



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL  
DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON POR  
INHALACIÓN DE MANGANESO: ASPECTOS  
BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS Y CONDUCTUALES

**T E S I S**

Que para obtener el grado académico de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

**P R E S E N T A**

JOSÉ LUIS ORDÓÑEZ LIBRADO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA

COMITÉ TUTOR: DR. JORGE ACEVES RUIZ  
DRA. LAURA COLÍN BARENQUE

Estado de México

Octubre de 2012



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de mayo de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **ORDOÑEZ LIBRADO JOSÉ LUIS** con número de cuenta **98536247** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON POR INHALACIÓN DE MANGANESO: ASPECTOS BIOQUÍMICOS, MORFOLÓGICOS Y CONDUCTUALES"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA**:

Presidente: DR. JORGE ACEVES RUÍZ  
Vocal: DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA  
Secretario: DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ  
Suplente: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY  
Suplente: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de agosto de 2012.

*María del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

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

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

**PAPIIT-DGAPA-UNAM** proyectos 213705, 215708, 220111

Quiero agradecer todos los aportes hechos a mi trabajo de investigación a los doctores

Dra. María Rosa Avila Costa

Dra. Verónica Anaya Martínez

Dra. Laura Colín Barenque

Dr. Jorge Aceves Ruíz

Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Dr. Andrés Aliú Castell Rodríguez

Con toda mi gratitud, amor y respeto dedico este trabajo a mis padres puesto que sin ustedes no hubiera sido posible. Me enseñaron la humildad, el respeto, el cariño y a esforzarme por cada cosa que hago. Pasamos tiempos muy difíciles pero nunca dejaron que abandonara, luchamos siempre juntos y fueron, son y serán la fuerza para cada uno de nosotros. Lo que hoy soy, es gracias a ustedes. Mil gracias!!!

A mis hermanos Miguel, Oscar, Héctor y Jorge, todo lo que vivimos juntos forma parte del carácter y de la felicidad, compartimos la perseverancia para lograr nuestras metas, sin duda alguna crecimos juntos en todos los sentidos. Sepan que siempre cuentan conmigo como sé que cuento con ustedes.

A mis sobrinos Fernanda, Angel, María José, Evelin, Regina y Oscar, quienes se han convertido en la felicidad de la familia, son la razón para seguir luchando y esforzándose cada día. A mis Cuñadas Leo, Nora y Ale gracias por el gran regalo que nos han dado con esos niños tan maravillosos.

A mis abuelitos, su grandeza y sabiduría es incomparable, gracias por todas sus enseñanzas, por todo su cariño.

A toda mi familia, de quienes he recibido siempre apoyo, cariño, confianza, pero sobre todo palabras de aliento cuando hacen falta. Gracias a todos!

A mis amigos de siempre, Ana, Aurora, Arturo, Israel, Areli, Araceli, Omar, Erika, Omar, Liliana, Roman, César, iniciamos un camino hace algún tiempo, y afortunadamente hemos seguido en él. Gracias por los grandes momentos, se les quiere!!

A mis amigos del laboratorio Vero, Ana, Enrique, Lau, Jesús, Javier, Montse, Paty, Ricardo, Fidencio, César, Alicia, gracias por todos esos días juntos, las enseñanzas, las historias, su apoyo y ayuda, por hacer el trabajo más fácil y divertido, en verdad gracias por todo.

A Michelle, Valeria, Carrera, Nydia, Gina, a la Doctora Luara, al Doctor Jarquin, al Doctor Víctor, y todas las personas que hacen que esta vida sea mejor, gracias a todos ustedes

A todos mis profesores y a todas las personas de quienes he aprendido, les agradezco infinitamente.

A Gaby, por el tiempo que me ha regalado, por tu amor, ayuda, confianza. Porque no has dejado que me rinda aun cuando los tiempos han sido difíciles, el trabajo es mucho pero siempre estas para animarme a salir adelante. La vida a tu lado es mejor....

Finalmente con toda mi gratitud y cariño dedico este trabajo a María Rosa Avila Costa, mi asesora y amiga. Confiaste en mí y en el proyecto, trabajamos mucho y estudiamos aun más, nos desesperábamos pero siempre buscamos opciones para salir adelante, nos arriesgamos incluso un poco demás pero al final todo valio la pena. Contagias de tu fortaleza y tenacidad a todos los que están a tu alrededor. Al fin podemos decir, lo logramos!!

Infinitas gracias a todos los que han sido parte de mi vida y me han permitido ser parte de la suya, este trabajo tiene un poquito de todos ustedes.

GRACIAS!!!

<b>Índice</b>	<b>Pág.</b>
Abreviaturas-----	I
Resumen-----	II
Abstract-----	III
Introducción-----	01
Justificación-----	08
Hipótesis-----	08
Objetivo general-----	09
Objetivos particulares-----	09
Métodología-----	10
Resultados-----	11
Discusión-----	33
Conclusión -----	45
Bibliografía-----	46
Anexos-----	53

## Abreviaturas

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

## Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un problema de salud a nivel mundial y se ha sugerido que en las próximas décadas incrementará su incidencia, por lo que es necesario contar con nuevos modelos experimentales que permitan diseñar estrategias farmacológicas adecuadas para su tratamiento. Los modelos experimentales existentes han sido de gran ayuda sin embargo ninguno de ellos reproduce completamente esta patología, la mayoría de ellos son agudos y el grado de degeneración de las neuronas dopaminérgicas que provocan corresponden a estadios avanzados de la enfermedad en humanos. En nuestro laboratorio encontramos que la inhalación de cloruro de Manganeso ( $MnCl_2$ ) y Acetato de Manganeso ( $Mn(OAc)_3$ ) produjo cambios ultraestructurales, degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, y algunas alteraciones motoras de manera progresiva y bilateral, similares a lo descrito en los pacientes con EP, lo cual podría representar una ventaja sobre otros modelos. El presente trabajo pretende continuar con la caracterización del modelo mediante la correlación entre la neurodegeneración dopaminérgica con las alteraciones motoras, determinar si el tratamiento con L-DOPA mejora la conducta motora para asegurar que las alteraciones son de origen dopaminérgico, y establecer la especificidad del Mn por las neuronas de la Sustancia Nigra compacta (SNc) mediante la inmunocitoquímica anti NeuN y la medición de las concentraciones de dopamina y sus metabolitos en otras estructuras cerebrales. Para ello se utilizaron ratones macho de la cepa CD1, se formaron dos grupos: un grupo fue expuesto a agua desionizada (grupo control; n= 20), mientras que el segundo grupo (n= 20) fue expuesto a la mezcla de  $MnCl_2$  0.04 M y  $Mn(OAc)_3$  0.02 M por vía inhalada en una caja de acrílico, 1 hora, 2 veces por semana. De acuerdo a nuestros resultados observamos en los animales expuestos que mostraron alteraciones en la coordinación motora y mejoría significativa tras la administración de L-DOPA, pérdida del 67.58 % de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, pérdida celular en el Estriado y Globo Pálido, no así en los otros núcleos evaluados. Ultraestructuralmente, observamos alteraciones del neuropilo, disminución de los contactos sinápticos axoespinosos, aumento de las sinapsis perforadas en el estriado, alteraciones nucleares, necrosis y apoptosis en la SNc y en menor medida en el estriado. Finalmente se encontró disminución significativa de la dopamina y sus metabolitos en la SNc, el estriado y el Globo Pálido tras la inhalación de  $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ . Dichas alteraciones son similares a lo reportado en pacientes parkinsonianos. De esta manera, la inhalación de la mezcla de compuestos de manganeso es un modelo adecuado para el estudio de la EP, sensible, reproducible y de fácil aplicación, con el cual pretendemos brindar una herramienta más para el estudio de la enfermedad así como la evaluación nuevos tratamientos.

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is a worldwide health problem and it has been suggested that in the next decades will increase their incidence, so that, is necessary to have new experimental models that allow to design appropriate pharmacological strategies for its treatment. The existing experimental models have been helpful, however none completely reproduces this disorder, most of them are acute and the degeneration degree of dopaminergic neurons that they cause correspond to advanced stages of the disease in humans. In our laboratory found that inhalation of manganese chloride ( $\text{MnCl}_2$ ) and manganese acetate ( $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ ) produced ultrastructural changes, degeneration of dopaminergic neurons in the SNc, and some motor impairment progressively and bilaterally, similar to the described in PD patients, this characteristics could be an advantage over other models. The aims of this paper is to continue the model carecterización through the correlation between dopaminergic neurodegeneration with motor impairment, improves of motor impairment behavior with L-DOPA to ensure that alterations are due to dopamine loss, and establish the specificity of Mn of the substantia nigra compacta (SNc) neurons using anti NeuN immunocytochemistry and measuring dopamine concentrations and its metabolites in basal ganglia. For this were used CD1 male mice, divided into two groups: one group was exposed to deionized water (control group,  $n = 20$ ), while the second group ( $n = 20$ ) was exposed to a mixture of  $\text{MnCl}_2$  0.04 M and  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  0.02 M by inhalation in an acrylic box, 1 hour, 2 times per week. According to our results, exposed animals showed alterations in motor coordination and significant improvement after administration of L-DOPA, 67.58% loss of dopaminergic neurons in the SNc, cell loss in the striatum and globus pallidus but not in other evaluated nuclei. Ultrastructurally, we observed abnormalities in the neuropil, decreased in axoespinosos synaptic contacts, increases of perforated synapses in the striatum, nuclear changes, necrosis and apoptosis in the SNc and lesser extent in the striatum. Finally we found significant decrease of dopamine and its metabolites in the SNc, striatum and globus pallidus after inhalation of  $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ . These alterations were similar to those reported in parkinsonian patients. Thus, the inhalation of manganese compounds mixture is a suitable model for the PD, sensitive, reproducible and easy to apply, with which we intend to provide a tool for the study of disease and the evaluation new treatments.



## Introducción

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

Esta enfermedad fue descrita por James Parkinson en 1817, en su publicación “*Essay on the shaking palsy*” (Ensayo sobre la parálisis agitante), como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo. El paciente con EP desarrolla temblor, rigidez, bradicinesia y alteraciones de los reflejos posturales (Gilmans-Winans, 1994; García-Martínez, 2003; Tolosa *et al.*, 2006; Jankovic, 2008; Lees *et al.*, 2009; Guilarte, 2010). Las líneas de la cara del paciente son lisas, su expresión es fija, y casi no hay prueba manifiesta de respuesta emocional espontánea (Gilmans-Winans, 1994).

En 1966 Hornykiewicz analizó cerebros de pacientes con EP y encontró reducción significativa de Dopamina (DA), serotonina y noradrenalina principalmente en el núcleo estriado (NE) y la sustancia *nigra* (SN), además puntualizó que de las tres aminas biogénicas, la más reducida era la DA (Hornykiewicz, 1993; 2006). Posteriormente se demostró que las neuronas que estaban degenerando principalmente eran las neuronas dopaminérgicas de la porción compacta de la sustancia *nigra* (SNc) (Yurek y Sladek, 1990; Gibb y Less, 1991), con pérdida moderada de la porción dorsal de la misma (Gibb y Less, 1991; Otero-Siliceo, 1996; López-Pousa *et al.*, 2003). De esta forma una de las características más relevantes de la EP es muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc con la consecuente disminución de las concentraciones de DA en el NE (Bové *et al.*, 2005). A partir de estos hallazgos se propuso el uso de la L-DOPA es el fármaco sintomático más efectivo en el tratamiento de la EP ya que es el precursor de la DA (Barbeau, 1981), además es uno de los criterios empleados en el diagnóstico definitivo de enfermedad de Parkinson (Hughes *et al.*, 1992; Gelb *et al.*, 1999).

De esta manera, desde que se comprendió que las alteraciones observadas en la EP se deben

principalmente a la disminución en la concentración de DA en los ganglios basales (Hornykiewicz, 1993) producto de la degeneración de las neuronas de la SNc (Yurek y Sladek, 1990; Gibb y Less, 1991) se han propuestos diversos modelos animales de degeneración nigral, los cuales permiten estudiar los mecanismos básicos que regulan la función neural o conductual con la finalidad de recrear los eventos que se presentan en esta enfermedad (Anaya, 1997; Hirsch, 2006).

Algunos de los modelos de la Enfermedad de Parkinson son los siguientes:

- Reserpina: Carlsson y colaboradores (1957) observaron que la administración sistémica de reserpina causa la depleción de catecolaminas en el cerebro llevando a un estado acinético en conejos. Posteriormente, mostraron que la administración de L-DOPA alivió el estado acinético inducido por la reserpina, indicando que la recuperación conductual es dependiente de DA. Esto llevó a la primera hipótesis que posteriormente fue confirmada en humanos (Hornykiewicz, 1993; 2006) acerca de que los síntomas de la EP son el resultado de la depleción dopaminérgica estriatal (Bernheimer *et al.*, 1973). El descubrimiento de que la deficiencia dopaminérgica estriatal resulta en los signos clínicos de la EP permitieron el desarrollo de la reserpina como un modelo animal. La administración sistémica de reserpina produce la depleción de DA a nivel de la terminal nerviosa e induce un estado hipocinético en roedores. Este déficit de movimiento es debido a la pérdida de la capacidad para almacenar DA en las vesículas intracelulares (Carlsson *et al.*, 1957; Hornykiewicz, 1966; Betarbet *et al.*, 2002).

Se ha reportado que los cambios inducidos por la reserpina son temporales sin degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Gossel *et al.*, 1995). Además se observó que varios fármacos que revierten el déficit motor inducido por éste fármaco en modelos animales han sido ineficientes en el tratamiento de pacientes (Betarbet *et al.*, 2002).

- MPTP: Varios estudios han demostrado que en humanos y monos, el MPTP produce un síndrome parkinsoniano agudo irreversible caracterizado por signos clínicos de la EP que incluyen temblor, rigidez, enlentecimiento de los movimientos, inestabilidad postural y el “congelamiento” (freezing; Dauer y Przedborski, 2003), degeneración de las neuronas dopaminérgicas y agregación de  $\alpha$ -sinucleína (pero no cuerpos de Lewy), además, respuesta positiva al tratamiento con L-DOPA (Shimohama *et al.*, 2003) y gliosis reactiva (Barcia *et*

*al.*, 2004). Sin embargo, la degeneración neuronal en un lapso muy corto (agudo o subagudo) es una de las principales dificultades con el uso del MPTP como modelo, ya que la EP es un padecimiento lento y progresivo, además, ratones y ratas son menos sensibles que los primates a la neurotoxicidad inducida por esta molécula, en estos animales se requieren altas dosis de esta toxina para producir la depleción de DA y los signos conductuales del parkinsonismo aparecen raramente (Shimohama *et al.*, 2003).

- 6-OHDA: La 6-hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifeniletilamina; 6-OHDA) fue el primer modelo animal de la EP asociado con la muerte de neuronas dopaminérgicas, introducido por Ungerstedt en 1968. Este compuesto es un análogo hidroxilado de la DA, la cual produce depleción selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y sus terminales en el NE (Blum *et al.*, 2001). Animales con lesión bilateral muestran algunos elementos de los síntomas motores parkinsonianos como acinesia, hipocinesia y alteraciones de la postura (Smith *et al.*, 2002). Sin embargo la lesión bilateral no es un modelo comúnmente utilizado puesto que los animales lesionados de esta manera necesitan de cuidados intensivos ya que mueren fácilmente debido a que presentan marcada adiposidad y afagia (Bové *et al.*, 2005). Debido a estas dificultades se ha optado por la inyección unilateral de 6-OHDA en la SNc o el haz medial en ratas, y es este modelo el que ha contribuido en la mayoría de investigaciones preclínicas de la EP (Deumens *et al.*, 2002), se ha reportado que la 6-OHDA produce pérdida de aproximadamente el 95 % de la DA en el NE durante de las primeras 24 h posterior a ser administrada. Después de la inyección unilateral de 6-OHDA, las terminales dopaminérgicas degeneran del lado de la lesión, el animal presenta giro espontáneo ipsilateral y disminuye su conducta exploratoria espontánea (Ungerstedt, 1971; Miller y Beninger, 1991; Fornaguera *et al.*, 1993). Sin embargo, la inyección de esta toxina induce exclusivamente efectos agudos, los cuales son diferentes de la progresión lenta natural de los enfermos con Parkinson (Betarbet *et al.*, 2002).
- Paraquat: El paraquat (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinium) es un herbicida que produce un modelo tóxico de la EP; muestra similitud estructural con el MPP<sup>+</sup>, sin embargo, esta toxina no penetra fácilmente la barrera hemato-encefálica (Shimizu *et al.*, 2001). La toxicidad por paraquat parece que es mediada por la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Day *et al.*, 1999). La administración sistémica de paraquat a ratones lleva a la degeneración de neuronas dopaminérgicas acompañado de la formación de inclusiones que contienen  $\alpha$ -sinucleína (McCormack *et al.*, 2002). Aún no se ha determinado si la toxicidad del paraquat provoca

solamente la degeneración de las neuronas dopaminérgicas o si otras células son afectadas de manera similar (Dauer y Przedborski, 2003).

- Rotenona: Es un compuesto citotóxico natural que se extrae de plantas tropicales, es usado ampliamente como insecticida. Es altamente lipofílico por lo que tiene acceso a todo el organismo (Talpade, 2000). Se une e inhibe el complejo I mitocondrial. En un principio se pensaba que su inyección intravenosa producía la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales, acompañado de inclusiones parecidas a los cuerpos de Lewy positivas para  $\alpha$ -sinucleína (Betarbet *et al.*, 2000). Estudios posteriores en los que se trató crónicamente a ratas con dosis bajas de rotenona, mostraron disminución de neuronas colinérgicas y células positivas para NADPH diaforasa. Estos resultados demuestran que la rotenona no es específica para las neuronas dopaminérgicas, es decir su toxicidad es más amplia de lo que originalmente se pensaba (Hoglinger *et al.*, 2003). Ratas de la cepa Lewis expuestas crónicamente a través de la canulación de la vena yugular mostraron varias características de la EP, incluyendo la degeneración de la vía nigroestriatal y la formación de inclusiones intracitoplasmáticas en las neuronas dopaminérgicas que son reminiscencias de cuerpos de Lewy. Estas ratas mostraron bradicinesia, inestabilidad postural y algunas evidencias de temblor, sin embargo, la patología parkinsoniana fue observada solo en la mitad de las ratas a las cuales se les administró rotenona y estos síntomas no fueron observados en otras cepas de ratas (Shimohama *et al.*, 2003)

Como se mencionó, existen diferentes modelos animales para el estudio de la EP, todos ellos con ventajas y desventajas, sin embargo, hasta el momento no existe un modelo que asemeje el curso temporal de la enfermedad en humanos. Se ha propuesto que un modelo ideal de la EP es aquel capaz de reproducir los signos clínicos observados en humanos (Hirsch, 2006) y el déficit neuroquímico asociado a la degeneración patológica de las células dopaminérgicas de la SNc, incluyendo el curso temporal (Emborg, 2004). En nuestro laboratorio hemos propuesto un modelo para el estudio de la EP, en el cual la mezcla de cloruro de manganeso ( $MnCl_2$ ) y acetato de manganeso ( $Mn(OAc)_3$ ) produjo a ratones expuestos déficit motor manifestado como acinesia, inestabilidad postural y temblor, además estos animales perdieron al menos el 67 % de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Ordoñez-Librado *et al.*, 2008).

Se propuso el uso de estos compuestos para la obtención del modelo debido a que se ha reportado que la inyección intraestriatal de Mn en animales de laboratorio provoca disminución de la concentración de DA (Witholt *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2001). También, varias investigaciones han reportado que este metal tiende a acumularse en regiones ricas en DA, por lo que se ha propuesto un posible papel de este neurotransmisor y sus mecanismos de recaptura en el transporte de Mn al interior de las neuronas dopaminérgicas. Los resultados experimentales soportan la idea de que la concentración de Mn en el mesencéfalo ventral es dependiente del sistema de recaptura de DA (DAT) dependiente de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (Calne *et al.*, 1994; Nagatomo *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 1992, 2005b). Ingersoll y cols. (1999) examinaron el efecto de la inhibición del DAT sobre la captura de Mn; estos investigadores administraron cocaína (inhibidor del DAT) a ratas a las cuales se les inyectó posteriormente Mn intracerebralmente. Estos autores muestran que la acumulación de Mn en los ganglios basales es menor en las ratas pretratadas con cocaína comparadas con ratas a las cuales se les inyectó el metal pero no el inhibidor del DAT. En otro estudio llevado a cabo por Erikson y cols. (2005b) en el que se utilizaron ratones knockout (KO) los cuales no expresaban el transportador para DA (DAT-KO) encontraron decremento significativo del 40 % en la acumulación de Mn en el NE comparado con los ratones silvestres (WT) que recibieron inyección de Mn. Adicionalmente, en un estudio realizado en sinaptosomas de NE los cuales fueron incubados con GBR12909 (un inhibidor específico del DAT), disipramina (inhibidor del transportador de norepinefrina) o fluoxetina (inhibidor del transportador de serotonina) solo los sinaptosomas tratados con el inhibidor del DAT mostraron disminución en la acumulación de Mn *in vitro*. Ningún efecto fue observado en los sinaptosomas tratados con disipramina o fluoxetina, por lo que estos resultados demuestran que la acumulación de Mn en los ganglios basales es facilitada por el DAT (Anderson *et al.*, 2007). Además Chin-Chang y cols. (2003) evaluaron la función del DAT en la vía dopaminérgica nigroestriatal en pacientes expuestos crónicamente a Mn encontrando aumento en la actividad de este transportador, adicionalmente, se trató a ratas con reserpina, y se observó que la disminución de DA inducida por este fármaco, produce que la concentración de Mn en los ganglios basales sea menor, por lo que se ha propuesto que la concentración de Mn en la SNc es dependiente de la concentración de DA (Aposhian *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 2005a). Los estudios anteriores sugieren que la recaptura y/o el metabolismo de la DA contribuyen en el transporte de Mn; estas observaciones llevan a la hipótesis que el Mn puede unirse a DA y transportarse como un complejo al interior de las neuronas vía el DAT y/o el Mn puede competir con el  $\text{Na}^{+2}$  para su co-transporte con la DA a través del DAT (Aposhian *et al.*, 1999).

En humanos la intoxicación por Mn es referida comúnmente como “manganismo”; es una patología en la cual se observan características similares a la EP (Harte *et al.*, 1991) causadas por acumulación de este metal especialmente en el caudado-putamen, globo pálido (GP), SN y núcleo subtalámico (NST) (Calne *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1999). Se pueden distinguir tres fases clínicas en el desarrollo de la neurotoxicidad crónica por Mn (Finkelstein *et al.*, 2007), pero es en la fase tardía (o de establecimiento) donde se observan alteraciones extrapiramidales que incluyen rigidez muscular, hipocinesia y temblor de las extremidades superiores (Walowitz y Roth, 1999; Normandin *et al.*, 2002; Guilarte, 2010). El desarrollo del síndrome extrapiramidal denota daño permanente en el sistema nervioso central (SNC) (Finkelstein *et al.*, 2007). Se ha propuesto que estos signos están asociados con disfunción dopaminérgica dentro de los ganglios basales (Chun *et al.*, 2001; Tapin *et al.*, 2006) y aunque se ha propuesto que el sitio de lesión neurológica primaria es el GP, se han acumulado algunas evidencias que sugieren que la toxicidad del Mn puede causar daño a la SNc (Chun *et al.*, 2001), por ejemplo se ha descrito que tanto en el manganismo como en la EP la cantidad de neuromelanina se reduce en la SNc, lo cual podría deberse a la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Archivald y Tyree, 1987; Tapin *et al.*, 2006).

Es importante conocer los mecanismos de absorción del Mn, puesto que de ellos depende los efectos que pudiera tener en el SNC. Se ha demostrado que las formas divalente ( $Mn^{+2}$ ; ion manganeso) y trivalente ( $Mn^{+3}$ ; ion mangánico) son las especies predominantes de Mn en los seres vivos (Takeda, 2003). En el plasma, alrededor del 80 % del  $Mn^{+2}$  se une a  $\beta$ -globulina y albúmina, mientras que el  $Mn^{+3}$  está unido a transferrina (Critchfield y Keen, 1992; Aschner *et al.*, 2005; Aschner *et al.*, 2007). El endotelio capilar tiene la mayor densidad de receptores para transferrina en el cerebro (Moos, 1996), por lo que la transferrina une  $Mn^{+3}$  y es transportado dentro del cerebro a través de la barrera hemato-encefálica vía la endocitosis mediada por su receptor (Aschner y Gannon, 1994; Roth y Garrick, 2003). De acuerdo con lo anterior, se sabe que tanto el núcleo acumbens y el caudado-putamen, dos núcleos con gran cantidad de receptores para transferrina, tienen fibras aferentes al GP y la SN, áreas en las cuales el Mn se acumula principalmente (Aschner *et al.*, 2005).

Otros mecanismos propuestos en la captura de Mn son los canales de  $Ca^{2+}$  (Narita *et al.*, 1990), intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  (Frame y Milanick, 1991), canal uniporte de  $Ca^{2+}$  (Gavin *et al.*, 1990), el antiporte de  $Na^+/Mg^+$  (Gunther *et al.*, 1990; Takeda, 2003) y el transportador

de metales divalentes (DMT-1; Roth *et al.*, 2000; Takeda, 2003; Benedetto *et al.*, 2009). Gunshin y cols. (1997) demostraron que el DMT-1 está expresado en las células endoteliales de los capilares cerebrales y en las células epiteliales coroideas (Murphy *et al.*, 1991; Rabin *et al.*, 1993). Sin embargo se ha observado que aproximadamente el 60 % del  $Mn^{+2}$  y  $Mn^{+3}$  es transportado rápidamente al cerebro probablemente como ion libre (Sotogaku *et al.*, 2000; Takeda, 2003; Zheng *et al.*, 2003).

Hay reportes contradictorios acerca del efecto del Mn dentro de los ganglios basales, algunos autores reportan un papel antioxidante de este metal; se ha demostrado que a bajas concentraciones el  $Mn^{+2}$  protege a las células en contra del estrés oxidativo, y que este efecto neuroprotector deriva del hecho de que el  $Mn^{+2}$  puede catalizar la dismutación del  $O_2^-$  y del  $H_2O_2$  bajo condiciones fisiológicas (Oubrahim *et al.*, 2001; HaMai *et al.*, 2001; HaMai y Bondi, 2004a), en cuanto al papel pro-oxidante otros estudios reportan que el  $Mn^{+2}$ , produce el aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), sin embargo su actividad pro-oxidante fue bloqueada en la presencia de DFO, un quelador de metales trivalentes, por lo que se ha propuesto que aún cuando el  $Mn^{+2}$  no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de  $Mn^{+3}$  en cantidades traza es suficiente para promover la formación de radicales libres y quinonas tóxicas producto de la auto-oxidación de la DA mediada por Mn (Sava *et al.*, 2004; HaMai y Bondi, 2004b).

## **Justificación**

Existe controversia acerca de las alteraciones producidas por el Mn; mientras algunos autores reportan que el Mn altera la función dopaminérgica, específicamente en los ganglios basales y produce un síndrome muy similar a la enfermedad de Parkinson, otros señalan que la intoxicación por Mn parece ser diferente de la EP en cuanto a la etiología y patología, especialmente en la conservación de los somas dopaminérgicos de la SNc. Según varios autores, lo más importante entre estas diferencias es la falta de respuesta clínica a la L-DOPA. Recientemente en nuestro laboratorio, reportamos que ratones que fueron expuestos durante 5 meses a la mezcla de Mn divalente y trivalente desarrollaron alteraciones de movimiento y pérdida significativa de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, proporcionando evidencia de que las alteraciones motoras son debidas a la deficiencia de la vía de dopaminérgica nigroestriatal, estableciendo un posible modelo experimental de la EP. Como siguiente paso, se busca determinar si después de 5 meses de inhalación de Mn, los trastornos de movimiento mejoran con la administración de L-DOPA para garantizar que el origen de alteraciones es dopaminérgico, y demostrar mediante inmunohistoquímica anti NeuN la diferente susceptibilidad entre distintas regiones cerebrales.

Con ello pretendemos brindar un modelo para el estudio de esta enfermedad en el cual la degeneración de la vía nigroestriatal sea gradual, bilateral el cual nos permita comprender la patogénesis de la enfermedad así como establecer terapias para su tratamiento.

## **Hipótesis**

Al parecer existe sinergia entre el  $MnCl_2$  y el  $Mn(OAc)_3$ , ya que al inhalarlos mezclados producen temblor, rigidez, bradicinesia y otras alteraciones motoras debidas, muy probablemente, a la pérdida de dopamina y sus metabolitos dentro de los ganglios basales producto de la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, por lo que es posible que los animales, después de haber inhalado durante 5 meses dicha mezcla, presenten mejoría motora después de la administración de L-DOPA brindando un modelo experimental para el estudio de la Enfermedad de Parkinson.

## **Objetivo General**

Examinar los efectos de la inhalación de la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  en ratones sobre las posibles alteraciones en la concentración de dopamina y sus metabolitos, alteraciones ultraestructurales y citológicas de los ganglios basales, así como sus posibles alteraciones y el efecto de la L-DOPA sobre la actividad motora para fundamentar un modelo para el estudio de la Enfermedad de Parkinson.

## **Objetivos específicos**

1. Evaluar la conducta motora de ratones expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  mediante las pruebas de la viga y reaching task.
2. Evaluar el efecto de la L-DOPA sobre el desempeño motor en las pruebas de la viga y reaching task después de 40 inhalaciones.
3. Realizar el conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en el SNc de los animales control y expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ .
4. Realizar el conteo de neuronas en diferentes núcleos cerebrales mediante inmunocitoquímica anti NeuN de los animales control y expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ .
5. Determinar el número de espinas dendríticas en el NE mediante el método de Golgi en los animales control y expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ .
6. Realizar un análisis ultraestructural de la SNc, NE y GP de los animales control y expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ .
7. Determinar las concentraciones de DA en el NE, GP y SNc mediante HPLC.

## Metodología

Los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho de la cepa CD1 con peso inicial de  $33\pm 2$  g, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad 12:12, con agua y alimentación *ad libitum*. Antes de la exposición a Mn los animales fueron entrenados para las pruebas de coordinación motora durante una semana (Anexo 1). Posteriormente se formaron dos grupos: un grupo fue expuesto a agua desionizada (grupo control; n= 20), mientras que el segundo grupo (n= 20) fue expuesto a la mezcla de  $MnCl_2$  0.04 M y  $Mn(OAc)_3$  0.02 M por vía inhalada en una caja de acrílico, 1 hora, 2 veces por semana. Después de 40 inhalaciones, los animales expuestos a Mn se dividieron en 2 grupos, uno de ellos siguió inhalando y se le administró L-DOPA (15 mg/Kg), mientras que el segundo dejó de inhalar y recibió el tratamiento con L-DOPA; cada semana se evaluó la coordinación motora de todos los animales mediante las pruebas de viga y prueba motora fina (reaching task) hasta finalizar los tratamientos (Ordoñez-Librado *et al.* 2008; 2010; 2011).

Animales control y expuestos bajo las condiciones mencionadas fueron sacrificados a las 40 inhalaciones, 10 controles y 10 expuestos se perfundieron vía aorta y se fijaron con glutaraldehído y paraformaldehído al 2 %, se extrajeron los cerebros y se tomaron fragmentos del NE, SNc y GP para analizarlos ultraestructuralmente (Anexo 2), además se hicieron cortes histológicos a los cuales se les realizaron inmunomarcajes en el siguiente orden: para determinar el número de neuronas dopaminérgicas se realizó inmunohistoquímica anti-TH a cortes del mesencéfalo; para evaluar la especificidad de la neurotoxicidad de la mezcla de Mn se realizó el conteo de neuronas a través de inmunohistoquímica anti-NeuN en el NE, GP, Corteza motora primaria y corteza frontal, áreas CA1 y CA3 del hipocampo y la corteza cerebelosa (Anexo 3), además se tomaron fragmentos del NE para procesarlos mediante el método de Golgi y se hizo el conteo de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas (Anexo 4). Por otra parte, a las 40 inhalaciones se obtuvo el tejido fresco de 10 animales control y 10 expuestos para determinar la concentración de DA y sus metabolitos mediante HPLC en el NE, SNc y GP (anexo 5).

Los datos obtenidos en las pruebas conductuales y la determinación de la concentración de DA, HVA y DOPAC serán analizados mediante ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de Tukey mientras que la comparación del número de neuronas, espinas dendríticas y el análisis ultraestructural será a través de pruebas de T.

## Resultados

Dentro de las características de la enfermedad se encuentra el déficit motor, para estudiar este aspecto se evaluó en la viga de 3mm a los animales de todos los grupos. En la figura 1 se observa que el tiempo promedio que tardaron los animales control en atravesar la viga fue de 8 segundos, mientras que los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  a partir de la décima y hasta la cuadragésima inhalación mostraron aumento en el tiempo de realización de la prueba. Con la administración de L-DOPA a las 40 inhalaciones los animales expuestos a Mn mostraron disminución significativa en el tiempo en el cual recorrieron la viga alcanzando los tiempos registrados por los animales del grupo control.

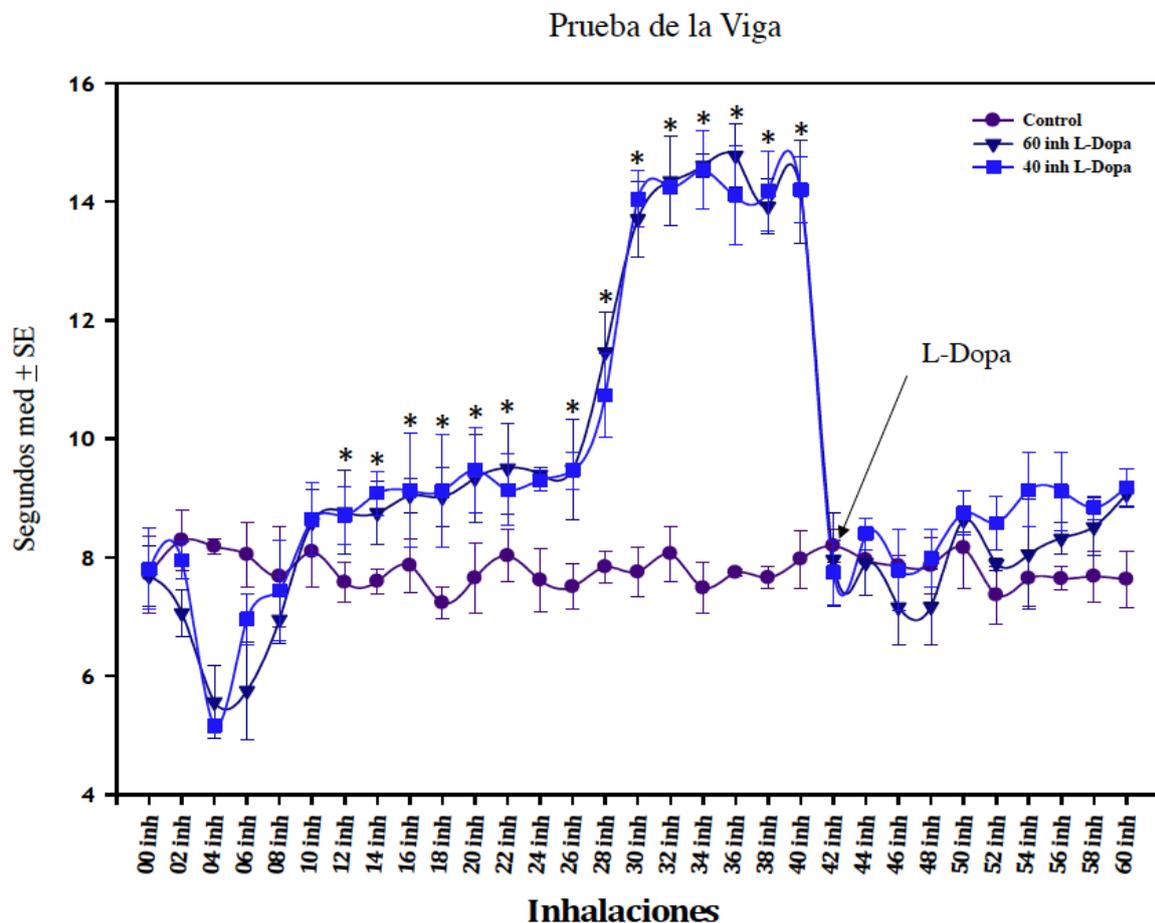


Figura 1: Media del tiempo en segundos que tardaban en recorrer la viga los animales del grupo control así como los expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  -  $Mn(OAc)_3$  tratados con L-DOPA. ANOVA \* =  $P < 0.05$  vs grupo control.

Posteriormente se evaluó la coordinación motora (reaching task), mediante el conteo de aciertos y errores. Como se observa en la figura 2, en promedio los animales control obtuvieron 13 aciertos durante todo el periodo de evaluación, mientras que los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$  a partir de la vigésima y hasta la cuadragésima inhalación mostraron disminución significativa en el número de aciertos. A partir de la cuadragésima inhalación, cuando se les administró L-DOPA mostraron recuperación en esta tarea casi a nivel de los animales del grupo control.

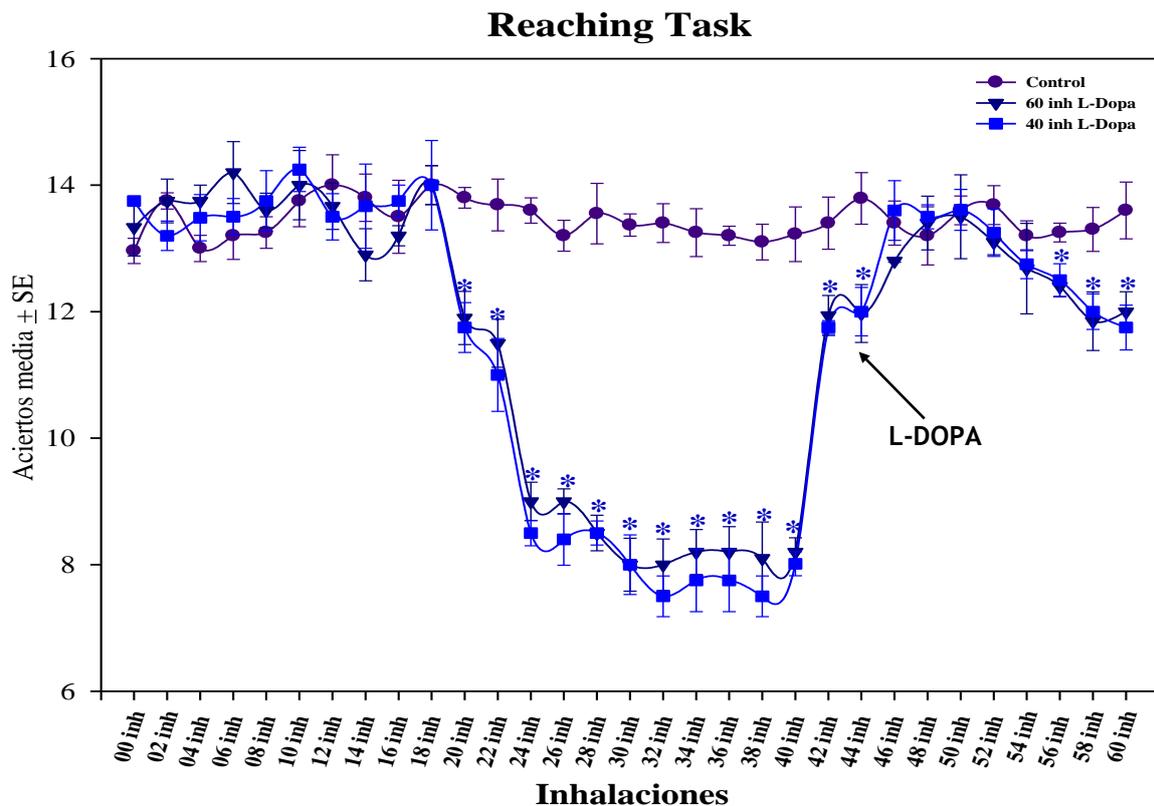


Figura 2: Media del número de aciertos tanto del grupo control así como de los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  -  $Mn(OAc)_3$  tratados con L-DOPA. ANOVA \* =  $P < 0.05$  vs grupo control

Adicionalmente se realizó el análisis cualitativo de los movimientos durante la ejecución de esta tarea. Esta prueba implica la realización de una secuencia de movimientos, se inicia a partir de que los animales huelen el trozo de alimento en la parte delantera de la caja de evaluación, levantan el miembro anterior, ajustan la postura para proyectar la extremidad hacia el pellet y lo sujetan, finalmente el movimiento culmina con el regreso del miembro y la presentación de la comida ante la boca e introducirlo a la misma. Como lo muestra la figura 3, los animales del grupo control (serie A) mostraron todo este conjunto de movimientos;

contrario a ello, en los animales expuestos a Mn (serie B) se observó que el ajuste de la postura es deficiente, ya que no se alinean hacia la abertura de la caja, al proyectar la extremidad, los dígitos estaban abiertos sin sujeción del alimento, en lugar de ello lo jalan al interior de la caja para posteriormente tomarlo del piso con la boca. En contraste con este hecho en los animales expuestos a Mn que recibieron L-DOPA a las 40 inhalaciones (serie C) se observa mejoría significativa en la ejecución de la tarea, ya que son capaces de realizar todos los movimientos necesarios para la presentación del alimento en su boca.



Figura 3.- En el panel A se puede observar la serie de movimientos realizados por los animales del grupo control, en donde se aprecia que el movimiento de la extremidad anterior es dirigido específicamente al pellet, con los dígitos cerrados para sólo abrirlos al momento en que va a tomar la comida. En la serie B se aprecia como en los animales expuestos a la mezcla de Mn, los movimientos son deficientes, ya que no sujetan la comida, sino que la arrastran al interior de la caja con los dedos abiertos todo el tiempo. En contraste con ello, en la serie C los animales expuestos que recibieron L-DOPA, son capaces de realizar nuevamente dichos movimientos de manera adecuada.

Los animales expuestos a 40 inhalaciones mostraron disminución del 67.58 % en el número de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc respecto a los animales del grupo control, mientras que no hubo pérdida de neuronas en el VTA de los animales expuestos a  $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$  comparados con los controles (figura 4 B). En la figura 4 A se aprecia la disminución en el número de neuronas de la SNc, no así en el VTA de los animales expuestos a Mn en relación a los animales del grupo control.

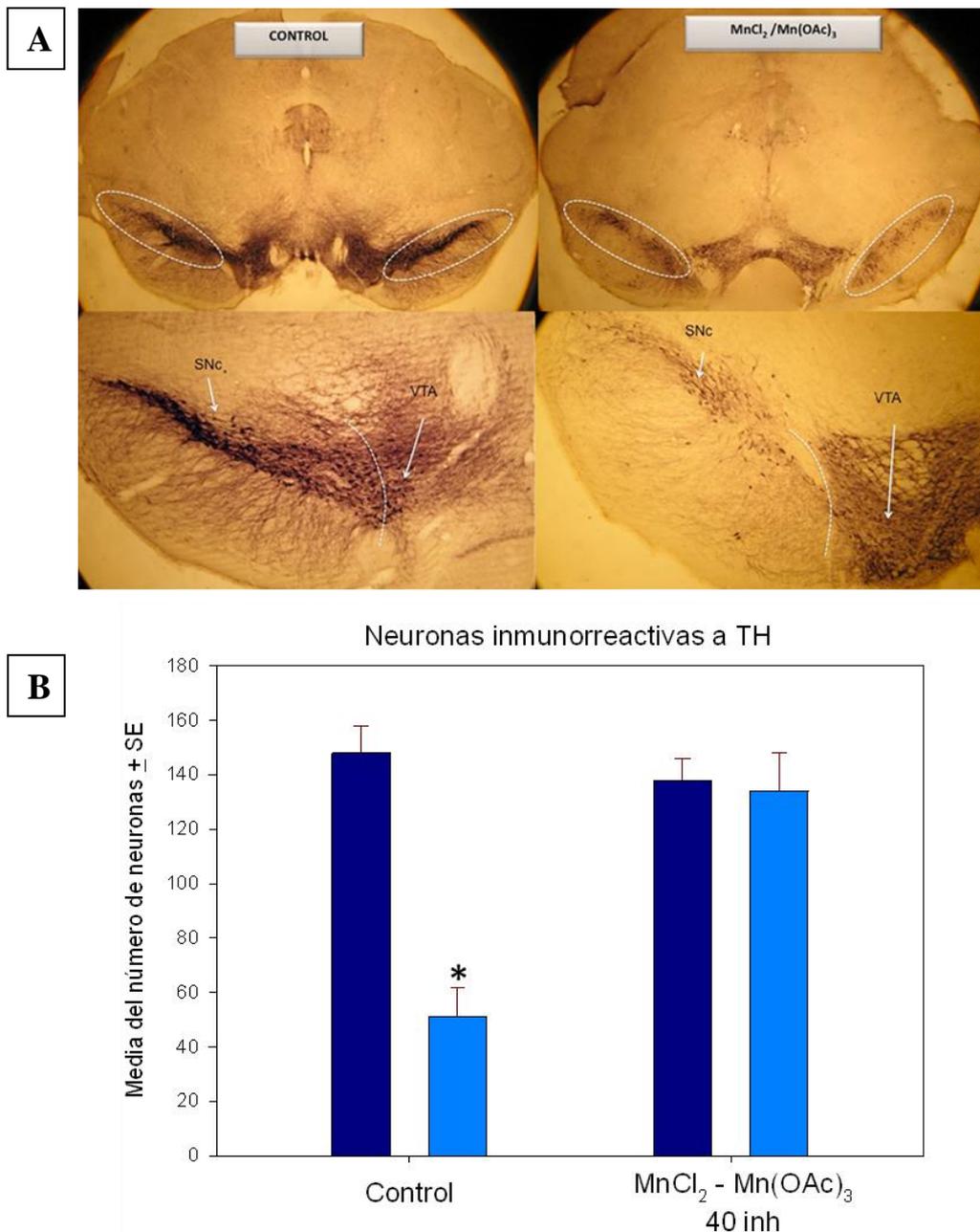


Figura 4.- A: Cortes representativos a nivel del mesencéfalo de ambos grupos donde se puede observar la pérdida de neuronas en la SNc de los animales expuestos a Mn en comparación de los animales del grupo control, además no hay diferencia en la marca dentro del VTA. En B se observa el número promedio de neuronas dopaminérgicas de la SNc y el VTA en cada grupo; para calcular el porcentaje de pérdida se tomó la media del grupo control como el 100 %. El conteo de las neuronas se realizó en un área de  $1500 \mu m^2$  dentro de la SNc y en  $3300 \mu m^2$  en el VTA. Prueba de T \* =  $P < 0.001$  vs grupo control.

Una de las características que deben tener los modelos animales es la especificidad por los núcleos que se ven afectados en humanos, por lo que para determinar si la mezcla de Mn afecta otras estructuras cerebrales se realizó inmunohistoquímica anti NeuN, una proteína nuclear específica de las neuronas.

Uno de los núcleos a los cuales inerva principalmente la SNc es el NE por lo que podría verse afectado por la depleción de DA. En la figura 5A se observa el número característico de neuronas en los animales control, la figura 5B corresponden a animales del grupo expuesto a Mn, en donde se observó pérdida neuronal significativa del 19 % en comparación con los animales del grupo control (figura 5C).

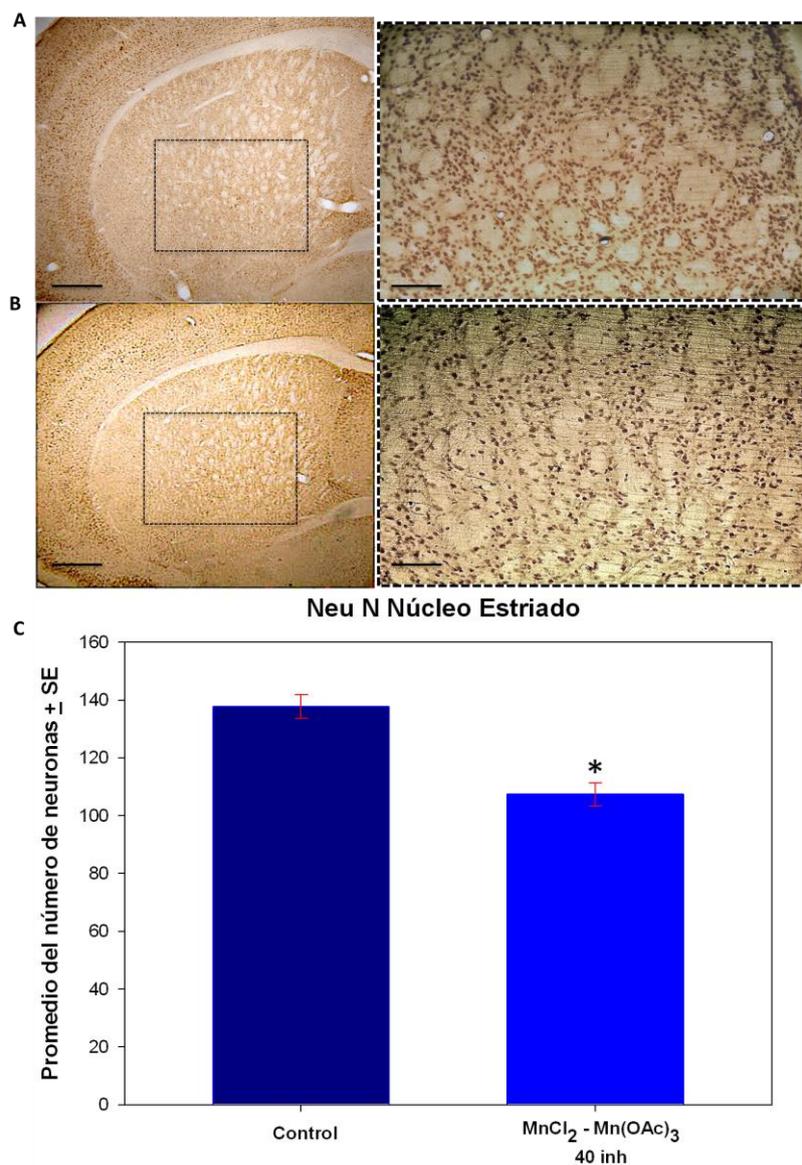


Figura 5.- A: corte representativo del NE de un animal del grupo control, en el recuadro se observa el número característico de neuronas en este núcleo; B: corte representativo del NE de un animal del grupo expuesto a la mezcla de Mn, en el recuadro se percibe disminución del número de neuronas (barra foto panorámica 100  $\mu$ m, barra en el recuadro 25  $\mu$ m); C: media del número de neuronas en donde se observa disminución de neuronas en el grupo expuesto a 40 inhalaciones de MnCl<sub>2</sub> y Mn(OAc)<sub>3</sub>. Prueba de T \* = P < 0.001 vs grupo control.

En el GP, los animales expuestos a Mn mostraron pérdida significativa del 17 % con respecto a los animales del grupo control (figura 6 C), esto se puede apreciar en la figura 6 A donde se muestra un corte representativo de un animal del grupo control comparado con la figura 6 B que corresponde a un corte de un animal expuesto a Mn.

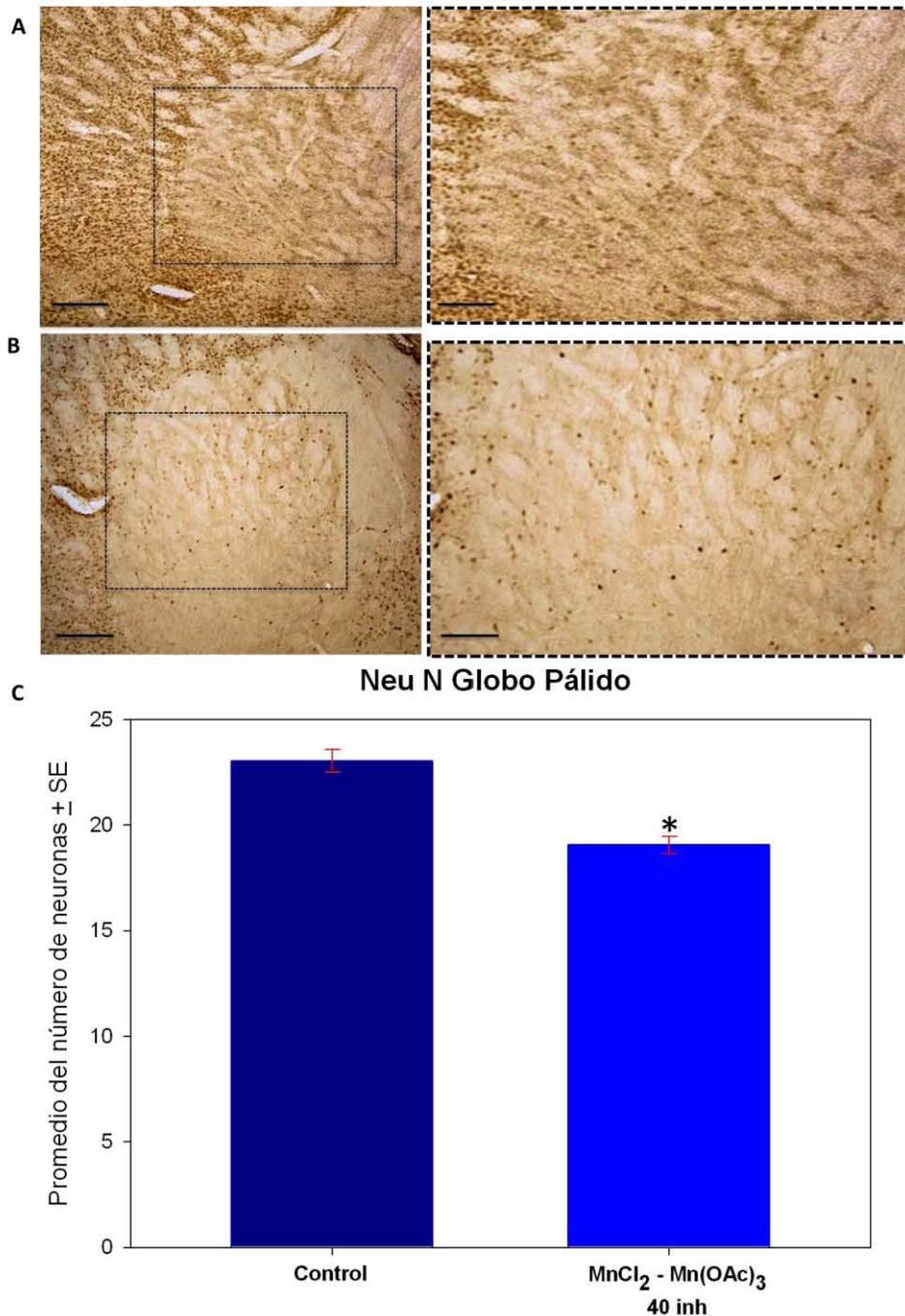


Figura 6.- A: corte representativo del GP de un animal del grupo control, en el recuadro se observa el número normal de neuronas en este núcleo; B: corte representativo del GP de un animal del grupo expuesto a la mezcla de Mn, en el recuadro se percibe disminución del número de neuronas (barra foto panorámica 100  $\mu$ m, barra en el recuadro 25  $\mu$ m); C: media del número de neuronas en el GP, en la gráfica se observa que hay disminución de neuronas en el grupo expuesto a 40 inhalaciones de MnCl<sub>2</sub> y Mn(OAc)<sub>3</sub>. Prueba de T\* = P < 0.001 vs grupo control.

Con el fin de descartar que la deficiencia motora observada en los animales expuestos a Mn se debiera a alteraciones de la vía piramidal, se realizó el conteo de neuronas en la corteza motora primaria, específicamente en la capa piramidal interna, ya que son estas neuronas las que proyectan al NE. Como lo muestra la figura 7 C no existe diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas en la corteza motora entre ambos grupos. La figura 7 A y B son imágenes representativas de los animales del grupo control y expuesto a Mn respectivamente.

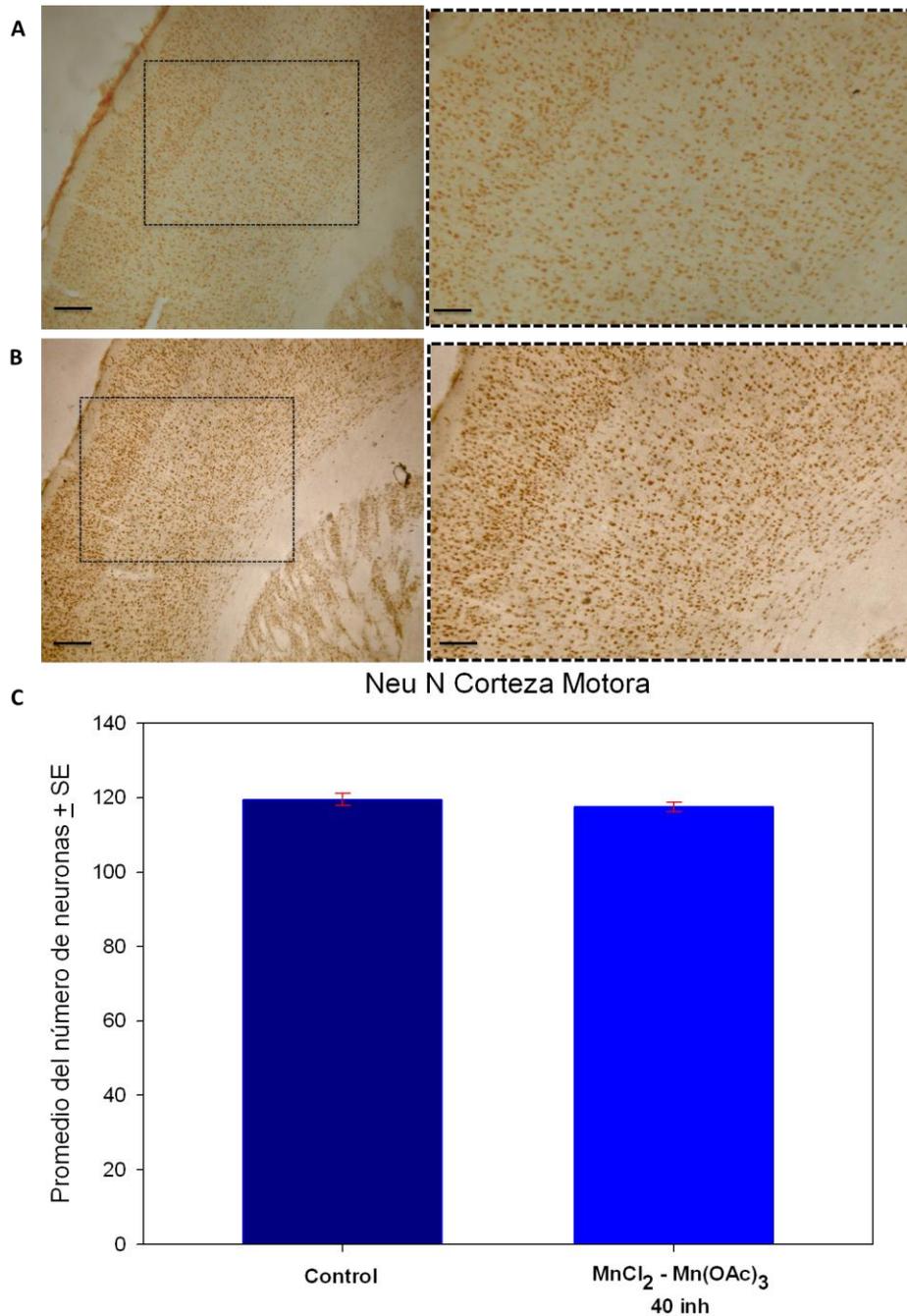


Figura 7.- A y B: cortes representativos de la Corteza Motora de un animal del grupo control y un animal del grupo expuesto a la mezcla de Mn, en el recuadro se observa el número normal de neuronas en esta área (barra foto panorámica 100  $\mu$ m, barra en el recuadro 25  $\mu$ m); C: media del número de neuronas en la corteza motora primaria. No existe diferencia significativa entre ambos grupos. Prueba de T \* = P < 0.001.

Como se mostró anteriormente, no hay pérdida de neuronas en el VTA, sin embargo, esto no significa que la transmisión sináptica no pudiera estar afectada y que haya alteraciones en las áreas que son inervadas por esta estructura. Por ello se realizó el conteo de neuronas en la corteza frontal, ya que esta área es inervada ampliamente por las neuronas dopaminérgicas del VTA. Nuestros resultados muestran que al igual que en la corteza motora, no existe diferencia estadísticamente significativa en el número de neuronas en esta estructura en el grupo de ratones expuestos comparado con los animales del grupo control (figura 8). La figura 8 A y B muestra cortes representativos de esta área donde se puede apreciar el número característico de neuronas en esta estructura.

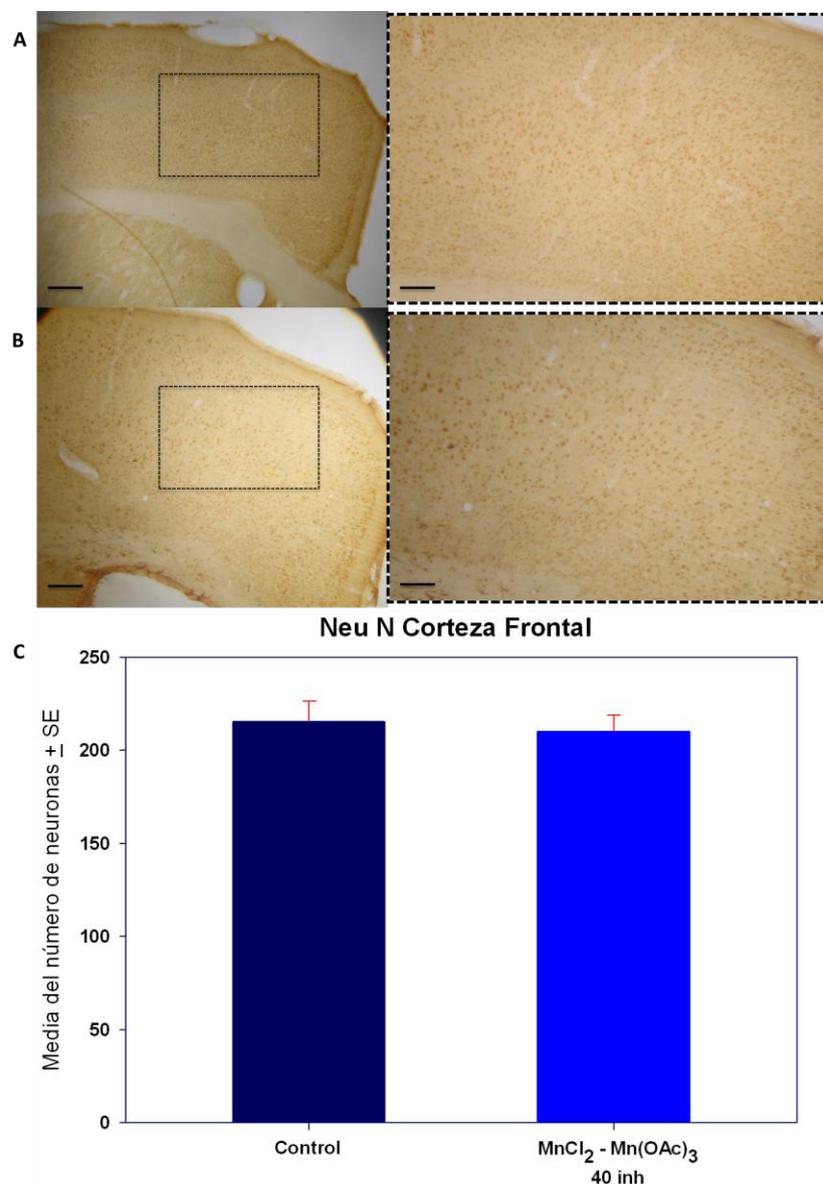


Figura 8.- A y B: cortes representativos de la Corteza Frontal de un animal del grupo control y un animal del grupo expuesto a la mezcla de Mn, en el recuadro se observa el número normal de neuronas en esta área (barra foto panorámica 100  $\mu$ m, barra en el recuadro 25  $\mu$ m); C: media del número de neuronas en la corteza frontal. No existe diferencia significativa entre ambos grupos. Prueba de T \* = P < 0.001.

Se ha reportado que el Mn produce excitotoxicidad; el hipocampo es muy labil al daño mediante este mecanismo, por ese hecho es importante evaluar si la mezcla de Mn pudiera estar provocando daño en esta estructura. La figura 9 C se observa que no hay pérdida neuronal significativa en las áreas CA1 y CA3 de los animales expuestos a Mn en relación a los animales del grupo control. En la figura 9 se presentan cortes representativos del hipocampo de los animales control (serie A) y de los animales expuestos a Mn (serie B), como se puede observar en los recuadros, el número de neuronas es muy similar en ambos grupos.

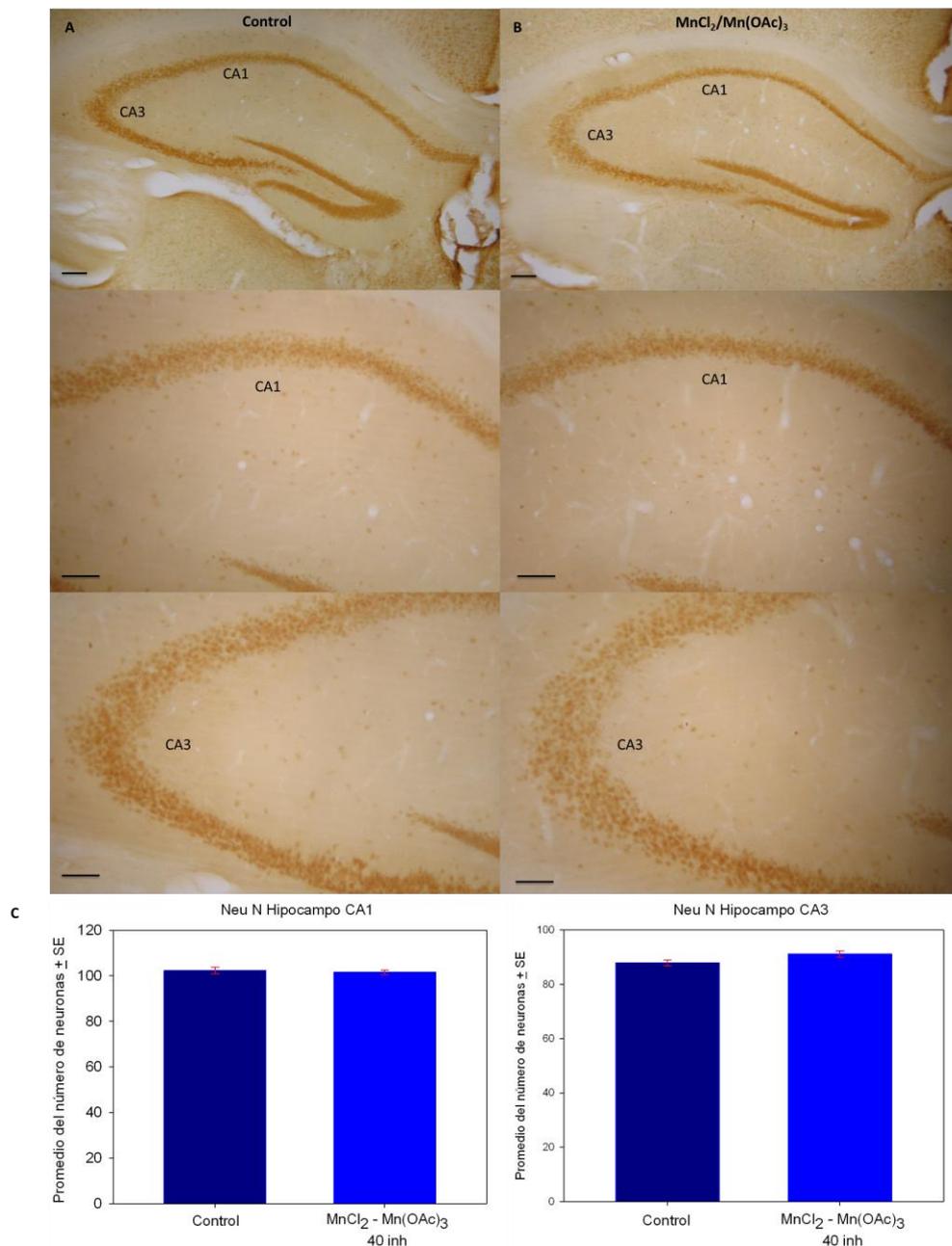


Figura 9.- Corte representativo del hipocampo de un animal del grupo control (A) y un animal del grupo expuesto a la mezcla de Mn (B), en los recuadros se observa el número característico de neuronas en el área CA1 y CA3 de ambos grupos (barra foto panorámica 100  $\mu$ m, barra en el recuadro 25  $\mu$ m); C: media del número de neuronas el área CA1 y CA3, no existe diferencia significativa entre ambos grupos en ninguna de estas áreas. Prueba de T \* = P< 0.001.

Una de las estructuras cerebrales implicadas en el control del movimiento es el cerebelo, por ello es importante evaluarlo. En la figura 10 A y B se muestran cortes representativos del cerebelo de los animales del grupo control y expuestos a Mn respectivamente, en los recuadros se puede apreciar que el número de neuronas de Purkinje en ambos grupos es muy similar, en la figura 10 C se muestra que no hubo diferencia significativa entre los grupos.

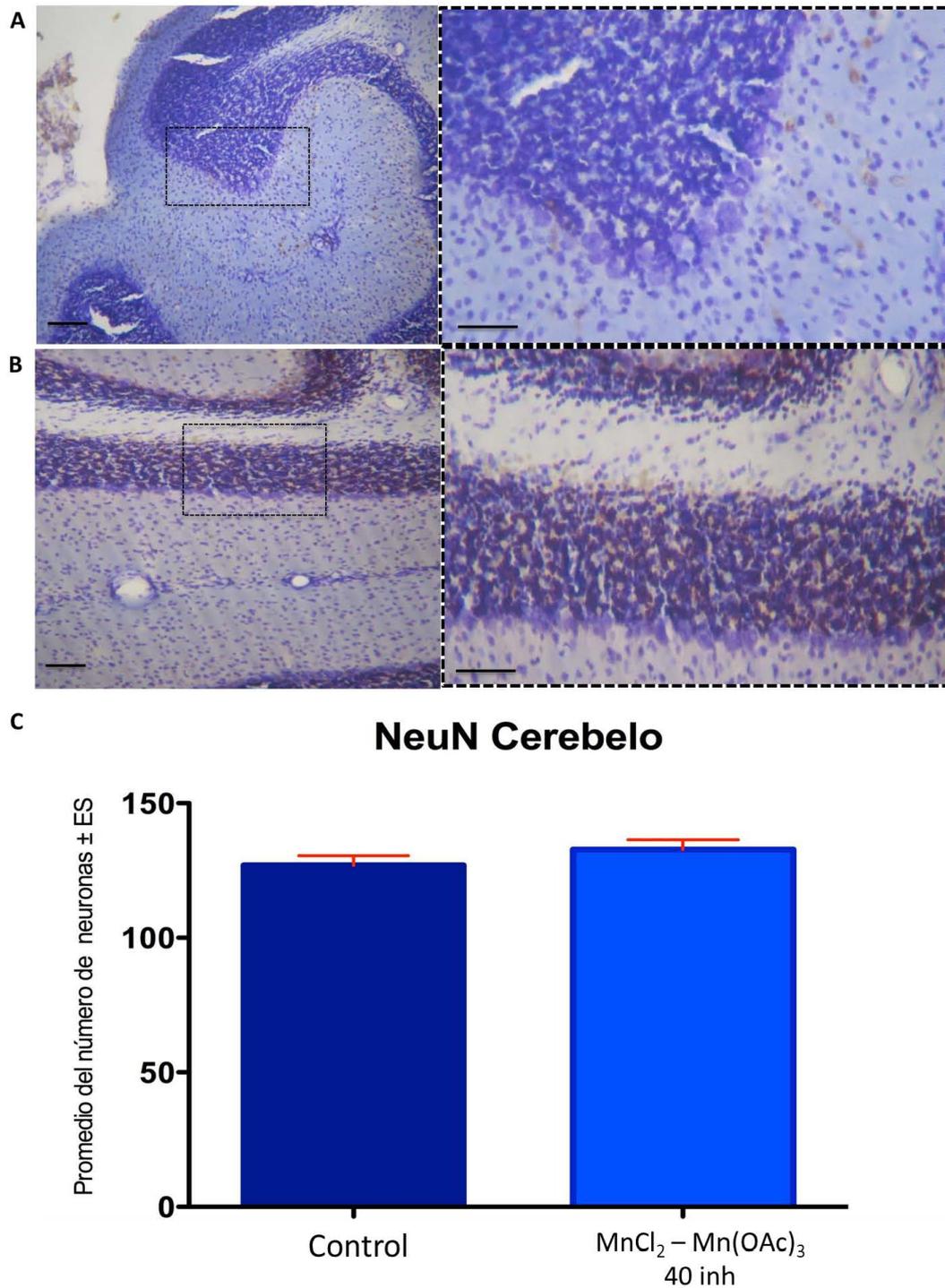


Figura 10.- Corte representativo del cerebelo de un animal del grupo control (A) y un animal del grupo expuesto a la mezcla de Mn (B), en los recuadros se observa el número característico de neuronas de Purkinje de ambos grupos (barra foto panorámica 100  $\mu$ m, barra en el recuadro 25  $\mu$ m); C: media del número de neuronas de Purkinje, no existe diferencia significativa entre ambos grupos en ninguna de estas áreas. Prueba de T \* = P < 0.001.

Se realizó el conteo de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del NE de animales del grupo control y expuestos a 40 inhalaciones de Mn mediante la impregnación de Golgi. La figura 11 C muestra que en los animales expuestos a la mezcla de Mn hay pérdida significativa del 52.24 % en el número de espinas dendríticas en estas neuronas comparadas con el grupo control. Esto se puede apreciar de mejor manera en la figura 11 A y B, donde se muestra en los recuadros un acercamiento de las dendritas de animales de ambos grupos.

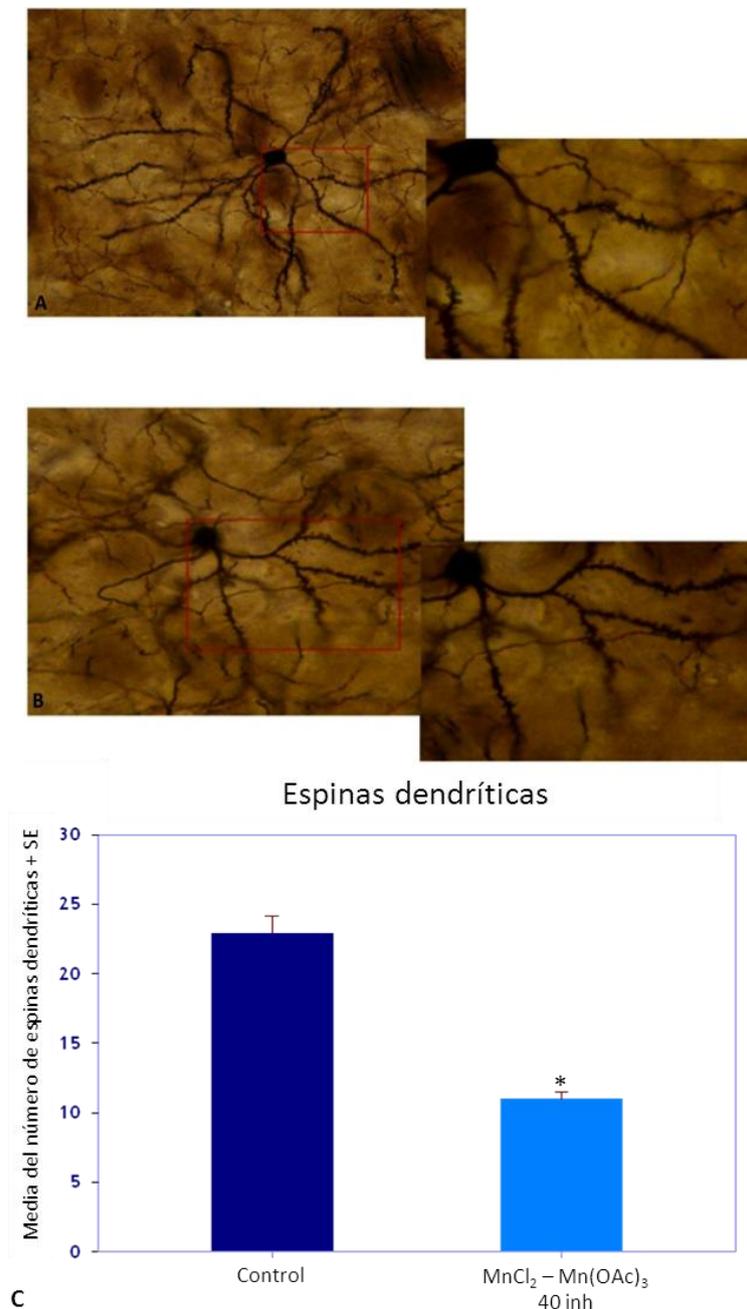


Figura 11.- A: Neurona espinosa mediana perteneciente a un animal del grupo control, se puede apreciar el número característico de espinas dendríticas en estos animales. En el recuadro se observa la magnificación de algunas dendritas en donde son más evidentes estas estructuras. B: Neurona espinosa mediana de uno de los animales expuestos a Mn, se aprecia la pérdida de espinas dendríticas con respecto a las neuronas de los animales del grupo control. El recuadro muestra el acercamiento de algunas dendritas de esta célula. C: Media del número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas tanto de los animales del grupo control, así como de los animales expuestos a la mezcla de Mn. Prueba de T \* = P < 0.001 vs grupo control.

## Análisis ultraestructural

Se han reportado ampliamente los cambios ultraestructurales que se dan en los pacientes con EP, por lo que a fin de evaluar si dichos cambios se asemejan a los producidos por la exposición a Mn, se realizó el análisis ultraestructural en el tejido proveniente del NE, el GP y la SNc de nuestros animales expuestos y controles.

### Núcleo Estriado

En el análisis ultraestructural del tejido estriatal obtenido de los animales de los grupos control y expuestos a Mn se determinó el diámetro de los botones sinápticos. Las figuras 12 C y D muestran que hay un aumento significativo en el diámetro de los botones sinápticos del grupo expuesto a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . La media del diámetro es de  $1203 \pm 19 \mu m^2$  en el eje mayor y  $980 \pm 13 \mu m^2$  en el eje menor en los animales expuestos, comparado con el grupo control cuya media fue de  $837 \pm 19 \mu m^2$  y  $713 \pm 16 \mu m^2$ , respectivamente. En la figura 12 A se observa un botón característico del estriado de los animales del grupo control, mientras que la figura 12 B muestra un botón con edema observado en los animales expuestos a Mn.

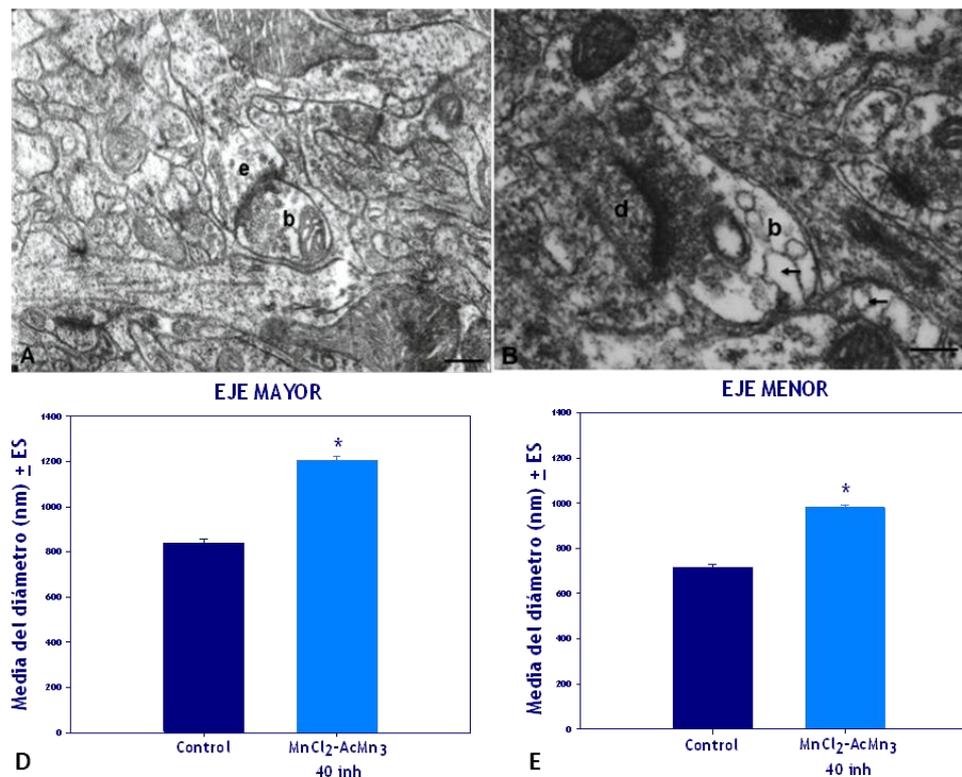


Figura 12.- Micrografía Electrónica en donde se observa el tejido estriatal de: A.- Animal control, donde un botón presináptico (b) establece contacto con una espina dendrítica (e). También se puede observar el neuropilo bien conservado. B.- Animal expuesto a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ , donde se observa un botón presináptico (b) haciendo contacto con una dendrita (d). Se observa el botón hinchado, así como botón y neuropilo vacuolado ( $\leftarrow$ ). Barra= 0.25  $\mu m$ . C, D: Media del diámetro de los botones sinápticos en  $\mu m \pm SE$ , tanto eje mayor como eje menor en el grupo de animales control y ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ . Prueba de T \* = P < 0.001 vs grupo control

Con respecto a la estructura posináptica, en el grupo expuesto, los contactos realizados con la cabeza de la espina prevalecen, mientras que los contactos con el cuello de la espina dendrítica se vieron disminuidos en el tejido proveniente del NE de los animales expuestos a  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  con respecto a los animales del grupo control (figura 13 C y D ). En la figura 13 A se observa un contacto sináptico con el cuello de una espina dendrítica de un animal del grupo control, mientras que en la figura 13 B se observa un contacto con la cabeza de la espina de un animal expuesto a Mn.

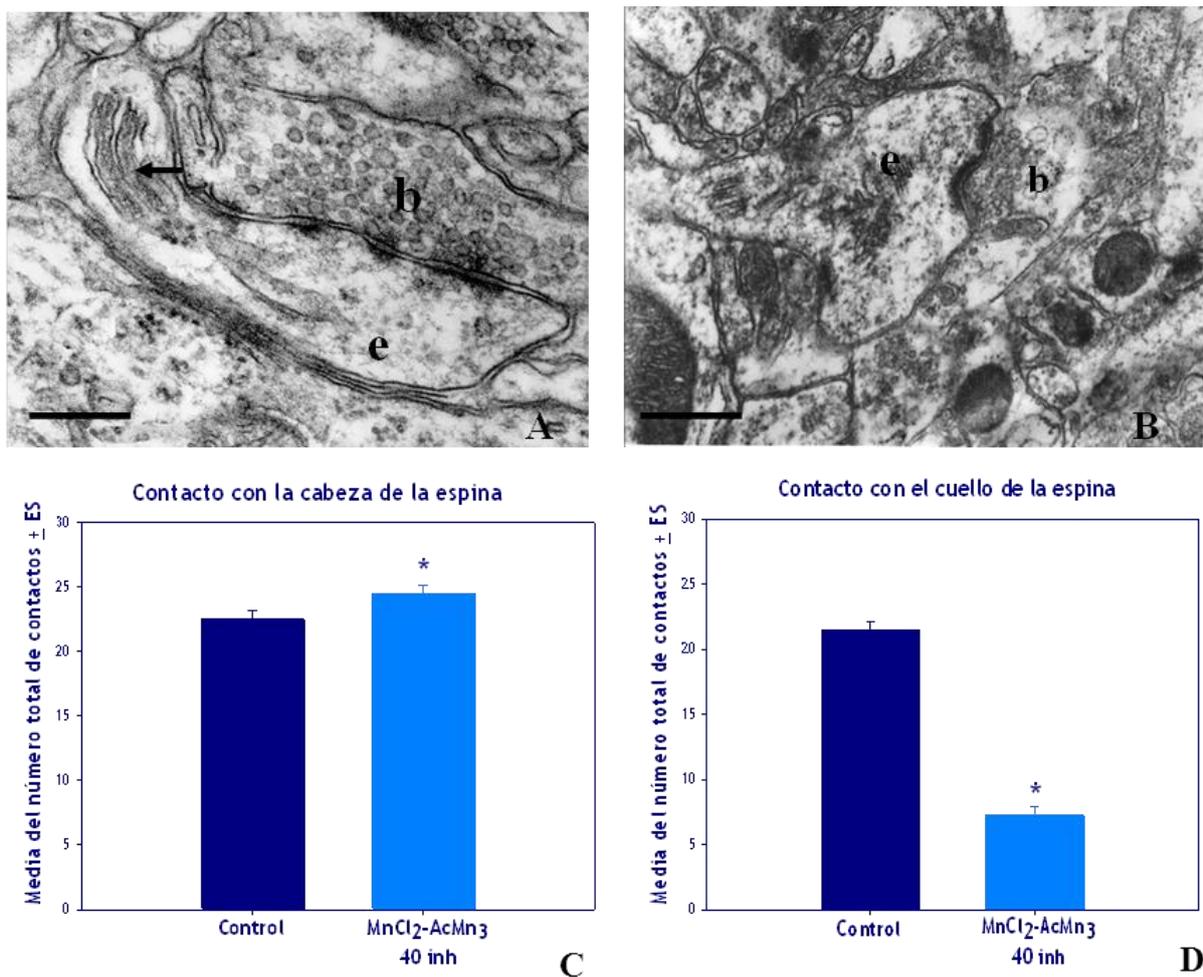


Figura 13.- Micrografías Electrónicas en donde se observa: A.- Estriado de un animal control, donde un botón presináptico (b) establece contacto con el cuello de una espina dendrítica (e), se aprecia perfectamente el aparato espinoso (←). B.- Estriado de un animal expuesto a mezcla de Mn, donde se muestra un botón presináptico (b) haciendo contacto con la cabeza de una espina dendrítica (e). Barra= 0.25  $\mu$ m. C y D: Media del número de contactos sinápticos que se realizan con la cabeza y con el cuello de la espina dendrítica en el tejido estriado de los ratones control y expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . Prueba de T \* =  $P < 0.001$  vs grupo control

También se analizó el número de sinapsis perforadas. La figura 14 B muestra aumento significativo en el número de este tipo de contactos en los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  comparados con los animales del grupo control. La figura 14 A muestra una sinapsis perforada, la cual se caracteriza por la invaginación de la membrana del botón postsináptico hacia el botón presináptico.

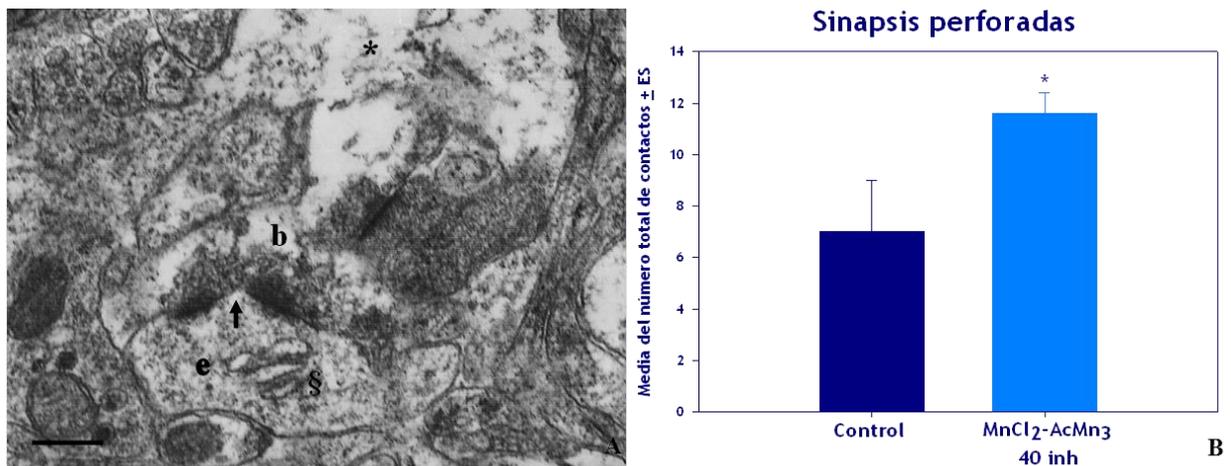


Figura 14.- A: Micrografía Electrónica en donde se observa una sinapsis perforada en el tejido estriatal de un ratón expuesto a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ . El botón sináptico (b) establece contacto con la cabeza de una espina dendrítica (e). Se observa la invaginación del botón postsináptico hacia el botón presináptico ( $\blackleftarrow$ ), el aparato espinoso (§) y el neuropilo dañado (\*). Barra= 0.25  $\mu m$ . B: Media del número de sinapsis perforadas contadas en el tejido estriatal proveniente de los ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ , comparados con los animales control. Prueba de T \* =  $P < 0.05$  vs grupo control

## Globo Pálido

En el análisis ultraestructural del GP observamos que no hay aumento significativo en el diámetro de los botones sinápticos del grupo expuesto a la mezcla de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  (Figura 15 C). La media del diámetro es de  $983 \pm 14 \mu m^2$  en el eje mayor y  $790 \pm 16 \mu m^2$  en el eje menor en el grupo expuesto, y  $877 \pm 18 \mu m^2$  y  $789 \pm 13 \mu m^2$  en el grupo control, respectivamente. En la figura 15 A se observa un botón característico del GP de los animales del grupo control, mientras que la figura 14 B muestra un botón observado en los animales expuestos a Mn.

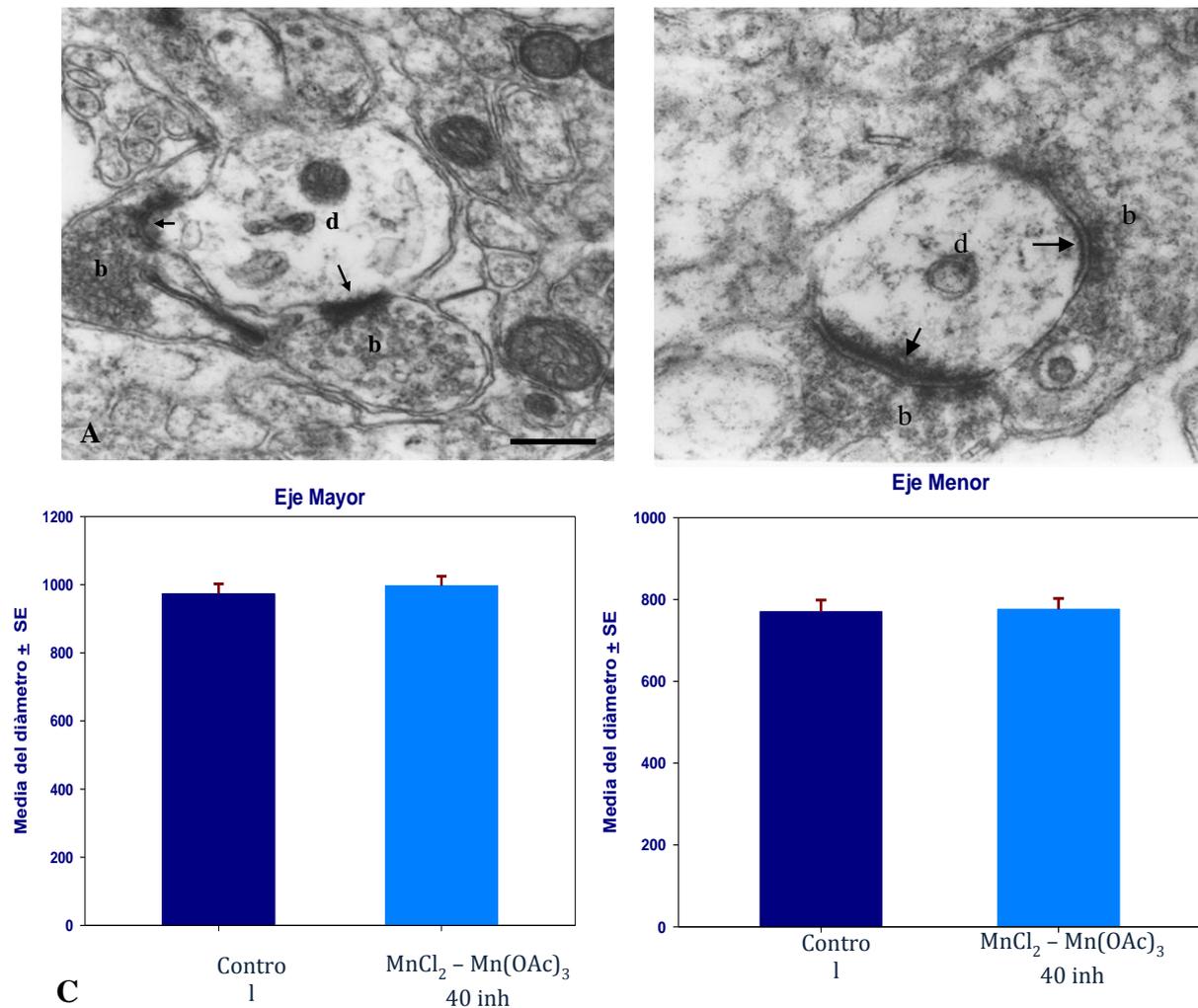


Figura 15.- Micrografía Electrónica en donde se observa el tejido palidal de: A.- Animal control, donde se aprecian dos botones presinápticos (b) estableciendo contacto con una dendrita. B.- Animal expuesto a la mezcla de  $MnCl_2 - Mn(OAc)_3$ , donde se observan múltiples contactos sinápticos (b) con una dendrita (d). También se puede observar el neuropilo bien conservado en ambos grupos de animales. Barra= 0.25  $\mu m$ . C: Media del diámetro de los botones sinápticos en  $\mu m \pm SE$ , tanto eje mayor como eje menor en el grupo de animales control y ratones expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $AcMn_3$ . Prueba de T \* =  $P < 0.001$  vs grupo control.

En lo referente a la estructura postsináptica se observó que en este núcleo existen contactos axosómicos, los cuales no mostraron disminución en los animales expuestos (figura 16 B); por el contrario, los contactos axoespinosos se pierden en esta estructura (figura 16 D), por ende se puede encontrar con mayor frecuencia los contactos establecidos con las dendritas en el grupo expuesto (figura 16 F). En la figura 16 A se observan un par de contactos sinápticos (marcados con flechas) establecidos con un soma, mientras que en la figura 16 C se puede ver

un botón presináptico prácticamente rodeando a una espina dendrítica; en la 16 E se muestra una dendrita estableciendo contactos con varias terminales axónicas.

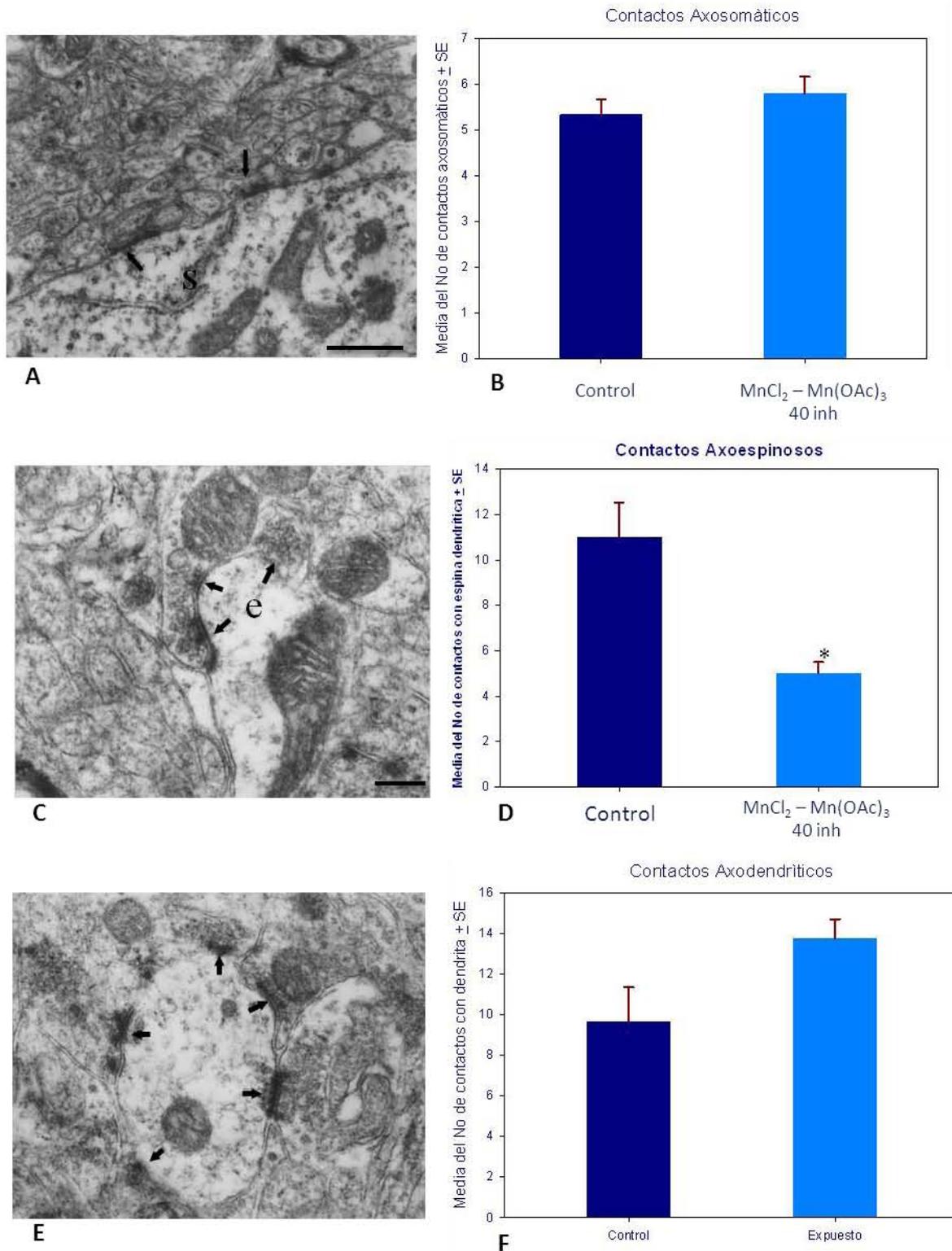


Figura 16.- Las micrografías muestran A: dos contactos sinápticos (←) establecidos con un soma (S), C: multiples contactos sinápticos (←) establecidos con una espina dendrítica (e) y E: multiples contactos sinápticos (←) establecidos con una dendrita (d). B: Media del número de contactos axosomáticos, D: axoespinosos y F: axodendríticos en el GP de ratones expuestos a 40 inhalaciones de MnCl<sub>2</sub> y Mn(OAc)<sub>3</sub>. \* = diferencia significativa vs grupo control con P < 0.001.

Además del análisis cuantitativo, se realizó el análisis ultraestructural cualitativo del tejido obtenido de los estriados de los animales de ambos grupos, encontrándose que las neuronas espinosas medianas en el NE de los animales control presentan un núcleo relativamente grande con pocas indentaciones y agregados de cromatina en la membrana nuclear, también presentan poca cantidad de citoplasma y pocos organelos (figura 17 A), el neuropilo bien conservado con una gran cantidad de contactos sinápticos (flechas en la figura 17 B); mientras que el neuropilo de los animales expuestos a 40 inhalaciones de  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$  presenta vacuolas (marcadas con asteriscos) y axones con mielina desorganizada (figura 17 C, D, J). También se observaron células necróticas en los animales expuestos, comparados con los animales del grupo control (figura 17 E, F). Otro cambio observado fue la presencia de cuerpos multivesiculares (CM) y acúmulos de lipofucsina (L; figura 17 G, H), además el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico presentaban edema, lo cual se observa como dilatación de las cisternas.

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

Las neuronas dopaminérgicas de la SNc se caracterizan por tener una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso y membrana nuclear aparentemente lisa sin invaginaciones (figura 18 A). En el tejido obtenido de la SNc de los animales expuestos se observó distribución anormal de la cromatina, la cual se acumula cerca de la membrana nuclear, aspecto característico de las células en apoptosis (figura 18 G, H), además de alteraciones nucleares muy evidentes al compararlas con las neuronas del grupo control, en este grupo se observan núcleos con invaginaciones (figura 18 C, D, E, F). También se observaron células necróticas (figura 18 I, J) y dendritas con una gran cantidad de mitocondrias (figura 18 B).

### **Cambios Ultraestructurales en el GP**

El GP presenta neuronas grandes con núcleos indentados (n) con cromatina dispersa, también presentan poca cantidad de citoplasma y pocos organelos, el neuropilo bien conservado (figura 19 A); en los animales expuestos a Mn se observaron pocos cambios en este núcleo, de manera general el neuropilo se encontraba bien conservado (figura 19 D, F, G, H), sin embargo se encontraron algunas células necróticas (figura 19 I, J, K) y dendritas vacuoladas (figura 19 E, L).

## Cambios ultraestructurales en el NE

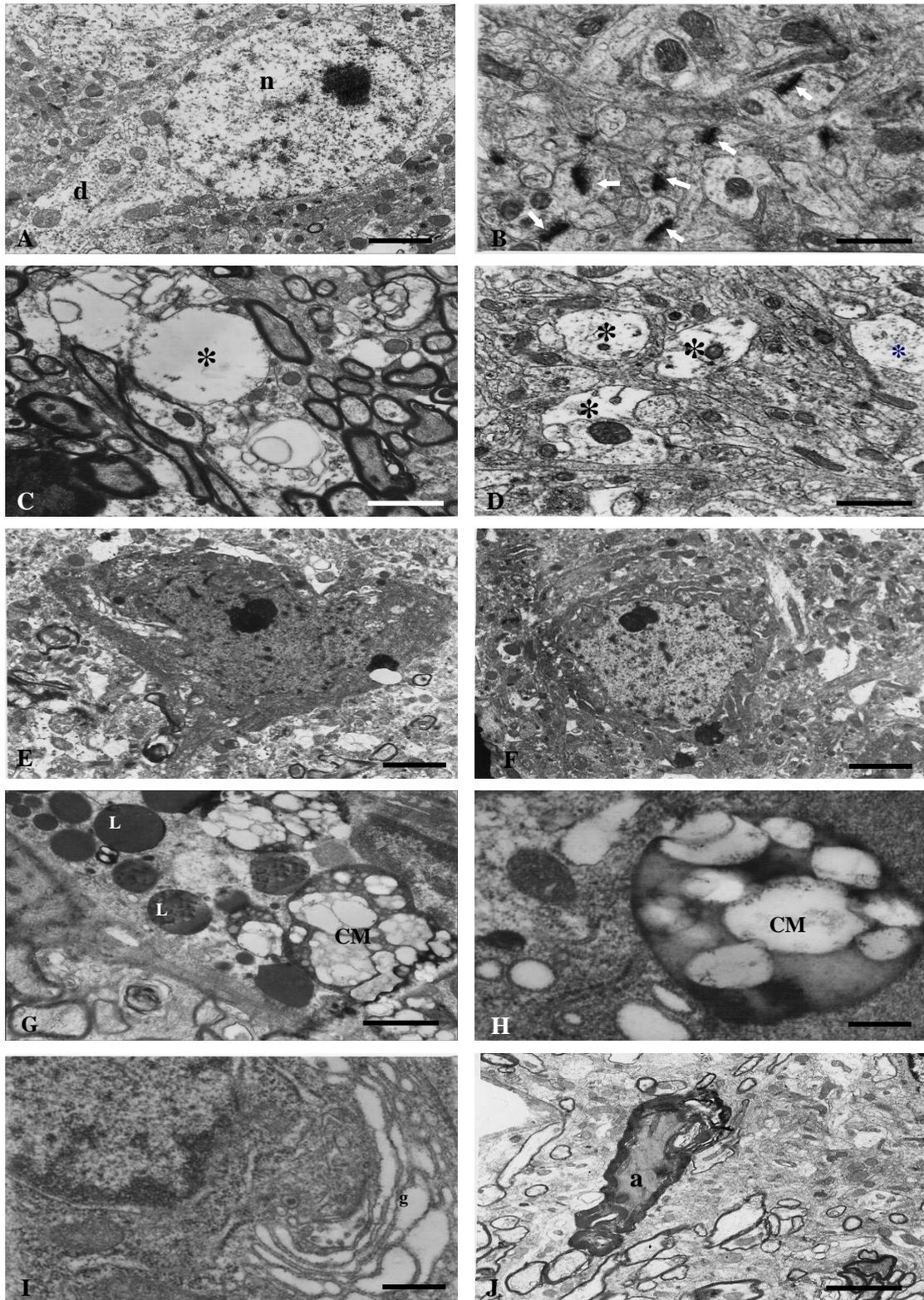


Figura 17.- Cambios ultraestructurales en el NE. Micrografías Electrónicas en donde se observa: A.- Soma de una neurona espinosa mediana del tejido estriado de un animal del grupo control (d) dendrita, (n) núcleo (Barra= 1 $\mu$ m). B.- estriado de un animal del grupo control donde se observa el neuropilo bien conservado y varios contactos sinápticos ( $\blackleftarrow$ ) (Barra= 0.5 $\mu$ m). C y D.- neuropilo dañado del grupo expuesto a Mn con una gran cantidad de vacuolas (\*) y axones con mielina desorganizada (Barra= 0.75 $\mu$ m). E y F.- neuronas necróticas del tejido obtenido del estriado de los animales expuestos (Barra= 1 $\mu$ m). G y H.- Lipofuscina (L) y cuerpos multivesiculares (CM) (Barra= 0.25  $\mu$ m y 0.5 $\mu$ m respectivamente). I.- Aparato de Golgi dañado y J.- axón dañado con la mielina desorganizada (Barra= 0.5 $\mu$ m).

## Cambios ultraestructurales en la SNc

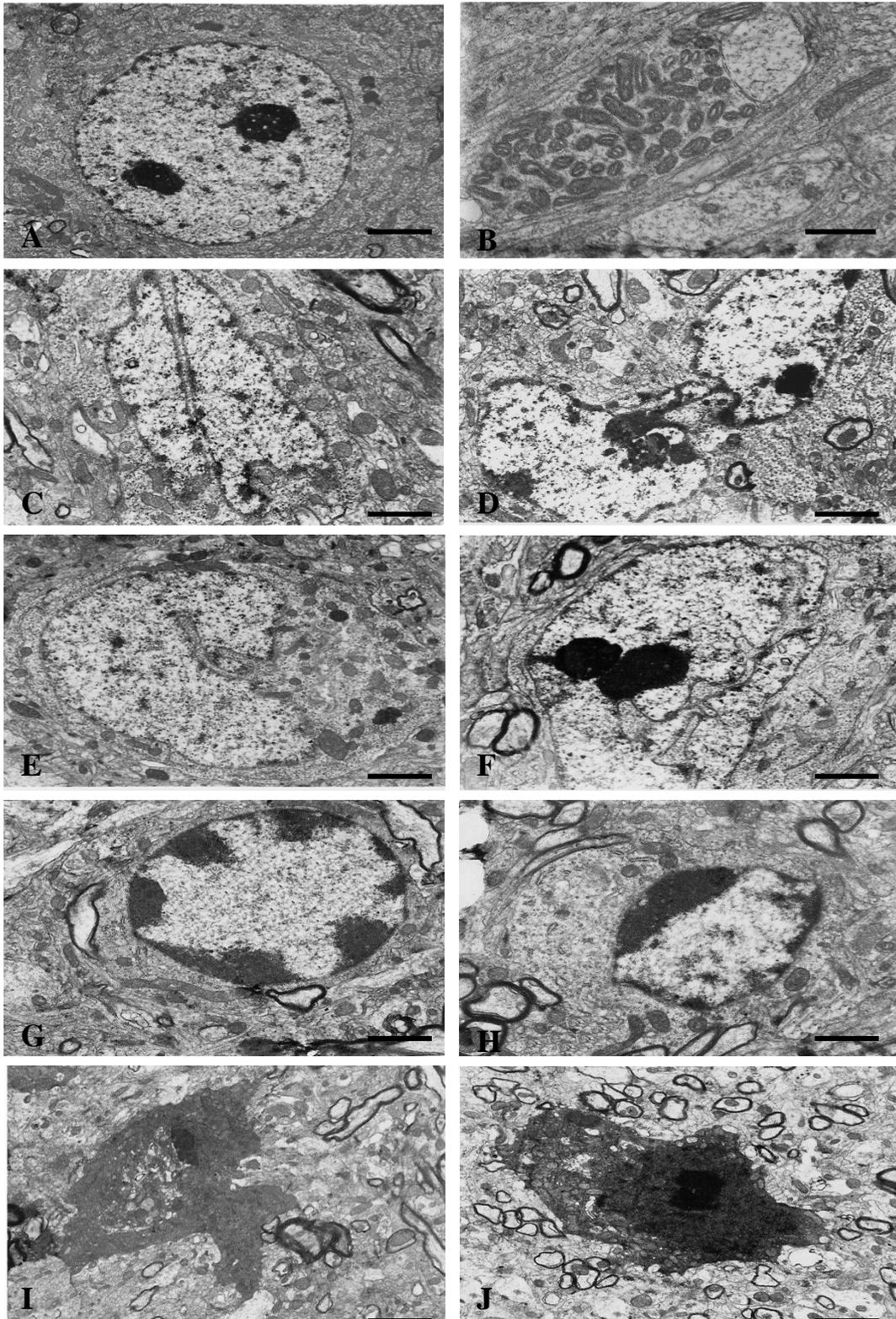


Figura 18.- Cambios ultraestructurales en la SNc. Micrografías Electrónicas en donde se observa: A.- Soma de una neurona dopaminérgica de la SNc de un animal del grupo control (Barra= 1  $\mu$ m). B.- Dendrita de un animal expuesto con una gran cantidad de mitocondrias (Barra= 0.25 $\mu$ m). C,D,E,F.- Alteraciones nucleares de animales expuestos. G,H.- distribución anormal de la cromatina, apoptosis en animales expuestos. I,J.- Necrosis (Barra= 1 $\mu$ m).

## Cambios ultraestructurales en el GP

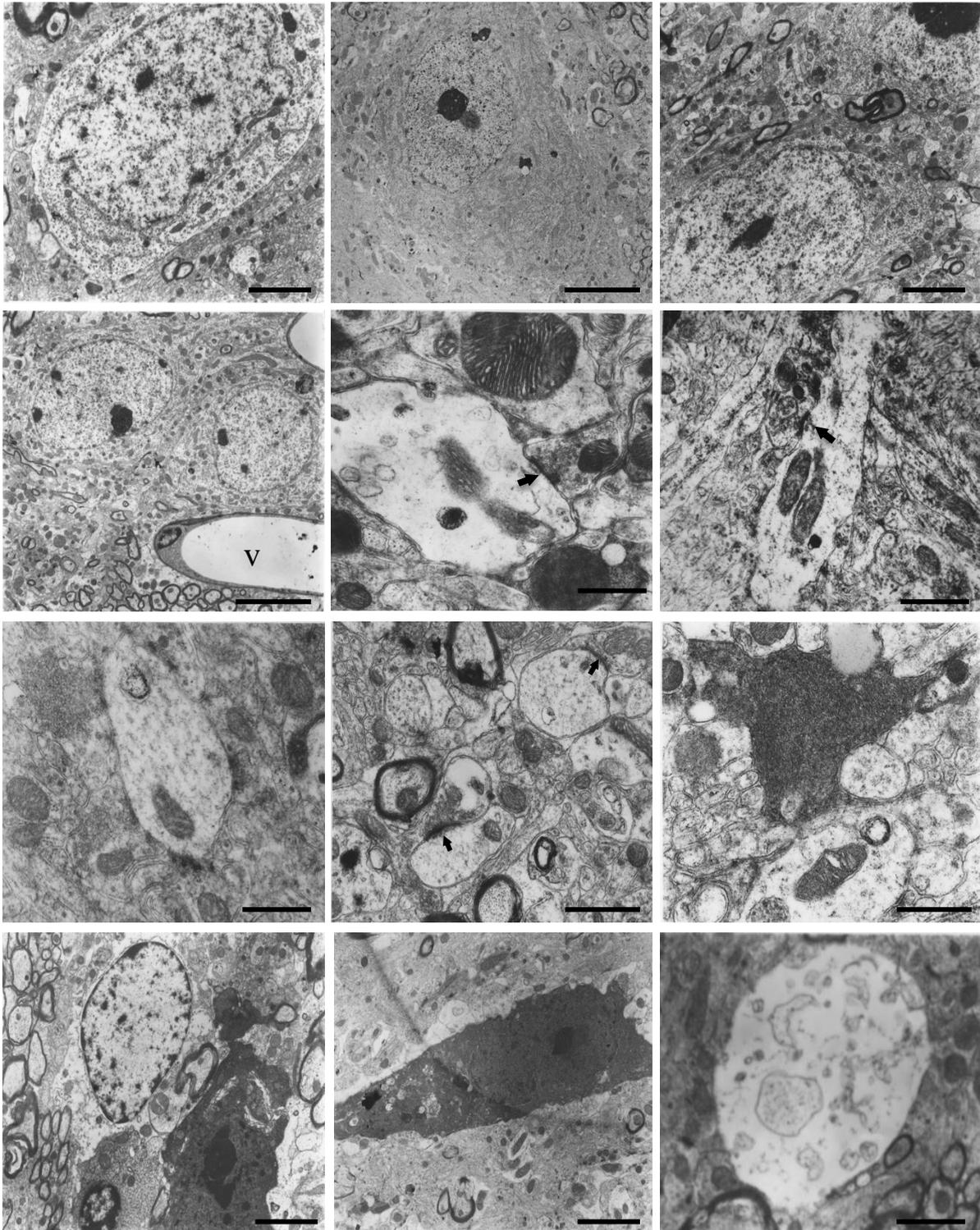


Figura 19.- Cambios ultraestructurales en el GP. Micrografía Electrónica en donde se observa: A.- Soma de una neurona palidal de un animal del grupo control, (n)= núcleo (Barra= 1 $\mu$ m). B.- neurona palidal perteneciente a un animal expuesto donde se observa neuropilo dañado (Barra= 0.5 $\mu$ m), en contraste, en las imágenes C y D el neuropilo se encuentra bien conservado, en E,f,H se pueden observar multiples contactos sinápticos ( $\blackleftarrow$ ) (Barra= 0.75  $\mu$ m). I, J y K.- Necrosis neuronas del tejido obtenido del GP de los animales expuestos (Barra= 1 $\mu$ m). E y L, dendritas vacuoladas (d) (Barra= 0.5 $\mu$ m).

Adicionalmente se realizó el conteo de los somas que presentaban daño en cada uno de los núcleos analizados, en la tabla 1 se resumen estos resultados y se comparan con los obtenidos con las diferentes marcas inmunocitoquímicas. De acuerdo al conteo realizado durante el análisis ultraestructural se determinó que el porcentaje de neuronas dañadas en la SNc fue del 50 al 70 % lo cual concuerda con lo observado mediante la inmunocitoquímica ya que el promedio de la pérdida de neuronas TH positivas fue del 67 %. De igual forma, en el NE se observó daño neuronal entre el 15 – 30 %, mientras que en el análisis inmunocitológico el promedio fue del 19 %, por su parte, en el GP el intervalo se situó entre el 0 y el 15 % de neuronas dañadas y mediante la inmunocitoquímica para Neu N se encontró que en promedio hay pérdida del 17 %.

Tabla 1.- porcentaje de pérdida neuronal en la SNc, el NE y el GP a través del análisis ultraestructural y las diferentes inmunocitoquímicas realizadas.

<b>Estructura</b>	<b>Inmunohistoquímica</b>	<b>Ultraestructura</b>
<b>Sustancia Nigra</b>	Disminución del 67 % (TH)	50 – 70 % Neuronas dañadas
<b>Núcleo Estriado</b>	Disminución del 19 % (Neu N)	15 – 30 % Neuronas dañadas
<b>Globo Pálido</b>	Disminución del 17 % (Neu N)	0 – 15 % Neuronas dañadas

## Concentraciones de DA

De acuerdo a los datos obtenidos observamos que posterior a las 40 inhalaciones de la mezcla de Mn hubo disminución significativa de DA y sus metabolitos. En el NE, GP y la SNc se registro pérdida significativa del 73 %, 68 % y 87 % de la DA; 52 % 61 % y 85 % del DOPAC y 58 %, 46 % y 56 % del HVA respectivamente (figura 20).

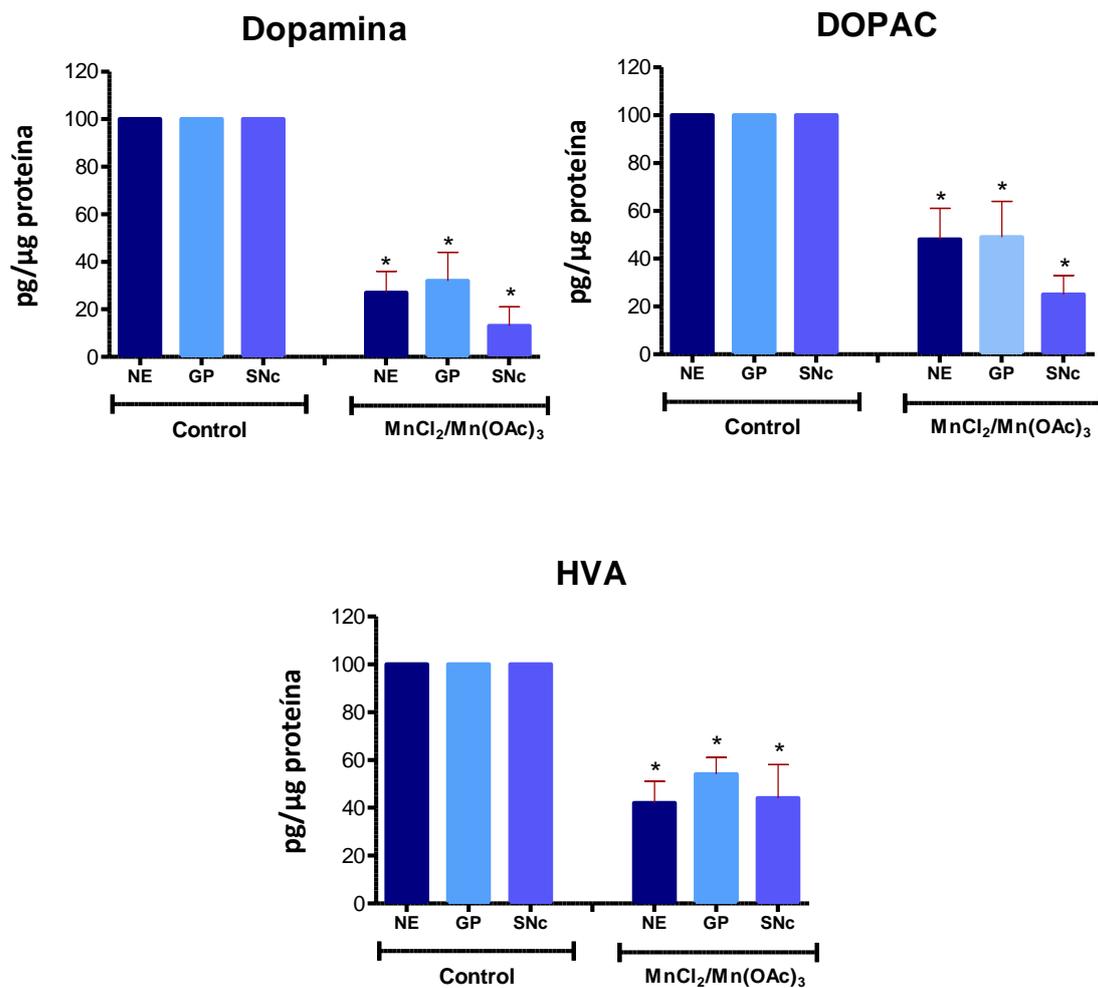


Figura 20.- Contenido de DA, DOPAC y HVA en el núcleo estriado (NE) globo pálido (GP) y sustancia nigra compacta (SNc) de los animales del grupo expuesto a 40 inhalaciones de MnCl<sub>2</sub> - Mn(OAc)<sub>3</sub> comparados con el grupo control. \* = P < 0.001 vs grupo control

## Discusión

Uno de los objetivos de los modelos animales para el estudio acerca de la EP se enfocan en el entendimiento e identificación de los mecanismos involucrados en el proceso neurodegenerativo asociados a esta enfermedad con el fin de diseñar tratamientos y desarrollar estrategias para retardar o detener la pérdida neuronal; (Anaya, 1997; Betarbet *et al.*, 2002; Hirsch, 2006; Potashkin *et al.*, 2011). Idealmente, un modelo de EP idiopática sería de naturaleza progresiva, que permitiera la caracterización de los cambios en el cerebro y la aparición de los síntomas de manera gradual. De acuerdo a este aspecto, los modelos actuales no son muy adecuados, ya que su naturaleza aguda, la aplicación de una sola o unas pocas inyecciones en un período corto y la aparición rápida o inmediata de los síntomas limita su utilidad. Por ello es necesaria la exploración de nuevas alternativas que nos permitan realizar evaluaciones en las diferentes etapas de evolución de la enfermedad. Como reportamos previamente (Ordoñez-Librado *et al.*, 2008), la inhalación de la mezcla de  $MnCl_2 - Mn(OAc)_3$  produce degeneración progresiva (5 meses) y bilateral de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en ratones expuestos por inhalación, por lo que de momento podemos decir es un modelo más apegado a lo que sucede en humanos, sin embargo, como mencionan Emborg en 2004 y Potashkin y colaboradores en 2011, un modelo adecuado de EP debe de reproducir la patofisiología de la enfermedad así como el deterioro conductual.

Para lograrlo inicialmente se realizaron diferentes pruebas la coordinación motora a los animales expuestos a la mezcla de  $MnCl_2 - Mn(OAc)_3$ , para posteriormente administrar L-DOPA y con ello evaluar si las deficiencias motoras presentadas por dichos animales pudieran deberse a la alteración de la vía dopaminérgica (Hughes *et al.*, 1992; Gelb *et al.*, 1999).

Como se observa en nuestros resultados (figura 1) los animales expuestos a la mezcla de Mn incrementaron el tiempo en la realización de la prueba de la viga conforme transcurria el número de inhalaciones. Datos similares fueron observados en modelos en los cuales hay disminución de DA; por ejemplo en ratones C57 BL6/J a los cuales se les administró MPTP, se observó alteraciones en la coordinación de las extremidades y disminución en la longitud de la zancada (Ogawa *et al.*, 1985; Fernagut *et al.*, 2002), además, la inyección de esta toxina al igual que un modelo transgénico de EP (Pitx3) propician el aumento del tiempo en el cual los animales cruzaban la viga (Hwang *et al.*, 2005), hechos que se relacionan con nuestros resultados, sin embargo las alteraciones motoras reportadas en ambos modelos son

contradictorias, en el modelo de MPTP en ratones se ha reportado recuperación espontánea mientras en el modelo transgénico hay pérdida de neuronas en el VTA (van den Munckhof *et al.*, 2003).

La prueba de “*reaching task*” ha sido ampliamente utilizada para evaluar la función de los ganglios basales (Whishaw *et al.*, 1991; 2007). Mediante esta prueba se examina tanto la habilidad para retirar pellets, así como la exactitud para hacerlo (Biernaskie *et al.*, 2004), la precisión de los movimientos de los miembros superiores tales como el alcance y la sujeción muestran componentes motores muy similares entre humanos y ratones, lo cual sugiere homología (Metz *et al.*, 2001; Whishaw *et al.*, 2002); por ello esta prueba es muy útil para conocer si el déficit motor en los modelos animales está relacionado a la depleción de DA (Whishaw *et al.*, 2007).

El análisis de los movimientos realizados por los roedores indica que la sujeción consiste en ajustes posturales, en donde el cuerpo del animal es soportado de manera diagonal por la extremidad posterior ipsilateral y la anterior opuesta a la que realizará el movimiento. Esta estrategia postural permite que el cuerpo se desplace hacia delante y hacia atrás y, al hacerlo, ayuda al avance de la extremidad y la sujeción del pellet. El movimiento de sujeción en sí, se compone de varios subcomponentes que incluyen dirigir la extremidad hacia el objetivo, sujetarlo, finalmente el movimiento culminaría con el retroceso del brazo hasta la presentación de la comida ante la boca e introducirlo a la misma (Metz *et al.*, 2001; Whishaw *et al.*, 2002; Biernaskie *et al.*, 2004; Whishaw *et al.*, 2007).

Como se describe en nuestros resultados (figura 2), los ratones expuestos a la mezcla de  $\text{MnCl}_2$  -  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  muestran alteración en la coordinación motora ya que cometen más errores al momento de tomar la comida en la caja de evaluación. Además se observó que los movimientos eran realizados de manera incorrecta. En los animales expuestos a Mn (figura 3, serie B) se observó que al proyectar al brazo la mano presenta los dígitos abiertos y ya no hay sujeción del alimento, en lugar de ello lo jalar al interior de la caja para posteriormente tomarlo del piso con la boca, estas alteraciones motoras indican daño en la función de los ganglios basales responsables de estos movimientos (MacLellan *et al.*, 2006), la pérdida de neuronas en la SNc, disminución de DA y sus metabolitos en los ganglios basales de nuestros animales corroboran esta aseveración; aunado a estos resultados, descartamos que el déficit motor mencionado pudieran estar relacionado a la alteración de los mecanismos sensoriales o

zonas de la corteza motora involucradas en esta actividad. De acuerdo a los datos obtenidos a través del conteo celular en el VTA y en la corteza motora primaria y corteza frontal se demuestra que no hubo cambios importantes en estos núcleos, por lo que suponemos están intactos ya que no se ve pérdida aparente de neuronas en esta área después de la exposición a Mn, aunado a ello los resultados de la prueba de la viga son sensibles a las alteraciones en la vía nigroestriatal (García-Hernández *et al.*, 1993).

Cabe resaltar que los resultados de la prueba de *Reaching task* concuerdan con lo descrito en pacientes con EP, quienes a menudo se les describe con destreza manual pobre que empeora a medida que progresa la enfermedad (Castiello *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 2000). Ellos experimentan dificultad para la ejecución de tareas que requieren movimientos secuenciales unilaterales o bilaterales de los brazos, o bien actividades que alternen el movimiento de las diferentes extremidades y los movimientos realizados por los segmentos corporales distales están más afectados que los movimientos realizados por los segmentos corporales proximales (Whishaw *et al.*, 2002).

Los datos conductuales observados en nuestros animales en ambas pruebas sugieren analogía con el déficit motor observado en humanos, puesto que varios estudios han reportado que tras la exposición prolongada a Mn, este metal se podría acumular en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Tomas-Camardiel, 2002; Vettori *et al.*, 1999), por lo que el resultado de la alteración en las concentraciones de DA está relacionado con los efectos del Mn sobre las funciones extrapiramidales motoras (Calabresi *et al.*, 1997) datos también observados en nuestros animales, en los cuales hubo disminución en el número de neuronas dopaminérgicas y disminución en la concentración de DA en los Ganglios Basales. Sin embargo, con el fin de corroborar esta teoría, en nuestro trabajo administramos L-DOPA a los animales expuestos a la mezcla de Mn posterior a las 40 inhalaciones. Como se muestra en los resultados, hay recuperación significativa en los animales expuestos posterior a la administración del fármaco, ya que registran menos tiempo en la viga y mayor número de aciertos en la prueba de *reaching task*, además se observa mejoría significativa en la ejecución de esta tarea ya que son capaces de realizar toda la serie de movimientos necesarios para la presentación del alimento hasta su boca (figura 3, serie C). La L-DOPA, se forma como uno de los pasos intermedios en la síntesis de DA por lo que se ha reportado que su administración oral provoca efectos benéficos sostenidos y dramáticos en pacientes con EP (Cotizas; 1967)

revertiendo los déficit motores de dicha enfermedad, a través de su conversión a DA (Jenner y Olanow, 1996).

### **Inmunocitoquímica anti TH**

Posterior a las evaluaciones conductuales, los animales fueron sacrificados y se realizó inmunocitoquímica anti TH con el fin de realizar el conteo de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Varios estudios han demostrado que el Mn se acumula en los ganglios basales, particularmente en el GP, el NE y la SNc en donde causa neurodegeneración; la exposición crónica a Mn puede inducir parkinsonismo similar a la EP (Vezér *et al.*, 2005). Los pacientes con esta enfermedad presentan rigidez, temblor, acinesia y alteraciones de la postura, estos signos, son el reflejo de la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Otero-Siliceo *et al.*, 1996). En esta enfermedad hay un umbral, en donde los síntomas motores aparecen cuando la depleción de DA en el estriado es de alrededor del 80 % y cuando aproximadamente el 60 % de las neuronas dopaminérgicas de la SNc se han perdido (Dauer y Przedborski, 2003; Sherer *et al.*, 2003). Esto concuerda con nuestros resultados, los cuales muestran que a las 40 inhalaciones de  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$  hay disminución del 63 % en el número de neuronas TH positivas de las SNc y disminución en los contenidos de DA en los núcleos estudiados, lo cual podría explicar las alteraciones motoras observadas en las evaluaciones conductuales.

Al respecto de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas se han propuesto varias teorías acerca de cómo el Mn puede provocar daño a estas células. Se ha establecido que el Mn tiene acceso a las neuronas dopaminérgicas a través del sistema de recaptura de alta afinidad para DA (DAT) (Calne *et al.*, 1994; Nagatomo *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 1992; 2005a) e intracelularmente se acumula dentro de la mitocondria vía el canal uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gavin *et al.*, 1990; Gunter *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004), en donde puede inhibir al complejo I propiciando la formación de radicales libres, principalmente  $\text{O}_2^-$  (Erikson *et al.*, 2004) y aunque el  $\text{Mn}^{+2}$  mostró habilidad aparente para promover la formación de EROs dentro de la fracción sinaptosomal de las mitocondrias corticales, su actividad pro-oxidante fue bloqueada en la presencia de un quelador de metales trivalentes. Por lo que se ha propuesto que, aun cuando el  $\text{Mn}^{+2}$  no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de  $\text{Mn}^{+3}$  en cantidades traza es suficiente para promover ciclos redox tipo Fenton con  $\text{Mn}^{+2}$  o  $\text{Fe}^{+2}$  (HaMai y Bondi, 2004b), de esta manera se ha sugerido que el  $\text{Mn}^{+3}$  es la forma activa

en los mamíferos (Ali *et al.*, 1995), y que además es requerido en cantidades traza para la aparente actividad pro-oxidante asociada con la actividad del  $Mn^{+2}$ , indicando que el  $Mn^{+3}$  podría tener un efecto catalítico sobre la oxidación del  $Mn^{+2}$  (HaMai *et al.*, 2001) produciendo un ciclo de oxidación del Mn, en donde el  $Mn^{+3}$  provoca el evento inicial, y el  $Mn^{+2}$  más el  $O_2^-$  amplifican este efecto mediante la producción de EROs, lo cual llevaría a las neuronas a un estado de estrés oxidativo, con las subsiguiente muerte neuronal (Dauer y Przedborski, 2003; Malecki, 2001).

En nuestro estudio encontramos que a diferencia de la degeneración mostrada en la SNc, las neuronas del VTA no se vieron afectadas mostrándose la especificidad del Mn por las neuronas de la SNc. Se ha propuesto que uno de los mecanismos que influyen la susceptibilidad específica de las neuronas dopaminérgicas a varias sustancias es la recaptura de DA por el DAT, ya que varias moléculas tienen acceso a estas neuronas por medio de este transportador (Thoenen y Tranzre, 1973; Haber *et al.*, 2009; Ingersoll *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 2001; Dauer y Przedborski, 2003; Erikson *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2007), entre ellas, el Mn, ya que se ha sugerido que su concentración en la SNc depende de su captura a través del DAT (Calne *et al.*, 1994; Nagatomo *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 1992; Ingersoll *et al.*, 1999; Erikson *et al.*, 2005a).

En contraste con este hecho, las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas en el VTA, cuyos cuerpos neuronales son adyacentes a la SNc, son mucho menos afectadas en la EP (Uhl *et al.*, 1985) ya que se ha propuesto que corteza prefrontal, el sitio primario de proyección para estas neuronas, la recaptura y catabolismo de la DA al parecer depende más de otros transportadores monoaminérgicos y enzimas como la catecol-O-metiltransferasa (COMT) que del DAT, mientras que en el NE el mecanismo de “limpieza” de DA del espacio sináptico parece depender principalmente de este transportador (Mundorf, *et al.*, 2001). Estas diferencias son importantes para entender la resistencia relativa de las neuronas dopaminérgicas del VTA a la neurodegeneración en comparación con las neuronas de la SNc (Dauer y Przedborski, 2003).

## **Inmunocitoquímica anti Neu N**

Una de las características de los modelos animales para el estudio de cualquier enfermedad debe ser la similitud con la patología que se pretende estudiar (Emborg, 2004; Potashkin *et al.*, 2011); en el caso concreto de la EP hay deterioro específico tanto de la función como de la anatomía de la SNc y el NE. Es por ello de suma importancia, en términos de validar nuestro modelo, determinar si la mezcla de Mn afecta otras estructuras cerebrales. Para ello se realizó inmunohistoquímica para NeuN, una proteína nuclear específica de las neuronas (Mullen *et al.*, 1992), en diferentes estructuras cerebrales que incluyeron al NE, GP, Corteza motora primaria, Corteza frontal, áreas CA1 y CA3 hipocámpales y corteza cerebelosa.

De acuerdo al conteo realizado en las diferentes áreas cerebrales no encontramos pérdida neuronal excepto en el NE (19 %) y en el GP (17 %). Aunque la mayoría de los estudios reportan la degeneración específica de las neuronas dopaminérgicas, algunos autores también han encontrado pérdida de neuronas en el NE de pacientes con EP (Kish *et al.*, 1988; Machado-Salas *et al.*, 1990; O'Brien *et al.*, 1990; Colín-Barenque, 1994; 2000). Machado-Salas y colaboradores (1990) reportan cambios en la ultraestructura del NE de pacientes parkinsonianos, encontraron principalmente degeneración axonal, dendritas hiperdensas y degeneración neuronal dentro de este núcleo. Datos similares fueron reportados por Colín-Barenque (2000) quien analizó cerebros de personas con enfermedad de Parkinson y observó muerte celular dentro de este núcleo. Por su parte O'Brien y colaboradores (1990) reportan los resultados de un paciente parkinsoniano que presentaba degeneración estriatal; la resonancia magnética y los estudios neuropatológicos revelaron atrofia putaminal.

El mecanismo implicado en la degeneración neuronal en los pacientes con EP dentro del NE y el GP aún no es claro, pero podría estar implicado un proceso excitotóxico, ya que como es sabido, ambos núcleos reciben gran cantidad de aferencias glutamatérgicas, por ejemplo el NE recibe glutamato proveniente de todas las áreas de la corteza, con excepción de la corteza visual y auditiva primaria (Tisch *et al.*, 2004; Nambu, 2008; Bolam *et al.*, 2009), estas aferencias son derivadas de neuronas piramidales que inervan principalmente el estriado ipsilateral y en menor medida el estriado contralateral (Lei *et al.*, 2004; Bolam *et al.*, 2009), mientras que el GP recibe aferencias del NST (Wichmann y DeLong, 1996; Magill *et al.*, 2001; Tisch *et al.*, 2004).

De manera similar, se ha sugerido que un mecanismo excitotóxico juega un papel crucial en la neurotoxicidad inducida por Mn, ya que el  $Mn^{+2}$  puede sustituir al  $Ca^{2+}$  en el proceso excitotóxico o inducir la liberación de  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares (Takeda *et al.*, 2002).

### **Pérdida de espinas dendríticas (Impregnación de Golgi)**

Además de todas las funciones realizadas por la DA en el NE, este neurotransmisor también juega un papel muy importante mediando la plasticidad sináptica a largo plazo dentro de este núcleo (Smith *et al.*, 2009), por lo que la degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal en la EP no sólo afecta directamente la actividad de las neuronas espinosas medianas, sino que también dispara una serie de cambios secundarios en la morfología sináptica y función en el NE (Calabresi *et al.*, 2007; Raju *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009; Villalba *et al.*, 2009). Al respecto se sabe que la transmisión dopaminérgica regula la morfogénesis de las neuronas espinosas medianas estriatales (Deutch *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009). Por ejemplo, en modelos murinos de la EP, la pérdida de DA estriatal está asociada con la reducción de la densidad de espinas dendríticas en estas neuronas (Ingham *et al.*, 1989; 1998). Además, algunos autores utilizando la técnica de Golgi, reportan que personas quienes padecieron EP presentan reducción de entre el 20 % y 30 % en la densidad de espinas dendríticas en el NE además de reducción en el tamaño del árbol dendrítico de estas mismas neuronas (Zaja-Milatovic *et al.*, 2005), de igual forma, primates no humanos tratados con MPTP muestran pérdida de estas estructuras del 50 % cuando la depleción de DA es severa (Villalba *et al.*, 2009). Datos similares fueron obtenidos en nuestro trabajo, ya que tras la exposición a la mezcla de Mn observamos pérdida tanto de las espinas dendríticas (52 %) y del contenido de DA en el NE y la SNc. Los datos obtenidos a través del análisis ultraestructural apoyan esta teoría, ya que observamos pérdida de contactos axoespinosos, principalmente los establecidos con el cuello de la espina y aumento de contactos axodendríticos.

### **Análisis Ultraestructural**

En nuestros resultados se observan cambios ultraestructurales en el NE de los ratones expuestos a  $MnCl_2$  y  $Mn(OAc)_3$ , en donde el neuropilo mostró vacuolas y axones con mielina desorganizada, el aparato de Golgi de las células estriatales presentaba edema, lo cual se

observa como dilatación de las cisternas, así como la presencia de cuerpos multivesiculares y cúmulos de lipofucsina, además de células necróticas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Colín-Barenque (2000) quien analizó cerebros de personas con EP y observó que las neuronas estriatales de estos pacientes mostraban núcleos distorsionados, axones degenerados, cisternas dilatadas de retículo endoplásmico, vacuolas y gránulos de lipofucsina. Otros autores han reportado la presencia de cuerpos multivesiculares, mitocondrias hinchadas y células oscuras (Jedrzejewska *et al.*, 1990), cambios en los tipos de contactos sinápticos (Forno y Norville, 1979; Ingham *et al.*, 1993; Avila-Costa *et al.*, 1998; 2008) además de la proliferación astrocítica, degeneración axónica y neuritas densas (Forno y Norville, 1979; Machado-Salas *et al.*, 1990).

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

También observamos cambios en el sitio del contacto sináptico, en donde hay mayor cantidad de contactos con la cabeza de la espina con respecto a los contactos con el cuello de las espinas dendríticas. En el NE, la mayoría de las sinapsis excitatorias se establecen con la cabeza de las espinas dendríticas, las cuales son largas con especialización de membrana asimétrica. Las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas reciben también una segunda entrada sináptica, la cual, usualmente es pequeña con especialización de membrana simétrica; se ha propuesto que este tipo de sinapsis es dopaminérgica (Freund *et al.*, 1984; Groves *et al.*, 1994; Ingham *et al.*, 1998), además, se ha demostrado que terminales sinápticas inmunoreactivas para TH establecen contactos simétricos con el cuello de las espinas dendríticas en el NE de ratas (Linder *et al.*, 1995). Ingham y cols. (1998) reportaron que la lesión de la vía dopaminérgica nigroestriatal con 6-OHDA produce la disminución de las sinapsis simétricas de las espinas dendríticas en el NE de ratas lesionadas. En nuestro modelo observamos la disminución del 63 % en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc,

además de la disminución de las sinapsis con el cuello de las espinas dendríticas, por lo cual podríamos inferir que los contactos sinápticos que se perdieron corresponden a la innervación dopaminérgica de la SNc al NE.

Respecto al aumento en el número de sinapsis perforadas se ha sugerido que ocurre un incremento en la proporción de sinapsis perforadas con respecto a las no perforadas en el putamen de pacientes con EP, en el modelo con 6-OHDA y después del bloqueo de los receptores dopaminérgicos con haloperidol (Meshul y Tan, 1994; Anglade *et al.*, 1996; Avila-Costa *et al.*, 2005). También se ha reportado que en pacientes con EP hay incremento significativo en la longitud de la densidad posináptica y número de sinapsis perforadas del 24 y 88 % respectivamente, datos que sugieren hiperactividad de las aferencias corticales sobre las neuronas GABAérgicas estriatales (Anglade *et al.*, 1996). Además, en roedores, varios estudios han reportado cambios morfológicos en el NE de ratas con depleción de DA, los cuales sugieren un posible incremento en la transmisión sináptica glutamatérgica (Smith *et al.*, 2009) y este incremento obedece al aumento de las sinapsis perforadas (Avila-Costa *et al.*, 2005; Harris y Kater, 1994; Meshul *et al.*, 1999; 2000).

Existen evidencias acerca de que las sinapsis perforadas incrementan la eficiencia de la transmisión y han sido implicadas en la remodelación sináptica en el hipocampo donde su número aumenta con el LTP (long-term potentiation) incrementando el área del contacto sináptico (Lisman y Harris, 1993; Harris y Kater, 1994). Sin embargo, la pérdida de las sinapsis dopaminérgicas acompañado del aumento de las sinapsis perforadas podría tener consecuencias funcionales importantes, las cuales participan en el desarrollo de la EP (Avila-Costa *et al.*, 2008). Si tomamos en cuenta que hay sobreactividad de la vía corticoestriatal posterior a la denervación dopaminérgica (Greenamyre y O'Brien, 1991) ya que los receptores D<sub>2</sub> localizados en las terminales de las neuronas corticales regulan la liberación de glutamato, por lo tanto, la depleción de DA en este núcleo, propiciaría la liberación excesiva de glutamato de las neuronas de la corteza cerebral (Calabresi *et al.*, 2001), aunado al aumento en la cantidad de receptores glutamatérgicos como resultado en el incremento del área de contacto, indicado por las sinapsis perforadas, las cuales corresponden a sinapsis glutamatérgicas, cuya estimulación lleva al incremento en el contenido de Ca<sup>2+</sup> intraneuronal, provocando muerte de las neuronas estriatales por excitotoxicidad (Lisman y Harris, 1993; Harris y Kater, 1994). Además, se ha reportado que el Mn se acumula en los astrocitos, los cuales son esenciales para neutralizar la acción del glutamato liberado por las sinapsis

glutamatérgicas (Normandin y Hasell, 2002); se ha demostrado que la captura de glutamato es atenuada significativamente en cultivos primarios de astrocitos posterior a la adición de Mn en el medio de cultivo. Por lo que se ha sugerido que el Mn afecta a los genes de los transportadores de glutamato (por ejemplo el GLAST) posiblemente a través de la generación de EROs (Erikson *et al.*, 2002; Erikson y Aschner, 2003). De esta manera, estos eventos propician la degeneración neuronal, disparada por la estimulación excesiva, producto del aumento de glutamato en el espacio sináptico, así como de su receptor (Mehta y Dawson, 2001). La excesiva estimulación, principalmente de los receptores glutamatérgicos NMDA, desencadenan una serie de eventos que incrementan la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Saransaari y Oja, 2000).

Por otra parte, además de analizar al NE, realizamos el análisis ultraestructural de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En 1983 Domesick y cols. realizaron una descripción ultraestructural de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, ellos muestran que estas neuronas se caracterizan por tener una gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso bien organizado en pilas y membrana nuclear aparentemente lisa (sin invaginaciones), similar a lo que encontramos en los animales control; por otro lado, observamos alteraciones nucleares en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de los animales expuestos a Mn las cuales se hacen muy evidentes al compararlos con los animales control. Dichos cambios podrían ser explicados por la interacción de este metal con algunas proteínas encargadas de la organización del citoesqueleto. Evidencias farmacológicas y bioquímicas indican que el Mn inactiva la RhoA, la cual es una GTPasa que funciona como molécula “switch”, quien hace converger señales intra y extracelulares para la reorganización del citoesqueleto. De esta manera la disrupción de la arquitectura del citoesqueleto por el Mn indica el decremento de la actividad de RhoA (Chun-Jung *et al.*, 2005)

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

DA, y por lo tanto elevada actividad de las neuronas dopaminérgicas remanentes (sensibilización) lo cual requiere de mayor generación de energía (Seeman y Niznik, 1990).

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

Por todo lo anterior, cabe la posibilidad de que mecanismos provocados por el Mn como la generación de EROs, depleción de ATP o bien por el aumento de glutamato en el NE pueden llevar a la muerte de las neuronas del NE y las de la SNc como se observa en el análisis ultraestructural.

### **Concentraciones de DA, DOPAC y HVA**

La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por la pérdida selectiva de neuronas en la SNc y la reducción significativa del contenido de DA neostriatal y sus principales metabolitos, el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA) (Serra *et al.*, 2000).

En nuestros resultados observamos pérdida significativa de DA y sus metabolitos en los tres núcleos evaluados de los animales expuestos a Mn en comparación con los animales del grupo control. Estas observaciones demuestran que el sistema dopaminérgico es un blanco

importante para la toxicidad del Mn. De acuerdo a lo anterior se ha reportado que en personas expuestas a Mn, la concentración de DA estriatal se redujo notablemente (Bernheimer *et al.*, 1973). Por su parte, modelos para el estudio de la EP, dentro de sus características neuropatológicas incluyen reducción de DA estriatal y sus metabolitos (Tillerson *et al.*, 2002).

Numerosos estudios realizados en roedores y primates no humanos han demostrado que el agotamiento de la DA estriatal y la pérdida de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales se producen tras la exposición a dosis altas de Mn (Komura y Sakamoto, 1991; Bonilla, 1984). Por ejemplo, Vidal y colaboradores (2005) observaron que tras la administración intraestriatal de 2 mM de MnCl<sub>2</sub> a ratas conscientes y libremente móviles, hubo disminución significativa en los niveles extracelulares de DA; por su parte Erikson y colaboradores (1987, 1992) mostraron reducción de la concentración estriatal y palidal de DA y DOPAC, pero no la concentraciones de HVA en monos expuestos a óxido de manganeso por vía subcutánea. Shannon y colaboradores (2007) utilizando cortes de cerebro de 350 micras que incluían NE expuestos a MnCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub> y MnPO<sub>4</sub>, reportan que la exposición a Mn no afectó la viabilidad del tejido, y que los niveles de DA y su metabolito DOPAC se redujeron significativamente. Contrariamente a los efectos significativos de Mn en la DA y DOPAC, los niveles de HVA no se vieron afectados.

De esta forma, varios estudios han señalado que el Mn disminuye los niveles de DA estriatal y se han sugerido diferentes mecanismos de acción, los cuales incluyen la desregulación de la homeostasis del Ca<sup>+</sup>, inhibición de la TH en las neuronas dopaminérgicas (Vidal *et al.*, 2005) y algunos estudios han propuesto que la disminución de la DA se da por la autooxidación causada por el Mn (Archivald y Tyree, 1987; Donaldson, 1987; HaMai y Bondy, 2004b). De esta manera los mecanismos exactos de la neurotoxicidad de Mn son muy complejos y aún no se comprenden en su totalidad (Tran *et al.*, 2002).

## Conclusión

Los resultados observados en nuestro modelo simulan algunas de las alteraciones conductuales, morfológicas y neuroquímicas reportadas en los pacientes con EP, entre ellas podemos mencionar:

- Alteraciones en la actividad motora de los animales expuestos a  $\text{MnCl}_2 - \text{Mn}(\text{OAc})_3$  las cuales son revertidas tras la administración de L-DOPA, por lo que consideramos que se deben a la pérdida de DA.
- Pérdida del 67.58 % de las neuronas dopaminérgicas de la SNc.
- Pérdida celular en el Estriado y Globo Pálido, no así en los otros núcleos evaluados.
- Ultraestructuralmente observamos alteraciones del neuropilo, disminución de los contactos sinápticos axoespinosos, aumento de las sinapsis perforadas en el estriado, alteraciones nucleares, necrosis y apoptosis en la SNc y en menor medida en el estriado. En el GP no observamos alteraciones.
- Se encontró disminución significativa de la dopamina y sus metabolitos en la SNc, el estriado y el Globo Pálido tras la inhalación de  $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ .

Por lo cual concluimos que la inhalación de la mezcla Mn es un modelo adecuado para el estudio de la EP, que es sensible, reproducible y de fácil aplicación, con el cual pretendemos brindar una herramienta para el estudio de este padecimiento así como la evaluación de nuevas terapias.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anaya M.V (1997) Estudio morfofuncional comparativo entre los trasplantes de la médula adrenal colocados en el ventrículo lateral o en el parénquima estriatal. Tesis para obtener el título de Maestra en Neurociencias. ENEP Iztacala UNAM.
- Anderson JG, Cooney PT, Erikson KM. (2007) Inhibition of DAT function attenuates manganese accumulation in the globus pallidus. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23:179-184.
- Anglade P., Mouatt-Prigent A., Agid Y., Hirsch E.C. (1996) Synaptic Plasticity in the Caudate Nucleus of Patients with Parkinson's Disease. *Neurodegeneration* 5(2): 121-128.
- Anglade P.S., Tsuji F., Javoy-Agid y Hirsch E.C. (1995) Plasticity of a nerve aferent to nigrostriatal neurons in Parkinson´s disease. *Annals of Neurology* 37: 265-272.
- Aposhian H.V., Ingersoll R.T. y Montgomery E.B. (1999) Transport and control of manganese ions in central nervous system. *Environmental Research section A* 80: 96-98.
- Archivald F.S. y Tyree C. (1987) Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256(2): 638-650.
- Aschner M, GuilarteTR, Schneider JS, Zheng W. (2007) Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity *Toxicology and Applied Pharmacology* 221:131-147.
- Aschner M., Erikson K.M. y Dorman D.C. (2005) Manganese dosimetry: species differences and implication for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 35: 1-32.
- Aschner M. y Gannon M. (1994) Manganese (Mn) transport across the rat blood–brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Research Bulletin* 33: 345–349.
- Avila-Costa M.R., Gutierrez-Valdez A.L., Ordoñez-Librado J.L., Anaya-Martínez V., Colín- Barenque L., Vázquez M.C.S., Reynoso-Eraza L. The presence of perforated synapses in the striatum after dopamine depletion. is this a sign of negative brain pasticity? En: Kaiser T.F. y Peters F.J. *Synaptic Plasticity: New Research*. Nova Publiser, New York U.S.A. (2008): 113-142.
- Avila-Costa M.R., Colín-Barenque L., Aley-Medina P., Gutiérrez V.A.L., Ordoñez L.J.L., Flores M.E., Fortoul T.I. (2005) Bilateral Increase of Perforated Synapses after Unilateral Dopamine Depletion. *International Journal of Neuroscience*. 115(1):79-86.
- Avila-Costa R.M., Colín-Barenque L., Espinosa V.J. y Machado S.J. (1998). Degeneración del neurópilo del núcleo caudado en la enfermedad de Parkinson y en el modelo experimental provocado con 6-OHDA: Análisis ultraestructural comparativo. *Patología México* 36:297-301.
- Avila-Costa M.R. (1996). Evolución de las alteraciones ultraestructurales del neurópilo del núcleo caudado de rata después de la lesión unilateral de la vía nigroestriatal con 6-Hidroxidopamina. Tesis de Maestría. ENEP-I. UNAM. Mex. D.F.
- Barbeau (1981) High-level levodopa therapy in severely akinetic parkinsonian patients twelve years later. En: *Parkinson´s disease: current progress, problems and management*. Rinne, V.K; Klinger, M;Stamm, G. (eds.) Elsevier, Amsterdam.229-239.
- Barcia C., Sanchez- Bahillo A., Fernandez- Villanva E., Bautista V., Poza Y., Poza M., Fernandez-Barreiro A., Hirsch E.C., Herrero M.T. (2004) Evidence of active microglia in sustantia nigra pars compacta in parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia* 46: 402-429.
- Benedetto A., Au C., Aschner M. (2009) Manganese-Induced Dopaminergic Neurodegeneration: Insights into Mechanisms and Genetics Shared with Parkinson´s Disease. *Chem. Rev.* 109: 4862–4884.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of Neurological Sciences* 20: 415-455.
- Betarbet R., Sherer T.B., Greenamyre J.T. (2002) Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 24(4): 308-18.
- Betarbet R., Porter R.H., Greenamyre J.T. (2000) GluR1 glutamate receptor subunit is regulated differentially in the primate basal ganglia following nigrostriatal dopamine denervation. *J Neurochem*. 74:1166–1174.
- Biernaskie J., Chernenko G., Corbett D. (2004) Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci* 24:1245–1254.
- Blum D.S. Torch N., Lambeng M., Nissou A.L., Benabid R., Sadoul y Verna J.M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson´s disease. *Progress in Neurobiology*. 65: 135-172.
- Bolam J P, M T C Brown, J Moss, and P J Magill, (2009) Basal Ganglia: Internal Organization *Encyclopedia of Neuroscience* 2: 97-104.
- Bonilla E. (1984) Chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats. *Experimental Neurology* 84: 696-700.
- Bové J., Prou D., Perier C., Przedborski (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *The Journal of American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2: 484-494.

- Calabresi P., Picconi B., Tozzi A., Di Filippo M. (2007) Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends Neurosciences*. 30:211–219.
- Calabresi P., Ammassari M., Gubellini P., Sancesario G., Morello M., Centonze D., Marfia G., Saulle E., Passino E., Picconi B. y Bernardi G. (2001) A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication. *Neurobiology of Disease* 8: 419–432.
- Calabresi P., De Murtas M. y Bernardi G. (1997) The neostriatum beyond the motor function: experimental and clinical evidence. *Neuroscience* 78: 39-60.
- Calne D.B., Chu N.S., Huang C.C. Lu C.S. y Olanow W. (1994) Manganism and idiopathic parkinsonism: Similarities and differences. *Neurology* 44(9): 1583-1586.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180:1200.
- Castiello U, Bennett K, Bonfiglioli C, Lim S, Peppard RF (1999) The reach-to-grasp movement in Parkinson's disease: response to a simultaneous perturbation of object position and object size. *Exp Brain Res* 125:453–462.
- Chin-Chang H., Yi-Hsin W., Chin-Song L., Nai-Shin C. y Tzu-Chen Y. (2003) Dopamine transporter binding in chronic manganese intoxication. *Journal of Neurology* 250: 1335-1339.
- Chun H.S., Lee H., Son J.H. (2001) Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. *Neuroscience Letters* 316:5-8.
- Chun-Jung C., Su-Lan L., Yong-San H. y An-Na C. (2005) RhoA inactivation is crucial to manganese-induced astrocytes stellation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326: 873-879.
- Colín-Barenque L., Avila-Costa M.R., Espinosa-Villanueva J., Machado-Salas J. (2000) Análisis Ultraestructural Comparativo en Pacientes con Enfermedad de Parkinson y Ratas Viejas. *Archivos de Neurociencias* 5(4):168-173.
- Colín-Barenque (1994) Estudio morfológico del núcleo caudado del ser humano normal y con enfermedad de Parkinson. Tesis de Maestría en Neurociencias. ENEP Iztacala UNAM.
- Critchfield J.W. y Keen C.L. (1992) Manganese +2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma. *Metabolism* 41(10): 1087-1092.
- Dauer W. y Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.
- Day B.J., Patel M., Calavetta L., Chang L.Y. y Stamier J.S. (1999) A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12760-12765.
- Deumens R., Blokland A. y Prickerts J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesion of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology* 175: 303-317.
- Deutch A.Y., Colbran R.J., Winder D.J. (2007) Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling in Parkinsonism. *Parkinsonism Related Disorders*. 13(3): S251–S258.
- Domesick V.B., Stinus L. y Paskevich (1983) The cytology of dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat: Light and electron-microscopic study. *Neuroscience* 8(4): 743-765.
- Donaldson J. (1987) The physiopathologic significance of manganese in brain: its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicology* 8(3):451-462.
- Emborg M.E. (2004) Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *Journal of Neuroscience Methods* 139:121-143.
- Erikson KM, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. (2005a) Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19:415-421.
- Erikson K.M., John C.E., Jones S.R. y Aschner M. (2005b) Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter. *Experimental Toxicology and Pharmacology* 20: 390-394.
- Erikson K.M., Dobson A., Dorman D., Aschner M. (2004) Manganese exposure and induced oxidative stress in the rat brain. *Science of the Total Environment*. 334(335): 409-416.
- Erikson K.M. y Aschner M. (2003) Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International* 43: 475-480.
- Erikson K.M., Tedroff J., Thuomas K.A., Aquilonius S.M., Hartvig P., Fasth K.J. Bjurling P., Langstrom B., Hedstrom K.G. y Heibronn E. (1992) Manganese induced brain lesion in *Macaca fascicularis* as revealed by positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *Archives of Toxicology* 66(6): 403-407.
- Erikson H., Mägiste K., Plantin L.O., Fonnum F., Hedström K.G., Theodorsson-Norheim E., Kristensson K., Ståhlberg E., Heibronn E. (1987) Effects of manganese oxide on monkeys as revealed by a combined neurochemical, histological and neurophysiological evaluation. *Archives of Toxicology*. 61(1): 46–52.

- Fernagut P.O., Diguët E., Labattu B., Tison F., (2002) A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. *Journal of Neuroscience Methods*. 113(2): 123–130.
- Finkelstein Y., Milatovic D., Aschner M. (2007) Modulation of cholinergic systems by manganese *NeuroToxicology*. 28: 10.03–1014.
- Fornaguera J., Schwarting R.K.W., Boix F. y Huston J.P. (1993) Behavioral indices of moderate nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesion: A preclinical Parkinson's model. *Synapse* 143: 179-185.
- Forno L.S. y Norville R.L. (1979) Ultrastructure of the neurostriatum in Huntington's and Parkinson's disease. *Advances in Neurology* 23: 123-135.
- Frame M.D. y Milanick M.A. (1991) Mn and Cd transport by the Na–Ca exchanger of ferret red blood cell, *American Journal of Physiology* 261: 467–475.
- Freund T.F., Powell J.F. y Smith A.D. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13: 1189 –1215.
- García-Hernández F., Pacheco-Cano M.T., Drucker-Colín R. (1993) Reduction of motor impairment by adrenal medulla transplants in aged rats. *Physiology and Behavior*. 54:589–598.
- García-Martínez J.C. (2003) La enfermedad de Parkinson vista por un afectado. *Revista de Neurología* 7(4): 391-400.
- Gavin C.E., Gunter K.K. y Gunter T.E. (1990) Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *The Biochemical Journal*. 266: 329–334.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of Neurology*. 56(1):33-9.
- Gibb W.R.G. y Less A.J. (1991) Anatomy, pigmentation ventral and dorsal suboculations of the substantia nigra and differential cell death in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 54: 388-396.
- Gilmans-Winans N.S. (1994). Principios de neuroanatomía y neurofisiología clínica de Monter y Gats. El manual moderno S.A. de C.V. (3 ed). México D.F. 183-192.
- Góngora Alfaro J.L., Moo-Puc R.E., Villanueva-Toledo J., Arankowsky-Sandoval G., Álvarez-Cervera F.J., Pineda- Cortés J.C., Heredia-López F.J. y Bata-García (2005) La cafeína y los antagonistas de los receptores A2a de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Revista Biomédica* 16: 99-111.
- Gossel M., Schmidt W.J., Loscher W., Zajaczkowski W., Danysz W. (1995) Effect of coadministration of glutamate receptor antagonists and dopaminergic agonists on locomotion in monoamine-depleted rats. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*; 10:27-39.
- Greenamyre y O'Brien (1991) N-Methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Archives of Neurology* 48:977-981.
- Groves P.M., Linder J.C., Young S.J. (1994) 5-hydroxydopamine-labeled dopaminergic axons: three-dimensional reconstructions of axons, synapses and postsynaptic targets in rat neostriatum. *Neuroscience* 58: 593– 604.
- Guilarte T.R. (2010) Manganese and Parkinson's Disease: A Critical Review and New Findings. *Environmental Health Perspectives*. 118 (8): 1071-1080.
- Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L. y Hediger M.A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian protein-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388: 482–488.
- Gunter T., Miller L., Gavin C., Eliseev R., Salter J., Buntinas L., Alexandrov A., Hammond S., Gunter K. (2004) Determination of the oxidation states of manganese in brain, liver, and heart mitochondria. *Journal of Neurochemistry* 88: 266–280.
- HaMai D. y Bondy S.C. (2004a) Pro or anti-oxidant manganese: a suggested mechanism for reconciliation. *Neurochemistry International* 44:223-229.
- HaMai D. y Bondy S.C. (2004b) Oxidative basis of Manganese Neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci* 1012:129-141.
- HaMai D., Campbell A. y Bondy S.C. (2001) Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 763-768.
- Harris K.M. y Kater S.B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Ann Rev Neurosci.*; 17:341–371.
- Harte J., Holden C., Schneider R., Shirey C. (1991) *Toxics A to Z. A guide to everyday pollution hazards*. University of California Press.
- Hartmann A., Hirsch E.C. (2001) Parkinson's disease. The apoptosis hypothesis revisited. *Adv. Neurol.* 86: 143- 153.
- Hirata Y., Adachi K. y Kiuchi K. (1998) Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 71: 1607-1615.
- Hirsch E.C. (2006) How to judge animal models of Parkinson's disease in terms of neuroprotection. *Journal of Neural Transmission* 70: 255-260.
- Hoglinger G.U., Feger J., Annick P., Michel P.P., Karine P., Champy P., Ruberg M., Wolfgang W.O. y Hirsch E. (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces hypokinetic multisystem degeneration in rats. *Journal of Neurochemistry* 84: 1-12.

- Hököfelt T. y Ungerstedt U. (1969). Electron and fluorescence microscopical studies on the nucleus caudatus putamen of the rat after unilateral lesions of ascending nigrostriatal dopamine neurons. *Acta Physiologica Scandinavica* 76: 415-426.
- Hornykiewicz O. (2006) The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *Journal of Neural Transmission (suppl)*: 9–15.
- Hornykiewicz O. (1993) Parkinson's disease and the adaptive capacity of the nigrostriatal dopamine system: Possible neurochemical mechanisms. *Advances in neurology*.60: 140-147.
- Hornykiewicz O. (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* 18: 925-964.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 55(3):181-4.
- Hwang D.Y., Fleming S.M., Ardayfio P., Moran-Gates T., Kim H., Tarazi F.I., Chesselet M.F., Kim K.S. (2005) 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *Journal of Neurosciences*. 25(8):2132-7.
- Ingersoll R.T., Montgomery Jr. y Aposhian H.V. (1999) Central nervous system toxicity of manganese II. Cocaine or reserpine inhibit manganese concentration in the rat brain. *Neurotoxicology* 20: 467-476.
- Ingham C.A., Hood S.H., Taggart P. y Arbuthnott G.W. (1998) Plasticity of Synapses in the Rat Neostriatum after Unilateral Lesion of the Nigrostriatal Dopaminergic Pathway. *Journal of Neuroscience* 18(12): 4732–4743.
- Ingham C.A., Hood S.H., Van Maldegem B., Weeninck A., Arbuthnott G.W. (1993) Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Experimental Brain Research* 93: 17-27.
- Ingham C.A., Hood S.H., Arbuthnott G.W. (1989) Spine density on neostriatal neurones changes with 6-hydroxydopamine lesions and with age. *Brain Research*. 503: 334–338.
- Jackson S.R., Jackson G.M., Hindle J.V. (2000) The control of bimanual reach-to-grasp movements in hemiparkinsonian patients. *Experimental Brain Research*. 132: 390–398.
- Jankovic J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal Neurol Neurosurgery and Psychiatry*. 79:368–376.
- Jedrzejska A., Wierzbica-Bobrowicz T., Olejniczak P., Poszwinska Z. y Dymecki J. (1990). Ultrastructure and immunocytochemistry of left and right nigrostriatal system after lesion of right side of substantia nigra of rat. *Advances in Neurology* 53: 41-49.
- Jenner P. y Olanow C.W. (1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47: 161-170.
- Kish S.J., Shannak K., Hornykiewicz O. (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *New England Journal of Medicine* 318(14):876-80.
- Komura J. y Sakamoto M. (1991) Short-term oral administration of several manganese compounds in mice: physiological and behavioral alterations caused by different forms of manganese. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 46(6): 921-928.
- Lees A.J., Hardy J., Revesz T. (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373:2055–2066.
- Lei W., Jiao Y., Del Mar N., Reiner A. (2004) Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *The Journal of Neuroscience* 24(38): 8289-8299.
- Linder J.C., Young S.J. y Groves P.M. (1995) Electron microscopic evidence for neurotoxicity in the basal ganglia. *Neurochemistry International* 26(2): 195-202.
- Lisman J.E. y Harris K.M. (1993) Quantal analysis and synaptic anatomy: Integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neuroscience* 16: 141–147.
- López-Pousa S., Garre-Olmo A., Turon-Estrada E., Gelada-Battle E., Lozano-Gallego M., Hernández-Ferrándiz M., Morante-Muñoz V., Peralta-Rodríguez V., Cruz-Reina M.M. (2003) Incidencia clínica de la demencia por los cuerpos de Lewy. *Revista de Neurología* 36(8): 715-720.
- Lotharius J., Dugan L.L., O'Malley K.L. (1999) Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience* 19: 1284 –1293.
- Machado-Salas J., Ibarra O., Martinez Fong D., Cornejo A., Aceves J. and Kuri J. (1990) Degenerative ultrastructural changes observed in the neuropil of caudate nuclei from Parkinson's disease patients. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*. 54(55):297-305.
- MacLellan C.L., Gyawali S., Colbourne F. (2006) Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behavioral Brain Research*. 175:82–89.
- Magill P.J., Bolam J.P. Bevan M.D. (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience* 106(2): 313-330.
- McCormack A.L., Thiruchelvam M., Manning-Bog A.B., Thiffault C., Langston J.W., Cory-Slechta D-A. y Di Monte D.A. (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of Disease* 10: 119-127.

- McNeill T.H., Brown S.A., Rafols J.A., Shulson I. (1988). Atrophy of medium spiny striatal dendrites in advanced Parkinson's disease. *Brain Research*. 445: 148-152.
- Mehta T. R. y Dawson R. Jr. (2001) Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture. *Amino Acids* 20: 419-433.
- Meshul C.K., Cogen J.P., Cheng H.W., Moore C., Krentz L., McNeill T.H. (2000) Alterations in rat striatal glutamate synapses following a lesion of the cortico- and/or nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology*. 165:191-206.
- Meshul C.K., Emre N., Nakamura C.M., Allen C., Donohue M.K., Buckman J.F. (1999) Time-dependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neuroscience*. 88:1-16.
- Meshul C.K. y Tan S.E. (1994) Haloperidol-induced morphological alterations are associated with changes in calcium/calmodulin kinase II activity and glutamate immunoreactivity. *Synapse* 18: 205-217.
- Metz G.A., Farr T., Ballermann M., Whishaw I.Q. (2001) Chronic levodopa therapy does not improve skilled reach accuracy or reach range on a pasta matrix reaching task in 6-OHDA dopamine-depleted (hemi-Parkinson analogue) rats. *European Journal of Neurosciences*. 14:27-37.
- Miller R. y Beninger R.J. (1991) On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonist in animals with unilateral depletion of striatal dopamine. *Progress in Neurobiology* 36, 229-256.
- Moos T. (1996) Immunohistochemical localization of intraneuronal transferrin receptor immunoreactivity in the adult mouse central nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 375: 675-692.
- Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 116: 201-211.
- Mundorf M.L., Joseph J.D., Austi C.M., Caron M.G. y Wightman R.M. (2001) Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 79: 130-142.
- Mundorf M.L., Joseph J.D., Austi C.M., Caron M.G. y Wightman R.M. (2001) Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 79: 130-142.
- Murphy V.A., Wadhvani K.C., Smith Q.R. y Rapoport S.I. (1991) Saturable transport of manganese (II) across the rat blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* 57(3): 948-954.
- Nagatomo S., Umehara F., Hanada K., Nobuhara Y., Takenaga S., Arimura K. y Osame M. (1999) Manganese intoxication during total parenteral nutrition: Report of two cases and review of the literature. *Journal of Neurological Sciences* 162(1): 102-105.
- Nambu A. (2008) Seven problems on the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology*. 18: 1-10.
- Narita K., Kawasaki F., Kita H. (1990) Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminal are prevented by verapamil frogs. *Brain Research*. 510: 289-295.
- Normandin L, Panisset M, Zayed J. (2002) Manganese neurotoxicity: Behavioral, pathological, and biochemical effects following various routes of exposure. *Reviews on Environmental Health*. 17:189-217.
- Normandin L. y Hazell Nandedkar A.S. (2002) Manganese Neurotoxicity: An Update of Pathophysiologic Mechanisms. *Metabolic Brain Disease*. 17(4):375-387.
- Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Rodriguez M., Lanciego J.L., Artieda J., Gonzalo N., Olanow C.W. (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosciences*. 23:S8-S19.
- O'Brien C., Sung J.H., McGeachie R.E., Lee M.C. (1990) Striatonigral degeneration: Clinical, MRI, and pathologic correlation. *Neurology*. 40:710-711.
- Ochu E.E., Rothwell N.J., Waters C.M. (1998) Caspases mediate 6-hydroxydopamine-induced apoptosis but not necrosis in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry* 70: 2637-2640.
- Ogawa N., Hirose Y., Ohara S. (1985) A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 50(3): 435-441.
- Ordoñez-Librado J.L., Anaya-Martínez V., Gutierrez-Valdez A.L., Colín-Barenque L., Montiel-Flores E., Avila-Costa M.R. (2011) Manganese Inhalation as a Parkinson Disease Model. *Parkinson's Disease*. 2011 Article ID 612989, 14 pages, 2011. doi:10.4061/2011/612989.
- Ordoñez-Librado J.L., Anaya-Martínez V., Gutierrez-Valdeza A.L., Montiel-Flores E., Reyes Corona D., Martinez-Fong D., Avila-Costa M.R. (2010) L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neuroscience Letters*. 471(2): 79-82.
- Ordoñez-Librado J.L., Gutierrez-Valdez A.L., Colín-Barenque L., Anaya-Martínez V., Díaz-Bech P., Avila-Costa M.R. (2008) Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: Immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience* 155(1): 7-16.
- Otero-Siliceo E., Abascal-Arias M.R., Alanís-Quiroga M. (1996) Parkinson enfoque al futuro. *Fondo de Cultura Económica*. México D.F. 374.

- Oubrahim H., Stadtman E.R. y Chock P.B. (2001) Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98: 9505-9510.
- Potashkin J.A., Blume S.R., Runkle N.K., (2011) Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease*. 2011: 1-7.
- Rabin O., Hegedus L., Bourre J.M. y Smith Q.R. (1993) Rapid brain uptake of manganese (II) across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry* 61(2): 509-517.
- Raju D.V., Ahern T.H., Shah D.J., Wright T.M., Standaert D.G., Hall R.A., Smith Y. (2008) Differential synaptic plasticity of the corticostriatal and thalamostriatal systems in an MPTP-treated monkey model of parkinsonism. *European Journal of Neuroscience*. 27:1647–1658.
- Roth J.A. y Garrick M.D. (2003) Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical Pharmacology* 66(1):1-13.
- Roth J.A., Horbinski C., Feng L., Dolan K.G., Higgins D. y Garrick M.D. (2000) Differential localization of divalent metal transporter I with and without iron response element in rat PC12 and sympathetic neuronal cells. *Journal of Neuroscience*. 20(20): 7595-7601.
- Saransaari P. y Oja S.S. (2000) Involvement of metabotropic glutamate receptors in ischemia-induced taurine release in the developing and adult hippocampus. *Neurochemical Research* 25(8): 1067-1072.
- Sava V., Mosquera D., Song S., Cardozo-Pelaez F., Sánchez-Ramos J.R. (2004) Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons. *Free Radical Biology & Medicine*. 36(9): 1144-1154.
- Seeman P. y Niznik. (1990) Dopamine receptors and transporters in Parkinson disease and schizophrenia. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. 4: 2737-2744.
- Serra P.A., Esposito G., Enrico P., Mura M.A., Migheli R., Delogu M.R., Miele M., Desole M.S., Grella G., Miele E. (2000) Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology*. 130: 937-945.
- Shannon C.S., Matthew K.R., Nikolay M.N. (2007) Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: An in vitro study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23: 286–296.
- Sherer T.B., Betarbet R., Kim J. y Greenamyre J.T. (2003) Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 341: 87-90.
- Shimizu K., Ohtaki K., Matsubara K., Aoyama K., Uezono T., Saito O., Suno M., Ogawa N. Hayase N., Kimura K. y Shiono H. (2001) Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. *Brain Research* 906: 135-142.
- Shimohama S., Sawada H., Kitamura Y. Y Taniguchi T. (2003) Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine* 9(8): 360-365.
- Smith Y, Raju D, Nanda B, Pare JF, Galvan A, Wichmann T. (2009) The thalamostriatal systems: anatomical and functional organization in normal and parkinsonian states. *Brain Research Bulletin*. 78:60–68.
- Smith A.D., Amalric M., Koob G.F., Zigmond M.J. (2002) Effect of Bilateral 6-Hydroxydopamine Lesions of the Medial Forebrain Bundle on Reaction Time. *Neuropsychopharmacology* 26(6): 756–764.
- Sotogaku N., Oku N. y Takeda A. (2000) Manganese concentration in mouse brain after intravenous injection. *Journal Neuroscience Research* 61: 350–356.
- Spooren W., Gentsch C. y Wiessner C. (1998) TUNEL-positive cells in the substantia nigra of C57BL/6 mice after a single bolus of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience* 85: 649–651.
- Stanic D., Parish C.L., Zhu W.M., Krstew E.V., Lawrence A.J., Drago J., Finkelstein D.I. y Horne M.K. (2003) Changes in function and ultrastructure of striatal dopaminergic terminals that regenerate following partial lesions of the SNc. *Journal of Neurochemistry* 86: 329-343.
- Takeda A. (2003) Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews* 41: 79-87.
- Takeda A., Ishiwatari S. y Okada S. (1999) Manganese uptake into rat brain during development and aging. *Journal of Neuroscience Research*. 56(1): 93-98.
- Talpade D.J., Greene J.G., Higgins D.S., Greenamyre J.T. (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenona. *Journal of Neurochemistry* 75: 2611-2621.
- Tapin D., Kennedy G., Zayed J. (2006) Bioaccumulation and locomotor effects of manganese sulfate in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 211: 166-174.
- Tatton N.A. y Kish S.J. (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77: 1037-1048.
- Tillerson J.L., Caudle W.M., Reverón M.E., Miller G.W. (2002) Detection of Behavioral Impairments Correlated to Neurochemical Deficits in Mice Treated with Moderate Doses of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Experimental Neurology*. 178: 80–90.
- Tisch S., Silberstein P., Limousin-Dowsey P., Jahanshahi M. (2004) The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. *Psychiatric Clinical N Am*. 27: 757-799.

- Tolosa E., Wenning G., Poewe W. (2006) The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5: 75–86.
- Tomas-Camardiel M., Herrera A.J., Venero J.L., Cruz Sanchez-Hidalgo M., Cano J. y Machado A. (2002) Differential regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats. *Molecular Brain Research* 103: 116–129.
- Tran T.T., Chowanadisai W., Crinella F.M., Chicz-DeMet A., Lonnerdal B., (2002) Effect of high dietary manganese intake of neonatal rats on tissue mineral accumulation, striatal dopamine levels, and neurodevelopmental status. *Neurotoxicology.* 23: 635.
- Uhl G.R., Hedreen J.C., Price D.L. (1985) Parkinson's disease: Loss of neurons from ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesion. *Neurology* 35: 1215-1218.
- Ungerstedt U. (1968) 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoaminergic neurons. *European Journal Pharmacology* 5: 107-110.
- Ungerstedt U. (1971) Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed birotational behavior. *Acta Physiologica Scandinavica Sup.* 367: 69-93.
- Van den Munkhof P., Luk K.C., Ste-Marie L., Montgomery J., Blanchet P.J., Sadikot A.F., Drouin J. (2003) Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development.* 130(11): 2535-2542.
- Vettori M.V., Gatti R., Orlandini G., Belletti S., Alinovi R., Smargiassi A. y Mutti A. (1999) An in vitro model for assessment of manganese neurotoxicity. *Toxicology in vitro* 13: 931-938.
- Vezér T., Papp A., Hoyk Z., Varga C., Náráy M. y Nagymajtényi L. (2005) Behavioral and neurotoxicological effects of subchronic manganese exposure in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 19: 797–810.
- Vidal M.A., Campos F., Faro L.R.F., Cervantes R.C., Durán R. (2005) Effects of Manganese on Extracellular Levels of Dopamine in Rat Striatum: An Analysis In vivo by Brain Microdialysis. *Neurochemical Research.* 30(9): 1147–1154.
- Villalba R.M., Lee H., Smith Y. (2009) Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTPtreated monkeys. *Exp Neurol.*; 215:220–227.
- Walowitz J.L. y Roth J.A. (1999) Activation of ERK1 and ERK2 Is Required for Manganese-Induced Neurite Outgrowth in Rat Pheochromocytoma (PC12) Cells. *Journal of Neuroscience Research.* 57: 847-854.
- Whishaw I.Q., Pellis S.M., Gorny B.P., Pellis V.C. (1991) The impairments in reaching and the movements of compensation rats with motor cortex lesions: an endpoint, videorecording, and movement notation analysis. *Behavioural Brain Research.* 42: 77-91.
- Whishaw I.Q., Suchowersky O., Davis L., Sarna J., Metz G.A., Pellis S.M. (2002) Impairment of pronation, supination, and body coordination in reach-to-grasp tasks in human Parkinson's disease (PD) reveals homology to deficits in animal models. *Behav Brain Res* 133: 165–176.
- Whishaw Q., Zeeb F., and Erickson C., McDonald J. (2007) Neurotoxic lesions of the caudate-putamen on a reaching for food task in the rat: acute sensorimotor neglect and chronic qualitative motor impairment follow lateral lesions and improved success follows medial lesions. *Neuroscience* 146: 86–97.
- Wichmann T. y DeLong M.R. (1996) Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Current Opinion in Neurobiology* 6: 751-758.
- Witholt R., Gwiazada R.H., Smith D.R. (2000) The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. *Neurotoxicology and Teratology* 22: 851-861.
- Yurek D.M. y Sladek J.R. (1990) Dopamine cell replacement: Parkinson's disease. *Annual Reviews in Neuroscience* 13: 415-440.
- Zaja-Milatovic S., Milatovic D., Schantz A.M., Zhang J., Montine K.S., Samii A., Deutch A.Y., Montine T.J. (2005) Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson's disease. *Neurology.*; 64:545–547.
- 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. *Toxicology in Vitro* 18: 71–77
- Zheng W., Aschner M., Ghersi-Geage J.F. (2003) Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 192: 1-11.

## Anexo 1.- Conducta Motora

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



Prueba de la viga

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

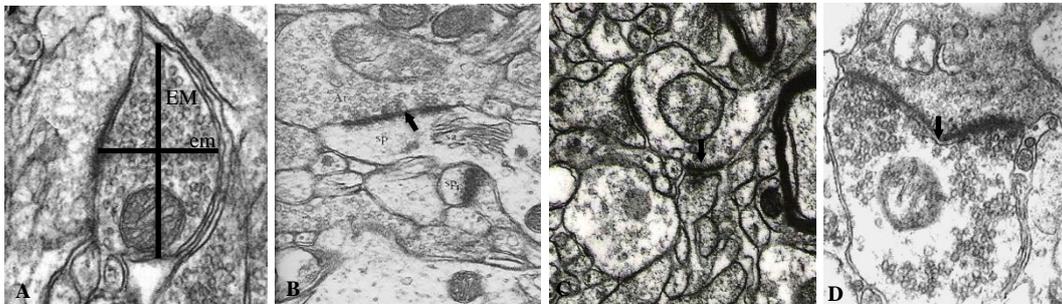


Prueba motora fina (reaching task)

## Anexo 2.- Microscopia Electrónica

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

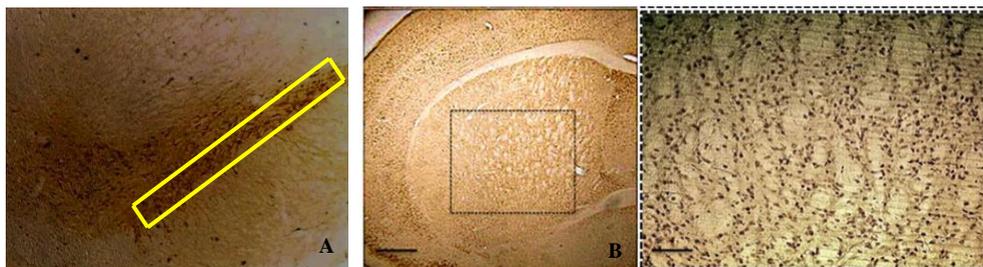
Una vez que se polimerizó la resina, se procedió a realizar los cortes finos de 900 Å en un ultramicrotomo Reichert-Jung utilizando cuchillas de diamante. Se montaron los cortes en rejillas de cobre y se contrastaron en acetato de uranilo al 5 % durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0.4 % por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



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

### Anexo 3.- Inmunohistoquímica:

Se realizaron cortes histológicos del mesencéfalo ventral (SNc), del NE, GP, cortezas, hipocampo y cerebelo de los animales control y expuestos, y se realizó inmunohistoquímica para TH y NeuN. Para lo cual se realizaron cortes de entre 50-100  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se hicieron lavados sucesivos en el siguiente orden: En amortiguador PBS 3 veces por 10 minutos; 3 lavados en amortiguador TRIS de 10 minutos; amortiguador TRIS y peróxido de hidrógeno 0.3 % (30 minutos); amortiguador TRIS y borohidrido de sodio 0.01 % (30 min); amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra y 0.3 % de tritón (durante 1 h), todos con agitación, posteriormente se incubaron los cortes en una alícuota de anticuerpo primario anti-TH o anti-NEU N (según el caso) en amortiguador TRIS 1:1000 con 1 % de suero normal de cabra por 3 días a 4 °C. Posteriormente se lavaron los cortes 3 veces en amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra durante 10 min con agitación. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario. Anti-IGg de conejo 1:200 en TRIS con 1 % de suero normal de cabra. Se hizo un lavado en TRIS con 1 % de suero normal de cabra, para después incubar en Abidina-Biotina (2 Hrs) a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en TRIS con agitación se reveló la tinción en los tejidos con 3-3 Diaminobencidina (DAB) al 0.05 % y 0.003 % de peróxido de hidrógeno. El tejido se lava una última vez en TRIS por 10 min y se montan en portaobjetos previamente gelatinizados, se dejan secar un día. Para cubrir con resina se realizó la deshidratación de los cortes con alcoholes en concentraciones crecientes (60, 70, 80, 90 y 96 %) diez minutos en cada uno y 3 cambios en alcohol de 100 % de 10 min. y finalmente dos cambios en tolueno de 10 min. cada uno. Para su posterior análisis en un fotomicroscopio, haciendo un conteo de las neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc en un área de 1500  $\mu\text{m}^2$  en 10 cortes por animal a partir del inicio del núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio, mientras que para el conteo de neuronas mediante NEU N se realizó en 25 cortes en un área de 330  $\mu\text{m}^2$  en las estructuras ya mencionadas.



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

#### **Anexo 4.- Método de Golgi**

1.- Las muestras ya fijadas se lavan en buffer fosfatos y se sumergen en una mezcla de osmio-dicromato ( $\text{OsO}_4$  1g,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  8g,  $\text{H}_2\text{O}$  300ml) durante 7 días a temperatura ambiente en la obscuridad (se utilizarán 10ml de mezcla para cada cerebro).

2.- A continuación las muestras se lavan rápidamente con agua destilada, después con nitrato de plata al 0.75%. Los fragmentos se colocan en nitrato de plata durante 24 horas a temperatura ambiente.

3.- Para realizar los cortes, se quita el exceso de nitrato de plata con papel filtro y se encastran en un bloque de parafina. La parte libre de la muestra se baña en alcohol al 95% y se realizan los cortes de  $120\mu\text{m}$ , lubricando constantemente la cuchilla con alcohol.

4.- Los cortes se deshidratan en 2 baños de alcohol absoluto 10 minutos cada uno, posteriormente en esencia de clavo durante 10 minutos para ser aclarados, y después dos cambios de xilol, finalmente se montan en un portaobjetos con resina sintética.

## **Anexo 5.- Determinación de los contenidos de DA por HPLC**

A las 40 inhalaciones de  $\text{MnCl}_2\text{-Mn(OAc)}_3$  los animales fueron sacrificados y se extrajo el cerebro para medir las concentraciones de DA en la SNc, el GP y NE. Utilizando un vibratomo se obtuvieron rebanadas coronales de 300  $\mu\text{m}$ , y de ellas se disecaron secciones de ambos lados. Cada núcleo se homogenizó con ácido perclórico (0.1 N) y con ayuda de una microcentrífuga airfuge (Beckman, Fullerton CA., EUA) a 300 PSI por minuto se obtuvieron dos fases.

La fase líquida se filtró en membranas de nylon con poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , y se ocupó para medir las concentraciones de DA en un cromatógrafo LC-4C (Bioanalytical System, Inc. -BAS-, West Lafayette, IN, EUA) equipado con un inyector automático Rheodyne con asa de 5  $\mu\text{L}$ . El flujo de la fase móvil se mantuvo a 0.9 mL/min.; la composición de la fase móvil fue: ácido monocloroacético 0.1 M, ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA) 0.65 mM, ácido octanosulfónico 0.9 mM, y acetonitrilo al 4.5%, p.H. ajustado a 4.5 con hidróxido de sodio (NaOH) y desgasificada con agitación y vacío. La separación de las catecolaminas se efectuó en una columna de microboro C18 (100 X 1 mm) con partículas de 3  $\mu\text{m}$  (BAS- Unijet).

La detección electroquímica se hizo mediante una celda con dos electrodos de carbono vidriado colocados en serie y controlados por dos módulos LC-4C (BAS). El primer electrodo se trabajó a un potencial de + 300 mV, con el fin de oxidar contaminantes; y al segundo electrodo se le asignó un voltaje de + 750 mV, cuya señal obtenida fue digitalizada por una tarjeta de interfase, procesada en una PC y analizada mediante el programa Peak II (SRI Instruments, Torrance, CA, EUA).

La fase sólida fue resuspendida en 120  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2N y en alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  se cuantificó por triplicado la cantidad de proteína con el método de Bradford (1976).