
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS EN DIFERENTES NÚCLEOS CEREBRALES
INDUCIDA POR LA INHALACIÓN DE MANGANESO COMO UN MODELO DE
LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

TESIS

Que para obtener el título de:

Licenciada en Biología

PRESENTA

DALIA SARAI RODRÍGUEZ NOLASCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México

Agosto, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

¡Qué nervios! ¿por dónde empezar? Tal vez por el inicio de los tiempos y no me refiero precisamente a hace ~13 800 millones de años atrás con el Big Bang y esas cosas, aunque no estaría nada mal. Pero ya hablando en serio, empecemos.

A mis papás, Verónica y Ricardo, por cuidar de mí en estos 23 años de vida, por enseñarme, guiarme, regañarme y dejarme volar, aunque no fue fácil ¿cierto? A ustedes, además de la vida, les debo el poder llegar hasta aquí ¡Infinitas gracias, lo logramos!

A mis hermanos, Yarely y Ricardo, por esos días de juego, por esas peleas, por el pasado, presente y el futuro que nos espera... ¡gracias por estar!

A esos tíos que velaron por nosotros, no tengo palabras para expresar lo agradecida que estoy con la vida por tenerlos, gracias, porque son pilares importantes de lo que soy. A mis primos, por esos juegos, películas, risas y por el tiempo compartido, muchas, muchas gracias.

A mis amigos, que son mi segunda familia, porque en las buenas y en las no tan buenas, por las risas, los bailes, los chismes, los llantos, los gritos, las comidas, las fiestas, los exámenes, los viajes y porque espero que haya mucho más. Gracias Jessy, Ale, Gallo, Brian, Monse, Vic e Isaac.

A Dios, Buda, Energía, Universo...como quieran llamarle, porque nunca estuve sola.

Y por último, pero no menos importante, a ti María Rosa, tal vez no te diste cuenta pero tus palabras de aliento significaron mucho para mí, gracias por creer en mí. A mis compañeros de laboratorio, gracias por permitirme aprender de ustedes.

<< No dejes que termine el día sin haber crecido un poco, sin haber sido feliz, sin haber alimentado tus sueños.

No te dejes vencer por el desaliento.

No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte, que es casi un deber. No abandones tus ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.

No dejes de creer que las palabras y la poesía sí pueden cambiar al mundo. Porque pase lo que pase, nuestra esencia está intacta. Somos seres humanos llenos de pasión.

La vida es desierto y es oasis; nos derriba, nos lastima, nos enseña, nos convierte en protagonistas de nuestra propia historia. Aunque el viento sopla en contra, la poderosa obra continúa. Tú puedes aportar una estrofa.

No dejes nunca de soñar, porque sólo en sueños puede ser libre el hombre.

No caigas en el peor de los errores, el silencio. La mayoría vive en un silencio espantoso, no te resignes. Huye.

...

Valora la belleza de las cosas simples, se puede hacer poesía bella sobre las pequeñas cosas.

No traiciones tus creencias. Todos necesitamos aceptación, pero no podemos remar en contra de nosotros mismos. Eso transforma la vida en un infierno.

Disfruta el pánico que provoca tener la vida por delante. Vívela intensamente, sin mediocridades.

Piensa que en ti está el futuro, y encara la tarea con orgullo y sin miedo.

Aprende de quienes pueden enseñarte. Las experiencias de quienes nos precedieron...te ayudan a caminar por la vida.

La sociedad de hoy somos nosotros... No permitas que la vida te pase a ti sin que la vivas. >>

Walt Whitman.

Carpe diem.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Introducción.....	3
• Membrana celular.....	3
• Especies reactivas de oxígeno y radicales libres	6
• Estrés Oxidativo	8
• Peroxidación de lípidos	10
• Ganglios Basales	13
• Enfermedad de Parkinson	14
• Modelo de EP por la inhalación de Manganeso.	16
• Absorción y Transporte del Mn.....	17
Justificación.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivos	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	23
• Conducta motora.....	23
• Peroxidación de lípidos	23
Discusión.....	27
• Conducta motora.....	27
• Peroxidación de lípidos	28
Conclusiones.....	32
Referencias	33
ANEXO 1.....	42
ANEXO 2.....	43

Abreviaturas

Antioxidantes	aox
Especies reactivas de oxígeno	ROS
L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina
Lípidos tetraéter de las arqueobacterias	LTBA
Radicales Libres	RL
Superoxido Dismutasa	SOD
Retículo Endoplasmático	ER
4- Hidroxinonenal	HNE
Ciclooxigenasas	COX
Lipoxigenasas	LOX
Péptido β amiloide	A β
Ácidos grasos poliinsaturados	PUFA
Enfermedad de Parkinson	EP
Sustancia Nigra compacta	SNC
Ganglios Basales	GB
Cloruro de Manganeso	$MnCl_2$
Acetato de manganeso	$Mn(OAc)_3$
Transportador de dopamina	DAT
Malonaldehído	MDA
Tirosina hidroxilasa	TH
Monoaminooxidasa	MAO
Dopamina	DA
Transferrina	Tf
Sistema Nervioso Central	SNC
Transportador de metal divalente	DMT-1
Receptores de dopamina	DAR

Resumen

La composición y proporción de lípidos y proteínas en la membrana varía con cada dominio, especie, tejido o tipo celular, cada uno tiene cierto tipo característico lo que refleja la diversidad de papeles biológicos. La característica central de la membrana celular es que está formada por una doble capa lipídica, la cual funge como barrera al paso de moléculas polares y iones.

El estrés oxidativo se refiere a los eventos bioquímicos y moleculares debido al desbalance entre la producción de radicales libres (RL) y la habilidad de la célula para defenderse de ellos. La peroxidación de lípidos se define como el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ocurre en tres etapas distintas: iniciación, propagación y terminación. Las consecuencias de la peroxidación de lípidos son disfunción de las proteínas y canales proteicos, disminución en la permeabilidad de la membrana, alteraciones en la mitocondria, niveles altos de Ca^{2+} intramitocondrial y liberación de factores apoptóticos.

Dentro del sistema nervioso, el cerebro es especialmente susceptible al daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno, su alta demanda de energía y gran abundancia de lípidos y ácidos grasos. Algunos metales como el Fe, Cu y Mn parecen tener participación importante en el estrés oxidativo, llevando eventualmente, en algunos casos, a la neurodegeneración. En la Enfermedad de Parkinson (EP) el estrés oxidativo ha recibido atención principal, debido al potencial que tiene la Dopamina para oxidarse y formar H_2O_2 y otras especies reactivas de oxígeno. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la peroxidación de lípidos en cinco núcleos cerebrales (sustancia nigra (SN), núcleo estriado (NE), globo pálido (GP), hipocampo (HIP) y corteza motora (CM); inducida por la inhalación de la mezcla de Mn.

Se utilizaron 40 ratones macho CD-1 con un peso inicial de 33 ± 2 gr. Los animales se entrenaron para las pruebas de coordinación motora durante una semana, posteriormente se dividieron en dos grupos. El grupo control inhaló agua desionizada una 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 $Mn(OAc)_3$ al 0.02 M. Una vez finalizado el periodo de exposición se sacrificaron los ratones, se extrajeron los cerebros y se disecaron los núcleos de interés, para la determinación de peroxidación lipídica se empleó la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBARS).

De acuerdo a los resultados, la exposición a la mezcla de Mn produce alteraciones conductuales, similares a los síntomas en pacientes con EP. La CM e HIP, para este experimento, son estructuras que no presentan diferencias significativas en los niveles de MDA después de ser sometidas a estrés por Mn. El NE, GP y la SN son estructuras vulnerables a la peroxidación de lípidos produciendo mayores concentraciones de MDA. Estos resultados, en conjunto con otros experimentos empleando el mismo modelo brindan una visión más general sobre la neurotoxicidad del Mn y su implicación en la vía nigroestriatal como modelo de la enfermedad de Parkinson.

Introducción

Membrana celular

En las células eucariotas, las membranas organizan secuencias de reacciones y su principal importancia reside en la conservación de la energía biológica así como la comunicación intercelular. La composición y proporción de lípidos y proteínas varía con cada dominio, especie, tejido o tipo celular, cada uno tiene cierto tipo característico de lípido de membrana lo que refleja la diversidad de papeles biológicos, sin embargo todas comparten ciertas propiedades fundamentales, por ejemplo: la impermeabilidad a solutos polares o cargados, pero permeables a compuestos apolares; su grosor va de 5 a 8 nm; los fosfolípidos formando la bicapa y proteínas incrustadas mediante interacciones hidrofóbicas con los lípidos. Juntas, proteínas y lípidos forman un mosaico fluido (fig 1.), ya que las interacciones entre sus componentes no son covalentes, dan libertad a las moléculas de trasladarse lateralmente en el plano de la membrana (Nelson y Michael, 2008).

Los lípidos, son un conjunto de biomoléculas compuestos por grupos químicamente muy diversos, cuya característica en común es su insolubilidad en agua. Estos se pueden clasificar en lípidos de almacenamiento, lípidos como señales, cofactores y pigmentos, y por último los lípidos estructurales de membrana, de los cuales se hablará más a fondo (Nelson y Michael, 2008).

Para comprender la función de las membranas es necesario entender y saber su composición. Las membranas definen los límites de las células y regulan el paso molecular. La característica central de la membrana celular es que está formada por una doble capa lipídica, la cual funge como barrera al paso de moléculas polares y iones. Estos lípidos son anfipáticos, es decir tienen dos extremos, de los cuales uno es hidrofóbico y el otro hidrofílico (Nelson y Michael, 2008).

- En general hay cinco tipos de lípidos de membrana (Nelson y Michael, 2008):
- **Glicerofosfolípidos:** sus regiones hidrofóbicas están constituidas por dos ácidos grasos unidos al glicerol, contienen un grupo polar que se une a una región hidrofóbica mediante un enlace fosfodiéster, dando fosfolípidos, también están los glucolípidos, que carecen de fosfato pero tienen un azúcar sencillo u oligosacárido complejo en los extremos polares.
- **Galactolípidos y Sulfolípidos:** también con dos ácidos grasos unidos al glicerol pero carecen del fosfato, son los grupos predominantes en las células vegetales, constituyen alrededor del 70-80% de los lípidos totales en plantas vasculares y se encuentran en las membranas tilacoideas de los cloroplastos.
- **LTAB** (Lípidos tetraéter de las arqueobacterias): dos cadenas alquílicas están unidos por enlace éter al glicerol de ambos extremos, comúnmente estas arqueobacterias habitan en nichos ecológicos muy extremos, totalmente extendidos, estos lípidos miden el doble al de los fosfolípidos y esfingolípidos, abarcando todo el grosor de la membrana.
- **Esfingolípidos:** se une un solo ácido graso a una amina grasa, tienen un grupo de cabeza polar y dos colas apolares pero no tiene glicerol. La ceramina es la unidad estructural de todos los esfingolípidos y gracias a esto se derivan tres subtipos:
 - a) Esfingomielinas: especialmente abundante en la mielina, la vaina que rodea los axones de algunas neuronas.
 - b) Glucolípidos neutros: se encuentran en la cara externa de la membrana y se clasifican en cerebrósidos que se encuentran en células de tejido nervioso y globósidos (glucoesfingolípidos con dos o más azúcares).
 - c) Gangliósidos: son los más complejos, formados por dos grupos de cabezas polares usualmente oligosacáridos, además de ácido siálico en terminales. Tienen carga negativa a pH 7.

Cabe mencionar que en la especie humana hay al menos 60 esfingolípidos diferentes en las membranas celulares, muchos de ellos desempeñan un

papel esencial en las membranas de las neuronas (Nelson y Michael, 2008).

- **Esteroles:** compuesto por ciclopentanoperhidro fenantreno. El colesterol es el principal esteroles en tejidos animales. Son los principales precursores de muchos productos con diversas actividades biológicas, por ejemplo los ácidos biliares.

En cuanto a proteínas, las proteínas periféricas están asociadas por débiles interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno o por anclaje de lípidos unidos covalentemente, en comparación con las proteínas integrales, que están asociadas fuertemente por interacciones hidrofóbicas entre la bicapa lipídica y cadenas laterales de los amino ácidos polares, y por último las proteínas anfitrópicas que se asocian reversiblemente con las membranas (Nelson y Michael, 2008).

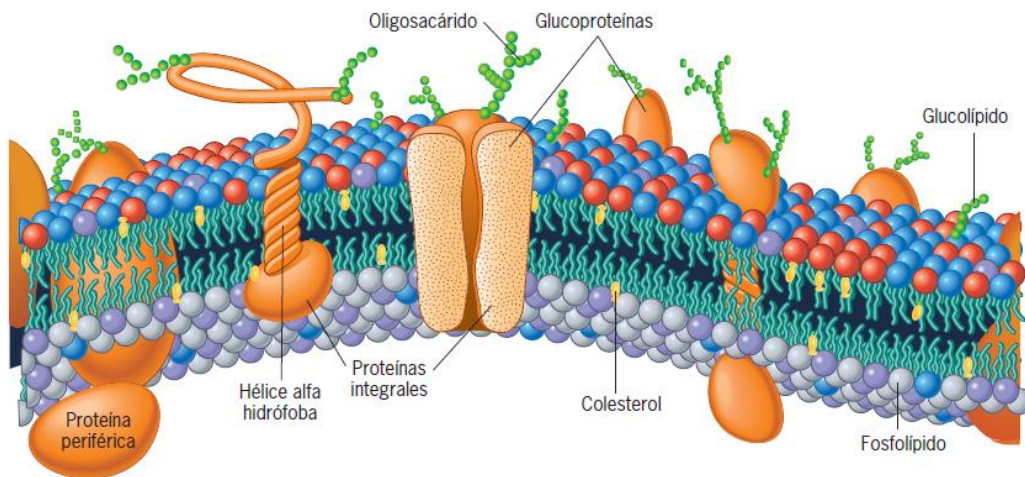


Fig 1. Modelo del mosaico fluido para la estructura de la membrana, tomado de Karp, 2009

Especies reactivas de oxígeno y radicales libres

Durante el proceso de obtención de energía metabólica en forma de ATP los seres vivos producen agentes moleculares oxidantes cuya reactividad debe ser controlada, ya que una porción de oxígeno que se respira se reduce de forma parcial, dando lugar a formas moleculares conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) definidas como el conjunto de moléculas que pueden o no ser radicales libres (RL) (fig 2.). Los RL son moléculas o átomos que tienen al menos un electrón desapareado en su último orbital, y estos a su vez son los responsables del estrés oxidativo (Cerdá et al., 2010).

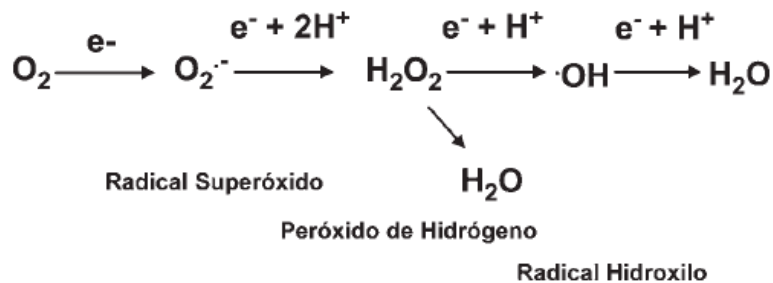


Fig 2. Reducción del oxígeno molecular para la formación de ROS (tomado de Cerdá et al., 2010).

Los radicales se pueden formar cuando pierden un electrón, dejando una carga positiva (radical catión), o ganando un electrón (radical anión) (fig 3.), también se pueden formar mediante el rompimiento de un enlace covalente, dejando un electrón en cada átomo, proceso conocido como ruptura homolítica, contrario a la ruptura heterolítica en la que un átomo recibe los dos electrones (fig 4) (Halliwell y Gutteridge, 2015).

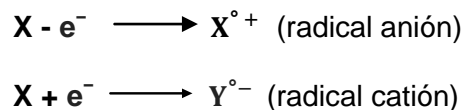


Fig 3. Formación de radicales (tomado de Halliwell y Gutteridge, 2015).

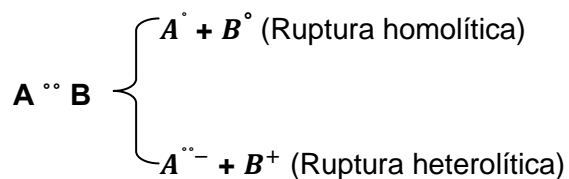
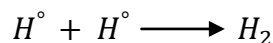


Fig 4. Rompimiento de enlace covalente (tomado de Halliwell y Gutteridge, 2015).

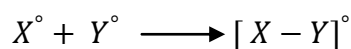
Pero ¿por qué el oxígeno es reactivo? la molécula de oxígeno diatómico por sí mismo en un RL ya que tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en un diferente orbital π^* antienlazante, éstos dos electrones tienen el mismo spin de número cuántico. Ésta es la forma más estable del oxígeno, además es como se encuentra en el aire que respiramos. Si el oxígeno intenta oxidar otro átomo o molécula aceptando un par de electrones, estos electrones deben tener el mismo spin para ocupar los espacios en el orbital π^* , es por esto que la restricción de spin hace que el oxígeno prefiera aceptar un electrón a la vez (Halliwell y Gutteridge, 2015).

No todas las especies reactivas son radicales de oxígeno, también se incluyen las especies reactivas del nitrógeno, cloro, bromo, hierro y azufre (anexo 1, tabla 1), también llamados no radicales. Pero de manera general la forma en la que reaccionan se explica de la siguiente manera:



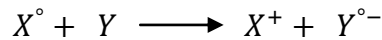
Si dos radicales libres se encuentran, pueden unir sus electrones impares para formar un enlace covalente, como la formación del hidrógeno diatómico (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Como se explicó antes, muchas moléculas no son radicales del oxígeno, es por ello que cuando un radical libre reacciona con un no radical resulta algo nuevo y se inicia una reacción en cadena:



- a) El radical X^\cdot puede adherirse a otra molécula. El producto tiene aún un electrón no apareado.

b) Un radical puede ser un agente reductor, donando un electrón a un no radical. El producto tendrá entonces un electron desapareado.



c) El radical también puede ser un agente oxidante, tomando un electrón de un no radical, dejando la no radical con un electrón desapareado.

d) Un radical puede extraer un átomo de hidrógeno de una unión $C - H$, y como el H° tiene solo un electrón, el C se queda con un electrón desapareado (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Otra manera en que las moléculas se oxidan es mediante la auto oxidación, la cual se inicia cuando un compuesto es oxidado por el O_2 para producir $O_2^{\circ-}$ (superóxido), ejemplo de estos son: gliceraldehido, FAD2, adrenalina, noradrenalina, L-DOPA, entre otros. A pesar de que la reacción es lenta, una vez iniciado puede generar una reacción en cadena produciendo más $O_2^{\circ-}$ (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se refiere a los eventos bioquímicos y moleculares debido al desbalance entre la producción de RL y la habilidad de la célula para defenderse de ellos (Olanow, 1993; Schulz et al., 1996; Avila-Costa, 2000). Su origen se puede deber a:

- 1) Disminución de defensas antioxidantes.
- 2) Incremento de la producción de RL.

De acuerdo con Halliwell y Gutteridge (2015), las consecuencias del estrés oxidativo se puede clasificar de la siguiente manera, siendo una de las opciones o combinación de las mismas y depende del tipo de tejido y/o célula a examinar, el tiempo y la severidad del estrés oxidativo:

- a) Incremento de la proliferación celular
- b) Adaptación: mediante mecanismos que protegen completamente, mecanismos que protegen pero no completamente y sobreprotegiendo,

estableciendo protección a niveles más altos de estrés oxidativo impuestos posteriormente.

- c) Lesión celular: incluye daño a algunas o todas las moléculas blanco como DNA, lípidos, proteínas, etc.
- d) Senescencia: La célula sobrevive pero ya no se puede dividir.
- e) Muerte celular: Después del daño la célula puede recuperarse mediante la reparación o reemplazando molécula afectada, o bien puede sobrevivir con el daño oxidativo persistente; o si se ve afectado el DNA puede inducir la muerte por apoptosis o necrosis.

Pero ¿hay algún mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo?, la respuesta es sí y son los famosos antioxidantes (aox), los cuales son definidos como cualquier sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo de una molécula blanco. Pueden ser sintetizados por el organismo u obtenidos a partir de la dieta (Halliwell y Gutteridge, 2015). Y pueden ser divididos en cuatro categorías: Prevención de la formación de oxidantes activos, barrido, extinción y eliminación de oxidantes activos; reparación de daños y, excreción de productos de oxidación tóxicos y respuestas adaptativas (Niki et al., 2005).

Los principios generales bajo los cuales los aox actúan son (Niki et al., 2005):

- Agentes que remueven catalíticamente los RL.
- Agentes que controlan la formación de RL.
- Agentes que actúan como chaperon para proteger a las biomoléculas de los RL.
- Reemplazando moléculas sensibles al daño oxidativo por moléculas más resistentes.
- Sacrificando agentes que reaccionen con los RL para frenar el daño.
- Reaccionado RL con biomoléculas, dando moléculas que protejan a la célula.

Peroxidación de lípidos

Se define como el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), estos son lípidos de dos o más enlaces doble de $C=C$. Pero ¿cómo es el proceso?, ocurre en tres etapas distintas: iniciación, propagación y terminación (Fig. 5). La extracción de hidrógeno en el carbono vecino a un doble de enlace marca la etapa de iniciación en la que transita en la fase de propagación. La propagación se caracteriza porque los PUFA oxidados reaccionan con oxígeno molecular para generar un radical peroxilo lipídico. El radical peroxilo lipídico ataca a otros PUFA para abstraer otro H y luego reaccionar con oxígeno y así formar un radical peroxilo lipídico, iniciando una reacción en cadena a menos que se produzca la terminación. La terminación puede surgir de dos mecanismos diferentes: dos radicales o radicales peroxilo pueden conjugar entre sí o un antioxidante puede reducir el último radical formado. La oxidación de los PUFA conduce a la generación enzimática o no enzimática de múltiples productos finales de aldehídos α β -insaturados que pueden producir modificaciones a lípidos y proteínas (Cob y Cole, 2015).

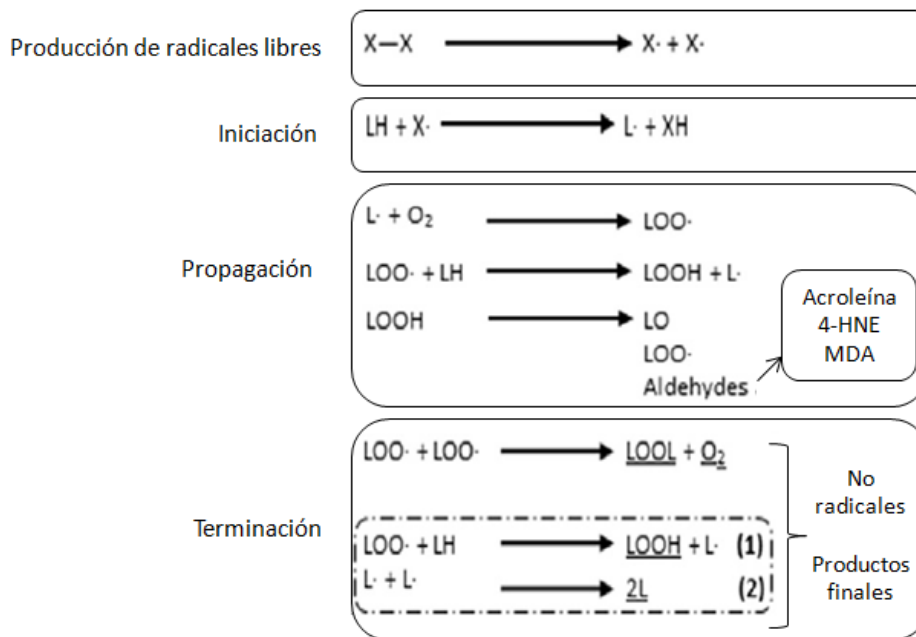


Fig 5. Reacción de peroxidación de lípidos (tomado de Cob y Cole, 2015).

Algunos factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: la naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador, el tipo de ácidos grasos de la membrana, la reacción del oxígeno, la concentración de antioxidantes y la activación de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (Roche, 1994; Venereo, 2002).

Las consecuencias de la peroxidación de lípidos según Mattson (1998) son disfunción de las proteínas y canales proteicos, incluyendo disminución en la permeabilidad de la membrana por lo cual se interrumpe la homeostasis de iones y aumento de la vulnerabilidad neuronal a la excitotoxicidad. También, se induce a una secuencia de alteraciones en la mitocondria, niveles altos de Ca^{2+} intramitocondrial y liberación de factores apoptóticos (fig 6).

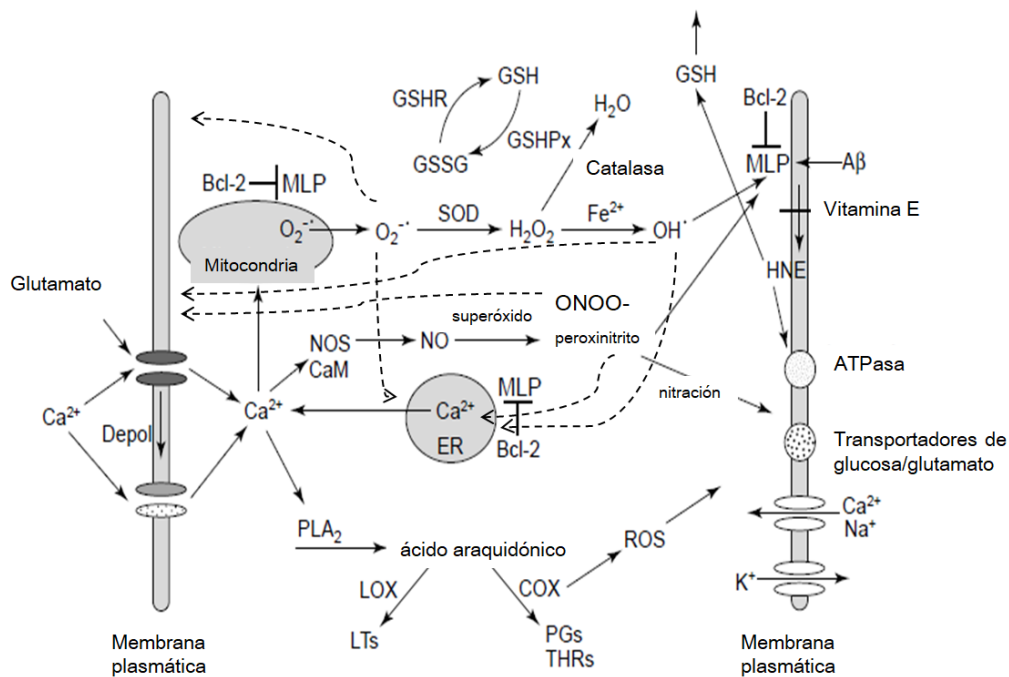


Fig 6. Vías involucradas en la inducción de la peroxidación de lípidos y mecanismos por los cuales conduce a alteraciones en la homeostasis iónica y el metabolismo energético. La fuente subcelular preeminente de RL es la mitocondria donde el $O_2^{\cdot-}$ se genera durante el proceso de transporte de electrones. La superóxido dismutasa (SOD) convierte el $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , que, en presencia de Fe^{2+} genera OH^{\cdot} . $O_2^{\cdot-}$ también pueden interactuar con NO^{\cdot} para formar peroxinitrito. Ambos OH^{\cdot} y peroxinitrito inducen peroxidación de lípidos, que puede ocurrir en la membrana plasmática, las membranas mitocondriales y en retículo endoplasmático (ER). Adicionalmente, agentes exógenos

tales como el péptido beta amiloide (A β) pueden inducir peroxidación de lípidos, de la cual se puede liberar 4-hidroxinonenal (HNE), que se une a los transportadores de membrana y canales iónicos, y por lo tanto altera su actividad. El deterioro de la Na^+/K^+ ATPasa, el transportador de glucosa y los transportadores de glutamato da como resultado la despolarización de la membrana y la activación excesiva de los receptores de glutamato, dando como resultado una excitotoxicidad. La peroxidación también perturba la homeostasis iónica en el ER y las mitocondrias, y con ello compromete sus importantes funciones de secuestro de Ca^{2+} . El producto génico antiapoptótico Bcl-2 podría actuar, en parte, mediante la supresión de la peroxidación en plasma, membranas mitocondriales y ER. Debe tenerse en cuenta que no sólo la peroxidación conduce a la elevación de Ca^{2+} , pero, al contrario, la elevación de Ca^{2+} , promueve la peroxidación por la inducción de NO° y $O_2^{\circ-}$, y por activación de fosfolipasas, dando como resultado la producción de ácido araquidónico. A continuación actúan las ciclooxigenasas (COX) y las lipoxigenasas (LOX) con la generación de ROS (modificado de Mattson, 1998).

Dentro del sistema nervioso, el cerebro es especialmente susceptible al daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno (aproximadamente el 20% del total), su alta demanda de energía y gran abundancia de lípidos y ácidos grasos (Cerdá et al., 2010). Algunos metales como el Hierro (Fe^{++}), el Cobre (Cu^{++}) y el Manganeso (Mn) parecen tener participación importante en el estrés oxidativo, llevando eventualmente, en algunos casos, a la neurodegeneración (Zatta et al., 2003; Tabner et al., 2005; Molina-Holgado et al., 2007; Kozłowski et al., 2009; Jomova et al., 2010; Jomova y Valko, 2011; Farina et al., 2013; Muhoberac y Vidal, 2013; Jellinger 2013).

En 1985 Zaleska y Floyd trabajaron en un modelo de peroxidación en cerebro de ratas inducido por Fe^{++} , encontrando que la susceptibilidad a la peroxidación en diferentes partes del tejido es promovida por la hiperoxia y que el Fe^{++} puede actuar como iniciador directo de la peroxidación de la membrana; por otro lado Dexter et al. (1989) encontraron aumento en la peroxidación de lípidos en el núcleo Estriado (NE) de pacientes con enfermedad de Parkinson, asociándolo a la disminución de PUFA. Finalmente, Avila-Costa en el 2000 evaluó el estrés oxidativo causado por ozono en tres estructuras cerebrales (corteza frontal, NE e hipocampo) y el efecto antioxidante de la taurina sobre éstas, observando aumento en la peroxidación siendo el NE la estructura con mayor alteración.

Ganglios Basales

Los ganglios basales (GB) son núcleos subcorticales que incluyen el NE (caudado y putamen), núcleo subtalámico (NST), el globo pálido (GP) y la Sustancia nigra, con sus partes, la sustancia nigra compacta (SNc) y la sustancia nigra pars reticulata (SNr) (fig 7). Estos núcleos están interconectados anatómicamente y funcionalmente mediante proyecciones al tálamo y al tallo cerebral, constituyen una intrincada red córtico-subcortical. Los GB están anatómicamente segregados en tres circuitos: motor, límbico y asociativo o cognitivo. La porción dorso-lateral de los GB constituye el circuito motor proyectando sobre la corteza motora primaria y el área motora suplementaria, la porción ventromedial de los núcleos, forma el circuito límbico y conecta con áreas límbicas corticales, y la porción anatómicamente localizada entre ambas proyecta sobre la corteza prefrontal formando el circuito asociativo (Martínez-Hernández, 2016).

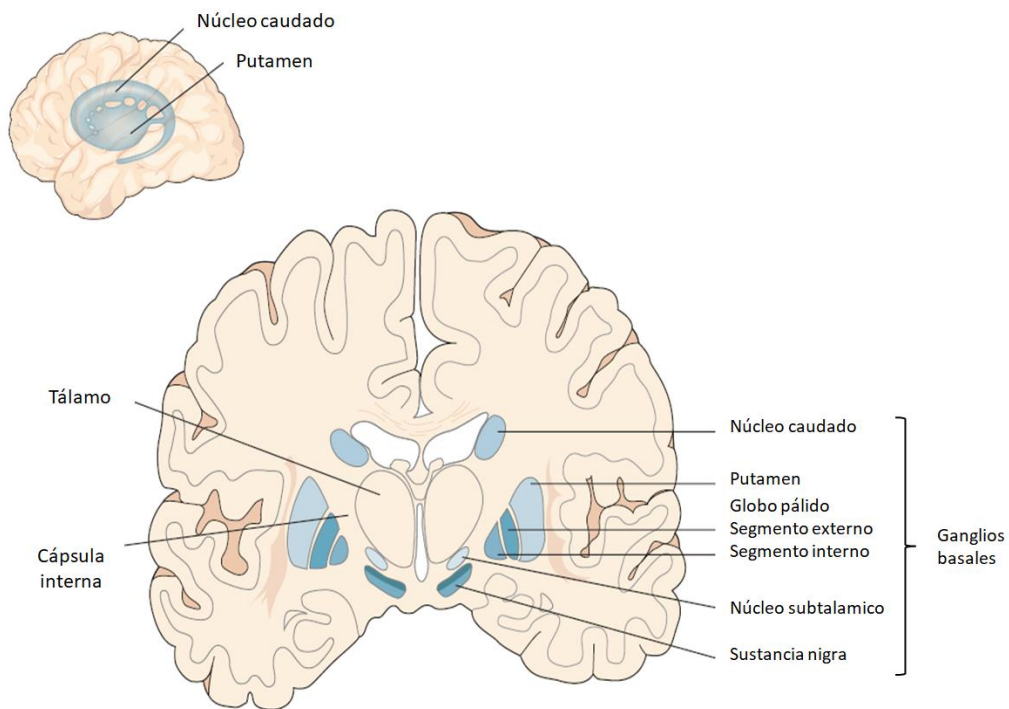


Fig 8. Ubicación de los ganglios basales y estructuras circundantes en el humano (tomado de Kandel et al., 2013).

Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un proceso neurodegenerativo que se manifiesta en la edad adulta y es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer. Su etiología aún es desconocida pero se propone que es el conjunto de diversos factores ambientales y genéticos. Su principal base anatomopatológica es la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, así como la presencia de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy (Martínez-Hernández, 2016). Se ha propuesto que el aumento de estrés oxidativo es uno de los factores etiológicos importantes de esta enfermedad, ya que la dopamina (DA) es fácilmente auto oxidada (Carlsson, 1978; Maruyama et al., 2014). Clínicamente esta enfermedad se caracteriza por temblor en reposo, bradicinesia (lentitud de los movimientos voluntarios), rigidez y pérdida de los reflejos posturales, los pacientes con esta enfermedad tienden a caminar encorvados con pequeños pasos (Elbaz et al., 2002; Avila-Costa et al., 2009). También, se incluyen síntomas no motores muy variados como apatía o depresión, alteraciones de sueño, disfunción autonómica o síntomas sensitivos (Martínez-Hernández, 2016).

El resultado de dicha neurodegeneración es la denervación dopaminérgica de las proyecciones de la SNc hacia el NE, dando paso a una alteración en la fisiología normal de los GB provocando las principales manifestaciones de la enfermedad (Martínez-Hernández, 2016). En los pacientes con EP de inicio anterior a los 45 años, la mutación más común es la del gen de la *parkina*, presente en el 50% de los casos familiares y en el 15% de los esporádicos. Además, algunos factores ambientales como la exposición a pesticidas o traumatismos cráneoencefálicos repetidos han sido asociados al aumento de riesgo (Martínez-Hernández, 2016).

En la EP el estrés oxidativo ha recibido atención principal, debido al potencial que tiene la DA para oxidarse y formar H_2O_2 y otras ROS. Así el estrés oxidativo y la consecuente muerte neuronal se puede dar en la SNc cuando (Olanow y Tatton, 1999; Ordoñez-Librado, 2007):

- a) Incrementa el recambio de DA, resultando un exceso en la formación de H_2O_2 .
- b) Deficiencia de la glutatión peroxidasa, por lo que disminuye la capacidad de metabolizar H_2O_2 .
- c) Incremento de Fe^{2+} , el cual promueve la formación de OH°

Durante su auto-oxidación, la DA es convertida a semiquinona SQ^\bullet y anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ (1), el cual puede reaccionar con otras moléculas de DA y formar SQ^\bullet y peróxido de hidrógeno H_2O_2 (2) o reaccionar con óxido nítrico y formar el altamente tóxico peroxinitrito $ONOO^-$ (4). El H_2O_2 también es formado mediante el metabolismo enzimático de la DA por la monoaminoxidasa MAO (3), así el H_2O_2 generado durante estas reacciones en presencia de Fe^{2+} (5), genera radical hidroxilo OH° a lo cual se le denomina reacción de Fenton (fig. 7) (Barzilai et al., 2001; Ordoñez-Librado, 2007).

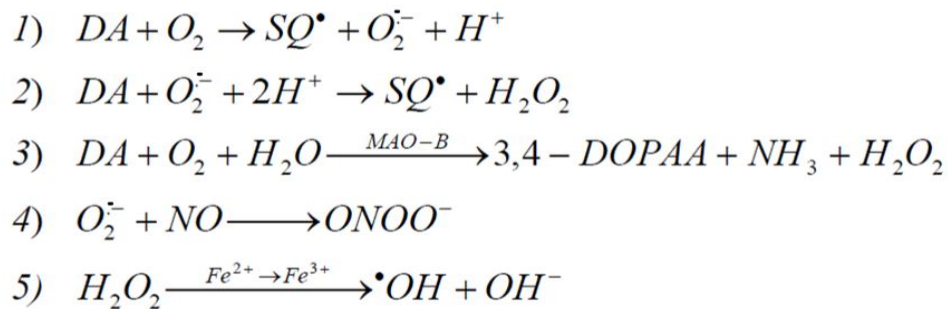


Fig 7. Reacción de auto-oxidación de la DA (tomado de Ordoñez-Librado, 2007).

Progresión de la enfermedad

Las manifestaciones motoras, que habitualmente se presentan en un solo hemicuerpo, se generalizan afectando también al lado contralateral, aunque la enfermedad suele mantener cierto grado de asimetría a lo largo de su evolución. Además, mayor denervación dopaminérgica resulta en una peor capacidad para almacenar, recaptar y liberar la L-DOPA ingerida como tratamiento, por lo que la concentración de DA en el cerebro se vuelve progresivamente más errática resultando en las típicas complicaciones en relación con el tratamiento

dopaminérgico. Los tratamientos actualmente disponibles tienen un efecto estrictamente sintomático. Ningún fármaco ha demostrado efecto curativo (o neuroprotector) en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha. El tratamiento de los síntomas debe estar adaptado al tiempo de evolución, fase de la enfermedad, al tipo de sintomatología presente y la discapacidad que conlleva (motora y no motora) (Martínez-Hernández, 2016).

Modelo de EP por la inhalación de Manganeso.

El Mn es un nutriente esencial y juega un papel importante en reacciones enzimáticas como la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos (Takeda, 2003; Aschner et al., 2005; Sánchez-Betancourt, 2016). Sin embargo, su exposición supone un riesgo para la salud. La excesiva acumulación de Mn en el NE, GP y SNc puede resultar en un desorden neurodegenerativo, usualmente llamado manganismo (Cotzias et al., 1968; Milatovic et al., 2009), algunas manifestaciones de intoxicación por Mn son contracción muscular, decremento de movimiento (hipocinesia), rigidez y temblor muscular (Chun et al., 2001; Ordoñez-Librado, 2007). Dichos síntomas motores son similares a los de la EP, como lo señalan en 2007 Ordoñez-Librado, Ordoñez-Librado et al., 2010, y en 2012 Sánchez-Betancourt et al. empleando ratones y ratas sometidos a la inhalación de cloruro y acetato de manganeso.

Además de dirigirse a áreas cerebrales similares, la EP y el manganismo comparten mecanismos comunes que conducen a la neurodegeneración dopaminérgica, la disfunción mitocondrial, la transducción de señales aberrantes, estrés oxidativo y la activación de las vías de muerte celular (Dobson et al., 2004; Latchoumycandane et al., 2005; Kitazawa et al., 2005; Milatovic et al., 2009). A nivel celular, el Mn se acumula en la en la membrana interna mitocondrial, en las crestas, donde interrumpe la fosforilación oxidativa y aumenta la generación de ROS (Gunter et al., 2006; Milatovic et al., 2009).

Absorción y Transporte del Mn

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 la transferrina (Tf) y a otras proteínas transportadoras en la sangre, así como las barreras cerebrales (Santamaría y Sulsky, 2010; Sánchez-Betancourt, 2016). El Mn existe en forma divalente Mn^{+2} (ion manganeso) y trivalente Mn^{+3} (ion mangánico), en el plasma, aproximadamente el 80% del Mn^{+2} se une a β -globulina y albúmina, mientras que el Mn^{+3} se une a Tf (Critchfield y Keen, 1992; Ordoñez-librado, 2007). Se ha reportado que varios sistemas de transporte participan en su captura, por ejemplo los canales de Ca^{2+} (Narita et al., 1990; Ordoñez-Librado, 2007), intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Frame y Milanick, 1991; Ordoñez-Librado, 2007), canal uniporte de Ca^{2+} (Gavin et al., 1990; Ordoñez-librado, 2007) y antiporte de Na^+/Mg^+ (Gunther et al., 1990; Ordoñez-Librado, 2007).

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 (Santamaría y Sulsky, 2010; Sánchez-Betancourt, 2016). El Mn entra al cerebro a través de los capilares cerebrales y/o fluido cerebroespinal (transportado por los plexos coroideos) o vía nervio olfatorio (Murphy et al., 1991; Rabin et al., 1993; Ordoñez-Librado, 2007). Una vez dentro del cerebro, tiende a acumularse en regiones dopaminérgicas, específicamente los GB, por lo que se ha sugerido que la recaptura y/o metabolismo de la DA están involucrados (Aschner, 2005; Sánchez-Betancourt, 2016).

Diversos experimentos reportan que la recaptura y/o metabolismo de la DA contribuye con el transporte del Mn. Ya que la concentración de Mn en la SNc es dependiente de la concentración de DA. Lo anterior llevó a la hipótesis de que el Mn puede unirse a la DA y transportarse como un complejo al interior de las neuronas vía el transportador de dopamina (DAT) y/o el Mn puede competir con el Na^+ para su transporte con la DA a través del DAT (Aposhian et al., 1999; Ordoñez-Librado, 2007).

Sin embargo, hay reportes contradictorios acerca del potencial tóxico del Mn dentro de los ganglios basales, algunos autores reportan que a bajas concentraciones el Mn^{2+} protege a las células en contra del estrés oxidativo, y que este efecto neuroprotector deriva del hecho de que el Mn^{2+} puede catalizar la dismutación del $O_2^{\circ-}$ y del H_2O_2 bajo condiciones fisiológicas (Oubrahim et al., 2001; HaMai et al., 2001; HaMai y Bondi, 2004; Ordoñez-Librado, 2007), mientras que otros estudios reportan un papel pro-oxidante de este metal, el Mn^{2+} , produce aumento en la generación de ROS sin embargo, su actividad pro-oxidante fue bloqueada en presencia de un quelador de metales trivalentes. Por lo que se ha propuesto que aún cuando el Mn^{2+} no tiene propiedades oxidantes intrínsecas, la presencia de Mn^{3+} en cantidades pequeñas es suficiente para promover la formación de RL y quinonas tóxicas producto de la auto-oxidación de la DA mediada por Mn (Sava et al., 2004; HaMai y Bondi, 2004; Ordoñez-Librado, 2007).

En nuestro laboratorio se ha encontrado que la mezcla de cloruro de Mn ($MnCl_2$), (forma divalente) y acetato de Mn ($Mn(OAc)_3$), (forma trivalente) es una condición que produce disminución de neuronas dopaminérgicas en la SNc en un 67.58 % en ratones macho CD-1 y en ratas Wistar un 75%. 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; Sánchez-Betancourt, 2016). Por lo que se considera como un buen modelo para el estudio de la EP.

Justificación

Se sabe que la mezcla de cloruro de manganeso ($MnCl_2$) y acetato de manganeso ($Mn(OAc)_3$) en ratas y ratones produce muerte celular, principalmente de las neuronas dopaminérgicas, además, produce alteraciones motoras similares a las observadas en la EP (Ordoñez-Librado et al., 2008; Sánchez-Betancourt et al., 2012; Trujillo, 2017). Sin embargo, lo que aún se desconoce son los mecanismos por los cuales ocurre dicha muerte neuronal.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la patogénesis de la EP (Beal, 2003). Hay estudios que muestran niveles incrementados de malonaldehído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos, marcadores de peroxidación de lípidos, en la SN de cerebros de pacientes post mortem con la EP (Dexter et al., 1989; Dexter et al., 1994). Así mismo, se ha reportado que la SN contiene bajos niveles de aox y se ha mostrado reducción de hasta 50% del aox glutatión en la SN, haciéndolo vulnerable al estrés oxidativo (Perry et al., 1986).

Es por ello que se desea conocer si la mezcla de los compuestos de Mn, al producir la muerte de las mismas neuronas que se afectan en la enfermedad, produce estrés oxidativo, y con esto dar una explicación a los posibles mecanismos involucrados en la toxicidad del Mn, así mismo proporcionar un panorama más amplio sobre la relación de la neurotoxicidad de la mezcla de compuestos de Mn, pérdida neuronal y estrés oxidativo como modelo experimental de la EP.

Hipótesis

Si la mezcla de Mn en ratas y ratones produce muerte celular, principalmente de las neuronas dopaminérgicas, además, produce alteraciones motoras similares a las observadas en la EP y se ha propuesto que el estrés oxidativo tiene un papel importante en la patogénesis de la EP, entonces los ratones sometidos a la inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$, presentarán aumento en la peroxidación de lípidos, debido al estrés oxidativo en los GB. Estando esto relacionado con el deterioro de la conducta motora.

Objetivos

- Evaluar la coordinación motora de los animales control, así como de los animales que han inhalado la mezcla de los compuestos de Mn mediante las pruebas de viga de equilibrio y de reaching Task.
- Analizar los cambios oxidativos en cinco núcleos cerebrales, tres de los GB directamente involucrados con la acumulación de Mn (sustancia nigra (SN), globo pálido (GP) y núcleo estriado (NE)) y dos estructuras lábiles al estrés oxidativo, el Hipocampo (HIP) y la Corteza motora (CM), utilizando la técnica de peroxidación de lípidos con ácido tiobarbitúrico (TBARS) como modelo de la enfermedad de Parkinson.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 40 ratones macho CD-1 con un peso inicial de 33 ± 2 gramos que fueron mantenidos en ciclos de luz-oscuridad 12:12, con libre acceso al agua/comida lo anterior de acuerdo al Guide for the care and use of laboratory animals (1996) y a la NOM-062-ZOO-1999 (México) y que fueron sometidos a las siguientes condiciones aprobadas por el comité de ética de la FES Iztacala:

Antes de la exposición a Mn los animales se entrenaron para las pruebas de coordinación motora durante una semana, el entrenamiento y las pruebas se realizaron durante la parte iluminada del ciclo, a la misma hora todos los días. Se evaluó la respuesta motora de todos los animales mediante las pruebas de reaching task y viga de equilibrio de acuerdo a lo reportado por Ordoñez-Librado et al. (2008), anexo 2 figs 1 y 2. Las pruebas de comportamiento motor se realizaron durante los días que los animales no inhalaban la mezcla de Mn.

El grupo control inhaló agua desionizada una 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 $Mn(OAc)_3$ al 0.02 M. La inhalación se realizó 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, con 10 l/min de flujo continuo. El ultranebulizador está diseñado para producir gotas en un rango de 0.5-5 mm. Una trampa de vapor se encuentra en el lado opuesto con una solución de bicarbonato de sodio para precipitar el metal restante. En el caso de la inhalación de Mn se ha establecido como límite para causar daño neurológico en humanos 1 mg/m³ (Santamaría y Sulsky, 2010).

En modelos animales 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/m³ (ATSDR, 2000). Las concentraciones de Mn en la cámara se cuantificaron de la siguiente manera: se colocó un filtro en la salida del ultra- nebulizador durante todo el tiempo de inhalación a una taza de 10 l/min. Después de cada exposición, el filtro fue removido y pesado; el elemento se cuantificó usando un Espectrómetro de Absorción Atómica de horno de grafito

(Perkin Elmer Mod. 3110, CT, EE. UU.). Se evaluaron seis filtros para cada inhalación. La concentración promedio de Mn medida en los filtros de la cámara fue de 2676 mg/m³ durante todo el experimento.

Una vez finalizado el periodo de exposición se sacrificaron los ratones, se extrajeron los cerebros y se disecaron los núcleos de interés (SN, NE, GP, HIP y CM); para la determinación de la peroxidación lipídica se empleó la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBARS) anexo 2 fig. 3, la cual se fundamenta en la reacción de este ácido con el MDA (producto de la peroxidación de ácidos grasos), produciendo una reacción color rosa que puede medirse por medio de espectrometría (a 532 nm); la absorción es directamente proporcional a la cantidad de peroxidación lipídica y por tanto, de estrés oxidativo. Los resultados se expresan en nM de MDA/μg de proteína, por lo que para cada muestra se realizó la medición de proteínas con el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para verificar si existen diferencias significativas entre los grupos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con $\alpha=0.05$, seguida de la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P<0.05$.

Resultados

- **Conducta motora**

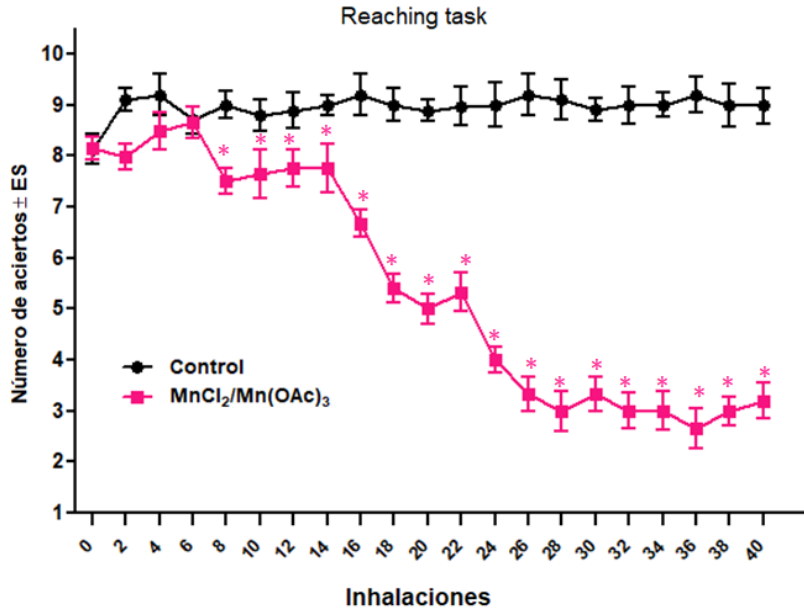
La prueba de coordinación motora (reaching task) nos arrojó que en promedio los animales control obtuvieron 9 aciertos (\pm ES), mientras que los animales expuestos a la mezcla de Mn a partir de la cuarta semana (8 inhalaciones) hasta la semana cuarenta mostraron disminución significativa en el número de aciertos (Gráfica 1).

Por otro lado, la prueba de la viga de equilibrio arrojó un promedio de 7 segundos (7.2 ± 6.9 s) en atravesar la viga para los animales control, mientras que los animales expuestos a la mezcla de Mn desde la segunda a la octava inhalación el tiempo que tardaron en atravesar la viga disminuyó significativamente (7.8 ± 3.1 s), lo anterior probablemente corresponde a una actividad hiperactiva de la actividad motora, sin embargo de la inhalación diez hasta la cuarenta los animales expuestos mostraron aumento en el tiempo de realización de la prueba (Gráfica 2).

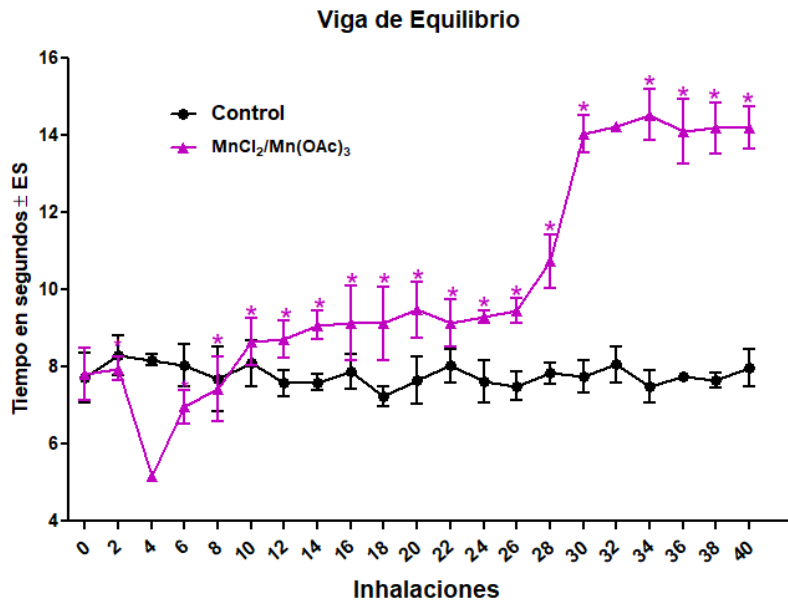
- **Peroxidación de lípidos**

En la gráfica 3 (CM), la media (\pm ES) del grupo control (0.006341 ± 0.001698) respecto al grupo experimental (0.008266 ± 0.003115) no muestra cambios significativos respecto al contenido de nM MDA/ μ g proteína, de igual manera en la gráfica 4 (HIP) no se muestran cambios significativos del grupo control (0.003849 ± 0.0005132) vs el grupo experimental (0.003357 ± 0.0005551) posterior a los 5 meses de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$.

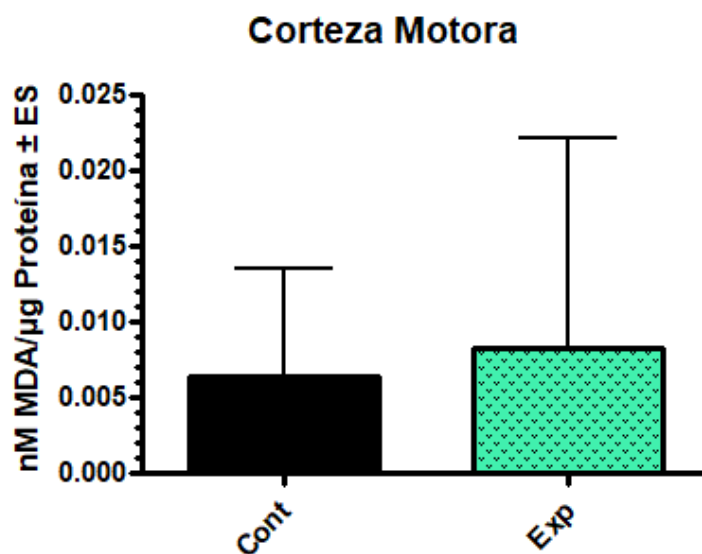
Mientras que en los grupos controles de las gráficas 5 (NE) 0.007339 ± 0.003041 , 6 (GP) 0.01645 ± 0.003556 y 7 (SN) 0.01401 ± 0.003307 vs el grupo experimental 0.01420 ± 0.005249 , 0.03377 ± 0.01331 y 0.02033 ± 0.007615 respectivamente, se muestra aumento significativo de nM MDA/ μ g proteína posterior a los 5 meses de inhalación de la mezcla de Mn.



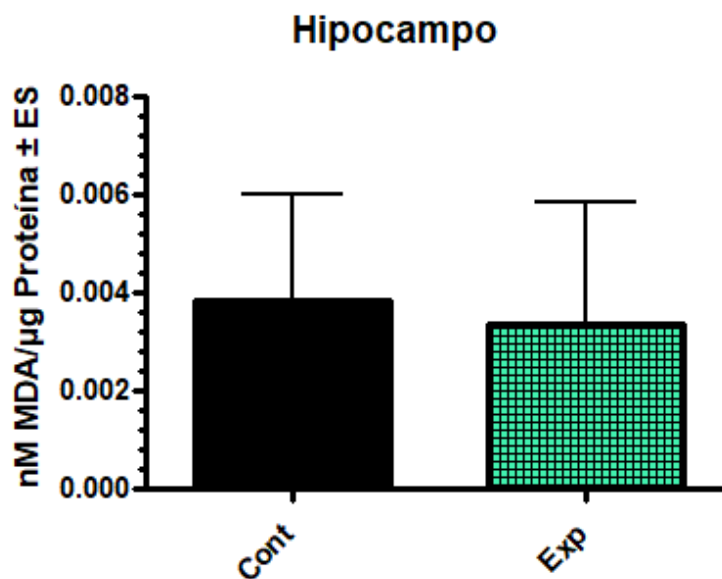
Gráfica 1: Media del número de aciertos (\pm ES) tanto del grupo control, así como de los animales expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. * $P < 0.05$ vs grupo control



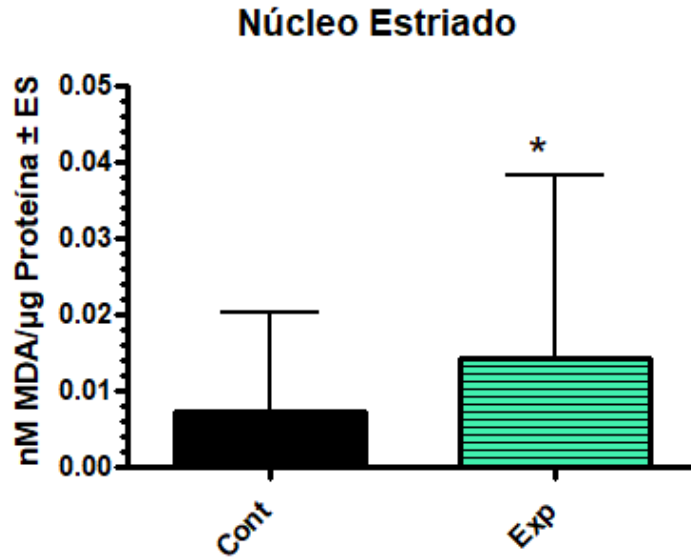
Gráfica 2: Media del tiempo en segundos (\pm ES) que tardaron los ratones en cruzar la viga de equilibrio, tanto del grupo control, así como de los animales expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$, durante las 40 inhalaciones. * $P < 0.05$ vs grupo control



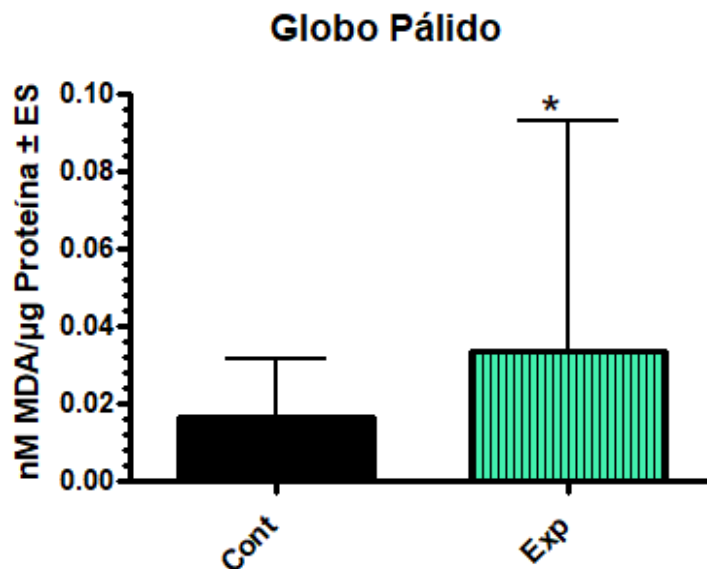
Gráfica 3. Media de nM de MDA/μg proteína (± ES) presente en la Corteza Motora del grupo control y experimental posterior a 5 meses de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$.



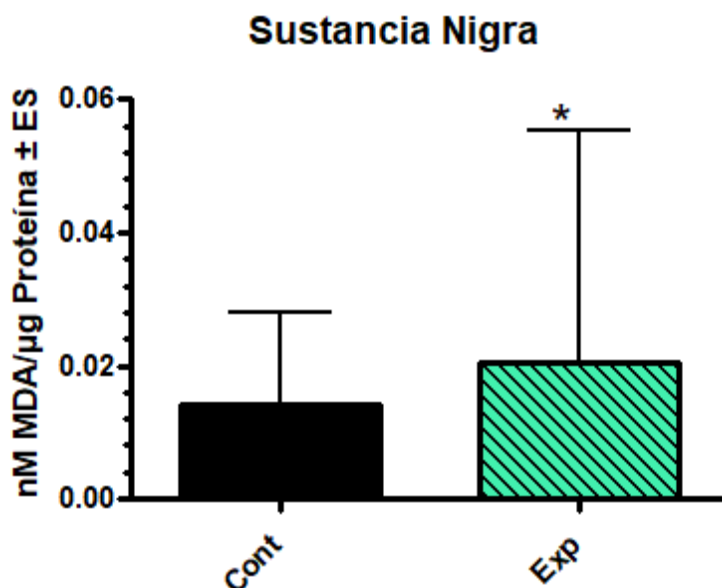
Gráfica 4. Media de nM de MDA/μg proteína (± ES) presente en el Hipocampo del grupo control y experimental posterior a 5 meses de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$.



Gráfica 5. Media de nM de MDA/μg proteína (± ES) presente en el N. Estriado del grupo control y experimental posterior a 5 meses de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. *P< 0.05 vs grupo control.



Gráfica 6. Media de nM de MDA/μg proteína (± ES) presente en el Globo Pálido del grupo control y experimental posterior a 5 meses de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. *P< 0.05 vs grupo control.



Gráfica 7. Media de nM de MDA/µg proteína (\pm ES) presente en la Sustancia Nigra del grupo control y experimental posterior a 5 meses de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. * $P < 0.05$ vs grupo control.

Discusión

- **Conducta motora**

De acuerdo con Biernaskie et al., (2004) y Ordoñez-Librado (2010) la prueba de reaching task es la prueba más sensible para analizar las alteraciones motoras sutiles en comparación a otras, en donde las alteraciones no pueden ser detectadas tan fácilmente, ya que el estiramiento de la extremidad anterior requiere una habilidad motora fina de la musculatura proximal y distal, así como la sensación para recuperar con éxito los pellet. La prueba examina tanto la capacidad para recuperar pellets como la precisión. En los animales expuestos a la mezcla de Mn que tuvieron reducción significativa en el número de aciertos en comparación con el grupo control MacLellan et al., (2006) y Ordoñez-Librado et al., (2008) proponen que hay alteraciones en los GB los cuales son los responsables de los movimientos de agarre. En relación con la hiperactividad que presentan los animales expuestos a la mezcla de Mn, a partir de la segunda semana en la

prueba de la viga de equilibrio, Bowenkamp et al., (1996) y Ordoñez-Librado et al., (2008) mencionan que el circuito dopaminérgico nigroestriado parece estar involucrado en la realización exitosa de la viga de equilibrio, así mismo Nachtman et al., (1986) demuestran que la exposición aguda a Mn está asociada al aumento de DA, lo cual puede manifestarse como hiperactividad (Ordoñez-Librado et al., 2008). Sin embargo, en 2003 Salehi et al., mencionan que la exposición a largo plazo puede dañar a las neuronas dopaminérgicas afectando la coordinación motora (Ordoñez-Librado, 2007) lo cual podría explicar el aumento de tiempo en dicha actividad, después de dos semanas de inhalación y hasta el final del experimento.

- **Peroxidación de lípidos**

Pocas investigaciones emplean a la CM y al HIP para estudiar el estrés oxidativo y más aún la peroxidación de lípidos, uno de estos es el llevado a cabo por Bromont et al., (1988) en donde examinaron la peroxidación de lípidos en cerebros de rata posterior a isquemia. Sus resultados muestran aumento tardío y duradero de la peroxidación lipídica que ocurre en el HIP, el NE y la CM; y que es paralela al desarrollo de necrosis neuronal. Por otro lado Avila-Costa en el 2000 determinó los niveles de peroxidación de lípidos en el NE, HIP y CM, inducida por O_3 , siendo el NE la estructura que mayor peroxidación presentó, seguida del HIP. Mythri et al., (2011) evaluaron el estrés oxidativo en el NE y CM en cerebros humanos posmortem con EP, encontrando que la peroxidación de lípidos solo aumentó en la CM.

En 2001 HaMai et al., estudiaron las propiedades oxidativas del Mn para promover la formación de ROS en la CM; concluyen que el Mn^{+2} no tiene potencial oxidante intrínseco. No obstante, puede actuar de manera pro o antioxidante, dependiendo de la presencia de Mn^{+3} o Fe^{+3} , respectivamente. Sin embargo, para este trabajo como se puede observar en las gráficas 3 y 4, las concentraciones de MDA en CM y el HIP de los grupos expuestos a la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$ en comparación con los grupos control no son estadísticamente significativos.

Se ha reportado que el Mn tiende a concentrarse en los GB (Newland et al., 1989; Slood et al., 1994; Milatovic et al., 2009), gracias a que el DAT facilita su acumulación específica (Erikson et al., 2005). En este trabajo, el NE, el GP, y la SN (gráficas 5, 6 y 7, respectivamente) fueron los núcleos que presentaron peroxidación de lípidos significativa posterior a la inhalación de la mezcla de $MnCl_2$ y $Mn(OAc)_3$.

Parece ser que el Mn produce lesiones selectivas en el NE (Slood et al., 1994), el transporte de Mn al cerebro está regulado, al menos parcialmente, por endocitosis mediada por Tf y transportador de metal divalente (DMT-1), un estudio demostró que el Mn depende de DMT-1 para su transporte celular (Conrad et al., 2000). En el cerebro, se sabe que el NE es una región rica en DMT-1 (Erikson et al., 2005). Por otro lado, el GP tiene una afinidad particular por este metal, lo que sugiere una conexión entre el Mn y la familia del Fe, ya que el GP contiene más Fe que cualquier otro tejido cerebral (Newland et al., 1989). La acumulación de Mn^{+2} en las mitocondrias y la disminución de la actividad desintoxicante de la SOD al Mn^{+2} puede ser la base de la vulnerabilidad del GP (Spadoni et al., 2000). En la SN, se han encontrado niveles de PUFA bajos, siendo proporcional a concentraciones de MDA altos en pacientes parkinsonianos en comparación con los pacientes control. La SN puede ser particularmente vulnerable a las ROS debido a que la DA dentro de las neuronas nigrales experimenta autooxidación, este proceso genera RL (Dexter et al., 1989).

En el cerebro, las neuronas DAérgicas son particularmente propensas al estrés oxidativo debido a la presencia de enzimas generadoras de ROS como la tirosina hidroxilasa (TH) y la monoamino oxidasa (MAO) (Deng et al., 2014).

Estudios previos han demostrado que el Mn se dirige selectivamente a las neuronas DAérgicas en los GB y conduce a la disminución de los niveles de DA. La DA produce sus efectos activando los receptores de dopamina (DAR); (hay diferentes subtipos de DAR: la familia D1, se expresa, con densidades más altas en el NE, la SN y el bulbo olfatorio, y menores densidades en la CM e HIP, mientras que la familia tipo D2, se expresan principalmente en el NE, GP, la

amígdala, CM, HIP y la hipófisis (Rangel-Barajas et al., 2015). Además, las neuronas DAérgicas de la SN contienen Fe que catalizan la reacción de Fenton por lo que los radicales $O_2^{\circ-}$ y H_2O_2 contribuyen a un mayor estrés oxidativo, por lo tanto el estrés oxidativo inducido por Mn y la neurodegeneración dopaminérgica parecen ser fenómenos conectados (Deng et al., 2014).

Respecto a lo anterior, Ordoñez-Librado et al., (2008) empleando el modelo utilizado en esta investigación, reportan que en la SNc de los animales expuestos a Mn mostraron disminución del 67.58% en el número de neuronas inmunopositivas TH en ratones, así mismo Sánchez-Betancourt et al., (2012), muestran que la mezcla de Mn en ratas causó 75.95% de pérdida de neuronas DAérgicas de la SNc de ratas. Los resultados de esta investigación podrían complementarse con el trabajo de estos autores, proporcionando así un panorama más amplio sobre la relación de la neurotoxicidad de la mezcla de compuestos de Mn, pérdida neuronal y estrés oxidativo.

Varias explicaciones han sido propuestas para elucidar la vulnerabilidad de las neuronas DAérgicas al Mn, como el deterioro de las defensas aox (Venkateshappa et al., 2012) por la acumulación de metal, así como la interrupción del metabolismo mitocondrial por el aumento de ROS que se generan por la fuga de electrones de la cadena de transporte, que así mismo pueden dañar las mitocondrias directamente a través de oxidantes secundarios como $O_2^{\circ-}$ y H_2O_2 o $ONOO^-$. Además, el $O_2^{\circ-}$ producido en la cadena de transporte de electrones mitocondrial puede catalizar el cambio de transición de Mn^{+2} a Mn^{+3} a través de un conjunto de reacciones similares a las mediadas por la SOD y así conducir a la capacidad oxidante aumentada de este metal (Milatovic et al., 2009). La disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con una mayor formación de ROS en la EP. La fosforilación oxidativa es el mecanismo principal que proporciona energía para potenciar la actividad neuronal. Consecuentemente, esta vía metabólica es la principal fuente de $O_2^{\circ-}$ y H_2O_2 , que al mismo tiempo, conducen a la propagación de radicales libres que contribuyen a la enfermedad (Blesa et al., 2015)

Por lo tanto, tal vez los mecanismos de neurotoxicidad del Mn están relacionados con su potencial oxidativo, así como la degeneración selectiva de las neuronas DAérgicas de la SN sugiere que la DA en sí misma puede ser una fuente de estrés oxidativo propiciando su autooxidación (Ordoñez-Librado et al., 2008; Deng et al., 2014; Blesa et al., 2015).

Conclusiones

- La inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ produce alteraciones a nivel conductual tanto en la prueba de reaching task como en la viga de equilibrio siendo similares a los síntomas en pacientes con EP.
- La CM y el HIP son estructuras que no presentan diferencias en los niveles de MDA después de ser sometidas al estrés oxidativo producido por la inhalación de la mezcla de compuestos de Mn.
- El NE, el GP y la SN son estructuras sensibles al estrés oxidativo, posiblemente por los contenidos de DA, produciendo mayores concentraciones de MDA a causa de la inhalación de la mezcla de compuestos de Mn. Estos resultados, en conjunto con otros experimentos empleando el mismo modelo brindan una visión más general sobre la neurotoxicidad del Mn y su implicación en la vía nigroestriatal como modelo de la enfermedad de Parkinson.

Referencias

- **Aposhian H.V., Ingersoll R.T. y Montgomery E.B. (1999)** Transport and control of manganese ions in central nervous system. *Environmental Research Section A*. 80:96-98.
- **Aschner M., Erikson K. M. y Dorman D. C. (2005)** Manganese dosimetry: species differences and implication for neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*. 35:1-12.
- **(ATSDR) Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2010)** Toxicological profile for Manganese. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- **Avila-Costa M.R. (2000)** Efecto de la taurina en el sistema nervioso de la rata expuesta a un modelo de estrés oxidativo producido por ozono: análisis morfológico-bioquímico y su relación con la conducta. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Avila-Costa M.R. Reynoso E.L. y Ordoñez L.J.L. (2009)** Neurodegenerative diseases. En: *Progress in Neurodegeneration, The role of metals*. Avila-Costa M.R. y Anaya M.V., Nova Science Publisher, Inc. pp 18 y 23.
- **Avila-Costa M.R., Reynoso Erazo L., Gutierrez-Valdez A.L. y Ordoñez-Librado J.L. (2009b)** Metals, Toxicity and Neurodegeneration. En: *Progress in Neurodegeneration, The role of metals*. Avila-Costa M.R. y Anaya M.V., Nova Science Publisher, Inc. pp 77
- **Barzilai A., Melamed E. y Shirvan A. (2001)** Is there a rationale for neuroprotection against Dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2:215-230.
- **Biernaskie J., Chernenko G. y Corbett D. (2004)** Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury (behavior, striatum), *Journal of Neuroscience*. 24:1245–1254.
- **Blesa J., Trigo D.I., Quiroga V. A., Jackson L.V.R. (2015)** Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*. 9:1-9.

- **Bowenkamp K.E., Lapchak P.A., Hoffer B.J. y Bickford P.C. (1996)** Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses motor impairment in 16–17 month old rats. *Neuroscience Letters*. 211:81–84.
- **Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254.
- **Bromont C., Marie C. y Bralet J. (1988)** Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 20:918-924.
- **Carlsson A. (1978)** Age-dependent changes in central dopaminergic and other monoaminergic systems. *Advances in experimental Medicine and Biology*. 113:1–13.
- **Cerdá M.C. Borrego O.S. y Sáez T.G. (2010)** Estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. España. Consultado el 11 de agosto del 2016. <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1055>
- **Chun H.S., Lee H. y Son J.H. (2001)** Manganese induces endoplasmic reticulum (ER) stress and activates multiple caspases in nigral dopaminergic neuronal cells, SN4741. *Neuroscience Letters*. 316:5-8.
- **Cob A.C. y Cole P.M. (2015)** Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*. 84:4–21.
- **Conrad, M.E., Umbreit, J.N., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Porubcin, M., Simovich, M.J., Nakada, M.T., Dolan, K., Garrick, M.D. (2000)** Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *American Journal of Physiology*. 279:G767–G774.
- **Cotzias G.C., Horiuchi K., Fuenzalida S. y Mena I., (1968)** Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology*. 18:376–382.
- **Critchfield J.W. y Keen C.L. (1992)** Manganese +2 exhibits dynamic binding to multiple ligands in human plasma. *Metabolism*. 41:1087-1092.
- **Deng Y., Jiao C., Mi Ch., Xy B., Li Y., Wang F., Liu W. y Xu Z. (2014)** Melatonin inhibits manganese-induced motor dysfunction and neuronal loss

in mice: Involvement of oxidative stress and dopaminergic neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*. 51:68-88.

- **Dexter D.T. Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid F., Agid Y., Less A., Jenner P. y Marsden C.D. (1989)** Basal lipid peroxidation in Substantia Nigra is increased in Parkinson's Disease. *Neural of Neurochemistry*. 1:381-389.
- **Dexter D.T., Holly A.E., Flitter W.D. (1994)** Increased levels of lipid hydroperoxides in the Parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *The Movement Disorder Society*. 9:92-97.
- **Dobson A.W., Erikson K.M. y Aschner, M., (2004)** Manganese neurotoxicity. *Annals of N.Y. Academy of Science*. 1012:115–128.
- **Elbaz A., Bower J.H., Maraganore D.M., McDonnell S.K., Peterson B.J., Ahlskog J.E., Schaida D.J. y Rocca W.A. (2002)** Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Epidemiology*. 55:25–31.
- **Erikson K.M., John C.E., Jones S.R. y Aschner M. (2005)** Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter. *Environmental toxicology pharmacology*. 20:390-394.
- **Farina M., Avila D.S., da Rocha, J.B., y Aschner M. (2013)** Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*. 62: 575–594.
- **Frame M.D. y Milanick M.A. (1991)** Mn and Cd transport by the Na–Ca exchanger of ferret red blood cell. *American Journal of Physiology*. 261: 467–475.
- **Gavin C.E., Gunter K.K. y Gunter T.E. (1990)** Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. *The Biochemical Journal* 266:329–334.
- **Guide of the care and use of laboratory animals. (1997)** *Institute for Laboratory Animal research Journal*. 38:41-48.

- **Gunter T.E., Gavin,C.E., Aschner M. y Gunter K.K. (2006)** Speciation of manganese in cells and mitochondria: a search for the proximal cause of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*. 27:765–776.
- **Gunther T., Vormann J. y Cragoe E.J. (1990)** Species-specific Mn⁺²/Mg⁺² antiport from Mg⁺² loaded erythrocytes. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 261:47–51.
- **Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. (2015)** Free Radicals in biology and Medicine. 5ta. Ed. Oxford University. pp 20, 21, 24, 30, 31, 77, 78, 200.
- **HaMai D. y Bondy (2004)** Pro-or anti-oxidant manganese: a suggested mechanism for reconciliation. *Neurochemistry International*. 44:223-229.
- **HaMai D., Campbell A. y Bondy S.C. (2001)** Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Radical Biology and Medicine*. 31:763-768.
- **Jellinger K.A. (2013)** The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *International Review of Neurobiology*. 110:1-47.
- **Jomova K. y Valko, M. (2011)** Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283:65–87.
- **Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., y Valko, M. (2010)** Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345:91–104.
- **Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A. y Hudspeth A.J. (2013)** En: The basal ganglia. Principles of neural science. 5ta. ed. Estados Unidos de América. Ed. McGraw-Hill. 938 p.
- **Karp, G. (2009)** Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos. En: La estructura y función de la membrana plasmática. 5ta. Ed. Mc Graw Hill. 124p.
- **Kitazawa M., Anantharam, V., Yang Y., Hirata Y., Kanthasamy A. y Kanthasamy, A.G., (2005)** Activation of protein kinase C δ by proteolytic cleavage contributes to manganese-induced apoptosis in dopaminergic cells: protective role of Bcl-2. *Biochemical Pharmacology*. 69:133–146.

- **Kozłowski H., Janicka-Kłos A., Brasun, J., Gaggelli E., Valensin D., y Valensin G. (2009)** Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*. 253: 2665–2685.
- **Latchoumycandane C., Anantharam V., Kitazawa M., Yang Y., Kanthasamy, A. y Kanthasamy A.G. (2005)** Protein kinase C is a key downstream mediator of manganese-induced apoptosis in dopaminergic neuronal cells. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*. 313:46–55.
- **MacLellan C.L., Gyawali S. y Colbourne F. (2006)** Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behavioural Brain Research*. 175:82–89.
- **Martínez-Hernández R., Gasca-Salas C., Sánchez-Fierro A. y Obeso J.A. (2016)** Actualización en la enfermedad de Parkinson. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 27:363-379.
- **Maruyama W., Yato Y., Hisaka S., Osawa T. y Kato Y. (2014)** Role of lipid peroxide in the neurodegenerative disorders. En: *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules*. Springer. Japón. pp 127-134.
- **Mattson. (1998)** Modification of iron homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends In Neuroscience*. 20:53-57.
- **Milatovic D., Zaja-Milatovic S., Gupta C.R., Yu Y. y Ashner M. (2009)** Oxidative damage and neurodegeneration in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 240:219-225.
- **Molina-Holgado F., Hider R. C., Gaeta A., Williams R., & Francis P. (2007)** Metals ions and neurodegeneration. *Biometals*. 20:639–654.
- **Muhoberac B. B., y Vidal R. (2013)** Abnormal iron homeostasis and neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 5:1-9.
- **Murphy V.A., Wadhvani K.C., Smith Q.R. y Rapoport S.I. (1991)** Saturable transport of manganese (II) across the rat blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 57:948-954.

- **Myhri R.B., Venkateshappa C., Harish G., Mahandevan A., Muthane U.B., Yasha T.C., Bharath S.M.M. y Shankar S.K. (2011)** Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the Striatum and Frontal Cortex of Parkinson's Disease Brains. *Neurochemical Research*. 36:1452-1463.
- **Nachtman J.P., Tubben R.E., Commissaris R.L. (1986)** Behavioral effects of chronic manganese administration in rats: locomotor activity studies. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*. 8:711–715.
- **Narita K., Kawasaki F. y Kita H. (1990)** Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminal are prevented by verapamil frogs. *Brain Research*. 510:289–295.
- **Newland M.Ch., Ceckler T.L., Kordower J.H. y Weiss B. (1989)** Visualizing Manganese in the primate basal ganglia with magnetic resonance imaging. *Experimental Neurology*. 106:251-258.
- **Nelson, D. L. y Michael M.C. (2008)** Lehninger Principles of Biochemistry. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, pp 343-349, 351-357, 371, 373 y 380.
- **Niki E., Yoshida Y., Saito Y y Noguchi. (2005)** Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 338:668–676.
- **NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- **Olanow, C.W. (1993)** A scientific rationale for protective therapy in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 91:161-180.
- **Olanow C.W., y Tatton W.G. (1999)** Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annual Reviews in Neuroscience*. 22:123-144.
- **Ordoñez-Librado J.L. (2007)** Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de Manganese. Tesis de Maestría. México. Universidad Nacional autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. pp 77 y 29.

- **Ordoñez-Librado J.L., Anaya-Martínez V., Gutiérrez-Valdez A.L., Montiel-Flores E., Reyes C.D., Martínez-Fong D. y Avila-Costa M.R. (2010)** L-DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neuroscience Letters*. 471:79-82.
- **Ordoñez-Librado J.L., Gutierrez-Valdez A.L., Colín-Barenque L., Anaya-Martínez V., Díaz Bech P. y Avila-Costa M.R. (2008)** Inhalation of divalent and trivalent Manganese mixture induces a Parkinson's disease model: Immunocytochemical and behavioral evidences. *Neuroscience*. 155:7-12.
- **Oubrahim H., Stadtman E.R. y Chock P.B. (2001)** Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98:9505-9510
- **Perry T.A., Torres E.M., Czech C., Beyreuther K., Richards S., Dunnett S.B. (1995)** Cognitive and motor function in transgenic mice carrying excess copies of the 695 and 751 amino acid isoforms of the amyloid precursor protein gene. *Alzheimers Research*. 1:5–14.
- **Perry T.L., Godin D.V. y Ames B. (1982)**. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency?. *Neuroscience Letters*. 33:305-310.
- **Rabin O., Hegedus L., Bourre J.M. y Smith Q.R. (1993)** Rapid brain uptake of manganese (II) across the bloodbrain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 61:509-517.
- **Rangel-Barajas C., Coronel I. y Florán B., (2015)** Dopamine receptor and neurodegeneration. *Aging and Disease*. 6:349-368.
- **Roche E. (1994)** Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Medical Clinics*. 103:189-96.
- **Salehi F., Krewski D., Mergler D., Normandin L., Kennedy G., Philippe S., y Zayed J. (2003)** Bioaccumulation and locomotor effects of manganese phosphate/sulfate mixture in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 191:264-271.

- **Sánchez-Betancourt J.T. (2016)** Caracterización de un modelo de la enfermedad de Parkinson en rata por inhalación de manganeso. Tesis de Doctorado. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. pp 16-21.
- **Sánchez-Betancourt J., Anaya-Martínez V., Gutierrez-Valdez A.L., Ordoñez-Librado J.L., Montiel-Flores E., Espinosa-Villanueva J., Reynoso-Eraza L. y Avila-Costa M.R. (2012)** Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *NeuroToxicology*. 33:1346-1355.
- **Santamaría A.B. y Sulsky S.I. (2010).** Essentiality and toxicity of manganese. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 73:128–155.
- **Sava V., Mosquera D., Song S., Cardozo-Pelaez F. y Sánchez-Ramos J. (2004)** Effects of melanin and manganese on DNA damage and repair in PC12-derived neurons. *Free Radical Biology and Medicine*. 36:1144-1154.
- **Schulz, J.B., Henshaw, D.R., MacGarvey, U. y Beal, M.F. (1996)** Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochemistry International*. 29:167-171.
- **Sloot W.N., van der Sluijs G. y Gramsbergen. (1994)** Selective lesions by Manganese and extensive damage by Iron after injection into rat striatum or hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 62:205-2016.
- **Spadoni F., Stefani A., Morello M., Lavaroni F., Giacomini P. y Sancesario G. (2000).** Selective vulnerability of pallidal neurons in the early phases of manganese intoxication. *Experimental Brain Research*. 135:544–551.
- **Tabner B. J., El-Agnaf O. M., German M. J., Fullwood N. J., y Allsop D. (2005)** Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*. 33:1082–1086.
- **Takeda A. (2003)** Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*. 41:79-87.

- **Trujillo M. A. (2017).** Estudio comparativo sobre el efecto de la exposición a la mezcla de cloruro y acetato de manganeso en diferentes estructuras del cerebro de rata y ratón. Tesis de Licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- **Venereo G. J. R. (2002)** Daño oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 31:126-33.
- **Venkateshappa C., Harish G., Mythri R.B., Mahadevan A., Srinivas B.M.M. y Shankar S.K. (2012)** Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochemical Research.* 37:358-369.
- **Zaleska M.M y Floyd A.R. (1985)** Regional Lipid Peroxidation in rat brain in vitro: Possible role of endogenous Iron. *Neurochemical Research.* 10: 397-410.
- **Zatta P., Lucchini R., van Rensburg S. J., y Taylor, A. (2003)** The role of metals in neurodegenerative processes: Aluminum, manganese, and zinc. *Brain Research Bulletin.* 62:15–28.

ANEXO 1

Nomeclatura de especies reactivas, tomado de Halliwell y Gutteridge, 2015.

Radicales libres	No radicales
<p>ROS</p> <p>Superoxido $O_2^{\circ-}$ Hidroxilo OH° Hidroperoxilo OH_2° Carbonato $CO_3^{\circ-}$ Peroxilo RO_2° Alcoxilo RO° Singulete $1O_2$</p>	<p>ROS</p> <p>Peroxido de hidrógeno H_2O_2 Ácido hipobromoso $HOBr$ Ácido hipocloroso $HOCl$ Oxígeno singulete $1O_2$ Peroxidos orgánicos $ROOH$ Peroxinitrito $ONOO-$ Peroxinitrato O_2NOO Nitroperoxicarbonato $ONOOCO_2^-$ Peroxomonocarbonato $HOOCO_2^-$</p>
<p>Especies Reactivas del cloro</p> <p>Cloro atómico Cl°</p>	<p>Especies Reactivas del Cloro</p> <p>Ácido hipocloroso $HOCl$ Cloruro de nitrilo NO_2Cl Cloruro de nitrosilo $NOCl$ Cloraminas Gas de cloro Cl_2 Cloruro de bromo $BrCl$ Dióxido de cloro ClO_2</p>
<p>Especies Reactivas del bromo</p> <p>Bromo atómico Br°</p>	<p>Especies Reactivas del bromo</p> <p>Ácido hipobromoso $HOBr$ Gas de bromo Br_2 Cloruro de bromo $BrCl$</p>
<p>Especies Reactivas del nitrógeno</p> <p>Oxido nítrico NO° Dióxido nítrico NO_2° Radical nitrato NO_3°</p>	<p>Especies Reactivas del nitrógeno</p> <p>Acido nítrico HNO_2 Nitrosil catión NO^+ Nitrosil anión NO^- Tetróxido de dinitrógeno N_2O_4 Trióxido de dinitrógeno N_2O_3 Peroxinitrito $ONOO-$ Peroxinitrato O_2NOO Ácido peroxinitroso $ONOOH$ Ácido peroxinitrico O_2NOOH Nitronium cation NO_2^+ Cloruro de Nitrilo NO_2Cl Peroxiacetil nitrato $CH_3C(O)OONO_2$</p>

ANEXO 2

Reaching task

Se entrenó a los animales empleando una caja de acrílico de 19,5 cm de largo, 8 cm de ancho y 20 cm, en la parte frontal cuenta con una abertura de 1 cm por la cual el animal tiene que alcanzar un trozo de alimento (pellet) con la pata delantera y comerlo (fig. 1). 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 10 ensayos. Antes del entrenamiento, a los animales se les privó de alimento durante 24 h. Posteriormente, recibieron una dieta restringida a ~10 g/kg de peso corporal ajustada para mantener su peso constante (Ordoñez-Librado et al., 2008).

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 (Sánchez-Betancourt, 2016).

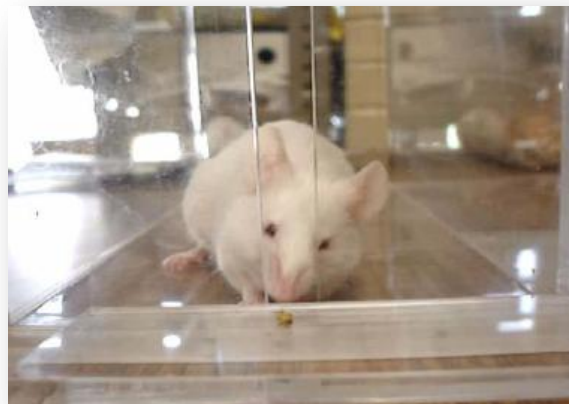


Fig 1. Prueba motora fina (reaching task).

Prueba de viga de equilibrio

Esta prueba mide la capacidad del animal para atravesar una viga (3 mm) para alcanzar una plataforma de seguridad cerrada (Perry et al., 1995). El aparato se construye elevando la superficie de una viga de madera de 10x100 cm x 3 mm a 75 cm del suelo con soportes de madera (Ordoñez-Librado et al., 2008).

Durante el entrenamiento, los animales se colocaron al inicio de la viga sin inclinación y se los entrenó durante 4 días (cuatro ensayos por día). Una vez que los animales cruzaron la viga en un intervalo de 20s, completaron dos ensayos consecutivos más con la viga inclinada. A los animales les fueron permitidos hasta 60s para atravesar la viga. Se registró con un cronómetro el tiempo en que los animales tardaban en atravesar la viga (Ordoñez-Librado et al., 2008).



Fig 2. Prueba de la viga de equilibrio.

Técnica del ácido tiobarbiturico (TBARS)

Los núcleos que fueron extraídos se recolectaron en tubos eppendorf y se mantuvieron en congelación a -50°C . Para el procesamiento de las muestras se maceró el tejido con ácido perclórico, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Cada muestra se hizo por triplicado, en cada experimento se calibra el sistema y se emplea una curva de referencia con concentraciones conocidas que se procesan al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que las muestras experimentales. Los tubos se mantuvieron en hielo para preservar las muestras lo mejor posible.

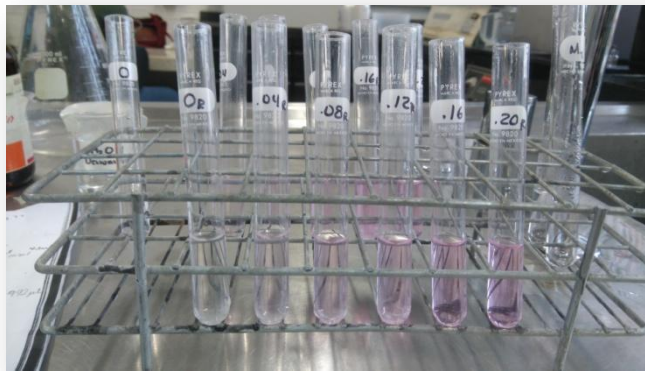


Fig 3. Curva patrón de la técnica de TBARS en la que se muestra la escala de coloración

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Se tomó del sobrenadante de las muestras procesadas con ácido perclórico y se hizo por triplicado cada una, se empleó una curva patrón con concentraciones conocidas que se procesaron al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que las muestras experimentales. Los tubos se mantuvieron en hielo para preservar las muestras lo mejor posible y se leyó al espectrofotómetro a 595nm .