que tuvieron los mayores niveles de Mn (280 y 273% por encima de los controles respectivamente en corteza, 688 y 698% en estriado, 487 y 473% en cerebelo, 769 y 760% en el *globus pallidus*).

Con respecto a los niveles de amonio, éstos aumentaron tanto en plasma como en cerebro por efecto de la interacción entre la LCB y el tratamiento con amonio. Así mismo, el tratamiento con Mn también influyó sobre los niveles de amonio, pues además de la interacción LCB-Am, la interacción LCB-Mn resultó significativa en corteza y, en las otras áreas se observó la misma tendencia (Fig. 23). También se exploró la posibilidad de interacción entre daño hepático, amonio y Mn sobre los niveles de Gln. La interacción LCB-amonio fue la principal causa de incremento en los niveles de Gln; sin embargo, se encontró también un efecto significativo de la interacción LCB-Mn en la corteza. Además se observó una tendencia muy similar a la de los niveles cerebrales de amonio (Fig. 24).



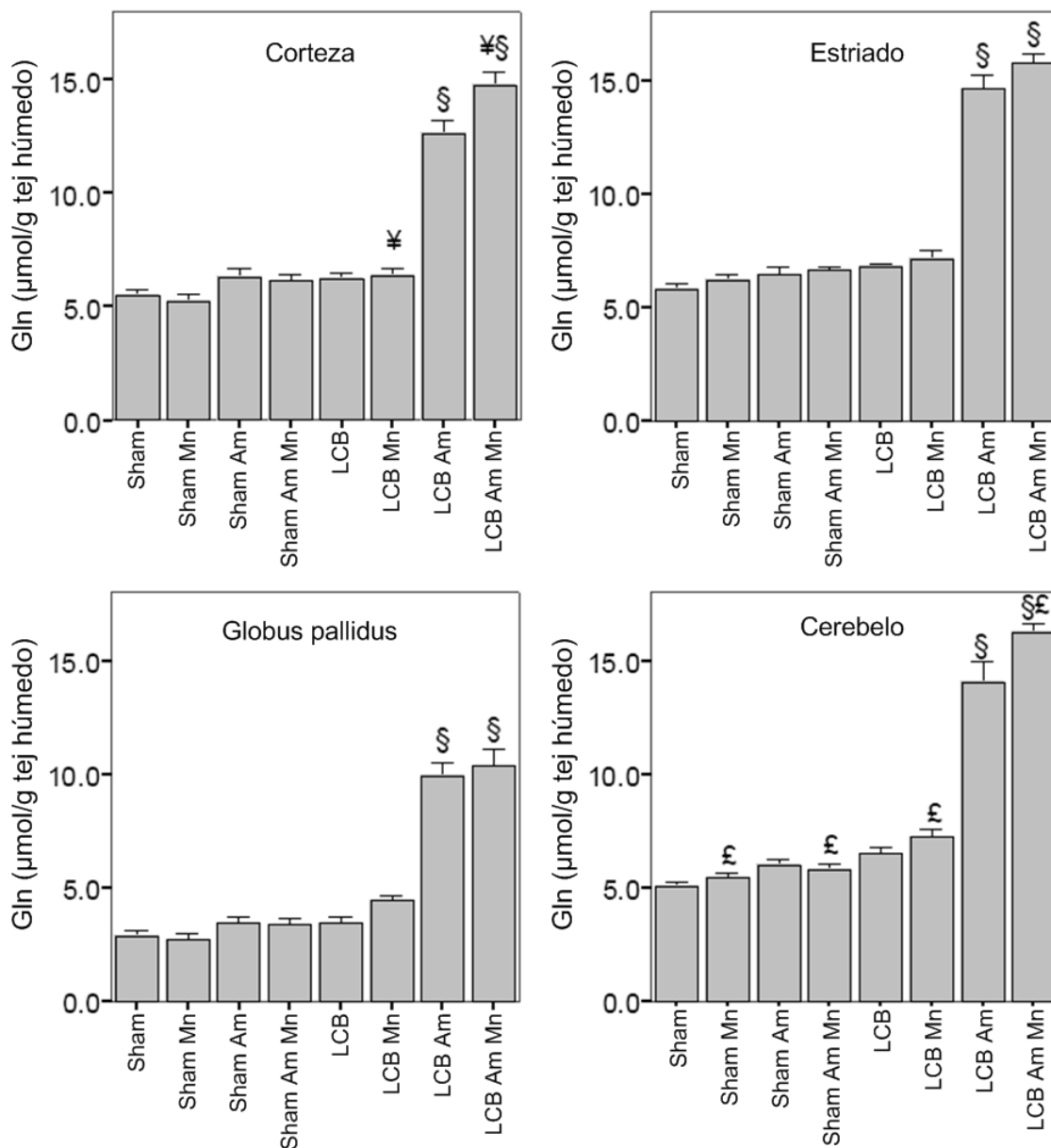
Factor o interacción	p (significancia)			
	Corteza	Estriado	Cerebelo	<i>Globus pallidus</i>
LCB	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mn	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Am	0.885	0.127	0.178	0.296
LCBxMn	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LCBxAm	0.443	0.398	0.708	0.510
MnxAm	0.908	0.257	0.254	0.697
LCBxMnxAm	0.987	0.471	0.163	0.901

Figura 22. Niveles de manganeso en diferentes áreas cerebrales. El *globus pallidus* mostró el mayor incremento en términos de porcentaje. No hubo ninguna influencia del amonio sobre los niveles de manganeso en ninguna de las áreas estudiadas. ANDEVA de tres vías. # p < 0.05 para la interacción LCB-Mn. En la parte inferior se muestra un resumen del análisis estadístico y los valores significativos están sombreados.



Factor o interacción	p (significancia)			
	Plasma	Corteza	Estriado	Cerebelo
LCB	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mn	0.746	0.071	0.163	0.127
Am	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
LCBxMn	0.102	0.016	0.518	0.138
LCBxAm	<0.001	0.010	0.003	0.014
MnxAm	0.069	0.212	0.830	0.832
LCBxMnxAm	0.341	0.627	0.560	0.884

Fig. 23. Niveles de amonio en plasma y en diferentes áreas cerebrales. La interacción LCB-Mn tuvo influencia sobre los niveles de amonio en corteza. El grupo LCB Mn mostró menor concentración de amonio en plasma que el grupo LCB pero ocurrió lo opuesto en todas las áreas cerebrales. ANDEVA de tres vías § $p < 0.05$ para la interacción LCB-amonio, ¥ $p < 0.05$ para la interacción LCB-Mn. En la parte inferior se muestra un resumen del análisis estadístico y los valores significativos están sombreados.



Factor o interacción	p value			
	Corteza	Estriado	Globus pallidus	Cerebelo
LCB	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Mn	0.122	0.075	0.392	0.022
Am	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
LCBxMn	0.020	0.424	0.200	0.099
LCBxAm	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
MnxAm	0.082	0.599	0.710	0.601
LCBxMnxAm	0.092	0.405	0.673	0.220

Figura 24. Niveles de glutamina en diferentes áreas cerebrales. Los niveles de glutamina mostraron una tendencia similar a la de los niveles cerebrales de amonio. La combinación LCB-amonio fue la mayor influencia para el incremento en los niveles de Gln. La interacción LCB-Mn también produjo un incremento en los niveles de Gln en la corteza. ANDEVA de tres vías. § p<0.05 para la interacción LCB-amonio, * p<0.05 para la interacción LCB-Mn, § p<0.05 para el efecto del Mn. En la parte inferior se muestra un resumen del análisis estadístico y los valores significativos están sombreados.

Se estudió la posibilidad de una interacción entre los mismos factores sobre el contenido de agua cerebral. Únicamente el daño hepático resultó estadísticamente significativo y hubo una tendencia al incremento cuando se agregan el Mn y el amonio como factores (Fig. 25). Se encontró una correlación positiva entre los niveles de Gln y el porcentaje de agua en la corteza cerebral (coeficiente de correlación de Pearson = 0.439, $p=0.01$) (Fig. 26).

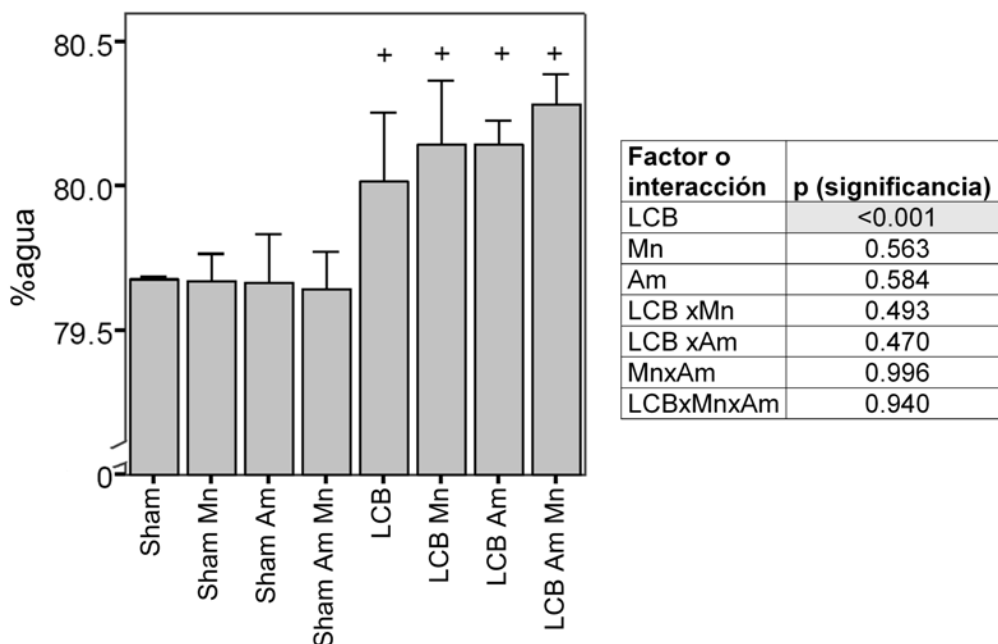


Fig. 25. Contenido de agua en corteza cerebral. Los cambios en el contenido de agua fueron influidos principalmente por el efecto de la LCB. Puede observarse una tendencia hacia un incremento cuando existe la combinación de la LCB, el amonio y el Mn. ANDEVA de tres vías. + $p<0.05$ para el efecto de la LCB. Del lado derecho se muestra un resumen del análisis estadístico y los valores significativos están sombreados.

En cuanto a la coordinación motora, se encontró significancia estadística para la LCB y para el tratamiento con Mn, mientras que las interacciones LCB-Mn y LCB-Am tuvieron un valor de p cercano a la significancia ($p=0.091$ y $p=0.092$ respectivamente). El grupo LCB Am Mn tuvo el menor tiempo de permanencia sobre el cilindro (Fig. 27).

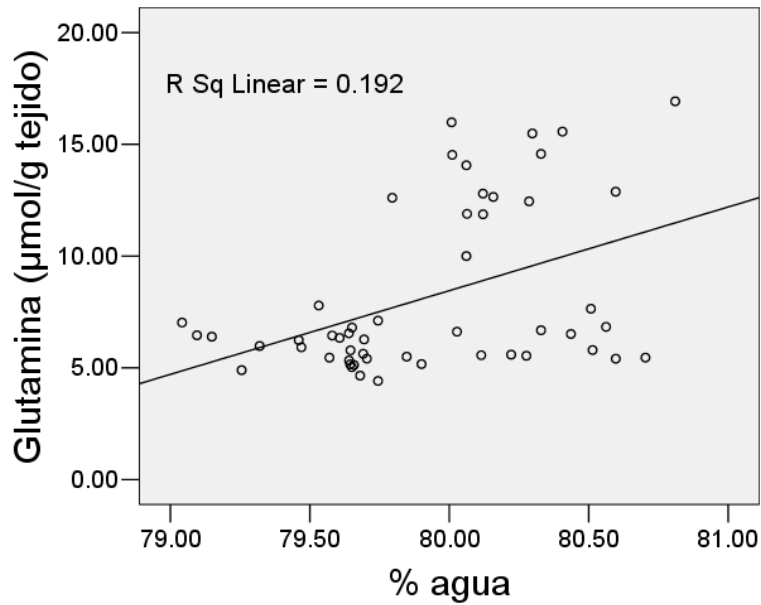


Figure 26. Los niveles de glutamina correlacionan con el contenido de agua en corteza. Los niveles de Gln correlacionaron positivamente con el contenido de agua en la corteza. Correlación de Pearson = 0.439, $p = 0.001$.

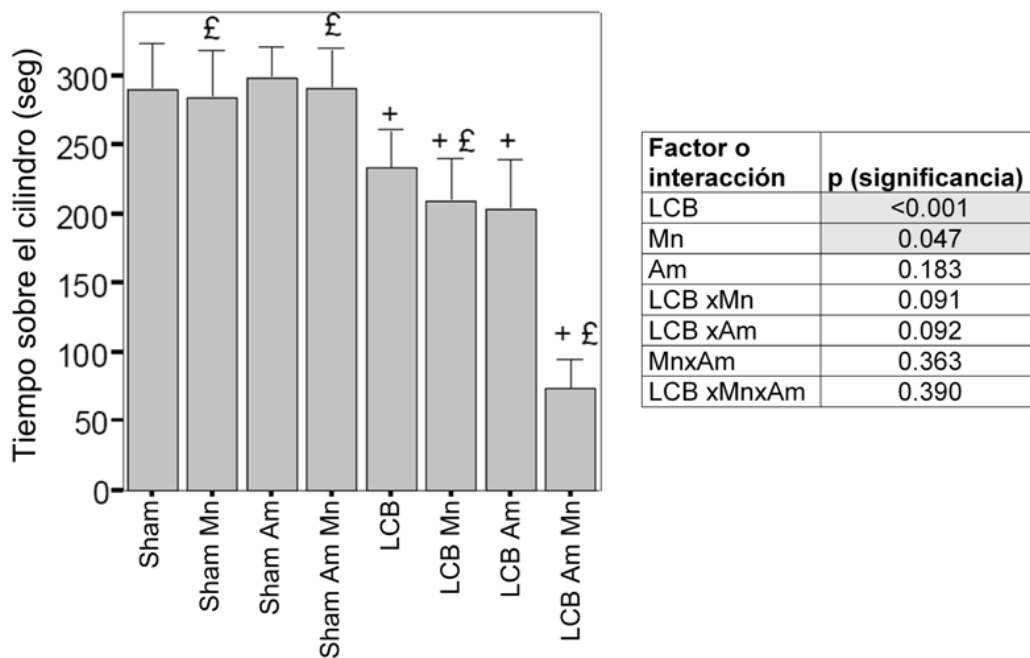


Figura 27. Coordinación motora evaluada con la prueba de Rotarod. La coordinación motora fue afectada principalmente por efecto de la LCB y del Mn. Las ratas LCB Am Mn tuvieron el menor desempeño comparado con los demás grupos. ⁺ $p < 0.05$ para el efecto de la LCB, [£] $p < 0.05$ para el efecto del Mn. Del lado derecho se muestra un resumen del análisis estadístico y los valores significativos están sombreados.

10. Discusión

En este trabajo exploramos la participación del Mn sobre diferentes factores patogénicos presentes en la EH, al mismo tiempo que se trabajó sobre la construcción de un modelo experimental que incluyera tres de los principales factores considerados como relevantes en esta patología. Una parte importante para la construcción del modelo experimental era asegurar que se reprodujeran las características más importantes de la cirrosis bajo las condiciones del estudio, pues la cirrosis es el punto de partida para dar lugar a la encefalopatía hepática, caracterizada por acumulación de Mn y de amonio a nivel sistémico y del sistema nervioso.

En la cirrosis, con frecuencia, se encuentran hepatomegalia y esplenomegalia (Heidelbaugh y Bruderly, 2006), razón por la que se incluyeron como parámetros en estos experimentos los pesos relativos del hígado y el bazo, mismos que se encontraron aumentados en las ratas sometidas a LCB. El bazo aumenta de tamaño como consecuencia de alteraciones hemodinámicas inducidas por el daño hepático (Katsuka et al., 2005; Bolognesi et al., 2002), lo cual nos indica que este modelo reproduce dichas alteraciones.

Entre las alteraciones hemodinámicas producidas en la cirrosis se encuentra la hipertensión portal que conduce a la generación de varices esofágicas y gástricas (Heidelbaugh y Bruderly, 2006), que pueden desencadenar hemorragias internas. Esto sucedió en algunas de las ratas con LCB en las que se llevó a cabo un análisis *postmortem* y se encontraron signos de hemorragias internas, siendo éste un factor importante al que puede atribuirse la alta mortalidad encontrada en esos grupos (Akimoto et al., 2005).

Por otro lado, las muestras histológicas reflejan que, como consecuencia de la obstrucción del flujo biliar por la cirugía, el hígado modificó su arquitectura normal y presenta fibrosis desde las dos semanas de tratamiento y estas alteraciones son más evidentes a las cuatro semanas. Además de estos cambios, se observó fibrosis, abundante proliferación ductular, así como áreas de necrosis e infiltrados

inflamatorios, todas características de la cirrosis (Popper, 1977; Kontouras et al., 1984). Asimismo, el incremento en los niveles de colágena, estimada por medio del contenido de 4-hidroxiprolina, coincidió con la fibrosis observada en las preparaciones histológicas.

En lo que se refiere a la actividad de las enzimas hepáticas, todas las que se analizaron se encontraron aumentadas como consecuencia de la LCB. El incremento en los niveles plasmáticos de estas enzimas es indicativo del daño directo a los hepatocitos pues tanto la GGT como la FA son enzimas de su membrana plasmática y la ALT se encuentra en su citosol (Muriel, 1998). El aumento en las bilirrubinas se explica por un lado, por la obstrucción del flujo biliar producida por la cirugía y por otro, por el daño posterior a las células hepáticas que les impide llevar a cabo su función de conjugación y excreción (Labori y Raeder, 2004).

En conjunto, la presencia de hepatomegalia y esplenomegalia, los datos histológicos y los datos bioquímicos mostraron que por medio de LCB se establece cirrosis hepática en las ratas, con rasgos similares a los que se encuentran en la cirrosis biliar secundaria en humanos (Karadeniz et al., 2008).

De acuerdo a los resultados, la exposición a Mn por vía oral no afectó significativamente la función hepática tanto en las ratas con operación falsa como en las ratas con daño hepático por colestasis.

Como se mencionó anteriormente, la cirrosis conduce a diversas alteraciones en la función cerebral y, en muchas ocasiones, al desarrollo de EH. En los pacientes cirróticos con EH pueden presentarse síntomas extrapiramidales que correlacionan con una alta incidencia de una señal de hiperintensidad en imagenología de resonancia magnética T1 en el *globus pallidus* y dicha señal está relacionada con los niveles de Mn en sangre y en los ganglios basales (Pujol et al., 1993; Das et al., 2008). Esta es una de las razones por las que se ha propuesto al Mn como un factor relevante en la patogénesis de la EH (Normandin y Hazell, 2002). El Mn está relacionado con las alteraciones neuropsiquiátricas presentes en la EH por ser

similares a las que se presentan en el manganimismo (Calne et al., 1994). De ahí la importancia de contar con un modelo en el que se tuviera acumulación de Mn en presencia de cirrosis. Adicionalmente, el Mn está relacionado con la presencia de alteraciones morfológicas en los astrocitos de pacientes cirróticos con concentraciones elevadas de este metal (Klos et al., 2006).

En reportes previos (Montes et al., 2002; Montes et al., 2003), el modelo de LCB y administración de Mn en el agua de bebida condujo a concentraciones elevadas de Mn en diversas áreas cerebrales (corteza, estriado y *globus pallidus*), siendo este incremento mayor en las ratas LCB Mn como consecuencia de la obstrucción del flujo biliar, que constituye la principal vía de eliminación para este metal (Schroeter et al., 2011).

Existen diversas explicaciones a la acumulación selectiva del Mn en los ganglios basales, como la posible presencia de astrocitos regionalmente diferenciados y particularmente sensibles al Mn (Hazell, 2002). Otra posibilidad es que el Mn utiliza mecanismos de transporte mediados por Tf en el cerebro (Aschner y Gannon, 1994; Aschner y Dorman, 2006) y las áreas que acumulan Mn, como el *globus pallidus*, son eferentes a áreas con alta densidad de receptores de transferrina (TfR), por lo que estos sitios pueden acumular Mn vía transporte axonal (Sloot y Gramsbergen, 1994).

En pacientes cirróticos se encuentra con alta frecuencia una alteración en la morfología glial, conocida como astrocitosis Alzheimer tipo II y se ha propuesto que, además del amonio (Felipo y Butterworth, 2002), el Mn podría ser un factor en el desarrollo de esta alteración (Hazell et al., 2006; Normandin y Hazell, 2002) por lo que se decidió emplear este modelo para conocer si la acumulación crónica de Mn en el cerebro de las ratas cirróticas induciría astrocitosis de Alzheimer tipo II.

El área en la que se esperaba encontrar un mayor porcentaje de astrocitos alterados era el *globus pallidus* por reportes acerca de que esta área acumula el Mn en mayor proporción con respecto a otras áreas (Rose et al., 1999; Pomier-Layrargues et al., 1995) y presenta cambios morfológicos en los astrocitos como consecuencia de la

presencia de niveles elevados de Mn (Olanow et al., 1996). Aunque se observó una ligera tendencia a un aumento en el porcentaje de astrocitos alterados en *globus pallidus* por el tratamiento de LCB y Mn, el incremento sólo resultó estadísticamente significativo como consecuencia de la LCB para todas las áreas, y no se encontró una diferencia significativa atribuible al Mn, a pesar de que los niveles del metal se encontraban muy elevados en los cerebros de las ratas con daño hepático tratadas con Mn.

Un hecho importante es que se observaron cambios morfológicos, como núcleos agrandados y pálidos, con marginación periférica de la cromatina, desde las dos semanas de tratamiento en los grupos LCB y LCB Mn, por lo que es posible que los cambios morfológicos en los astrocitos tengan lugar desde etapas relativamente tempranas de la cirrosis. Además, se esperaba un incremento en el número total de astrocitos como consecuencia de la acumulación de Mn en el cerebro de las ratas LCB Mn como se ha observado en la intoxicación por Mn en modelos de exposición crónica (Pentschew et al., 1963) y subaguda (Hazell et al., 2006); sin embargo, el Mn no causó un efecto significativo en este parámetro. Tanto Pentschew et al. (1963) (en un experimento crónico en primates no humanos) como Hazell, et al. (2006) (en un experimento subagudo en ratas) reportaron la presencia de astrocitosis Alzheimer tipo II atribuible a la intoxicación por Mn; sin embargo, existen al menos dos diferencias fundamentales entre estos experimentos y el modelo empleado para este proyecto; la primera es que la cirrosis hepática no estaba presente y la segunda es que ambos autores utilizaron una vía de administración diferente para el Mn, mientras ambos grupos de investigación emplearon la vía intraperitoneal, en este modelo se empleó la vía oral. Lo anterior podría implicar diferentes efectos del Mn sobre la morfología astrocítica, dependiendo de la vía de administración y del tiempo de exposición, pues es posible que los efectos del Mn no sean los mismos dependiendo de estos factores. A este respecto, existen reportes de diferencias temporales y espaciales en la distribución del Mn dependiendo de la vía de administración. En el trabajo realizado

por Roels et al. (1997) se encontró que al administrar dosis equivalentes de Mn por las vías inhalatoria, i.p (ambas evitan la circulación enterohepática) y oral la acumulación de Mn no fue la misma en las áreas cerebrales (por ejemplo, por vía inhalatoria el aumento en el estriado fue muy alto en comparación con las otras vías). La explicación que dan los autores a este fenómeno es que el transporte del Mn hacia el cerebro es principalmente por los capilares por un mecanismo saturable (transporte activo) y cuando este mecanismo se satura, el transporte del Mn se favorece a través de LCR (difusión pasiva) y las regiones adyacentes a los ventrículos laterales (como el estriado) se exponen a altas concentraciones de Mn. Debido a que en este trabajo se realizó la administración en el agua de bebida, la dosis diaria de Mn se distribuyó a lo largo del día, posiblemente evitando la saturación de los mecanismos de transporte activo. Cabe mencionar que se empleó la vía oral por ser la vía más común de entrada del Mn al organismo (Klos et al., 2006).

No se observaron cambios en el número total de astrocitos en ninguno de los grupos experimentales. Ni el daño hepático ni el tratamiento con Mn produjeron un incremento en el número de estas células en ninguna de las áreas estudiadas aunque los niveles de Mn aumentaron significativamente en las ratas LCB Mn. Reportes de Jover et al. (2006) indican que el número total de astrocitos se conserva aún en presencia de daño hepático en la corteza de ratas con daño hepático inducido por LCB. También es posible que, debido a que los astrocitos se expusieron de manera gradual al Mn, éstos fueran capaces de compensar el daño, pues algunos autores han descrito que estos cambios pueden ser reversibles dependiendo del tipo y magnitud del daño al que estas células se expongan (Ma, 2001).

A pesar de que no se encontró diferencia en el número de astrocitos alterados y totales por efecto del Mn, esto no descarta la posibilidad de su influencia en la progresión de la morfología normal a alterada. Es posible que otros factores diferentes a la acumulación de Mn en el cerebro y asociados con la presencia de cirrosis participen en el incremento del número de astrocitos que se observa en los cerebros

postmortem de pacientes cirróticos. Los factores y los mecanismos moleculares por los cuales los astrocitos adquieren la morfología que se manifiesta en la astrocitosis Alzheimer tipo II en el cerebro de pacientes cirróticos se desconocen, aunque se asocian con niveles elevados de amonio y de Mn, entre otros, como incremento de neuroesteroides (Norenberg et al., 1997) y recientemente con la deficiencia de tiamina, pues esta deficiencia está presente en otra patología en la que se encuentra esta misma alteración en la morfología astrocítica, la encefalopatía de Wernicke (Butterworth, 2009).

Una vez que se determinó que el Mn no afectó de manera significativa el número de astrocitos alterados, la siguiente pregunta a responder era si el Mn y el amonio podrían interactuar para producir cambios en el cerebro de ratas cirróticas como, incremento en los niveles de Gln e incremento en el contenido de agua cerebral, partiendo de la premisa de que es posible que el amonio y el Mn tengan efectos sinérgicos sobre estos parámetros (Butterworth, 2008). Para responder a esta pregunta se tomó como base el modelo con el que se había estado trabajando en este grupo de investigación y que se empleó para la primera parte de este proyecto. Se agregó como factor la acumulación de amonio y para lograrla se utilizó una dieta con acetato de amonio 20% p/p.

Se corroboraron nuevamente las características que se habían evaluado en la primera parte de este estudio, como el incremento en los niveles de enzimas hepáticas en el plasma, la presencia de esplenomegalia y de hepatomegalia, así como alteraciones en la arquitectura hepática. Todas estas características se observaron a las tres semanas posteriores a la cirugía.

Como se mencionó anteriormente, cuando la función hepática está alterada, aumenta la susceptibilidad al incremento de amonio, Mn y Gln en el cerebro.

De manera consistente, el *globus pallidus* fue el área que acumuló Mn en mayor grado que las otras áreas. De acuerdo a los resultados, el tratamiento con amonio no tuvo ninguna influencia significativa sobre los niveles de Mn.

Existe evidencia de que la disfunción hepatocelular también conduce a alteraciones en el metabolismo del amonio, principalmente a través del ciclo de la urea, e incrementa el riesgo de EH (Chrzanowska et al., 2009) y es por ello que las ratas LCB Am y LCB Am Mn, las cuales fueron tratadas con amonio en la dieta, no compensaron el incremento, a diferencia de las Sham Am y las Sham Am Mn.

Como se esperaba, la interacción LCB-amonio fue significativa para la acumulación de esta sustancia tanto en plasma como en las diferentes áreas cerebrales. Además, la interacción LCB-Mn favoreció el incremento en los niveles de amonio en la corteza. A este respecto, también es importante mencionar que el grupo LCB Mn, a diferencia de los otros grupos, mostró un comportamiento diferente en cuanto a los niveles de amonio cuando se comparan el plasma y el cerebro en términos de la tendencia observada, pues los niveles de amonio fueron menores para el grupo LCB Mn que para las ratas LCB en el plasma, y lo contrario ocurrió en todas las áreas cerebrales. Esto sugiere un comportamiento diferente en los niveles de amonio para el plasma y el cerebro, es decir, una acumulación de amonio en el cerebro debida a un fenómeno específico en este órgano promovido por la acumulación cerebral de Mn.

Existen diversas alternativas que podrían explicar este comportamiento ocasionado por el Mn en las ratas con daño hepático, por ejemplo, disminución en la actividad de la GS, aumento en la actividad de la PAG y aumento en el transporte de amonio hacia el cerebro. El cerebro lleva a cabo la destoxificación de amonio por medio de la GS (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979); por lo tanto, la disminución de la actividad de la GS provocaría un aumento en los niveles de amonio. Si la actividad de esta enzima estuviera disminuida en las ratas con daño hepático tratadas con Mn, se esperaría que estos grupos tuvieran una disminución en los niveles de Gln. A este respecto, Montes et al. (2003) reportó que el Mn no disminuye la actividad de la GS en el cerebro de ratas cirróticas, por el contrario causa un aumento en la actividad de la enzima en la corteza cerebral. Por otro lado, también en el ciclo glutamato-glutamina, la PAG convierte la Gln a glutamato y amonio; un incremento en la actividad de esta

enzima también causaría un aumento en los niveles de amonio. Si la actividad de la PAG estuviera aumentada, se esperaría que las ratas con daño hepático tratadas con Mn tuvieran disminución de los niveles de Gln. Ambas condiciones no se reflejan en los niveles de Gln (Fig. 24). Probablemente el Mn favorezca la entrada de amonio al cerebro, aunque todas las posibilidades requieren estudiarse en detalle.

Considerando que el Mn pudiera favorecer la entrada de amonio, se realizó una búsqueda en la bibliografía para encontrar posibles explicaciones:

1. La existencia de un complejo entre el Mn y el amonio que pudiera favorecer la acumulación del amonio. Entre el Mn y el amonio sólo se encontró reportado un complejo cuya fórmula es $[\text{Mn}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$, el cual no es estable en medio acuoso (Cotton y Wilkinson, 2001), por lo tanto su existencia *in vivo* es poco probable.
2. La existencia de transportadores de amonio sobre los que el Mn pudiera tener algún efecto. La literatura reporta entre los transportadores de amonio a las acuaporinas (AQPs) y al NKCC1 (cotransportador de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$; es una isoforma del NKCC2 que se encuentra en la porción ascendente del asa de henle y que se encarga del 50 al 60% de reabsorción de amonio en esa zona) (Ott y Larsen, 2004; Musa-Aziz et al., 2009).

2a. Las acuaporinas humanas AQP3, AQP7, AQP8, AQP9 son permeables al amonio (posiblemente también la AQP10) (Litman et al., 2009). Algunas acuaporinas se expresan en el cerebro, como la AQP1, AQP4 y AQP9 en astrocitos, AQP4 en los vasos sanguíneos y AQP9 en neuronas (Benfenati y Ferroni, 2010). Diversos estudios muestran que algunos cationes divalentes pueden regular a estas proteínas; sin embargo, está reportado que esta regulación conduce al cierre de los canales en las acuaporinas (Tornroth-Horsefield et al., 2010). Por lo tanto, esta posibilidad no explicaría los cambios observados en este estudio.

2b. El cotransportador NKCC1 es capaz de transportar amonio (Nagaraja y Brookes, 1998), probablemente debido a que la especie cargada NH_4^+ tiene un radio iónico en su estado hidratado similar al K^+ (Cooper y Plum, 1987; Bosoi y Rose, 2009). El NKCC1 se expresa en la membrana luminal de las células endoteliales y en los astrocitos (Kahle et al., 2009). Los astrocitos presentan alta captura de amonio y una gran parte de esa captura se atribuye al NKCC1 (Nagaraja y Brookes, 1998). El NKCC1 se activa por fosforilación por medio de cinasas como la SPAK (cinasa rica en alanina y prolina relacionada con Ste20) y OSR1 (respuesta a estrés oxidante 1). Estudios *in vitro* realizados por Gagnon y colaboradores (Gagnon et al., 2006) mostraron que el Mn^{+2} incrementa la actividad de ambas cinasas y que la especificidad es mayor para el Mn^{+2} que para el Mg^{+2} . Por lo anterior, una posible explicación para los resultados obtenidos es que el Mn podría favorecer la entrada de amonio a través del NKCC1 al promover la activación de este transportador por fosforilación (Fig. 28).

Una gran cantidad del amonio que llega al cerebro entra en los astrocitos para ser convertido a Gln por acción de la enzima GS (Norenberg y Martinez-Hernandez, 1979). La Gln se considera un factor importante en la patogénesis de la EH debido a que su contenido correlaciona positivamente con el grado de EH (Laubenberger et al., 1997). Algunos autores sugieren que el incremento en los niveles de Gln tiene relación con la presencia de edema cerebral por efectos osmóticos de este aminoácido (Jalan et al., 2003); sin embargo se ha encontrado que aunque la Gln parece jugar un papel importante en el desarrollo de esta complicación, esta relación no obedece precisamente a un efecto osmótico (Jayakumar et al., 2006), sino a que la Gln podría liberar amonio dentro de la mitocondria, conduciendo a alteraciones funcionales en los astrocitos, hinchamiento celular y edema cerebral (Albrecht et al., 2010).

Resultados previos de nuestro grupo muestran que el Mn en ratas cirróticas favorece el incremento en los niveles de Gln y tal incremento no se relaciona con la actividad de la GS (Montes et al., 2003), excepto en la corteza cerebral.

En los experimentos que se presentan en este trabajo se observó una tendencia similar a la que se obtuvo para los niveles de amonio en los diferentes grupos, lo que sugiere que la influencia del Mn sobre los niveles de Gln podría estar relacionada con el incremento en el sustrato para la síntesis del aminoácido, el amonio, aunque no puede descartarse la existencia de otros mecanismos.

En la corteza, se obtuvo un efecto estadísticamente significativo para las mismas interacciones, LCB-amonio y LCB-Mn, tanto para las concentraciones de amonio como para las de Gln; sin embargo, para el cerebelo el Mn influyó significativamente sobre los niveles de Gln pero no sobre los de amonio. Esto sugiere que otros mecanismos, además de la entrada de amonio podrían estar induciendo un aumento en los niveles de Gln como resultado de la acumulación de Mn. En la figura 28 se plantea un conjunto de posibles mecanismos que pudieran favorecer la acumulación cerebral de Gln.

Cabe mencionar que los niveles de Gln fueron el único parámetro para el que se obtuvo un valor cercano a la significancia estadística ($p= 0.092$) para la interacción triple (LCBxMnxAm) y, de acuerdo a Montgomery (2001), un valor cercano a 0.1 sugiere una interacción moderada entre los factores. Esto significaría que la acumulación conjunta de Mn y amonio durante la cirrosis incrementarían los niveles de Gln más que si una sola de las dos sustancias se acumulara.

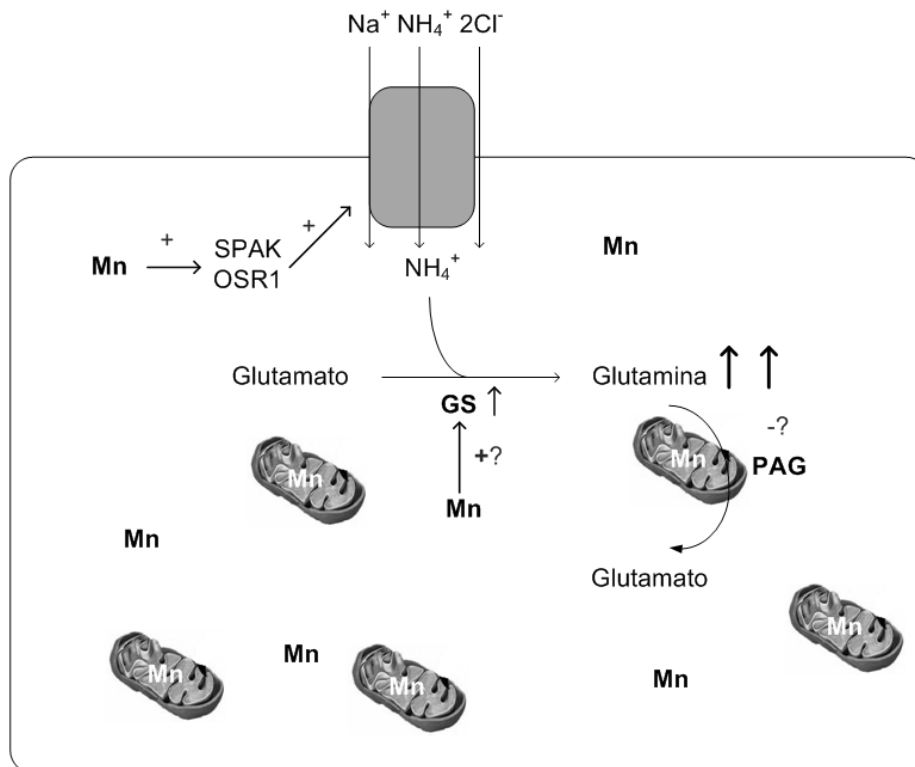


Fig. 28 Posible mecanismo por el que el Mn favorece la acumulación cerebral de amonio y glutamina. El Mn podría favorecer la fosforilación de SPAK (Cinasa rica en alanina y prolina relacionada con Ste20) y OSR1 (respuesta a estrés oxidante 1), lo cual, a su vez, conduciría a la activación por fosforilación del cotransportador NKCC1. La activación de este transportador favorecería la entrada de NH_4^+ . Al acumularse el amonio los astrocitos sintetizarían glutamina en exceso. Es posible que la inhibición de la PAG (glutaminasa activada por fosfato) o un aumento en la actividad de la GS (glutamina sintetasa) contribuyan a la acumulación de glutamina en el cerebro de ratas cirróticas.

Con respecto al contenido de agua, se observaron cambios discretos por efecto de los tratamientos, esto lo podemos relacionar al hecho de que en la falla hepática crónica en el humano sólo se presenta edema de bajo grado, a diferencia de los que ocurre en la falla hepática aguda (Cordoba et al., 2001); Sin embargo, el edema de bajo grado se considera un evento patogénico importante en la EH (Jalan et al., 2003). La tendencia que se obtuvo hacia un incremento en el contenido de agua cerebral cuando las ratas cirróticas recibieron tratamiento con amonio y Mn, aunque no fue significativa, coincide con las tendencias observadas para los niveles de amonio y Gln. En este caso sólo resultó significativo el efecto del daño hepático, por lo que este factor por sí mismo parece ser más importante que la acumulación de Mn o de amonio en el desarrollo del edema.

Algunos estudios han encontrado una correlación directa entre los niveles de Gln y el edema cerebral en pacientes con EH (Poveda et al., 2010; Yadav et al., 2010), sugiriendo una relación causa-efecto. En este trabajo también se obtuvo una correlación positiva entre los niveles de Gln y el contenido de agua cerebral. De acuerdo a estos resultados, los niveles de Gln pueden explicar, al menos parcialmente el contenido de agua cerebral, aunque deben explorarse otras posibles causas.

Los síntomas motores de la EH parecen estar asociados con alteraciones en los circuitos neuronales entre los ganglios basales y la corteza frontal (Weissenborn y Kolbe, 1998) y algunos estudios muestran que el daño a estas estructuras cerebrales produce un déficit en el desempeño de las ratas durante la prueba de rotarod (Vernon et al., 2011). En este trabajo se estudiaron áreas cerebrales relacionadas con la función motora y en todas ellas se encontró acumulación de Mn y amonio cuando se llevó a cabo el tratamiento con estas sustancias en ratas cirróticas. Debido a que el amonio y el Mn son factores que pueden alterar la función motora (Guilarte et al., 2006; Rodrigo et al., 2010) se esperaba un efecto de ellos sobre la coordinación motora en la prueba de rotarod. La LCB y el Mn como factores individuales afectaron significativamente la coordinación motora. Además las interacciones LCB-Mn y LCB-Am tuvieron valores cercanos a la significancia estadística (0.091 y 0.092 respectivamente) y cuando todos los factores estudiados (daño hepático, acumulación de Mn y acumulación de amonio) se encontraron en conjunto la coordinación motora estaba muy reducida comparada con los controles.

De manera general, se puede decir que en el modelo estudiado el Mn contribuye como factor patogénico favoreciendo la acumulación de amonio y de glutamina, principalmente a nivel cortical, y afectando significativamente la función motora.

Algunos autores sugieren que el control del Mn en la dieta sería conveniente para los pacientes con falla hepática crónica, como una opción para evitar la acumulación cerebral de este metal (Klos et al., 2006). Considerando la posibilidad de que el Mn

puede favorecer la acumulación de amonio y Gln, el control de este metal en la dieta es una estrategia terapéutica potencial.

11. Conclusiones

La ligadura del conducto biliar reprodujo las principales de características histológicas y bioquímicas presentes en la cirrosis hepática y permitió a acumulación de Mn y amonio en el cerebro, situaciones frecuentemente observadas en pacientes cirróticos.

La astrocitosis de Alzheimer tipo II se desarrolló en las ratas cirróticas independientemente de si estuvieron o no expuestas al Mn en el agua de bebida, por lo que el daño hepático resultó ser un factor más importante que la acumulación de Mn en este modelo.

Con la administración de Mn en el agua de bebida y de acetato de amonio en el alimento de ratas con daño hepático inducido por ligadura del conducto biliar se construyó un modelo para el estudio de las interacciones entre el daño hepático, la acumulación de Mn y la acumulación de amonio.

Con este modelo se reprodujeron características de la encefalopatía hepática, como son daño hepático, acumulación de manganeso, acumulación de amonio y glutamina, edema cerebral y alteraciones motoras.

El tratamiento con Mn afectó el metabolismo del amonio favoreciendo su acumulación y la de glutamina en el cerebro de ratas cirróticas, siendo la corteza el área más afectada. Esto podría ser resultado de alteraciones en el ciclo glutamato-glutamina o de un aumento en el transporte de amonio hacia el cerebro ocasionado por la acumulación de Mn.

De acuerdo a los resultados de este estudio sería conveniente que, además del control de los niveles de amonio, se considere como estrategia terapéutica el ajuste de los niveles de Mn en la dieta de pacientes cirróticos.

12. Referencias

- Aguilar MA, Miñarro J, Felipo V. 2008. Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol* 161: 704-713.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. 2005. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim* 54: 155-161.
- Albrecht J, Norenberg MD. 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44: 788-794.
- Albrecht J, Zielinska M, Norenberg MD. 2010. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol* 80: 1303-1308.
- Amodio P, Montagnese S, Gatta A, Morgan MY. 2004. Characteristics of minimal hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19: 253-267.
- Aschner M, Aschner J. 1991. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 15: 333-340.
- Aschner M, Dorman DC, 2006. Manganese: pharmacokinetics and molecular mechanisms of brain uptake. *Toxicol Rev* 25: 147-154.
- Aschner M, Gannon M. 1994. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull* 33: 345-349.
- Aschner M, Vrana KE, Zheng W. 1999. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology* 20: 173-180.
- Au C, Benedetto A, Aschner M. 2008. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology* 29: 569-576.
- Bakouh N, Benjelloun F, Cherif-Zahar B, Planelles G. 2006. The challenge of understanding ammonium homeostasis and the role of the Rh glycoproteins. *Transfus Clin Biol* 13: 139-146.
- Bender AS, Norenberg MD. 1996. Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 21: 567-573.
- Benfenati V, Ferroni S. 2010. Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168: 926-940.
- Blei AT, Olafsson S, Therrien G, Butterworth RF. 1994. Ammonia induced brain edema and intracranial hypertension in rats after portacaval anastomosis. *Hepatology* 19: 1437-1444.
- Bock NA, Paiva FF, Nascimento GC, Newman JD, Silva AC. 2008. Cerebrospinal fluid to brain transport of manganese in a non-human primate revealed by MRI. *Brain Res* 1198: 160-170.
- Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Merkel C, Sartori G, Merenda R, Nava V, Angeli P, Feltracco P, Gatta A. 2002. Change in portal flow after liver transplantation: effect on hepatic arterial resistance indices and role of spleen size. *Hepatology* 35: 601-608.
- Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Zatonski WA, Negri E, La Vecchia C. 2007. Worldwide mortality from cirrhosis: An update to 2002. *J Hepatol* 46: 827-839.
- Bosoi CR, Rose CF. 2009. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab Brain Dis* 24: 95-102.

Bouchard M, Laforest F, Vandelac L, Bellinger D, Mergler D. 2007. Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect* 115: 122-127.

Brahma B, Forman RE, Stewart EE, Nicholson C, Rice ME. 2000. Ascorbate inhibits edema in brain slices. *J Neurochem* 74: 1263-1270.

Brenner DA, Waterboer T, Choi SK, Lindquist JN, Stefanovic B, Burchardt E, Yamauchi M, Gillan A, Rippe RA. 2000. New aspects of hepatic fibrosis. *J Hepatol*. 32: 32-38.

Brusilow SW, Traystman RJ. 1986. Hepatic encephalopathy. *N Engl J Med* 314: 786-787.

Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM, Garrick MD, Dolan KG, Haile DJ, Beard JL, Connor JR. 2001. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res* 66: 1198-1207.

Butterworth RF. 2003. Hepatic encephalopathy. *Alcoh Res Health* 27:240-246.

Butterworth RF. 2008. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: The concept of synergism. *Hepatol Res* 38 (Suppl.1): S116-S121.

Butterworth RF. 2000. Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 32 (Suppl 1): 171-180.

Butterworth RF. 2009. Thiamine deficiency-related brain dysfunction in chronic liver failure. *Metab Brain Dis* 24: 189-196.

Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS, Olanow CW. 1994. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* 44: 1583-1586.

Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipo V. 2006. Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepat* 45: 654-661.

Chan PH, Yurko M, Fishman RA. 1982. Phospholipid degradation and cellular edema induced by free radicals in brain cortical slices. *J Neurochem* 38: 525-531.

Chandra SV, Shukla GS. 1976. Role of iron deficiency in inducing susceptibility to manganese toxicity. *Arch Toxicol* 35: 319-323.

Chen SF, Hsu CW, Huang WH, Wang JY. 2008. Post-injury baicalein improves histological and functional outcomes and reduces inflammatory cytokines after experimental traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 155: 1279-1296.

Chrzanowska A, Gajewska B, Baranczyk-Kuzma A. 2009. Arginase isoenzymes in human cirrhotic liver. *Acta Biochim Pol* 56: 465-469.

Cooper AJ, Plum F. 1987. Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol Rev* 67: 440-519.

Cordoba J, Alonso J, Rovira A, Jacas C, Sanpedro F, Castells L, Vargas V, Margarit C, Kulisevsky J, Esteban R, Guardia J. 2001. The development of low-grade cerebral edema in cirrhosis is supported by the evolution of (1)H magnetic resonance abnormalities after liver transplantation. *J Hepatol* 35: 598-604.

Cotton FA, Wilkinson G. 2001. *Química inorgánica avanzada*. Limusa, México, p. 892.

Crawford JM. 2005. Liver and biliary tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (Eds.), *Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 877-938.

- Crippin JS, Gross JBJr, Lindor KD. 1992. Increased intracranial pressure and hepatic encephalopathy in chronic liver disease. *Am J Gastroenterol* 87: 879-882.
- Das K, Singh P, Chawla Y, Duseja A, Dhiman RK, Suri S. 2008. Magnetic resonance imaging of brain in patients with cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension. *Dig Dis Sci* 53: 2793-2798.
- Deng Y, Xu Z, Xu B, Tian Y, Xin X, Deng X, Gao J. 2009. The protective effect of riluzole on manganese caused disruption of glutamate-glutamine cycle in rats. *Brain Res* 1289: 106-117.
- Deniau JM, Menetrey A, Thierry AM. 1994. Indirect nucleus accumbens input to the prefrontal cortex via the substantia nigra pars reticulata: a combined anatomical and electrophysiological study in the rat. *Neuroscience* 61: 533-545.
- Dietz MC, Ihrig A, Wrazidlo W, Bader M, Jansen O, Triebig G. 2001. Results of magnetic resonance imaging in long-term manganese dioxide exposed workers. *Environ Res* 85: 37-40.
- Dolinska M, Hilgier W, Albrecht J. 1996. Ammonia stimulates glutamine uptake to the cerebral non-synaptic mitochondria of the rat. *Neurosci Lett* 213: 45-48.
- Donovan JP, Schafer DF, Shaw BWJr, Sorrell MF. 1998. Cerebral oedema and increased intracranial pressure in chronic liver disease. *Lancet* 351: 719-721.
- Erikson KM, Aschner M. 2006. Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. *Neurotoxicology* 27: 125-130.
- Erikson KM, Syversen T, Steinnes E, Aschner M. 2004. Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. *J Nutr Biochem* 15: 335-341.
- Felipo V, Butterworth RF. 2002. Neurobiology of ammonia. *Prog Neurobiol* 67: 259-279.
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. 2002. Hepatic encephalopathy—definition, nomenclature, diagnosis and quantification: final report of the working party of the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Hepatology* 35: 716-721.
- Fitsanakis VA, Piccola G, Aschner JL, Aschner M. 2006. Characteristics of manganese (Mn) transport in rat brain endothelial (RBE4) cells, an in vitro model of the blood-brain barrier. *Neurotoxicology* 27: 60-70.
- Fitsanakis VA, Zhang N, Garcia S, Aschner M. 2010. Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotox Res* 18: 124-131.
- Gagnon KB, England R, Delpire E. 2006. Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl cotransporter. *Mol Cell Biol* 26: 689-698.
- Garcia SJ, Gellein K, Syversen T, Aschner M. 2006. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. *Toxicol Sci* 92: 516-525.
- Garrick MD, Singleton ST, Vargas F, Kuo HC, Zhao L, Knopfel M, Davidson T, Costa M, Paradkar P, Roth JA, Garrick LM. 2006. DMT1: which metals does it transport? *Biol Res* 39: 79-85.
- Gonzalez-Zulueta M, Ensz LM, Mukhina G, Lebovitz RM, Zwacka RM, Engelhardt JF, Oberley LW, Dawson VL, Dawson TM. 1998. Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 18: 2040-2055.
- Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg MD. 1985. Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 404-414.

Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Hackam DJ, Grinstein S, Gros P. 1999. The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 189: 831-841.

Guilarte TR, Chen MK, McGlothlan JL, Verina T, Wong DF, Zhou Y, Alexander M, Rohde CA, Syversen T, Decamp E, Koser AJ, Fritz S, Gonczi H, Anderson DW, Schneider JS. 2006. Nigrostriatal dopamine system dysfunction and subtle motor deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp Neurol* 202: 381-390.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA 1997. Cloning and characterization of a mammalian protein-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482-488.

Gunter KK, Aschner M, Miller LM, Eliseev R, Salter J, Anderson K, Gunter TE. 2006. Determining the oxidation states of manganese in NT2 cells and cultured astrocytes. *Neurobiol Aging* 27: 1816-1826.

Hardy G. 2009. Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? *Gastroenterology* 137: S29-S35.

Häussinger D, Gerok W. 1994. Role of the cellular hydration state for cellular function: physiological and pathophysiological aspects. *Adv Exp Med Biol* 368: 33-44.

Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. 2000. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 32: 1035-1038.

Hazell AS. 2002. Astrocytes and manganese neurotoxicity. *Neurochem Int* 41: 271-277.

Hazell AS, Butterworth RF. 1999. Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 99-112.

Hazell AS, Norenberg MD. 1997. Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 22: 1443-1447.

Hazell AS, Normandin L, Norenberg MD, Kennedy G, Ji JH. 2006. Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neurosci Lett* 396: 167-171.

Heidelbaugh JJ, Bruderly M. 2006. Cirrhosis and chronic liver failure: Part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician* 74: 756-762.

Heidelbaugh JJ, Sherbondy M 2006. Cirrhosis and chronic liver failure: Part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician* 74: 767-776.

Hillaire S, Voitot H. 1999. Cirrhosis. *Pathol Biol (Paris)* 47: 895-902.

Hopkins KJ, Oster-Granite ML. 1998. Characterization of N-methyl-D-aspartate receptors in the hyperammonemic sparse fur mouse. *Brain Res* 797: 209-217.

INEGI, SECRETARÍA DE SALUD. Principales causas de mortalidad en edad productiva (de 15 a 64 años). <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>. 2008.

Iregren A. 1999. Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests. *Neurotoxicology* 20: 315-323.

Jalan R, Dabos K, Redhead DN, Lee A, Hayes PC. 1997. Elevation of intracranial pressure following transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt for variceal haemorrhage. *J Hepatol* 27: 928-933.

- Jalan R, Shawcross D, Davies N. 2003. The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1175-1181.
- Jayakumar AR, Rao KV, Murthy C, Norenberg MD. 2006. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int* 48: 623-628.
- Jayakumar AR, Rao KVR, Norenberg M. 2004. Glutamine-induced free radical production in cultured astrocytes. *Glia* 46: 296-301.
- Jiang YM, Mo XA, Du FQ, Fu X, Zhu XY, Gao HY, Xie JL, Liao FL, Pira E, Zheng W. 2006. Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study. *J Occup Environ Med* 48: 644-649.
- Johansen ML, Bak LK, Schousboe A, Iversen P, Sørensen M, Keidig S, Vilstrup H, Gjedde A, Ott P, Waagepetersen HS. 2007. The metabolic role of isoleucine in detoxification of ammonia in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem Int* 50: 1042-1051.
- Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, Candela A, Compañ A, Esteban A, Cauli O, Ausó E, Rodríguez E, Gutiérrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Pérez-Mateo M. 2006. Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: A model of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43: 1257-1266.
- Jursa T, Smith DR. 2009. Ceruloplasmin alters the tissue disposition and neurotoxicity of manganese, but not its loading onto transferrin. *Toxicol Sci* 107: 182-193.
- Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, Nahed BV, Jones PS, Sun D. 2009. Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 24: 257-265.
- Karadeniz G, Acikgoz S, Tekin IO, Tascylar O, Gun BD, Comert M. 2008. Oxidized low-density-lipoprotein accumulation is associated with liver fibrosis in experimental cholestasis. *Clinics (Sao Paulo)* 63: 531-540.
- Katsoyiannis IA, Katsoyiannis AA. 2006. Arsenic and other metal contamination of groundwaters in the industrial area of Thessaloniki, Northern Greece. *Environ Monit Assess* 123: 393-406.
- Katsuka Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. 2005. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nippon Med Sch* 72: 217-225.
- Keen CL, Ensunsa JL, Clegg MS. 2000. Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. *Met Ions Biol Syst* 37: 89-121.
- Kelly T, Kafitz KW, Roderigo C, Rose CR. 2009. Ammonium-evoked alterations in intracellular sodium and pH reduce glial glutamate transport activity. *Glia* 57: 921-934.
- Kha HT, Finkelstein DI, Tomas D, Drago J, Pow DV, Horne MK. 2001. Projections from the substantia nigra pars reticulata to the motor thalamus of the rat: single axon reconstructions and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 440: 20-30.
- Kim Y, Kim KS, Yang JS, Park IJ, Kim E, Jin Y, Kwon KR, Chang KH, Kim JW, Park SH, Lim HS, Cheong HK, Shin YC, Park J, Moon Y. 1999. Increase in signal intensities on T1-weighted magnetic resonance images in asymptomatic manganese exposed workers. *Neurotoxicology* 20: 901-908.
- Klos KJ, Ahlskog JE, Kumar N, Cambern S, Butz J, Burritt M, Fealey RD, Cowl CT, Parisi JE, Josephs KA. 2006. Brain metal concentrations in chronic liver failure patients with pallidal T1 MRI hyperintensity. *Neurology* 67: 1984-1989.

- Kontouras J, Billing BH, Scheuer PJ. 1984. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65: 305-311.
- Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P, Theilmann L, Lichtnecker H. 1995. Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 346: 270-274.
- Kulisevsky J, Pujol J, Junque C, Deus J, Balanzo J, Capdevila A. 1993. MRI pallidal hyperintensity and brain atrophy in cirrhotic patients: two different MRI patterns of clinical deterioration? *Neurology* 43: 2570-2573.
- Labori KJ, Raeder MG. 2004. Diagnostic approach to the patient with jaundice following trauma. *Scand J Surg* 93: 176-183.
- Laterra J, Keep R, Betz LA, Goldstein GW. 1999 Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. (Eds.), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp. 671-689.
- Laubenberger J, Häussinger D, Bayer S, Gufler H, Hennig J, Langer M. 1997. Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 112: 1610-1616.
- Levy B, Nassetta WJ. 2003. Neurologic effects of manganese in humans: A review. *Int J Occup Environ Health* 9: 153-163.
- Liao SL, Chen CJ. 2001. Manganese stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes. *Neuroreport* 12: 3877-3881.
- Litman T, Sogaard R, Zeuthen T. 2009. Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins. *Handb. Exp Pharmacol*: 327-358.
- Loockwood AH, Yap EWH, Wong WH. 1991. Cerebral ammonia metabolism in patients with severe liver disease and minimal hepatic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 337.
- Ma KC. 2001. Alzheimer-type I astroglipathy (AIA) and its implications for dynamic plasticity of astroglia: a historical review of the significance of AIA. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 121-131.
- Marcaida G, Miñana MD, Grisolia S, Felipe V. 1995. Ammonia prevents activation of NMDA receptors by glutamate in rat cerebellar neuronal cultures. *Eur J Neurosci* 7: 2389-2396.
- Marmarou A, Poll W, Shulman K, Bhagavan H. 1978. A simple gravimetric technique for measurement of cerebral edema. *J Neurosurg* 49: 530-537.
- Martinez-Hernandez HA, Bell KP, Norenberg MD. 1977. Glutamine synthetase, glial localization in brain. *Science* 195: 1356-1358.
- McCord JM. 1976. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases: structure, distribution, and evolutionary relationships. *Adv Exp Med Biol* 74: 540-550.
- Montaron MF, Deniau JM, Menetrey A, Glowinski J, Thierry AM. 1996. Prefrontal cortex inputs of the nucleus accumbens-nigro-thalamic circuit. *Neuroscience* 71: 371-382.
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C. 2001. Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. *Brain Res* 891: 123-129.
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C. 2003. Role of manganese accumulation in increased brain glutamine of the cirrhotic rat. *Neurochem Res* 28: 911-917.
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Ríos C, Muriel P. 2002. A method to induce manganese accumulation in the brain of the cirrhotic rat and its evaluation. *Brain Res Brain Res Protoc* 9: 9-15.

- Montgomery DC. 2001. Design and analysis of experiments. 5th edn. John Wiley & Sons, New York.
- Moser H. 1987. Electrophysiological evidence for ammonium as a substitute for potassium in activating the sodium pump in a crayfish sensory neuron. *Can J Physiol Pharmacol* 65: 141-145.
- Muriel P. 1998. Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 56: 773-779.
- Murthy CR, Rao KVR, Bai G, Norenberg MD. 2001. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res* 66: 282-288.
- Musa-Aziz R, Chen LM, Pelletier MF, Boron WF. 2009. Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 5406-5411.
- Myers JE, Fine J, Ormond-Brown D, Fry J, Thomson A, Thompson ML. 2009. Estimating the prevalence of clinical manganese using a cascaded screening process in a South African manganese smelter. *Neurotoxicology* 30: 934-940.
- Myers JE, teWaterNaude J, Fourie M, Zogoe hB, Naik I, Theodorou P, Tassel H, Daya A, Thompson ML. 2003. Nervous system effects of occupational manganese exposure on South African manganese mineworkers. *Neurotoxicology* 24: 649-656.
- Nagaraja TN, Brookes N. 1998. Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Physiol* 274: C883-C891.
- Nicolao F, Efrati C, Masini A, Merli M, Attili AF, Riggio O. 2003. Role of determination of partial pressure of ammonia in cirrhotic patients with and without hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 38: 441-446.
- Norenberg M, Rama Rao KV, Jayakumar AR. 2004. Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 36: 303-307.
- Norenberg MD, 1981 Astrocytes in liver disease. In: Fedoroff S., Hertz L. (Eds.), *Advances in Cellular Neurobiology*. Academic Press, New York, pp. 303-352.
- Norenberg MD 1996. Astrocytic-ammonia interactions in hepatic encephalopathy. *Sem Liv Dis* 16: 245-253.
- Norenberg MD, Itzhak Y, Bender AS. 1997. The peripheral benzodiazepine receptor and neurosteroids in hepatic encephalopathy. *Adv Exp Med Biol* 420: 95-111.
- Norenberg MD, Lapham LW, Nichols FA, May AG. 1974. An experimental model for the study of hepatic encephalopathy. *Arch Neurol* 31: 106-109.
- Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. 1979. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161: 303-310.
- Normandin L, Hazell AS. 2002. Manganese neurotoxicity: An update of pathophysiologic mechanisms. *Metab Brain Dis* 17: 375-387.
- Olanow CW. 2004. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1012: 209-223.
- Olanow CW, Good PF, Shinotoh H, Hewitt KA, Vingerhoets F, Snow BJ, Beal MF, Calne DB, Perl DP. 1996. Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology* 46: 492-498.

Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, Arroliga AC, Mullen KD. 2003. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *The Am J Med* 114: 188-193.

Ott P, Larsen FS. 2004. Blood-brain barrier permeability to ammonia in liver failure: a critical reappraisal. *Neurochem Int* 44: 185-198.

Pal PK, Samii A, Calne DB. 1999. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20: 227-238.

Panickar KS, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD. 2007. Downregulation of the 18-kDa translocator protein: effects on the ammonia-induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia* 55: 1720-1727.

Papavasiliou PS, Miller ST, Cotzias GC. 1966. Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese. *Am J Physiol* 211: 211-216.

Park RM, Bowler RM, Roels HA. 2009. Exposure-response relationship and risk assessment for cognitive deficits in early welding-induced manganism. *J Occup Environ Med* 51: 1125-1136.

Paxinos G, Watson C. 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.

Pentschew A, Ebner FF, Kovatch RM. 1963. Experimental manganese encephalopathy in monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol* 22: 488-499.

Peterson C, Giguere JF, Cotman CW, Butterworth RF. 1990. Selective loss of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate binding sites in rat brain following portacaval anastomosis. *Neurochem Res* 55: 386-390.

Pomier-Layrargues G. 2001. Movement dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 16: 27-35.

Pomier-Layrargues G, Spahr L, Butterworth RF. 1995. Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients. *Lancet* 345: 735.

Popper H. 1977. Pathologic aspects of cirrhosis. A review. *Am J Pathol* 87: 228-264.

Poveda MJ, Bernabeu A, Concepcion L, Roa E, de ME, Zapater P, Perez-Mateo M, Jover R. 2010. Brain edema dynamics in patients with overt hepatic encephalopathy A magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*. 52: 481-487.

Pujol A, Pujol J, Graus F, Rimola A, Peri J, Mercader JM, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodes J, Tolosa E. 1993. Hyperintense globus pallidus on T1-weighted MRI in cirrhotic patients is associated with severity of liver failure. *Neurology* 43: 65-69.

Quero Guillén JC, Herrerías-Gutiérrez JM. 2006. Diagnostic methods in hepatic encephalopathy. *Clin Chim Acta* 365: 1-8.

Quero JC, Schalm SW. 1996. Subclinical hepatic encephalopathy. *Sem Liv Dis* 16: 241-248.

Rama Rao KV, Reddy PV, Tong X, Norenberg MD. 2010. Brain edema in acute liver failure: inhibition by L-histidine. *Am J Pathol* 176: 1400-1408.

Rao KV, Norenberg MD. 2004. Manganese induces the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J Biol Chem* 279: 32333-32338.

Rao KVR, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2003. Induction of the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes by glutamine. *Neurochem Int* 43: 517-523.

- Rao KVR, Norenberg MD. 2007. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 22: 265-275.
- Rao KVR, Reddy PVB, Hazell AS, Norenberg MD. 2007. Manganese induces cell swelling in cultured astrocytes. *Neurotoxicology* 28: 807-812.
- Rivera-Mancía S, Ríos C, Montes S. 2011. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *Biometals*. Artículo en prensa.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipe V. 2010. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139: 675-684.
- Rodrigo R, Felipe V. 2006. Brain regional alterations in the modulation of the glutamate–nitric oxide–cGMP pathway in liver cirrhosis: Role of hyperammonemia and cell types involved. *Neurochemistry International* 48: 472-477.
- Roels H, Meiers G, Delos M, Ortega I, Lauwerys R, Buchet JP, Lison D. 1997. Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl₂, MnO₂) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats. *Arch Toxicol* 71: 223-230.
- Rose C, Butterworth RF, Zayed J, Normandin L, Todd K, Michalak A, Spahr I, Huet PM, Pomier-Layrargues G. 1999. Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117: 640-644.
- Roth JA, Garrick MD. 2003. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol* 66: 1-13.
- Santamaria AB, Cushing CA, Antonini JM, Finley BL, Mowat FS. 2007. State-of-the-science review: Does manganese exposure during welding pose a neurological risk? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 10: 417-465.
- Schroeter JD, Nong A, Yoon M, Taylor MD, Dorman DC, Andersen ME, Clewell HJ 3rd. 2011. Analysis of Manganese Tracer Kinetics and Target Tissue Dosimetry in Monkeys and Humans with Multi-Route Physiologically-Based Pharmacokinetic Models. *Toxicol Sci* 120: 481-498.
- Sharma P. 1996. Effect of ascorbic acid on hyperoxic rat astrocytes. *Neuroscience* 72: 391-397.
- Siddappa AJ, Rao RB, Wobken JD, Leibold EA, Connor JR, Georgieff MK. 2002. Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain. *J Neurosci Res* 68: 761-775.
- Sistrunk SC, Ross MK, Filipov NM. 2007. Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: An *in vitro* study. *Environ Toxicol Pharmacol* 23: 286-296.
- Sloot WN, Gramsbergen JBP. 1994. Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Res* 657: 124-132.
- Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F, Delavelle J, DuPasquier R, Giostra E, Mentha G, Terrier F, Hadengue A. 2000. Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with parkinsonian signs in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 119: 774-781.
- Spooner RJ, Toseland PA, Goldberg DM. 1975. The fluorometric determination of ammonia in protein-free filtrates of human blood plasma. *Clin Chim Acta* 65: 47-55.
- Stanwood GD, Leitch DB, Savchenko V, Wu J, Fitsanakis VA, Anderson DJ, Stankowski JN, Aschner M, McLaughlin B. 2009. Manganese exposure is cytotoxic and alters dopaminergic and GABAergic neurons within the basal ganglia. *J Neurochem* 110: 378-389.

- Strauss E, Tramote R, Silva EP, Caly WR, Honain NZ, Maffei RA, de Sá MF. 1992. Double-blind randomized clinical trial comparing neomycin and placebo in the treatment of exogenous hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 39: 542-545.
- Takahashi H, Koehler RC, Brusilow SW, Traystman RJ. 1991. Inhibition of brain glutamine accumulation prevents cerebral edema in hyperammonemic rats. *Am J Physiol* 261: H825-H829.
- Takeda A. 2003. Manganese action in brain function. *Brain Res Rev* 41: 79-87.
- Timmerman W, Westerink BH. 1997. Electrical stimulation of the substantia nigra reticulata: detection of neuronal extracellular GABA in the ventromedial thalamus and its regulatory mechanism using microdialysis in awake rats. *Synapse* 26: 62-71.
- Tofteng F, Hauerberg J, Hansen BA, Pedersen CB, Jorgensen L, Larsen FS. 2006. Persistent arterial hyperammonemia increases the concentration of glutamine and alanine in the brain and correlates with intracranial pressure in patients with fulminant hepatic failure. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 21-27.
- Tornroth-Horsefield S, Hedfalk K, Fischer G, Lindkvist-Petersson K, Neutze R. 2010. Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Lett* 584: 2580-2588.
- Vernon AC, Crum WR, Johansson SM, Modo M. 2011. Evolution of extra-nigral damage predicts behavioural deficits in a rat proteasome inhibitor model of Parkinson's disease. *PLoS One* 6: e17269.
- vom Dahl S, Kircheis G, Häussinger D. 2001. Hepatic encephalopathy as a complication of liver disease. *World J Gastroenterol* 7: 152-156.
- Wang X, Miller DS, Zheng W. 2008. Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron. *Toxicol Appl Pharmacol* 230: 167-174.
- Wedler FC, Denman RB. 1984. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Current Topics in Cellular Regulation* 24: 153-169.
- Weissenborn K, Kolbe H. 1998. The basal ganglia and portal-systemic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13: 261-272.
- Wolburg H, Paulus W. 2010. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 75-88.
- Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, Mani AR, Harry D, Stadlbauer V, Zou Z, Williams R, Davies C, Moore KP, Jalan R. 2007. Endotoxemia produces coma and brain swelling in bile duct ligated rats. *Hepatology* 45: 1517-1526.
- Yadav SK, Srivastava A, Srivastava A, Thomas MA, Agarwal J, Pandey CM, Lal R, Yachha SK, Saraswat VA, Gupta RK. 2010. Encephalopathy assessment in children with extra-hepatic portal vein obstruction with MR, psychometry and critical flicker frequency. *J Hepatol*. 52: 348-354.
- Yamada M, Ohno S, Okayasu I, Okeda R, Hatakeyama S, Watanabe H, Ushio K, Tsukagoshi H. 1986. Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol* 70: 273-278.
- Yin Z, Aschner JL, dos Santos AP, Aschner M. 2008. Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 1203: 1-11.
- Yudkoff M. 2006 Disorders of amino acid metabolism. In: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL (Eds.), *Basic Neurochemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 667-683.

Zielinzka M, Law RO, Albrecht J. 2003. Excitotoxic mechanism of cell swelling in rat cerebral cortical slices treated acutely with ammonia. *Neurochem Int* 43: 299-303.

Ziemska E, Dolinska M, Lazarewicz JW, Albrecht J. 2000. Induction of permeability transition and swelling of rat brain mitochondria by glutamine. *Neurotoxicology* 21: 295-300.

Zoratti M, Szabo I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176.

Zwingmann C, Chatauret N, Leibfritz D, Butterworth RF. 2003. Selective increase of brain lactate synthesis in experimental acute liver failure: results of a [¹H-C] nuclear magnetic resonance study. *Hepatology* 37: 420-428.

Apéndice. Diseño factorial: Análisis de varianza

La pregunta de investigación en este trabajo involucraba el estudio de las interacciones entre diversos factores, por lo que un diseño clásico de ANDEVA de una vía, en el que sólo se hacen las comparaciones entre grupos, resultaba poco informativo para responderla.

Como en este caso, algunos experimentos involucran el estudio de dos o más factores. Los diseños factoriales son los más eficaces para este tipo de experimentos. Un diseño factorial significa que, en cada ensayo de un experimento se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores a investigar. Por ejemplo, si hay a niveles del factor A y b niveles del factor B , cada réplica contiene todas las combinaciones del tratamiento ab .

El efecto de un factor se define como un cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor. Por ejemplo un factor puede tener dos niveles, 0 para la ausencia de dicho factor y 1 para la presencia del mismo. También puede ser que 0 haga referencia a un valor bajo del factor y 1 a un nivel alto. Si la presencia del factor influye sobre la variable que se está midiendo, entonces la presencia de ese factor (nivel 1) tiene un efecto significativo sobre la variable que se está midiendo.

En algunos experimentos, puede encontrarse que la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor no es la misma en todos los niveles de otros factores. Cuando esto ocurre hay una interacción entre los factores. Por ejemplo, si existe una diferencia mayor entre el nivel 0 y el 1 del factor A cuando el nivel del factor B es 1 que cuando es 0, entonces hay una interacción entre los dos factores (Fig A1). Es decir, el efecto de A depende del nivel elegido del factor B . Por lo tanto, el análisis factorial es de gran utilidad cuando se sospecha de interacción entre los factores.

El diseño que se describió anteriormente corresponde a un diseño factorial con dos factores (análisis de varianza de dos vías); sin embargo, también es aplicable al caso general donde existen a niveles del factor A , b niveles del factor B , c niveles del factor C , etc. Si son tres factores el análisis se denomina análisis de varianza de tres vías.

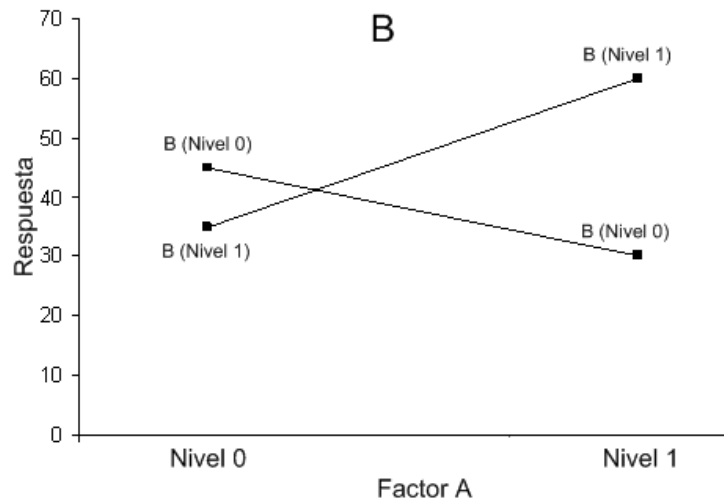
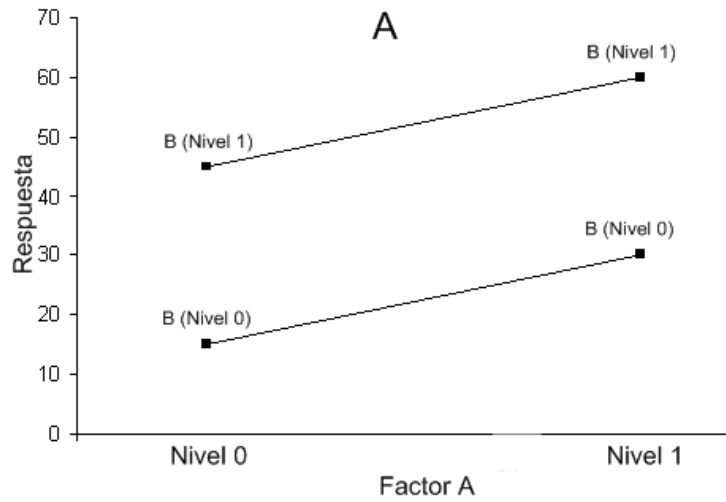


Fig. A1. En (A) la diferencia en la magnitud de la respuesta entre los niveles 0 y 1 del factor B no cambia entre los niveles 0 y 1 del factor A, por lo tanto no hay interacción. En (B) la magnitud de la diferencia entre los niveles 0 y 1 del factor B cambia al moverse del nivel 0 al 1 del factor A (las líneas no son paralelas), por lo tanto hay interacción entre ambos factores.

Al realizar un experimento con un análisis de varianza de tres vías con los factores A, B y C, teniendo cada uno de ellos dos niveles (0 como ausencia y 1 como presencia) se tendrían las siguientes combinaciones (o grupos experimentales):

Grupo experimental	Nivel del factor A	Nivel del factor B	Nivel del factor C
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0	1	0
4	0	0	1
5	1	1	0
6	0	1	1
7	1	0	1
8	1	1	1

De modo que, en el grupo 1 no estarían presentes los tres factores (generalmente este es el grupo control), en el grupo 2 sólo estaría presente el factor A y así sucesivamente hasta llegar al grupo 8 que tendría presencia de los tres factores.

En este diseño se evalúan efectos principales, interacciones dobles e interacción triple:

Factores principales:

A

B

C

Interacciones dobles:

A x B

B x C

A x C

Interacción triple:

A x B x C

Al realizar el análisis de varianza de tres vías se obtiene una tabla como la siguiente:

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F _o	p [*]
A	SC _A	a-1	CM _A	CM _A /CM _E	---
B	SC _B	b-1	CM _B	CM _B /CM _E	---
C	SC _C	c-1	CM _C	CM _C /CM _E	---
AB	SC _{AB}	(a-1)(b-1)	CM _{AB}	CM _{AB} /CM _E	---
BC	SC _{BC}	(a-1)(c-1)	CM _{BC}	CM _{BC} /CM _E	---
AC	SC _{AC}	(b-1)(c-1)	CM _{AC}	CM _{AC} /CM _E	---
ABC	SC _{ABC}	(a-1)(b-1)(c-1)	CM _{ABC}	CM _{ABC} /CM _E	---
Error	SC _E	abc(n-1)	CM _E		
Total	SC _T	abcn-1			

Cuando una interacción (AxB) resulta significativa, el análisis de los efectos principales (A y B por separado) puede estar enmascarado por dicha interacción, por lo tanto ya no se analizan. En este caso, si la interacción triple resulta significativa ya no se analizan las interacciones dobles ni los efectos principales. Así mismo, si una interacción doble resulta significativa ya no se analizan los efectos principales que también formen parte de dicha interacción.

* Probabilidad, calculada al asumir que la hipótesis nula es verdadera, de que la estadística de prueba tome valores tan extremos o más extremos que los calculados con la muestra actual.

Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies

Susana Rivera-Mancía · Camilo Ríos · Sergio Montes

Received: 11 March 2011 / Accepted: 13 April 2011 / Published online: 1 May 2011
© Springer Science+Business Media, LLC. 2011

Abstract Manganese (Mn) is an essential metal for life. It is a key constituent of clue enzymes in the central nervous system, contributing to antioxidant defenses, energetic metabolism, ammonia detoxification, among other important functions. Until now, Mn transport mechanisms are partially understood; however, it is known that it shares some mechanisms of transport with iron. CNS is susceptible to Mn toxicity because it possesses mechanisms that allow Mn entry and favor its accumulation. Cases of occupational Mn exposure have been extensively reported in the literature; however, there are other ways of exposure, such as long-term parental nutrition and liver failure. Manganism and hepatic encephalopathy are the most common pathologies associated with the effects of Mn exposure. Both pathologies are associated with motor and psychiatric disturbances, related in turn to mechanisms of damage such as oxidative stress and neurotransmitters alterations, the dopaminergic system being one of the most affected. Although manganism and Parkinson's disease share some characteristics, they differ in many aspects that are discussed here. The mechanisms for Mn transport and its participation in manganism and hepatic

encephalopathy are also considered in this review. It is necessary to find an effective therapeutic strategy to decrease Mn levels in exposed individuals and to treat Mn long term effects. In the case of patients with chronic liver failure it would be worthwhile to test a low-Mn diet in order to ameliorate symptoms of hepatic encephalopathy possibly related to Mn accumulation.

Keywords Manganese transport · Dopamine · Manganism · Hepatic encephalopathy · Oxidative stress

Introduction

Manganese (Mn) is found in rocks, soil, water and food. It exists as both inorganic and organic compounds, the inorganic being the most common. Organic compounds of Mn are used as fuel additives (methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl, MMT), fungicides (e.g., maneb and mancozeb) and as contrasts agents in magnetic resonance imaging (MRI) (Santamaria et al. 2007). The daily recommended Mn intake is 2.3 and 1.8 mg/kg for men and women, respectively (Sistrunk et al. 2007).

Mn is a trace essential element component of key enzymes in the central nervous system (CNS) such as glutamine synthetase (GS), mitochondrial superoxide dismutase and pyruvate carboxylase

S. Rivera-Mancía · C. Ríos · S. Montes (✉)
Neurochemistry Department, National Institute of
Neurology and Neurosurgery 'Manuel Velasco Suárez',
Insurgentes Sur 3877, La Fama, Tlalpan,
Mexico City 14269, Mexico
e-mail: smontes@innm.edu.mx

(Gonzalez-Zulueta et al. 1998; Keen et al. 2000; McCord 1976; Wedler and Denman 1984).

Although Mn intoxication is more common than its deficiency, both of them are detrimental. Mn exposure, mainly as Mn-containing dust particles, is associated with respiratory, reproductive, and especially neurological adverse effects (Iregren 1999). Chronic exposure to Mn can result in manganism, a disorder that resembles some symptoms of Parkinson's disease (PD) (Calne et al. 1994). On the other hand, its deficiency can cause birth defects, alterations in bone formation, reproductive disturbances and increased susceptibility to convulsions (Fitsanakis et al. 2007).

The main route for physiological Mn absorption is the gastrointestinal tract (Au et al. 2008). Absorption through lungs is important at the occupational level; in this regard, production of dry batteries, steel and aluminium manufacturing, welding, smelting, mining and the use of Mn derived fungicides are among the main forms of occupational Mn exposure (Keen et al. 2000; Myers et al. 2003, 2009; Park et al. 2009). Exposure to air containing Mn concentrations over $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ can lead to manganism symptoms (Yin et al. 2010). Other situations that lead to Mn toxicity are total parenteral nutrition (Hardy 2009), drinking water with high Mn concentration (Bouchard et al. 2007; Katsoyiannis and Katsoyiannis 2006) and chronic liver failure (Rose et al. 1999).

Several mechanisms of Mn neurotoxicity have been proposed, including the disruption of mitochondrial metabolism (Zhang et al. 2008), oxidative stress (Zhang et al. 2004), alteration of iron homeostasis (Kwik-Urbe and Smith 2006), inflammation (Milatovic et al. 2009; Zhao et al. 2009), altered glutamate and dopamine (DA) metabolism (Desole et al. 1995; Erikson et al. 2008; Gwiazda et al. 2007; Normandin and Hazell 2002), among others. The brain areas mainly affected by Mn are the globus pallidus and the substantia nigra pars reticulata, with damage extending less prominently to the caudate nucleus and the putamen (Calne et al. 1994; Olanow et al. 1996; Stanwood et al. 2009; Yamada et al. 1986).

Mn toxicity either by occupational exposure or chronic liver failure can cause motor disturbances resembling idiopathic PD (Calne et al. 1994; Pomier-Layrargues 2001); however, it is different in many aspects as will be discussed later.

MRI findings

Mn is highly paramagnetic and can be detected in the brain in vivo with MRI because it shortens the longitudinal relaxation time (T1) of tissues (Bock et al. 2008). Mn-overexposure can cause T1-weighted signal hyperintensities in the globus pallidus, striatum and, to a lesser extent, the substantia nigra (Krieger et al. 1995; Pal et al. 1999), while PD affects mainly the substantia nigra pars compacta and does not cause MRI abnormalities (Calne et al. 1994).

Hyperintensities in the globus pallidus have been found in workers occupationally exposed to Mn (Dietz et al. 2001; Jiang et al. 2006; Kim et al. 1999), in patients receiving long-term total parenteral nutrition (Nagatomo et al. 1999) and in clinical cases of hepatic failure (Hazell and Butterworth 1999; Schaumburg et al. 2006; Spahr et al. 2000).

Differences in Mn brain distribution among species have been found by T1-weighted MRI, uncovering a different pattern of distribution between rats and the small non human primate, marmoset. Marmoset showed higher changes in hyperintensities than the rat in several areas: visual cortex, striatum, globus pallidus, ventral pallidum, and substantia nigra when the same dose of MnCl_2 was administered. The discrepancies in signals between the two species seem to correlate to differences in cerebrospinal fluid (CSF) volume adjacent to each region (Bock et al. 2008); however it should be considered that only one dose was analyzed for the two species and it is possible that a higher dose of Mn could induce a similar pattern of distribution in the rat.

Mn transport

Ingested Mn is transported from the gut to portal circulation through divalent metal transporter-1 (DMT-1, also known as DCT1 or Nramp2). There is evidence that Mn, generally absorbed as Mn^{2+} , is oxidized to Mn^{3+} by ceruloplasmin in the liver and plasma and then transported by transferrin (Tf) (Aschner and Gannon 1994; Jursa and Smith 2009; Takeda 2003). At normal Mn plasma concentration, the metal appears to enter into the CNS primarily across the capillary endothelium, whereas at high Mn plasma concentrations, transport across the choroid

plexus seems to predominate (Aschner et al. 2007; Murphy et al. 1991).

There is enough evidence to affirm that Mn regulation in the organism is very close to that of Fe (Fitsanakis et al. 2006, 2009). Interdependence between Mn and Fe on their transport has been demonstrated in several studies (see Fitsanakis et al. 2010 for a review). Experimental studies have shown that Fe deficiency enhances Mn absorption through gastrointestinal tract, independently of Mn stores (Chandra and Shukla 1976) and it has been demonstrated an inverse association between Fe stores and Mn absorption in humans (Finley and Davis 1999). Therefore, even without significant Mn exposure, individuals with Fe deficiency are susceptible to Mn brain accumulation (Erikson et al. 2004) and consequently to neurotoxic symptoms. On the other hand, Mn exposure facilitates Fe deficiency; in an experiment conducted in developing rats (postnatal days 4–21) treated with a high Mn diet through breast milk, decreased Fe and increased Tf were found in plasma, as well as increased Mn and increased expression of both DMT-1 and transferrin receptor (TfR) in several brain regions (Garcia et al. 2006), such scenario is similar to Fe deficiency. This evidence strongly supports the hypothesis of Mn and Fe competition for transport mechanisms.

Although a lot of research has been done about Mn transport mechanisms through the blood–brain-barrier (BBB), there is still controversy about the transporters involved. In a study carried out by Fitsanakis et al. (2006), using an in vitro BBB model with RBE4 cells, they found that Mn transport through BBB is mediated by a protein-mediated active transport that is temperature and pH-dependent. Strong evidence suggests that both TfR and DMT-1 may play an important role in brain Mn deposition (Aschner and Gannon 1994; Erikson and Aschner 2006). In vitro experiments have demonstrated that DMT-1 activity is pH and temperature-dependent in addition to its high affinity for Mn ($K_m = 1 \mu\text{M}$) (Garrick et al. 2006). Furthermore, TfR is a pH-dependent active transporter (Fitsanakis et al. 2007). Therefore, both transport mechanisms are generally accepted.

DMT-1 and TfR are expressed in both vascular endothelium capillaries and the choroid plexus (Gunshin et al. 1997; Siddappa et al. 2002). The TfRs in the choroid plexus seem to be more involved in sequestering Mn into the CSF than in the transport

of the metal towards brain parenchyma (Takeda et al. 2000; Takeda 2003). Tf is able to bind Mn^{3+} , this complex could enter the CNS by TfR endocytosis (Aschner and Gannon 1994; Takeda 2003). Two hypotheses about Mn release in the BBB exist; the first suggests that a high proportion of Tf is recycled towards the luminal membrane of capillary endothelium and that the Mn^{3+} released crosses by transcytosis. The second hypothesis suggests that the Tf- Mn^{3+} complex actually crosses through transcytosis (Takeda 2003) (Fig. 1).

DMT-1 has been shown to co-localize with TfR, both at the plasma membrane and in the recycling endosome. This co-localization suggests a possible coupling of metal transport by TfR and DMT-1 (Fig. 1) (Au et al. 2008; Gruenheid et al. 1999). Fe coupled transport by DMT-1 and TfR has been demonstrated in several cell types (see Andrews 2000 for a review).

MRI studies suggest that Mn is actively transported from choroid plexus to CSF and then to brain parenchyma via ependyma surrounding ventricles, because of the rapid distribution of Mn from CSF to brain areas surrounding CSF compartments after IV Mn infusion (Aoki et al. 2004). This route of transport could be explained in part by the prominent DMT-1 expression in ependymal cells lining the third ventricle (Burdo et al. 2001). Additionally, leaky tight junctions between ependymal cells (Wolburg and Paulus 2010) may allow free diffusion of small hydrophilic molecules from the CSF into the interstitial fluid of the brain and vice versa (Lattera et al. 1999), opening the possibility of Mn diffusing between ependymal cells (Fig. 1). Studies on the mechanisms underlying Mn transport through the ependyma need deeper research.

Mechanisms of Mn (and Fe) transport across the blood-CSF barrier are poorly understood. Recently, expression of Fe homeostasis-related proteins was characterized. Ferroportin (Fpn, also known as IREG1 or MTP1), ceruloplasmin, hephaestin and the ferric reductase Dcytb were found in choroid plexus, suggesting important participation of choroid plexus in Fe homeostasis (Rouault et al. 2009). Since Mn shares transport mechanisms with Fe, a role of those proteins in Mn homeostasis is also a possibility.

It has been demonstrated that Mn exposure can influence the subcellular distribution and expression of molecules associated with Fe transport in the

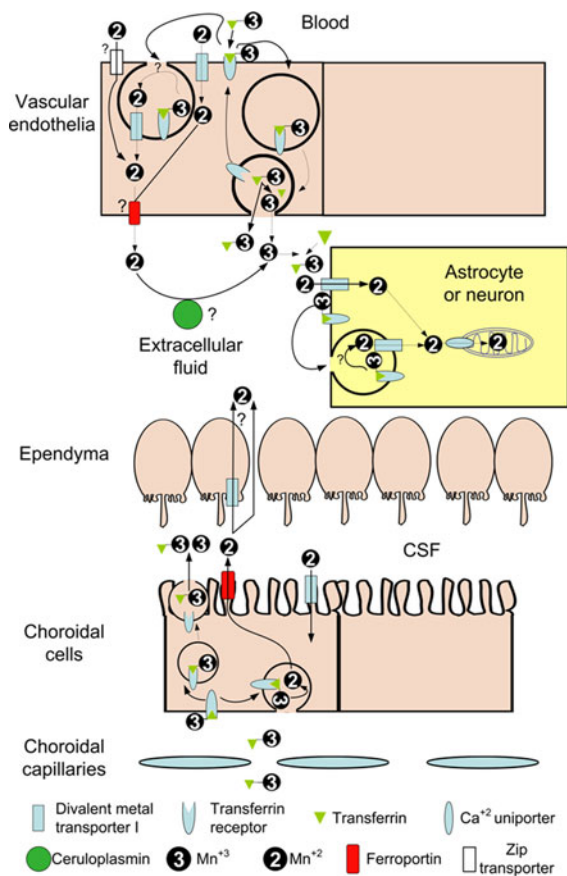


Fig. 1 Mn transport in CNS. Mn may enter the vascular endothelia through DMT-1 as Mn²⁺ or by TfR-mediated transport as Tf-bound Mn³⁺. Because DMT-1 co-localizes with TfR it is possible that both are located in the endocytic vesicle. Mn³⁺ could be reduced to Mn²⁺ by unknown mechanisms inside the vesicle and be released by DMT-1. Zip 8 and Zip 14 could also be playing a role in Mn entry to the brain parenchyma. Mn³⁺ could reach extracellular milieu alone or bound to Tf. Mn²⁺ could be oxidized to Mn³⁺ in the extracellular milieu by Cp and be bound to Tf. Mn entering the choroidal cells can be released in the CSF as Mn³⁺ or Tf-bound Mn³⁺. Mn may exit choroidal cells via Fpn. Mn²⁺ can be transported through ependymal cells via DMT-1 or through spaces between ependymal cells. Mn is transported into neurons and astrocytes also by TfR and DMT-1. Once inside the cell Mn can enter the mitochondria via Ca²⁺ uniporter

choroid plexus. Mn exposure is able to alter ferroportin location, by moving it to the apical membrane (Wang et al. 2008). Under physiological conditions, DMT-1 promotes Mn and Fe moving from CSF, whereas, Fpn transports those metals to CSF. Under Mn overexposure conditions, Mn uptake by apical DMT-1 increases intracellular concentrations. As a

consequence, Fpn changes its location towards apical microvilli to transport the metal ions to the CSF (Fig. 1). The increased Mn concentrations enhance TfR expression (Wang et al. 2008), favoring Mn transport towards CSF. Although influence of Mn on Fe transporters was demonstrated, unfortunately intracellular Mn concentrations were not measured in those studies.

Other Mn transporters that have been associated with Mn homeostasis are Zip8 (Zrt/Irt-related protein 8) and Zip14 (Zrt/Irt-related protein 14). Zip8 location in other organs has been described, for instance in the vascular endothelium of testis (Prozialek et al. 2008) and proximal tubular epithelial cells of the kidney, facing the blood in both cases. Both transporters are expressed in the brain (Girijashanker et al. 2008) but their cellular location is not known; however, they could have a role in Mn homeostasis in this organ (Fig. 1).

Once Mn has gone through BBB or CSF-blood barrier, it can be taken up by either neurons or astrocytes. Tf produced by oligodendrocytes can bind Mn³⁺, so that both free and Tf-bound Mn can be present in the brain extracellular fluid (Takeda 2003) (Fig. 1). Neurons express TfR, therefore they could take up Mn by mediated-TfR endocytosis. In brain parenchyma astrocytes act as the main Mn homeostasis regulator and as a Mn pool (Aschner et al. 1999) and they can be taking up Mn by DMT-1 and TfR, both of them associated with astrocytic processes (Burdo et al. 1999; Malecki et al. 1999; Roth and Garrick 2003).

Brain Mn is deposited preferentially in astrocytes because of its high affinity transport ($K_m = 0.3 \mu\text{M}$) (Aschner et al. 1992, 1999; Gunter et al. 2006), probably related to DMT-1 expression. Moreover, astrocytes contain GS, which is critical for ammonia metabolism and contains about 80% of brain Mn (Wedler and Denman 1984). Astrocytes contain Mn concentrations 10–50 fold higher than neurons (Erikson and Aschner 2006). Such preferential accumulation suggests that astrocytes could be more susceptible than other brain cells to Mn toxicity. Supporting this possibility, Mn toxicity models have shown astrocytic pathological alterations (Alzheimer type II astrocytosis) (Hazell et al. 2006; Olanow et al. 1996; Pentschew et al. 1963). Astrocytes probably use ceruloplasmin to oxidize iron to a form that binds Tf (Burdo et al. 2001), as it occurs in liver and plasma

(Takeda 2003), facilitating Tf-mediated transport; the same may also be possible for Mn.

Regarding regional Mn accumulation, the striatum is a DMT-1 rich region and it also shows great Mn accumulation under Mn toxicity conditions (Burdo et al. 2001; Montes et al. 2001; Rose et al. 1999). However, areas with dense Tf distribution (Hill et al., 1985) do not match the distribution of Mn (or Fe), a fact that suggests that these sites with high Mn content may accumulate Mn through axonal transport (Sloot and Gramsbergen, 1994). For example, the Mn-rich areas of the ventral-pallidum, globus pallidus and substantia nigra receive input from the nucleus accumbens and the caudate-putamen (Walaas and Fonnum 1979; Nagy et al. 1978), two TfR rich areas.

Other possible mechanisms for Mn transport have been described. It has been proposed that during Mn toxicity, DAT facilitates Mn transport into dopaminergic striatal neurons and that Mn accumulates in the globus pallidus via axonal transport (Anderson et al. 2007; Sloot and Gramsbergen 1994). As a result, blockage of the DAT in the striatum would attenuate Mn accumulation in striatal neurons and would cause decreased Mn concentrations in the globus pallidus (Anderson et al. 2007). Studies in the macaque using intra-striatal and intra-cortical injections of MnCl_2 with follow-up MRI have shown anterograde transport of Mn^{2+} from the striatum to the globus pallidus and the substantia nigra, and from the ventral striatum to the ventral pallidum (Murayama et al. 2006; Saleem et al. 2002). There are also other candidates for Mn transport but they have not been studied in detail, for instance voltage-gated calcium channels (Yokel and Crossgrove 2004) and choline transporters (Lockman et al. 2001).

Mechanisms for exporting Fe/Mn are poorly understood. In the intestine Fpn, the only known Fe exporter is located at the basal membrane and it exports iron to the circulation (Garrick 2011; Wu et al. 2004). Recent evidence shows that Mn increases Fpn expression and that this increase could be a compensatory mechanism to decrease Mn concentrations inside the cells, as demonstrated by decreased Mn accumulation and cell death, as well as reversal of impaired glutamate uptake as a consequence of Fpn overexpression in HEK293T cells (Yin et al. 2010). From these studies, it was suggested that Fpn could participate in Mn efflux (Fig. 1). Although

those studies come from other types of cells, it is known that Fpn is expressed in neurons, astrocytes, oligodendrocytes as well as in endothelial, ependymal and choroidal cells (Wu et al. 2004) and the role of ferroportin for Mn homeostasis remains to be elucidated in each cell type in the brain.

Manganese and dopaminergic system disturbances

Since brain Mn accumulation leads to some symptoms similar to those observed in PD, special attention has been focused on dopaminergic system in regard to the mechanisms underlying Mn neurotoxicity. Neuronal loss in substantia nigra pars compacta has been reported in rodents injected with Mn into the nigra or the striatum (Diaz-Veliz et al. 2004; Fernandes et al. 2010; Zhao et al. 2009), while Mn exposure by oral route did not cause any alteration in this region (Liu et al. 2006; Pappas et al. 1997). The substantia nigra in Mn-exposed humans has been constantly reported spared (Yamada et al. 1986, see Perl and Olanow 2007 for a review).

Studies regarding striatal DA levels in experimental manganese are also in debate. Some studies have found decreased DA and its metabolites in the striatum of animals exposed to Mn (Autissier et al. 1982; Sistrunk et al. 2007; Sloot et al. 1994; Tran et al. 2002; Zhang et al. 2003a), while others have found increased levels (Bonilla 1980; Montes et al. 2001). These controversial results can be due to differences in chronicity of exposure, routes of administration, age of the animals, Mn chemical species and other experimental issues. Altogether, experimental data on DA levels in the striatum of Mn-exposed animals suggest that Mn depletes DA only at elevated concentrations (See Gwiazda et al. 2007 for a review). Additionally, Desole et al. (1995) reported a biphasic response depending on Mn dose, resulting in increased DA and its metabolites at low doses and decreased levels at high doses. In rats treated chronically with oral MnCl_2 the activity of striatal tyrosine hydroxylase was increased at the beginning of the experiment and decreased after 6 months of treatment (Bonilla 1980). These results are in agreement with the increased and decreased DA levels found in the different Mn-exposure paradigms mentioned above. Furthermore, a biphasic

clinical appearance is also characteristic in Mn-exposed patients (Bonilla 1980; Finkelstein et al. 2008), probably the first symptoms being caused by the initial exposure to Mn and the late symptoms by long term nervous system exposure or high cumulative doses.

It is believed that mechanisms underlying Mn toxicity may be more related to downstream neuronal pathways rather than deficits in nigrostriatal function or DA content as occurs in PD (Calne et al. 1994; Pal et al. 1999). It has been suggested that loss of neuronal inputs in the basal ganglia (glutamatergic and GABAergic neurons) might be secondarily responsible for some of the perturbations in presynaptic DA functioning (McDougall et al. 2008). For instance Mn readily accumulates in the globus pallidus (Calne et al. 1994; Montes et al. 2003) and there are extensive direct and indirect connections between this structure and the striatum and nucleus accumbens.

The data discussed above provide evidence of alterations in the dopaminergic system that could explain disturbances in individuals exposed to excessive Mn; however, studies testing different doses and time of Mn-exposure in the same experiment are needed in order to establish the mechanisms of Mn actions on dopaminergic system over time.

Manganese, mitochondria and oxidative damage

Excessive reactive oxygen species (ROS) production has been linked to Mn exposure (HaMai and Bondy 2004; Hazell et al. 2006; Milatovic et al. 2009; Settivari et al. 2009). Involvement of oxidative stress has been demonstrated by significant changes in intracellular antioxidant levels, including increased glutathione and catalase levels due to Mn exposure (HaMai and Bondy 2004; Settivari et al. 2009) and the observed attenuation of Mn cytotoxicity when antioxidants are used (Prabhakarana et al. 2008).

When Mn is inside the cell, it preferentially accumulates into the mitochondria, mainly as Mn^{2+} via the Ca^{2+} uniporter (Gavin et al. 1990; Gunter et al. 2004) (Fig. 1). Inside the mitochondria, Mn can disrupt oxidative phosphorylation and increase ROS production (Gunter et al. 2004, 2006).

The ability of Mn to enhance oxidative stress is due to the transition of its oxidative state +2 to +3,

increasing its pro-oxidant capacity (Reaney et al. 2002). Experimental evidence suggests that pro-oxidant activity of Mn^{2+} is dependent on trace amounts of Mn^{3+} (HaMai and Bondy 2004). Superoxide produced in the mitochondrial electron transport chain may catalyze this transition through a set of reactions similar to those mediated by superoxide dismutase and thus lead to the increased oxidant capacity of the metal (Gunter et al. 2006).

Additionally, basal ganglia are regions with high oxidative activity, possibly favoring the oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} in those specific areas. Until now there are controversies about the Mn chemical specie able of producing more damage; however, Mn^{3+} is considered the most toxic specie (Donaldson et al. 1982). A reasonable hypothesis to explain Mn neurotoxicity is that Mn^{3+} is responsible for the dopaminergic toxicity. In this case, Mn^{2+} would undergo cyclic reactions with Mn^{3+} that would lead to aminochrome production in presence of dopamine. Aminochrome is the main DA oxidation product (Archibald and Tyree 1987; Sistrunk et al. 2007).

Mn^{2+} may also be involved with dopaminergic toxicity. Oikawa et al. (2006) found that PC12 cells exposed independently to either 0.2 mM Mn^{2+} or DA did not change significantly; however, when cells were co-exposed to Mn and DA, cell death was induced by a mechanism involving DNA damage. In primary mesencephalic cultures it was found that Mn enhanced ROS production and NOS2 expression. The effect was further exacerbated in presence of DA (Prabhakarana et al. 2008). These studies suggested that Mn exposure can enhance DA-induced cell death.

Mn-exposure triggered apoptosis and cell death via the ERK signaling pathway and the activation of caspase-3 in primary cultured astrocytes (Yin et al. 2008). Activation of the ERK signaling pathway and the collapse of the mitochondrial inner membrane potential can contribute to the generation of ROS (Yin et al. 2008). Oxidative stress generated by high Mn concentrations lead to the induction of mitochondrial permeability transition (mPT), a Ca^{2+} dependent process characterized by the opening of the permeability transition pore in the inner mitochondrial membrane, resulting in increased solubility to diverse substances, the loss of the mitochondrial inner membrane potential and cell swelling (Rama Rao et al. 2007; Rao and Norenberg 2004; Yin et al. 2008) in a dose and time-dependent fashion.

The selectivity of Mn for mitochondria of neurons from basal ganglia has been suggested (Sloot and Gramsbergen 1994). Long-term Mn-intoxication effects are similar to those produced by other substances that also affect the mitochondria in the same brain structures, for instance carbon monoxide and cyanide (Albin 2000). Parkinsonism and dystonia are common as sequelae of Mn, cyanide and carbon monoxide (CO) intoxications (Borghain et al. 1995; Calne et al. 1994; Carella et al. 1988; Choi 1983; Lee and Marsden 1994). Why Mn is able to produce the same effects that those substances is not known but there may be common mechanisms of injury; for example all of them are able to produce alterations in oxidative phosphorylation (Gunter et al. 2010; Iheagwara et al. 2007; Leavesley et al. 2010) and both Mn and CO induce mPT and ROS production (Piantadosi et al. 2006; Rao and Norenberg 2004).

Other Mn effects

Mn impact on energetic metabolism is significant. It can inhibit some tricarboxylic acids cycle enzymes (Zheng et al. 1998; Zwingmann et al. 2004) and reduce electron transport chain activity (Malecki 2001), leading to decreased ATP (Brouillet et al. 1993; Verity 1999). Additionally, it is known that Mn decreases astrocytic glutamate uptake (Hazell and Norenberg 1997; Normandin and Hazell 2002) and reduces the expression of astrocytic glutamate transporter (GLAST) and glutamate transporter 1 (GLT-1) (Erikson et al. 2008). As Mn alters ATP production (Milatovic et al. 2007; Zhang et al. 2003b) and glutamate uptake (Aschner et al. 2001) in astrocytes, basal ganglia neurons could be susceptible of excitotoxic damage (Liu et al. 2006).

Burton et al. (2009) found reduced GS expression in the globus pallidus of intravenously Mn-treated non human primates. Decreased expression of glutamine transporters has been also reported in Mn-exposed cultured astrocytes (Sidoryk-Wegrzynowicz et al. 2009), contributing to the disruption of the glutamate-glutamine cycle.

Changes in glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA content can be found as a consequence of Mn exposure, (Stanwood et al. 2009; Tomás-Camardiel et al. 2002). It has been proposed that loss of GAD-positive cells in the striatum and globus

pallidus of Mn-treated rats may be caused by the loss of chemical, electrical or physical support because of neurite dysfunction encountered in mesencephalic cultures exposed to Mn, resulting in profound changes in cytoskeleton and neurite length, or may be an independent neurotoxic event (Stanwood et al. 2009). Hence, manganism features can be due to the effect of the metal on the interactions among dopaminergic, gabanergic and glutamatergic neurotransmission systems.

Manganism

Manganism has been frequently defined as a disorder whose symptoms resemble those of idiopathic parkinsonism (Calne et al. 1994). Although some studies have found correlation between Mn-exposure and PD (Gorell et al. 1999), most of the evidence points to manganism and PD as different entities. Yet, a connection between manganism and PD through parkin and DMT-1 has recently arisen (Roth et al. 2010; Sriram et al. 2010). Loss of function of parkin and over-expression of DMT-1 have been associated with Parkinson's disease (Salazar et al. 2008; Sriram et al. 2010). Sriram et al. (2010) found that repeated exposure to Mn alters the expression of Park proteins in dopaminergic brain areas and other studies have shown that parkin reduces Mn neurotoxicity (Higashi et al. 2004; Roth et al. 2010) likely by reducing its transport. Over-expression of parkin decreased the expression of DMT-1 in SH-SY5Y cells (Roth et al. 2010). Therefore, the protective effect of parkin can be related to Mn transport as transport is believed to be the rate limiting step for Mn neurotoxic actions (Roth et al. 2010).

Early stage manganism is characterized by psychiatric symptoms, including emotional lability, mania, compulsive or aggressive behavior, hallucinations, sleep, feeding and sex disturbances, as well as mild motor impairment. In established manganism, motor symptoms predominate (Calne et al. 1994; Liu et al. 2006; Olanow 2004). Symptoms common to both PD and manganism include gait imbalance, rigidity, tremors and bradykinesia; however, manganism differs from PD because of the presence of symptoms like earlier behavioral and cognitive dysfunction, symmetry of effects, an intention rather than resting tremor, more prominent

dystonia and a characteristic “cock walk” (Calne et al. 1994). Additionally, in cases of manganese there is little or no response to L-DOPA (Calne et al. 1994; Lu et al. 1994).

Manganese is characterized by Mn accumulation in dopaminergic brain regions with high Fe content, specifically the basal ganglia (caudate nucleus, putamen, globus pallidus, substantia nigra and subthalamic nuclei) (Aschner et al. 2005; Montes et al. 2003; Nagatomo et al. 1999). The globus pallidus is the area most affected neuropathologically and the substantia nigra remains intact, while in PD the substantia nigra is severely damaged and globus pallidus is spared (Perl and Olanow 2007). Mn induced damage is not associated with Lewy body formation, the histological feature of PD (Olanow 2004). Moreover, it has been reported that Mn alone or combined with MPTP, a neurotoxin used to produce a model of PD, had no effect on the dopaminergic targets of MPTP (Baek et al. 2007).

Studies with [18F]-fluorodopa positron emission tomography (PET) have demonstrated intact nigrostriatal dopaminergic system in Mn-exposed individuals with signs of parkinsonism, contrary to the findings in PD patients. The authors concluded that damage may occur in pathways postsynaptic to the nigrostriatal system, probably involving striatal or pallidal neurons (Wolters et al. 1989) resulting in symptoms similar to those observed in PD. Exposed Mn patients can develop motor deficit or manganese without experiencing psychiatric symptoms and neurological function can be deteriorated long after Mn exposure has ceased (Liu et al. 2006). In early stages of manganese, when Mn exposure stops, symptoms can be reversed, but if patients have manifested motor disturbances, manganese is irreversible (Calne et al. 1994). In nonhuman primates motor deficits can be observed even at low internal cumulative doses (below 10 mg Mn/kg) and without effects on globus pallidus cell integrity (Gwiazda et al. 2007).

Hepatic encephalopathy

Cirrhosis is one of the most common causes of death around the world, mainly in people in productive age (Bosetti et al. 2007; Hernández-Muñoz et al. 2001). Many cirrhotic patients, up to 50–70%, may develop hepatic encephalopathy (HE) (Quero and Schalm

1996), a complex neuropsychiatric syndrome characterized by severe cognitive, psychiatric, and motor disturbances resulting from liver failure. It is believed that HE is developed as a consequence of accumulation of toxic substances normally metabolized or removed by the liver, such as ammonia and Mn (Butterworth 2003).

In addition to occupational exposure, food is the major source of Mn (Klos et al. 2006), a fact that acquires importance in cases of liver failure. Because Mn is excreted primarily by the bile (Levy and Nassetta 2003; Papavasiliou et al. 1966), it accumulates in the organs of cirrhotic patients and its levels are frequently increased in post-mortem brains of those patients with the highest levels observed in globus pallidus (Pomier-Layrargues et al. 1995).

Abnormal movements, including psychomotor slowing and hypokinesia, may be part of the clinical spectrum of HE in its chronic form (Cauli et al. 2006; Pomier-Layrargues 2001). Approximately 20–50% of patients with chronic liver failure have moderate to severe parkinsonism (Olanow 2004). The exact mechanism by which liver failure leads to these motor disturbances remains unknown.

Morphological changes in astrocytes, known as Alzheimer type II astrocytosis, constitute an important feature in HE (vom Dahl et al. 2001). Astrocytes appear large, with pale nucleus, margination of peripheral chromatin and prominent nucleolus (Norenberg 2001; Normandin and Hazell 2002; vom Dahl et al. 2001); they have been found predominantly in basal ganglia (Norenberg 1981), although they can be observed both in gray matter and white matter (Butterworth 2000). These morphological changes are considered a pathological hallmark of Mn neurotoxicity (Normandin and Hazell 2002; Pentschew et al. 1963).

Additionally, hyperintensities in T1-weighted MRI are frequently observed in basal ganglia of patients with chronic hepatic disease (Kulisevsky et al. 1993), probably as a consequence of Mn deposition. It is known that there is a relationship between the magnitude of the hyperintensity observed by MRI and the grade of hepatic failure and portosystemic flow, but there is no correlation with the HE stage (Quero Guillén and Herrerías-Gutiérrez 2006). On the other hand, the observed correlation between globus pallidus hyperintensity and motor disturbances suggests that basal ganglia dysfunction is involved in the

etiology of HE and the extrapyramidal symptoms displayed by patients with HE (Butterworth 2008; Spahr et al. 2000).

Bradykinesia is a symptom manifested even in early stages of HE (Joebges et al. 2003). Asterixis, facial and head rigidity, adiadochokinesia, dystonia, global slowness of movements and gait instability are other motor disturbances in liver cirrhosis and mild forms of HE (Burkhard et al. 2003; Mechtcheriakov et al. 2006; Pomier-Layrargues 2001).

Portosystemic shunting and a history of HE seems to constitute a necessary background for parkinsonism to occur in liver disease. Appearance of parkinsonism seems more related to the degree of liver failure rather than to a specific cause (Burkhard et al. 2003).

Motor alterations such as postural and action tremor and gait disturbances were found in cirrhotic patients with bilateral hyperintensities on T1-weighted MRI, while chronic liver failure patients without hyperintensities did not show motor alterations (Klos et al. 2006). Post-mortem brain Mn concentrations were also measured in this study, resulting in pallidal Mn concentrations 4.7 times higher in those patients with pallidal T1 hyperintensity compared to those with normal pallidal MRI signal, concluding that Mn could be responsible for the parkinsonism observed in some cases of chronic liver failure. Additionally, it has been demonstrated that several months after liver transplantation, neurological dysfunction improved or normalized and that pallidal T1 hyperintensity disappeared (Pomier-Layrargues 2001; Pujol et al. 1993).

An important complication of HE is brain edema that in cases of chronic liver failure seems to be present as a low-grade edema. It is believed that increased glutamine levels, resulting from altered brain metabolism, can be playing a role in the development of this condition (Jalan et al. 2003). In this regard our group has demonstrated that Mn is able to increase glutamine levels significantly in the brain of cirrhotic rats (Montes et al. 2003). Additionally, it has been proposed that Mn may act synergistically with ammonia (Butterworth 2008), one of the main toxins involved in the pathophysiology of EH, because both ammonia and Mn have similar effects in cell cultures such as glutamate uptake inhibition (Bender and Norenberg 1996; Hazell and Norenberg 1997), induction of oxidative

stress and mPT (Norenberg et al. 2004; Rao and Norenberg 2004) and cell swelling (Panickar et al. 2007; Rama Rao et al. 2007). Mechanisms for a possible interaction between Mn and ammonia have not been described; however, Mn seems to favor ammonia accumulation in the brain of cirrhotic rats (unpublished results). Therefore, the scenario in HE would not be the same with and without Mn accumulation.

In the case of chronic liver failure, is important to consider that, in addition to Mn or ammonia, other substances, such as mercaptans and phenols (Butterworth 2003, 2008), are accumulated as a consequence of liver impairment and can contribute to the symptoms observed in HE.

Therapeutic strategies

The main strategies aimed to decrease Mn concentrations in the organism are related to metal chelation. Nagatomo et al. (1999) and Jiang et al. (2006) reported the use of Ca-EDTA in patients with high brain and blood Mn levels, obtaining increased Mn excretion in urine, but although symptoms initially improved, they returned. Jiang et al. (2006) reported significant improvement in a patient with severe manganism treated with *p*-aminosalicylic acid (PAS), a drug used for tuberculosis treatment; she was evaluated 7 months and 17 years after the treatment and she was almost without signs of manganism and without T1-weighted MRI hyperintensity. PAS also reduced neurotoxicity caused by Mn exposure in the dopaminergic system of the gill of a bivalve mollusk, most likely by a chelation mechanism (Nelson et al. 2010). This drug is promising because of its lipophilicity and hence, the possibility of penetrating the BBB (Aschner et al. 2007). Another agent tested in rats exposed to high Mn levels in drinking water is diethyl-2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate (DPTVP); it improved motor performance, probably by its antioxidant effects or by altering striatal Mn transport (Avila et al. 2010).

As discussed above Mn alters glutamate transport. 17β -Estradiol and tamoxifen reduce Mn-induced astrocytic glutamate transport impairment, increasing GLAST expression via estrogen receptor-mediated genomic action (Lee et al. 2009).

In cases of liver failure it has been proposed that patients could be placed on low Mn diets but there are no clinical data using this strategy (Klos et al. 2006). The evidence discussed above regarding the role of Mn in HE provides a basis to consider the importance of monitoring Mn levels in cirrhotic patients as well as restricting Mn content in their diet.

Conclusion

Mn shares many transport mechanism with Fe; however, there are several gaps about the role Fe transporters in Mn transport in the brain. Mn promotes motor and psychiatric disturbances but, until now, the doses of Mn and exposure time that produce them are not precisely known. The dopaminergic system is affected in Mn intoxication, but how involved it is and its interaction with other neurotransmission systems remain to be studied in depth. Studies testing different schemes of Mn dosage, exposure time and routes of administration deserve further research in order to clarify a role for the dopaminergic system and the influence of other neurotransmission systems. Regarding HE, there may be a series of complex interactions between Mn and other substances that also merit exploration.

Although there are some promising experimental strategies aimed to treat Mn intoxication there is no effective therapy for the treatment of Mn long term effects. Therapeutic agents able to penetrate into the CNS and remove Mn are needed. Restricting Mn in the diet of cirrhotic patients is a potential approach to avoid increased brain Mn levels.

Acknowledgments S. Rivera-Mancía wants to thank the Biomedical Research Graduate Program, the Biomedical Research Institute and the National Autonomous University of Mexico for their support to carry out this work. S Rivera-Mancía receives a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (203330). S Montes receives a grant from CONACYT (51541).

References

- Albin RL (2000) Basal ganglia neurotoxins. *Neurol Clin* 18:665–680
- Anderson JG, Cooney PT, Erikson KM (2007) Inhibition of DAT function attenuates manganese accumulation in the globus pallidus. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:179–184
- Andrews NC (2000) Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 1:208–217
- Aoki I, Wu YJ, Silva AC, Lynch RM et al (2004) In vivo detection of neuroarchitecture in the rodent brain using manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 22:1046–1059
- Archibald FS, Tyree C (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch Biochem Biophys* 256:638–650
- Aschner M, Aschner J (1991) Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood–brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev* 15:333–340
- Aschner M, Gannon M (1994) Manganese (Mn) transport across the rat blood–brain barrier: saturable and transporter-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull* 33:345–349
- Aschner M, Gannon M, Kimelberg HK (1992) Manganese uptake and efflux in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 58:730–735
- Aschner M, Vrana KE, Zheng W (1999) Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology* 20:173–180
- Aschner M, Mutkus L, Allen JW (2001) Aspartate and glutamate transport in acutely and chronically ethanol exposed neonatal rat primary astrocyte cultures. *Neurotoxicology* 22:601–605
- Aschner M, Erikson KM, Dorman DC (2005) Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 35:1–32
- Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W (2007) Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 221:131–147
- Au C, Benedetto A, Aschner M (2008) Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology* 29:569–576
- Autissier N, Rochette L, Dumas P, Beley A et al (1982) Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic manganese chloride administration. *Toxicology* 24:175–182
- Avila DS, Colle D, Gubert P, Palma AS et al (2010) A possible neuroprotective action of a vinyllic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115:194–201
- Baek SY, Kim YH, Oh SO, Lee CR et al (2007) Manganese does not alter the severe neurotoxicity of MPTP. *Hum Exp Toxicol* 26:203–211
- Bender AS, Norenberg MD (1996) Effects of ammonia on L-glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 21:567–573
- Bock NA, Paiva FF, Nascimento GC, Newman JD et al (2008) Cerebrospinal fluid to brain transport of manganese in a non-human primate revealed by MRI. *Brain Res* 1198:160–170
- Bonilla E (1980) L-tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav Toxicol* 2:37–41
- Borghain R, Singh AK, Radhakrishna H, Rao VC et al (1995) Delayed onset generalised dystonia after cyanide poisoning. *Clin Neurol Neurosurg* 97:213–215
- Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Zatonski WA et al (2007) Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 46:827–839

- Bouchard M, Laforest F, Vandelac L, Bellinger D et al (2007) Hair manganese and hyperactive behaviors: pilot study of school-age children exposed through tap water. *Environ Health Perspect* 115:122–127
- Brouillet EP, Shinobu L, McGarvey U, Hochberg F et al (1993) Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp Neurol* 120:89–94
- Burdo JR, Martin J, Menzies SL, Dolan KG et al (1999) Cellular distribution of iron in the brain of the Belgrade rat. *Neuroscience* 93:1189–1196
- Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM et al (2001) Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res* 66:1198–1207
- Burkhard PR, Delavelle J, Du PR, Spahr L (2003) Chronic Parkinsonism associated with cirrhosis: a distinct subset of acquired hepatocerebral degeneration. *Arch Neurol* 60:521–528
- Burton NC, Schneider JS, Syversen T, Guilarte TR (2009) Effects of chronic manganese exposure on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter markers in the nonhuman primate brain. *Toxicol Sci* 111:131–139
- Butterworth RF (2000) Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 32(Suppl 1):171–180
- Butterworth RF (2003) Hepatic encephalopathy. *Alcohol Res Health* 27:240–246
- Butterworth RF (2008) Pathophysiology of hepatic encephalopathy: the concept of synergism. *Hepatol Res* 38(Suppl.1): S116–S121
- Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS et al (1994) Manganism and idiopathic Parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* 44:1583–1586
- Carella F, Grassi MP, Savoiaro M, Contri P et al (1988) Dystonic-Parkinsonian syndrome after cyanide poisoning: clinical and MRI findings. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:1345–1348
- Cauli O, Llansola M, Erceg S, Felipe V (2006) Hypolocomotion in rats with chronic liver failure is due to increased glutamate and activation of metabotropic glutamate receptors in substantia nigra. *J Hepatol* 45:654–661
- Chandra SV, Shukla GS (1976) Role of iron deficiency in inducing susceptibility to manganese toxicity. *Arch Toxicol* 35:319–323
- Choi IS (1983) Delayed neurologic sequelae in carbon monoxide intoxication. *Arch Neurol* 40:433–435
- Desole MS, Esposito G, Migheli R, Fresu L et al (1995) Cellular defence mechanisms in the striatum of young and aged rats subchronically exposed to manganese. *Neuropharmacology* 34:289–295
- Diaz-Veliz G, Mora S, Gomez P, Dossi MT et al (2004) Behavioral effects of manganese injected in the rat substantia nigra are potentiated by dicumarol, a DT-diaphorase inhibitor. *Pharmacol Biochem Behav* 77:245–251
- Dietz MC, Ihrig A, Wrazidlo W, Bader M et al (2001) Results of magnetic resonance imaging in long-term manganese dioxide exposed workers. *Environ Res* 85:37–40
- Donaldson J, McGregor D, LaBella F (1982) Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can J Physiol Pharmacol* 60:1398–1405
- Erikson KM, Aschner M (2006) Increased manganese uptake by primary astrocyte cultures with altered iron status is mediated primarily by divalent metal transporter. *Neurotoxicology* 27:125–130
- Erikson KM, Syversen T, Steinnes E, Aschner M (2004) Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency. *J Nutr Biochem* 15:335–341
- Erikson KM, Dorman DC, Lash LH, Aschner M (2008) Duration of airborne-manganese exposure in rhesus monkeys is associated with brain regional changes in biomarkers of neurotoxicity. *Neurotoxicology* 29:377–385
- Fernandes A, de Oliveira EF, de Rezende IC, Ponzoni S (2010) Manganese neurotoxic time course is not influenced by L-deprenyl systemic treatment: influence of L-deprenyl in manganese neurotoxic time course. *Brain Res* 1317:277–285
- Finkelstein Y, Zhang N, Fitsanakis VA, Avison MJ et al (2008) Differential deposition of manganese in the rat brain following subchronic exposure to manganese: a T1-weighted magnetic resonance imaging study. *Isr Med Assoc J* 10:793–798
- Finley JW, Davis CD (1999) Manganese deficiency and toxicity: are high or low dietary amounts of manganese cause for concern? *Biofactors* 10:15–24
- Fitsanakis VA, Piccola G, Aschner JL, Aschner M (2006) Characteristics of manganese (Mn) transport in rat brain endothelial (RBE4) cells, an in vitro model of the blood-brain barrier. *Neurotoxicology* 27:60–70
- Fitsanakis VA, Piccola G, Marreilha dos Santos AP, Aschner JL et al (2007) Putative proteins involved in manganese transport across the blood brain barrier. *Hum Exp Toxicol* 26:295–302
- Fitsanakis VA, Thompson KN, Deery SE, Milatovic D et al (2009) A chronic iron-deficient/high-manganese diet in rodents results in increased brain oxidative stress and behavioral deficits in the Morris water maze. *Neurotox Res* 15:167–178
- Fitsanakis VA, Zhang N, Garcia S, Aschner M (2010) Manganese (Mn) and iron (Fe): interdependency of transport and regulation. *Neurotox Res* 18:124–131
- Garcia SJ, Gellein K, Syversen T, Aschner M (2006) A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. *Toxicol Sci* 92:516–525
- Garrick MD (2011) Human iron transporters. *Genes Nutr* 6:45–54
- Garrick MD, Singleton ST, Vargas F, Kuo HC et al (2006) DMT1: which metals does it transport? *Biol Res* 39:79–85
- Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE (1990) Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *Biochem J* 266:329–334
- Girijashanker K, He L, Soleimani M, Reed JM et al (2008) Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol* 73:1413–1423
- Gonzalez-Zulueta M, Ensz LM, Mukhina G, Lebovitz RM et al (1998) Manganese superoxide dismutase protects nNOS neurons from NMDA and nitric oxide-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 18:2040–2055

- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL et al (1999) Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 20:239–247
- Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Hackam DJ et al (1999) The iron transport protein NRAMP2 is an integral membrane glycoprotein that colocalizes with transferrin in recycling endosomes. *J Exp Med* 189:831–841
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y et al (1997) Cloning and characterization of a mammalian protein-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388:482–488
- Gunter TE, Miller LM, Gavin CE, Eliseev R et al (2004) Determination of the oxidation states of manganese in brain, liver, and heart mitochondria. *J Neurochem* 88:266–280
- Gunter KK, Aschner M, Miller LM, Eliseev R et al (2006) Determining the oxidation states of manganese in NT2 cells and cultured astrocytes. *Neurobiol Aging* 27:1816–1826
- Gunter TE, Gerstner B, Lester T, Wojtovich AP et al (2010) An analysis of the effects of Mn^{2+} on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. *Toxicol Appl Pharmacol* 249:65–75
- Gwiazda R, Lucchini R, Smith D (2007) Adequacy and consistency of animal studies to evaluate the neurotoxicity of chronic low-level manganese exposure in humans. *J Toxicol Environ Health A* 70:594–605
- HaMai D, Bondy SC (2004) Oxidative basis of manganese neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1012:129–141
- Hardy G (2009) Manganese in parenteral nutrition: who, when, and why should we supplement? *Gastroenterology* 137:S29–S35
- Hazell AS, Butterworth RF (1999) Hepatic encephalopathy: an update of pathophysiological mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:99–112
- Hazell AS, Norenberg MD (1997) Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 22:1443–1447
- Hazell AS, Normandin L, Norenberg MD, Kennedy G et al (2006) Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neurosci Lett* 396:167–171
- Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JE, Trejo-Solís C et al (2001) Adenosine reverses a pre-established CCl_4 -induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 34:677–687
- Higashi Y, Asanuma M, Miyazaki I, Hattori N et al (2004) Parkin attenuates manganese-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 89:1490–1497
- Hill JM, Ruff MR, Weber RJ, Pert CB (1985) Transferrin receptors in rat brain: neuropeptide-like pattern and relationship to iron distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4553–4557
- Iheagwara KN, Thom SR, Deutschman CS, Levy RJ (2007) Myocardial cytochrome oxidase activity is decreased following carbon monoxide exposure. *Biochim Biophys Acta* 1772:1112–1116
- Iregren A (1999) Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests. *Neurotoxicology* 20:315–323
- Jalan R, Shawcross D, Davies N (2003) The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1175–1181
- Jiang YM, Mo XA, Du FQ, Fu X et al (2006) Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study. *J Occup Environ Med* 48:644–649
- Joebges EM, Heidemann M, Schimke N, Hecker H et al (2003) Bradykinesia in minimal hepatic encephalopathy is due to disturbances in movement initiation. *J Hepatol* 38:273–280
- Jursa T, Smith DR (2009) Ceruloplasmin alters the tissue disposition and neurotoxicity of manganese, but not its loading onto transferrin. *Toxicol Sci* 107:182–193
- Katsoyiannis IA, Katsoyiannis AA (2006) Arsenic and other metal contamination of groundwaters in the industrial area of Thessaloniki, Northern Greece. *Environ Monit Assess* 123:393–406
- Keen CL, Ensuna JL, Clegg MS (2000) Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese. *Met Ions Biol Syst* 37:89–121
- Kim Y, Kim KS, Yang JS, Park IJ et al (1999) Increase in signal intensities on T1-weighted magnetic resonance images in asymptomatic manganese exposed workers. *Neurotoxicology* 20:901–908
- Klos KJ, Ahlskog JE, Kumar N, Cambern S et al (2006) Brain metal concentrations in chronic liver failure patients with pallidal T1 MRI hyperintensity. *Neurology* 67:1984–1989
- Krieger D, Krieger S, Jansen O, Gass P et al (1995) Manganese and chronic hepatic encephalopathy. *Lancet* 346:270–274
- Kulisevsky J, Pujol J, Junque C, Deus J et al (1993) MRI pallidal hyperintensity and brain atrophy in cirrhotic patients: two different MRI patterns of clinical deterioration? *Neurology* 43:2570–2573
- Kwik-Urbe C, Smith DR (2006) Temporal responses in the disruption of iron regulation by manganese. *J Neurosci Res* 83:1601–1610
- Laterra J, Keep R, Betz LA, Goldstein GW (1999) Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Usher MD (eds) *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 671–689
- Leavesley HB, Li L, Mukhopadhyay S, Borowitz JL et al (2010) Nitrite-mediated antagonism of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase in dopamine neurons. *Toxicol Sci* 115:569–576
- Lee MS, Marsden CD (1994) Neurological sequelae following carbon monoxide poisoning clinical course and outcome according to the clinical types and brain computed tomography scan findings. *Mov Disord* 9:550–558
- Lee ES, Sidoryk M, Jiang H, Yin Z et al (2009) Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *J Neurochem* 110:530–544
- Levy B, Nassetta WJ (2003) Neurologic effects of manganese in humans: a review. *Int J Occup Environ Health* 9:153–163
- Liu X, Sullivan KA, Madl JE, Legare M et al (2006) Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. *Toxicol Sci* 91:521–531

- Lockman P, Roder K, Allen D (2001) Inhibition of the rat blood–brain barrier choline transporter by manganese chloride. *J Neurochem* 79:588–594
- Lu CS, Huang CC, Chu NS, Calne DB (1994) Levodopa failure in chronic manganese. *Neurology* 44:1600–1602
- Malecki EA (2001) Manganese toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and DNA fragmentation in rat primary striatal neurons. *Brain Res Bull* 55:225–228
- Malecki EA, Devenyi AG, Beard JL, Connor JR (1999) Existing and emerging mechanisms for transport of iron and manganese to the brain. *J Neurosci Res* 56:113–122
- McCord JM (1976) Iron- and manganese-containing superoxide dismutases: structure, distribution, and evolutionary relationships. *Adv Exp Med Biol* 74:540–550
- McDougall SA, Reichel CM, Farley CM, Flesher MM et al (2008) Postnatal manganese exposure alters dopamine transporter function in adult rats: potential impact on nonassociative and associative processes. *Neuroscience* 154:848–860
- Mechtcheriakov S, Graziadei IW, Kugener A, Schuster I et al (2006) Motor dysfunction in patients with liver cirrhosis: impairment of handwriting. *J Neurol* 253:349–356
- Milatovic D, Yin Z, Gupta RC, Sidoryk M et al (2007) Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol Sci* 98:198–205
- Milatovic D, Zaja-Milatovic S, Gupta RC, Yu Y et al (2009) Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 240:219–225
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C (2001) Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. *Brain Res* 891:123–129
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C (2003) Role of manganese accumulation in increased brain glutamine of the cirrhotic rat. *Neurochem Res* 28:911–917
- Murayama Y, Weber B, Saleem KS, Augath M et al (2006) Tracing neural circuits in vivo with Mn-enhanced MRI. *Magn Reson Imaging* 24:349–358
- Murphy VA, Wadhvani KC, Smith QR, Rapoport SI (1991) Saturable transport of manganese(II) across the rat blood–brain barrier. *J Neurochem* 57:948–954
- Myers JE, teWaterNaude J, Fourie M, Zogoeh B et al (2003) Nervous system effects of occupational manganese exposure on South African manganese mineworkers. *Neurotoxicology* 24:649–656
- Myers JE, Fine J, Ormond-Brown D, Fry J et al (2009) Estimating the prevalence of clinical manganese using a cascaded screening process in a South African manganese smelter. *Neurotoxicology* 30:934–940
- Nagatomo S, Umehara F, Hanada K, Nobuhara Y et al (1999) Manganese intoxication during total parenteral nutrition: report of two cases and review of the literature. *J Neurol Sci* 162:102–105
- Nagy JI, Carter DA, Lehmann J, Fibiger HC (1978) Evidence for a GABA-containing projection from the entopeduncular nucleus to the lateral habenula in the rat. *Brain Res* 145:360–364
- Nelson M, Huggins T, Licorish R, Carroll MA et al (2010) Effects of p-Aminosalicylic acid on the neurotoxicity of manganese on the dopaminergic innervation of the cilia of the lateral cells of the gill of the bivalve mollusc, *Crasostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 151:264–270
- Norenberg MD (1981) Astrocytes in liver disease. In: Fedoroff F, Hertz L (eds) *Advances in cellular neurobiology*. Academic Press, New York, pp 303–352
- Norenberg M (2001) Astrocytes and ammonia in hepatic encephalopathy. In: de Vellis J (ed) *Astrocytes in the aging brain*. Humana Press, New Jersey, pp 477–496
- Norenberg M, Rama Rao KV, Jayakumar AR (2004) Ammonia neurotoxicity and the mitochondrial permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 36:303–307
- Normandin L, Hazell AS (2002) Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiological mechanisms. *Metab Brain Dis* 17:375–387
- Oikawa S, Hirosawa I, Tada-Oikawa S, Furukawa A et al (2006) Mechanism for manganese enhancement of dopamine-induced oxidative DNA damage and neuronal cell death. *Free Radic Biol Med* 41:456–478
- Olanow CW (2004) Manganese-induced Parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1012:209–223
- Olanow CW, Good PF, Shinotoh H, Hewitt KA et al (1996) Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology* 46:492–498
- Pal PK, Samii A, Calne DB (1999) Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 20:227–238
- Panickar KS, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Norenberg MD (2007) Downregulation of the 18-kDa translocator protein: effects on the ammonia-induced mitochondrial permeability transition and cell swelling in cultured astrocytes. *Glia* 55:1720–1727
- Papavasiliou PS, Miller ST, Cotzias GC (1966) Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese. *Am J Physiol* 211:211–216
- Pappas BA, Zhang D, Davidson CM, Crowder T et al (1997) Perinatal manganese exposure: behavioral, neurochemical, and histopathological effects in the rat. *Neurotoxicol Teratol* 19:17–25
- Park RM, Bowler RM, Roels HA (2009) Exposure-response relationship and risk assessment for cognitive deficits in early welding-induced manganese. *J Occup Environ Med* 51:1125–1136
- Pentschew A, Ebner FF, Kovatch RM (1963) Experimental manganese encephalopathy in monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol* 22:488–499
- Perl DP, Olanow CW (2007) The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:675–682
- Piantadosi CA, Carraway MS, Suliman HB (2006) Carbon monoxide, oxidative stress, and mitochondrial permeability pore transition. *Free Radic Biol Med* 40:1332–1339
- Pomier-Layrargues G (2001) Movement dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 16:27–35
- Pomier-Layrargues G, Spahr L, Butterworth RF (1995) Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients. *Lancet* 345:375
- Prabhakarana K, Ghosh D, Chapman GD, Gunasekar PG (2008) Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. *Brain Res Bull* 76:361–367

- Prozialeck WC, Edwards JR, Nebert DW, Woods JM et al (2008) The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicol Sci* 102:207–218
- Pujol A, Pujol J, Graus F, Rimola A et al (1993) Hyperintense globus pallidus on T1-weighted MRI in cirrhotic patients is associated with severity of liver failure. *Neurology* 43:65–69
- Quero JC, Schalm SW (1996) Subclinical hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 16:241–248
- Quero Guillén JC, Herreras-Gutiérrez JM (2006) Diagnostic methods in hepatic encephalopathy. *Clin Chim Acta* 365:1–8
- Rama Rao KVR, Reddy PVB, Hazell AS, Norenberg MD (2007) Manganese induces cell swelling in cultured astrocytes. *Neurotoxicology* 28:807–812
- Rao KV, Norenberg MD (2004) Manganese induces the mitochondrial permeability transition in cultured astrocytes. *J Biol Chem* 279:32333–32338
- Reaney SH, Kwik-Urbe CL, Smith DR (2002) Manganese oxidation state and its implications for toxicity. *Chem Res Toxicol* 15:1119–1126
- Rose C, Butterworth RF, Zayed J, Normandin L et al (1999) Manganese deposition in basal ganglia structures results from both portal-systemic shunting and liver dysfunction. *Gastroenterology* 117:640–644
- Roth JA, Garrick MD (2003) Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol* 66:1–13
- Roth JA, Singleton S, Feng J, Garrick M et al (2010) Parkin regulates metal transport via proteasomal degradation of the 1B isoforms of divalent metal transporter 1. *J Neurochem* 113:454–464
- Rouault TA, Zhang DL, Jeong SY (2009) Brain iron homeostasis, the choroid plexus, and localization of iron transport proteins. *Metab Brain Dis* 24:673–684
- Salazar J, Mena N, Hunot S, Prigent A et al (2008) Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18578–18583
- Saleem KS, Pauls JM, Augath M, Trinath T et al (2002) Magnetic resonance imaging of neuronal connections in the macaque monkey. *Neuron* 34:685–700
- Santamaria AB, Cushing CA, Antonini JM, Finley BL et al (2007) State-of-the-science review: does manganese exposure during welding pose a neurological risk? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 10:417–465
- Schaumburg HH, Herskovitz S, Cassano VA (2006) Occupational manganese neurotoxicity provoked by hepatitis C. *Neurology* 67:322–323
- Settivari R, Levora J, Nass R (2009) The divalent metal transporter homologues SMF-1/2 mediate dopamine neuron sensitivity in *Caenorhabditis elegans* models of manganese and Parkinson disease. *J Biol Chem* 284:35758–35768
- Siddappa AJ, Rao RB, Wobken JD, Leibold EA et al (2002) Developmental changes in the expression of iron regulatory proteins and iron transport proteins in the perinatal rat brain. *J Neurosci Res* 68:761–775
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Lee E, Albrecht J, Aschner M (2009) Manganese disrupts astrocyte glutamine transporter expression and function. *J Neurochem* 110:822–830
- Sistrunk SC, Ross MK, Filipov NM (2007) Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: An in vitro study. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:286–296
- Sloot WN, Gramsbergen JBP (1994) Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Res* 657:124–132
- Sloot WN, van der Sluijs-Gelling AJ, Gramsbergen JB (1994) Selective lesions by manganese and extensive damage by iron after injection into rat striatum or hippocampus. *J Neurochem* 62:205–216
- Spahr L, Vingerhoets F, Lazeyras F et al (2000) Magnetic resonance imaging and proton spectroscopic alterations correlate with Parkinsonian signs in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 119:774–781
- Sriram K, Lin GX, Jefferson AM, Roberts JR et al (2010) Mitochondrial dysfunction and loss of Parkinson's disease-linked proteins contribute to neurotoxicity of manganese-containing welding fumes. *FASEB J* 24:4989–5002
- Stanwood GD, Leitch DB, Savchenko V, Wu J et al (2009) Manganese exposure is cytotoxic and alters dopaminergic and GABAergic neurons within the basal ganglia. *J Neurochem* 110:378–389
- Takeda A (2003) Manganese action in brain function. *Brain Res Rev* 41:79–87
- Takeda A, Ishiwatari S, Okada S (2000) Influence of transferrin on manganese uptake in rat brain. *J Neurosci Res* 59:542–552
- Tomás-Camardiel M, Herrera AJ, Venero JL, Sánchez-Hidalgo MC et al (2002) Differential regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats. *Brain Res Mol Brain Res* 103:116–129
- Tran TT, Chowanadisai W, Crinella FM, Chiczy-DeMet A et al (2002) Effect of high dietary manganese intake of neonatal rats on tissue mineral accumulation, striatal dopamine levels, and neurodevelopmental status. *Neurotoxicology* 23:635–643
- Verity MA (1999) Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* 20:489–497
- vom Dahl S, Kircheis G, Häussinger D (2001) Hepatic encephalopathy as a complication of liver disease. *World J Gastroenterol* 7:152–156
- Walaas I, Fonnum F (1979) The distribution and origin of glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in ventral pallidum and other basal forebrain regions. *Brain Res* 177:325–336
- Wang X, Miller DS, Zheng W (2008) Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron. *Toxicol Appl Pharmacol* 230:167–174
- Wedler FC, Denman RB (1984) Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr Top Cell Regul* 24:153–169
- Wolburg H, Paulus W (2010) Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:75–88
- Wolters EC, Huang CC, Clark C, Peppard RF et al (1989) Positron emission tomography in manganese intoxication. *Ann Neurol* 26:647–651
- Wu LJ, Leenders AG, Cooperman S, Meyron-Holtz E et al (2004) Expression of the iron transporter ferroportin in

- synaptic vesicles and the blood–brain barrier. *Brain Res* 1001:108–117
- Yamada M, Ohno S, Okayasu I, Okeda R et al (1986) Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol* 70:273–278
- Yin Z, Aschner JL, dos Santos AP, Aschner M (2008) Mitochondrial-dependent manganese neurotoxicity in rat primary astrocyte cultures. *Brain Res* 1203:1–11
- Yin Z, Jiang H, Lee ES, Ni M et al (2010) Ferroportin is a manganese-responsive protein that decreases manganese cytotoxicity and accumulation. *J Neurochem* 112:1190–1198
- Yokel RA, Crossgrove JS (2004) Manganese toxicokinetics at the blood–brain barrier. *Res Rep Health Eff Inst* 119:7–58
- Zhang J, Fitsanakis VA, Gu G, Jing D et al (2003a) Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. *J Neurochem* 84:336–346
- Zhang S, Zhou Z, Fu J (2003b) Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environ Res* 93:149–157
- Zhang S, Fu J, 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. *Toxicol In Vitro* 18:71–77
- Zhang F, Xu Z, Gao J, Xu B et al (2008) In vitro effect of manganese chloride exposure on energy metabolism and oxidative damage of mitochondria isolated from rat brain. *Environ Toxicol Pharmacol* 26:232–236
- Zhao F, Cai T, Liu M, Zheng G et al (2009) Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganese. *Toxicol Sci* 107:156–164
- Zheng W, Ren S, Graziano JH (1998) Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res* 799:334–342
- Zwingmann C, Leibfritz D, Hazell AS (2004) Brain energy metabolism in a sub-acute rat model of manganese neurotoxicity: an ex vivo nuclear magnetic resonance study using [1–¹³C]glucose. *Neurotoxicology* 25:573–587

Morphological changes of rat astrocytes induced by liver damage but not by manganese chloride exposure

Susana Rivera-Mancía · Sergio Montes ·
Maricela Méndez-Armenta · Pablo Muriel ·
Camilo Ríos

Received: 7 January 2008 / Accepted: 3 September 2008 /
Published online: 8 April 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract Liver cirrhosis is a common cause of death around the world. One of its more severe complications is hepatic encephalopathy. As a consequence of liver impairment, manganese (Mn) and other substances accumulate in the brain. Astrocytic morphological changes have been found in postmortem brains of cirrhotic patients. In this study we used a model of cirrhosis induced by bile duct ligation and Mn accumulation by exposing rats to MnCl_2 (1 mg Mn/ml) in their drinking water. Four experimental groups were used: Sham, Sham plus Mn treatment, BDL (bile duct ligated) and BDL plus Mn treatment. Brain Mn was measured by atomic absorption spectrophotometry in cortex, striatum and *globus pallidus*. Altered and normal astrocytes were counted in the same brain areas. Brain

S. Rivera-Mancía · S. Montes · C. Ríos
Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía,
‘Manuel Velasco Suárez’, México D.F, México

M. Méndez-Armenta
Departamento de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía,
‘Manuel Velasco Suárez’, México D.F, México

P. Muriel
Sección Externa de Farmacología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.,
México D.F, México

C. Ríos (✉)
National Institute of Neurology and Neurosurgery ‘Manuel Velasco Suárez’ Insurgentes Sur 3877,
La Fama, Tlalpan,
México D.F 14269, Mexico
e-mail: crios@correo.xoc.uam.mx

Mn was highest in rats of the BDL Mn group. An increased number of altered astrocytes was found only in BDL groups, Mn did not modify this effect. No changes were found in the total number of astrocytes. According to our results, biliary obstruction induced an increase in the number of altered astrocytes since early stages of cirrhosis and Mn did not affect this effect.

Keywords Hepatic encephalopathy · Manganese · Astrocytes · Cirrhosis

Introduction

Liver cirrhosis is among the most common causes of death around the world in people in productive age (Hernández-Muñoz et al. 2001; Bosetti et al. 2007). When liver becomes cirrhotic many substances accumulate in diverse organs of the body. Brain is severely affected by such substances, among them manganese (Mn) seems to play an important role in the pathophysiology of hepatic encephalopathy.

On the other hand Mn is involved in many biological functions (Ledig et al. 1991) and is essential for normal brain physiology (Sloot and Gramsbergen 1994). However, when it is present in excess in the organism, it causes brain function impairment and symptoms that resemble idiopathic parkinsonism (Calne et al. 1994). Mn has been encountered increased in the brain of people chronically exposed to this metal such as miners and ore milling plant workers (Chia et al. 1993). As Mn is normally excreted into the bile (Papavasiliou et al. 1966; Levy and Nassetta 2003), it is frequently found increased in autopsied brains of cirrhotic patients (Pomier-Layrargues et al. 1995). Tissue Mn is raised in caudate, putamen, *globus pallidus* and *substantia nigra* of cirrhotic patients post mortem (Yamada et al. 1986). Hyperintensities in magnetic resonance imaging (MRI) are commonly observed in the basal ganglia of patients with chronic liver disease (Kulisevsky et al. 1993) probably as a consequence of Mn deposits. In addition, Mn has been related to increased brain glutamine levels (Montes et al. 2003) and changes in dopamine metabolism (Montes et al. 2001; Sistrunk et al. 2007) and it could be related to other alterations observed in the brain of patients with chronic liver impairment, such as astrocytic morphological changes (Butterworth 2000).

Many cirrhotic patients, up to 50% to 70%, develop hepatic encephalopathy (Quero and Schalm 1996), a neuropsychiatric syndrome characterized by alterations of intellectual function, personality, consciousness and motor coordination (Rodrigo et al. 2004). A marker of hepatic encephalopathy is the presence of morphological changes in astrocytes, an alteration known as Alzheimer type II astrocytosis. Changes in astrocytes include nuclear pallor and enlargement, chromatin peripheral margination and prominent nucleoli (vom Dahl et al. 2001; Normandin and Hazell 2002; Norenberg et al. 1974) and they have been found mainly in the basal ganglia of patients dying of hepatic encephalopathy (Norenberg 1981). They are seen in both grey and white matter structures (Butterworth 2000).

Astrocytes are the main site for cerebral ammonia detoxification through the conversion of ammonia to glutamine (vom Dahl et al. 2001) in a reaction catalyzed by glutamate ammonia ligase (EC 6.3.1.2), also called glutamine synthetase. Another important characteristic of those cells is their specific high affinity transport

system for Mn (Aschner et al. 1999). Those factors make those cells susceptible to damage in chronic liver failure.

Previously, we have reported a model of Mn accumulation induced by chronic liver damage through bile duct obstruction plus Mn given in the drinking water (Montes et al. 2001, 2002, 2003). A remarkable Mn accumulation in brain structures such as cortex, striatum and *globus pallidus* is produced in rats submitted to that model. In the present study, we tested the possible influence of BDL-induced chronic liver damage and Mn accumulation on the morphology of astrocytes.

Materials and methods

Reagents

Hydroxyproline, chloramine-T, ethylene glycol, p-dimethylaminobenzaldehyde, activated charcoal, L-alanine, α -ketoglutaric acid, p-nitrophenylphosphate, γ -glutamyl-p-nitroanilide, redistilled nitric acid and manganese chloride tetrahydrate were all obtained from Sigma St Luis, M.O., USA, formaldehyde was from J. T. Baker Mexico and bilirubin kits from Diagnostic Chemicals Limited Atizapan, Mexico.

Animals and liver damage induction

Male Wistar rats weighing 200–250 g were obtained from Central Animal House of CINVESTAV, Mexico D.F., Mexico and they were randomly allocated into one of the following groups: Sham, Sham-Mn, bile duct ligated (BDL) or BDL-Mn; BDL were liver-damaged rats and Mn were animals treated with Mn in their drinking water (see below). The animals were fed ad libitum with standard rat chow and water or Mn solution and they were maintained on a 12:12 h light/dark cycle. The study complies with the Mexican regulation regarding the care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999). All efforts were made to minimize the number of animals and their suffering.

Liver damage was induced using the model reported by Kountouras et al. (1984). Briefly, under anesthesia, a 1 cm incision in the medial portion of the abdomen, below the xiphoid process, was made and the muscle was cut, epiploon was exposed and the portion of the intestine in which bile duct is attached was exposed, bile duct was ligated and, finally, cut. In Sham rats the same procedure was carried out without ligating and cutting the bile duct. Mn treatment was carried out as previously reported (Montes et al. 2002). Drinking water was substituted by a 1 mg Mn/ml solution ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ was used). Animals were treated for either 2 or 4 weeks with manganese. On the day of sacrifice rats were anesthetized, blood was then obtained and brain was rapidly removed. Liver and spleen were also obtained and weighed.

Liver function tests and collagen determination

Alanine aminotransferase (ALT) (Reitman and Frankel 1957), alkaline phosphatase (AP) (Bergmeyer et al. 1983) and γ -glutamyltranspeptidase (GGT) (Glossman and Neville 1972) activities and bilirubin quantification (Kit Diagnostics Chemical

Limited) were performed in blood plasma. A segment of the liver (100 mg) was removed to determine collagen concentration by means of the hydroxyproline content as previously reported (Muriel 1998).

Histology

Using a sagittal rodent brain matrix (ASI instruments), a cut was made 3 mm from midline in the right hemibrain. Such a procedure provided us with histological material in which frontal cortex, striatum and *globus pallidus* were all evident (Paxinos and Watson 1998). The sections were fixed in 10% buffered formalin during 4 days (Norenberg et al. 1974; Hazell et al. 2006), then tissue was paraffin embedded and cut 4 μ m thick and finally stained with hematoxylin-eosin.

Three slides per rat were prepared and analyzed under light microscopy. Images from five immersion oil fields were selected randomly from each area, frontal cortex, striatum and *globus pallidus* in each slide and they were taken using the IM500 software (Leica). Normal and altered astrocytes were counted in those images. Altered astrocytes were defined when they showed margination of chromatin and nuclear pallor. Percentages of altered astrocytes were obtained by dividing the number of altered astrocytes between total astrocytes in the five fields counted in each slide and the total number of astrocytes was expressed as the average of astrocytes per field in each slide per rat.

Fragments of liver were obtained and fixed in 10% buffered formalin, paraffin embedded, cut at 4 μ m and stained with hematoxylin-eosin and Masson trichrome staining and observed under light microscopy to search for markers of cirrhosis.

Mn determination

Mn levels were determined as previously reported (Montes et al. 2002). From the remaining hemibrain, cortex, striatum and *globus pallidus* were isolated and digested with redistilled nitric acid for 30 min at 60 C. Mn content was determined in an atomic absorption spectrophotometer Model 3110 (Perkin Elmer) with a Mn hollow cathode lamp.

Data analysis

Data were analyzed using two way block design ANOVA using the time of sacrifice as one block, using with the SPSS V. 13.0 software. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. All results are expressed as the mean + SEM.

Results

Liver damage

Spleen and liver relative weights were increased in BDL rats after both 2 and 4 weeks of treatment (Table 1), as a result of liver damage progression. Microscopically, disrupted architecture of the liver and fibrosis were observed

Table 1 Liver and spleen relative weights and collagen levels in rats after 2 and 4 weeks of biliary obstruction and/or Mn exposure in the drinking water

Treatment (weeks)	Liver/body weight×100	Spleen/body weight×100	Collagen (mg/g liver)
Sham (2 weeks)	3.66±0.12	0.23±0.01	0.99±0.17
Sham (4 weeks)	3.35±0.08	0.21±0.02	1.52±0.23
Sham-Mn (2 weeks)	3.58±0.07	0.23±0.01	1.20±0.06
Sham-Mn (4 weeks)	3.42±0.05	0.21±0.01	1.02±0.14
BDL (2 weeks)	6.13±0.38*	0.50±0.04*	1.70±0.28*
BDL (4 weeks)	4.66±0.50*	0.68±0.06*	8.79±1.03*
BDL-Mn (2 weeks)	5.59±0.24*	0.48±0.05*	2.57±0.23*
BDL-Mn (4 weeks)	4.68±0.41*	0.68±0.02*	7.50±1.04*

Values express mean ± SEM for six animals per group performed in duplicate

BDL Bile duct ligated, *Mn* Manganese in the drinking water

* $P < 0.05$ for the bile duct ligation effect (two way ANOVA)

(Fig. 1), mainly after 4 weeks. Increased collagen levels confirmed the presence of the cirrhotic process (Table 1). ALT, GGT and FA activities and bilirubin levels were higher in BDL rats after both 2 and 4 weeks of surgery (Table 2). Liver damage was confirmed histologically by Masson trichrome staining (Fig. 1).

Mn determination

Mn levels in cortex, striatum and *globus pallidus* significantly increased by Mn treatment, BDL and the interaction between BDL and Mn exposure (for Mn treatment: $F(\text{cortex})=62.884$, $F(\text{striatum})=121.869$, $F(\text{globus pallidus})=22.492$; for BDL: $F(\text{cortex})=38.647$, $F(\text{striatum})=72.761$, $F(\text{globus pallidus})=49.217$; for

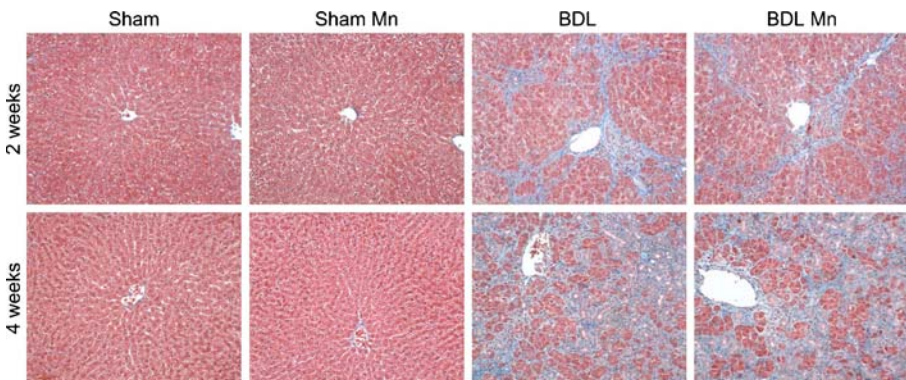


Fig. 1 Liver preparations from Sham, Sham-Mn, BDL and BDL-Mn rats after 2 and 4 weeks of treatment. Disrupted liver architecture was observed in BDL rats in comparison to Sham rats since 2 weeks of treatment and fibrosis is more extensive in BDL rats treated for 4 weeks. Masson trichrome staining, magnification×200. BDL: Bile duct ligated, Mn: Manganese in the drinking water

Table 2 Liver function tests after 2 and 4 weeks of bile duct ligation and/or Mn treatment

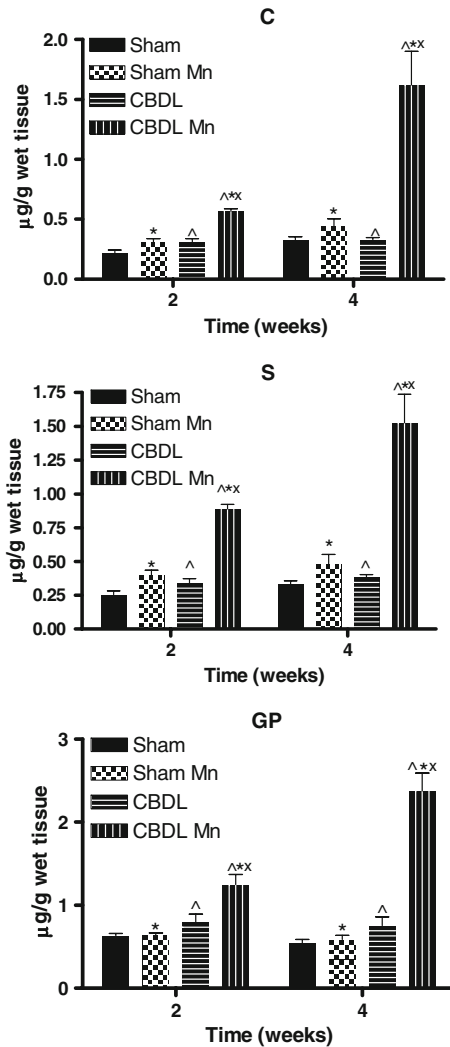
Treatment (weeks)	ALT ($\mu\text{mol substrate/l/min}$)	GGT ($\mu\text{mol substrate/l/min}$)	AP ($\mu\text{mol substrate/l/min}$)	Total bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	Direct bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)	Indirect bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)
Sham (2 weeks)	30.58 \pm 1.80	17.06 \pm 3.38	117.43 \pm 9.72	0.13 \pm 0.08	N.D.	0.13 \pm 0.08
Sham (4 weeks)	31.76 \pm 1.72	7.01 \pm 0.51	71.40 \pm 4.60	0.26 \pm 0.26	N.D.	0.26 \pm 0.26
Sham-Mn (2 weeks)	30.71 \pm 3.10	7.55 \pm 0.97	129.33 \pm 8.99	0.35 \pm 0.15	N.D.	0.35 \pm 0.15
Sham-Mn (4 weeks)	34.40 \pm 1.90	4.04 \pm 0.63	86.61 \pm 7.48	0.97 \pm 0.40	N.D.	0.97 \pm 0.40
BDL (2 weeks)	42.78 \pm 3.10*	115.88 \pm 15.32*	173.19 \pm 9.84*	51.24 \pm 3.56*	39.72 \pm 4.38*	11.51 \pm 4.80*
BDL (4 weeks)	50.13 \pm 6.11*	62.12 \pm 5.75*	170.27 \pm 12.98*	104.66 \pm 12.04*	77.13 \pm 9.58*	27.53 \pm 4.02*
BDL-Mn (2 weeks)	40.12 \pm 3.50*	193.11 \pm 18.85***	176.467 \pm 33.10*	26.04 \pm 3.34*	15.94 \pm 0.81*	10.10 \pm 2.32*
BDL-Mn (4 weeks)	52.82 \pm 1.47*	80.52 \pm 6.18**	151.28 \pm 9.81*	154.50 \pm 7.72*	125.97 \pm 6.94*	28.54 \pm 3.03*

Values express mean \pm SEM for six animals per group performed in duplicate

BDL Bile duct ligated, Mn: Manganese in the drinking water, ALT alanine aminotransferase, GGT γ -glutamyltranspeptidase, AP Alkaline phosphatase, N.D. No detectable

* P <0.05 for the bile duct ligation effect, ** P <0.05 for the interaction BDL*Mn treatment (two way ANOVA)

Fig. 2 Manganese levels in Sham, Sham-Mn, BDL and BDL-Mn rats after two and four weeks of treatment in cortex (Cx), striatum (S) and *globus pallidus* (GP). BDL: Bile duct ligated, Mn: Manganese in the drinking water. Values represent mean \pm SEM from six animals per group performed in duplicate expressed as μg of Mn/g of wet tissue. * $p < 0.05$ for manganese treatment, ^ $p < 0.05$ for bile duct ligation and X $p < 0.05$ for the interaction BDL*Mn treatment. (Two way ANOVA)



interaction between Mn treatment and BDL: $F(\text{cortex})=16.976$, $F(\text{striatum})=29.541$, $F(\text{globus pallidus})=17.260$; $p < 0.001$ in all cases). BDL plus Mn treatment resulted in higher Mn levels in the three areas, mainly the *globus pallidus* (Fig. 2).

Brain histology

The characteristics observed in altered astrocytes were nuclear pallor, enlargement and margination of chromatin, which were found more frequently in BDL and BDL-Mn groups than in the Sham and Sham-Mn groups (Fig. 3).

BDL resulted in a significantly increased number of altered astrocytes in the three areas studied (Fig. 4) as early as 2 weeks after treatment. No additional

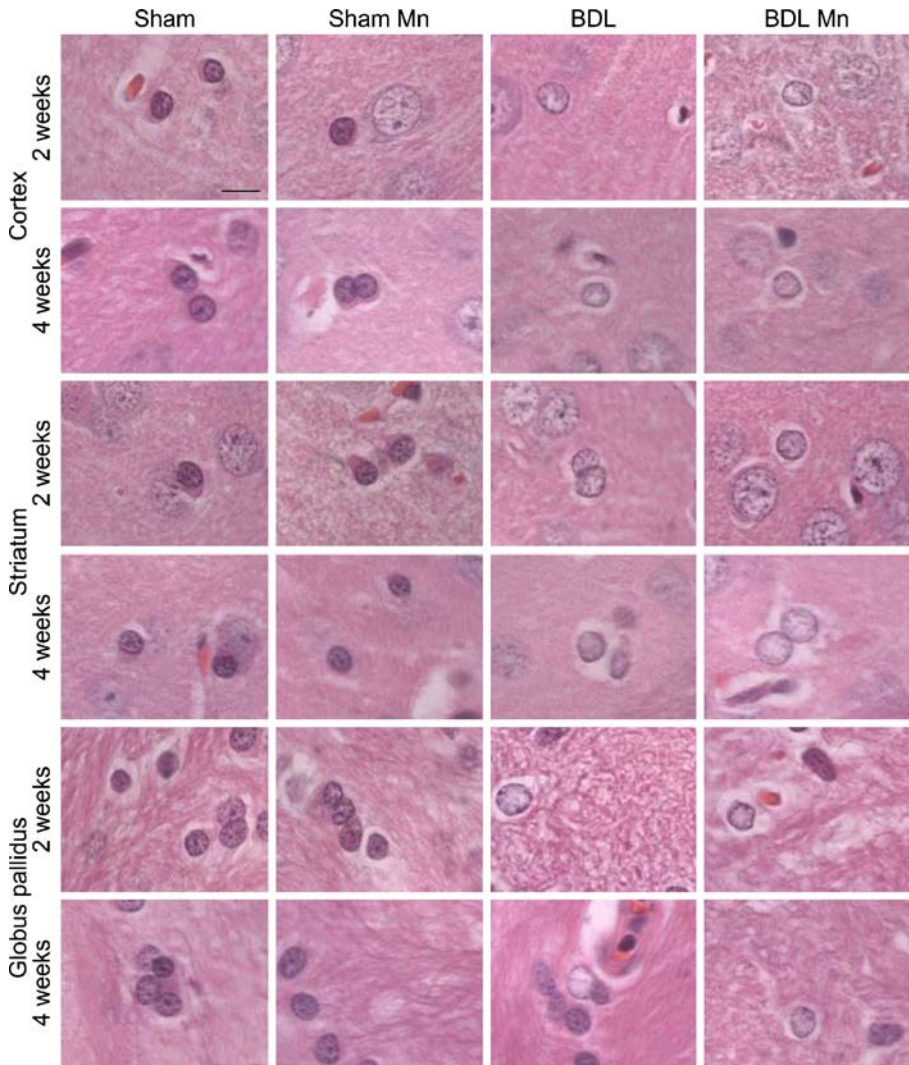


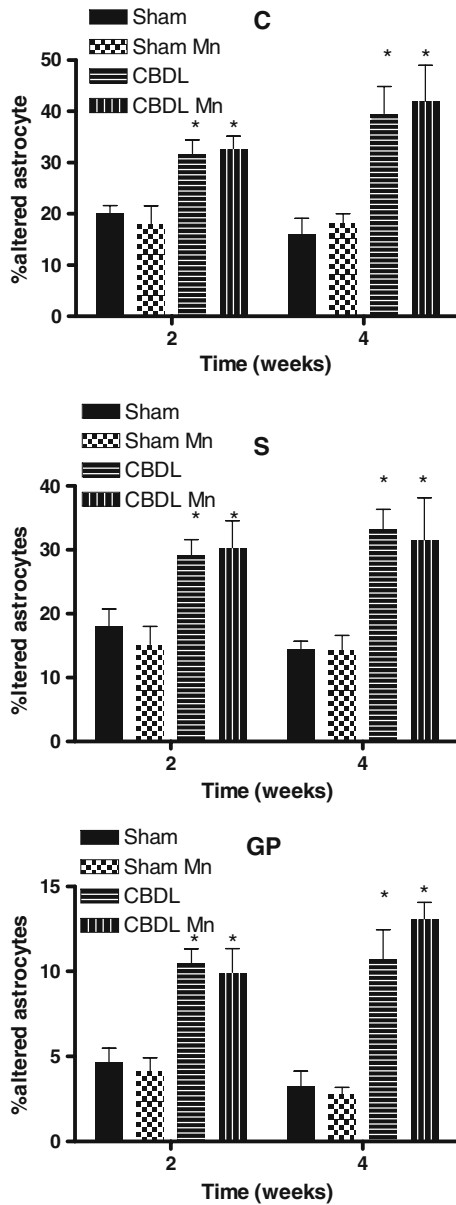
Fig. 3 Brain slices from cortex (C), striatum (S) and *globus pallidus* (GP) at 2 (2 weeks) and 4 weeks (4 weeks) of treatment showing astrocytes nuclei from Sham, Sham-Mn BDL and BDL-Mn groups. BDL: Bile duct ligated, Mn: Manganese in the drinking water. Hematoxylin and eosin staining, magnification $\times 1,000$

influence of Mn was apparent in BDL-Mn group. The total number of astrocytes was not altered in none of the studied regions, neither by liver damage nor Mn treatment (Fig. 5).

Discussion

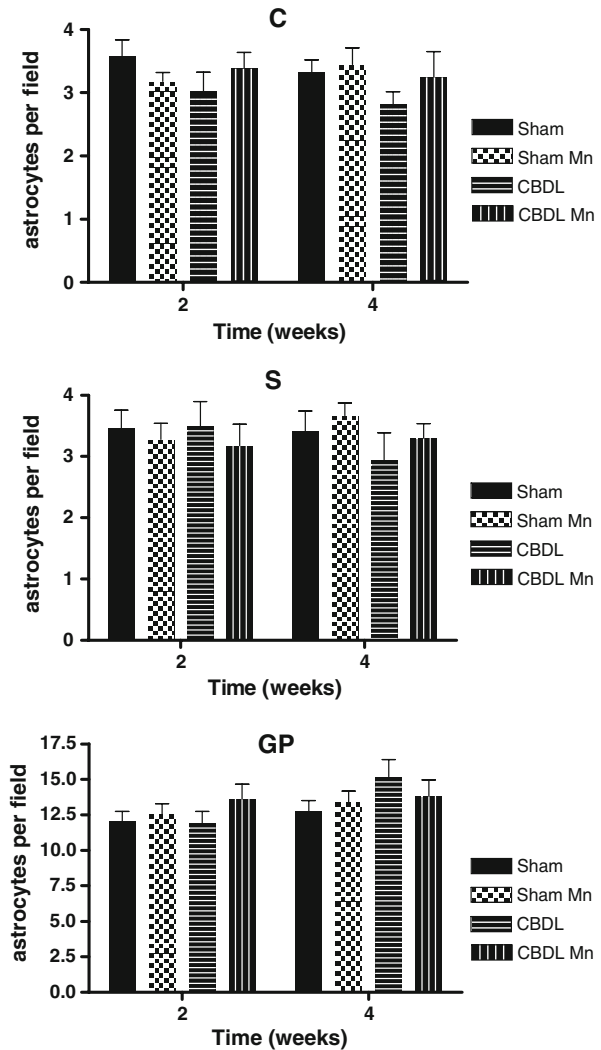
The presence of splenomegaly and hepatomegaly, increased activity of hepatic enzymes, high bilirubin levels and elevated hepatic collagen content in BDL and

Fig. 4 Percentage of altered astrocytes in cortex (C), striatum (S) and *globus pallidus* (GP). BDL: Bile duct ligated, Mn: Manganese in the drinking water. Values are mean \pm S.E.M. expressed as percentage of altered astrocytes counted in five fields per area in three slides per rat. * $p < 0.05$ for BDL (Two way ANOVA)



BDL-Mn rats showed that the obstruction of bile flow induced slight to severe cirrhosis to animals. The liver characteristics observed, as a result of BDL procedure, were necrosis, hepatocellular degeneration, inflammation, ductular proliferation and fibrosis and the presence of splenomegaly, resembling human secondary biliary cirrhosis (Popper and Zak 1958; Kountouras et al. 1984). Additionally, BDL induced a more severe grade of fibrosis after 4 weeks of BDL as biochemical determination of collagen and histology further confirmed.

Fig. 5 Total astrocytes per field per rat. Values are mean \pm S.E. M. and represent the total number of astrocytes counted in five fields per area in three slides per rat (Two way ANOVA). No significant differences were obtained



As previously reported (Montes et al. 2002, 2003), BDL plus Mn in the drinking water induced Mn accumulation in cortex, striatum and *globus pallidus* with the late structure presenting the highest levels of the metal (Fig. 2). Mn is eliminated through the bile, then liver cirrhosis favors its accumulation especially if the metal is given in excess as in this case, making this model suitable to clarify the possible role of Mn in the brain of cirrhotic patients.

It is not known precisely why basal ganglia have high avidity for Mn, although the possibility of regionally differentiated, functionally and particularly sensitive to manganese astrocytes in the basal ganglia has been claimed as an explanation (Hazell 2002). Another possibility is that Mn utilizes, at least partially, transferrin (Tf) mediated transport in the brain (Aschner and Gannon 1993; Aschner and Dorman 2006) and areas accumulating Mn such as *globus pallidus*, are efferent to

areas of high TfR density, suggesting that this sites may accumulate manganese via local axonal transport (Sloot and Gramsbergen 1994).

The exact mechanism by which Alzheimer type II astrocytosis develops in the brain of cirrhotic patients remains unknown although Mn has been proposed as a factor in its development (Pentschew et al. 1963) due to its presence in the brain of cirrhotic patients who had manifested pallidal signal hyperintensities on MRI during life (Weissenborn et al. 1995).

The treatment we used allowed the accumulation of Mn in a chronic way as it occurs in cirrhotic patients; however the number of altered astrocytes resulted only statistically significant as a consequence of cirrhosis but we did not find any significant difference attributable to Mn, although levels of Mn were significantly increased in cirrhotic rats exposed to the metal.

An important fact is that morphological changes, although subtle, were observed since 2 weeks of treatment both in BDL and BDL-Mn groups (Fig. 3), then it is possible that the alteration of astrocytes takes place since relatively early stages of cirrhosis, at least in this kind of liver damage model. The changes observed in BDL groups could be attributed to accumulation of different substances reported in cirrhotic stages such as short chain fatty acids, mercaptanes, neurosteroids, and other factors (Butterworth 2001).

We expected an increased number of altered astrocytes in BDL-Mn group as it has been observed in Mn intoxication using models of chronic (Pentschew et al. 1963) and subacute exposure (Hazell et al. 2006); In our hands however, Mn exposure did not cause a significant effect on altered astrocytes count. It is necessary to consider that although in the studies cited before $MnCl_2$ was also used, the time and route of administration were different. In the experiments carried out by Pentschew et al. (1963) monkeys were exposed for several months by intramuscular route while in the experiments performed by Hazell et al. (2006) rats were exposed to high doses of $MnCl_2$ i.p.; then, it is possible that differences in Mn kinetics and metabolism due to administration route and time of exposure could influence the outcome. Additionally, increases in brain Mn are accompanied by mild to moderate increased number of astrocytes (Yamada et al. 1986) and, although a possible role for ammonia has been described (Butterworth 2002), other possible factors may influence astrocytes proliferation. Changes in the total number of astrocytes were not observed in any of the experimental groups described here. Neither BDL nor Mn treatment induced an increase in the total number of astrocytes in cortex, striatum and *globus pallidus* although Mn levels were markedly elevated in BDL-Mn rats. This agrees with the report of Jover et al. (2006), where a total count of astrocytes in cortex is reported and no significant difference was found between controls and BDL group.

To our knowledge, this is the first report showing an altered astrocytes count after BDL in rats. Although differences in the number of altered or total cells were not encountered due to Mn, this fact does not discard the possibility of an influence of Mn in the progression from normal to altered morphology at longer periods. The results also suggest that one or more factors, different from Mn accumulation in the brain as a consequence of impaired hepatobiliary excretion, associated to the presence of cirrhosis could be participating in the morphological changes observed in cirrhotic patients dying with hepatic encephalopathy. It is worth considering that cirrhosis is a chronic disease and that many of the consequences accompanying it,

for example manganese accumulation, develop also in a chronic way. However, using this model, characterized by cirrhosis and very high levels of Mn in the brain at the same time, a more detailed study could be made to analyze the interaction between liver damage, Mn accumulation and diverse factors that possibly influence morphological changes in astrocytes in order to look for a plausible explanation for such morphological changes in cirrhotic patients.

Conclusions

In conclusion, BDL induced morphological changes in astrocytes independently of the treatment with Mn. Those changes are present early after cirrhosis. A more detailed evaluation of the role of Mn and its possible interactions with other factors involved in the pathophysiology of hepatic encephalopathy is needed. This model offers the possibility to study diverse interactions accompanied by cirrhosis and Mn accumulation.

Acknowledgements We thank to Biol. Mario Moreno, Mr. Ramón Hernández, and Mr. Benjamín Salinas for their excellent technical assistance.

S. Rivera-Mancia wants to thank to the Biomedical Research Ph D Program, to the Biomedical Research Institute and to the National Autonomous University of Mexico for their support to carry out this work.

This work was supported by CONACYT grant 51541. Susana Rivera-Mancia received a fellowship from CONACYT (203330).

References

- Aschner M, Gannon M (1993) Manganese (Mn) transport across the blood-brain barrier: Saturable and dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull* 33:345–349
- Aschner M, Dorman DC (2006) Manganese: pharmacokinetics and molecular mechanisms of brain uptake. *Toxicol Rev* 25:147–154
- Aschner M, Vrana KE, Zheng W (1999) Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology* 20:173–180
- Bergmeyer HU, Grabl M, Walter HE (1983) Enzymes. In: Bergmeyer J, Grabl M (eds) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag-Chemie, Weinheim, pp 269–270
- Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Zatonski WA, Negri E, La Vecchia C (2007) Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 46:827–839
- Butterworth RF (2000) Complications of cirrhosis III. Hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 32(1 Suppl):171–180
- Butterworth RF (2001) Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Metab Brain Dis* 16:55–65
- Butterworth RF (2002) Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look to ammonia. *Metab Brain Dis* 17:221–227
- Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS, Olanow W (1994) Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* 44:1583–1586
- Chia SE, Foo SC, Gan SL, Jeyaratnam J, Tian CS (1993) Neurobehavioral functions among workers exposed to manganese ore. *Scand J Work Environ Health* 19:264–270
- Glossman M, Neville DM (1972) Gamma-Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett* 19:340–344
- Hazell AS (2002) Astrocytes and manganese neurotoxicity. *Neurochem Int* 41:271–277
- Hazell AS, Normandin L, Norenberg MD, Kennedy G, Jae-Hyuk Y (2006) Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neurosci Lett* 396:167–171

- Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca J, Trejo-Solís C, López V, Sánchez-Sevilla L, Yáñez L, Chagoya V (2001) Adenosine reverses a preestablished CCL₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 34:677–687
- Jover R, Rodrigo R, Felipe V, Insausti R, Sáez-Valero J, García-Ayllón MS, Suárez I, Candela A, Compañ A, Esteban A, Cauli O, Ausó E, Rodríguez E, Gutiérrez A, Girona E, Erceg S, Berbel P, Pérez-Mateo M (2006) Brain edema and inflammatory activation in bile duct ligated rats with diet-induced hyperammonemia: a model of hepatic encephalopathy. *Hepatology* 43:1257–1266
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ (1984) Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 65:305–311
- Kulisevsky J, Pujol J, Junque C, Deus J, Balanzo J, Capdevila A (1993) MRI pallidal hyperintensity and brain atrophy in cirrhotic patients: two different MRI patterns of clinical deterioration? *Neurology* 43:2570–2573
- Ledig M, Tholey G, Megias-Megias L, Kopp P, Wedler F (1991) Combined effects of ethanol and manganese on cultured neurons and glia. *Neurochem Res* 16:591–596
- Levy BS, Nassetta WJ (2003) Neurologic effects of manganese in humans. *Int J Occup Environ Health* 9:153–163
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C (2001) Striatal manganese accumulation induces changes in dopamine metabolism in the cirrhotic rat. *Brain Res* 891:123–129
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Ríos C, Muriel P (2002) A method to induce manganese accumulation in the brain of the cirrhotic rat and its evaluation. *Brain Res Brain Res Protoc* 9:9–15
- Montes S, Alcaraz-Zubeldia M, Muriel P, Ríos C (2003) Role of Manganese accumulation in increased brain glutamine of the cirrhotic rat. *Neurochem Res* 28:911–917
- Muriel P (1998) Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem Pharmacol* 56:773–779
- Norenberg MD (1981) The astrocyte in liver disease. *Adv Cell Neurobiol* 2:303–352
- Norenberg MD, Lapham LW, Nichols FA, May AG (1974) An experimental model for the study of hepatic encephalopathy. *Arch Neurol* 31:106–109
- Normandin L, Hazell A (2002) Manganese neurotoxicity: an update of pathophysiologic mechanisms. *Metab Brain Dis* 17:375–387
- Papavasiliou PS, Miller ST, Cotzias GC (1966) Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese. *Am J Physiol* 211:211–216
- Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edn. Academic, San Diego
- Pentschew A, Ebner F, Kovatch R (1963) Experimental manganese encephalopathy in monkeys. A preliminary report. *J Neuropathol Exp Neurol* 22:488–489
- Pomier-Layrargues G, Spahr L, Butterworth RF (1995) Increased manganese concentrations in pallidum of cirrhotic patients. *Lancet* 345:735
- Popper H, Zak FG (1958) Pathologic aspects of cirrhosis. *Am J Med* 24:593–619
- Quero JC, Schalm SW (1996) Subclinical hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 16:321–328
- Reitman S, Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 28:56–63
- Rodrigo R, Montoliu C, Chatauret N, Butterworth RF, Behrends S, del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, Erceg S, Felipe V (2004) Alterations in soluble guanylate cyclase content and modulation by nitric oxide in liver disease. *Neurochem Int* 45:947–953
- Sistrunk SC, Ross MK, Filipov NM (2007) Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: An in vitro study. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:286–296
- Sloot WN, Gramsbergen JB (1994) Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Res* 657:124–132
- vom Dahl S, Kircheis G, Häussinger D (2001) Hepatic encephalopathy as a complication of liver disease. *World J Gastroenterol* 7:152–156
- Weissenborn K, Ehrenheim CH, Hori A, Kubicka S, Manns MP (1995) Pallidal lesions in patients with liver cirrhosis: clinical and MRI evaluation. *Metab Brain Dis* 10:219–231
- Yamada M, Ohno S, Okayasu I, Okeda R, Hatakeyama S, Watanabe H, Ushio K, Tsukagoshi H (1986) Chronic manganese poisoning: a neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol* 70:273–278