



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

PROGRESIÓN Y LATERALIZACIÓN DE LA  
DEGENERACIÓN DOPAMINÉRGICA EN  
RATONES EXPUESTOS A MANGANESO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

CARLOS ARMANDO LOZANO VILLALOBOS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA



2016

Los Reyes Iztacala, Edo. de Mex.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo fue gracias al apoyo de los proyectos: PAPIIT-DGAPA-UNAM IN215114, PAPIIT-DGAPA-UNAM IA2022142, PAPCA-IZTACALA UNAM-2014-16 y PAPCA-IZTACALA UNAM2014-18.

A la Universidad por darme la oportunidad de realizar mis estudios en su espacio y poder que estudié en la mejor universidad del país.

A los miembros del comité revisor a la Dra. María Rosa Avila Costa, Dra. Verónica Anaya Martínez, Dr. José Luis Ordóñez Librado, Mtro. Enrique Montiel Flores y Dra. Norma Laura García Saldívar, por sus comentarios, observaciones y tiempo dedicado a este trabajo.

A mi familia, porque sin ella mi vida estaría vacía, principalmente a mis padres, gracias por su paciencia y apoyo porque sin ustedes nunca hubiera alcanzado esta meta.

A todos en el laboratorio, por todo lo compartido dentro y fuera de él, porque hicieron de mi última etapa en la universidad la de mayor aprendizaje.

A todos mis amigos que conocí durante la carrera, que aunque no menciono a cada uno, fueron muy importantes durante estos años. Les deseo lo mejor.

## ABREVIATURAS

$\gamma$ -GTT	$\gamma$ - Glutamyltranspeptidasa	Mn	Manganeso
ACh	Acetilcolina	Mn <sup>2+</sup>	Manganeso divalente (Ion manganoso)
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico	Mn <sup>3+</sup>	Manganeso trivalente (Ion manganico)
BBB	Barrera hemato-encefalica	MSNs	Neuronas espinosas medianas
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio	MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
DA	Dopamina	NC	Núcleo caudado
DAT	Transportador de dopamina	NE	Núcleo estriado
DMT-1	Transportador de metales divalentes 1	NMDA	N-metil-D-aspartato
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxi-phenilacetico	NO	Óxido nítrico
EP	Enfermedad de Parkinson	NOS	Óxido nítrico sintasa
Fe <sup>2+</sup>	Ion ferroso	OH <sup>-</sup>	Radical hidróxilo
GABA	Ácido $\gamma$ - aminobutírico	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
Glu	Glutamato	P	Putamen
GP	Globo pálido	RNS	Especies reactivas de nitrógeno
GPe	Globo pálido externo	ROS	Especies reactivas de oxígeno
GPi	Globo pálido interno	SN	Sustancia nigra
GSH	Glutatión	SNC	Sistema nervioso central
GSSG	Glutatión oxidado	SNc	Sustancia nigra compacta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	SNr	Sustancia nigra reticulata
HVA	Ácido homovanílico	SOD	Superóxido dismutasa
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$	STN	Núcleo subtalámico
INF- $\gamma$	Interferón- $\gamma$	TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁG</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ENFERMEDAD DE PARKINSON</b>	<b>3</b>
PATOGENESIS	7
ETIOLOGÍA	10
<b>MANGANESO (Mn)</b>	<b>13</b>
ABSORCIÓN DE Mn	14
TRANSPORTE DEL Mn AL CEREBRO	15
MECANISMOS TOXICOS DEL Mn	17
<b>GANGLIOS BASALES</b>	<b>19</b>
ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES	19
ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES	21
DEPLECIÓN DE DA	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>25</b>
OBJETIVO PARTICULAR	25
<b>MÉTODO</b>	<b>26</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por presentar síntomas motores como temblor en reposo, bradicinesia y rigidez, consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc). Se ha reportado que la exposición crónica a altos niveles de manganeso (Mn) tiende a acumularse en el cerebro, en regiones ricas en dopamina (DA), alterando la integridad de las neuronas dopaminérgicas, resultando en un síndrome neurológico semejante a la EP. El objetivo de este trabajo fue determinar la lateralidad y la progresión de la muerte neuronal en la SNc en ratones expuestos a la inhalación de Mn a diferentes tiempos. Se utilizaron 72 ratones macho de la cepa CD-1, divididos en dos grupos de 36 ratones cada uno, el primer grupo fue expuesto a la inhalación de agua desionizada y el segundo grupo fue expuesto a la inhalación de la mezcla de 0.04M de  $MnCl_2$  y 0.02M de  $Mn(OAc)_3$ , durante 1 hora 2 veces por semana. Se sacrificaron seis ratones de cada grupo a los siguientes tiempos: a los 15 días, al mes, dos, tres, cuatro y cinco meses de haber comenzado con las exposiciones. Fueron perfundidos vía intracardiaca y fijados con paraformaldehído al 2%, los cortes histológicos del mesencéfalo donde se encontraba la SNc, fueron procesados con inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) y finalmente se hizo el conteo de las neuronas positivas a TH. Los resultados de este experimento muestran que la inhalación de la mezcla de Mn provoca reducción del 25% en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc comparado con los controles a partir de los dos meses de inhalación, así como del 42%, 51% y 61% a los tres, cuatro y cinco meses respectivamente. Cabe señalar que el número de neuronas dopaminérgicas siempre fue mayor en el lado izquierdo, sin embargo esta diferencia solo fue significativa, a los dos meses con un 16% y a los tres meses un 14% menos neuronas de iniciada la inhalación de Mn. Estos datos dan una mayor validez al modelo de inhalación de Mn ya que la muerte de las neuronas dopaminérgicas es bilateral, lateralizada, gradual y progresiva, muy parecido a lo que sucede en la EP.

## SUMMARY

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by motor symptoms such as resting tremor, bradykinesia and rigidity, resulting from the loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra compacta (SNc). It is known that chronic exposure to high levels of manganese (Mn) tends to accumulate in the brain, in dopamine (DA) rich regions, altering the integrity of dopaminergic neurons, resulting in a neurological syndrome resembling PD. The aim of this study was to determine neuronal death laterality and progression of SNc dopaminergic neurons in mice exposed to inhaled Mn at different times. 72 CD-1 male mice were used. They were divided into two groups of 36 mice each, the first group was exposed to the inhalation of deionized water and the second group was exposed to the inhalation of the mixture of 0.04M  $\text{MnCl}_2$  and 0.02M  $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ , for 1 hour 2 times a week. Six mice for each group were sacrificed at the following times: for 15 days, a month, two, three, four and five months after starting the exposition. The mice were perfused intracardially and fixed with 2% paraformaldehyde, the histological sections of the midbrain (SNc) were immunostained for tyrosine hydroxylase (TH) and finally the count of TH positive neurons were performed. Our results show that the effects of Mn mixture inhalation cause reduction of 25% in the number of dopaminergic neurons in the SNc compared to controls after two months of inhalation, and 42%, 51% and 61% at three, four and five months, respectively. We also note that the number of dopaminergic neurons was always greater on the left side, however this difference only was significant at two months 16% and 14% for three months after starting the inhalation. These data provide greater validity to this model since the death of dopaminergic neurons is bilateral, lateralized, gradual and progressive, very similar to what happens in PD.

## ENFERMEDAD DE PARKINSON

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por presentar disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales (Jordán, 2003). La Enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (Orr *et al*, 2002; Dauer y Przedborski, 2003; Greenamyre y Hasting, 2004; Tan *et al*, 2004; De Lau y Breteler, 2006), su incidencia aumenta considerablemente con la edad (Fearnley y Lees, 1991; Lees *et al*, 2009), afectando al 1% de las personas mayores de 60 años de edad (Olanow, 2004; Jankovic, 2005; Healy *et al*, 2008; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011).

Esta enfermedad fue descrita por James Parkinson en 1817, en su monografía titulada "Essay on the shaking palsy" (Ensayo sobre la parálisis agitante) como "movimientos temblorosos involuntarios en las partes que están en reposo, con la potencia muscular disminuida, con propensión a doblar el tronco hacia adelante y pasar de un ritmo de caminata a ritmo de carrera".

La EP es una enfermedad crónica, de larga evolución y curso progresivo que se desarrolla más gravemente durante los primeros 4 años (Hoehn y Yahr, 1967). Es de evolución variable, ya que en algunos pacientes la enfermedad progresa rápidamente, mientras que en pacientes más jóvenes es de progresión lenta (Hely *et al*, 1999). Esto ha ocasionado que se utilicen una variedad de escalas que evalúan la severidad de los signos y síntomas clínicos durante el curso de la enfermedad, la más simple es la escala de Hoehn y Yahr (Anexo 1) que fue diseñada para describir las diferentes etapas en la evolución de la EP (Hoehn y Yahr, 1967; Wolfgang *et al*, 2003). Se estima que el tiempo de transición de una etapa a otra es de alrededor de 20-26 meses (Zhao *et al*, 2010).

En la EP, alrededor del 86% de los pacientes (Barrett *et al*, 2011) reportan predominio unilateral de signos y síntomas al inicio de la enfermedad que puede persistir a veces durante 20-30 años, (Toth *et al*, 2004; Djaldetti *et al*, 2006; Stochl *et al*, 2009). Esta asimetría se ha asociado con la mano dominante (Kempster *et al*, 1989; De la Fuente-Fernández *et al*, 2000), variaciones normales innatas en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc (Barrett *et al*, 2011) o una vulnerabilidad en la SNc de un hemisferio (Toth *et al*, 2004; Pedrosa *et al*, 2014), sin embargo aún no es posible explicar satisfactoriamente la preferencia lateral (Djaldetti *et al*, 2006).

El temblor en reposo es el síntoma predominante al inicio de la enfermedad, que es acompañado de dolor en las extremidades (Hoehn y Yahr, 1967; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011), alteraciones en la marcha como el arrastre de pies, aumento en la velocidad de los pasos y dificultad para detenerse (marcha festinante), seguido de rigidez y bradicinesia (Hoehn y Yahr, 1967; Polymeropoulos *et al*, 1997; Dauer y Przedborski, 2003; Greenamyre y Hasting, 2004; De Lau y Breteler, 2006; Hardy *et al*, 2006; Benedetto *et al*, 2009; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011; Cervantes-Arriaga *et al*, 2013; Fahn, 2015).

Posteriormente el paciente desarrolla postura encorvada, brazos flexionados con falta de movimiento, rostro rígido y expresión fija (Hely *et al*, 1999), habla es monótona con ligero arrastre en las palabras, cambio en escritura (micrografía), así como el “conteo de monedas” (movimientos rápidos de los dedos) (Wolfgang *et al*, 2003; Lees *et al*, 2009) y depresión en 4% de los pacientes (Hoehn y Yahr, 1967; Hely *et al*, 1999; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011)

Cuando la enfermedad progresa surgen problemas de equilibrio, sialorrea, alteraciones de la sensación, alteraciones de sueño, tales como insomnio y fragmentación del sueño (Estrada-Bellmann y Martínez, 2011), así como dificultades visoespaciales, trastornos de atención, delirios y alucinaciones (Dauer y Przedborski, 2003; Wolfgang *et al*, 2003; Emre 2007; Lees *et al*, 2009) y finalmente, en

los casos mas avanzados bradifrenia (Estrada-Bellmann y Martínez, 2011) y demencia (Hoehn y Yahr, 1967; Hely *et al*, 1999; Greenamyre y Hasting, 2004), alrededor del 25-40% de los pacientes la presentan (De Lau y Breteler, 2006).

En nuestro país, no se cuenta con estudios acerca de la prevalencia e incidencia de la EP, pero se piensa que afecta entre 4.1-4.6 millones de personas mayores de 50 años, y se ha estimado que para el año 2030 esta cifra se duplicará, la evidencia actual sugiere una heterogeneidad clínica en poblaciones con EP con un discreto predominio masculino, donde el 89% de los sujetos han sido catalogados con EP de inicio tardío ( $\geq 40$  años); el 10% correspondieron a EP de inicio temprano (21-39 años) y el restante corresponde a EP juvenil ( $\leq 20$  años), el 59.5% se encontraba en un estadio leve de la enfermedad (HY I-II), el 28% en un estadio moderado (HY III) y el 12.5% fue catalogado como estadio grave (HY IV-V) (Cervantes-Arriaga *et al*, 2013).

Todas estas alteraciones tanto en el control como en la coordinación del movimiento son consecuencia de la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc) (Calabresi *et al*, 2000; Orr *et al*, 2002; Dauer y Przedborski, 2003; Jordán, 2003; Greenamyre y Hasting, 2004; Olanow, 2004; Jankovic, 2005).

La pérdida de las neuronas nigrales empieza varios años antes de que aparezcan los síntomas (Estrada-Bellmann y Martínez, 2011), por ello se plantean dos fases de la enfermedad:

- 1) La fase presintomática que transcurre entre la exposición del individuo con o sin carga hereditaria al ambiente, incluyendo toxinas, traumatismos, edad, etc., que agotan las reservas neuronales, pero no lo suficiente como para causar parkinsonismo clínico.

- 2) La fase sintomática que ya incluye signos y síntomas de la enfermedad (Fearnley y Lees, 1991; Braak *et al*, 2002).

Se estima que alrededor del 60-70% de las neuronas dopaminérgicas se han perdido y la dopamina (DA) estriatal está reducida entre un 70-90% cuando ocurren las primeras manifestaciones clínicas de la EP (Damier *et al*, 1999; Dauer y Przedborski, 2003; Wolfgang *et al*, 2003; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011), además, se ha reportado que al comienzo de la enfermedad (1-4 años), la pérdida de estas neuronas es más pronunciada (Kempster *et al*, 1989; Fearnley y Lees, 1991; Kordower *et al*, 2013). Por lo que, la EP se caracteriza por la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, disminución de la DA estriatal (Temlett *et al*, 1994; Ehringer y Hornykiewicz, 1998; Betarbet *et al*, 2000) y de sus catabolitos, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) (Forno *et al*, 1992; Sofic *et al*, 1992; Hornykiewicz, 2001; Lai *et al*, 2002; Tan *et al*, 2004). Esta pérdida se acompaña de inclusiones intraneuronales distintivas llamadas cuerpos de Lewy (Gibb y Lees, 1988; Polymeropoulos *et al*, 1997; De la Fuente-Fernández *et al*, 1998; Gonen-Alpan *et al*, 2004; Olanow, 2004; Tan *et al*, 2004; Jankovic, 2005; Lees *et al*, 2009), son agregados anormales presentes en neuronas compuestos principalmente de las proteínas  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina (De la Fuente-Fernández *et al*, 1998; Olanow y Tatton, 1999; Braak *et al*, 2002; McNaught *et al*, 2004; Wolfgang *et al*, 2003; Olanow *et al*, 2004; Jankovic, 2005; Hardy *et al*, 2006; McNaught y Olanow, 2006; Benedetto *et al*, 2009). Entre un 3-4% de las neuronas en la sustancia nigra (SN) contienen cuerpos de Lewy, estos se están formando y desapareciendo continuamente a lo largo de la enfermedad (Lees *et al*, 2009).

## PATOGÉNESIS

La EP se ha relacionado con una variedad de alteraciones celulares, bioquímicas y moleculares (McNaught y Olanow, 2006). Actualmente se considera que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo tienen un papel central en la patogénesis de la enfermedad (Jordán, 2003; Uchida, 2003).

### - Inflamación

La microglia sobreactivada puede inducir efectos neurotóxicos significativos y altamente perjudiciales por el exceso de producción de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Zhao *et al*, 2009), que se incrementan hasta 760-1,570% en la SNc de pacientes con EP en comparación con pacientes controles normales (Hirsch *et al*, 1998), sugiriendo que la inflamación crónica contribuye en la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas (Forno *et al*, 1992; Floyd, 1999; Youdim *et al*, 1999; Orr *et al*, 2002; Tansey y Goldberg, 2010).

### - Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo ha recibido la mayor atención en la EP debido al potencial del metabolismo oxidativo de la DA para producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que, en presencia de hierro ( $Fe^{2+}$ ) es capaz de degradarse a través de la reacción de Fenton y liberar radicales hidroxilos ( $OH\cdot$ ) (Fig. 1) (Youdim *et al*, 1999), que es considerado como el mediador primario del daño oxidativo (Oestreicher *et al*, 1994; Sengstock *et al*, 1994; Olanow y Tatton, 1999; Dauer y Przedborski, 2003; Greenamyre y Hasting, 2004; Kowaltowski *et al*, 2009) a través de la peroxidación lipídica de la membrana, oxidación de las bases del ADN y oxidación protéica (Uchida, 2003; Benedetto *et al*, 2009).

El estrés oxidativo y la consiguiente muerte celular podrían desarrollarse en la SNc por tres causas:

- A. Aumento del recambio de DA, lo que resulta en la formación excesiva de  $H_2O_2$  (Sofic *et al*, 1992).
- B. Deficiencia de glutatión reducido (GSH) disminuye la capacidad del cerebro para degradar el  $H_2O_2$ ; esta disminución solo se ha observado en la SNc (Sofic *et al*, 1992; Olanow y Tatton, 1999). Esta reducción por sí misma no puede dañar las neuronas dopaminérgicas, pero puede hacerlas vulnerables a otras toxinas (Olanow y Tatton, 1999; Uchida, 2003). El aumento significativo en los niveles de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ( $\gamma$ -GTT), esta enzima es la responsable de la traslocación de los precursores de la GSH y el metabolismo de la forma oxidada de glutatión (GSSG) se han detectado en la SNc en autopsias de pacientes con EP, se cree que la disminución de la GSH puede representar el defecto bioquímico en etapas iniciales en la EP (Sengstock *et al*, 1994; Olanow y Tatton, 1999).
- C. Aumento del  $Fe^{2+}$ , que puede promover la formación de radicales citotóxicos (Oestreicher *et al*, 1994). Estudios post mortem en cerebros de pacientes con EP demuestran aumento de  $Fe^{2+}$  acumulado principalmente en los gránulos de neuromelanina de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Good *et al*, 1992), además se han detectado aumento de receptores de lactoferrina en dicha zona en pacientes con EP (Faucheux *et al*, 1995). La pérdida de DA es dependiente de la acumulación de Fe (Good *et al*, 1992). El aumento de  $Fe^{2+}$  en la SNc ha sido observado después del tratamiento con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Temlett *et al*, 1994). Sin embargo, puede acumularse de forma secundaria a la degeneración de las células (Oestreicher *et al*, 1994; Olanow y Tatton, 1999).

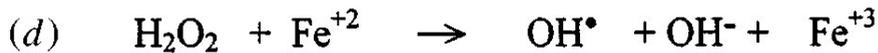
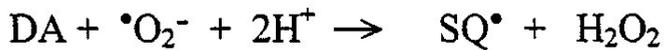


Fig. 1. Esquematzación de las reacciones enzimáticas y del metabolismo de la DA. Tanto la degradación enzimática (a) como la auto oxidación (b) de la DA dan como resultado la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  está normalmente controlado por la acción de la glutatión peroxidasa, quien hace uso de dos moléculas de glutatión reducido (GSH) para dar como resultado glutatión oxidado (GSSG) y dos moléculas de agua (c). Sin embargo, el aumento en la concentración en estado estacionario de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede conducir a la reacción con el hierro que genera el altamente reactivo y potencialmente citotóxico radical hidróxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) de acuerdo con la reacción de Fenton (d) (Olanow y Tatton, 1999).

#### - Disfunción Mitocondrial

En la EP, hay afectación a los complejos mitocondriales I y IV (Olanow y Tatton, 1999). La disminución del 30-40% en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial se ha encontrado en las células de la SNc (Chen *et al*, 2001), contribuyendo a la degeneración celular a través de la disminución en la síntesis de ATP (McNaught y Olanow, 2006) a través de los radicales libres generados directamente en este sitio por el aumento compensatorio de la respiración en el complejo II pudiendo conducir a la muerte celular por necrosis o apoptosis (Mochizuki *et al*, 1995; Olanow y Tatton, 1999; Greenamyre y Hasting, 2004).

## ETIOLOGÍA

La EP es de causa desconocida (Sofic *et al*, 1992; Sengstock *et al*, 1994; Olanow y Tatton, 1999; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011), sin embargo se han reportado factores que incrementan el riesgo de adquirir la enfermedad: a) factores genéticos b) factores endógenos y c) factores ambientales (Floyd, 1999; Djaldetti *et al*, 2006; Surmeier *et al*, 2010). Factores genéticos o ambientales pueden provocar EP, no obstante, es poco probable que en la mayoría de los casos se expliquen por una única causa, más bien puede ser el resultado de la interacción entre múltiples mutaciones genéticas y/o la combinación de un gen mutante y una toxina ambiental (Olanow y Tatton, 1999; Lai *et al*, 2002; Tan *et al*, 2004; De Lau y Breteler, 2006; Djaldetti, 2006; Tansey y Goldberg, 2010). Aproximadamente el 10% de los casos es genético (Olanow y Tatton, 1999; Wolfgang *et al*, 2003; Greenamyre y Hasting, 2004; De Lau y Breteler, 2006) y el restante 90% es idiopático (Dauer y Przedborski, 2003).

### - Factores Genéticos

Se han asociado con un alto riesgo de padecer EP a familias con varios miembros afectados por la enfermedad (De Lau y Breteler, 2006). Los genes más comúnmente estudiados incluyen genes implicados en el metabolismo de la DA y la función mitocondrial (Surmeier *et al*, 2010). La EP se vinculó inicialmente a la región q21-23 del cromosoma 4 (Wolfgang *et al*, 2003), donde se identificaron mutaciones en el gen SCNA que codifica la proteína  $\alpha$ -sinucleína (Olanow y Tatton, 1999; Tan *et al*, 2004; McNaught y Olanow, 2006), causando un síndrome parkinsoniano de inicio temprano (<40 años) (Polymeropoulos *et al*, 1997). Otros ejemplos son los genes Parkin, DJ-1, PINK1 y ATP13A2 que causan parkinsonismo (Tan *et al*, 2004) de inicio temprano y están directamente relacionados con la función mitocondrial (Kahle *et al*, 2009; Surmeier *et al*, 2010). Las mutaciones del gen Parkin son la segunda causa genética más común de parkinsonismo, mientras las mutaciones de los otros tres genes son raras (Hardy *et al*, 2006),

DJ-1 es una proteína mitocondrial sensible a reacciones redox, teniendo potencialmente la capacidad de coordinar una variedad de mecanismos de defensa oxidativa y la pérdida de su actividad podría promover estrés oxidativo y daño proteico mediado por radicales libres (Hardy *et al*, 2006; McNaught y Olanow, 2006; Kahle *et al*, 2009). Mutaciones en el gen LRRK-2, que es una cinasa que codifica la proteína Dardarina tiene una frecuencia mundial del 4% en pacientes con parkinsonismo hereditario (Hardy *et al*, 2006; Healy *et al*, 2008). La alteración del gen GBA causa la enfermedad de Gaucher, aumentando el riesgo de padecer la EP en más de cinco veces, mientras que el desarrollo de la enfermedad se incrementa 13 veces con una mutación severa (Goken-Alpan *et al*, 2004). Desafortunadamente, la mayoría de los genes asociados a la EP son de función desconocida o poco conocidos (Surmeier *et al*, 2010) (Anexo 2).

#### - Excitotoxicidad

Es una causa que se ha relacionado con la EP basado en dos posibles mecanismos; el primer mecanismo es resultado de una mayor síntesis de glutamato (Glu), las neuronas dopaminérgicas de la SNc expresan gran cantidad de receptores de Glu, pues reciben una amplia inervación desde la corteza y el núcleo subtalámico (STN) (Olanow y Tatton, 1999), y el segundo mecanismo sugiere que la reducción en el metabolismo energético debido al defecto en la función mitocondrial, resulta en la disminución de la concentración de ATP que se traduce en la pérdida del bloqueo que llevan a cabo los iones magnesio del canal de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), induciendo que las concentraciones fisiológicas de Glu provoquen mayor permeabilidad de calcio ( $Ca^{2+}$ ) al interior celular, para finalmente promover necrosis o apoptosis (McNaught y Olanow, 2006). Se cree que el daño excitotóxico pudiera estar mediado, al menos en parte, a través de la formación de óxido nítrico (NO) (Beckman *et al*, 1990). El NO se forma por la conversión de arginina a citrulina en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Olanow y Tatton, 1999). El NO reacciona con radicales

superóxido para formar el radical peroxinitrito y  $\text{OH}^-$ , ambos son agentes altamente tóxicos (Dauer y Przedborski, 2003). El NO también puede contribuir a la degeneración celular mediante el desplazamiento de  $\text{Fe}^{2+}$  de sitios de unión de ferritina, de modo que puede participar en la reacción de Fenton o mediando la inhibición del complejo IV mitocondrial (Olanow y Tatton, 1999).

#### - Factores Ambientales

El descubrimiento en 1983 de que la toxina sintética MPTP podía causar parkinsonismo en humanos (Langston *et al*, 1984) y el posterior descubrimiento de que daña selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la SNc, dio pie a que se hayan identificado otras toxinas exógenas asociadas con el desarrollo del parkinsonismo (Dauer y Przedborski, 2003; De Lau y Breteler, 2006; Greenamyre y Hasting, 2004; Wolfgang *et al*, 2003). Se ha propuesto que dichas toxinas tienen como objetivo particular la mitocondria (Surmeier *et al*, 2010), como el herbicida paraquat y la rotenona, pesticidas que son inhibidores selectivos del complejo I mitocondrial que inducen la disminución de DA en estudios con animales (Betarbet *et al*, 2000; Greenamyre y Hasting, 2004; Lai *et al*, 2002; Wolfgang *et al*, 2003). También se incluyen diluyentes de laca, disolventes orgánicos, monóxido de carbono y disulfuro de carbono (Olanow y Tatton, 1999), así como exposición a metales pesados tales como hierro, cobre, plomo, amalgamas, aluminio, zinc o manganeso, pues se ha planteado la posibilidad de que aumentan el riesgo de EP a través de su acumulación en la SN y provocando el aumento de estrés oxidativo (Temlett *et al*, 1994; Lai *et al*, 2002; Benedetto *et al*, 2009).

## MANGANESO (Mn)

El Mn está presente en el ambiente y alimentos, se puede encontrar en cereales, té, legumbres, frutos secos, entre otros (Jankovic, 2005; Milatovic *et al*, 2011; Chakraborty y Aschner, 2012). Se encuentra en todos los tejidos del organismo pues es esencial para la síntesis de algunos aminoácidos, lípidos, proteínas y carbohidratos además de ser necesario para muchas reacciones enzimáticas (Aposhian *et al*, 1999; Erikson y Aschner, 2003; Dobson *et al*, 2004; Aschner *et al*, 2007; Dobson y Aschner, 2007; Benedetto *et al*, 2009), actúa como cofactor en las enzimas Arginasa, Glutamina Sintetasa y la enzima mitocondrial Superóxido Dismutasa dependiente de Manganeso (SOD-Mn), enzima antioxidante muy importante presente en una amplia variedad de células, incluyendo las neuronas (Aschner y Aschner, 1991; HaMai y Bondy, 2004; Aschner y Aschner, 2005; Jankovic, 2005; Au *et al*, 2008; Benedetto *et al*, 2009; Yokel, 2009; Chakraborty y Aschner, 2012; Tuschl *et al*, 2013), también forma complejos estables con el ATP (Erikson y Aschner, 2003; HaMai y Bondy, 2004; Dobson y Aschner, 2007).

La exposición crónica a altos niveles de Mn tiende a acumularse en el cerebro (Rodier, 1955; Aschner y Aschner, 1991; Aschner y Aschner, 2005), especialmente en los ganglios basales, preferentemente en regiones ricas en DA (Aposhian *et al*, 1999; Milatovic *et al*, 2011; Zhang *et al*, 2011; Tuschl *et al*, 2013), pudiendo inducir neurotoxicidad (Sadek *et al*, 2003; Benedetto *et al*, 2009) y un síndrome neurológico parecido a la EP (Ali *et al*, 1995; Tran *et al*, 2002; Erikson y Aschner, 2003; Dobson *et al*, 2004; Olanow, 2004; Jankovic, 2005; Aschner, 2006; Fitsanakis *et al*, 2006; Aschner *et al*, 2007; Sistrunk *et al*, 2007; Au *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2011; Chakraborty y Aschner, 2012), pues provoca alteraciones en la integridad de las neuronas dopaminérgicas así como la neuroquímica de la DA, incluyendo disminución de la función del transporte de DA y los niveles de DA estriatal (Aposhian *et al*, 1999; Tran *et al*, 2002; HaMai y Bondy, 2004; Stredrick *et al*, 2004; Erikson *et al*, 2005; Ordoñez-Librado *et al*, 2008; 2010; 2011).

La toxicidad con Mn es llamada “manganismo” (Chakraborty y Aschner, 2012; Dobson *et al*, 2004; Milatovic *et al*, 2011; Tuschl *et al*, 2013) fue descrita por Couper en 1837 en 5 pacientes que trabajaban en una mina de extracción en Francia cuyo síntoma más prominente y temprano fue descrito como paraplejía, con las extremidades inferiores notablemente más afectados que las extremidades superiores (Rodier, 1955). Los síntomas clínicos se pueden clasificar en una fase inicial caracterizada por manifestaciones psiquiátricas como alucinaciones, psicosis, irritabilidad, impulsividad, agresividad, comportamiento obsesivo-compulsivo; todos estos síntomas son conocidos como “locura mangánica”; seguido de una fase intermedia con síntomas tales como bajo volumen al hablar, salivación, fatiga, dolor de cabeza, pérdida de apetito, insomnio, pérdida de expresión facial, inestabilidad al caminar; y finalmente la última fase donde los síntomas progresan y se caracterizan por debilidad muscular, postura inclinada, temblor en las extremidades, rigidez hipocinesia y distonía (Rodier, 1955; Wang *et al*, 1989; Sadek *et al*, 2003; Dobson *et al*, 2004; Olanow, 2004; Jankovic, 2005; Dobson y Aschner, 2007; Milatovic *et al*, 2011; Chakraborty y Aschner, 2012).

## **ABSORCIÓN DE Mn**

Las principales vías de entrada del Mn en los humanos son a través de la inhalación y de la ingestión (Rodier, 1955; Sadek *et al*, 2003; Milatovic *et al*, 2011). Su absorción depende en gran medida de la solubilidad, tamaño y forma de la partícula (Jankovic, 2005; Dobson y Aschner, 2007). El Mn puede encontrarse en múltiples estados de valencia, y esto determina el tipo de transportador que lo distribuirá por todo el cuerpo (Chen *et al*, 2001; Jankovic, 2005). Se encuentra comúnmente en su forma divalente ( $Mn^{2+}$ ), éste es rápidamente tomado en el torrente sanguíneo por la  $\gamma$ -globulina y la albúmina (alrededor del 80%), mientras que el Mn Trivalente ( $Mn^{3+}$ ) cuando es liberado al torrente sanguíneo se une con la transferrina (20%) (Aisen *et al*, 1969; Aschner, 2006; Au *et al*, 2008; Chakraborty y Aschner, 2012; Tuschl *et al*, 2013).

## TRANSPORTE DEL Mn AL CEREBRO

El Mn puede ser llevado por transportadores de alta afinidad (Au *et al*, 2008), pudiendo entrar al sistema nervioso central (SNC) a través de tres vías:

- a) Barrera hemato-encefálica (BBB por sus siglas en inglés): es una barrera física constituida por capilares especializados, separando a la sangre del cerebro, restringiendo el acceso a numerosos compuestos y permitiendo el paso de oxígeno, glucosa, aminoácidos y otros nutrientes esenciales para el cerebro, manteniendo así la homeostasis del SNC (Aschner y Aschner, 1991; Aschner, 2006; Aschner *et al*, 2007). El Mn cruza a través de las células endoteliales microvasculares (Yokel, 2009).
- b) A través del líquido cerebroespinal por medio de los plexos coroideos (Aschner *et al*, 2007; Yokel, 2009), que es un tejido altamente vascularizado cuya función principal es la producción y el mantenimiento de la homeostasis del fluido cerebroespinal (Aposhian *et al*, 1999). Las células endoceliales de los plexos coroideos tienen una densidad de receptores para transferrina intermedia entre los capilares cerebrales y las neuronas (Wang *et al*, 2008).
- c) Por medio de los sistemas olfativos y del nervio trigémino (Yokel, 2009; Tuschl *et al*, 2013), ambos expresan receptores sensoriales en el epitelio nasal que proyectan directamente al SNC proporcionando una ruta de entrada directa (Lewis *et al*, 2005).

El transportador de metales divalentes 1 (DMT-1) es considerado el principal transportador del  $Mn^{2+}$ , está localizado en de la membrana plasmática de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Aschner 2006; Aschner *et al*, 2007; Au *et al*, 2008; Benedetto *et al*, 2009), y se expresan en gran cantidad en los ganglios basales

(Huang *et al*, 2004; Tuschl *et al*, 2013). También puede entrar a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los potenciales de acción (Aschner y Aschner, 1991), pues se ha reportado que el  $\text{Mn}^{2+}$  tiene relativamente la misma carga y tamaño que el  $\text{Ca}^{2+}$  (Yokel, 2009). En cuanto al  $\text{Mn}^{3+}$ , cruza la BBB a través del complejo de transferrina (Aschner y Aschner, 1991; Yokel, 2009). En el núcleo Acumbens y Caudado-Putamen hay altas concentraciones de receptores transferrina, estas dos regiones presentan fibras eferentes al globo pálido y a la SN, que son ricas en Mn (Dobson *et al*, 2004; Dobson y Aschner, 2007). Así mismo se han relacionado a los transportadores ZIP, cuya función está orientada hacia la absorción de micronutrientes esenciales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (He *et al*, 2006) (Fig. 2).

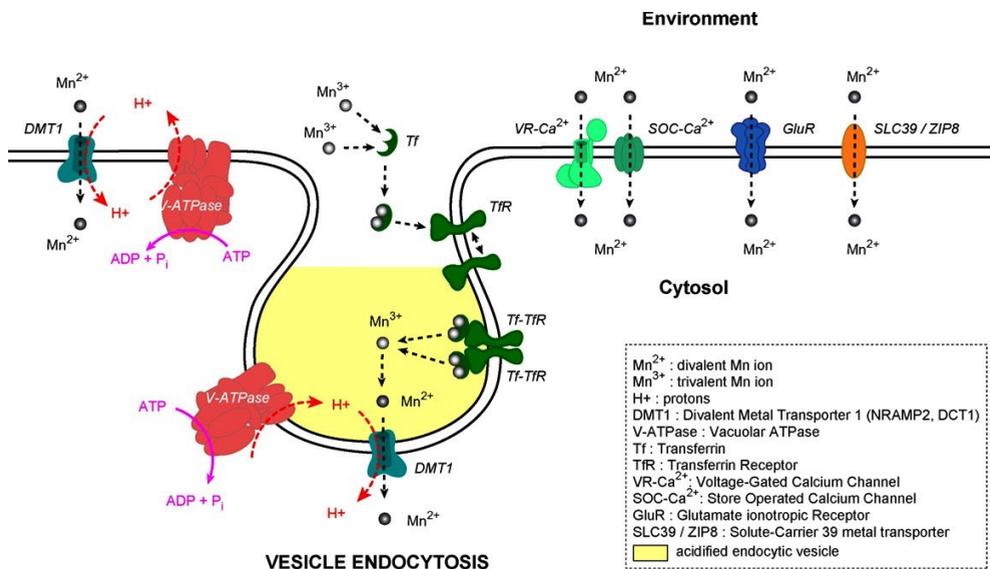


Fig. 2. Mecanismos moleculares de la absorción del Mn a través de la membrana de la BBB. El DMT-1 es un simporte que depende de la fuerza protón-motriz generada por la ATPasa vacuolar (V-ATPasa), ésta proteína, a través del uso de ATP, expulsa protones ( $\text{H}^+$ ) al espacio extracelular que son llevados nuevamente al interior de la célula. La recaptura de protones desde el espacio extracelular

proporciona la energía para el transporte de cationes  $Mn^{2+}$  a la célula. El gradiente de protones generado por la V-ATPasa, también es responsable de la acidificación de las vesículas endocíticas. Tras la acidificación, el ion  $Mn^{3+}$  es liberado por el sistema transferrina/receptor y convertido en  $Mn^{2+}$  disponible para ser transportado por el DMT-1. Los transportadores dependientes de voltaje como los canales de  $Ca^{2+}$ , el receptor ionotrópico de Glu y el transportador de metales 39 (SLC39) miembro de la familia ZIP8, se ha sugerido que participan en la absorción de Mn a través de la BBB (Au *et al*, 2008).

## **MECANISMOS TOXICOS DEL Mn**

Actualmente, la hipótesis más aceptada es que una vez que el Mn entra al cerebro, es tomado por los oligodendrocitos y astrocitos para su uso o almacenamiento (Aschner *et al*, 2007; Yokel, 2009). Los astrocitos sirven como el principal regulador homeostático y el sitio de almacenamiento de Mn en el cerebro, pues regulan las concentraciones de iones y neurotransmisores, removiendo toxinas así como desechos del espacio extracelular, y el Mn disminuye la captación por parte de los astrocitos, alterando los niveles de Glu extracelular provocando excitotoxicidad en las neuronas cercanas a los astrocitos afectados (Dobson *et al*, 2004; Fitsanakis *et al*, 2006; Gunter *et al*, 2006). También, el Mn induce directamente la activación de la microglia e incrementa los productos que preceden a la muerte neuronal (Zhao *et al*, 2009) como especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS), prostaglandinas y citocinas proinflamatorias (Orr *et al*, 2002).

La captación neuronal de Mn requiere a la transferrina y la utilización de sistemas de transporte específicos, tales como el transportador de DA (DAT) (Aposhian *et al*, 1999; Erikson *et al*, 2005; Anderson *et al*, 2007; Roth *et al*, 2013). A nivel celular, el Mn se acumula preferentemente en las mitocondrias (Aschner y Aschner, 2005), entrando a través de los canales  $Ca^{2+}$ , afectando el flujo de este y provocando disminución en la concentración de ATP (HaMai y Bondy, 2004; Gunter *et al*, 2006; Milatovic *et al*, 2011). Dentro de la mitocondria, el Mn se une a proteínas de la membrana o de la matriz mitocondrial (Gavin *et al*, 1990; Zhang *et al*, 2003) interactuando con

proteínas implicadas en la fosforilación oxidativa, inhibiendo directamente el complejo I (Chen *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2004; Benedetto *et al*, 2009) aumentando la formación de ROS generadas por la cadena de transporte de electrones (Zhang *et al*, 2003; HaMai y Bondy, 2004; Stredrick *et al*, 2004; Aschner y Aschner, 2005; Fitsanakis *et al*, 2006; Gunter *et al*, 2006; Dobson y Aschner, 2007; Tuschl *et al*, 2013).

El aumento de las ROS puede dañar directamente el ADN mitocondrial, provocando apoptosis en las neuronas involucradas (Chen *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2003; HaMai y Bondy, 2004; Stredrick *et al*, 2004; Dobson y Aschner, 2007). También se ha asociado con respuestas inflamatorias, incluyendo las prostaglandinas (Milatovic *et al*, 2011). Las ROS pueden actuar en conjunto con las RNS derivadas de los astrocitos y microglia para facilitar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, pues éstas poseen una reducida capacidad antioxidante, evidenciada por la baja concentración de GSH intracelular, lo que hace que sean más vulnerables al estrés oxidativo y a la activación glial en relación con otros tipos de células (Zhao *et al*, 2009).

El  $O_2^-$  producido en la cadena de transporte de electrones puede catalizar el cambio de transición de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  (Fig. 3) (Ali *et al*, 1995; HaMai y Bondy, 2004; Gunter *et al*, 2006), aumentando los niveles del  $Mn^{3+}$  que es considerado el mayor productor de  $O_2^-$  en la célula aumentando su capacidad oxidante (Aschner y Aschner, 1991; Dobson *et al*, 2004; Aschner, 2006). También se ha demostrado que el  $Mn^{3+}$  es más eficaz en la inhibición del complejo I mitocondrial (Chen *et al*, 2001; HaMai y Bondy, 2004) y se ha vinculado con la citotoxicidad de las células dopaminérgicas (Ali *et al*, 1995).

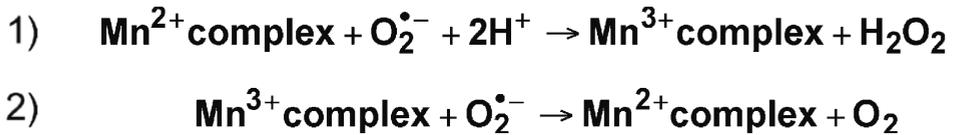


Fig. 3. Se muestran las reacciones propuestas por Archibald y Tyree donde describen la posible conversión del  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$  y viceversa por la acción del  $\text{O}_2^{\bullet -}$ . Estas reacciones son similares a las mediadas por Mn-SOD (Gunter *et al*, 2006).

## GANGLIOS BASALES

Los ganglios basales se componen de varios núcleos subcorticales interconectados que comprenden el telencéfalo, diencéfalo y mesencéfalo, los cuales son responsables de integrar y coordinar información de varias regiones del cerebro asociadas con las funciones motoras (Albin *et al*, 1989; Smith *et al*, 1998; Fitsanakis *et al*, 2006; Scanlon y Sanders, 2007; Gerfen y Bolam, 2010; Fahn *et al*, 2011; Kandel *et al*, 2013).

## ANATOMÍA DE LOS GANGLIOS BASALES

Están constituidos por cuatro núcleos conectados entre si (Fig. 4):

- 1) Núcleo estriado (NE): en primates está dividido por la cápsula interna en el núcleo caudado (NC) relacionado con la parte cognitiva del movimiento y el putamen (P) que es un sitio importante para la integración del movimiento, es el principal sitio de entrada a los ganglios basales, pues recibe proyecciones de la corteza y del tálamo (Albin *et al*, 1989; McGeer *et al*, 1979; Smith *et al*, 1998; Gerfen y Bolam, 2010; Fahn *et al*, 2011; Kandel *et al*, 2013).

El 90-95% de la población neuronal del NE esta constituido por las neuronas espinosas medianas (MSNs), caracterizadas principalmente por presentar una gran densidad de espinas que cubren a sus dendritas, tienen cuerpo celular de entre 12-20  $\mu\text{m}$  de diámetro (Parent y Hazrati, 1995; Gerfen y Bolam, 2010; Fahn *et al*, 2011). Estas neuronas contienen ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), encefalina, y sustancia P como neurotransmisores (McGeer *et al*, 1979). El 5% restante esta conformado por interneuronas GABAérgicas y colinérgicas que coexpresan neuropéptido Y, somatostatina, estas últimas carecen de espinas dendríticas (Kandel *et al*, 2013), tienen grandes cuerpos celulares y dendritas que se prolongan más de 250  $\mu\text{m}$  (Carpenter, 1994).

- 2) Globo pálido (GP): dividido en dos segmentos, externo (GPe) e interno (GPi), que en roedores es conocido como núcleo entopeduncular (Smith *et al*, 1998; Gerfen, 2004; Fahn *et al*, 2011) y es uno de los núcleos de salida de los ganglios basales (Gerfen y Bolam, 2010; Kandel *et al*, 2013). Las células que lo conforman son GABAérgicas (Carpenter, 1994; Fahn *et al*, 2011).
- 3) Sustancia nigra (SN) presenta dos porciones con las zonas pars reticulata (SNr), que se conforma por neuronas GABAérgicas, histológicamente es similar al GPi, y es el otro núcleo de salida de los ganglios basales, proyecta directamente hacia el tálamo y la zona pars compacta (SNc), compuesta por células grandes y pigmentadas que contienen altas concentraciones de DA (Carpenter, 1994; Fahn *et al*, 2011), proyectan prácticamente a todos los núcleos que conforman los ganglios basales, principalmente al estriado (Gerfen y Bolam, 2010; Kandel *et al*, 2013).
- 4) Núcleo subtalámico (NST): Las células que lo conforman contienen glutamato y ejercen efectos excitatorios sobre las neuronas del globo pálido y la sustancia nigra (Carpenter, 1994).

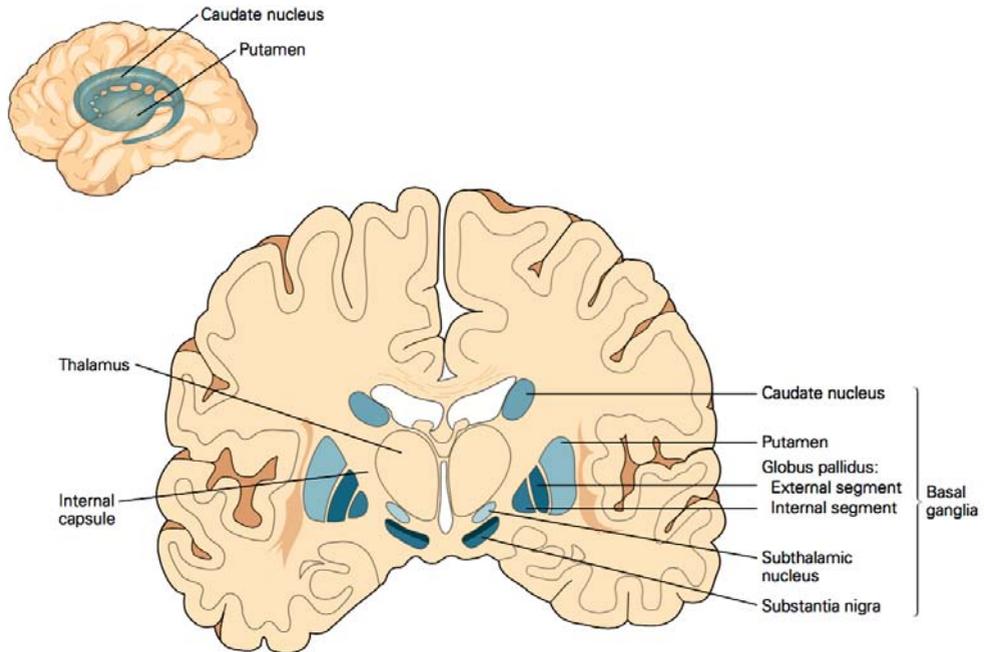


Fig. 4. Esquema de los ganglios basales (Kandel *et al*, 2013).

## ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES

Es ampliamente aceptado que a través de su interacción con la corteza cerebral, los ganglios basales están implicados en el procesamiento emocional, cognitivo y motor (Fahn *et al*, 2011; Kandel *et al*, 2013). Las conexiones de los ganglios basales, se pueden simplificar en base a circuitos que están organizados tanto estructural como funcionalmente, sin embargo la información puede cruzar de un circuito funcional a otro a través de las estructuras intrínsecas de los ganglios basales (Winn *et al*, 2010). Estos núcleos reciben proyecciones principalmente de la corteza cerebral, el tálamo, y ciertos núcleos del tronco cerebral (Carpenter, 1994;

Parent y Hazrati, 1995; Fitsanakis *et al*, 2006) involucrandose diferentes partes de los ganglios basales, proyectando a través del tálamo hacia la corteza y el tronco cerebral (Kandel *et al*, 2013). Se han establecido los siguientes circuitos:

Circuito motor: implicado en la selección de movimientos, proyecta desde la corteza premotora caudal, corteza motora presuplementaria y corteza motora cingulada al estriado dorsolateral (Winn *et al*, 2010).

Circuito cognitivo: es responsable de la selección de ideas asociadas con la planificación de las acciones apropiadas, proyecta desde la corteza prefrontal dorsolateral hacia el estriado central y dorsal (Winn *et al*, 2010).

Circuito límbico: se cree que participa en la motivación, proyecta desde la corteza prefrontal medial y orbital al estriado ventromedial (Winn *et al*, 2010).

El circuito motor es modulado por dos vías paralelas que se extienden desde el cuerpo estriado a los dos núcleos de salida:

La vía directa que facilita la ejecución de movimientos y la vía indirecta que se encarga de la inhibición del movimiento (Smith *et al*, 1998; Gerfen y Bolam, 2010; Winn *et al*, 2010; Kandel *et al*, 2013). Ambas vías inician con la entrada glutamatérgica cortical a las células del cuerpo estriado, donde las neuronas estriatales de la vía directa proyectan directamente a los núcleos de salida (GPi y SNr) inhibiéndolos brevemente, permitiendo así al tálamo y en última instancia a la corteza ser activados, mientras que las neuronas estriatales de la vía indirecta inhiben la actividad del GPe, desinhibiendo al NST para finalmente activar los núcleos de salida, lo que provoca la inhibición del tálamo (Alexander y Crutcher, 1990; Fahn *et al*, 2011; Kandel *et al*, 2013).

## DEPLECIÓN DE DA

La dopamina de la SNc es un modulador de ambas vías (directa e indirecta) (Fahn *et al*, 2011). Las neuronas que proyectan en la vía directa expresan receptores de la familia D1 (receptores D1 y D5) que activan la adenil ciclasa que causa la conversión de ATP a adenosin monofosfato cíclico (AMPc), el aumento de la concentración de AMPc facilita la transmisión de señales, mientras que las neuronas que proyectan en la vía indirecta expresan receptores de la familia D2 (receptores D2, D3, y D4) que inhiben la adenilato ciclasa y disminuyendo la concentración de AMPc, reduciendo la transmisión de señales (Calabresi *et al*, 2000; Kandel *et al*, 2013).

La denervación dopaminérgica estriatal provoca incremento en la densidad de los receptores D2 y disminución en la densidad de los receptores D1 (Joyce, 1991), generando complejas alteraciones en el circuito de los ganglios basales (Fig. 5b-c), ocasionando sobreactivación de la vía indirecta, pues se sensibiliza la respuesta de los receptores D2 presinápticos, y como consecuencia se incrementa la actividad inhibitoria de la SNr y GPi sobre tálamo y finalmente a la corteza, resultando en la disminución del movimiento voluntario (Cepeda *et al*, 2010).

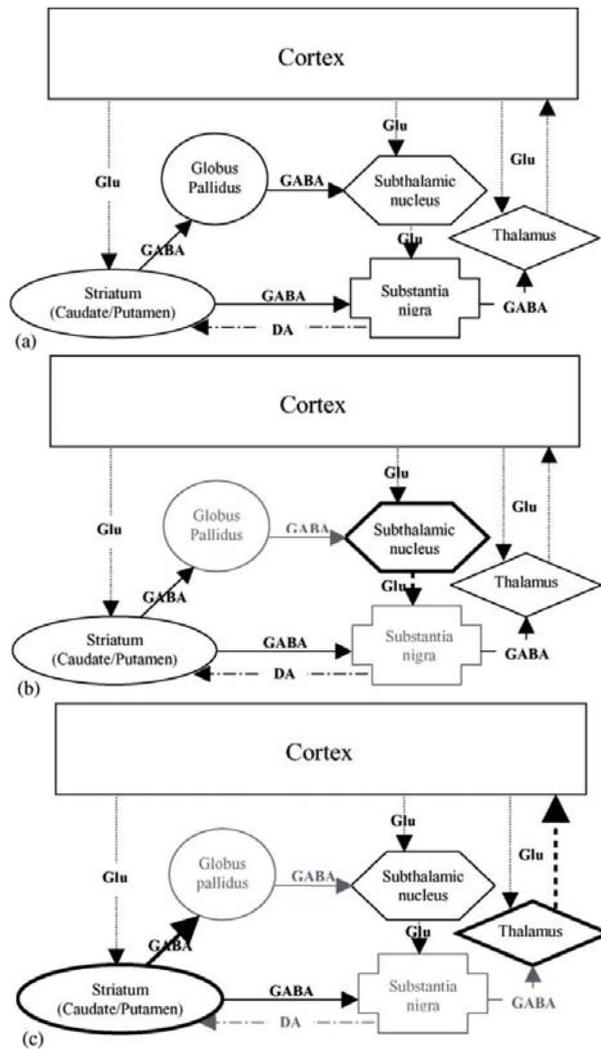


Fig. 5. Esquema de los circuitos de los ganglios basales y neurotransmisores involucrados durante (A) condiciones normales, (B) altos niveles de Mn (C) enfermedad de Parkinson. Núcleos grises en (B) y (C) son los afectados durante la respectiva condición patógena, lo que resulta en la degeneración y la baja regulación de sus respectivos neurotransmisores. Los núcleos con contornos negros gruesos serían sobreestimulados (Fitsanakis *et al*, 2006).

## **JUSTIFICACIÓN**

En el laboratorio de Neuromorfología se ha implementado un nuevo modelo de la enfermedad de Parkinson a través de la inhalación de la mezcla de cloruro ( $MnCl_2$ ) y acetato de manganeso ( $Mn(OAc_3)$ ), que produce alteraciones conductuales y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc de manera bilateral, no obstante se desconoce la progresión de dicha muerte neuronal. Es importante determinar la progresión y lateralidad de la muerte neuronal, pues hacerlo permitirá explorar experimentalmente las distintas etapas de la enfermedad, ya que éstas son determinantes para elegir los tratamientos con el fin de tener mejor control de los síntomas y menor grado de complicaciones.

Experimentalmente se ha limitado la investigación de la enfermedad de Parkinson pues los modelos existentes, además de ser invasivos y agudos, no representan sus particularidades clínicas en el curso temporal.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la progresión y la lateralidad de la muerte neuronal en la SNc de ratones expuestos a la mezcla de  $MnCl_2/Mn(OAc_3)$  a diferentes tiempos.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

- Comparar el número de neuronas TH+ remanentes en la SNc de ratones control y en ratones expuestos a una mezcla de  $MnCl_2/Mn(OAc_3)$ , a los 15 días, uno, dos, tres, cuatro y cinco meses.

## MÉTODO

Se utilizaron 72 ratones macho de la cepa CD-1 con un peso inicial de  $35\pm 2$ gr. Se dividieron en dos grupos de 36 ratones cada uno, el primer grupo fue expuesto a inhalación de agua desionizada (grupo control) y el segundo grupo fue expuesto a la inhalación de la mezcla de 0.04M de  $MnCl_2$  y 0.02M de  $Mn(OAc)_3$ , en una caja de acrílico durante una hora dos veces por semana.

Se sacrificaron 6 ratones control y 6 ratones expuestos a los 15 días, otros 6 ratones control y 6 ratones expuestos al mes e igualmente a los dos, tres, cuatro y cinco meses de haber comenzado con las exposiciones. Una vez terminado el tiempo de inhalación fueron perfundidos vía intracardiaca con solución salina al 0.9% y se fijaron con paraformaldehído al 2%, se extrajeron los cerebros y se hicieron cortes histológicos de 50  $\mu m$  del mesencéfalo donde se encuentra la SNc, posteriormente el tejido se procesó con la técnica de inmunohistoquímica para TH (anti-TH Millipore 1:1000, anti IGg de conejo Vectastain 1:200, revelado con Diaminobenzidina), esta técnica se realiza para identificar la presencia de la enzima tiroxina hidroxilasa (TH) que es la enzima limitante en la síntesis de DA en las neuronas dopaminérgicas de la SNc. Finalmente se realizó el conteo de las neuronas positivas a TH en el lado derecho y el lado izquierdo en un área de 1500  $\mu m^2$  en 6 cortes por animal.

Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA de una vía y la prueba *post hoc* de Tukey.

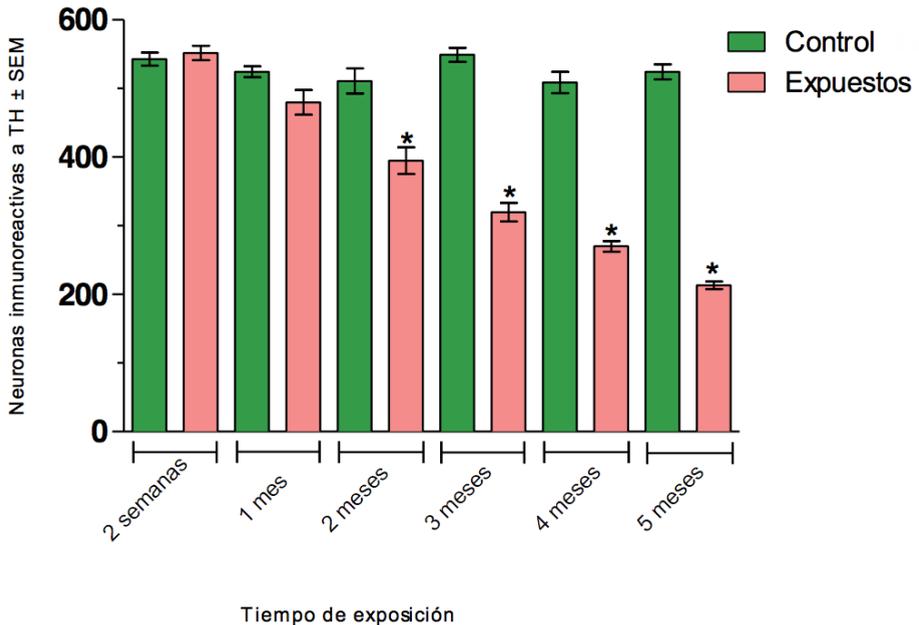
## **RESULTADOS**

Al comparar el grupo control con el grupo expuesto, se observó que con la inhalación de la mezcla de compuestos de Mn, las neuronas dopaminérgicas de la SNc fueron susceptibles, pues al realizar el conteo de neuronas inmunopositivas a TH, se apreció disminución significativa en los animales expuestos, con respecto al grupo control (Fig. 6), además se observó lateralidad en cuanto a la muerte neuronal, la cual no se aprecia en los animales del grupo control.

### **NEURONAS INMUNORREACTIVAS A TIROSINA HIDROXILASA**

Como se puede apreciar en la gráfica 1 el grupo control mantuvo el número de neuronas inmunopositivas a TH a lo largo de los periodos de sacrificio, a diferencia del grupo experimental donde se puede observar disminución significativa en el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc que es dependiente del tiempo de exposición a la mezcla de Mn. A partir del primer mes de iniciado el experimento, es posible notar cierta tendencia de disminución, pero fue a partir de los dos meses que esta disminución comenzó a ser significativa con un 28.08% menos neuronas, así como del 41.74% a los tres meses, 50.82% a los cuatro meses y 61.16% a los 5 meses, con respecto al grupo control.

## Neuronas Inmunopositivas a TH en la SNc



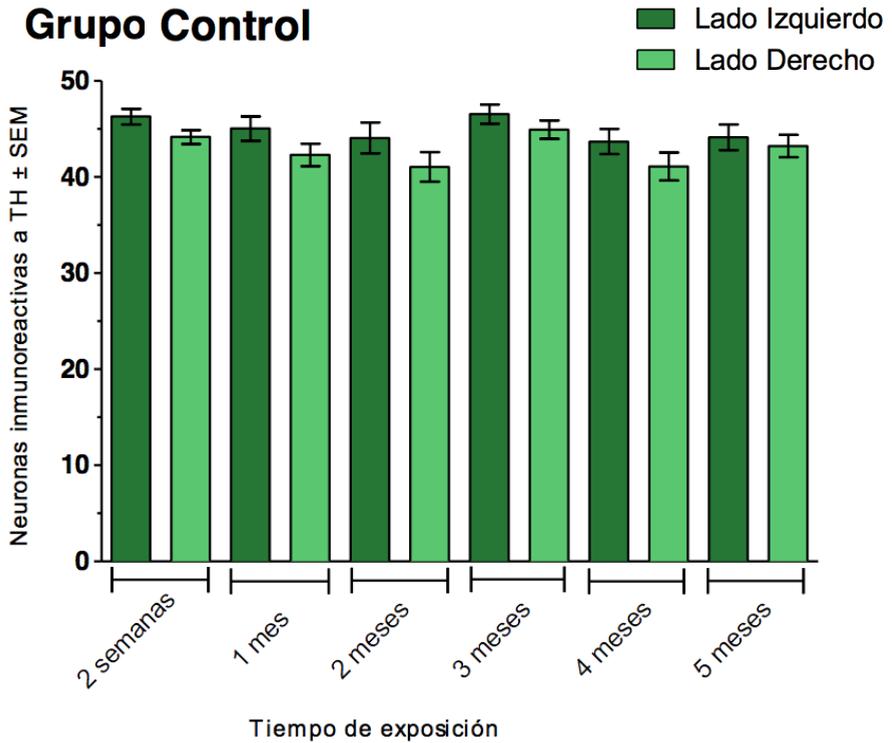
Gráfica 1. Número de células inmunopositivas a TH en la SNc a los diferentes tiempos de exposición a la mezcla de Manganeseo. Los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar (\* $p < 0.05$  vs grupo control).

## LATERALIZACIÓN DE LA MUERTE NEURONAL

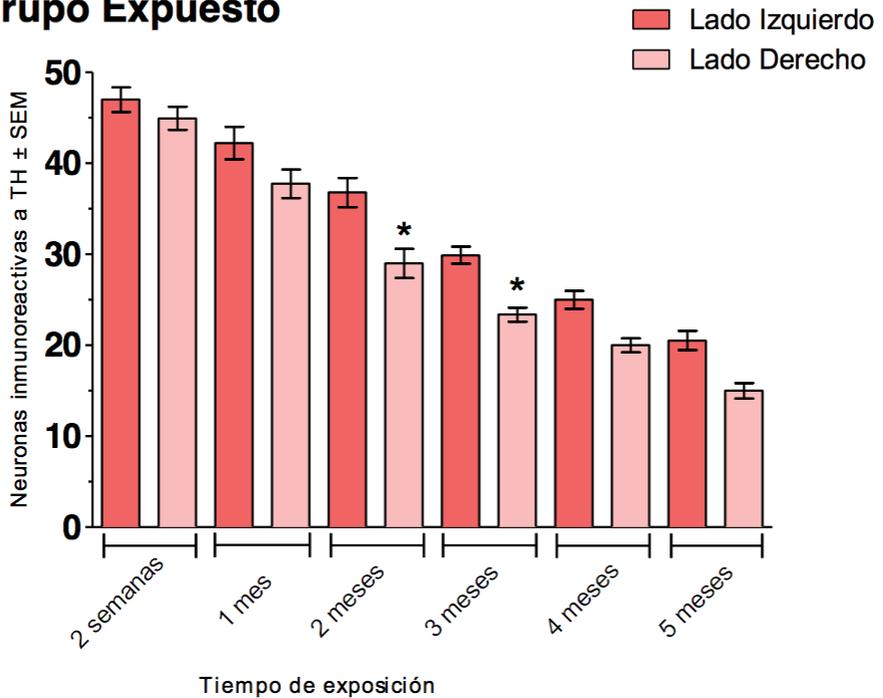
El grupo control mantuvo un número similar de neuronas cuya variación no fue mayor al 6% durante todo el experimento, tanto en el lado derecho como en el lado izquierdo. Cabe señalar que el número de neuronas inmunopositivas a TH siempre fue mayor del lado izquierdo que del lado derecho, no mayor al 6%, no obstante esta diferencia entre ambos lados no fue significativa (Gráfica 2A). En cuanto al grupo expuesto a la mezcla de Mn, presentaron una disminución drástica en el número de neuronas en la SNc de ambos hemisferios, siendo esta reducción más evidente en el lado derecho que en el izquierdo, indicando que hay lateralización en el daño inducido por el Mn, siendo estadísticamente significativo únicamente

a los 2 meses de iniciada la exposición a Mn con un 16.61% y a los 3 meses un 13.89% menos neuronas con respecto al lado menos afectado (Gráfica 2B).

### A Grupo Control



## B Grupo Expuesto



Gráfica 2. Número de células inmunopositivas a TH en la SNc izquierda y derecha a los diferentes tiempos. A Grupo Control. B Grupo Expuesto a la mezcla de Mn. Los datos son presentados como la media  $\pm$  error estándar (\* $p < 0.05$  vs lado izquierdo).



Fig. 6. Micrográfias representativas en 10x de cortes de la SNc con inmunohistoquímica para TH, donde se observan las neuronas dopaminérgicas remanentes en los animales control y expuestos a la mezcla de Mn.

# DISCUSIÓN

## NEURONAS INMUNORREACTIVAS A TIROSINA HIDROXILASA

La muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNc en los animales expuestos se explica mediante dos hechos:

1. Se ha reportado que el Mn entra a las neuronas dopaminérgicas a través del DAT (Aposhian *et al*, 1999; Erikson *et al*, 2005; Anderson *et al*, 2007; Roth *et al*, 2013), acumulándose dentro de la mitocondria, en donde puede inhibir al complejo I (Chen *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2004; Benedetto *et al*, 2009), provocando la formación de ROS, principalmente de  $O_2^-$ . El  $Mn^{3+}$  en pequeñas cantidades es capaz de catalizar la transición de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  en presencia de  $O_2^-$  (Fig. 3) (Ali *et al*, 1995; HaMai y Bondy, 2004; Gunter *et al*, 2006). El  $Mn^{3+}$  es reconocido como un potente agente oxidante y se ha vinculado con la citotoxicidad en las neuronas dopaminérgicas (Ali *et al*, 1995).
2. El metabolismo de la DA genera  $H_2O_2$  (Sofic *et al*, 1992),  $O_2^-$  y  $OH^*$ , lo que hace vulnerable a las neuronas dopaminérgicas por lo que se propicia un ambiente para la generación de ROS, y para que el  $Mn^{3+}$  oxide con mayor eficiencia a la DA provocando niveles excesivos de ROS (Archibald y Tyree, 1987).

Por lo que la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc en los animales expuestos puede explicarse por el hecho de que la toxicidad del Mn puede producir niveles citotóxicos de radicales libres e inducir estrés oxidativo (Zhang *et al*, 2004).

La inhalación de la mezcla de  $MnCl_2/Mn(OAc)_3$  produjo degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNc a partir del primer mes de exposición observándose muerte progresiva

dependiente del tiempo de exposición, donde a los 5 meses se observó una pérdida significativa del 61.16%, lo que concuerda con lo reportado por Ordoñez-Librado *et al*, en 2008; se observó una disminución del 67.58% de neuronas dopaminérgicas, además reportaron alteraciones motoras entre las seis y diez semanas después de haber iniciado la exposición a la mezcla (Ordoñez-Librado *et al*, 2011), es decir, alrededor de los dos meses, que es el tiempo en el que la reducción de neuronas dopaminérgicas (28.08%) comenzó a ser significativa. Estos resultados concuerdan con la EP, ya que en el momento en el que aparecen los primeros síntomas ya se han perdido alrededor del 60-70% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc (Fearnley y Lees, 1991; Damier *et al*, 1999; Dauer y Przedborski, 2003; Wolfgang *et al*, 2003; Estrada-Bellmann y Martínez, 2011).

## **LATERALIZACIÓN DE LA MUERTE NEURONAL**

La inhalación de la mezcla de  $MnCl_2/Mn(OAc)_3$  provocó lateralización de la muerte neuronal, observándose un 16.81% y 13.89% menos neuronas a los dos y tres meses respectivamente, en el hemisferio derecho con respecto al izquierdo, asemejándose a lo sucedido en la EP, donde se reportó una reducción de hasta el 25% en el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc del lado contralateral al lado del cuerpo más afectado, con respecto a la parte menos afectada (Kempster *et al*, 1989). Esta asimetría se ha asociado con la mano dominante, (56-58%) (Kempster *et al*, 1989; De la Fuente-Fernández *et al*, 2000; Barrett *et al*, 2011), pudiendo argumentar que, dado que la mano dominante es naturalmente más activa, las neuronas dopaminérgicas de la SNc contralateral serían más vulnerables, conduciendo a una muerte más acelerada (Melamed y Poewe, 2012). Sin embargo, no está claro si existe una relación entre el lado de aparición de los síntomas motores iniciales en la EP y la mano dominante (Stochl *et al*, 2009), pues hay una considerable proporción de pacientes con signos de la enfermedad predominantemente en su mano no dominante (Scherfler *et al*, 2012).

Actualmente, no existe una explicación válida en cuanto al por qué en la EP las neuronas dopaminérgicas de un hemisferio son más vulnerables que sus homólogas contralaterales, dañándose antes y más severamente en el curso de la enfermedad (Djaldetti *et al*, 2006; Melamed y Poewe, 2012; Scherfler *et al*, 2012).

Se han sugerido dos hipótesis:

1. La asimetría de los síntomas motores en la EP puede ser debida a variaciones normales innatas en el número de neuronas dopaminérgicas de la SNc (Barrett *et al*, 2011) entre el lado derecho e izquierdo del meencéfalo (aproximadamente 5%) (McRitchie *et al*, 1995), alcanzando así, el umbral crítico de pérdida de células antes que el lado con el número de células superior y por lo tanto, los signos motores aparecerán primero en el lado contralateral, de una manera asimétrica (Djaldetti *et al*, 2006; Melamed y Poewe, 2012) (Fig. 7A).
2. La SNc de un hemisferio es más vulnerable que la del otro hemisferio y una vez que se inicia el proceso degenerativo, la muerte celular se produce primero en ese lado (Toth *et al*, 2004; Pedrosa *et al*, 2014) (Fig. 7B). Algunas de las posibles causas que se pueden relacionar con esta vulnerabilidad son el debilitamiento de la BBB que es más pronunciado en un lado que en el otro (Kortekaas *et al*, 2005) o por las asimetrías en cuanto a las concentraciones de los neurotransmisores en los ganglios basales (Glick *et al*, 1982).

Ciertamente la primera hipótesis apoya los resultados obtenidos, ya que el lado que resultó más afectado en los animales expuestos a la mezcla de Mn, fue el lado con menor número de neuronas dopaminérgicas en los animales control, sin embargo sería necesario determinar las concentraciones de Mn y DA de cada hemisferio así como evaluar la coordinación motora en cada

extremidad de los animales, para así poder esclarecer lo que está ocurriendo en la SNc de cada hemisferio.

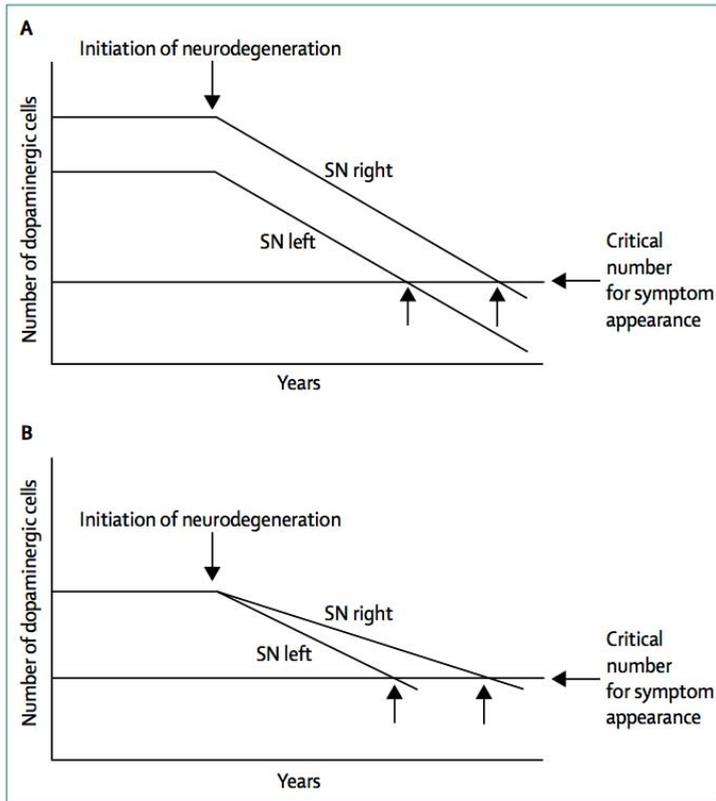


Fig. 7. Posibles teorías que explican la asimetría. A: un número desigual innato de las neuronas dopaminérgicas entre ambos hemisferios provoca que el lado con el menor número de neuronas degenera hasta el punto en que los síntomas aparezcan primero en la extremidad contralateral. B: La SNc de un hemisferio es más vulnerable, y una vez que la causa de la enfermedad se presenta, ese lado degenerará primero y alcanzará el nivel crítico para que los síntomas surjan (Djaldetti *et al*, 2006).

## CONCLUSIÓN

La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc, junto con la disminución del contenido de DA estriatal representan las alteraciones más importantes en la EP, por lo que los modelos animales se han enfocado en la depleción de DA, tales como el de MPTP (Langston *et al*, 1984), 6-Hidroxidopamina (Ungerstedt, 1968), rotenona (Betarbet *et al*, 2000), que se han utilizado para estudiar los efectos de la deficiencia de DA y aunque estos modelos han sido invaluableles esclareciendo las consecuencias de la pérdida de neuronas dopaminérgicas, su utilidad para estudiar el desarrollo de alteraciones fisiopatológicas en la EP sigue siendo limitada, ya que se basan principalmente en los mecanismos neurotóxicos y la administración aguda.

El modelo de inhalación de la mezcla de Mn implementado en el laboratorio de Neuromorfología produce alteraciones neuroquímicas y conductuales (Ordoñez-Librado *et al*, 2011), que sumados a los resultados presentados en este trabajo donde se muestra que la degeneración de las neuronas dopaminérgicas se llevó a cabo de manera lateralizada, bilateral, gradual y progresiva, muy similar a lo que ocurre en la EP, lo que permite explorar experimentalmente las distintas etapas de la enfermedad, pudiendo ser útil en el desarrollo y pruebas de terapias neuroprotectoras.

Por lo que podemos concluir que este es un modelo ideal para el estudio de la Enfermedad de Parkinson.

## LITERATURA CITADA

Aisen P, Aasa R, Redfield AG. 1969. The chromium, manganese, and cobalt complexes of transferrin. *The Journal of Biological Chemistry*; 244(17):4628-4633.

Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neuroscience*; 12(10):366-375.

Alexander GE., Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neuroscience*; 13(7):266-271.

Ali SF, Duhart HM, Newport GD, Lipe GW, Slikker W. 1995. Manganese-induced reactive oxygen species: comparison between  $Mn^{2+}$  and  $Mn^{3+}$ . *Neurodegeneration*; 4:329-334.

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.

Aposhian HV, Ingersoll RT, Montgomery EB. 1999. Transport and control of manganese ions in the central nervous system. *Environmental Research*; 80:96-98.

Archibald FS, Tyree C. 1987. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 256(2):638-650.

Aschner JL, Aschner M. 2005. Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*; 26:353-362.

Aschner M, Aschner JL, 1991. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*; 15:333-340.

Aschner M. 2006. The transport of manganese across the blood-brain barrier. *NeuroToxicology*; 27:311-314.

Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. 2007. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 221:131-147.

Au C, Benedetto A, Aschner M. 2008. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *NeuroToxicology*; 29:569-576.

Barrett MJ, Wylie SA, Harrison MB, Wooten GF. 2011. Handedness and motor symptom asymmetry in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*; 82(10):1122-1124.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 87:1620-1624.

Benedetto A, Au C, Aschner M. 2009. Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shares with Parkinson's disease. *Chemical Reviews*; 109:4862-4884.

Betarbert R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*; 3(12):1301-1306.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen ENHS, Braak E. 2002. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*; 24:197-211.

Calabresi P, Centonze D, Bernardi G. 2000. Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends in Neuroscience*; 23(10):57-63.

Cepeda C, Bamford NS, André VM, Levine MS. 2010. Capítulo 35: Alterations in corticostriatal synaptic function in Huntington's and Parkinson's diseases. En Steiner, H., Tseng, K. Y. (eds). *Handbook of basal ganglia structure and function*. 1ra edición. Elsevier Academic Press. Londres, Reino Unido. pp. 3-28.

Carpenter MB. 1994. *Neuroanatomía Fundamentos*. 4ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Montevideo, Uruguay. pp. 311-331.

Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M, López-Ruiz M, Estrada-Bellmann I, Zuñiga-Ramírez C, Otero-Cerdeira E, Camacho-Ordoñez A, González-Latapí P, Morales-Briceño H, Martínez-Ramírez D. 2013. Caracterización de la enfermedad de Parkinson en México: estudio ReMePARK. *Gaceta Médica de México*; 149:497-501.

Chakraborty S, Aschner M. 2012. Altered manganese homeostasis: implication for BLI-3-dependent dopaminergic neurodegeneration and SKN-1 protection in *C. elegans*. *Journal of Trace Element in Medicine and Biology*; 26:183-187.

Chen JY, Tsao GC, Zhao Q, Zheng W. 2001. Differential cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 175:160-168.

Couper J. 1837. On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *British Annals of Medicine, Pharmacy, Vital Statistics and General Science*; 1:41-42.

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. 1999. The substantia nigra of the human brain II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*; 122:1437-1448.

Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*; 39:889-909.

De Lau LML, Breteler MMB. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*; 5:525-535.

De la Fuente-Fernández R, Schulzer M, Mak E, Kishore A, Calne DB. 1998. The role of the Lewy body in idiopathic parkinsonism. *Parkinsonism and Related Disorders*; 4:73-77.

De la Fuente-Fernández R, Kishore A, Calne DB, Ruth TJ, Stoessl AJ. 2000. Nigrostriatal dopamine system and motor lateralization. *Behavioural Brain Research*; 112:63-68.

Djaldetti R, Ziv I, Melamed E. 2006. The mystery of motor assymetry in Parkinson's disease. *Lancet Neurology*; 5:796-802.

Dobson AW, Erikson KM, Aschner M. 2004. Manganese neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1012:115-128.

Dobson AW, Aschner M. 2007. Capítulo 19 Manganese-induced oxidative stress. En Qureshi, GA., Parvez, SH. (eds). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. 1ra Edición. Elsevier Academic Press. Amsterdam, Holanda. pp. 433-450.

Ehringer H, Hornykiewicz O, 1998. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Parkinsonism and Related Disorders*; 4:53-57.

Emre M. 2007. Treatment of dementia associated with Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*; 13:457-461.

Erikson KM, Aschner M. 2003. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochemistry International*; 43:475-480.

Erikson KM, John CE, Jones SR, Aschner M. 2005. Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 20:390-394.

Estrada-Bellmann I, Martínez RHR. 2011. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Revista Avances*; 8(25):16-22.

Fahn S, Jankovic J, Hallett M. 2011. Capítulo 3: Functional neuroanatomy of the basal ganglia. Capítulo 5: Current concepts on the etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Principles and practice of movement disorders*. 2da Edición. Elsevier Academic Press. Maryland, Estados Unidos. pp. 55-65, 93-118.

Fahn S. 2015. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Movement Disorders*; 30:4-18.

Faucheux BA, Nilless N, Damier P, Spik G, Mouatt-Prigent A, Pierce A, Leveugle B, Kubis N, Hauw JJ, Agid Y, Hirsch EC. 1995. Expression of lactoferrin receptors is increased in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 92:9603-9607.

Fearnley JM, Lees AJ. 1991. Ageing and Parkinson's disease; substantia nigra regional selectivity. *Brain*; 114:2283-2301.

Fitsanakis VA, Au C, Erikson KM, Aschner M. 2006. The effects of manganese on glutamate, dopamine and  $\gamma$ -aminobutyric acid aegulation. *Neurochemistry International*; 48:426-433.

Floyd RA. 1999. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radical Biology & Medicine*; 26(9/10):1346-1355.

Forno LS, DeLanney, L. E., Irwin, I., Di Monte, D. Langston J. W. 1992. Astrocytes and Parkinson's disease. *Progress in Brain Research*; 94:429-436.

Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE. 1990. Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. *Biochemical Journal*; 266:329-334.

Gerfen CR. 2004. Capitulo 18: Basal ganglia. En Paxinos G. (ed). *The rat nervous system*. 3ra edición. Elsevier Academic Press. California, Estados Unidos. pp. 455-508.

Gerfen CR, Bolam JP. 2010. Capítulo 1: The neuroanatomical organization of the basal ganglia. En Steiner, H., Tseng, K. Y. (eds). *Handbook of basal ganglia structure and function*. 1ra edición. Elsevier Academic Press. Londres, Reino Unido. pp. 3-28.

Gibb WRG, Lees AJ. 1988. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*;51:745-752.

Glick SD, Ross DA, Hough LB. 1982. Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. *Brain Research*; 234:53-63.

Goken-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. 2004. Parkinsonism among caucher disease carriers. *Journal of Medical Genetics*; 41:937-940.

Good PF, Olanow CW, Perl DP. 1992. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: A LAMMA Study. *Brain Research*; 593:343-346.

Greenamyre JT, Hasting TG. 2004. Parkinson's-divergent causes, convergent mechanisms. *Science*; 304:1120-1122.

Gunter TE, Gavin CE, Aschner M, Gunter KK. 2006. Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *NeuroToxicology*; 27:765-776.

HaMai D, Bondy SC. 2004. Oxidative basis of manganese neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1012:129-141.

Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A. 2006. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Annals Neurology*; 60:389-398.

He L, Girijashanker K, Dalton TP, Reed J, Li H, Soleimani M, Nebert DW. 2006. ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties. *Molecular Pharmacology*; 70:171-180.

Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK,

Berciano J, Schapira AHV, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. 2008. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of *LRRK2*-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurology*; 7:583-590.

Hely MA, Morris JGL, Traficante R, Reid WGJ, O'Sullivan DJ, Williamson PM. 1999. The Sydney multicentre study of Parkinson's disease: progression and mortality at 10 years. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*; 67:300-307.

Hirsch EC, Hunot S, Damier P, Faucheux B. 1998. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration?. *American Neurological Association*; 44:115-120.

Hoehn MM, Yahr MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology*; 17(5):427-442.

Hornykiewicz O. 2001. Chemical neuroanatomy of the basal ganglia-normal and in Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*; 22:3-12.

Huang E, Ong WY, Connor JR. 2004. Distribution of divalent metal transporter-1 in the monkey basal ganglia. *Neuroscience*; 128:487-496.

Jankovic J. 2005. Searching for a relationship between manganese and welding Parkinson's disease. *Neurology*; 64:2021-2028.

Jordán J. 2003. Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *Farmacología*; 22(3):102-112.

Joyce NJ. 1991. Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. *Experimental Neurology*; 113:261-276.

Kahle PJ, Waak J, Gasser T. 2009. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. *Free Radical Biology & Medicine*; 47:1354-1361.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. 2013. Parte VI Movement: The Basal Ganglia. *Principles of Neural Science*. 5ta Edición. Nueva York, Estados Unidos. pp. 982-998.

Kempster PA, Gibb WRG, Stern GM, Lees AJ. 1989. Asymmetry of substantia nigra neuronal loss in Parkinson's disease and its relevance to the mechanism of levodopa related motor fluctuations. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*; 52:72-76.

Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT. 2013. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain*; 136:2419-2431.

Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, Vaalburg W, Bart J, Willemsen ATM, Hedrikse NH. 2005. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain *In Vivo*. *Annals Neurology*; 57:176-79.

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*; 47:333-343.

Lai BCL, Marion SA, Teschke K, Tsui JKC. 2002. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinson and Related Disorders*;8:297-309.

Langston JW, Langston EB, Irwin I. 1984. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates. Clinical and experimental aspects. *Acta Neurologica Scandinavica*;100:49-54.

Lees AJ, Hardy J, Revesz T. 2009. Parkinson's disease. *Lancet*; 373:2055-2066.

Lewis J, Bench G, Myers O, Tinner B, Staines W, Barr E, Divine KK, Barrington W, Karlsson J. 2005. Trigeminal uptake and clearance of inhaled manganese chloride in rats and mice. *NeuroToxicology*; 26:113-123.

McGeer PL, McGeer EG, Hattori T. 1979. Biochemical interactions in the basal ganglia. *Progress in Brain Research*; 51:285-301.

McNaught KStP, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. 2004. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals Neurology*; 56:149-162.

McNaught KStP, Olanow CW. 2006. Protein aggregation in the pathogenesis of familial and sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*; 27:530-545.

McRitchie DA, Halliday GM, Cartwright H. 1995. Quantitative analysis of the variability of substantia nigra pigmented cell clusters in the human. *Neuroscience*; 68(2):539-551.

Melamed E, Poewe W. 2012. Taking sides: Is handedness involved in motor asymmetry of Parkinson's disease? *Movement Disorders*; 27(2):171-173.

Milatovic D, Gupta RC, Yin Z, Zaja-Milatovic S, Aschner M. 2011. Capítulo 34: Manganese. En Gupta RC. (ed). *Reproductive and Developmental Toxicology*. 1ra Edición. Elsevier Academic Press. Londres, Reino Unido. pp. 439-450.

Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. 1995. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*; 137:120-123.

Oestreicher E, Sengstock GJ, Riederer P, Olanow CW, Dunn AJ, Arendash GW. 1994. Degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons increases iron within the substantia nigra: a histochemical and neurochemical study. *Brain Research*; 660:8-18.

Olanow CW, Tatton WG. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*; 22:123-144.

Olanow CW. 2004. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Annals New York Academy of Sciences*; 1012:209-223.

Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KStP. 2004. Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurology*; 3:496-503.

Ordoñez-Librado JL, Gutierrez-Váldez AL, Colín-Barenque L, Anaya-Martínez V, Díaz-Bech P, Avila-Costa MR. 2008. Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience*; 155:7-16.

Ordoñez-Librado JL, Anaya-Martínez V, Gutierrez-Váldez AL, Montiel-Flores E, Corona DR, Martinez-Fong D, Avila-Costa MR. 2010. L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neuroscience Letters*; 471:79-82.

Ordoñez-Librado JL, Anaya-Martínez V, Gutierrez-Váldez AL, Colín-Barenque L, Montiel-Flores E, Avila-Costa MR. 2011. Manganese

inhalation as a Parkinson disease model. *Parkinson's Disease*; 2011:1-14.

Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. 2002. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*; 68:325-340.

Parent A, Hazrati LN. 1995. Functional anatomy of the basal ganglia I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Research Reviews*; 20:91-127.

Parkinson J. 1817. *Essay on the shaking palsy*. London Printed by Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely and Jones. pp 1-88.

Pedrosa DJ, Kahraman D, Schmidt M, Drzezga A, Timmermann L, Eggers C. 2014. Parkinson's disease with a predominant right-sided putaminal FP-CIT SPECT deficiency shows stronger decline of asymmetry over time. *Basal Ganglia*; 4:101-108.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. 1997. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*; 276:2045-2047.

Rodier J. 1955. Manganese poisoning in moroccan miners. *British Journal of Industrial Medicine*; 12(21):21-35.

Roth JA, Li Z, Sridhar S, Khoshbouei H. 2013. The effect of manganese on dopamine toxicity and dopamine transporter (DAT) in control and DAT transfected HEK cells. *Neurotoxicology*; 35:121-128.

Sadek AH, Rauch R, Schulz PE. 2003. Parkinsonism due to manganism in a welder. *International Journal of Toxicology*; 22:393-401.

Scanlon VC, Sanders T. 2007. *Essentials of anatomy and Physiology*. 5ta Edición. Frank Allston Davis Company. Filadelfia, Estados Unidos. pp. 183.

Scherfler C, Seppi K, Mair KJ, Donnemiller E, Virgolini I, Wenning GK, Poewe W. 2012. Left hemispheric predominance of nigrostriatal dysfunction in Parkinson's disease. *Brain*; 135:3348-3354.

Sengstock GJ, Olanow CW, Dunn AJ, Barone S, Arendash GW 1994. Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigra volume, and rotational behavior following iron infusion into the rat substantia nigra. *Experimental Neurology*; 130:82-94.

Sistrunk SC, Ross MK, Filipov NM. 2007. Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite dopac: an *In Vivo* study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 23:286-296.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam, JP. 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathway of the basal ganglia. *Neuroscience*; 86(2): 353-387.

Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. 1992. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*; 142(2):128-130.

Stochl J, Hagtvét KA, Brozová H, Klempír J, Roth J, Ruzicka E. 2009. Handedness does not predict side of onset of motor symptoms in Parkinson's disease. *Movement Disorders*; 24(12):1836-1839.

Stredrick DL, Stokes AH, Worst TJ, Freeman WM, Johnson EA, Lash LH, Aschner M, Vrana KE. 2004. Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. *NeuroToxicology*; 25:543-553.

Surmeier DJ, Guzmán JN, Sánchez-Padilla J, Goldberg JA. 2010. What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease?. *Progress in Brain Research*; 183: 59-77.

Tan EK, Drozdik M, Bialecka M, Honczarenko K, Klodowska-Duda G, Teo YY, Tang K, Wong LP, Chong SS, Tan C, Yew K, Zhao Y, Lee CGL. 2004. Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinson's disease in a white population. *Neuroscience Letters*; 372:240-244.

Tansey MG, Goldberg MS. 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: it's role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of Disease*; 37:510–518.

Temlett JA, Landsberg JP, Watt F, Grime GW. 1994. Increased iron in the substantia nigra compacta of the MPTP-lesioned hemiparkinsonian african green monkey: evidence from proton microprobe elemental microanalysis. *Journal of Neurochemistry*; 62:134-146.

Toth C, Rajput M, Rajput AH. 2004. Anomalies of asymmetry of clinical signs in parkinsonism. *Movement Disorders*; 19(2):151-157.

Tran TT, Chowanadisai W, Crinella FM, 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*;23:635-643.

Tuschl K, Mills PB, Clayton PT. 2013. Manganese and the brain. *International Review of Neurobiology*; 110:277-312.

Uchida K. 2003. 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*; 42:318-343.

Ungerstedt U. 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology*; 5:107-110.

Wang JD, Huang CC, Hwang YH, Chiang JR, Lin JM, Chen JS. 1989. Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter. *British Journal of Industrial Medicine*;46:856-859.

Wang X, Miller DS, Zheng W. 2008. Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a Rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 230:167-174.

Winn P, Wilson DIG, Redgrave P. 2010. Capítulo 23: Subcortical connections of the basal ganglia. En Steiner, H., Tseng, K. Y. *Handbook of basal ganglia structure and function*. 1ra edición. Elsevier Academic Press. California, Estados Unidos. pp. 397-408.

Wolfgang H, Oertel, Fahn S. 2003. Capítulo 74: Parkinsonism. En Brandt, T., Caplan, L. R., Dichgans, J., Diener, H. C., Kennard, C. *Neurological disorders: course and treatment*. 2da Edición. Elsevier Academic Press. California, Estados Unidos. pp. 1021-1079.

Yokel RA. 2009. Manganese flux across the blood-brain barrier. *NeuroMolecular Medicine*; 11:297-310.

Youdim MB H, Grünblatt E, Mandel S. 1999. The pivotal role of iron in NF- $\kappa$ B activation and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for neuroprotection in Parkinson's

disease with iron chelators. *Annals New York Academy of Science*; 890:7-25.

Zhang D, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy A. 2011. Effects of Manganese on tyrosine hydroxylase (TH) activity and TH-phosphorylation in a dopaminergic neural cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 254:65-71.

Zhang S, Zhou Z, Fu J. 2003. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environmental Research*; 93:149-157.

Zhang S, Fu J, Zhou Z. 2004. In Vitro effect of manganese chloride exposure on reactive oxygen species generation and respiratory chain complexes activities of mitochondria isolated from rat brain. *Toxicology in Vitro*; 18:71-77.

Zhao F, Cai T, Liu M, Zheng G, Luo W, Chen J. 2009. Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism. *Toxicological Sciences*; 107(1):156-164.

Zhao YJ, Wee HL, Chan YH, Seah SH, Au WL, Lau PN, Pica EC, Li SC, Tan LC. 2010. Progression of Parkinson's disease as evaluated by Hoehn and Yahr stage transition times. *Movement Disorders*; 25(6):710-716.

## ANEXOS

Anexo 1. Clasificación de Hoehn y Yahr (Tomada de Hoehn y Yahr, 1967).

Estadio I	Enfermedad exclusivamente unilateral. Sin afectación funcional o con mínima afectación.
Estadio II	Afectación bilateral. Sin alteración del equilibrio.
Estadio III	Enfermedad bilateral. Discapacidad leve a moderada. Alteración de los reflejos posturales.
Estadio IV	Enfermedad gravemente discapacitante. Aún capaz de caminar o de permanecer en pie sin ayuda.
Estadio V	Confinamiento en cama o en silla de ruedas si no tiene ayuda

Anexo 2. Genes asociados a la EP. D dominante y R recesivo (Fahn *et al* 2011).

Gen	Proteína	Modo de Herencia	Edad de Inicio (años)	Progresión Características Clínicas	Función Proteica
SCNA (PARK1)	Mutaciones de $\alpha$ -sinucleína	D	45	Rápida; Demencia, Hipoventilación, Mioclonía, Movimientos Extraoculares Anormales, Incontinencia	Tráfico vesicular, posiblemente sinápticas
PRKN (PARK2)	Parkin	R inicio juvenil; D inicio tardío	20	Muy lenta; Distrofia inicial, Sin cuerpos de Lewy	Ubiquitina ligasa E3, se une a cadenas de péptidos cortos para su degradación
PARK3	Desconocida	D	59	Lenta; Indistinguible de la EP idiopática	-
SCNA (PARK4)	Exceso $\alpha$ -sinucleína	D	33	Rápida; Amplio número de síntomas hasta demencia con cuerpos de Lewy	Tráfico vesicular, posiblemente sinápticas
UCHL1 (PARK5)	Ubiquitina C Hidrolasa L1	D	50	Indistinguible de la EP idiopática	Elimina la Poliubiquitina en el ciclo Ubiquitina proteasomal

Gen	Proteína	Modo de Herencia	Edad de Inicio (años)	Progresión Características Clínicas	Función Proteica
PINK1 (PARK6)	PTEN inducida Cinasa putativa 1	R	40	Lenta	Cinasa mitocondrial serina-treonina, Modula la dinámica mitocondrial
DJ-1 (PARK7)	DJ-1	R	33	Lenta; con problemas conductuales y distonía focal	Posible peroxirredoxina, Protege contra el estrés oxidativo
LRRK2 (PARK8)	Dardarina	D	60	Indistinguible de la EP idiopática	Cinasa citoplasmática probablemente
ATP13A2 (PARK9)	ATPasa Lisosomal	R	12-16	Síndrome Kufor-Rakeb, similar a la EP	Mantiene el pH ácido en el lisosoma
PARK10	Desconocida	R	> 40	EP Típica	-
PARK11	Desconocida	D	> 40	Indistinguible de la EP idiopática	-
PARK12	Desconocida	R ligado al cromosoma X	> 40	Indistinguible de la EP idiopática	-
HTRA2 (PARK13)	Proteína A2 (HTRA2)	D	> 40	Indistinguible de la EP idiopática	Proteasa localizada principalmente en el Retículo Endoplasmático y mitocondria

Gen	Proteína	Modo de Herencia	Edad de Inicio (años)	Progresión Características Clínicas	Función Proteica
PLA2G6 (PARK14)	Fosfolipasa A2	R	Bebes, Niños y Adultos	1) Bebes: distrofia neuroaxonal con espasticidad, ataxia y acumulación de hierro; 2) Parkinsonismo y sin acumulación de hierro	Libera los ácidos grasos de los fosfolípidos
FBXO7 (PARK15)	F-box	R	Niñez	Síndrome Palido-piramidal;	Componente modular de Ubiquitina Ligasa E3
PARK16	Desconocida	Desconocida	> 40	Desconocidos	-
EIF4G1	Factor de iniciación de la traducción Eucariótica 4-γ	D	> 40	Desconocidos	Facilita el reclutamiento de ARNm al Ribosoma
GBA	β-glucocerebrosidasa	D	< 20	Enfermedad de Gaucher	Enzima lisosomal, metaboliza la glucosil ceramida de la membrana lipídica y la glucosa
DCTN1	Dinactina 1	D	< 40	Síndrome de Perry	Transporte celular, incluyendo transporte axonal

Gen	Proteína	Modo de Herencia	Edad de Inicio (años)	Progresión Características Clínicas	Función Proteica
POLG1	Polimerasa γ 1	D	< 40	Familias con EP y Neuropatía Periférica	Replicación del DNA mitocondrial
GCH1	GTP Ciclo-Hidrolasa 1	D	< 40	Distonía sensible a la Dopa; prevalencia en mujeres	Cofactor para Tirosina Hidroxilasa
TH	Tirosina Hidroxilasa	R	< 40	Distonía sensible a la Dopa	Convierte tirosina a Levodopa
SLC6A3 (DAT1)	Transportador de soluto de la Familia 6; transportador de DA	D	< 40	Elevados niveles de HVA CSF; pobre respuesta a la Levodopa	Recaptura de DA
ATXN2 (SCA2)	Ataxina-2	D	< 20	Ataxia, puede tener un fenotipo parkinsoniano	Localizada en el Aparato de Golgi