



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Psicología

Neurociencias de la Conducta

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN RATA POR INHALACIÓN DE MANGANESO

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN PSICOLOGÍA**

**PRESENTA:
JAVIER TADEO SÁNCHEZ BETANCOURT**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA
FES IZTACALA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
FES IZTACALA
DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DRA. MARÍA ASUNCIÓN CORSI CABRERA
FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ
FES IZTACALA**

MÉXICO D.F., Febrero 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradezco al programa de Maestría y Doctorado en Psicología por la formación y apoyo académico.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) # de becario 328549, al consejo Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT) promoción 2013 folio 13BTD0401 así como al proyecto: PAPIIT-DGAPA-UNAM IN215114, al LABORATORIO NACIONAL EN SALUD: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y EFECTO AMBIENTAL EN ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS, PROYECTO NÚMERO 232630, CONACYT

También quiero agradecer a mi comité tutorial por las aportaciones y comentarios en este trabajo.

Dra. María Rosa Avila Costa

Dra. Elizabeth Hernández Echeagaray

Dra. Selva Rivas Arancibia

Dra. María Asunción Corsi Cabrera

Dra. Verónica Anaya Martínez

Agradecimientos personales

Cuando uno decide emprender un proyecto en la vida sabe que vendrán situaciones y eventos como la dificultad, la angustia, la templanza, la disciplina o el éxito. Al final, todo se traduce en aprendizaje y sin importar lo que haya pasado ya no eres el mismo. En mi caso, emprender el proyecto de doctorado implicó estas situaciones aunque no esperé encontrarme con el regalo más valioso que la vida me pudo haber dado; mis amigos a los cuales les agradezco y dedico este trabajo.

Comenzando la lista agradezco a mi amiga y tutora principal María Rosa porque sus enseñanzas, atención y apoyo me han hecho disfrutar al máximo del trabajo académico así como mejorar en todas las áreas de mi vida. Recuerdo sus palabras cuando me hablaba sobre como se hizo el proyecto de la inhalación del manganeso, de los tipos de muerte celular en la enfermedad de Parkinson pero también recuerdo cosas chistosas en las plásticas durante la comida. María Rosa, no sé si eres de las que lee los agradecimientos pero si lo llegas a hacer me gustaría que sepas que te quiero mucho y siempre puedes contar conmigo.

También le agradezco a mis súper amigos Lichita, Laura, Paty y al master Chucho. Los aprecio mucho, su apoyo y amistad tiene una relación directa con los mejores años de mi vida. Ustedes son una bendición, compartimos buenos y malos momentos que hacen que jamás pueda sacarlos de mi memoria. Así mismo, estoy muy agradecido con el apoyo y la compañía de Vero, Ana, Enrique Jr. y José Luis. Además de tener mi eterna gratitud y amistad, he de confesar que tienen mi admiración.

Agradezco a todos y cada uno de los chic@s del laboratorio. El último año fue muy divertido por las ocurrencias de Fernando, las apuestas perdidas de Carlos, las charlas con Miguel, el trabajo con Maribel, May y la compañía de Azucena. También doy gracias a todos los chicos de servicio social que me ayudaron en los experimentos.

En este camino tuve la dicha conocer amigos fuera del laboratorio como es el caso de mi camarada Jorge Guzman. Fuimos compañeros de generación, vecinos de laboratorio, compartimos clases, comenzamos a correr juntos y hasta fui a su boda pero jamás hablamos de que trataban nuestros proyectos de doctorado. Agrego a mi amigo Héctor y Gaby Méndez de quienes obtuve varios consejos.

Mi familia es mi fuerza y motivación, por siempre estaré agradecido con mis padres y hermanos. Mi hermano jhonatán que hace que la vida sea exageradamente divertida, aun en las peores circunstancias. Él es una de las poderosas razones para ser mejor en este mundo y solo espero que me supere en todas las áreas de la vida.

Finalmente, puedo decir que el doctorado me permitió tener un trabajo, aprender técnicas, ser más curioso, comprender el valor de la disciplina pero lo más importante es que me permitió conocerlos. Termino con una dedicatoria especial para mi perrita Tracy que me acompañó por 15 años así como a mi abuelito "Talo". Los sigo extrañando y aunque ya no los puedo tener a mi lado siempre están en todo lo que hago.

Índice

Abreviaturas -----	1
Resumen -----	2
Abstract -----	3
Introducción -----	4
Justificación -----	16
Hipótesis -----	17
Objetivos -----	17
Metodología -----	19
Resultados -----	27
Discusión -----	50
Conclusión -----	63
Referencias -----	65
Anexos-----	75

Abreviaturas

6-OHDA	6-hidroxidopamina (2,3,5 trihidroxifeniletamina)
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DMT-1	Transportador de metales divalentes
EP	Enfermedad de Parkinson
EROs	Especies reactivas de oxígeno
GP	Globo pálido
GABA	Ácido Gamma Aminobutírico
MnCl ₂	Cloruro de manganeso
Mn(OAc) ₃	Acetato de manganeso
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NE	Núcleo estriado
Mn	Manganeso
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
SNc	Sustancia nigra compacta
TH	Tirosina hidroxilasa

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) representa un problema de salud en todo el mundo por la tendencia a aumentar su prevalencia e incidencia, y a la vez es un desafío para la ciencia ya que aún no se establece su etiología ni un tratamiento completamente eficaz. Aunque existen modelos animales que han contribuido en el estudio de la EP no han logrado simular todos los eventos de la enfermedad. En nuestro laboratorio se ha encontrado que el modelo de inhalación de manganeso simula las principales características de la EP, incluyendo el daño progresivo y bilateral, lo cual lo hace un modelo ventajoso en comparación con los demás. Sin embargo, dicho modelo sólo ha sido caracterizado en ratones. Al ser caracterizado en ratas, se contribuirá a contar con un modelo bien sustentado y generalizable en roedores. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue caracterizar el modelo de inhalación de manganeso en ratas. Los experimentos se llevaron a cabo con 100 ratas macho Wistar que fueron divididas en el grupo control (que inhaló agua desionizada durante 6 meses) y el grupo experimental (que inhaló la mezcla de $MnCl_2$ al 0.04 M y $Mn(ACo)_3$ al 0.02 M 1 hora, 3 veces a la semana durante 6 meses). Los resultados mostraron que los animales del grupo experimental tuvieron alteraciones motoras progresivas que fueron revertidas con L-DOPA y se mantuvieron por 4 meses posteriores a la última inhalación. Así mismo, en el grupo expuesto se encontró pérdida de neuronas dopaminérgicas del 75 %, disminución del 43 % en el número espinas dendríticas, depleción significativa de dopamina (76.76 %) y sus metabolitos en el núcleo estriado (NE), globo pálido (GP) y sustancia nigra compacta (SNc). Estos cambios son consistentes con los reportados en el modelo de ratón y con las alteraciones descritas en pacientes con EP. Se puede concluir que el modelo de inhalación de manganeso es una herramienta útil y confiable para el estudio de la EP ya que, al igual que en el modelo de ratón, simula sus principales características y representa ventajas sobre varios modelos ya establecidos.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a health problem around the world because, unfortunately there is a tendency of increase its prevail and incidence. This is a challenge for science because it has not established yet its etiology neither a completely effective treatment. Although there are animal models that have contributed to the study of the EP they have not been simulating all events of the disease. In our laboratory we have found that manganese inhalation model simulates the main features of PD, including bilateral progressive damage, making it an advantageous model compared to others. However, this model has only been characterized in mice. Being characterized in rats, this model will help to have a well supported and generalizable model in rodents. Therefore, the purpose of this study was to characterize the pattern of inhalation of manganese in rats. Experiments were performed in 100 male Wistar rats were divided into control group (which inhaled deionized water for 6 months) and another experimental group (who inhaled a mixture of 0.04 M MnCl_2 and 0.02 M $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ 1 hour, three times a week for 6 months). The results showed that the animals of the experimental group had progressive motor disturbances that were reversed with L-DOPA and held for four months after the last inhalation. The mixture of $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ caused 75.95% loss of SNc dopaminergic neurons, 43% decrease in the number dendritic spines, significant depletion of dopamine and its metabolites in the striatum (NE), globus pallidus (GP) and substantia nigra compacta (SNc). These changes are consistent with those reported in the mouse model and the changes described in patients with PD. Thus can be concluded that the manganese inhalation model is a useful and reliable tool for the study of PD because, as in the mouse model simulates its main characteristics and represents some advantages over established models.

Introducción

En la actualidad el mundo enfrenta una transformación epidemiológica. Este cambio se debe al abatimiento de las causas de muerte que aquejaron a la humanidad entre finales del siglo XIX y principios del XX, fundamentalmente procesos infeccioso/contagiosos y fallecimientos por lesiones en combate en las guerras. Con ello aumentó la esperanza de vida y emergieron problemas de salud hasta entonces poco comunes, denominados crónico-degenerativos, y que en la actualidad representan un reto para los sistemas de salud del mundo, entre ellos está la Enfermedad de Parkinson (EP) (García, Sauri & Meza, 2008).

Actualmente, la EP afecta al 1 % de personas mayores de 60 años y al 2 % de la población mayor de 75 años en el mundo, ocupa el segundo lugar entre las enfermedades neurodegenerativas, su comienzo oscila entre los 55 y 65 años y el riesgo de presentarla aumenta con la edad (Calne & Yoshikuni, 2004).

En México no hay estudios epidemiológicos que revelen el número total de pacientes con EP, algunos estudios indican cifras de 140,000 pacientes en el año 2000 (INEGI, 2000) aunque datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía refieren la existencia de 500,000 pacientes con EP en el año 2002 (Consejo Nacional de las Adicciones, 2002). Así también, tomando en cuenta las cifras de crecimiento poblacional por grupos de edad notificadas por el Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI) se estima que en el año 2020 los adultos con edades de 60 años o más representarán el 12% de los habitantes de México y en el año 2050 esta cifra se elevará al 23%. Este cambio en las características demográficas del país ponen de manifiesto que la EP tiene una tendencia a aumentar (INEGI, 2009).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez por James Parkinson en 1817 en su publicación *An essay on the shaking palsy* (Ensayo sobre la parálisis agitante), como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular durante el reposo. Básicamente, el paciente con EP desarrolla cuatro signos clínicos principales: temblor, bradicinesia, rigidez y alteración de los reflejos posturales (Calne, Snow & Lee, 1992; Calne & Yoshikuni, 2004; Calne, 2005).

El principal hallazgo histopatológico de la EP es la muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia *nigra* compacta (SNc), con típicas inclusiones eosinófilas intracitoplasmáticas denominadas cuerpos de Lewy (Otero-Siliceo, Abascal-Arias & Alanis-Quiroga, 1996). Como consecuencia de este daño hay disminución de dopamina (DA) en el núcleo estriado (NE). A partir de estos hallazgos se ha propuesto el uso de la L-DOPA como el fármaco más efectivo en el tratamiento de la EP, ya que es precursor de la DA (Barbeau, 1981) además, su uso es uno de los criterios empleados en el diagnóstico definitivo de esta enfermedad (Hughes, Daniel, Kilford & Lees, 1992; Gelb, Olivier & Gilman, 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 producto de la degeneración de las neuronas de la SNc se han propuesto 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).

Modelo de Rotenona: es un compuesto que se extrae de plantas tropicales y es usado como insecticida. La rotenona fue empleada por primera vez como modelo en 1985 cuando Heikkila y colaboradores intentaban determinar si esta toxina tenía un efecto similar al MPTP sobre el sistema dopaminérgico. Después de inyectar rotenona en el haz medial se encontró depleción significativa de DA así como inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Heikkila, Nicklas, Vyas & Duvoisin, 1985). Posteriormente, en el modelo de la rotenona se han reportado inclusiones citoplasmáticas parecidas a los cuerpos de Lewy. Las desventajas de este modelo son que el daño celular se extiende a otros grupos neuronales, así como la susceptibilidad de los animales, ya que algunos animales muestran alteraciones y otros no (Betarbet, Sherer, Macfenzie, Garcia-Osuna & Greenamyre, 2002).

Modelo de MPTP (1- metil-4-fenil-2,3,6-tetrahidroxipiridina): Algunos estudios han demostrado que en humanos y primates no humanos, el MPTP produce un síndrome parkinsoniano agudo que es irreversible y tiene todos los signos clínicos de la EP, disminución significativa de las neuronas dopaminérgicas, agregados de alfa-sinucleína (pero no cuerpos de Lewy) y respuesta positiva al tratamiento con L-DOPA (Langston, Forno, Rebert, & Irwin, 1984; Shimohama, Sawada, Kittamura & Taniguchi, 2003).

Después de la administración sistémica, el MPTP, que es altamente lipofílico, cruza la barrera hemato-encefálica en pocos minutos. En el cerebro es metabolizado en la glía por la monoamino oxidasa B (MAO-B) a MPP⁺ (la forma tóxica) para entonces ser liberado al espacio extracelular. Debido a que el MPP⁺ es una molécula polar depende de los transportadores de la membrana plasmática para entrar en la célula; el MPP⁺ tiene alta afinidad por el sistema de recaptura de alta afinidad para dopamina (DAT) (Bezard et al., 1999; Dauer & Przedorsky, 2003). Dentro de las neuronas dopaminérgicas, el MPP⁺ afecta las mitocondrias, dañando el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, la cual lleva a un decremento en los niveles de ATP y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), especialmente del radical superóxido (O₂^{-*}). La administración sistémica de MPTP reduce entre el 80 y 85% de neuronas dopaminérgicas al igual que produce depleción significativa de DA y sus metabolitos (Langston, Forno, Rebert & Irwin, 1984; Hallman, Lange, Olson & Stromberg 1985). Sin embargo, este modelo presenta algunas limitaciones como el hecho de que la muerte neuronal se da un lapso muy corto (siendo que la EP es un padecimiento lento y progresivo) y existe una susceptibilidad diferente entre especies. Así pues, se ha reportado que los ratones son más sensibles que las ratas al MPTP debido a que, a diferencia de las ratas, expresan más MAO-B y menos transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2), el cual en ratas es el que secuestra al ion MPP⁺ y disminuye su toxicidad (Russo, Daniels, Viveros & Reinard, 1994). Así también, en los ratones se ha reportado una

recuperación espontánea por lo que se emplean altas dosis de esta neurotoxina (Jackson-Lewis & Przedorski, 2007).

Modelo de 6-OHDA (6-hidroxidopamina, 2,3,5-trihidroxifeniletilamina): la inyección de 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior induce pérdida de las células dopaminérgicas de la SNc en el 85-90%, llevando a la denervación dopaminérgica del NE, núcleo accumbens y corteza prefrontal (Emborg, 2004). La degeneración ocurre dentro de las primeras 24 horas después de la administración de su administración, y la depleción de DA estriatal se puede apreciar 2 ó 3 días después de la inyección (Ungerstedt, 1968). Las principales desventajas de este modelo son; 1) la no detección de cuerpos de Lewy característicos de la EP, 2) se debe hacer mediante cirugía estereotáxica, generalmente se emplea unilateralmente, ya que si se lleva a cabo de forma bilateral produce adipsia, afagia y en consecuencia la muerte 3) es un modelo agudo (Bertabet, Sherer, Macfenzie, Garcia-Osuna & Greenamyre, 2002).

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 (Figura 1). Se ha propuesto que un modelo ideal de la EP es aquel capaz de reproducir los signos clínicos observados en humanos y el déficit neuroquímico asociado a la degeneración patológica de las células dopaminérgicas de la SNc, incluyendo el curso temporal (Hirsch, 2006). 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 en los ratones

expuestos, déficit motor manifestado como acinesia, inestabilidad postural y temblor, además estos animales perdieron 67% de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y tuvieron disminución significativa de las concentraciones de dopamina y sus metabolitos en la SNc. Dichas alteraciones fueron revertidas con L-DOPA, asegurándonos que las alteraciones eran de origen dopaminérgico (Ordoñez-Librado *et al.*, 2008; 2010; 2011).

Modelo	Características	Desventajas
Rotenona	<p>Daño en SNc e inclusiones citoplasmáticas parecidas a cuerpos de Lewy.</p> <p>Inhibición de cadena respiratoria mitocondrial.</p>	<p>Selectividad neuronal y cantidad de animales afectados.</p>
MPTP	<p>En humanos y monos produce mismos síntomas/histopatología y respuesta a L-DOPA.</p> <p>Es transformado a MPP+ en la glía y entra por el DAT.</p>	<p>Menor susceptibilidad en roedores y la administración es aguda o subaguda.</p>
6-OHDA	<p>Primer modelo establecido, degeneración neuronal en 24 horas</p> <p>Entra vía el DAT e inhibe la cadena respiratoria mitocondrial</p>	<p>Inyección unilateral y es un modelo agudo.</p>

Figura 1. Muestra las principales ventajas y limitaciones de los principales modelos de la EP.

Modelo de inhalación de manganeso (Mn): el Mn es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre. Sus usos en la industria incluyen, la aleación de metales, manufactura de baterías, aditivo en la gasolina, así como herbicida en la agricultura. Es un elemento traza y nutriente esencial para humanos, animales y plantas. Es requerido para reacciones enzimáticas que incluyen la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos (Takeda, 2003; Aschner, Erikson & Dorman, 2005).

De todo el Mn ingerido (que es una cantidad de 2-9 mg al día) entre el 1 y 5% es absorbido en el tracto gastrointestinal bajo condiciones normales (Bel, Keen & Lönnerdal, 1989). Los mecanismos fisiológicos que regulan el paso del Mn al cerebro son: la absorción en el tracto gastrointestinal, la eliminación por el sistema hepatobiliar, la unión a transferrina y otras proteínas transportadoras en la sangre, así como las barreras cerebrales. La acumulación excesiva puede ocurrir cuando estos sistemas regulatorios son sobrepasados, como en el caso de la inhalación (Calne, Chu, Huang, Lu & Olanow, 1994; Mergler et al., 1994; Pal, Samii & Calne 1999). Cuando el Mn es inhalado puede alcanzar la profundidad del árbol bronquial llegando al torrente sanguíneo y después a la vasculatura cerebral sin pasar por el sistema de excreción hepatobiliar, por lo que esta ruta es la más viable para el transporte de Mn al cerebro (Santamaría & Sulsky, 2010).

Una vez dentro del cerebro, el Mn tiende a acumularse en regiones dopaminérgicas, específicamente los ganglios basales (GP, NE, SNc y núcleo subtalámico) (Aschner, 2005) por lo que se ha sugerido que la recaptura y/o metabolismo de la DA están involucrados. Ingersoll, Montgomery & Aposhian (1999) evaluaron la participación del DAT en el transporte del Mn al administrar cocaína (un inhibidor del DAT) antes de la inyección intracerebral de Mn, encontrándose reducción significativa de este metal en los ganglios basales. 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 era menor. En otro estudio, llevado a cabo por Erikson, John, Jones & Aschner (2005) 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, Cooney & Erikson, 2007).

La propuesta del uso de Mn como modelo de la EP comienza cuando se descubre que en humanos, la intoxicación por este metal (referida comúnmente como “manganismo”) manifiesta, en etapas avanzadas, características similares a la EP (Harte, Holdren, Schneider & Shirley, 1991). Se pueden distinguir tres fases clínicas en el desarrollo de la neurotoxicidad crónica por Mn (Finkelstein, Milatovic & Aschner, 2007), pero es en la fase tardía (o de establecimiento) en donde se observan alteraciones extrapiramidales que incluyen rigidez muscular, hipocinesia y temblor de las extremidades superiores (Guilarte, 2010). Se ha relacionado la presencia de estos síntomas con la disfunción dopaminérgica dentro de los ganglios basales y aunque se ha propuesto que el sitio de lesión neurológica primaria es el GP (Crossgrove & Zheng, 2004; Guilarte, 2010; Guilarte, 2013; Perl & Olanow, 2007; Uchino et al., 2007), se han acumulado evidencias de que el Mn puede causar daño en la SNc (Archibald & Tyree, 1987; Guilarte et al., 2006).

Los estudios sobre las consecuencias neurotóxicas del Mn realizados en las últimas dos décadas se han enfocado principalmente a los efectos del Mn sobre el metabolismo de la DA y las alteraciones conductuales asociadas a éste. No obstante, se han encontrado resultados que son objeto de discusión debido a la discrepancia de los mismos, ya que hay estudios que reportan disminución, incremento o ningún cambio en las concentraciones de DA. Así por ejemplo, Sistrunk, Ross & Filipov (2007), encontraron que tras la incubación de células estriatales en diferentes concentraciones de $MnCl_2$, fosfato de Mn ($MnPO_4$) y

sulfato de Mn (MnSO_4) hay reducción significativa de DA y el metabolito DOPAC. Por otra parte, O'Neal, Lee, Zheng & Cannon (2014) reportaron que ratas inyectadas intraperitonealmente con 15 mg/kg de MnCl_2 , 5 días a la semana durante 4 semanas muestran aumento significativo en las concentraciones de DA, DOPAC y HVA en NE.

Al respecto, resulta importante mencionar que esta diversidad de resultados se acompaña por una variabilidad importante en la metodología empleada ya que factores como la valencia, solubilidad, vía de administración y tiempo de exposición es diferente en cada estudio. Así por ejemplo, se ha encontrado que el Mn en estado trivalente es más potente inhibiendo el complejo de la cadena respiratoria de la cadena mitocondrial en condiciones in vitro. Así también, se ha mostrado que la inhalación de cloruro de Mn (MnCl_2), una sal soluble, tuvo una rápida absorción y aumento en concentración en el cerebro de ratas en comparación con la inhalación de óxido de Mn insoluble (MnO_2). De la misma forma, el sulfato de Mn inhalado (SOMn_4) tuvo una mayor absorción que el fosfato y tetraóxido de Mn (Dorman et al., 2002). En cuanto a las vías de administración, se ha demostrado que la vía más eficiente para el paso de Mn al cerebro es la inhalación. Los modelos animales que evalúan la toxicidad de Mn en el alimento o agua usan cantidades mayores a 1 mg/día (Hurley, 1987). Vezér et al. (2007) demuestran que posterior al consumo diario de 59.34 mg de MnCl_2 durante 10 semanas aumenta la concentración de Mn en el cerebro de ratas, sobre todo en hipocampo. Estos resultados sugieren que dosis elevadas y frecuentes de Mn pueden sobrepasar a los sistemas que regulan su paso al

cerebro. En el caso de la inhalación se ha establecido como límite para cuasar daño neurológico en humanos 1 mg/m^3 (Santamaría & Sulsky, 2010). En modelos animales de inhalación de Mn se han establecido anomalías respiratorias y conductuales a exposiciones que abarcan periodos desde 1 día hasta 10 meses en concentraciones de 0.7 a 69 mg/m^3 (ATSDR, 2000).

De esta manera, parece que en exposiciones agudas el Mn aumenta la DA y los niveles de sus metabolitos, mientras que el efecto contrario se ha observado en exposiciones prolongadas (Chandra & Shukla, 1981; Desole et al., 1995). Asimismo, se ha sugerido que concentraciones mayores de Mn ($>1 \text{ mg/m}^3$) pueden acelerar significativamente la oxidación de la DA y otras catecolaminas, lo que amplifica la formación de EROs (Donaldson, McGregor & LaBella, 1982; Sloot, Korf, Koster, de Wit & Gramsbergen, 1996).

Existen reportes de que el Mn se encuentra en diferentes estados de oxidación (Salahi et al., 2006; Archivald & Tyree, 1987; Aschner, Erikson & Dorman, 2005). En humanos y animales está principalmente en los estados divalente (Mn^{2+}) y trivalente (Mn^{3+}) (Archivald & Tyree, 1987), siendo el Mn^{2+} la forma predominante (Aschner, Erikson & Dorman, 2005). Se ha demostrado que en la mitocondria el Mn inhibe el complejo I alterando la fosforilación oxidativa; al parecer el Mn^{3+} es más potente inhibiendo el complejo I que el Mn^{2+} (Archivald & Tyree, 1987). Al respecto, y de acuerdo con HaMai y Bondy (2004), la actividad prooxidante del Mn^{2+} es dependiente de las concentraciones del Mn^{3+} , quien podría facilitar que una pequeña porción de Mn^{2+} se oxide a Mn^{3+} . Esta relación sinérgica entre el

Mn^{2+} y el Mn^{3+} resulta en un ciclo redox continuo. Más aún, 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 el Mn (HaMai y Bondy, 2004). Estos hallazgos nos llevaron a considerar la hipótesis de que si los animales son expuestos a la mezcla de Mn^{2+} y Mn^{3+} , es posible que encontremos alteraciones celulares y conductuales similares a las observadas en la EP (Ordoñez-Librado et al., 2008).

En nuestro laboratorio se ha encontrado que la mezcla de $MnCl_2$ (forma divalente) y $Mn(OAc)_3$ (forma trivalente) es una condición que produce disminución de neuronas dopaminérgicas en la SNc en un 67.58 % en ratones. Funcionalmente, esta reducción se ha visto relacionada con la presencia de temblor, pérdida de la coordinación motora, acinesia y alteraciones en la marcha (Ordoñez-Librado et al., 2008, 2010, 2011).

De manera concreta, la condición experimental empleada en dicho estudio consistió en la inhalación de cloruro y acetato de Mn en concentraciones de 0.04 y 0.02 M respectivamente, durante 1 hora, 2 veces a la semana, en un periodo de 5 meses. Con este método, también se ha reportado a nivel ultraestructural, aumento en el diámetro de los botones presinápticos, disminución significativa de sinapsis axoespinosas y aumento en la cantidad de sinapsis perforadas en el NE (Avila-Costa et al., 2007). Estas variables también se encuentran en modelos de lesión unilateral con 6-OHDA, así como en pacientes con EP (Colín-

Barenque, Avila-Costa, Espinosa-Villanueva & Machado-Salas, 2000; Avila-Costa et al., 2008).

Adicionalmente, la misma condición experimental produjo la disminución del 71 % de DA en el NE y se encontró que las alteraciones motoras inducidas por Mn fueron revertidas con la administración de L-DOPA (Ordoñez-Librado et al., 2010; Ordoñez-Librado et al., 2011) demostrando que las alteraciones son de origen dopaminérgico. Todas estas evidencias revelan con claridad la efectividad de este modelo para estudiar la EP aunque hay condiciones que se no se han explorado como la generalización en otros roedores (ratas), así como si las alteraciones encontradas se mantienen después de concluido el periodo de inhalación de Mn, es decir, determinar si podría existir una recuperación ya que es algo que sucede en otros modelos representativos de la EP como el de MPTP en ratones (Russo, Daniels, Viveros & Reinard, 1994).

Justificación

Se tienen evidencias sólidas de que el modelo de inhalación de Mn produce la misma sintomatología, histopatología y respuesta positiva a L-DOPA que en modelos representativos y establecidos de la EP. Con ventajas adicionales, el modelo de inhalación de Mn es progresivo y bilateral, lo cual lo hace ser más completo que los otros modelos. Sin embargo, el modelo de inhalación de Mn solo ha sido caracterizado en ratón. Al ser caracterizado en ratas, se contribuirá a contar con un modelo bien sustentado y generalizable en roedores, que nos permitirá explorar nuevas estrategias de estudio y/o tratamiento de la EP.

Hipótesis

Las ratas expuestas a la inhalación crónica de la mezcla de cloruro y acetato de Mn mostrarán cambios conductuales, estructurales y bioquímicos similares a los encontrados en ratón expuestos a la mezcla de Mn y en otros modelos de la EP.

Objetivo general

Caracterizar un modelo de la EP por inhalación crónica de Mn en ratas

Objetivos específicos

1. Evaluar el desempeño motor de ratas expuestas a la mezcla de MnCl_2 y Mn(OAc)_3 mediante las pruebas de la viga y reaching task.
2. Determinar si las alteraciones motoras encontradas en animales expuestos a Mn se mantienen durante 4 meses posteriores a la última inhalación de Mn.
3. Evaluar el efecto de la L-DOPA sobre el desempeño motor en las pruebas de la viga y reaching task de los animales control y expuestos a la mezcla de MnCl_2 y Mn(OAc)_3 después de 6 meses de inhalación.
4. Realizar el conteo de neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH) en la SNc de los animales control y expuestos a la mezcla de MnCl_2 y Mn(OAc)_3
5. 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 para determinar la especificidad del Mn por estructuras dopaminérgicas.

6. 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 $Mn(OAc)_3$.

7. Determinar las concentraciones de DA en el NE, GP y SNc mediante HPLC en el grupo control y el experimental.

Metodología

Se utilizaron 100 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 180 gramos que fueron mantenidas en ciclos luz-oscuridad 12:12, con libre acceso al agua/comida (salvo los días de evaluación en la prueba de “reaching task”) y que fueron sometidas a las siguientes condiciones:

Fase 1. Entrenamiento

Las ratas fueron entrenadas durante una semana en las siguientes pruebas:

Prueba de la viga: para evaluar la conducta motora se utilizó un aparato de madera con dos pedestales, a los cuales va unida una viga de madera de 2 metros de largo con una inclinación de 15°. Se utilizaron dos vigas de diferentes anchos: 6 y 12 mm, por donde los animales debían caminar hasta alcanzar su caja hogar desde la parte más baja del aparato (figura 2). Se registró con un cronómetro el tiempo en que los animales tardaban en atravesar cada viga (tiempo total) las cuales fueron colocadas en orden aleatorio. Se esperaba como tiempo máximo 120 segundos, y si el animal no cruzaba en el tiempo estipulado se daba por terminada esta actividad asignando el valor de 120 segundos a su evaluación.



Figura 2. Muestra la prueba de la viga así como una rata trasladándose en dicha prueba

Prueba de “reaching task”: se colocó a cada rata dentro de una caja de acrílico cuyas dimensiones son 20 cm de alto, 15 de ancho y 30 de largo, en la parte frontal cuenta con una abertura de 1 cm por la cual el animal tiene que alcanzar un trozo de comida (pellet) con la pata delantera y comerlo (figura 3). Se contó como acierto cada vez que el animal tomaba el trozo de alimento y lo llevaba hasta su hocico y como error si se le caía o no lo podía sujetar en 20 ensayos. 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. Cabe mencionar, que antes de la prueba los animales fueron privados de alimento al 90% de su peso. Los animales fueron videograbados para el análisis posterior de la secuencia de movimientos, tanto en la prueba de la viga de equilibrio, como en la prueba de reaching task.

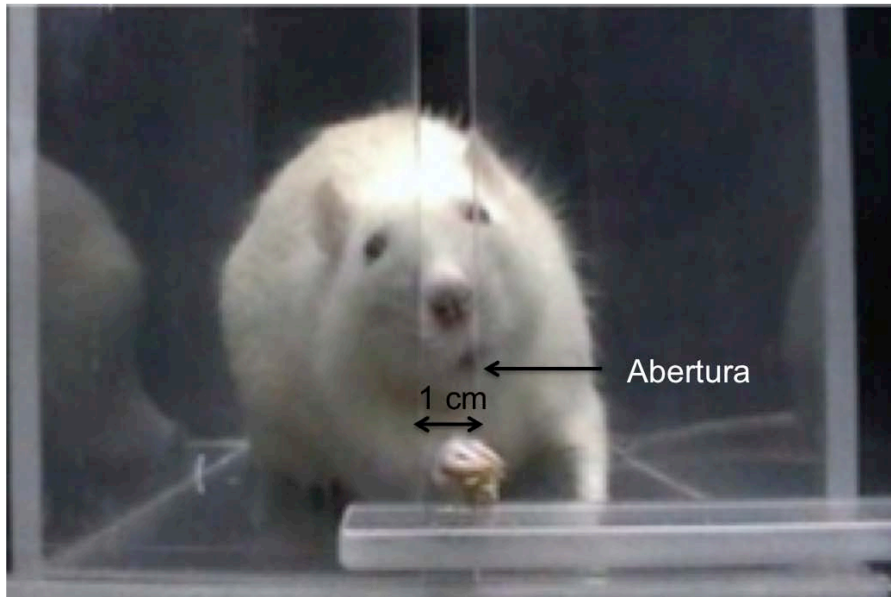


Figura 3. Muestra una rata atrapando un pellet en la prueba de reaching task

Fase 2. Inhalación de Mn

Con la intención de determinar las condiciones experimentales necesarias para reproducir el modelo de inhalación de Mn en rata se llevó a cabo un estudio piloto empleando la misma metodología que se reportó en el modelo de ratón, es decir, 2 inhalaciones por semana durante cinco meses. Primeramente, los animales fueron entrenados en las pruebas de la viga de equilibrio así como en la de reaching task durante 1 semana. Posteriormente, fueron divididos al azar para conformar el grupo control y grupo experimental. El grupo control inhaló agua desionizada 1 hora, dos veces a la semana durante 5 meses mientras que el grupo experimental inhaló la mezcla de MnCl_2 al 0.04 M y $\text{Mn}(\text{OAc})_3$ al 0.02 M durante el mismo tiempo y número de veces que el grupo control inhaló agua desionizada. La inhalación fue en una caja de acrílico cuyas dimensiones son,

70 cm de largo, 40 cm de alto y 25 cm de ancho, la cual fue conectada a un ultranebulizador (Shinmed, modelo SW91810) (figura 4). La evaluación conductual se llevó a cabo de manera semanal en días diferentes a los de la inhalación.

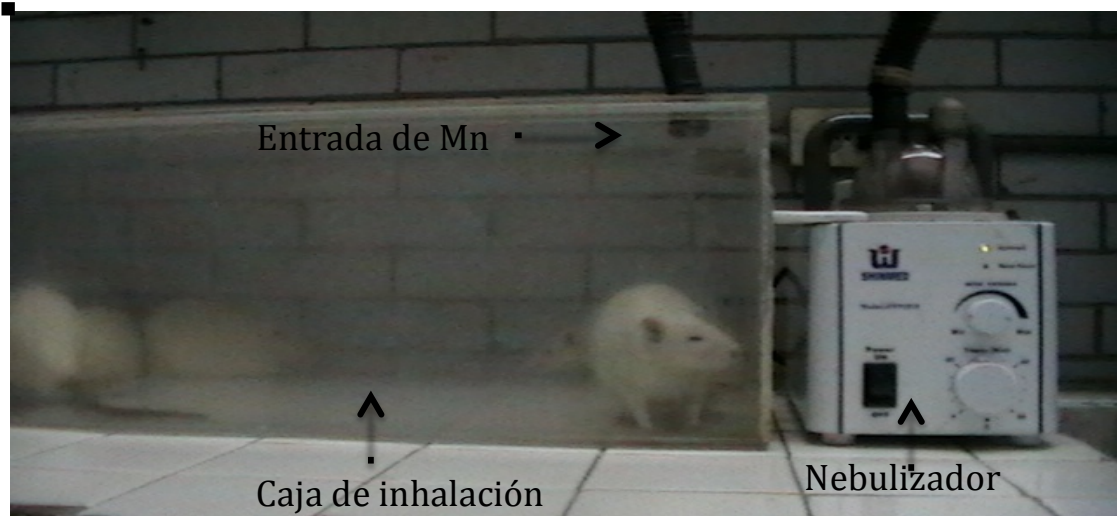


Figura 4. Se muestra el proceso de la inhalación donde se destaca al nebulizador así como a la cámara de inhalación.

Los resultados encontrados con estas condiciones no fueron los esperados ya que el desempeño motor en la prueba de la viga y reaching task era muy similar tanto en el grupo control como en el experimental (figura 5). Por otra parte, el grupo experimental tuvo una reducción del 48.53% de neuronas inmunopositivas a TH en la SNc en comparación con el grupo control (figura 5).

Estudio piloto

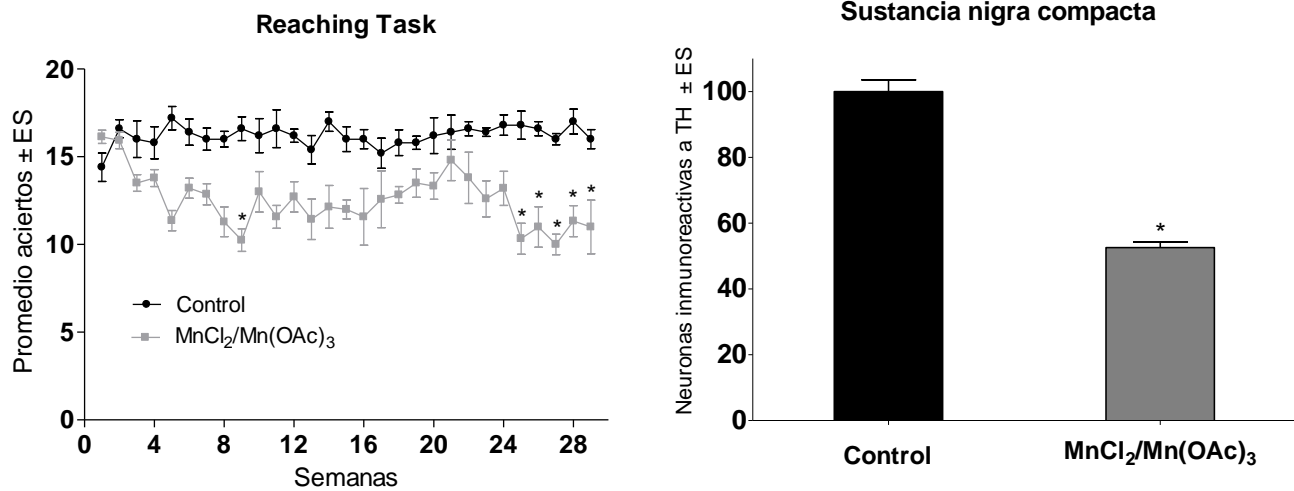


Figura 5. Resultados conductuales y citológicos encontrados en el estudio piloto. En la prueba de reaching task, los animales que inhalaron Mn muestran disminución de la coordinación motora en las últimas semanas de inhalación, $F(1, 296)=2.09$, $p<0.01$. En la inmunohistoquímica para TH, los animales que inhalaron tienen una pérdida neuronal cercana al 50 %. $t(124)=13.11$, $p < 0.001$

Posteriormente, se probaron varias condiciones de exposición a la mezcla de Mn para inducir mayor daño, encontrándose que la inhalación de MnCl₂ (0.04 M) y Mn(OAc)₃ (0.02 M), durante 1 hora, 3 veces a la semana, por un periodo de 6 meses produjo mejores resultados.

Así pues, las ratas fueron divididas al azar en el grupo control (n=34) y el grupo experimental (n=66). El grupo control fue expuesto a agua desionizada mientras que el grupo experimental inhaló la mezcla de compuestos de Mn. La evaluación motora se realizó semanalmente durante este período, en días diferentes para cada prueba.

Después de la inhalación los animales de ambos grupos fueron anestesiados con pentobarbital sódico en dosis letal i.p. (0.5 mg), posteriormente, se perfundieron vía aorta con solución salina al 0.9% y se fijó el tejido con la mezcla de glutaraldehído y paraformaldehído al 2%. Una vez perfundidos, se extrajeron los cerebros y se colocaron en el mismo fijador por dos horas. Posteriormente se hicieron cortes histológicos a los cuales se le realizaron inmunomarcajes: para determinar el número de neuronas dopaminérgicas se realizó inmunohistoquímica anti-TH a cortes del mesencéfalo (SNc y el área ventral tegmental, VTA); para determinar la especificidad de la mezcla de Mn se realizó el conteo de neuronas a través de inmunohistoquímica anti-NeuN en el NE, GP, corteza motora primaria, áreas CA1 y CA3 del hipocampo así como cerebelo. Así también, se tomaron cortes del NE que fueron procesados mediante el método de Golgi y se hizo el conteo de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas.

Los conteos en la inmunohistoquímica anti-TH se realizaron en un área de 1500 μm^2 dentro de la SNc y en 3300 μm^2 en el VTA directamente en el microscopio. Para la inmunohistoquímica anti-NeuN el conteo se realizó en un área de 3300 μm^2 (Ver anexo 1). En el caso del conteo de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas los cerebros se procesaron por el método de Golgi rápido. Se obtuvieron cortes coronales de 90 μm que contenían el núcleo estriado. El análisis consistió en el conteo de las espinas dendríticas en una

longitud de 10 μm en 4 dendritas secundarias de 10 neuronas espinosas medianas (Ver anexo 2).

Fase 3. “Recuperación”

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas para reproducir el modelo de inhalación de Mn en rata se evaluó si las alteraciones conductuales y celulares encontradas se mantenían o no después de finalizado el periodo de inhalación. Esto es, posterior al periodo de inhalación (6 meses), un grupo de 14 ratas expuestas a la mezcla de Mn fue evaluado semanalmente durante 4 meses con las pruebas motoras descritas en la fase de entrenamiento. Al mismo tiempo, un grupo de ratas siguió inhalando (n=14) y otro grupo control se mantuvo por el mismo tiempo (n=12). Después de este periodo, las ratas se sacrificaron para realizar el análisis citológico.

Fase 4. Respuesta a L-DOPA

En una siguiente fase se quería comprobar que el origen de las alteraciones motoras era producto de una disfunción dopaminérgica por lo que otro grupo de 6 ratas recibió tratamiento con L-DOPA (7.5mg/kg) por vía oral durante 2 semanas, periodo en el que fue evaluado semanalmente con las pruebas motoras descritas en la fase de entrenamiento.

Fase 5. Determinación de concentraciones de DA y sus metabolitos

Adicionalmente, otro grupo de ratas que inhaló la mezcla de Mn durante 6 meses (n=6) así como un grupo control, que inhaló agua desionizada durante el mismo

tiempo (n=6) fueron usados para determinar las concentraciones de DA en el NE, GP y SNc mediante HPLC (Anexo 3).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las pruebas conductuales, de inmunohistoquímica, de la técnica de Golgi así como la determinación de la concentración de DA, HVA y DOPAC fueron sometidos al análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar si tenían una distribución normal. Una vez determinada dicha distribución se utilizó ANOVA de una o dos vías seguido del análisis *post hoc* de Tukey para los datos conductuales, del número de neuronas, números de espinas. La t de Student se uso para determinar las diferencias de dos grupos como fue en el caso de las pruebas de inmunohistoquímica para TH, para la concentraciones de DA así como Neu-N.

Resultados

Fase 2. Inhalación de Mn por 6 meses

a) Pruebas motoras

En la prueba de la viga (de 6 y 12 mm) se hace evidente el aumento en el tiempo de ejecución en los animales expuestos a la mezcla de Mn. Mientras que los animales del grupo control mantienen un promedio de 20 segundos para atravesar la viga durante todo el experimento, los animales expuestos a Mn llegaron a tardar en el traslado por la viga hasta 120 segundos a partir de la décima semana (figuras 6 y 7). La prueba ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas en los grupos a medida que aumenta el número de inhalaciones, $F(1,203)=23.52$, $p < 0.01$. Por otra parte, las observaciones de los videos en esta prueba permitieron identificar alteraciones motoras como dificultad para iniciar el movimiento, alteraciones de la marcha así como periodos en los que las ratas se quedaban inmóviles.

Prueba de la viga 6 mm

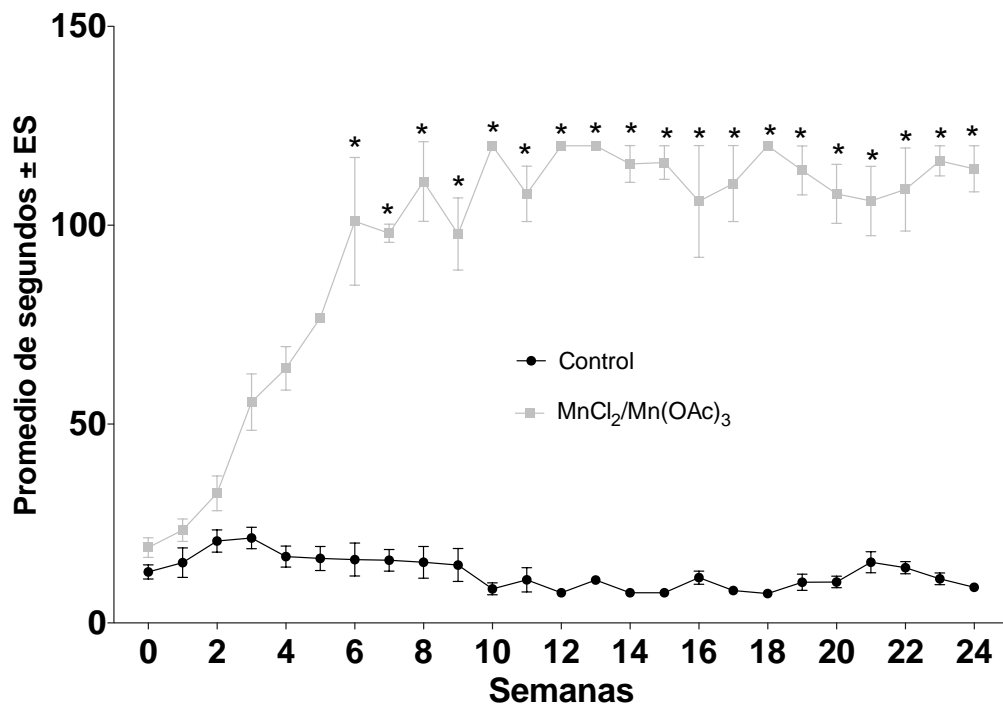


Figura 6. Media del tiempo en segundos que tardaban en recorrer la viga de 6 mm los animales del grupo control así como los expuestos a la mezcla de MnCl₂/Mn(OAc)₃, (F (1, 203)=23.52, p < 0.01).

Prueba de la viga 12 mm

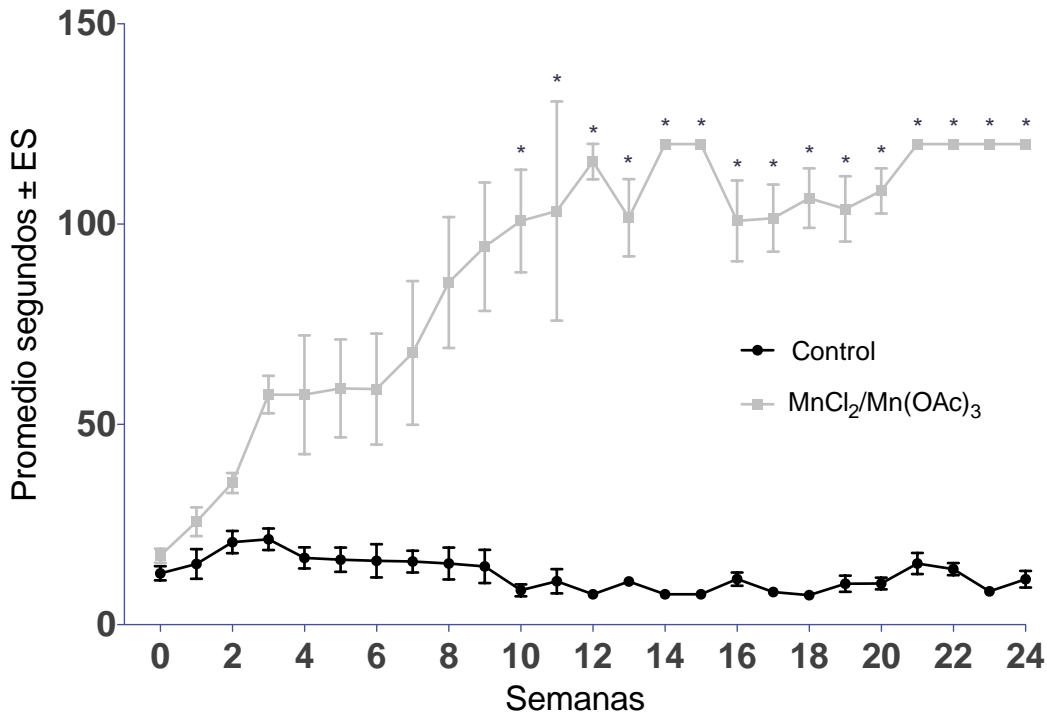


Figura 7. Media del tiempo en segundos que tardaban en recorrer la viga de 12 mm los animales del grupo control así como los expuestos a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$, $F(1, 263)=3.21$, $p < 0.01$.

Al evaluar la coordinación motora mediante la prueba de reaching task, se observan diferencias significativas en el grupo control y el grupo que inhaló la mezcla de Mn, $F(1, 263)=3.21$, $p < 0.01$ (figura 8). Mientras que el grupo control mantiene un promedio de 16 aciertos durante todo el experimento, el grupo experimental inicia con un promedio de 14.5 y en las últimas semanas de exposición a Mn tiene una media de 5.6 aciertos. Adicionalmente, se realizó el análisis 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, 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 (Taylor, Elsworth, Roth, Sladek & Redmond, 1990; Whishaw, Pellis, Gorny & Pellis, 1991; Metz, Farr, Ballermann & Whishaw, 2001; Whishaw et al., 2002).

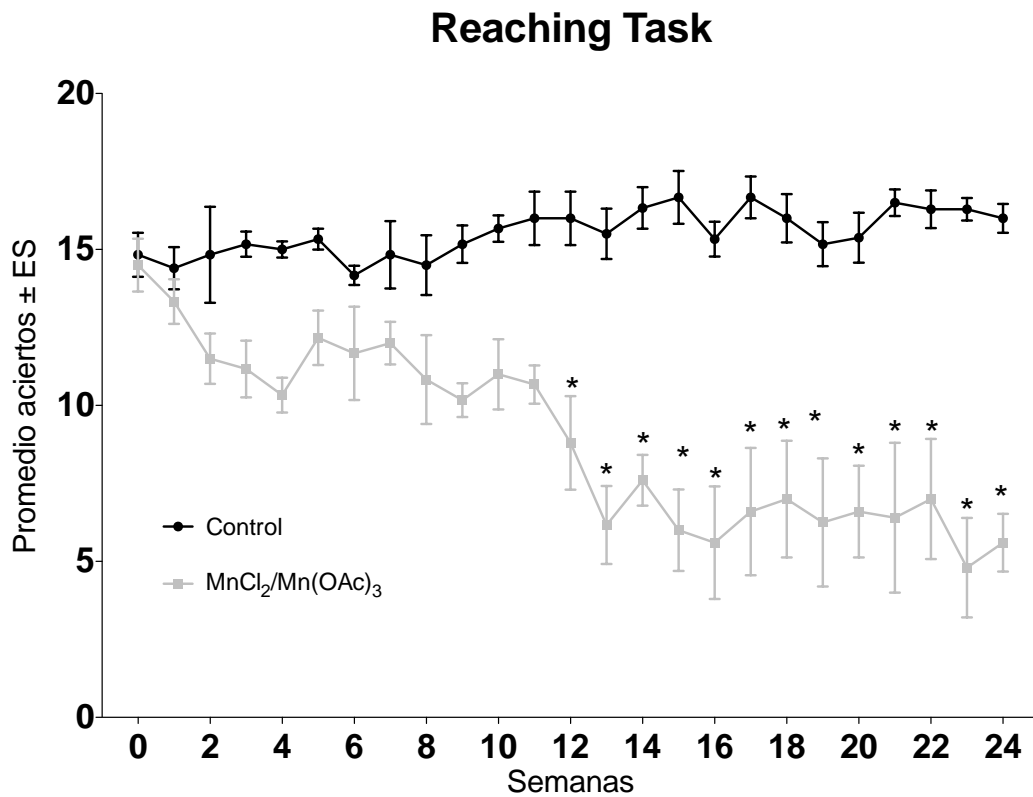


Figura 8. Prueba de reaching task. El grupo de animales expuestos a Mn muestra disminución significativa en el número da aciertos a partir de la doceava semana de inhalación. $F(1, 387)=5.78, p < 0.01$

Como lo muestra la figura 9, (serie A) los animales del grupo control mostraron este conjunto de movimientos; contrario a ello, en los animales expuestos a Mn (series B y C) 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 jalaban al interior de la caja para posteriormente tomarlo del piso con el hocico.

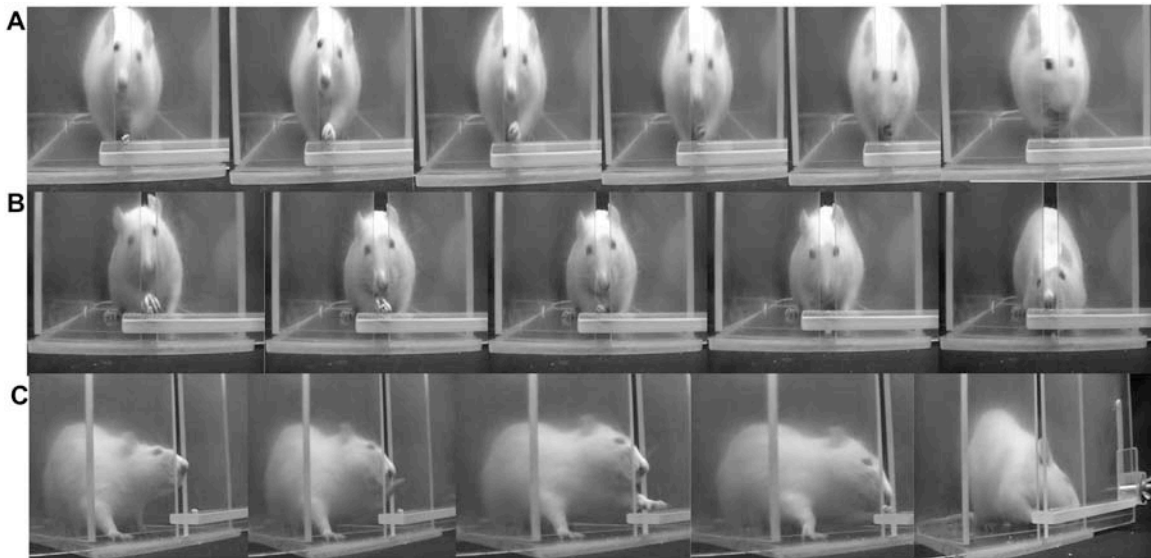


Figura 9. En el panel A se puede observar la serie de movimientos realizados por los animales del grupo control, en donde se aprecia que el movimiento de la extremidad anterior es dirigido específicamente al pellet, con los dígitos cerrados para solo abrirlos al momento en que va a tomar la comida. En las series B y C se aprecia cómo 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 y toman el pellet con el hocico.

b) Inminohistoquímica

Por otra parte, se encontró que después de 6 meses de inhalación el grupo control tuvo una media de 102.14 neuronas inmunopositivas a TH en la SNc mientras que en el grupo experimental se encontró una media de 24.56. Esto representa una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc del 75.95% en comparación con el grupo control, $t(125)=20.69$, $p < 0.01$. En el área ventral tegmental (VTA), que también es dopaminérgica, el grupo control tuvo una media de 126.93 de neuronas inmunopositivas a TH, mientras que en el grupo experimental se encontró en promedio 132.73 neuronas, lo cual no muestra diferencias significativas, $t(105)=1.13$, $p = 0.26$ (Figura 10).

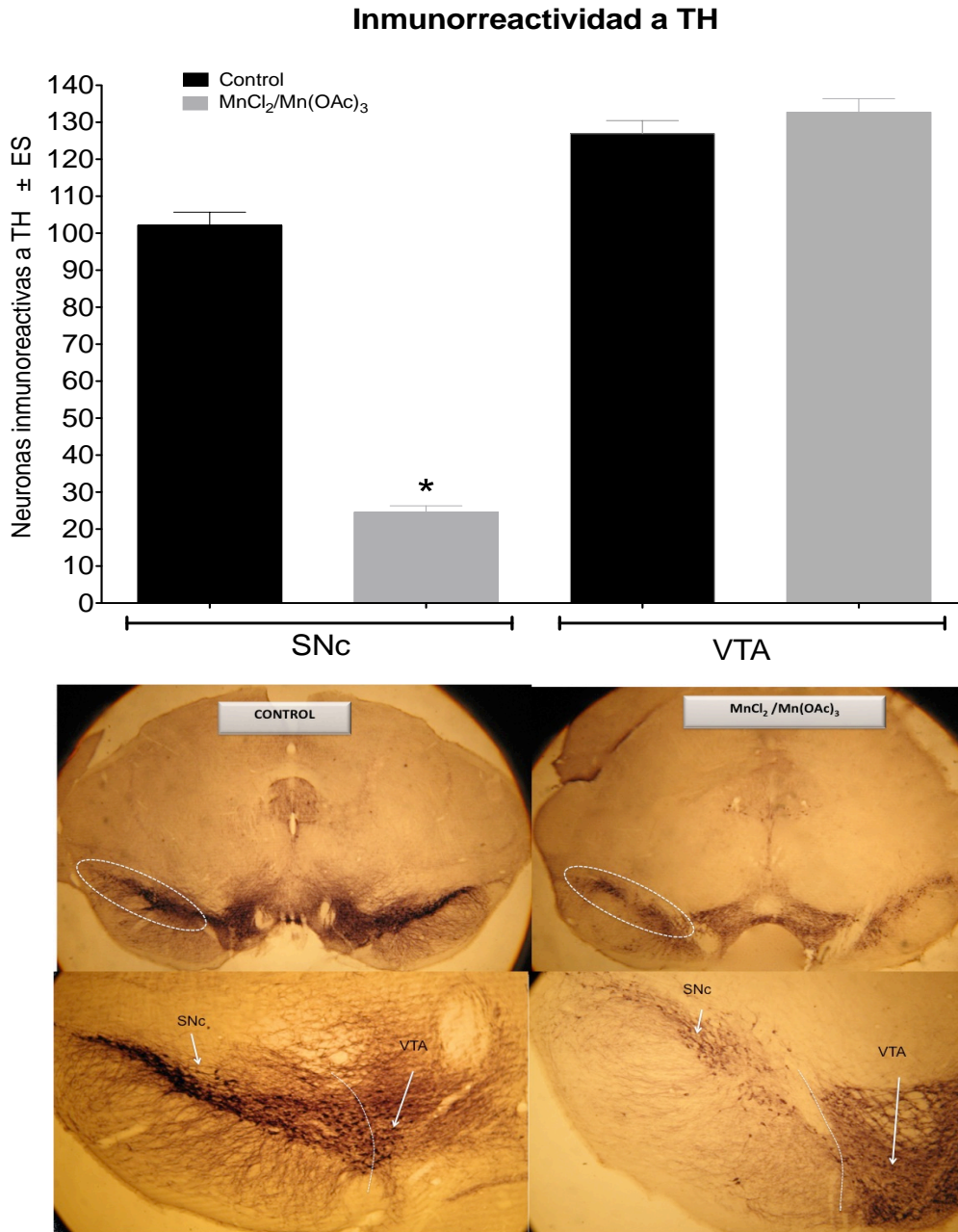


Figura 10. En A se observa el promedio de neuronas dopaminérgicas de la SNc y el VTA en cada grupo. El conteo de las neuronas se realizó en un área de $1500 \mu\text{m}^2$ dentro de la SNc y en $3300 \mu\text{m}^2$ en el VTA. Se encontró una reducción significativa de neuronas TH en la SNc ($t(125)=20.69$, $p < 0.01$), mientras que en el VTA no hubo diferencias en el grupo control y experimental ($t(105)=1.13$, $p = 0.26$). En B se muestran cortes representativos a nivel del mesencéfalo de ambos grupos donde se puede observar dicha pérdida de neuronas en la SNc de los animales expuestos a Mn en comparación con los animales del grupo control.

Imunohistoquímica anti-NeuN

Por otra parte, se evaluó el posible daño en otras áreas con el fin de determinar la especificidad del Mn por estructuras dopaminérgicas. En el NE el grupo control tuvo un promedio de 73.65 neuronas positivas a NeuN y en el grupo experimental se encontró un promedio de 76.85. Al aplicar la prueba t de muestras independientes no se encontraron diferencias significativas, $t(104)=1.23$, $p = 0.22$. Así mismo, en el GP el grupo control mostró un promedio de 17.4 neuronas positivas a NeuN mientras que el grupo experimental tuvo 18.7 como promedio, lo cual no es diferente en términos estadísticos, $t(81)=1.04$, $p = 0.30$ (figura 11).

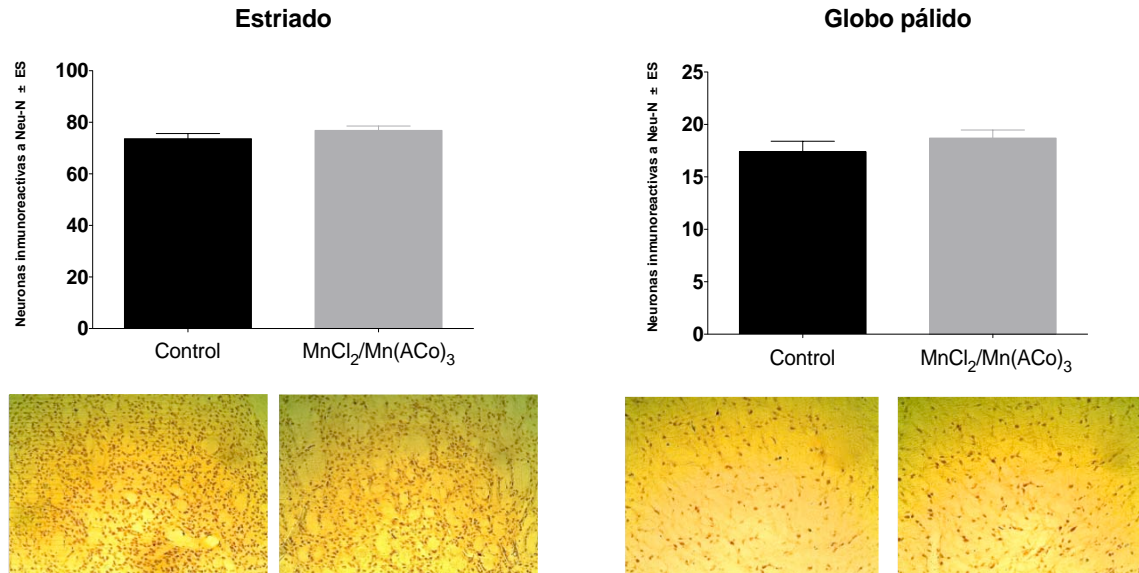


Figura 11. Muestra que no hay diferencias en el número de células inmunorreactivas a NeuN del núcleo estriado y globo pálido del grupo control y el grupo que inhaló la mezcla de manganeso $t(104)=1.23$, $p = 0.22$

Por otra parte, en las áreas de CA1 y CA3 del hipocampo el grupo control mostró una media de 52.64y 48.78 contra 56.48 y 51.11 del grupo experimental, respectivamente. La prueba t de muestras independientes no mostró diferencias significativas en estas dos área (CA1, $t(47)=1.05$, $p = 0.29$; CA3, $t(52)= 0.77$, $p = 0.44$) (figura 12).

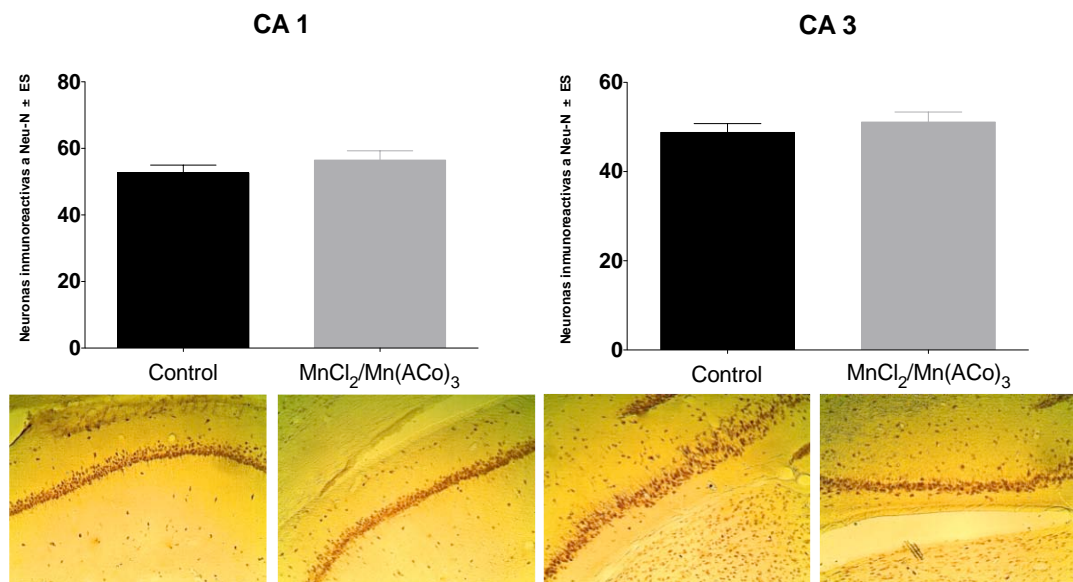


Figura 12. Células inmunorreactivas a NeuN de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo del grupo control, y el grupo que inhaló la mezcla de manganeso. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el experimental.

De manera similar, tampoco se encontraron diferencias significativas en la corteza motora, el grupo control tuvo una media de 95.64 mientras que la del grupo experimental fue de 95.13, ($t(99)=1.13$, $p = 0.25$). Finalmente, en el cerebelo se observó una media de 366.41 en el grupo control mientras que en el grupo experimental se obtuvo una media de 382.57; el análisis estadístico

también demostró que no hubo diferencias en este núcleo, $t(96)=0.13$, $p = 0.89$) (figura 13).

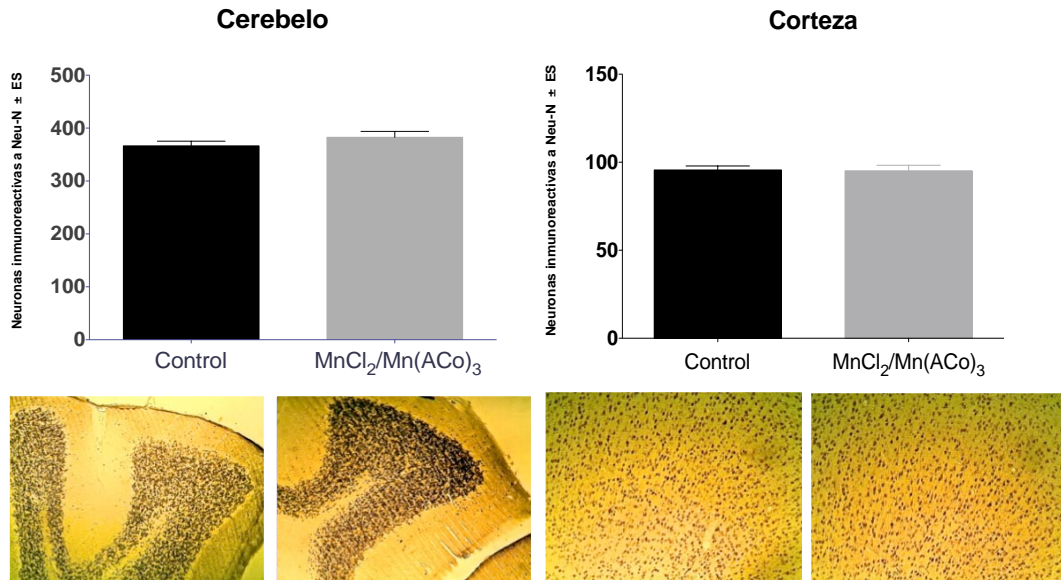


Figura 13. Células inmunorreactivas a NeuN de la corteza motora y cerebelo del grupo control, y el grupo que inhaló la mezcla de manganeso. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el experimental.

c) Espinas dendríticas

También se realizó el conteo de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas en el NE del grupo de animales del grupo control y de los que inhalaron Mn durante 6 meses. Los resultados mostraron que en el grupo control hubo un promedio de 18.02 espinas dendríticas mientras que en el grupo experimental se observó un promedio de 9.17 espinas, lo cual indica una reducción aproximada del 40% de espinas dendríticas en el grupo que inhaló la mezcla de Mn ($t(438)=21.20$, $p < 0.01$). En la misma figura se muestran imágenes

representativas de espinas dendríticas del grupo control y el grupo experimental (figura 14).

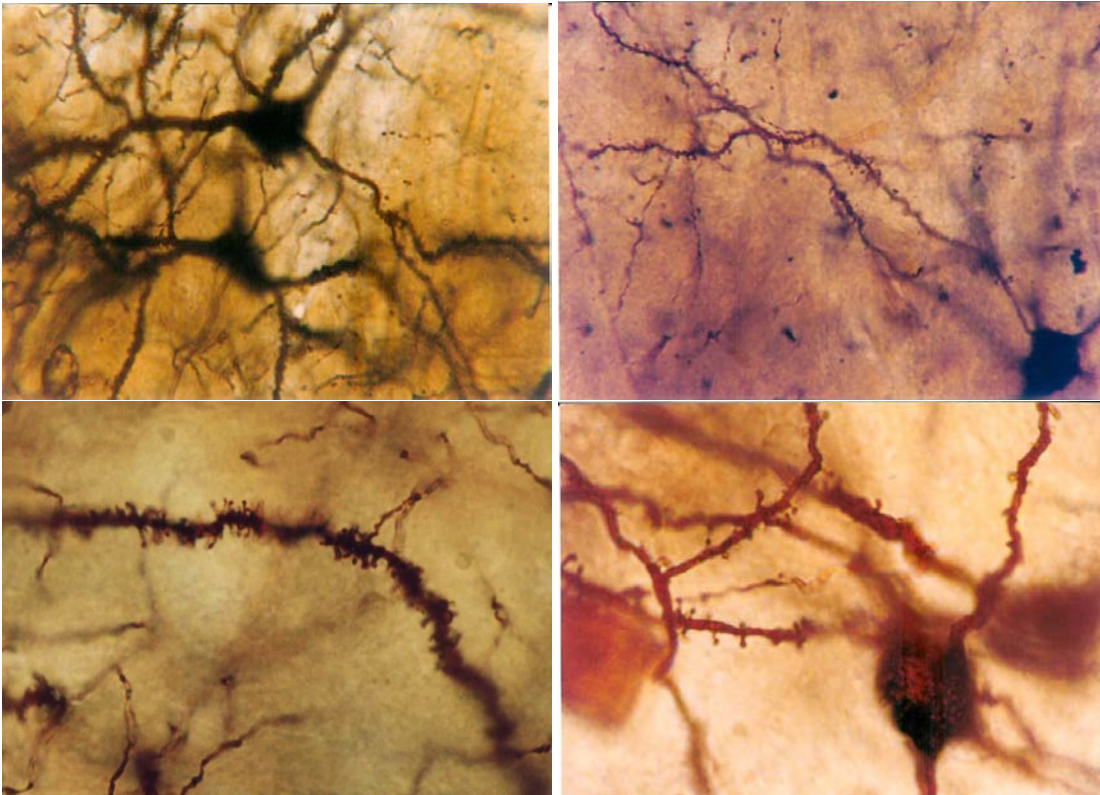
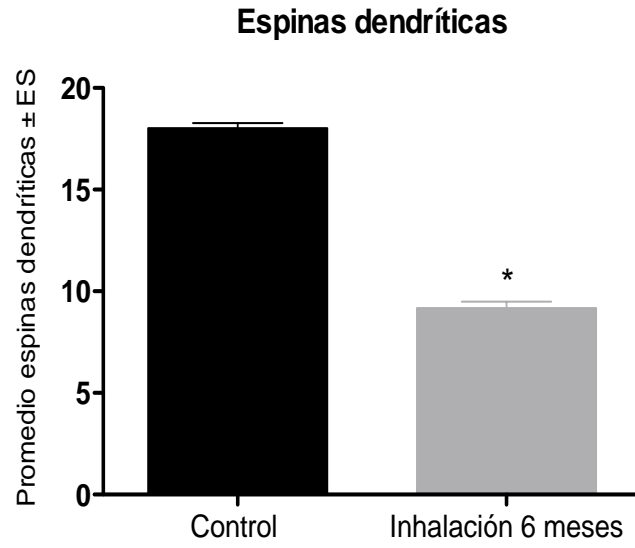


Figura 14. Media del número de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas en los grupos de inhalación de 6 meses, post-inhalación así como de inhalación de 10 meses. A y C son fotografías de dendritas del grupo control donde se puede apreciar una gran densidad de espinas dendríticas en comparación con el grupo expuesto a Mn (B y D).

Fase 3. “Recuperación”

Una vez que se establecieron las condiciones para reproducir las alteraciones motoras y citológicas en los animales expuestos a la mezcla de Mn se evaluó si dichas alteraciones se mantenían aun después de terminado el periodo de inhalación de Mn. Los resultados mostraron que tanto en el grupo de ratas que inhaló Mn durante 10 meses (grupo “expuestos”) como el grupo que inhaló Mn durante 6 meses y, posteriormente, se evaluó si había recuperación motora a lo largo de 4 meses (grupo “post-inhalación”) tuvieron aumento significativos en el tiempo para atravesar la viga de 6 y 12 mm que se mantuvo desde la semana 10 hasta la semana 40 ($F(2, 484)=9.25$, $p < 0.01$) (figuras 15 y 16). En ambos grosores de la viga se observa que el grupo control, el grupo “expuestos” así como el grupo de “post-inhalación” tienen medias aproximadas de 20 segundos en la evaluación inicial y al terminar el experimento los grupos que inhalaron Mn tuvieron medias de 120 segundos.

Viga 6 mm

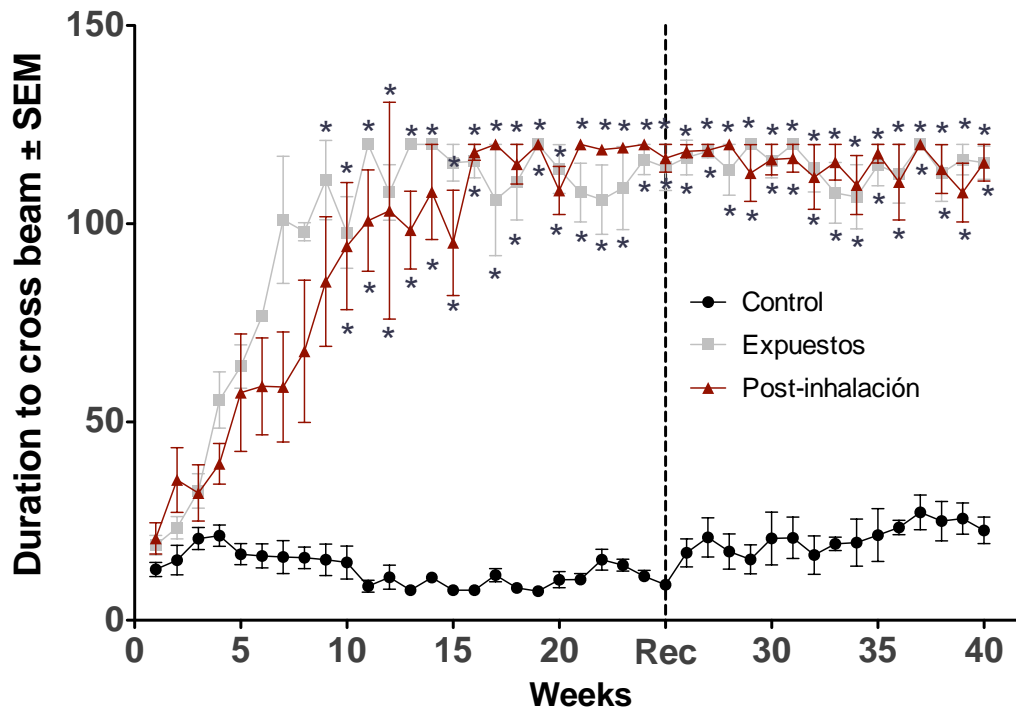


Figura 15. Se encontró que los animales que dejaron de inhalar y fueron evaluados durante 4 meses muestran un desempeño similar al de los animales que siguieron inhalando durante ese periodo ya que el tiempo para desplazarse en la viga de 6 mm es significativamente mayor al de los animales del grupo control ($F(2,484) = 9.25, p < 0.01$).

Viga 12 mm

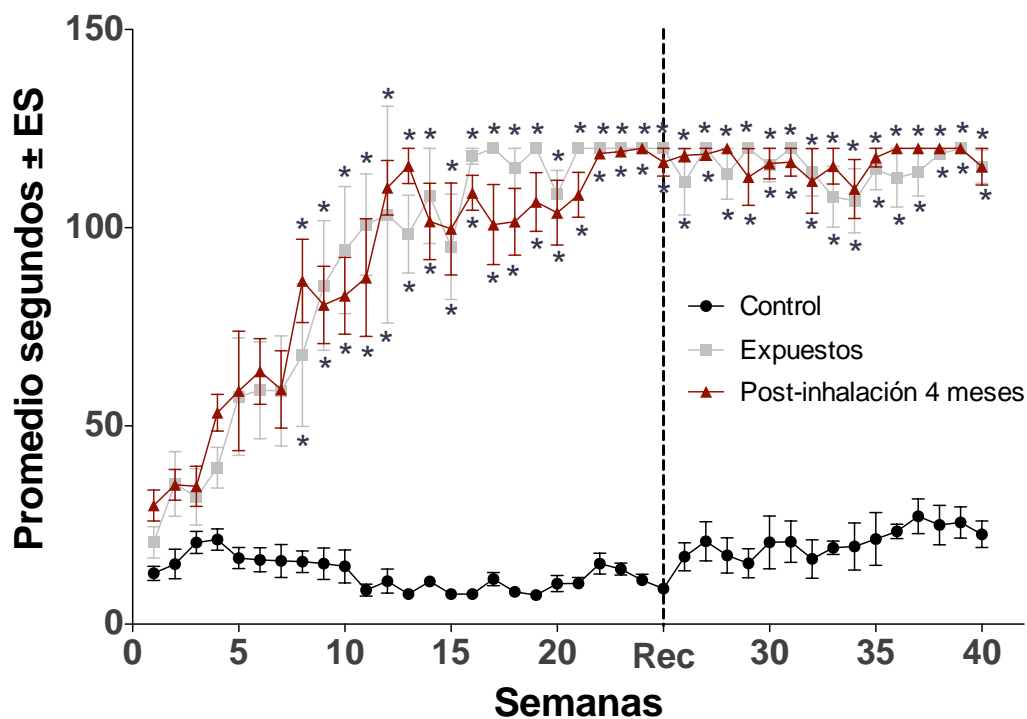


Figura 16. Al igual que en la prueba de la viga de 6 mm, los animales que dejaron de inhalar y fueron evaluados durante 4 meses muestran un desempeño similar al de animales que siguieron inhalando durante ese periodo ya que el tiempo para desplazarse en la viga de 12 mm es significativamente mayor al de los animales del grupo control, $F(2, 571) = 6.23, p < 0.01$.

En la figura 17 se observan resultados similares en la prueba de reaching task, el promedio de pellets atrapados de forma correcta en el grupo control fue de 15.37 a lo largo de todo el experimento mientras que en el grupo de “expuestos” y el de “post-inhalacion” se observó una reducción del promedio de aciertos a medida que avanzaron las semanas de inhalación hasta llegar a una media de 1.75 y 0 en la última semana de evaluación, respectivamente. El análisis de ANOVA de dos vías confirmó que esta reducción de pellets atrapados correctamente en los animales que inhalaron Mn es significativa ($F(2, 686) =$

5.98, $p < 0.01$). Es decir, las alteraciones motoras encontradas en las pruebas motoras se mantienen, al menos, durante 4 meses después de concluidas la inhalaciones. Adicionalmente, el análisis de los videos reveló que las alteraciones mostradas tanto en la prueba de la viga como en la prueba de reaching task se mantuvieron durante el periodo de post-inhalación de 4 meses.

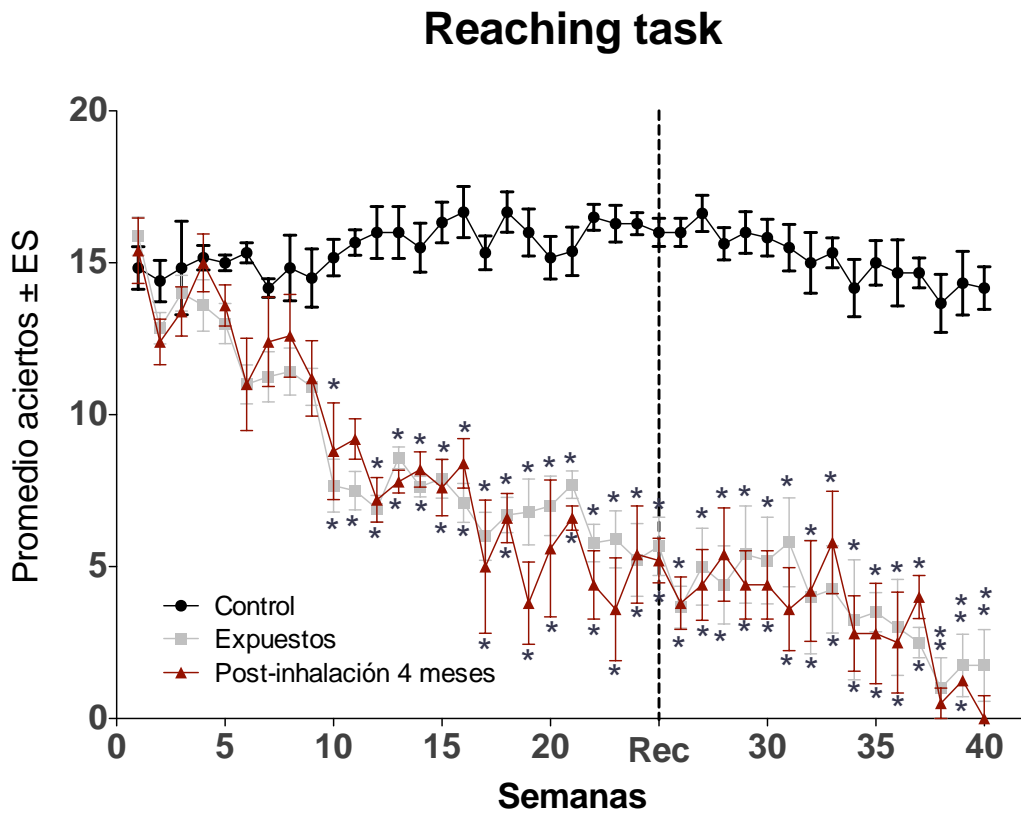


Figura 17. Mientras que el promedio de aciertos en la prueba de “reaching task” se mantiene similar durante 10 meses en los animales del grupo control la dificultad para retirar alimento en la plataforma persiste durante 4 meses después de la última inhalación al igual que en los animales que siguieron inhalando, $F(2, 686) = 5.98, p < 0.01$.

Así mismo, tanto en el grupo “expuestos” como en el grupo “post-inhalación” se encontró una disminución significativa de neuronas inmunopositivas a TH ($F(2, 192) = 339.1, p < 0.01$). En la figura 18 se observa que, a pesar de que los animales dejaron de inhalar por 4 meses, la pérdida de neuronas persistió, dicha pérdida es comparable con lo observado en los animales que siguieron inhalando.

Inmunohistoquímica TH - Post-inhalación 4 meses

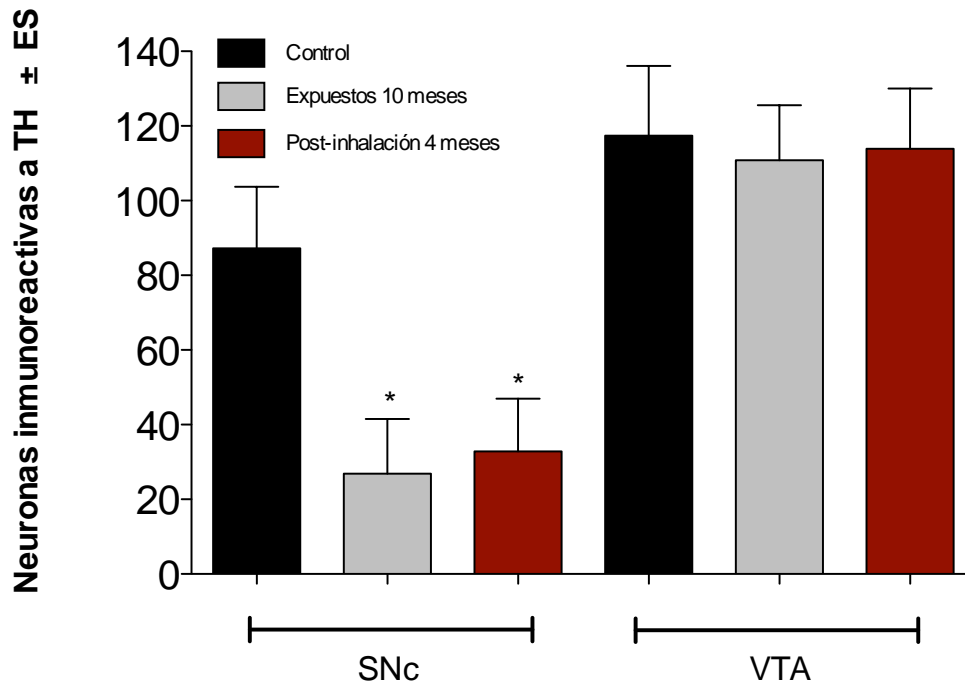


Figura 18. Se observa el promedio de neuronas inmunopositivas a TH de la SNc y el VTA. En la SNc el grupo control tuvo una media de 98.64, mientras que el grupo expuestos 24.81 y el grupo de post-inhalación 24.97, $F(2, 192) = 339.1, p < 0.01$. En la VTA las medias para el grupo control, expuestos y post-inhalación fueron de 117.40, 110.83 y 113.87, respectivamente; no se encontraron diferencias significativas en la VTA, $F(2, 102)=1.35, p = 0.37$.

En cuanto al número de espinas dendríticas, se encontró que durante el periodo de post-inhalación de 4 meses el porcentaje de pérdida se mantuvo en niveles similares (cerca del 40 %) a los encontrados en el grupo de ratas expuestas a Mn (figura 19).

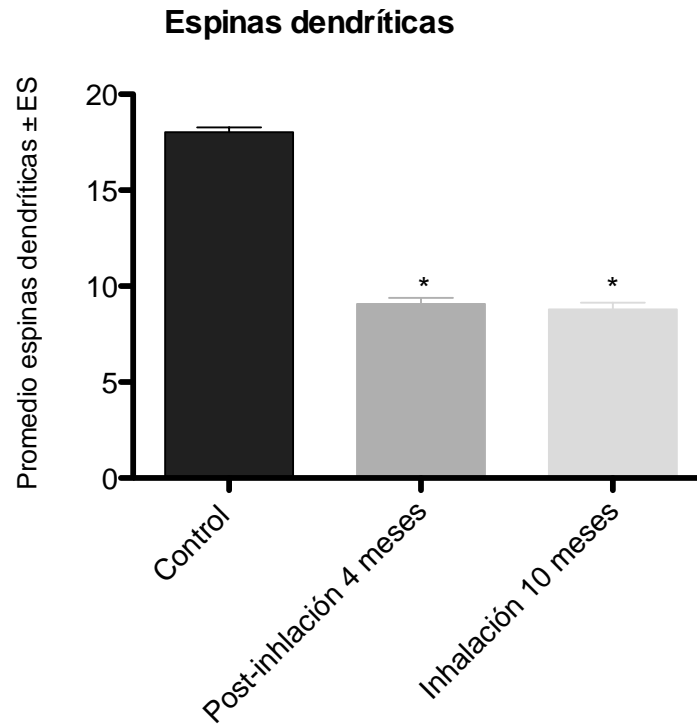


Figura 19. Muestra el promedio de espinas dendríticas en el grupo control (18.02), el grupo de post-inhalación (9.07) y el grupo que inhaló la mezcla de Mn durante 10 meses (8.8). De esta forma, se demuestra que la disminución de espinas se mantiene durante 4 meses después de la última inhalación, $F(2, 606)=270.6, p < 0.01$.

Fase 4. Respuesta a L-DOPA

Un grupo de ratas que inhalaban la mezcla de Mn durante 6 meses fue tratado durante dos semanas con L-DOPA con el fin de determinar el efecto de este fármaco sobre el desempeño motor y asegurarnos que las alteraciones son de origen dopaminérgico. Los resultados mostraron que los animales tratados con L-DOPA mejoraron significativamente su desempeño en la prueba de la viga ya que el grupo tratado con este fármaco tuvo un promedio de 31 segundos al cruzar la viga de 12 mm, un promedio similar al del grupo control (20.91) mientras que el grupo que siguió inhalando Mn tuvo un promedio de 118.3 segundos ($F(2, 344) = 7.13, p < 0.01$) (figura 21). Así también, en el grupo que se administró L-DOPA hubo un aumento en el promedio de aciertos. Antes de la administración de L-DOPA tenía una media de 5.33, sin embargo, después de tratamiento tuvo una media de 13 aciertos; esta media es parecida a la del grupo control que fue de 16 mientras que la del grupo que siguió inhalando Mn fue 5.4. Los análisis hechos a través de las grabaciones pusieron en evidencia que los animales tratados con L-DOPA tuvieron una secuencia motora parecida a la ejecución de los animales del grupo control. Así también, en la prueba de la viga se encontró que el tiempo de inmovilidad y las alteraciones para iniciar el movimiento no se presentaron en dicho grupo (figuras 20, 21 y 22).

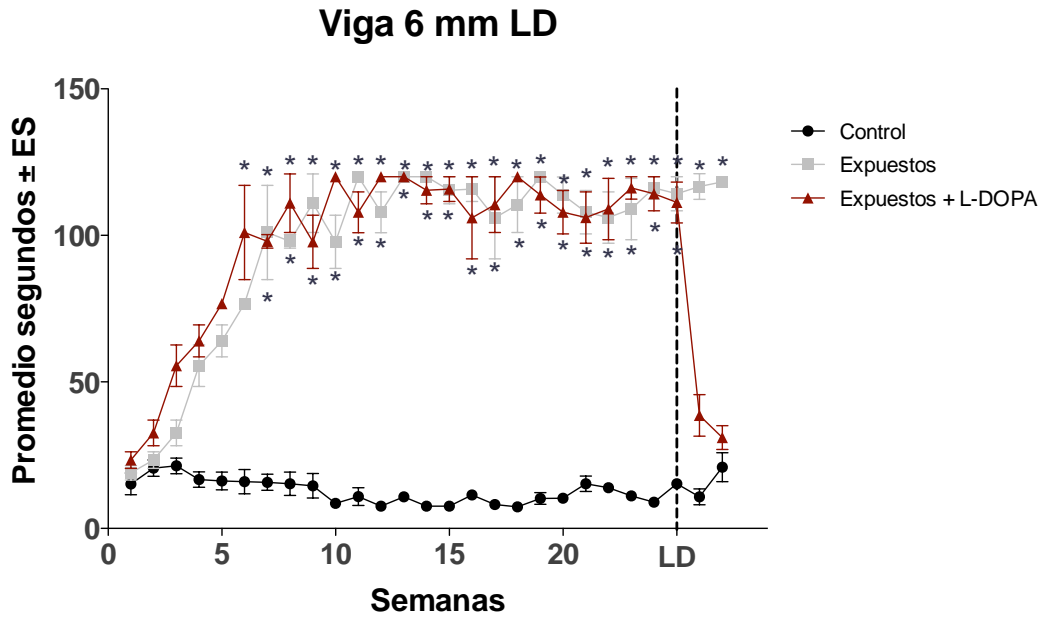


Figura 20. Después de 6 meses de inhalación, a un grupo de ratas se le administró L-DOPA (LD). A partir de la semana 24, el tiempo de recorrido de las ratas que inhalaron la mezcla de Mn y fueron medicadas es parecido al de los animales del grupo control. El grupo sin tratamiento sigue mostrando aumento en el tiempo de recorrido de la viga de 6 mm ($F(2, 203) = 15.25, p < 0.01$).

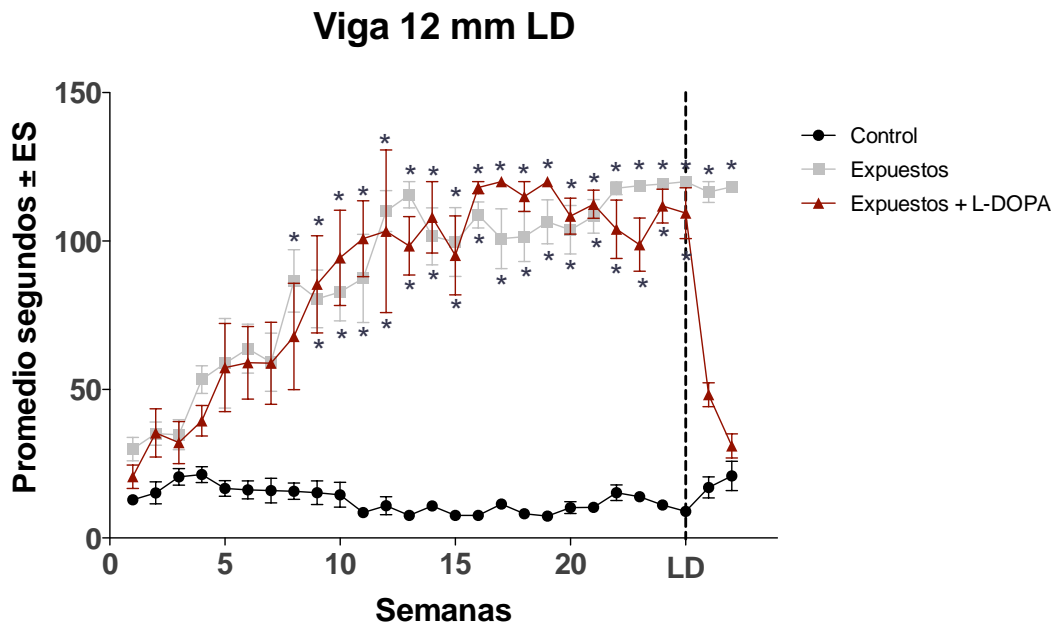


Figura 21. Se observa que el tiempo de recorrido de las ratas que inhalaron la mezcla de Mn y recibieron L-

DOPA es parecido al de los animales del grupo control. El grupo sin tratamiento sigue mostrando aumento en el tiempo de recorrido de la viga de 12 mm, $F(2, 344) = 7.13$, $p < 0.01$.

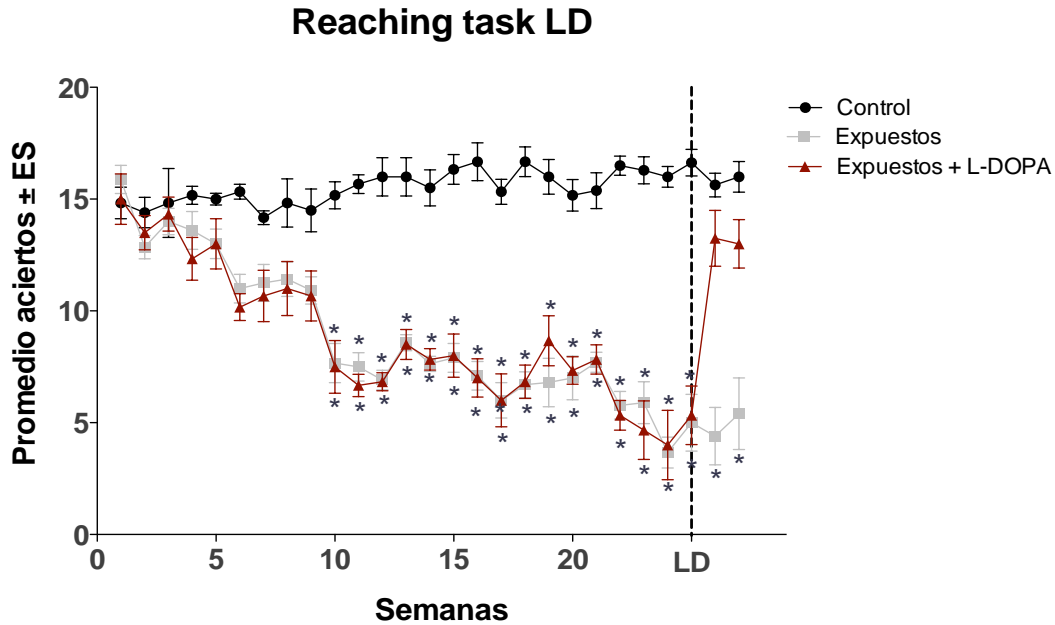


Figura 22. De la misma forma que en la prueba de la viga, en la prueba de reaching task se encuentra que los animales que inhalaron la mezcla de Mn y fueron tratados con L-DOPA tienen aumento en el número de aciertos. El grupo que no recibió tratamiento tiene pocos aciertos en la prueba ($F(2, 539)=7.45$, $p < 0.01$).

Fase 5. Determinación de las concentraciones de DA y sus metabolitos

De acuerdo con los datos obtenidos observamos que, posterior a 6 meses de inhalación de la mezcla de Mn, hubo disminución significativa de DA y sus metabolitos en estructuras de los ganglios basales (ver tabla 1). El promedio de DA en el NE del grupo control fue de 110.6 pg/mg de proteína mientras que para el grupo experimental fue de 25.74 pg/mg de proteína, esto representó una disminución significativa del 76.73% ($t(9)=2.77$, $p < 0.05$). En el GP, el promedio

de DA del grupo control fue de 31.58 pg/mg de proteína y del grupo experimental de 5.73 pg/mg de proteína, por lo que se observó una disminución significativa del 81.87% ($t(8)=3.16$, $p < 0.05$). En la SNc, las concentraciones de DA del grupo control fueron de 15.17 pg/mg de proteína y del grupo experimental de 2.99 pg/mg de proteína, que también indica una reducción significativa en los animales que inhalaban la mezcla de Mn del 80.29% ($t(8)=2.96$, $p < 0.05$).

	NE			GP			SNc		
	DA	DOPAC	HVA	DA	DOPAC	HVA	DA	DOPAC	HVA
Grupo control	110.6±30.3	75.2±23.5	54.95±26.3	31.5 ± 9.8	35.3 ± 11.9	24.8 ± 9.9	15.1±6.4	15±8.4	15.9±5.4
Grupo experimental	25.7±5.1*	24.3±9.1*	16.01±3.9*	5.7±1.9*	8.3±2.8*	5.7±1.8*	2.9±1.5*	4.5±2.2*	4.8±1.3*

Tabla 1. Muestra el promedio \pm el error estándar de pg/mg de proteína de DA y metabolitos del animales del grupo control y el grupo experimental en las estructuras del NE, GP y SNc. * $p < 0.05$

Por otra parte, el promedio del contenido de DOPAC en el NE del grupo control fue 76.25 pg/mg de proteína y del grupo experimental de 24.34 pg/mg de proteína, que indicó una disminución significativa del 68.07% ($t(9)=2.99$, $p < 0.05$). En el GP, las concentraciones promedio del grupo control fueron de 35.39

pg/mg de proteína mientras que en el grupo experimental se encontró 8.3 pg/mg de proteína, lo cual muestra que en los animales expuestos a Mn hubo una reducción significativa del 76.49% ($t(9)= 5.05$, $p < 0.05$). En la SNc se encontró una reducción significativa del 70% ($t(9)=2.8$, $p < 0.05$), ya que grupo control se obtuvo una media de 15 pg/mg de proteína y en el grupo experimental de 4.5 pg/mg de proteína.

Finalmente, los contenidos del metabolito HVA del grupo control en el NE fueron de 54.95 pg/mg de proteína, el grupo experimental obtuvo una media de 16.01 pg/mg de proteína donde se encuentra una reducción significativa del 71.74 % ($t(9)=6.34$, $p < 0.05$). En el caso del GP, también se encontró una reducción significativa que fue del 76.84%; los animales del grupo control obtuvieron una media de 24.85 pg/mg de proteína y el grupo experimental 5.76 pg/mg de proteína ($t(9)=2.01$, $p < 0.05$). En la SNc, las concentraciones de HVA del grupo control fueron de 15.91 pg/mg de proteína y del grupo experimental de 4.8 pg/mg de proteína. El porcentaje de pérdida de HVA del grupo experimental en la SNc fue del 69.83% ($t(9)=2.27$, $p < 0.05$).

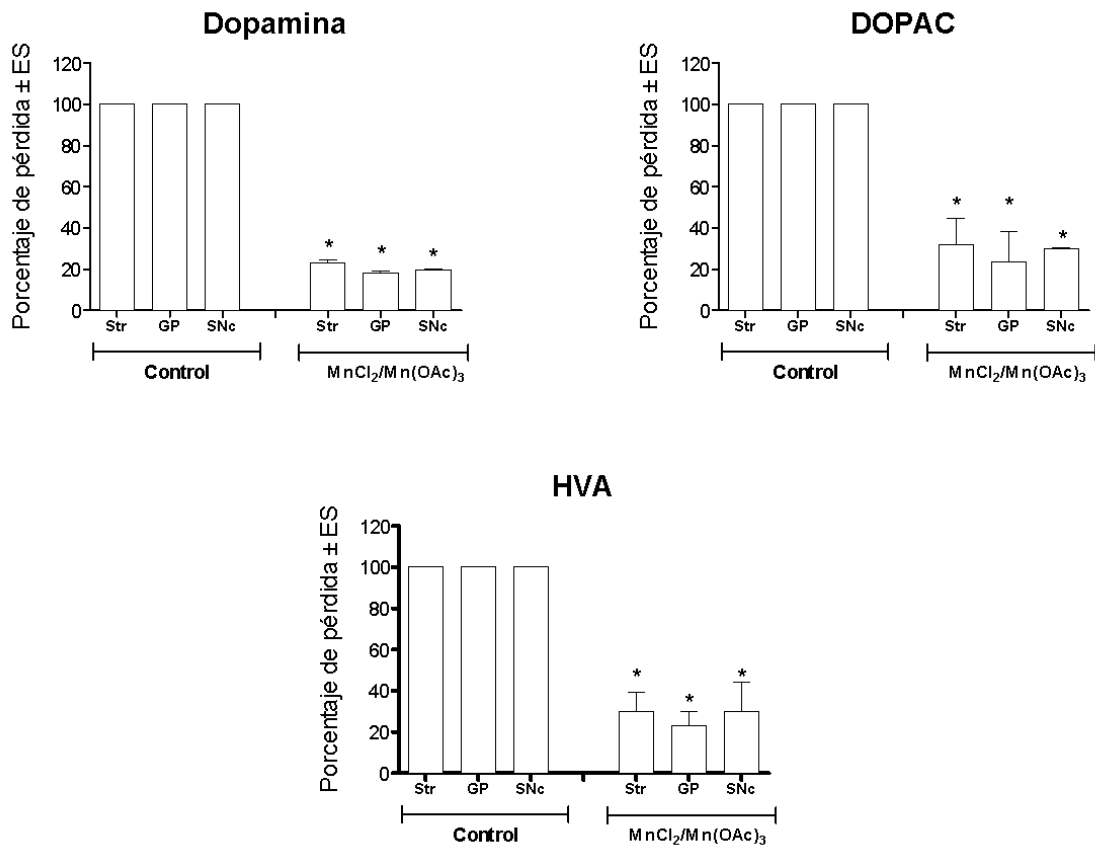


Figura 23. Esta gráfica representa el porcentaje de pérdida de DA, DOPAC y HVA en el núcleo estriado (NE), globo pálido (GP) y sustancia nigra compacta (SNc) de los animales del grupo expuesto a 40 inhalaciones de MnCl₂ – Mn(OAc)₃ comparados con el grupo control. * p < 0.05.

Discusión

En ciencia se entiende que un modelo consiste en la simulación de los aspectos más representativos de un fenómeno, de tal forma que resulte ser una herramienta física o conceptual que facilite su estudio. Así pues, los esfuerzos de contar con modelo más completo de la EP radican en la comprensión de los mecanismos involucrados en la etiopatogénesis de la enfermedad así como para probar tratamientos (Emborg, 2004). De este modo, el modelo de inhalación de Mn empleado en este estudio puede ser considerado confiable, ya que ha demostrado simular los aspectos más representativos de la EP.

Fase 2. Inhalación de Mn

a) Alteraciones conductuales

Primeramente, a nivel conductual se observó que las ratas expuestas a la mezcla de Mn mostraron alteraciones motoras importantes en comparación con los animales del grupo control. De la misma forma que en el modelo de inhalación de Mn en ratón, algunas de estas alteraciones consistieron en la dificultad para iniciar el movimiento, así como pérdida del equilibrio, que dieron como resultado el aumento significativo del tiempo de desplazamiento en la prueba de la viga conforme aumentaba el número de inhalaciones (Ordoñez-Librado, 2008, 2010, 2011; Sánchez-Betancourt et al., 2012). El aumento del tiempo para ejecutar la prueba de la viga es una variable que también ha sido

reportada en condiciones donde hay alteraciones del sistema dopaminérgico. Así por ejemplo, Truong et al. (2006) y Allbutt & Henderson (2007) reportan que tras la inyección unilateral de 6-OHDA en el haz medial del cerebro anterior de ratas hay aumento significativo en el tiempo para ejecutar la prueba de la viga debido a la pérdida de la coordinación motora, dificultad para iniciar el movimiento, además de la presencia de la conducta de “congelamiento”. Así también, estos resultados coinciden con experimentos en los que ratas depletadas de DA después de ser inyectadas con un antagonista dopaminérgico (Haloperidol) mostraron las mismas alteraciones motoras en la prueba de la viga (Drucker-Colín & García-Hernández, 1991).

En cuanto a la prueba de reaching task, también se encuentra evidencia de daño motor en las ratas expuestas a Mn. Mientras que los animales del grupo control tuvieron una ejecución normal durante todo el experimento los animales del grupo experimental disminuyeron el promedio de aciertos a medida que incrementaban las inhalaciones. Estos resultados coinciden con los de los ratones expuestos a la mezcla de Mn, ya que a partir de los primeros meses de exposición es notable la disminución en el promedio de aciertos en esta prueba durante las inhalaciones (Ordoñez-Librado, et al., 2008, 2010, 2011). De manera similar, en otros modelos de degeneración dopaminérgica como el de la 6-OHDA, se ha observado que la conducta de retirar alimento en la prueba de reaching task en ratas lesionadas con esta toxina muestran reducción significativa en el número de aciertos cuando usan la pata contralateral a la lesión (Metz, Farr, Ballermann & Whishaw, 2001; Miklyaeva, Martens &

Whishaw, 1995). Así también, en el modelo de MPTP se encontró que la destreza manual de primates no humanos en la prueba de “reaching task” estuvo correlacionada con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc (Taylor, Elsworth, Roth, Sladek & Redmond, 1990).

Además de la reducción en el promedio de aciertos, el análisis de los movimientos permite poner en evidencia que los animales del grupo experimental presentaron alteraciones a nivel cualitativo, como dificultad para extender el brazo hacia el pellet, para sujetarlo con los dígitos así como para transportarlo hacia el hocico, ya que era arrastrado por la plataforma y tirado en el piso para poder comerlo. Este punto es importante destacar porque a través de la prueba de reaching task se evalúa la capacidad y precisión para alcanzar, sujetar y retirar pellets en especies como roedores, primates no humanos y humanos debido a que comparten los mismos componentes anatómico y funcional (Taylor, Elsworth, Roth, Sladek & Redmond, 1990; Whishaw, Pellis, Gorny & Pellis, 1991; Metz, Farr, Ballermann & Whishaw, 2001; Whishaw et al., 2002). Básicamente, esta capacidad consiste en la orientación frontal al objetivo, extensión de la extremidad con los dedos/dígitos semiabiertos, sujetar el alimento (pronación), levantarlo (supinación) y llevarlo hacia el hocico. Así pues, se ha determinado que esta conducta y todos los componentes motores que implica es altamente sensible a alteraciones de tipo dopaminérgico, por lo que los mismos déficits cualitativos y cuantitativos encontrados en nuestras ratas expuestas a la mezcla de Mn también están presentes en otras condiciones como en el modelo de inhalación de Mn en ratón (Ordoñez-Librado et al., 2008,

2011), en el modelo de 6-OHDA en ratas (Miklyeva, Martens & Whishaw, 1995) en el modelo de MPTP en primates no humanos (Taylor et al., 1990; Redmond et al., 2008) y en la misma EP en humanos (Whishaw et al., 2002; Sacrey, Alaverdashvili & Whishaw, 2009).

b) Inmunohistoquímica

Los resultados citológicos también proporcionan solidez a nuestro modelo, ya que además de las alteraciones motoras mostradas en los animales que inhalaron la mezcla de Mn se encontró pérdida del 75% de neuronas inmunopositivas a TH en comparación con el grupo control. La pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNc es el rasgo histopatológico más representativo de la EP y se ha establecido que, con la aparición de los primeros síntomas ya hay depleción dopaminérgica del 80% en el estriado y degeneración neuronal de al menos 60% en la SNc (Dauer & Przedborski, 2003). Esto concuerda con nuestros datos ya que se encontró depleción y pérdida de neuronas inmunopositivas a TH similares a la EP y también al modelo de inhalación de Mn en ratón; mientras que en nuestro estudio encontramos una depleción significativa del 69.85 % de DA en el modelo de ratón hubo una reducción del 71 % (Ordoñez-Librado et al. 2008, 2011).

Sin embargo, es importante señalar que estos resultados no coinciden con otros estudios donde se evalúa la neurotoxicidad del Mn ya que se ha propuesto que el daño se produce en otros núcleos de los ganglios basales, como el GP o NE

(Calabresi et al., 2001; Olanow, 2004; Perl & Olanow, 2007). Al respecto, es necesario tomar en cuenta que así como existen discrepancias por el sitio donde el Mn origina daño celular, también hay una gran variedad de condiciones experimentales usadas, ya que algunos parámetros importantes como la valencia del compuesto, solubilidad, concentración, así como la vía de administración difieren en cada experimento. Así pues, en nuestro modelo se emplearon parámetros que no se habían utilizado antes, ya que se usó una mezcla de Mn en estados divalente y trivalente. De acuerdo con Aschner (2005), el estado de oxidación del Mn es importante, ya que es un factor que determina su toxicidad. Al respecto se ha descrito que el Mn^{+3} tiene mayor afinidad por el complejo I de la cadena mitocondrial, mientras en el Mn^{+2} es la especie predominante *in vivo*, además de que el Mn^{+2} es oxidado al reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$. Por lo que es posible que el Mn^{+3} desacople la cadena de electrones generando $O_2^{\cdot-}$, el cual es capaz de reaccionar con el Mn^{+2} y ser oxidado a Mn^{+3} , aumentando la disponibilidad de este ión para dañar más mitocondrias. Esto provocaría un ciclo de oxidación del Mn, donde el Mn^{+3} provoca un evento inicial y el Mn^{+2} más el $O_2^{\cdot-}$ lo amplificarían mediante la producción de EROs, lo cual llevaría a las neuronas a un estado de estrés oxidativo, con la subsiguiente muerte neuronal. También se ha mencionado que el cerebro es un blanco importante de los metales de transición, como el Mn, debido a su alta concentración de catecolaminas (Stokes, Hastings & Vrana, 1999). Al respecto, se ha sugerido que el Mn interactúa con grupos catecoles de las neuronas dopaminérgicas causando depleción de DA y daño en dichas

neuronas (Archibald & Tyree, 1987; Donaldson McGrigor & LaBella, 1982). Por tanto, es posible que la oxidación de DA inducida por Mn resulte en la generación de EROs, estrés oxidativo y citotoxicidad (Archibald & Tyree, 1987; Graham, 1984; Hussain Slikker & Ali., 1997; Simonian & Coyle, 1996). Así pues, se han propuesto muchas explicaciones para dilucidar la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas al Mn, como la deficiencia de defensas celulares antioxidantes (Desole et al., 1997) y daño en el metabolismo mitocondrial (Morello et al., 2008).

Además, hay que considerar otros factores como la concentración y la ruta de administración. Por una parte, en nuestro modelo los niveles de Mn en la cámara de inhalación fueron 2676 mg/m^3 (Sánchez-Betancourt et al., 2012) y el tiempo de exposición (6 meses); lo anterior fue suficiente para producir alteraciones citológicas y conductuales, lo cual es consistente con reportes que indican que los niveles tóxicos del Mn se encuentran en concentraciones mayores a 1 mg/m^3 y en exposiciones a largo plazo (Pal, Samii, & Calne, 1999). Por otra parte, la ruta de administración es un factor determinante para la disponibilidad del Mn en el cerebro. Así pues, Roels et al. (1997) investigaron las concentraciones de Mn en el cerebro de ratas después de ser expuestas a la forma soluble (MnCl_2) e insoluble (MnO_2). Éstos se administraron por inyección intratraqueal (como una forma análoga de inhalación) y por vía intragástrica (como una forma análoga de la vía oral). La administración intratraqueal de MnCl_2 (1.22 mg), que se dió una vez por semana durante 4 semanas resultó en el incremento de concentración

de Mn en sangre del 68% (500 ng/g en el grupo control y 700-800 ng/g de Mn en el grupo expuesto). Esto llevó al aumento significativo de Mn en el estriado del 205% (300-400 ng/g en el grupo control y 1000-1200 ng/g de Mn en el grupo experimental) y en corteza del 48% (400 ng/g en el grupo control y 600-700 ng/g de Mn en el grupo experimental). Por otra parte, la administración intragástrica de $MnCl_2$ (24.3 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas) también produjo aumento del 68% de Mn en sangre aunque su concentración fue menor en el cerebro, ya que hubo aumento del 22% en la corteza y no hubo cambios significativos en el NE. Así, la liberación pulmonar de Mn es más eficiente que la ingesta para aumentar la concentración de Mn en el cerebro.

La susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas al Mn ha sido explicada por el posible papel de la DA y su recaptura en el transporte de Mn al interior de la neurona (Chen, Cheng, Lin, Chen & Huang, 2006). Así pues, Ingersoll, Montgomery & Aposhian (1999) evaluaron la participación del DAT en el transporte del Mn al administrar cocaína (un inhibidor del DAT) antes de la inyección intracerebral de Mn, encontrándose reducción significativa de este metal en los ganglios basales. Erikson, John, Jones & Aschner (2005) encontraron que ratones que no expresan el DAT (DAT-KO) mostraron reducción del 40% en la acumulación de Mn en comparación con ratones del grupo control que recibieron inyecciones de Mn. Además, se ha reportado que ratas pretratadas con reserpina, un inhibidor de la liberación de DA, mostraron menor concentración de Mn en los ganglios basales, por lo que se podría considerar el DAT como responsable de la entrada de Mn a la neurona y la

cantidad de DA como un “activador” de la entrada de Mn (Aposhian, Ingersoll & Montgomery, 1999). Estos estudios, soportan la idea de que el transporte del Mn al interior de las neuronas dopaminérgicas es dependiente de la recaptura y/o metabolismo de la DA; así pues, estas observaciones llevan a la hipótesis de que el Mn puede unirse a la DA y transportarse como un complejo al interior de las neuronas vía el DAT, y/o el Mn puede competir con el Na^+ para su co-transporte con la DA a través del DAT (Aposhian, Ingersoll & Montgomery, 1999).

Otro punto importante a considerar en el daño celular inducido por el Mn es la integridad encontrada en las neuronas del VTA, ya que son dopaminérgicas y también se encuentran preservadas en otros modelos de la EP y en la misma enfermedad (Bernheimer, Birkmayer, Hornykiewicz, Jellinger & Seitelberger, 1973; Blanchard et al., 1994; Uhl, 1998). Al respecto, 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, entre ellas el Mn, ya que se ha sugerido que su concentración en la SNc depende de su captura a través del DAT (Ingersoll, Montgomery & Aposhian, 1999; Erikson *et al.*, 2005; Roth, Li, Sridhar & Khoshbouei, 2013). En contraste, las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas del VTA, son menos afectadas en la EP ya que se ha propuesto que la 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) o el transportador vesicular de monoaminas tipo 2 (VMAT2) que del DAT, mientras que en el NE el mecanismo de “limpieza” de DA del espacio sináptico parece depender principalmente de este transportador (Ingersoll, Montgomery & Aposhian, 1999; Erikson *et al.*, 2005). Estas diferencias son importantes para entender la resistencia de las neuronas dopaminérgicas del VTA a la neurodegeneración en comparación con las neuronas de la SNc.

Adicionalmente, nuestros resultados revelaron que no hay disminución en el número de células inmunopositivas a NeuN (marcador neuronal) en el NE, GP, corteza motora, hipocampo y cerebelo mostrando así especificidad del efecto toxico del Mn por la SNc.

c) Pérdida de espinas dendríticas

Otra de las variables evaluadas en nuestro modelo fue la de las espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas del NE. Esta variable resulta de interés debido a que las espinas dendríticas disminuyen ante cualquier tipo de agresión en el sistema nervioso (Ferrer et al., 1986; Avila-Costa et al., 1999; Lescaudron Jaffard R. & Verna, 1989; Ingham, Hood S. H. & Arbuthnott, 1989; Müller, Gähwiler, Rirtschin & Thompson, 1993; Sunanda, Rao & Raju, 1995) pero también porque en algunos modelos, como el del MPTP en primates no humanos existe correlación de degeneración nigral y depleción dopaminérgica severa con la disminución de al menos el 50% de espinas dendríticas en

neuronas espinosas medianas del estriado (Villalba, Lee & Smith, 2009). Así también, en el caso de pacientes con EP la pérdida de DA estriatal está asociada con la disminución de espinas dendríticas en un 20-30% así como reducción en el tamaño del árbol dendrítico en éstas mismas neuronas (Zajac-Milatovic *et al.*, 2005). Datos similares fueron obtenidos en nuestro trabajo, ya que posterior a la exposición de Mn^{+2}/Mn^{+3} observamos pérdida tanto de espinas dendríticas como en el contenido de dopamina en el NE, GP y SNc.

Se ha establecido que el cuello de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas establecen contactos sinápticos de tipo simétrico con neuronas dopaminérgicas provenientes de la SNc mientras que la cabeza de las espinas establecen contactos asimétricos de tipo excitatorio provenientes de neuronas glutamatérgicas de la corteza (Mensah, 1980; Tanaka, 1980; Smith *et al.*, 1998). En este sentido, la disminución de espinas dendríticas que encontramos en los animales expuestos a Mn puede deberse a la pérdida de contactos dopaminérgicos en el cuello debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, ya que las espinas quedarían expuestas a un proceso excitotóxico por la invasión de los contactos excitatorios provenientes de la corteza (KucukKaya Haklar & Yalcin, 1996; Sheperd, 1996).

Fase 3. “Recuperación”

Otra de las variables que se evaluaron en este estudio fue la posible presencia de recuperación en los animales expuestos a Mn en ambas pruebas motoras.

Este punto resulta importante debido a que en algunos modelos de la EP se ha visto que los efectos de toxinas o fármacos sobre la función dopaminérgica y alteraciones del movimiento son temporales, como es el caso del modelo de MPTP en ratones o el de la reserpina (Kasahara et al., 2003; Betarbet, Sherer, Macfenzie, Garcia-Osuna & Greenamyre, 2002; Alamo, López-Muñoz, Bhatara & Cuenca, 2004). En el caso del modelo de inhalación de Mn en rata no se encontró recuperación a nivel conductual o celular confirmando que el efecto del Mn persiste al menos 4 meses más después de la última inhalación.

Fase 4. Respuesta a L-DOPA

Los datos encontrados en los animales expuestos a la mezcla de $MnCl_2$ - $Mn(OAc)_3$ mostraron alteraciones del movimiento en las dos pruebas motoras empleadas, de forma similar a personas que han sido expuestas durante periodos largos al Mn (Amaral et al., 2014). Debido a que los animales que tuvieron dichas alteraciones conductuales también tuvieron reducción de neuronas inmunopositivas a TH y disminución en los contenidos de DA se podría suponer que la causa de dichas alteraciones es, precisamente, la disfunción del sistema dopaminérgico. Sin embargo, para confirmar que el origen de las alteraciones motoras era el resultado de daño en el sistema dopaminérgico se administró L-DOPA (7.5 mg/kg) a un grupo de animales que inhalaban Mn. La L-DOPA forma parte de los pasos intermedios en la síntesis de la DA y se ha reportado que su administración oral provoca efectos benéficos y sostenidos en pacientes con EP revirtiendo el déficit motor a través de su conversión a DA, por

lo que se esperaba que este fármaco tuviera un efecto similar en las ratas que inhalaron Mn (Juri & Chana, 2006; Barbeau, 1981). Este hecho se confirmó al observarse mejores ejecuciones en las dos pruebas motoras utilizadas en este estudio llevando a la reducción en el tiempo para recorrer la viga, aumento del promedio de aciertos en la prueba de reaching task, así como secuencias motoras correctas en ambas pruebas, ya que la dificultad para extender el brazo, atrapar el pellet, así como llevarlo al hocico desapareció al igual que la dificultad para iniciar el movimiento en la viga de equilibrio. Estos resultados coinciden con los del modelo de inhalación de Mn en ratón (Ordoñez-Librado et al., 2008, 2011), con reportes de respuesta favorable a L-dopa en personas que fueron expuestas a Mn por periodos prolongados debido a sus actividades laborales (Rosenstock , Simons & Meyer, 1971; Racette et al., 2001) y, principalmente, se correlacionan con los pacientes con EP en quienes la L-DOPA es la estrategia farmacológica para confirmar el diagnóstico de EP así como el principal fármaco para tratar los síntomas motores (Biagio & Bernardi, 2005; Duvoisin, 1987).

Fase 5. Determinación de contenidos de DA y sus metabolitos

Adicionalmente, con el objetivo de consolidar evidencias de que el modelo de inhalación de Mn en rata es una herramienta útil y confiable para reproducir aspectos representativos de la EP se midieron las concentraciones de DA y sus metabolitos en el NE, GP y SNc. Nuestros resultados mostraron que las ratas expuestas a la mezcla de Mn tuvieron reducción 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, lo cual es parecido con el modelo de inhalación de Mn en ratón y con la EP (Lang & Lozano, 1998; Olanow & Tatton, 1999). En la EP, la depleción de la DA es una de las características neuroquímicas que trae como consecuencia la manifestación de los síntomas motores que dificultan la vida cotidiana de los pacientes (Shimohama, Sawada, Kittamura & Taniguchi, 2003). Aunque el metabolismo y liberación de la DA son procesos complejos en la enfermedad, se ha logrado establecer que cuando este neurotransmisor disminuye en un 80% en el NE existe correlación positiva con la presencia de los síntomas motores característicos de la EP (Calne, Snow & Lee, 1992; Calne, Chu, Huang, Lu & Olanow, 1994; Calne, 2005).

Debido a la importancia de esta variable, la depleción dopaminérgica es uno de los objetivos principales que se pretende alcanzar en los diferentes modelos animales de la EP. Así pues, tanto en el caso de la 6-OHDA (Ungerstedt, 1968; Bloom, Algeri, Groppetti, Revuelta & Costa, 1969; Uretsky & Iversen, 1970) del MPTP (Chiueh, Huang & Murphy, 1992; Chiueh, Miyake & Peng, 1993) o en el modelo de la rotenona (Betarbet et al., 2000) se ha encontrado reducción similar de DA a la reportada en la EP. En cuanto al modelo de inhalación de Mn también se ha logrado reproducir este rasgo neuroquímico en ratones en donde se encontró depleción dopaminérgica significativa que se relacionó con dificultad para iniciar el movimiento así pérdida de coordinación motora. De manera específica, en el modelo de ratón los contenidos de DA de los animales expuestos fueron de 28.008 pg/mg de proteína mientras que en el modelo de

rata fueron de 25.7 pg/mg de proteína, lo que representa una disminución del 71% y 76.73%, respectivamente (Ordoñez-Librado, et al., 2010). A su vez, estos resultados concuerdan con una serie de estudios donde se evalúa el efecto del Mn sobre el sistema nitroestriatal. Así por ejemplo, Vidal et al. (2005) observaron que tras la administración intraestriatal de 2 mM de $MnCl_2$ a ratas, hubo disminución de los niveles extracelulares de DA. Por su parte, Erikson et al. (1987, 1992) mostraron reducción de la concentración estriatal y palidal de DA y DOPAC, pero no las concentraciones de HVA en monos expuestos a óxido de Mn por vía subcutánea.

Conclusión

La generación de modelos animales en investigación resulta importante debido a que son herramientas que permiten el conocimiento de algún objeto de estudio para la ciencia a partir de la manipulación de variables. En el caso del modelo de inhalación de Mn en rata nuestros resultados proporcionan bases para poder decir que se logran representar los principales eventos de la EP. Así pues, encontramos alteraciones motoras que empeoran con el transcurso del tiempo, que son irreversibles (al menos durante 4 meses) y que responden de forma positiva al tratamiento con L-DOPA (al igual que en el contexto clínico donde la respuesta positiva e inmediata a este fármaco confirma el diagnóstico de esta enfermedad). Además, los animales expuestos a la mezcla de Mn mostraron pérdida de neuronas dopaminérgicas, cambios morfológicos en el NE (pérdida de espinas dendríticas) así como depleción de DA en los GB. De esta forma,

tenemos elementos para decir que el modelo de inhalación de Mn es una herramienta válida y confiable para el estudio de la EP al simular los principales signos clínicos e histopatológicos de manera progresiva y bilateral (característica que no está incluida en los principales modelos animales de la EP).

La tarea de generalizar el modelo de inhalación de Mn a ratas no fue del todo fácil y nos encontramos con algunas diferencias respecto al modelo en ratón. Primeramente, la frecuencia y duración de las inhalaciones tuvo que aumentar en las ratas por diferencias entre especies (diferencias en el metabolismo del Mn) (García-Aranda, Wapnir & Lifshitz, 1893). Además, también quedaría como propuesta una mayor prolongación del periodo de post-inhalación para estar seguros de que el daño inducido por la mezcla de Mn es irreversible.

Referencias

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.

Anaya-Martínez V., Martínez-Marcos A., Martínez-Fong D., Aceves J. & Erlij (2006). Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior. *Neuroscience*, Vol. 143, pp. 477-486.

Alamo C., López-Muñoz F., Bhatara V. S. & Cuenca E. (2004). La contribución de la reserpina al desarrollo de la psiquiatría y su papel en la investigación neurobiológica. *Rev Psiquiatría*, Vol. 31(3), pp. 130-139.

Allbutt H. N., & Henderson J. M. (2007). Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*. Vol. 159, pp. 195-202.

Amaral A. M., Ferracioli F. E. , Luiz P. J., Harumi A. J., Teixeira R. R., Silva P. R., Tuschl K., Barsottini G. P.O & Rodrigues M. M. (2014). Inherited manganism: The "cock-walk" gait and typical neuroimaging features. *Journal of the Neurological Sciences*, Vol. 341(1-2), pp. 150-152.

Anderson J. G., Cooney P. T. & Erikson K. M. (2007). Inhibition of DAT function attenuates manganese accumulation in the globus pallidus. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23:179-184.

Aposhian H. V., Ingersoll R. T. & Montgomery E. B. (1999). Transport and control of manganese ions in central nervous system. *Environmental Research*, Vol. 80, pp. 96-98.

Archibald F. S. & Tyree C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 256(2), pp. 638-650.

Aschner M., Erikson K. M. & Dorman D. C. (2005). Manganese dosimetry: species differences and implication for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 35, pp. 1-12.

Avila-Costa M. R., Colin-Barenque L., Fortoul T. L., Machado-Salas J. P., Espinosa-Villanueva J., Rugerio-Vargas C. & Rivas-Arancibia S. (1999). Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes on rat6 hippocampus CA1. *Neurosci. Lett*. Vol. 270, pp. 107-109.

Avila-Costa M.R., Anaya-Martínez V., Ordoñez-librado, J. L., Gutierrez-Valdez, A., I., Montiel-Flores, E., Colín-Barenque, L., Aley-Medina, P., Espinosa-Villanueva, J., Reynoso-Erazo, L. y Fortoul, T. (2007). Synaptic alterations of the striatum: Two different models of dopamine deafferentation. En: Lassau J. (Ed.) *A Neural synapse; Research frends* (pp. 97-132). New York, Nova Biomedical.

Avila-Costa M. R., Gutierrez-Valdez A, Ordoñez-Librado J, Martinez V, Colin-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, Aley-Medina P, Montiel-Flores E, Velazquz-Mata A, & Machado-Salas JP. (2008) Time course changes of the striatum neuropil after unilateral dopamine depletion and the usefulness of the contralateral striatum as a control structure. *Neurol Res*. Vol. 30, pp.1068-74.

Barbeau (1981). High-level levodopa therapy in severely akinetic parkinsonian patients twelve years later. En: V. K. Rinne, M. Klinger & G. Stamm (Eds.) *Parkinson's disease: curren tprogress, problems and management* (pp. 229-239). Amsterdam, Elsevier.

Bel J. G., Keen C. L. & Lönnerdal F. (1989). Higher retention of manganese in suckling than in adult rats is not due to maturational differences in manganese uptake by rat small intestine. *Journal of Toxicology and Envionmental Health*, Vol. 26, pp. 387-398.

Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K. & Seitelberger F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington: clininal and morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci*. 20, 415-455.

Betarbet R., Sherer T. B., Macfenzie G., Garcia-Osuna M. N. & Greenamyre, J. T. (2002). Animal models of Parkinson's disease, *Bioassays*, Vol 24, pp. 308-318.

Bezard E., Gross C. E., Fournier M. C., Dovero S., Bloch B. y Jaber M. (1999). Absence of MPTP-Induced neuronal death in mice lacking the dopamine transportes. *Experimental Neurology*, Vol 55, pp. 268-273.

Biagio M. N. & Bernardi G. (2005). The 'magic' of L-DOPA: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci*, Vol. 26, pp. 341-344

Blanchard V., Raisman-Vozari R., Vyas S., Michel P. P., Javoy-Agid F., Uhl G. & Agid Y. (1994). Differential expression of tyrosine hydroxylase and membrane dopamine transporter genes in subpopulations of dopaminergic neurons of the rat mesencephalon. *Brain Res Mol Brain Res*, Vol. 22, pp. 29–38.

Bloom F.E., Algeri S., Groppetti A., Revuelta A. & Costa E. (1969). Lesions of central norepinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure. *Science*, Vol. 166, pp. 1284–1286.

Calne D. B. (2005). A definition of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. Vol 11 (1). pp 39-40.

Calne D. B., Snow B. J. & Lee C. (1992). Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Annals of neurology* Vol 32. pp. 125-127.

Calne D. B., Chu N. S., Huang C. C., Lu C. S. & Olanow W. (1994). Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology*, 44(9): 1583-1593.

Calne D. B. & Yoshikuni M. (2004). The neuromythology of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. Vol 10 (5), pp. 319-322.

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*. Vol. 8, pp. 419-432.

Chen M., Cheng G., Lin C., Chen B. H. & Huang Y. L. (2006). Effects of acute manganese chloride exposure on lipid peroxidation and alteration of trace metals in rat brain. *Biological Trace Element Research*, Vol. 110(2), pp. 163-178.

Chiueh C. C., Huang S.J. & Murphy, D.L. (1992). Enhanced hydroxyl radical generation by 27-methyl analog of MPTP: suppression by clorgyline and deprenyl. *Synapse* Vol. 11, pp. 346-348.

Chiueh C.C., Miyake H., Peng M.T., (1993). Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. *Adv. Neurol.* Vol. 60, pp. 251-258.

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*, Vol. 5(4), pp. 168-173.

Consejo Nacional de las Adicciones. Programas de Acción en Salud Mental: Programa Específico de Atención a la Enfermedad de Parkinson. México DF 2002. Disponible en: URL: http://www.salud.gob.mx/unidades/conadic/pparkinson_index.htm#intro.

Crossgrove J. & Zheng W. (2004). Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed.* 17, 544-553.

Dauer W. & Przedorski S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, Vol 39, pp. 889-909.

Desole M. S., Esposito G., Migheli R., Sircana S., Delogu M. R., Fresu L, Miele

L., de Natale G. & Miele E. (1997). Glutathione deficiency potentiates manganese toxicity in rat striatum and brainstem and in PC12 cells. *Pharmacol Res*, Vol. 36, pp. 285–92.

Donaldson J., McGregor D. & LaBella F. (1982). Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration. *Can J Physiol Pharmacol*, Vol. 60, pp. 1398–1405.

Drucker-Colín R. & García Hernández F. (1991). A new motor test sensitive to aging and dopaminergic function. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 39(2), pp. 153-161.

Duvoisin R. C. (1987). To treat early or to treat late. *Ann. Neural*, Vol. 22, pp. 2-3.

Emborg M. (2004) Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies., *J Neurosci Methods*. Vol, 139:121-43,

Erikson K. M., John C. E., Jones S. R. & Aschner M. (2005). Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter. *Experimental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 20, pp. 390-394.

Ferrer J. L., Fábregues I., Rairiz J. & Galofré L. (1986). Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neuroscience Letters*, Vol. 69, pp. 115-119.

Finkelstein Y., Milatovic D. & Aschner M. (2007) Modulation of cholinergic systems by manganese *NeuroToxicology*. Vol. 28, pp. 1003–1014.

García S., Sauri S. S. & Meza D. E. (2008). Perspectiva histórica y aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Parkinson. *MedIntMex*, Vol. 24(1), pp. 28-37.

Garcia-Aranda J. A., Wapnir R. A. & Lifshitz F. (1983). In vivo intestinal absorption of manganese in the rat. *J Nutr*, Vol. 113, pp. 2601–2607.

Gelb D. J., Oliver E., & Gilman S. (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of Neurology*. Vol 56 (1), pp. 33-9.

Graham D. G. (1984). Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, Vol. 5, pp. 83–96.

Guilarte T. R., Chen M-K., McGlothlan J. L., Verina T., Wong D. F., Zhou Y., Alexander M., Rohde C. A., Syversen T. Decamp E., Koser A. J., Fritz S., Gonczi H., Anderson D. W & Schneider J. S (2006). Nigrostriatal dopamine system

dysfunction and subtle motor function deficits in manganese-exposed non-human primates. *Exp.Neurol* Vol. 202, pp. 381–390.

Guilarte T.R. (2010) Manganese and Parkinson's disease: A Critical review and new findings. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 118 (8), pp.1071-1080.

Guilarte T. R. (2013). Manganese neurotoxicity: New perspectives from behavioral, neuroimaging and neuropathological studies in humans and non-human primates. *Front. Aging Neurosci.* 5, 1–10.

Hallman H., Lange J., Olson L. & Stromberg I. (1985). Neurochemical and histological characterization of 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Journal of Neurochemistry*, Vol 44, pp. 117-127.

Harte J., Holdren C., Schneider R., Shirley C. (1991). *Toxics A to Z. A guide to every day pollution hazards.* University of California Press.

Heikkila R. E., Nicklas W. J., Vyas I. & Duvoisin R. C. (1985). Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine toxicity. *Neuroscience Letters*, Vol 62 (3), pp. 389-94

Hirsch E. C. (2006) How to judge animal models of Parkinson`s disease in terms of neuroprotection. *Journal of Neural Transmition* Vol. 70, pp. 255-260.

Hughes A. J., Daniel S. E., Kilford L., & Lees A. J. (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Vol. 55(3), pp.181-4.

Hussain S., Slikker W. Jr & Ali S. F. (1997). The effects of chronic exposure of manganese on antioxidant enzymes in different regions of rat brain. *Neurosci Res Commun* Vol. 21, pp. 135–44.

Ingersoll, R. t., Montgomery, E. B. & Aposhian, H. V. (1999). Central nervous system toxicity of manganese II. Cocaine or reserpine inhibit manganese concentration in the rat brain. *Neurotoxicology*, Vol. 20, pp. 467-476.

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*. Vol. 93, pp.17-27.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. En: XII Censo General de Población y Vivienda, México 2000. Disponible en: www.inegi.gob.mx.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática de México (INEGI) (2009). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>. [31.08.2009]

Jackson-lewis V. & Przebdorski S. (2007). Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Nature protocols*, Vol. 2, pp. 141-151

Juri C. C. & Chana C. P. (2006). Levodopa en la enfermedad de Parkinson: ¿Qué hemos aprendido? *Revista Médica de Chile*, Vol. 134(7), pp. 893-901.

Kasahara J., Emamussalehim C., Yokoyama H., Kadoguchi N & Nomoto M. (2013). Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Induced Animal Models for Parkinson's Disease. *Animal Models for the Study of Human Disease*.

Lang E. & Lozano A. M. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, Vol. 339, pp. 1044–1053.

Langston J. W., Forno L. S., Rebert C. S. & Irwin I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of MPTP in the squirrel monkey. *Brain Research*, Vol 292 (2), pp. 290-394.

Lescaudron L., Jaffard R. & Verna A. (1989). Modifications in number and morphology of dendritic spines resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal: A Golgi study in the mouse anterior and posterior hippocampus. *Exp. Neurol.* Vol. 106, pp. 156-163.

Mensah P. L. (1980). Distribution of the largest neurons in mouse caudate-putamen uncle: Its positions in large cell-medium cell clusters. *Exp. Brain Res.*, Vol. 3, pp. 267-271,

Mergler D., Huel G., Bowler R., Iregren A., Belanger S., Balwi, M., Tardit R., Smargiassi A. & Martin L. (1994). Nervous system dysfunction among workers with long-term exposure to manganese. *Environmental Research*, Vol. 64(2), pp.151-180.

Metz G. A. S., 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 Neuroscience*, Vol. 14(1), pp. 27-37.

Miklyaeva E. I., Martens D. J. & Whishaw, I. Q. (1995). Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. *Brain Res*, Vol. 681, pp. 23–40.

Morello M., Canini A., Mattioli P., Sorge R. P., Alimonti A., Bocca B., Forte G, Martorana A., Bernardi G. & Sancesario G. (2008). Sub-cellular localization of

manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats. An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *Neurotoxicology*, Vol. 29, pp. 60–72.

Müller M., Gähwiler, B. H., Rirtschin L. & Thompson S. M. (1993). Reversible loss of dendritic spines and altered excitability after chronic epilepsy in hippocampal slice cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 90, pp. 257-261.

Olanow C. W. (2004). Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* Vol. 1012, pp. 209-223.

Olanow C. W & Tatton W. G. (1999). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, Vol. 22, pp. 123–144.

O'Neal S. L., Lee J-W, Zheng W. & Cannon J. R. (2014). Subacute manganese exposure in rats is a neurochemical model of early manganese toxicity, Vol 44, pp. 303–313

Ordoñez-Librado, J. L., Gutiérrez-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*, Vol. 155(1), pp. 7-16.

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-Valdez A.L., Montiel-Flores E., Reyes Corona D., Martínez-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*. Vol. 471(2): pp. 79–82.

Otero-Siliceo, E., Abascal-Arias, M. R., Alanis-Quiroga, M. (1996). Parkinson: enfoque al futuro. Fondo de Cultura Económica. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Pal, P. K., Samii, A. & Calne, D. B. (1999). Manganese neurotoxicity: A review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology*, Vol. 20(2-3), 227-238.

Perl D. P. & Olanow C. W. (2007). The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 66(8), pp. 675-82.

Racette B. A., McGee-Minnich L., Moerlein S. M., Mink J. W., Videen T. O. & Perlmutter J. S. (2001). Welding-related parkinsonism. *Neurology*, Vol. 56(1), pp. 8-13.

Rosenstock A. H., Simons G. D. & Meyer S. J. (1971). Chronic Manganism Neurologic and Laboratory Studies During Treatment With Levodopa. Vol. 217(10), pp. 1354-1358.

Roels H, Meiers G, Delos M, Ortega I, Lauwerys R, Buchet J. P. & Lison D. (1997). Influence of the route of administration and the chemical form (MnCl₂, MnO₂) on the absorption and cerebral distribution of manganese in rats. *Arch Toxicol*, Vol. 71(4), pp. 223-230.

Roth J. A., 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*, Vol. 35, pp. 121-128.

Russo S. M., Daniels A. J., Viveros O. H. & Reinard J. F. Jr. (1994). Differences in the reserpine-sensitive storage in vivo of 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats and mice may explain differences in catecholamine toxicity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurotoxicol Teratol*. Vol 16(3), pp. 277-81.

Sacrey, L.A., Alaverdashvili, M., Whishaw, I.Q., (2009). Similar hand shaping in reaching-for-food (skilled reaching) in rats and humans provides evidence of homology in release, collection, and manipulation movements. *Behav. Brain Res*. Vol. 204, pp. 153–161.

Sánchez-Betancourt J., Anaya-Martínez V., Gutierrez-Valdez A. L., Ordoñez-Librado J. L., Montiel-Flores E., Esponosa-Villanueva J., Reynosio-Erazo & Avila-Costa M. R. (2012). Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neurotoxicology*, Vol. 33, pp. 1346-1355.

Santamaría, A. B. & Sulsky S. I. (2010). Essentiality and toxicity of manganese. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Vol. 73, pp. 128–155.

Simonian N.A. & Coyle J. T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* , Vol. 36, pp. 83–106.

Sistrunk S. C., Ross M. K. & Filipov N. M. (2007). Direct effects of manganese compounds on dopamine and its metabolite Dopac: an in vitro study. *Environ Toxicol Pharmacol*. Vol. 3(3), pp. 286-96.

Shimohama, S., Sawada, H., Kittamura, Y. & Taniguchi, T. (2003). Disease model: Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 9(8), pp. 360-365.
Smith Y., Bevan M. D., Shink E. & Bolam J. P. (1998). Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience*, Vol 86(2), pp. 353-387

Sunanda M., Rao S. & Raju T. R. (1995). Effect of chronic restraint stress on dendritic spines and excrescences of hippocampal CA3 pyramidal neurons- a quantitative study. *Brain Res.* Vol. 694, pp. 312-317.

Taylor, J.R., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Sladek, J.R., Redmond, D.E., (1990). Cognitive and motor deficits in the acquisition of an object retrieval/detour task in MPTP-treated monkeys. *Brain* Vol. 113, pp. 617–637.

Takeda, A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, Vol 41, pp. 79-87.

Tanaka D. (1980). Development of spiny and aspiny neurons in the caudate nucleus of the dog during the first postnatal month. *Comp. Neurol.*, Vol. 192, pp. 247-253.

Truong L., Allbult H., Kassiou M. & Henderson J. M. (2006). Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behavior in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behavioral Brain Research*, Vol. 169(1), pp. 1-9.

Uchino A., Noguchi T., Nomiya K., Takase Y., Nakazono T., Nojiri J., Kudo S. (2007). Manganese accumulation in the brain: MR imaging. *Neuroradiology* 49, 715–720.

Uhl G. R. (1998). Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, Vol. 43, pp. 555–560.

Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol*, Vol 5, pp.107-110.

Uretsky N. J., Iversen L. L., (1970). Effects of 6-hydroxydopamine on catecholamine containing neurones in the rat brain. *J. Neurochem.* Vol. 17, pp. 269–278

Vidal L., Alfonso M., Campos F., Faro L. R., 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*. Vol. 30(9), pp. 1147–1154.

Villalba R.M., Lee H., Smith Y. (2009) Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. *Exp Neurol.*; 215:220–227.

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 end point, video recording, and movement notation analysis. *Behavioural Brain Research*. Vol. 42, pp. 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.* Vol. 133, pp. 165–176.

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.* Vol. 64, pp. 545–547.

Anexo 1

Se hicieron histológicos del mesencéfalo ventral a nivel de la SNc, y se realizó la técnica inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH) para poder hacer el conteo de las neuronas inmunorreactivas. Los cortes fueron de 50 μm . Para su posterior análisis en un fotomicroscopio, se hizo el conteo de las neuronas inmunoreactivas a TH en la SNc en un área de 1500 μm^2 en 10 cortes por animal a partir del inicio del núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio.

Hay que señalar los datos más importantes de la inmuno: anticuerpo primario y anticuerpo secundario en ambos añadir marca y concentración usada.



Conteo de neuronas inmunorreactivas a TH en un área de 1500 μm^2

Anexo 2

Se tomaron muestras del estriado para procesarse con el método de tinción de Golgi describe brevemente la técnica por si alguien quiere reproducir tus resultados, para el conteo del número de espinas dendríticas secundarias de las neuronas espinosas medianas. Se contaron 5 dendritas secundarias de 10 neuronas con una reglilla colocada en el ocular, en una longitud de 10 μm .

Anexo 3

Determinación de los contenidos de DA con la técnica de HPLC

Se obtuvieron cortes coronales de 300 μm de los que se extrajeron manualmente secciones del núcleo estriado, globo pálido y sustancia nigra compacta. Dichos núcleos fueron homogenizados con ácido perclórico (0.01) y se obtuvieron dos fases con ayuda de una microcentrifuga Airguge (Beckman, Fullerton CA., EUA) a 300 PSI por minuto.

La fase líquida se filtró en membranas de nylon con poro de 0.22 μm , y se ocupó para medir las concentraciones de DA en un cromatógrafo LC-4C (bioanalyticalSystem, Inc.-BAS-. West Lafayette, IN, EUA) equipado con un inyector automático Rheodyne con asa de 5 ml. El flujo de la fase móvil se mantuvo a 0.9 mL/minuto; 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 1mm) con partículas de 3 μm (BAS-Uniger).

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 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 un PC y analizada mediante el programa Peak II (SRI Instruments, Torrance, CA, EUA).

La fase sólida fue resuspendida en 120 ml de NaOH 0.2N y en alícuotas de 20 ml se cuantificó por triplicado la cantidad de proteína con el método de Bradford (1976).