



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

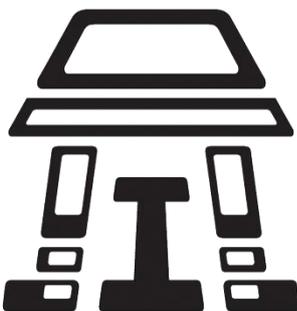
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA MOTORA A L-
DOPA EN RATAS EXPUESTAS A LA MEZCLA DE
CLORURO ($MnCl_2$) Y ACETATO DE MANGANESO
($Mn(OAc)_3$)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:
Maribel Suleyma Castañeda Alberto



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA ROSA AVILA COSTA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO
2017



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.

Dedicatorias

A mis padres y hermano por siempre haberme dado lo mejor y todo cuanto pudieron, por la confianza y el amor que me han dedicado todos estos años, sin ustedes nada de esto sería posible. Los amo.

Agradecimientos

A mi padre quien ha trabajado gran parte de su vida para poder darnos lo mejor a mi hermano y a mí, sin su esfuerzo esto no sería posible, gracias por tu dedicación, confianza y cariño, te amo.

A mi madre que siempre ha estado conmigo escuchándome y apoyándome, gracias por creer en mí, por estar conmigo en mis peores momentos y ser un gran ejemplo para mí. Sé que has dejado mucho por mi hermano y por mí, siempre estaré agradecida por ello. Eres una mujer admirable, Te amo.

A mi hermano que con sus locuras llena de alegría mi vida, gracias por estar conmigo, por darme ánimos siempre que lo necesito, por ser mi confidente y mi mejor amigo, sabes bien que eres muy importante en mi vida y que pese a que somos muy diferentes y tengamos nuestras discusiones siempre estarás en mi corazón. Te amo.

A Israel Sánchez, mi novio, que durante nueve años ha estado a mi lado y con quien eh pasado algunas de las mejores experiencias en mi vida, gracias por ser paciente conmigo, por creer en mí, por los buenos y malos momentos, por el amor y el apoyo que me has dado, eres mi gran amor y espero que sigamos creciendo juntos y logrando nuestras metas. Te amo.

A mis tíos que siempre han estado apoyándome, especialmente a mi tía Reyna que siempre me ha dado su apoyo incondicional y sobre todo por contagiarnos su alegría siempre.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Sandra, Manuel, Yenifer, Liliana y Azucena por esos momentos tan divertidos que pasamos y por formar parte de esta pequeña etapa de mi vida, haciendo que esta experiencia fuera aún más especial.

A mis sinodales, por el tiempo y la dedicación invertidos que ayudaron a que este trabajo fuera mejor.

A la Dra. María Rosa, por haberme dado la oportunidad de formar parte del laboratorio de Neuromorfología, haberme guiado, apoyado y exigido a lo largo de este tiempo, gracias a ello he podido crecer como persona. Por ultimo le agradezco el tiempo invertido en este proyecto y la confianza que puesta en mí, me llevo para siempre los gratos momentos y los conocimientos que este laboratorio me dejo.

A Enrique, Paty, Ana y Chucho por haberme apoyado, ya sea ayudándome con las técnicas o bien compartiendo su conocimiento conmigo; especialmente quiero agradecer a Chucho quien con amabilidad y dulzura siempre está dispuesto a ayudarnos.

Quiero hacer una mención especial por aquellos a los que siempre olvidamos y que sin ellos nada de esto sería posible, los animales de laboratorio, puesto que son un pilar importante en la investigación y deben ser reconocidos, apreciados y tratados con respeto ya que por su sacrificio involuntario, todo esto es posible.

Este trabajo se llevó a cabo gracias al programa de apoyo a proyectos PAPIIT: IN219617.

Índice

Abreviaturas	I
Resumen	II
Abstract.....	III
Introducción.....	1
Justificación	15
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
Metodología	17
Resultados	19
Discusión	29
Conclusión.....	36
Literatura Citada.....	37
Anexos	49

Abreviaturas

6-OHDA	6-Hidroxidopamina (2,4,5 Trihidroxifeniletilamina)
BHE	Barrera Hematoencefálica
Ca²⁺	Calcio
DA	Dopamina
DMT-1	Transportador de Metales Divalentes
PSD	Densidad post Sináptica
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido Gamma Aminobutírico
GP	Globo Pálido
GPe	Globo Pálido Externo
GPi	Globo Pálido Interno
Glu	Glutamato
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
L-DOPA	Levodopa
IL-1β	Interleucina 1β
INF- γ	Interferón gama
Mn	Manganeso
Mn⁺²	Ion Manganeso
Mn⁺³	Ion Mangánico
MnCl₂	Cloruro de Manganeso
Mn(OAc)₃	Acetato de Manganeso
MPTP	1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina
NDA	Neuronas Dopaminérgicas
NEM	Neuronas espinosas medianas
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NST	Núcleo Subtalámico
O₂[·]	Súper Óxido
OH[·]	Radical Hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
SN	Sustancia Nigra
SNc	Sustancia Nigra Compacta
SNr	Sustancia Nigra Reticular
NE	Núcleo Estriado
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TNFR1	Receptor para TNF-α

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial y se estima que su incidencia aumentará en los próximos años. Actualmente existen modelos experimentales que permiten su estudio, sin embargo, no simulan la progresión lenta y natural de la enfermedad. En el laboratorio de Neuromorfología de la FES Iztacala se implementó un modelo experimental basado en la inhalación de cloruro (MnCl_2) y acetato de manganeso ($\text{Mn}(\text{OAc})_3$) que muestra mayor fidelidad al desarrollo de la EP. Por otra parte, la L-DOPA es el tratamiento sintomático más utilizado en la EP, por ello el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad motora de ratas expuestas a la inhalación de la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ antes, durante y después del tratamiento con L-DOPA. Se utilizaron 32 ratas macho de la cepa *Wistar* de 180-200g, sometidas a 72 inhalaciones (6 meses) de la mezcla de compuestos de manganeso (Mn). Posteriormente se dividieron en 3 grupos de 8 ratas cada uno: grupo "Expuesto" continuó inhalando durante 2 semanas más; grupo "Expuestas+L-DOPA" continuó inhalando y administración de 15 mg/Kg de L-DOPA vía oral durante 2 semanas; grupo "L-DOPA" dejó de inhalar a los 6 meses y tratado con 15 mg/Kg de L-DOPA vía oral durante 2 semanas. La evaluación motora se realizó mediante prueba de viga y "reaching task", el análisis morfológico incluyó impregnación de Golgi, Inmunohistoquímica anti-tirosina hidroxilasa y microscopía electrónica. Los resultados de este trabajo mostraron que el modelo por inhalación de Mn produce alteraciones motoras bilaterales progresivas, similares a las descritas en pacientes con EP, evidenciadas por el aumento en el tiempo promedio del recorrido en la prueba de viga de equilibrio y disminución progresiva en el número de aciertos en el "reaching task". La inhalación de Mn propició pérdida (74.85%) de neuronas dopaminérgicas (NDA) en la sustancia nigra compacta, disminución en la densidad de espinas dendríticas en las neuronas espinosas medianas (50%) del núcleo estriado y cambios ultraestructurales como aumento del diámetro de los botones sinápticos, sinapsis perforadas y vacuolas en el neuropilo. Los animales presentaron respuesta positiva al tratamiento con L-DOPA, evidenciando daño dopaminérgico, sin embargo, en la coadministración de Mn/L-DOPA, los animales no mostraron recuperación motora y sí mayor pérdida de NDA y espinas dendríticas.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide and it is estimated that its incidence will increase in the coming years. Currently there are a few experimental models that allow their study, however, do not simulate the slow and natural progression of the disease. In the Neuromorphology laboratory of the FES Iztacala, an experimental model was implemented based on the inhalation of chloride ($MnCl_2$) and manganese acetate ($Mn(OAc)_3$) that shows greater fidelity to the development of PD. On the other hand, L-DOPA is the most used symptomatic treatment in PD, therefore, the objective of this work was to evaluate the motor activity of exposed rats to the inhalation of the $MnCl_2 / Mn(OAc)_3$ mixture before, during and after the L-Dopa treatment. In this study 32 male rats of the *Wistar* were used, they of 180-200g, all rats were exposed to 72 inhalations (6 months) of the manganese (Mn) compounds. Later they were divided into 3 groups of 8 rats each group "Exposed" continued inhaling for 2 more weeks; the exposed group + L-DOPA" continued inhaling and was administered 15 mg / Kg of L-DOPA was orally for 2 weeks; the inhalation was discontinued at the L-Dopa group at six months and 15 mg / kg of L-DOPA was orally for 2 weeks to each rats. Motor activity was evaluated by beam test and "reaching task", the morphological analysis included Golgi impregnation, anti-tyrosine hydroxylase immunohistochemistry and electron microscopy. The results of this study demonstrated that the manganese inhalation model produces progressive bilateral motor alterations, similar to those described in patients with PD, evidenced by the increase in the average time of the course in the balance beam test and progressive decrease in the number of success in the "reaching task". Inhalation of Mn causes dopaminergic neuronal (DAN) loss (74.85%) in the substantia nigra pars compacta, decrease density of dendritic spines in the medium spiny neurons (50%) of the striatum nucleus and ultrastructural changes such as increased synaptic buttons diameter of the, perforated synapses and vacuoles in the neuropil. The animals that presented positive response to L-DOPA treatment, support dopaminergic damage, however, in the co-administration of Mn / L-DOPA, the animals did not show motor recovery and there was greater loss of NDA and dendritic spines.

Introducción.

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a 50 de cada 100,000 habitantes en México (González y Armendáriz, 2005); actualmente es el segundo padecimiento neurodegenerativo más frecuente en las personas de la tercera edad (Alarcón *et al.*, 2010); fue descrita por James Parkinson en Inglaterra en el año 1817 con el nombre de “*Parálisis Agitante*” como movimientos involuntarios con disminución de la fuerza muscular en segmentos que están en reposo (Scorticati y Micheli, 2006).

Se considera una enfermedad crónica, de larga evolución y curso progresivo que se desarrolla más gravemente durante los primeros cuatro años (Hoehn y Yahr, 1967). Se caracteriza principalmente por temblor en reposo, rigidez, bradicinesia y pérdida de los reflejos posturales (Koller, 1984; Coyle y Puttfarcken, 1993; Cantello *et al.*, 1995; Fahn, 2003; González y Armendáriz, 2005; Tolosa *et al.*, 2006; Lin y Bleal, 2006).

Los síntomas de la EP comienzan de forma insidiosa y empeoran gradualmente, el temblor en reposo es a menudo el primer síntoma reconocido por el paciente (Fahn, 2003). Sin embargo, la enfermedad a veces comienza con bradicinesia; y en algunos otros pacientes el temblor puede no desarrollarse (Fahn, 2003; Rodríguez-Violante, 2011).

La bradicinesia es una característica diferencial en los trastornos asociados a los ganglios basales y se refiere a la lentitud en la realización de movimientos. La manifestación inicial de la enfermedad es a menudo la lentitud en la ejecución de las actividades de la vida diaria, también abarca dificultades de planificación, formulación de movimientos y realización de tareas (Jankovic, 2008).

La pérdida de los reflejos posturales, generalmente se manifiesta en las últimas etapas de la EP, comprometiendo la capacidad de mantener el equilibrio durante las tareas diarias como caminar, girar y ponerse de pie después de estar sentado (Morris *et al.*, 2000; Jankovic, 2008).

Cuando la enfermedad progresa surgen problemas de equilibrio, sialorrea, alteraciones de la sensación, insomnio y fragmentación del sueño (Estrada-Bellmann y Martínez, 2011).

En la actualidad, México no cuenta con estudios epidemiológicos acerca de la prevalencia o incidencia de la enfermedad; sin embargo, se estima que a nivel mundial se presenta entre el 1 y 2% de la población mayor de 60 años de edad. De acuerdo al conteo de población y vivienda realizado en 2005; por parte del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el 8.1% de la población en México se encuentra en este grupo de edad, lo que implicaría una prevalencia aproximada de entre 83,000 a 166,600 personas con EP en México (Rodríguez-Violante, 2011).

En la EP se observa pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas (NDA) de la sustancia nigra compacta (SNc) que conduce a la reducción del contenido de dopamina (DA) en el núcleo estriado (NE) (Kordowel *et al.*, 2000; Nieuwenhuys *et al.*, 2009). La pérdida de las NDA de la SNc empieza varios años antes que aparezcan los síntomas (Estrada-Bellmann y Martínez, 2011).

El tratamiento de la EP se basa en el uso de medicamentos agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina, ropirol, cabergolina, apomorfina, amantadina, selegilina y L-DOPA, siendo este último es el más utilizado en el tratamiento de la enfermedad ya que es precursor de la DA, resultando el tratamiento más efectivo para reducir las alteraciones motoras de la EP (Rodríguez-Violante, 2011; Muñiz, 2015).

La DA no cruza la barrera hematoencefálica (BHE), lo que limita su uso para el tratamiento de la EP, la L- DOPA por otro lado, atraviesa con facilidad la BHE, su absorción se da principalmente en el duodeno y una vez absorbido es convertido a DA por medio de la enzima dopadescarboxilasa, de esta manera se restablece temporalmente la funcionalidad en el sistema dopaminérgico (Juri y Chaná, 2006). A menudo este fármaco es utilizado para determinar deficiencia dopaminérgica y confirmar el diagnóstico de la EP (Juri y Chaná, 2006; Tolosa *et al.*, 2006; Anaya-Martínez *et al.*, 2012).

Patogénesis de la EP

La EP es un trastorno complejo, sin embargo, estudios recientes han considerado que el estrés oxidativo y los daños mitocondriales juegan un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad (Agid, 1991; Moore *et al.*, 2005).

Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo se considera un importante mecanismo patogénico de la muerte neuronal en la EP (Halliwell, 1992). Las propiedades oxidativas del oxígeno juegan un papel vital en diversos fenómenos biológicos. Sin embargo, el oxígeno también puede provocar eventos oxidativos dañinos dentro de las células, principalmente a través de su transformación a formas reactivas como: peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales hidroxilo (OH[•]) y superóxido (O₂[•]), y de esta manera puede dañar las enzimas esenciales y proteínas estructurales (Fhan y Cohen, 1992). Se han descrito al menos nueve mecanismos que pueden generar radicales libres. Los dos más importantes implicados en la EP son:

Reacción Haber-Weiss



Reacción de Fenton



Figura 1.- Esquema donde se muestran los componentes implicados en las reacciones de Haber-Weiss y la reacción de Fenton.

En la reacción de Haber-Weiss se generan radicales OH[•] a partir del H₂O₂ y del O₂, en la reacción de Fenton se generan radicales O₂[•] y OH[•] en presencia de hierro (Fe²⁺) (Fig.1) (Ebadi *et al.*, 1996, Birben *et al.*, 2012).

El estrés oxidativo también provoca reacciones en cadena sin control, como la peroxidación de lípidos y reacciones de autooxidación de catecolaminas como la DA (Fhan y Cohen, 1992; Beal, 2003).

La DA presenta distintos procesos de oxidación, que derivan en la formación de H_2O_2 y O_2 (Drukarch *et al.*, 2000) que a través de la reacción de Fenton liberan radicales OH^* (Youdim, *et al.*, 1999), estos son considerados como los radicales libres más reactivos, ya que pueden causar peroxidación lipídica, daño a proteínas, carbohidratos y a las bases del ADN (Fahn y Cohen, 1992; Birben *et al.*, 2012).

Actualmente existen diversos estudios que apoyan la teoría que el estrés oxidativo aumenta en la EP, especialmente en la SNc (Jenner y Olanow, 1996; Jenner, 2003) además, el tratamiento sintomático con L-DOPA aumenta la carga oxidativa por medio de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) generando estrés oxidativo y muerte celular, relacionándose con la progresión de la enfermedad (Migheli, *et al.*, 1999; Serra *et al.*, 2000).

Disfunción mitocondrial

El daño mitocondrial representa un factor de riesgo para las enfermedades neurodegenerativas, debido a mutaciones en el ADN mitocondrial y producción de ROS (Lin y Beal, 2006). La alteración de la función mitocondrial se debe principalmente a la disminución de la transferencia de electrones en los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris y Navarro, 2008). En la EP se ha descrito que el complejo I mitocondrial reduce su actividad del 20 % al 40 % especialmente en la SNc (Shapira, 1994; Greenamyre *et al.*, 1999; Boveris y Navarro, 2008; Hauser y Hastings, 2013) provocando disminución de la producción de ATP con la consecuente muerte celular por apoptosis o necrosis así como la liberación de ROS generando estrés oxidativo (Hartley *et al.*, 1994; Hauser y Hastings, 2013).

Inflamación

La síntesis de componentes inflamatorios como citosinas generados por la glía, específicamente por la microglía, tienen un papel importante en la patogénesis de la EP (Gao, *et al.*, 2002; Liu y Hong, 2003).

Cuando la microglía se activa, regula gran variedad de receptores y moléculas implicadas en la inflamación y fagocitosis, entre estas moléculas se encuentran, el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interferón gama ($INF-\gamma$), interleucina-

1 β (IL-1 β) y óxido nítrico (NO). La sobreproducción de NO puede ser neurotóxica ya que reacciona con el O₂[•] para formar peroxinitrito (ONOO⁻) (Chao *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2002; Lui y Hong, 2003; Zhao *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2009) contribuyendo a procesos neurotóxicos y daño a células dopaminérgicas; por lo tanto, la sobreactivación microglial en la EP podría promover la muerte neuronal y fagocitar los restos celulares, contribuyendo a la progresión de la enfermedad y al daño de las áreas adyacentes (Knott *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2001; González-Torres y Armendáriz-Borunda, 2005).

Aun cuando no se han identificado plenamente los factores que propician la EP, se han propuesto y desarrollado modelos experimentales para abordar la progresión de la EP.

Modelos experimentales de la EP

Para el estudio de la EP se han propuesto modelos animales, basados en el uso de neurotóxicos como MPTP, 6-OHDA, Paraquat y Rotenona (Fig.2), éstos actúan provocando la muerte y degeneración selectiva de las NDA de la SNc a través de la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial generando ROS y Radicales libres y consecuentemente estrés oxidativo (Uversky, 2004; Alarcón *et al.*, 2010).

La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) fue descubierta accidentalmente en jóvenes drogadictos que desarrollaron un síndrome parkinsoniano idiopático después de la autoadministración intravenosa de este compuesto (Langston *et al.*, 1983; Langston *et al.*, 1984; Shimohama *et al.*, 2003). Es considerado un potente neurotóxico ya que diversos estudios demuestran que induce la muerte de NDA, así como disminución en la concentración de DA y sus metabolitos (Heikkila, 1984) también reproduce los síntomas de la EP como temblor, rigidez, lentitud de los movimientos e inestabilidad postural (Langston *et al.*, 1984; Bezard *et al.*, 1997; Dauer y Przedborski, 2003) además, se demostró que la administración de L-DOPA induce mejoría de las alteraciones motoras, lo cual indica que el daño es dopaminérgico (Langston *et al.*, 1984; Bezard *et al.*, 1997). Sin embargo, se requieren altas dosis de esta toxina para producir depleción de DA, y frecuentemente se presenta recuperación, particularmente en roedores (Shimohama *et al.*, 2003; Mounayar *et al.*, 2007). El MPTP atraviesa

con facilidad la BHE y es oxidado por la MAO-B principalmente en astrocitos, transformándose inicialmente en 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio (MPDP⁺) y posteriormente a 1-metil-4-fenilpiridinium (MPP⁺) por oxidación espontánea. El MPP⁺ liberado de los astrocitos entra por medio del transportador de DA (DAT) a las NDA, acumulándose en las mitocondrias provocando disfunción mitocondrial, especialmente del complejo I (Shimohama *et al.*, 2003; Alarcón *et al.*, 2010).

El Paraquat, N,N'-dimetil-4,4'-bipiridinium, es un herbicida utilizado como neurotoxina para simular un modelo animal de la EP, causa muerte celular de las NDA y además induce la formación de cuerpos de Lewy (McCormack *et al.*, 2002; Uversky, 2004). Aunque su estructura química es similar al MPP⁺ la absorción de este compuesto es limitada, atravesando con dificultad la BHE (Hatcher *et al.*, 2008), induce daño mitocondrial en el complejo I aumentando la producción de ROS y generando estrés oxidativo (Alarcón *et al.*, 2010).

Rotenona, es un insecticida de origen natural usado para el control de plagas (Dhillon *et al.*, 2008), diversos estudios han demostrado el carácter neurotóxico de esta sustancia, la cual actúa a nivel mitocondrial, afecta el complejo I provocando estrés oxidativo mediante la generación y liberación de ROS, especialmente del ion O₂[·] incrementando la concentración de radicales libres, también provoca la disminución de ATP (Uversky, 2004), ocasionando la muerte de las NDA y la aparición de síntomas como bradicinesia, inestabilidad postural, y temblor, alteraciones observadas en la EP (Betarbet *et al.*, 2000; Shimohama *et al.*, 2003; Gómez-Chavarín *et al.*, 2013).

El proceso tóxico de la rotenona provoca la activación microglial predominantemente en el NE, la SNc y en menor proporción en la corteza cerebral (Sherer *et al.*, 2003) lo que indica que su toxicidad puede no ser específica de las NDA.

6-OHDA: La 6-hidroxidopamina (2,4,5-trihidroxifeniletilamina), es un compuesto hidroxilado análogo a la DA que produce depleción selectiva del 60-95% de las NDA de la SNc (Ungerstedt, 1968; Kirik *et al.*, 1998; Jakel *et al.*, 2005). Está catalogado como el primer modelo animal utilizado para la EP. Comúnmente se realiza mediante la inyección unilateral en el haz medial del cerebro anterior o bien en la SNc y actúa inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial generando

estrés oxidativo, (Shimohama *et al.*, 2003; Hanrott *et al.*, 2006) reducción de glutatión estriatal y disminución en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Perumal *et al.*, 1992).

Este modelo simula algunos aspectos motores de la EP como arrastre de pies y lentitud de la marcha (Metz *et al.*, 2001; Truong *et al.*, 2006). Pese a que este modelo es el más utilizado, es de carácter agudo, ocasionando muerte frecuente de animales experimentales, además de que no atraviesa la BHE (Ferro *et al.*, 2005), por lo que se administra intracerebralmente por métodos estereotáxicos.

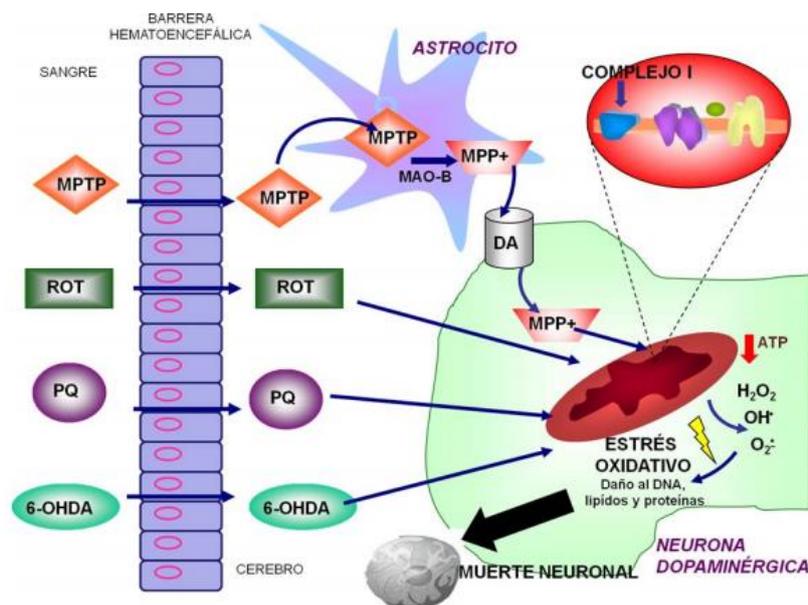


Figura 2.- Esquema donde se muestra la acción y efecto de los agentes neurotóxicos: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP), Rotenona (ROT), paraquat (PQ), atraviesan la barrera hematoencefálica. El MPTP entra al astrocito donde es metabolizado por la monoamino oxidasa B, y se transforma en el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), se libera al espacio presináptico y entra en las NDA a través del transportador de DA y se va directamente a la mitocondria. La ROT, PQ y 6-OHDA atraviesan la membrana de las neuronas y también se dirigen a la mitocondria. Todos los tóxicos actúan inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual aumenta la generación de ROS, disminuye el potencial redox y por lo tanto la síntesis de ATP. La generación de ROS induce estrés oxidativo, propiciando daño a las biomoléculas. Todo ello produce la muerte de las NDA (Alarcón *et al.*, 2010).

Aunque estos modelos reproducen aspectos muy importantes de la EP son incapaces de simular la progresión lenta y natural de los pacientes con EP. En la búsqueda de un modelo animal que represente la progresión de la enfermedad se ha encontrado que la inhalación de Manganeso (Mn) con estados de valencia

+2 y +3 puede ser una alternativa viable (Ordoñez-Librado *et al.*, 2008), ya que a pesar de ser un mineral esencial para el funcionamiento de enzimas mitocondriales, como la súper oxido dismutasa (SOD) y el piruvato carboxilasa (Sloot y Gramsbergen, 1994). Existen reportes que relacionan concentraciones elevadas de Mn en sangre y su acumulación en la SNc con la aparición de una patología similar a la EP, condición conocida comúnmente como “manganismo” (Takeda, 2003).

Manganeso (Mn)

El Mn es un elemento que de manera natural se encuentra en nuestro organismo en pequeñas cantidades, por ejemplo, el valor normal en sangre va de 0.4 a 1.2 mg/L; es indispensable para ciertos procesos metabólicos como la síntesis de aminoácidos, carbohidratos y lípidos (Finley y Davis, 1999), sin embargo, la exposición crónica a este mineral puede causar severos daños neurológicos debido a que el Mn tiende a acumularse en los ganglios basales, especialmente en zonas ricas en DA como la SN, Núcleo estriado (NE) y Globo pálido (GP) (Yamada *et al.*, 1986; Sloot y Gramsbergen 1994; Reaney *et al.*, 2006) provocando “manganismo”, condición descrita en 1837 por James Cooper (Lucchini *et al.*, 2009) quién al observar a 5 mineros encontró que el síntoma más prominente y temprano era la paraplejía, afectando primordialmente las extremidades inferiores, otros síntomas son desorientación, deterioro de la memoria, bradicinecia progresiva, distonía y perturbación en la marcha (Rosenstock *et al.*, 1971; Rodier, 1995; Bast-Petterse *et al.*, 2004).

El manganismo es una disfunción extrapiramidal progresiva, donde se han identificado al menos tres fases (Rodier, 1995):

-La primera se caracteriza por no presentar síntomas específicos como astenia, anorexia, apatía, dolores de cabeza, hipersomnía, espasmos, cansancio de las piernas, artralgia, e irritabilidad y algunas veces puede presentar episodios de psicosis denominada “locura mangánica”.

-La segunda se caracteriza por presentar síntomas relacionados con la disfunción de los ganglios basales, por ejemplo, rigidez facial, alteraciones del

habla (tartamudeo, lentitud y mala articulación de las palabras), alteraciones en la marcha y ligeros temblores.

-La última fase presenta agravamiento de los síntomas mencionados, se caracteriza por rigidez muscular, temblores y escalonamiento en la marcha denominado "paso de gallo".

Respuesta a la L-DOPA

Se han reportado diferentes respuestas a la terapia con L-DOPA en pacientes que presentan síntomas por intoxicación por Mn. Se ha observado reducción en la rigidez y bradicinesia además de mejoría en el equilibrio en algunos pacientes (Mena *et al.*, 1970; Huang *et al.*, 1989), Rosenstock en 1971 reportó que la cognición y la bradicinesia, pero no la distonía, mejoraron en un paciente que recibió tratamiento con L-DOPA. Koller y colaboradores (2004), realizaron un estudio con plazo de un mes, donde 13 pacientes con síntomas de parkinsonismo inducido por Mn fueron tratados con dosis altas (900 mg/día) de L-DOPA, sin embargo, no se observó ningún efecto en la escala de calificación clínica (The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)) ni en las medidas objetivas (tiempo de caminata, prueba de tapping). Así mismo, Olanow y colaboradores (1996), concuerdan en la inefectividad del tratamiento con L-DOPA en monos expuestos a cloruro de Mn ($MnCl_2$).

Las diferentes respuestas al tratamiento con L-DOPA en la intoxicación por Mn pueden estar relacionadas con la variabilidad que existe en la metodología utilizada en los estudios, por lo que podemos inferir que tanto la vía de administración, la valencia del Mn, el tiempo de exposición y la dosis administrada, juegan un papel fundamental en la respuesta al tratamiento con L-DOPA y por lo tanto, al daño al sistema dopaminérgico.

Vías de entrada y Absorción del Mn

Las principales vías de entrada del Mn en los humanos es a través de la inhalación y la ingesta (Rodier, 1955). Solo un pequeño porcentaje del Mn es absorbido y una cantidad aún menor llega finalmente al cerebro; tanto la absorción como el transporte del Mn está regulados por varios sistemas, como

el tracto intestinal, la transferrina, proteínas del transporte sanguíneo y la BHE, el estado de valencia en el que se encuentre el Mn, determinará la ruta por la cual llegará al cerebro.

El Mn tiene diferentes estados de valencia, pero son el Mn divalente (Mn^{+2}) y trivalente (Mn^{+3}) los más comunes en los seres vivos (Aschner y Aschner, 1990; Reaney *et al.*, 2006). El Mn^{+2} en el torrente sanguíneo es tomado por el transportador de metales divalentes (DMT-1), la albúmina y la β -globulina; por otro lado, el Mn^{+3} se une a la transferrina para posteriormente ser transportado al cerebro (Aschner y Gannon, 1994; Slot y Gramsbergen, 1994; Crossgrove y Yokel, 2004; Dobson *et al.*, 2004; Aschener *et al.*, 2005; Au *et al.*, 2008).

Transporte del Mn al Cerebro

El Mn cuenta con tres diferentes rutas para ser transportado al sistema nervioso central (SNC), que dependerán de la vía de exposición y la afinidad a las diferentes especies de Mn (Crossgrove *et al.*, 2003):

- 1) A través de la BHE: es una estructura restrictiva microanatómica vascular que regula la entrada de partículas al cerebro (Fitsanakis *et al.*, 2006). El Mn tiene la capacidad de atravesar la BHE mediante las células endoteliales microvasculares o por un proceso de difusión a través de los canales de Ca^{2+} (Crossgrove y Yokel, 2004; Yokel, 2009).

La transferrina y el DMT1 participan en el transporte de Mn a través de la BHE (Ashner y Ashner, 1990), se ha observado que su expresión aumenta hasta un 35% en el cerebro cuando se presentan niveles altos de Mn (Reaney *et al.*, 2006; García *et al.*, 2006), normalmente se localiza en la membrana de las neuronas de los ganglios basales, lo que podría explicar la sensibilidad de esta región a la toxicidad del Mn (Au *et al.*, 2008).

- 2) A través del líquido cefalorraquídeo: el epitelio del plexo coroideo juega un papel importante en la modulación del movimiento de productos químicos, incluido iones metálicos entre la sangre y el líquido cefalorraquídeo (Dobson, 2004). El Mn es transportado al cerebro a través del líquido cefalorraquídeo por medio de la transferrina secretada por las células

ependimarias de los plexos coroideos (Takeda *et al.*, 2000; Takeda, 2003; Wang *et al.*, 2008).

- 3) A través del sistema olfatorio y del nervio trigémino: el transporte a través del bulbo olfatorio a menudo resulta ser una ruta directa para el ingreso de productos químicos desde la nariz hasta el cerebro. Los productos químicos inhalados son captados y transportados a las neuronas del bulbo olfatorio, así mismo el nervio trigémino cuenta con receptores que proyectan directamente al SNC (Tjälve *et al.*, 1996; Henriksson *et al.*, 1999; Fechter *et al.*, 2002; Dorman *et al.*, 2004).

Neurotoxicidad del Mn

Similar a lo reportado en la EP, el Mn afecta a las neuronas dopaminérgicas de los ganglios basales; éstos últimos son una serie de núcleos conectados entre sí, ubicados en el telencéfalo, diencefalo y mesencéfalo (Albin *et al.*, 1989; Parent, 1990). Los ganglios basales están implicados en procesos cognitivos, emocionales y motores; están integrados por el NE, globo pálido (GP), núcleo subtalámico (NST) y sustancia nigra (SN) (Herrero *et al.*, 2002; Yelnik, 2002).

NE: Es el componente más grande de los ganglios basales, recibe proyecciones masivas de la corteza cerebral, tálamo y SNC; también recibe proyecciones, aunque en menor intensidad, del GP y el NST. Las neuronas del NE consisten principalmente de neuronas espinosas medianas de proyección (NEM-96%), es decir, neuronas cuyas dendritas están densamente cubiertas con espinas dendríticas, todas estas neuronas son GABAérgicas, otras neuronas estriatales son pequeñas interneuronas GABAérgicas (1%) o interneuronas colinérgicas grandes (2%) (Herrero *et al.*, 2002; Yelnik, 2002).

Globo pálido: compuesto por el globo pálido interno (GPi) y el globo pálido externo (GPe). El GP recibe aferencias del NE y el NST. Las neuronas del GP son principalmente GABAérgicas (Parent *et al.*, 1995; Yelnik, 2002).

Núcleo subtalámico: se compone de una multitud de interneuronas de proyección densamente empaquetadas de tamaño mediano, al igual que el cuerpo estriado, recibe proyecciones de la corteza cerebral y el GPe. El

neurotransmisor principal es el glutamato (Glu), envía aferencias a la SN y al GP (Parent *et al.*, 1990, 1995; Yelnik, 2002).

Sustancia Nigra: es una estructura que comprende la *pars reticulata* (SNr) y la *pars compacta* (SNc), donde se concentran las NDA (Parent *et al.*, 1990; Mink, 1996; Yelnik, 2002; Herrero *et al.*, 2002). La pérdida progresiva de las NDA conduce a la reducción de DA principalmente en el NE provocando los déficits motores característicos de la EP (Albin *et al.*, 1989; Kreitzer y Malenka, 2008).

Los reportes actuales sugieren que el Mn se acumula en los ganglios basales (Fig.3), donde los astrocitos son el sitio principal de disfunción temprana y daños tóxicos del Mn (Hazell, 2002). Los astrocitos se encargan de la recaptura de aproximadamente el 80% del Glu, sin embargo, debido a que tienen alta afinidad por el Mn, la presencia de este elemento en niveles excesivos, provoca disminución en la absorción del Glu, en consecuencia se observa aumento de este neurotransmisor, promoviendo excitotoxicidad por sobreactivación glutamatérgica (Hazell, 2002; Fitsanakis *et al.*, 2006).

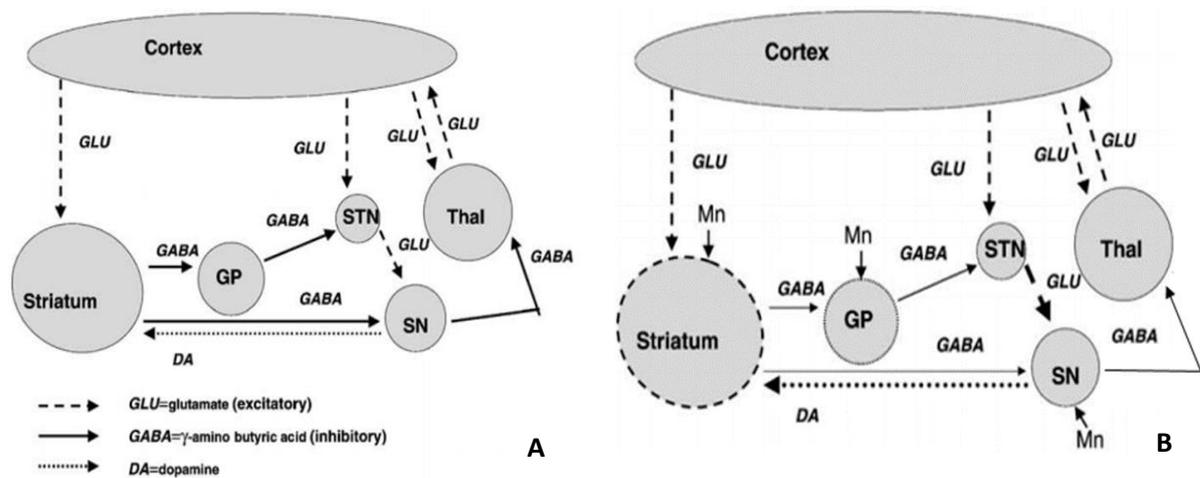


Figura 3.- Esquema donde se muestra la toxicidad inducida por Mn y su acumulación en los ganglios basales: A) Diagrama esquemático simplificado de los ganglios basales se muestran los neurotransmisores presentes para el funcionamiento normal. B) Se ha descrito que el Mn se acumula especialmente en el GP, SN y NE. El aumento de Mn en el GP produce la disminución de las señales gabaérgicas en el NST entonces la entrada glutamatérgica en la SN no es regulada y conduce a la disfunción dopaminérgica en el NE. El grosor de las líneas muestra la intensidad de la neurotransmisión. GP: globo pálido, STN: núcleo subtalámico, Thal: tálamo, SN: sustancia nigra (Erikson y Aschner, 2003).

Por otro lado, el Mn puede aumentar la producción de NO a través de las células microgiales activadas, lo que puede conducir potencialmente a la producción sostenida de NO neurotóxico afectando a las neuronas circundantes, también aumenta la producción de citocinas proinflamatorias y ROS (Chang y Liu, 1999; Zhang *et al.*, 2003; Filipov *et al.*, 2005).

Debido a que el Mn se acumula en la matriz mitocondrial puede interrumpir su función mediante tres posibles mecanismos 1) por la inhibición de la energía de transducción, 2) mutaciones en el ADN mitocondrial y 3) generación de ROS (Zhang *et al.*, 2003). Alaimo (2012) reporta que el Mn induce aumento de la generación de ROS implicados en la muerte celular asociada a enfermedades neurodegenerativas como la EP; las ROS se ven implicadas en la activación de la caspasa 3 provocando la muerte celular por apoptosis.

El Mn tiene diferentes estados de valencia, siendo el Mn⁺³ el más tóxico (Ali *et al.*, 1995), sin embargo, Archibald y Tyree (1987) proponen que existe una relación sinérgica donde el Mn⁺² se oxida gracias a la participación del radical superóxido dando lugar al Mn⁺³ (Fig. 4).

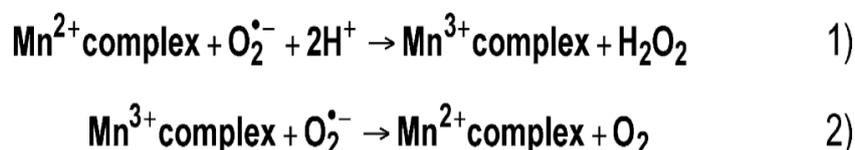


Figura 4.- Mecanismo propuesto por Archibald y Tyree (1987) de la posible conversión del M⁺² a Mn⁺³ y viceversa mediante la acción del radical O₂^{•-}.

Algunos investigadores (Bonilla, 1986; Aschner *et al.*, 2005; Repetto y Repetto, 2009) reportan que la absorción de Mn produce encefalopatía con degeneración neuronal, principalmente en el caudado-putamen, GP, NST y SN, esta última es la más afectada, ya que se decrementa la concentración cerebral de DA y de sus metabolitos como DOPAC, HVA, además de reducir la producción de ATP (Brouillet *et al.*, 1993).

Por otra parte, Latchoumycandane y colaboradores (2005) mencionan que el Mn provoca muerte celular por apoptosis en las NDA del mesencéfalo, mediante la activación de proteínas proapoptóticas, particularmente la liberación de citocromo C y activación de la caspasa 3 (Fig.5).

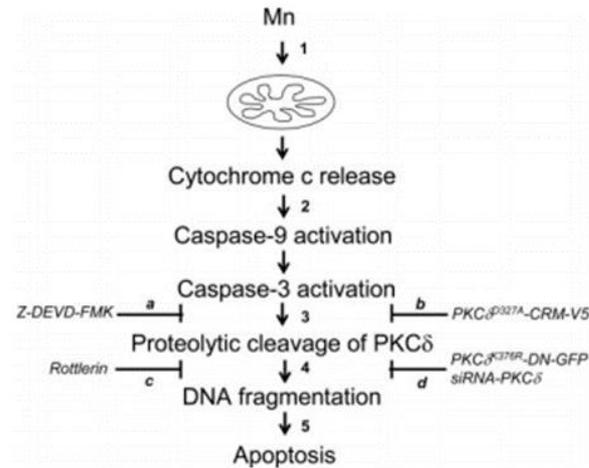


Figura 5.- Modelo propuesto por Latchoumycandane y colaboradores (2005) que describe la secuencia de eventos de muerte celular por apoptosis inducida por Mn. 1) El Mn altera la función mitocondrial, lo que resulta en la liberación de citocromo C al citosol; 2) citocromo C citolítico activa la cascada de caspasas. La caspasa-3 media la escisión proteolítica de la PKC; la PKC a su vez media la fragmentación del ADN y la apoptosis.

En el laboratorio de Neuromorfología, Ordoñez-Librado y cols. en 2008 implementaron un modelo de la EP en ratón basado en la inhalación de la mezcla de cloruro y acetato de Mn, el modelo consistió en la inhalación de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ durante una hora, dos veces por semana, por un periodo de cinco meses; dentro de las evidencias proporcionadas en este estudio se encuentra la degeneración progresiva y bilateral de las NDA de la SNc, reportando pérdida neuronal del 67.58%, además de demostrar respuesta favorable en la conducta motora tras la administración de L-DOPA (Ordoñez-Librado *et al.*, 2010), evidenciando que las afecciones provocadas por el Mn son de origen dopaminérgico, además se observaron alteraciones estructurales y ultraestructurales, como disminución del número de espinas dendríticas en las NEM del NE, aumento en el diámetro de los botones sinápticos, mayor número de sinapsis perforadas y disminución en la concentración de DA y sus metabolitos (HVA y DOPAC); siendo consistente con lo reportado por otros

modelos de la EP y por enfermos de Parkinson (Ingham *et al.*, 1993; Ingham *et al.*, 1998; Colin-Barenque *et al.*, 2000; Solis *et al.*, 2007; Villalba *et al.*, 2009)

Por último, en 2012 Sánchez-Betancourt y cols. corroboran que este modelo es reproducible en ratas. En este caso el número de inhalaciones aumentó, tres veces por semana durante 6 meses y se midieron las mismas variables que en el estudio anterior, obteniendo resultados similares; adicionalmente se analizó por un periodo de cuatro meses posterior a la inhalación y se concluyó que los animales expuestos no presentaban recuperación. Estas evidencias refuerzan el uso de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ como un modelo que simula de manera progresiva y bilateral las alteraciones motoras producidas en la EP, del mismo modo se presentan las alteraciones estructurales y ultraestructurales características de la enfermedad, además con este modelo los animales no presentan recuperación espontánea ni gradual de los síntomas motores en al menos un periodo de 4 meses posterior a la exposición de Mn.

Justificación

Actualmente existe controversia en torno a si el uso de L-DOPA logra revertir las alteraciones motoras producidas por la intoxicación de Mn; diversos estudios presentan resultados contradictorios en torno a ello, observando respuestas, positivas, negativas o nulas al tratamiento.

En el laboratorio de Neuromorfología se demostró que el tratamiento con L-DOPA posterior a la exposición de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ reduce de manera significativa las alteraciones motoras, inducidas en ratas y ratones expuestos a Mn, sin embargo, aún no se ha evaluado el efecto que tiene la L-DOPA frente inhalaciones ininterrumpidas de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$.

El presente trabajo evaluará la respuesta motora de ratas al tratamiento con L-DOPA durante y después de la exposición a la mezcla $MnCl_2/Mn(OAc)_3$. Con ello se pretende despejar las dudas que existen en torno al uso de la L-DOPA como tratamiento de las alteraciones motoras producidas por la mezcla de Mn y ampliar el conocimiento del uso de la inhalación de Mn como un modelo ideal para el estudio de la EP.

Objetivo general

Evaluar los cambios inducidos en la actividad motora, el número de espinas dendríticas de las NEM estriatales y el número de NDA de la SNc de ratas expuestas a la inhalación de la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ antes, durante y después del tratamiento con L-DOPA.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad motora de las ratas expuestas a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$ mediante las pruebas de viga de equilibrio y de “Reaching task” antes, durante y después del tratamiento con L-Dopa.
- Determinar el número de espinas dendríticas de las NEM del NE mediante la impregnación de Golgi en los animales control y expuestos a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$.
- Realizar el análisis ultraestructural del NE de los animales control y expuestos a la mezcla de $\text{MnCl}_2/\text{Mn}(\text{OAc})_3$.
- Determinar el número de NDA de la SNc mediante el conteo de neuronas marcadas por medio de la técnica de Inmunohistoquímica anti-tirosina hidroxilasa (TH).

Metodología

Los experimentos se llevaron a cabo en 32 ratas *Wistar* macho con peso inicial de 180-200g, mantenidos en ciclos de luz/oscuridad 12:12, con agua y alimentación *ad libitum*.

Antes de la exposición a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ los animales fueron entrenados durante dos semanas en las pruebas de coordinación motora de viga de equilibrio (6mm y 12mm) (Anexo 1) y de "Reaching task" (Anexo 2), posteriormente se dividieron en: un grupo expuesto a agua desionizada ($n=8$) (grupo control), mientras que los demás animales fueron expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ por vía inhalada en una caja de acrílico, 1 hora, 3 veces por semana. Después de 72 inhalaciones (6 meses), los animales expuestos se dividieron en los siguientes grupos; un grupo que continuó inhalando durante 2 semanas más ($n=8$) (Expuestas), un grupo que continuó inhalando y además fue medicado con L-DOPA (15 mg/Kg) vía oral durante 2 semanas ($n=8$) (Expuestas+L-DOPA), y, finalmente, otro grupo que dejó de inhalar a los seis meses y fue tratado con L-DOPA (15 mg/Kg) durante 2 semanas ($n=8$) (L-DOPA). Cada semana se evaluó la coordinación motora de todos los animales mediante las pruebas motoras antes mencionadas (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2012).

Todos los animales bajo las condiciones mencionadas fueron sacrificados después de 6 meses y 2 semanas, se perfundieron vía aorta, se fijaron con glutaraldehído y paraformaldehído al 2%; se extrajeron los cerebros y posteriormente se realizaron cortes histológicos para obtener fragmentos del NE y la SNc, para realizar la técnica de impregnación argéntica de Golgi, el análisis ultraestructural y la técnica inmunohistoquímica anti-TH.

Impregnación Argéntica de Golgi: Se realizaron cortes histológicos de 120 μm a nivel del NE los cuales se procesaron mediante la técnica de impregnación Argéntica de Golgi y se realizó el conteo de espinas dendríticas de las NEM; para el conteo se seleccionaron 5 dendritas secundarias de 10 neuronas y se contaron las espinas en una longitud de 10 μm (Avila-Costa *et al.*, 2006) (Anexo 3).

Inmunohistoquímica anti-TH: Se obtuvieron cortes histológicos de 50 μm de la SNc y se procesó con la técnica inmunohistoquímica TH (anti-TH Millipore 1:1000, anti IGg de conejo Vectastain 1:200, revelado con Diaminobenzidina), para identificar la enzima Tirosina Hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de DA. Finalmente se realizó el conteo de las neuronas positivas a TH en un área de 1500 μm^2 en la SNc (Ordoñez-Librado, 2012) (Anexo 4).

Análisis ultraestructural: Los cerebros se retiraron cuidadosamente y se colocaron en la misma solución de fijación durante una hora. Usando un microscopio de disección, se tomaron pequeños fragmentos del cuadrante dorsomedial del NE derecho e izquierdo para su estudio ultraestructural en un microscopio electrónico Zeiss Gemini. Se realizó el análisis de 50 terminales sinápticas por animal seleccionadas al azar. En cada botón sináptico se analizaron las características morfológicas de la membrana y organelos, así mismo se midieron:

- Diámetros de los botones presinápticos mediante el software Orbicule Macnification, 2.0.4.
- Contacto sináptico con cuello o cabeza de la espina; los contactos sinápticos fueron clasificados en contactos con la cabeza de la espina y con el cuello.
- Número de sinapsis perforadas; basándonos en la clasificación descrita por Calverley y Jones en 1987, se analizó:
 - El sitio de la perforación se proyecta hacia la terminal presináptica.
 - La zona activa tiene uno o más componentes curvados negativamente que están separados por una región central de la zona activa que proyecta hacia la terminal presináptica.
 - La densidad post sináptica (PSD) está en estrecha asociación con el cuerpo de la espina o una extensión de ésta.

Se determinó que una sinapsis contenía una PSD perforada si había una hendidura en la PSD de >50 nm (el ancho de una vesícula sináptica) (Anaya-Martinez *et al.*, 2014) (Anexo 5).

Análisis estadístico:

Para los datos conductuales (prueba de viga y “reaching task”), se utilizó ANOVA de dos vías, seguido del análisis multifactorial de Bonferroni. Por otro lado, para los datos obtenidos en la técnica de Golgi e inmunohistoquímica anti-TH se utilizó ANOVA de una vía seguido del análisis de *post hoc* de Tukey; por último, para el análisis ultraestructural se utilizó t de Student para muestras no pareadas. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Una de las características principales de la EP son las alteraciones motoras particularmente en la marcha, los enfermos se tornan más lentos debido al constante arrastre de los pies, por tal motivo para hacer hincapié en este aspecto particular se realizó la prueba de la viga equilibrio, en la cual se evaluó el tiempo en que las ratas tardaban en atravesar dos vigas inclinadas, una de 6 mm y la otra de 12 mm. En la Fig. 6 se observa el desempeño de los grupos en la viga de 12 mm. El grupo control tardó un tiempo promedio de 14 ± 0.8 segundos mientras que los demás grupos comenzaron a aumentar el tiempo de recorrido a partir de la cuarta semana hasta estabilizarse, aproximadamente en la semana 13 tardando en promedio 111.15 ± 5.14 segundos, sin embargo, al ser tratados con L-DOPA mostraron disminución en el tiempo de recorrido, observándose tiempos similares al grupo control (7-30 segundos), después de dos semanas de tratamiento, lo mismo sucede en la viga de 6 mm donde el grupo control alcanzó un promedio de 13.09 ± 0.7 segundos (Fig. 7); es importante resaltar que el grupo que continuó inhalando la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ simultáneamente al tratamiento con L-DOPA mostró menor grado de recuperación con respecto al grupo que dejó de inhalar antes de ser tratado con L-DOPA.

Viga 12 mm

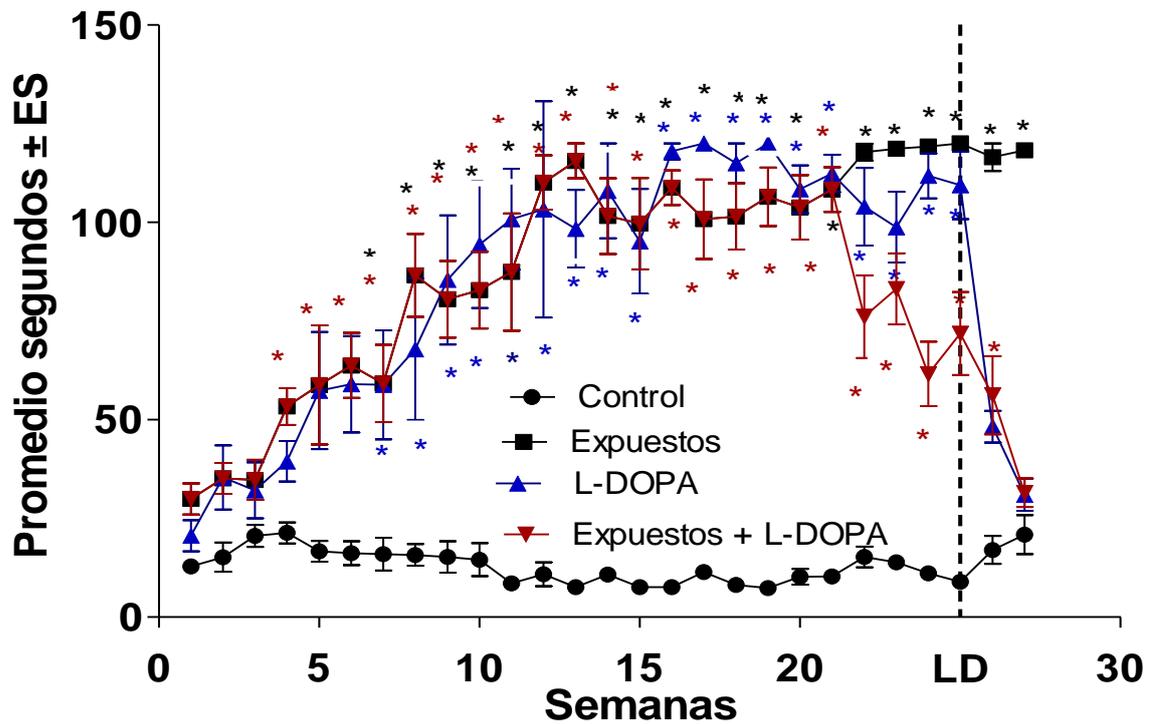


Figura 6.- Media del tiempo en segundos que tardaban en recorrer la viga de 12 mm los cuatro grupos (Control 14 ± 0.8 s, Expuestos 91.45 ± 5.5 s, Expuestos+ L-DOPA 77.58 ± 6.2 s y L-DOPA 83.45 ± 5.1 s) a lo largo de 26 semanas, se observa que el grupo control se mantuvo estable mientras que los demás grupos aumentaron el tiempo de recorrido mostrando diferencias significativas con respecto al grupo control. ANOVA con análisis de Bonferroni $* = p < 0.05$ vs grupo control.

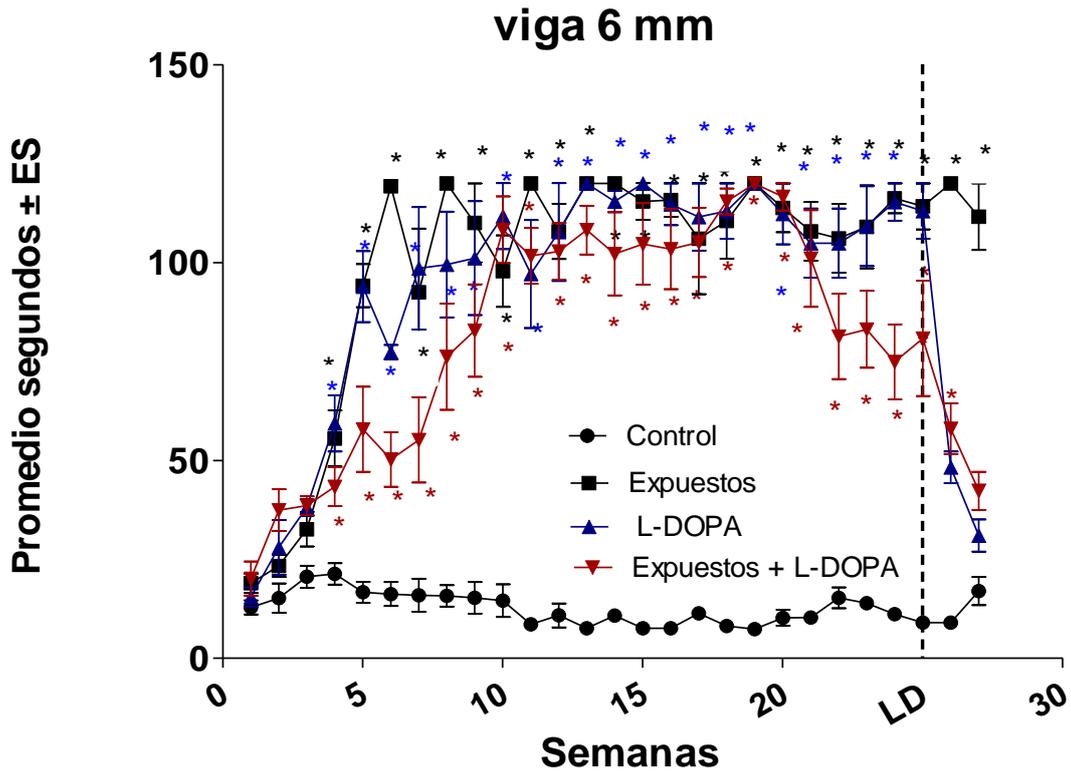


Figura 7.- Media del tiempo en segundos que tardaban en recorrer la viga de 6 mm los cuatro grupos (Control 13.09 ± 0.7 s, Expuestos 101.21 ± 5.7 s, Expuestos+ L-DOPA 79.26 ± 5.5 y L-DOPA 90.94 ± 6.1 s) a lo largo de 26 semanas, se observa que el grupo control se mantuvo estable mientras que los demás grupos mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control coincidiendo con lo reportado en la viga de 12 mm. Por otro lado, se observa que el grupo que continuó inhalando presentó una recuperación lenta frente al tratamiento con L-DOPA (LD). ANOVA con análisis de Bonferroni * = $p < 0.05$ vs grupo control.

La dificultad para realizar movimientos alternados y secuenciados en las extremidades superiores, especialmente en las manos son síntomas característicos de los enfermos de Parkinson por tal motivo se evaluó la coordinación motora mediante la prueba de “reaching task”, con ella se valoró la cantidad de aciertos logrados. El grupo control mantuvo un promedio de 15.47 ± 0.1 aciertos, mientras que los grupos sometidos a la inhalación de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ después de la novena semana comenzaron a disminuir la cantidad de aciertos (10.67 ± 0.6), una vez que los animales fueron tratados con L-DOPA mostraron mejoría, alcanzando valores similares al control (13.25 ± 0.6), no obstante lo animales que fueron medicados simultáneamente a la inhalaciones de la mezcla de Mn, nuevamente no alcanzaron el mismo grado de recuperación que los otros grupos (Fig.8).

Reaching task

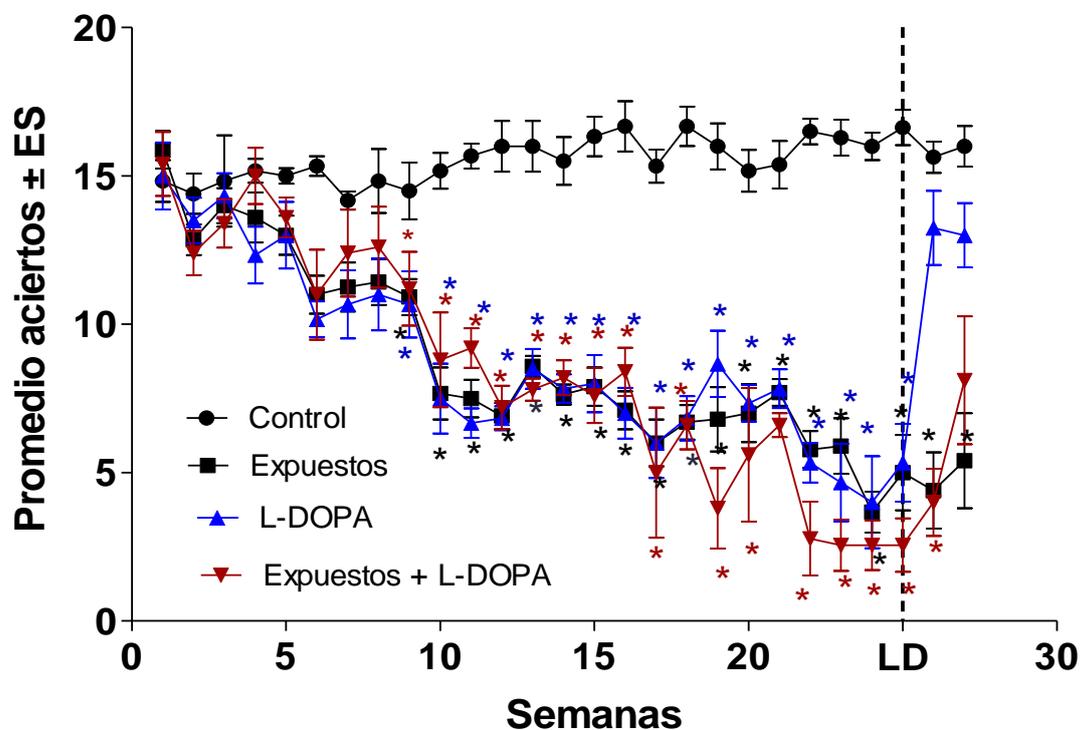


Figura 8.- Media del número de aciertos en la prueba de “reaching task”. Se muestran los resultados de los diferentes grupos (Control 15.47 ± 0.1 , Expuestos 8.64 ± 0.6 , Expuestos+ L-DOPA 8.41 ± 0.6 y L-DOPA 9.08 ± 0.7), inicio del tratamiento con L-DOPA (LD). ANOVA con análisis de Bonferroni * = $p < 0.05$ vs grupo control.

Durante la realización de esta prueba se hicieron ciertas observaciones adicionales en el comportamiento de los animales expuestos a la mezcla de Mn. Los animales expuestos presentaron alteraciones motoras como: dificultad para iniciar el movimiento y problemas para sujetar el alimento, ya que en lugar de sujetarlo con la mano, el alimento era arrastrado al interior de la caja y posteriormente era tomado con el hocico, además, algunos animales perdieron interés por realizar la tarea, a pesar de estar privados de alimento.

En cuanto al número de espinas dendríticas la Fig. 9 muestra que en los animales expuestos a la mezcla de Mn hay pérdida significativa del número de espinas dendríticas, comparado con el grupo control, también observamos que existe pérdida significativa de espinas dendríticas cuando se administra el tratamiento con L-DOPA de manera simultánea a la inhalaciones de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$.

Lo anterior puede observarse más claramente en la Fig. 10, donde apreciamos la densidad de las espinas dendríticas con los diferentes tratamientos, se observa que el grupo control (A y B) tiene una densidad normal de espinas dendríticas, mientras que en el grupo expuesto a las inhalaciones de Mn (C y D) se redujo significativamente el número de espinas, mientras que la administración de L-DOPA (E y F) refleja mayor cantidad de espinas dendríticas, por el contrario cuando el tratamiento es simultaneo a las inhalaciones de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ se observa pérdida significativa de espinas dendríticas (G y H).

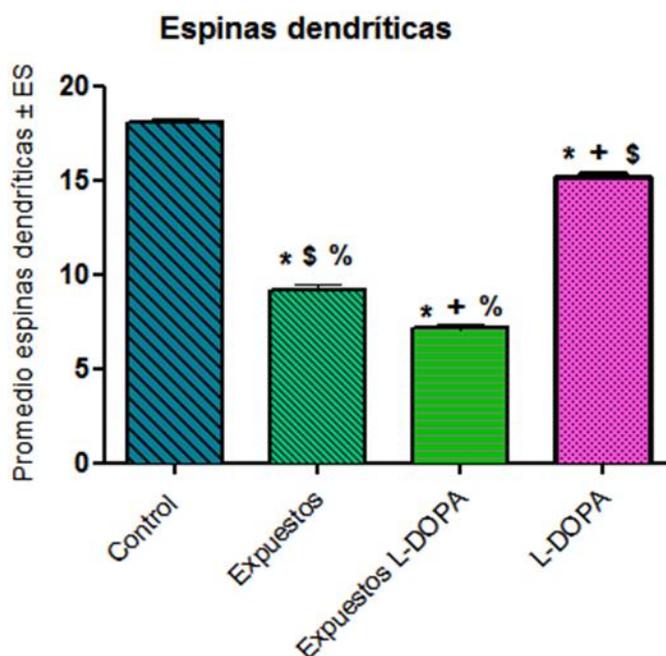


Figura 9.- Promedio de espinas dendríticas de las NEM del NE tanto del grupo control (18.02 ± 0.2), Expuestos (9.07 ± 0.3), Expuestos + L-DOPA (7.14 ± 0.09) Y L-DOPA (15.14 ± 0.2). Observamos disminución en el número de espinas dendríticas después de la exposición al Mn, además de evidenciar que el tratamiento con L-DOPA resulta efectivo siempre que las inhalaciones sean suspendidas antes de iniciar la administración. ANOVA con *post hoc* Tukey *** = $p < 0.001$. Donde * = $p < 0.001$ vs Control, + = $p < 0.001$ vs Expuestos, \$ = $p < 0.001$ vs Expuestos+ L-DOPA y % = $p < 0.001$ vs L-DOPA.

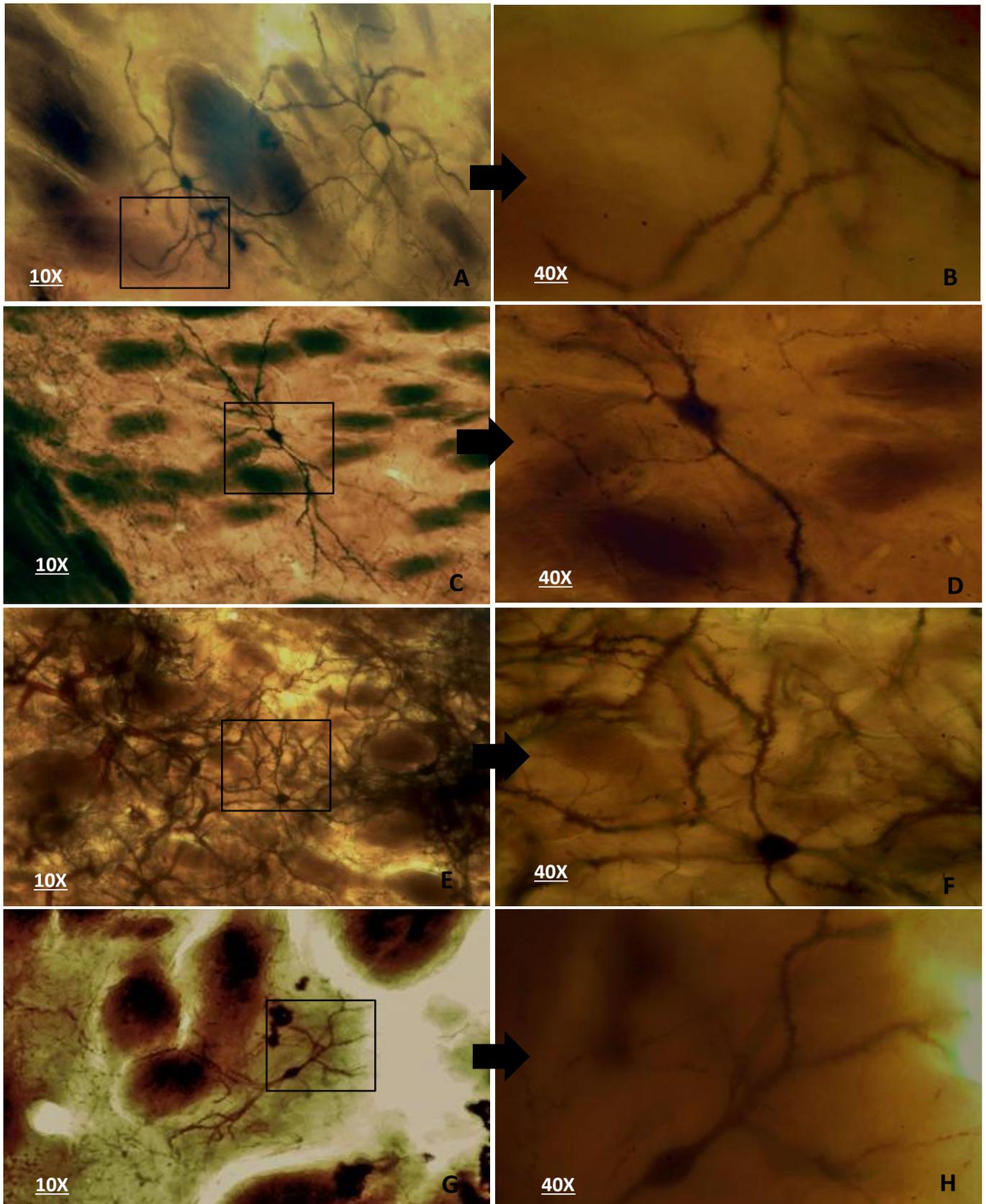


Figura 10.- Neuronas espinosas mediadas de animales control (A y B), Expuestos (C y D) L-DOPA (D y E) y animales Expuestos+L-DOPA (F y G): En las siguientes imágenes podemos observar cómo disminuye el número de espinas dendríticas cuando los animales son expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$, cuando se suministra L-DOPA posterior a las inhalaciones observamos un aumento significativo en la densidad del número de espinas (F) sin embargo, se observa cuando el tratamiento se coadministra con Mn disminuye de manera significativa la densidad del número de espinas dendríticas (H). (→) 40X.

Inmunohistoquímica TH

Se cuantificó el número de NDA en la SNc (Fig.11 y 12); observando pérdida del 75.59 % en el grupo expuesto con respecto al grupo control. El grupo L-DOPA presentó pérdida del 29.70%, sin embargo, la coadministración del fármaco y el Mn (Expuestos+L-DOPA), aumentó la muerte neuronal (57.2%) de manera significativa con respecto al grupo que detuvo las inhalaciones antes del tratamiento con L-DOPA (30%).

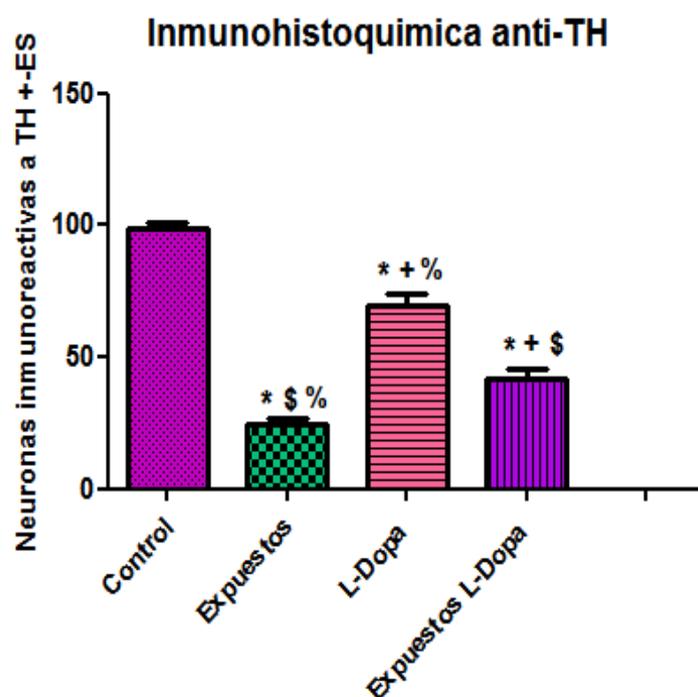


Figura 11.- Se observa el promedio de neuronas inmunoreactivas anti-TH en la SNc de los diferentes grupos; Control (98.64±2.5), Expuestos (24.81±1.8), Expuestos+L-DOPA (42.04±4.6) y L-DOPA (69.35±3.4), todos los grupos muestran diferencias significativas con respecto al grupo control y entre ellos. ANOVA con *post hoc* Tukey *** = $p < 0.001$. Donde * = $p < 0.001$ vs Control, += $p < 0.001$ vs Expuestos, \$ = $p < 0.001$ vs Expuestos+ L-DOPA y % = $p < 0.001$ vs L-DOPA.

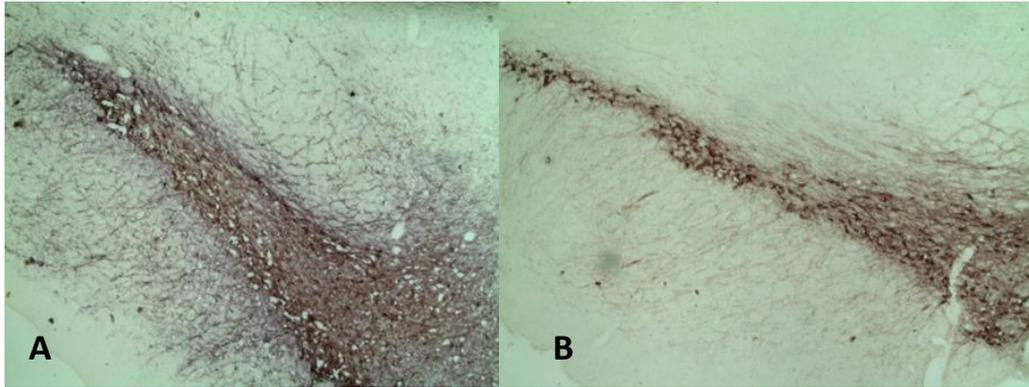


Figura 12.- Micrografías representativas en 40x de cortes de la SNc con inmunohistoquímica para TH, donde se observan las neuronas dopaminérgicas remanentes en los animales del grupo L-DOPA (A) y Expuestos+ L-DOPA (B).

Ultraestructura

En el análisis ultraestructural se utilizó tejido estriatal obtenido de los grupos control y expuestos + L-DOPA, se midió el diámetro de 50 botones sinápticos. En la figura 13 se observa aumento significativo en el diámetro de los botones sinápticos, de $1.1100 \pm 3 \mu\text{m}$ en el grupo expuestos+ L-DOPA con respecto a los valores promedio de $0.4753 \pm 3 \mu\text{m}$ del grupo control. La figura 14 nos muestra el neurópilo estriatal de animales del grupo control y el del grupo expuesto+L-DOPA, este último presenta un aumento de vacuolas y un aumento en el diámetro de los botones sinápticos.

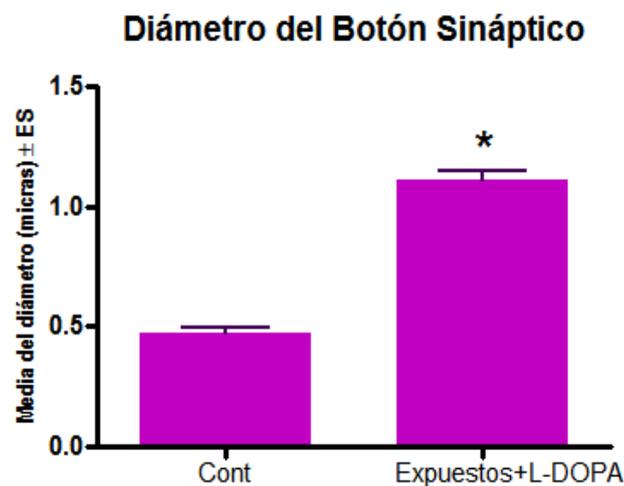


Figura 13.- Media del diámetro de los botones sinápticos, claramente el diámetro de los botones sinápticos de los animales Expuestos+L-DOPA tuvieron aumento significativo ($1.1100 \pm 3 \mu\text{m}$) con respecto al Control ($0.4753 \pm 3 \mu\text{m}$). Prueba de T ***= $p < 0.001$ vs grupo control.

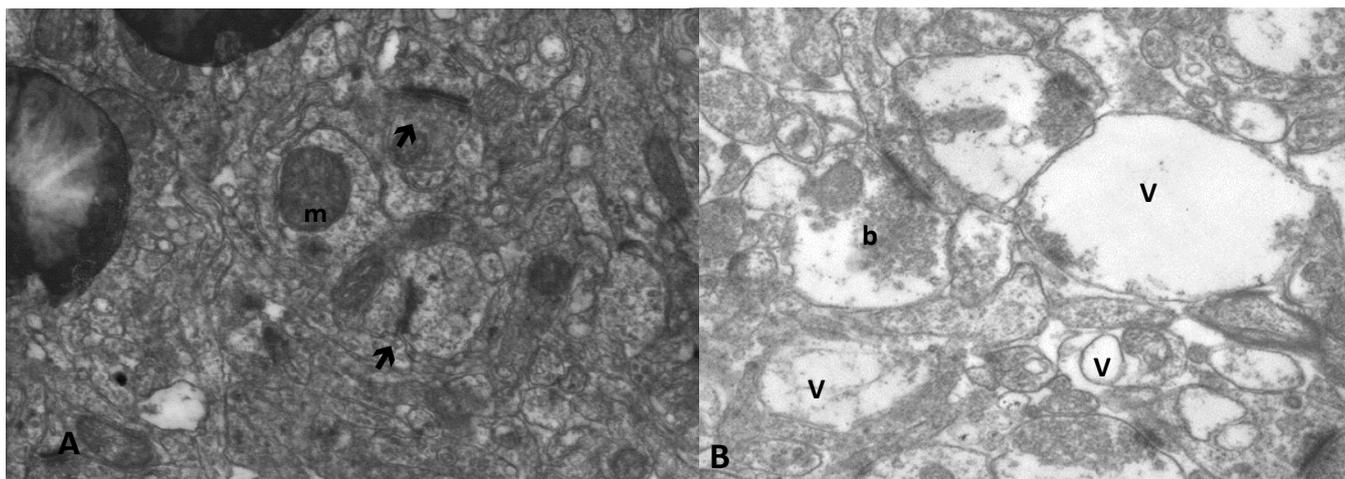


Figura 14.- Micrografías electrónicas de neuropilo estriatal, **A)** se observa el neuropilo de una animal perteneciente al grupo control donde se observan diversos contactos sinápticos (➔) y algunas mitocondrias (m) **B)** neuropilo perteneciente a un animal expuesto a las inhalaciones de Mn, se pueden observar, los botones sinápticos hinchados (b) y formación de vacuolas en el tejido (V).

El tipo de contacto sináptico nos orienta a saber si el contacto es excitatorio (conexión asimétrica con la cabeza de la espina) o dopaminérgico (conexión simétrica con el cuello de la espina). En nuestros resultados se observó aumento de los contactos sinápticos con la cabeza de la espina (9%) (Fig.16-B), en los animales expuestos+L-DOPA, mientras que, los contactos con el cuello de la espina (Fig.15-B) disminuyeron de manera significativa hasta un 70%. En la Fig.15-A podemos observar el botón sináptico haciendo contacto con el cuello de una espina dendrítica y en la Fig. 16-A se observa el contacto sináptico con la cabeza de la espina.

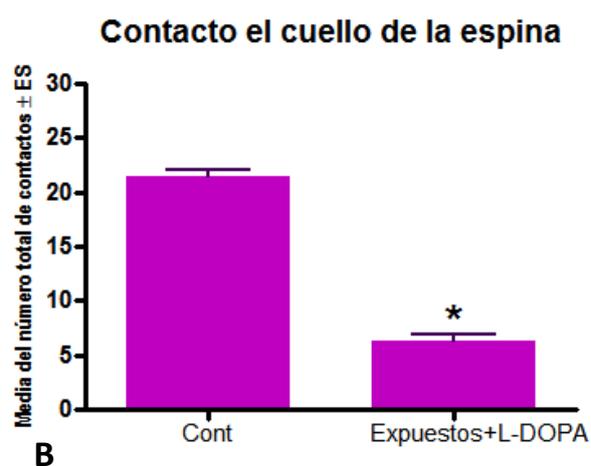
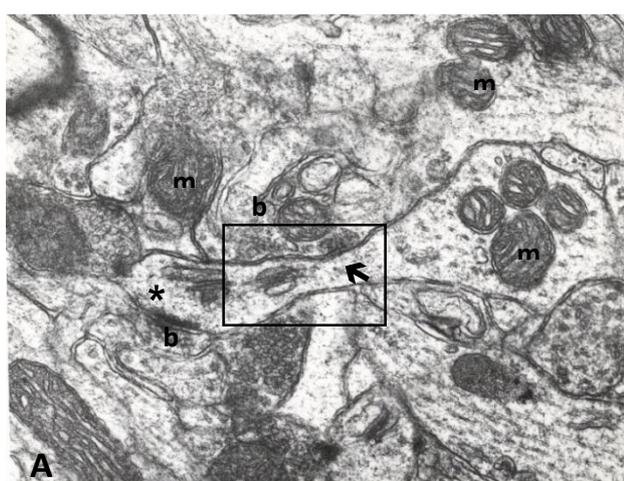


Figura 15.- **A)** Micrografía del NE donde se observa el contacto sináptico tanto con la cabeza de la espina (*) como con el cuello (➔) además se distinguen los botones sinápticos (b) y algunas mitocondrias (m). **B):** En el caso específico de los contactos con el cuello de la espina se vieron disminuidos en el grupo expuesto+L-DOPA donde la media fue de 6.3 ± 7 μ m botones a diferencia del grupo control, donde la media fue de 21.5 ± 7 botones. Prueba de T *** = $p < 0.001$ vs grupo control.

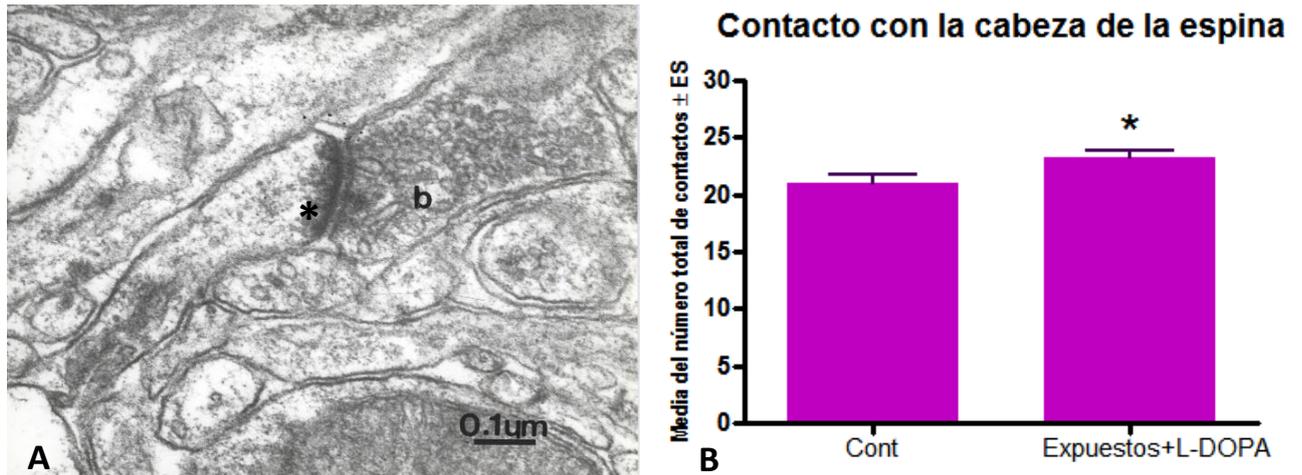


Figura 16.- **A:** Micrografía del NE donde se observa claramente el contacto sináptico con la cabeza de la espina dendrítica (*) además se distingue el botón sináptico (b). **B:** Media del número de contactos con la cabeza de la espina, se observa aumento significativo entre el grupo control y Expuestos+L-DOPA, teniendo una media de 21±1 y 23±1 botones respectivamente. Prueba de T *** = $p < 0.05$ vs grupo control.

También se analizó el número de sinapsis perforadas, en la Fig. 17 observamos la micrografía de un animal expuesto a la inhalación de la mezcla de Mn donde se aprecia la discontinuidad del contacto sináptico (Fig.17-A) y aumento significativo de sinapsis perforadas (50%) posterior a la inhalación de Mn y al tratamiento con L-DOPA, con respecto al grupo control (Fig.17-B).

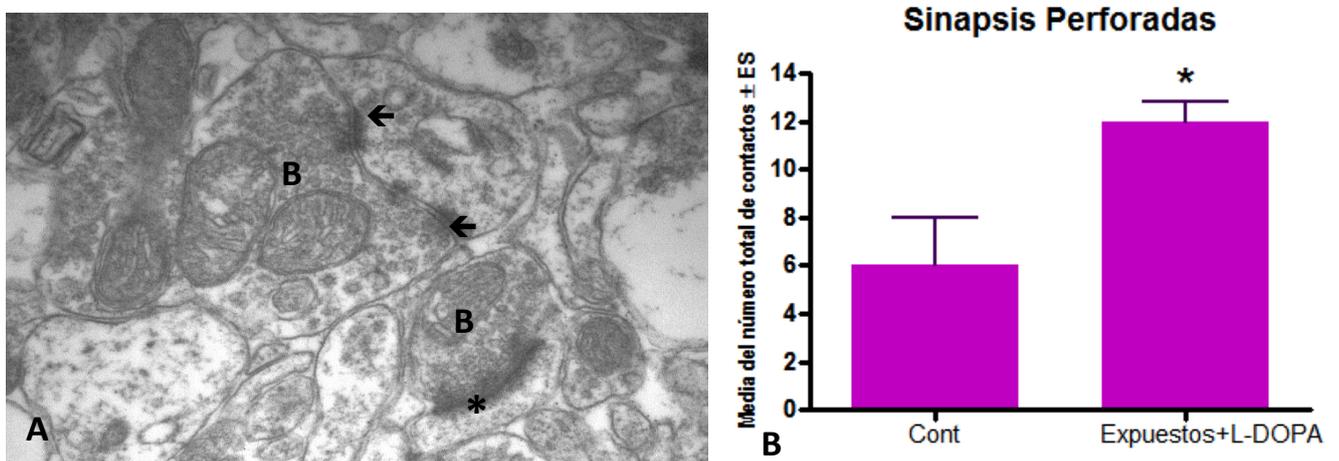


Figura 17.- **A:** Micrografía Electrónica donde se observan una sinapsis perforada (↔) en tejido estriatal de una rata expuesta a inhalación de la mezcla de Mn y tratada simultáneamente con L-DOPA; adicionalmente, se observa: el botón sináptico (B) y un contacto sináptico simple (*) **B:** Gráfica de la media del número de sinapsis perforadas en ratas expuestas+ L-DOPA (12±3) vs control (6±3). Prueba de T *** = $p < 0.001$ vs grupo control.

Discusión

La inhalación de la mezcla de cloruro $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ ha mostrado ser un modelo de estudio ideal de la EP, ya que actúa de manera lenta y progresiva, lo que permite estudiar los diferentes estadios de la enfermedad. El presente estudio reafirma estas aseveraciones mediante los resultados obtenidos en las pruebas motoras de viga de equilibrio (6 y 12mm) (Fig. 6 y 7) podemos observar que el deterioro motor se acentúa a medida que el número de inhalaciones aumenta, los animales incrementaron el tiempo de recorrido para lograr completar la prueba, estos resultados concuerdan con lo reportado por Ordoñez-Librado y cols. 2010 y Sánchez-Bentancourt y cols. 2012, quienes observaron que el tiempo total necesario para cruzar la viga de equilibrio de ratones y ratas expuestos a la mezcla de Mn aumentó de manera significativa a partir de la segunda semana de exposición y continuó aumentando hasta la administración del tratamiento con L-DOPA, el cual redujo las afecciones motoras en ambas especies.

La prueba motora “reaching task” resulta más sensible para evaluar alteraciones motoras sutiles y estrategias de enseñanza compensatoria que no pueden ser detectados por otras pruebas motoras (Biernaskie *et al.*, 2004), se utilizó para observar los movimientos en las extremidades y analizar la capacidad de las ratas para recuperar pellets así como la exactitud para sujetarlos y con ello se evaluó el posible daño en la coordinación motora.

Se observó que los animales expuestos a la mezcla de Mn aumentaron la cantidad de errores de manera significativa a partir de la semana nueve (Fig.8) y conforme prosiguen las inhalaciones aumenta la presencia de movimientos erráticos como la manera de sujetar los pellets, éstos eran arrastrados al interior de la caja de acrílico y, posteriormente sujetados directamente con el hocico, algunos de los animales también presentaron falta de interés por realizar la prueba; estos datos concuerdan con lo descrito en pacientes con la EP en un estudio realizado por Whishaw y colaboradores en 2002, donde mencionan que los enfermos de Parkinson presentan deficiencias motoras en una prueba similar a la de “reaching task”, como cambios de la postura, movimientos rígidos, conformación atenuada de los dígitos y lentitud para realizar la tarea, lo que sugiere cierta homología en las alteraciones motoras de los enfermos de

Parkinson y los animales sometidos a la inhalación de la mezcla de Mn, esto es apoyado por estudios que demuestran que la exposición constante a Mn induce alteraciones en la actividad motora espontánea asociadas a cambios en las concentraciones de DA, por lo cual genera alteraciones en las NDA (Bonilla, 1984; Cardozo y Bonilla 1985).

Por otro lado, el tratamiento con L-DOPA fue suministrado para mostrar el daño neuronal que la inhalación de la mezcla de Mn produce en la vía dopaminérgica, ya que la degeneración y muerte de las NDA está directamente asociada a la EP, la muerte neuronal conlleva a la disminución en las concentraciones de DA en el NE, principal sitio de acción del neurotransmisor (Florán y Rangel, 2005), al restaurar la DA mediante la administración de L-DOPA provoca la recuperación parcial de la funcionalidad del sistema.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con L-DOPA contribuyó a la mejoría casi inmediata de los sujetos experimentales llegando a niveles similares a los del grupo control, lo cual evidencia el daño neurotóxico específico de las NDA. Es importante destacar que el grupo que continuó inhalando mostró una mejoría tardía frente al tratamiento con L-DOPA con respecto al grupo que dejó de inhalar antes del tratamiento, esto puede deberse a la auto-oxidación de la L-DOPA la cual genera quinonas y ROS (Smith *et al.*, 1994), incrementando aún más la pre-existente condición de estrés oxidativo, Serra y colaboradores en el 2000 mencionan que la presencia del Mn estimula la autooxidación de la L-DOPA, reportando que la infusión intraestriatal de $MnCl_2$ aumenta la producción de Dopa-semiquinonas además de una marcada disminución de DA, también se ha demostrado que el Mn junto con la L-DOPA disminuye de manera significativa la viabilidad de las células PC12 induciendo apoptosis (Migheli *et al.*, 1999).

Número de espinas dendríticas

Actualmente se ha reportado que los cambios en el número de espinas dendríticas y su morfología están asociados con alteraciones a largo plazo en la eficacia de la transmisión excitatoria y la depleción dopaminérgica (Day *et al.*, 2006; Deutch *et al.*, 2007). En la EP existe disminución en la densidad de espinas dendríticas de entre 20 a 30% en NEM del NE (Zaja-Milatovic *et al.*, 2005 Stephens *et al.*, 2005), así mismo en algunos modelos experimentales como el

de MPTP (en primates no humanos) y el modelo de 6-OHDA, se ha reportado que existe relación entre la degeneración nigral y la disminución del número de espinas dendríticas al menos en un 50% en NEM del NE (Ingham *et al.*, 1993; Ingham *et al.*, 1998; Solis *et al.*, 2007; Villalba *et al.*, 2009).

Del mismo modo, en el presente estudio se observó pérdida significativa de espinas dendríticas después de la exposición a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ (Fig.9), cabe destacar que el grupo que fue expuesto a la mezcla de Mn y tratado simultáneamente con L-DOPA mostró mayor pérdida de espinas dendríticas (Fig.10).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Madison y cols. en 2011, quienes expusieron ratones a $MnCl_2$, observando disminución de espinas dendríticas en las NEM estriatales. La alteración dopaminérgica causada por el Mn tiende a desencadenar cambios en la estructura de las NEM, debido a que existe una estrecha relación entre la disminución de DA y la pérdida de espinas dendríticas, la denervación de DA en el sistema nigroestriatal tiene como consecuencia alteraciones en los receptores D_2 encargados de inhibir la liberación de Glu aumentando la excitotoxicidad, por otro lado, el aumento en la permeabilidad del Ca^{2+} generado por el Glu, también puede generar cambios en la estructura dendrítica (Deutch, *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009).

Son muchos los mecanismos que están implicados en la pérdida de espinas dendríticas en las NEM, no obstante la disminución de DA, el aumento del Ca^{2+} intracelular y el Glu juegan un papel fundamental en este proceso tanto en la EP como en la intoxicación por Mn (Coyle y Puttfarcken, 1993; Segal, 1995; Stephens *et al.*, 2005; Deutch, *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009; Madison *et al.*, 2011; Madison *et al.*, 2012; Herms y Dorostkar, 2016).

Inmunohistoquímica anti-TH

La pérdida de NDA en la SNc es el rasgo histopatológico más representativo de la EP, debido a que los primeros síntomas de la enfermedad comienzan a presentarse cuando la pérdida neuronal alcanza aproximadamente un 60% en la SNc y la depleción dopaminérgica en el NE es de hasta el 80% (Dauer y Przedborski, 2003; Fhan, 2003).

Por ello, los modelos experimentales de la EP tienen como prioridad recrear este aspecto; el modelo de inhalación de la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$ ha mostrado disminuir hasta un 67.58% el número de neuronas inmunopositivas a TH en ratones y 75.95% en ratas en la SNc (Ordoñez-Librado *et al.*, 2010; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2012), lo que concuerda con los datos obtenidos en el presente estudio, donde se observó pérdida neuronal del 75.59% en los animales expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$; por otro lado, el tratamiento con L-DOPA posterior a las inhalaciones de Mn, mostró menor pérdida neuronal ya que se reportó disminución del 29.70 % de NDA en la SNc.

Sin embargo, el grupo que continuó inhalando de manera simultánea al tratamiento con L-DOPA presentó mayor pérdida de NDA (57.39%) con respecto al grupo que dejó de inhalar (Fig. 11 y 12), este cambio en la supervivencia neuronal también ha sido observado por otros autores quienes reportan disminución en la supervivencia neuronal cuando el Mn y la L-DOPA se administran conjuntamente, proponiendo que el Mn interactúa de manera negativa con la L-DOPA propiciando aumento en la neurotoxicidad, disminución en la concentración de DA estriatal y de sus metabolitos secundarios (Parenti *et al.*, 1986; Parenti *et al.*, 1988; Prabhakaran *et al.*, 2008).

Análisis ultraestructural

En nuestros resultados uno de los cambios ultraestructurales más evidentes fue el aumento del diámetro de los botones sinápticos del NE en las ratas expuestas a $MnCl_2/Mn(OAc)_3 + L-DOPA$ (Fig.13), además se observó aumento de vacuolas en el neuropilo (Fig.14), estos resultados coinciden con lo reportado por Colín-Barenque y colaboradores en el 2000, quienes analizaron cerebros de personas con EP y observaron que las neuronas estriatales mostraban núcleos distorsionados, axones degenerados y claro aumento en el diámetro de los botones sinápticos; por otro lado, con el modelo de 6-OHDA también se presenta aumento de los botones sinápticos y presencia de sinapsis perforadas (Ingham *et al.*, 1991; Ingham *et al.*, 1993).

Las sinapsis perforadas se refieren a contactos sinápticos que dan la apariencia de ser más de un contacto (Calverley y Jones, 1990), pero realmente es la ruptura de la zona activa; se ha demostrado que las sinapsis perforadas están

asociadas al posible potenciamiento de la actividad sináptica, (Geinisman *et al.*, 1991; Greenough y DeVoogd, 1978). Sin embargo, Avila-Costa y colaboradores en 2008, mencionan que podría tratarse de un mecanismo de plasticidad neuronal negativo; ya que este tipo de sinapsis puede inducir el aumento en la transmisión Glutamatérgica y desencadenar muerte neuronal por excitotoxicidad.

Esto es congruente con lo observado en la EP y la lesión con 6-OHDA donde el aumento de sinapsis perforadas es proporcional al incremento de sinapsis glutamatérgicas, posiblemente asociadas a este mismo proceso (Anglade *et al.*, 1996; Meshul *et al.*, 1999; Colin-Barenque *et al.*, 2000; Avila-Costa *et al.*, 2005).

Anaya y colaboradores en 2014 proponen que, la reducción de la transmisión dopaminérgica nigroestriatal que se produce con el modelo de 6-OHDA da como resultado aumento en la transmisión sináptica córtico-estriatal mediada por Glu. Debido a que los receptores D₂ localizados en las terminales de las neuronas corticales regulan la liberación de Glu, la depleción de DA en este núcleo propiciaría la liberación excesiva de Glu de las neuronas de la corteza cerebral propiciando aumento en la excitotoxicidad (Calabresi *et al.*, 2001).

Así mismo en el modelo de inhalación de la mezcla de Mn, se observa aumento significativo en el número de sinapsis perforadas en el NE (Fig. 17), el Glu también podría estar implicado en este proceso, ya que existen reportes donde se menciona que los astrocitos tienen alta afinidad por el Mn, lo que provoca disminución en la captura del Glu propiciando de esta manera la sobreestimulación glutamatérgica (Hazell, 2002; Fitsanakis *et al.*, 2006).

Es importante mencionar que los contactos sinápticos en el NE pueden presentarse en diferentes puntos de la espina dendrítica; se ha propuesto que las conexiones que se dan en la cabeza de la espina suelen ser preferentemente asimétricas y excitatorias (Freund *et al.*, 1984; Freund *et al.*, 1985); por el contrario, las conexiones con el cuello de la espina son generalmente sinapsis simétricas y TH-positivas lo cual sugiere que estas conexiones son de origen dopaminérgico (Freund *et al.*, 1984; Freund *et al.*, 1985; Ingham *et al.*, 1998). Esto es consistente con los datos obtenidos en el presente estudio, donde se observó que los animales expuestos+ L-DOPA, presentaron disminución en los

contactos sinápticos con el cuello de la espina dendrítica (Fig.15), indicando pérdida de conexiones dopaminérgicas y aumento significativo de sinapsis excitatorias evidenciado por el aumento de conexiones sinápticas con la cabeza de las espinas (Fig.16).

Estos resultados son equivalentes con los datos obtenidos por Ordoñez-Librado en el 2012 quien reportó aumento de contactos sinápticos con la cabeza de las espinas dendríticas en ratones expuestos a la mezcla de $MnCl_2/Mn(OAc)_3$, así como aumento en el tamaño de los botones sinápticos y de vacuolas en el neuropilo, además de mayor presencia de sinapsis perforadas. Datos similares han sido observados en otros modelos de la EP, por ejemplo, en la lesión con 6-OHDA se observa disminución en las sinapsis simétricas y un aumento de las sinapsis asimétricas, además de la presencia de sinapsis perforadas en el NE (Ingham y cols, 1998; Meshul *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos con el modelo de inhalación de la mezcla de compuestos de Mn, podemos inferir que, al igual que el modelo con 6-OHDA y la EP, el Mn afecta de manera significativa el flujo dopaminérgico en la vía nigroestriatal, generando todas las alteraciones motoras características de la EP, además de coincidir con los daños morfológicos y estructurales de la enfermedad, pero con la ventaja de que es un modelo no invasivo, bilateral y que se desarrolla paulatinamente como sucede en la enfermedad en humanos.

Neurotoxicidad de la L-DOPA

El medicamento más utilizado hasta el día de hoy con mejores resultados sintomáticos demostrados en la EP es la L-DOPA, sin embargo, se ha reportado que el tratamiento a largo plazo con este fármaco provoca neurotoxicidad, misma que es atribuida a la generación de semiquinonas y quinonas producidas por la autooxidación de la L-DOPA (Asanuma *et al.*, 2003).

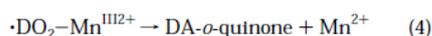
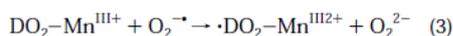
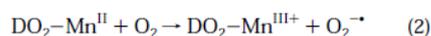
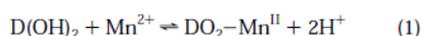
La DA es catabolizada por la monoamino-oxidasa (MAO) o mediante autooxidación no enzimática para producir ROS. La autooxidación espontánea de la DA y L-DOPA genera DA semiquinona y DOPA quinona, moléculas específicas de NDA altamente citotóxicas; durante este proceso se producen

ROS como H₂O₂ el cual reacciona con algunos metales de transición como Fe²⁺ y Mn induciendo más muerte neuronal (Agid, 1991; Coyle y Puttfarcken, 1993; Asanuma *et al.*, 2003; Hauser y Hastings, 2013). Por lo tanto, es probable que la L-DOPA, al aumentar los niveles intraneuronales de DA, mejore la formación de materiales citotóxicos a partir de la oxidación DA activada por Mn (Parenti *et al.*, 1986).

En el presente trabajo observamos que, cuando la L-DOPA se administra conjuntamente con la mezcla de Mn disminuye su eficacia, esto también se ha observado en estudios *in vitro*, donde la administración conjunta de L-DOPA y MnCl₂ provoca aumento de muerte en cultivos celulares (Migheli *et al.*, 1999; Prabhakaran *et al.*, 2008). Por otro lado, Parenti y colaboradores en 1986 reportan que la neurotoxicidad del Mn es incrementada en presencia de L-DOPA.

Nuestros resultados muestran que cuando la L-DOPA se administraba al interrumpir las inhalaciones de Mn actuaba de manera positiva mejorando los aspectos motores y estructurales, sin embargo, cuando la mezcla de Mn y la L-DOPA se coadministran se presentó aumento de muerte neuronal, esto puede ser atribuido a que se produce una relación sinérgica entre la L-DOPA y la mezcla de Mn, donde los subproductos originados por la autooxidación de la L-DOPA, en especial el H₂O₂ reacciona con algunos metales de transición, en este caso con el Mn, de esta manera produce OH• y aumenta la concentración de radicales libres (Asanuma *et al.*, 2003). Por otro lado, Shen y Dryhurst, en 1998, mencionan que el Mn cataliza la autooxidación de DA directamente a DA-*o*-quinona, proponiendo el siguiente mecanismo Fig.-18:

DA following the pathway shown in eqs 1-4



overall

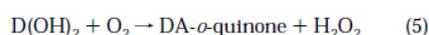


Figura 18.-Donde D(OH)₂= DA, DO₂ = DA semiquinona y DO₂- Mn= DA-Complejo de manganeso. La autooxidación catalizada por Mn de DA implica Ciclo redox de Mn²⁺ y Mn³⁺ en una reacción que genera H₂O₂ y DA-*o*-quinona (Shen y Dryhurst, 1998).

Con esto podemos asumir que ambos compuestos interactúan entre sí formando esta relación sinérgica, donde la DA (L-Dopa) propicia la reducción del Mn^{2+} a Mn^{3+} que como ya mencionamos es más neurotóxico y éste a su vez cataliza la autooxidación de la DA generando DA-quinonas y H_2O_2 , este último interactúa con el Mn^{3+} circundante iniciando el ciclo nuevamente.

Conclusión

- El modelo de inhalación de la mezcla de cloruro y acetato de Mn implementado en el laboratorio de Neuromorfología de la FES Iztacala provoca la progresión lenta en el desarrollo de las alteraciones conductuales y neurológicas características de la EP.
- El tratamiento con L-DOPA tiene un efecto positivo cuando la administración es posterior a la exposición de Mn, en este caso el tratamiento reduce las alteraciones motoras producidas por la inhalación de Mn de manera casi inmediata como ocurre con la EP.
- Cuando el tratamiento con L-DOPA es administrado de manera simultánea a la exposición de Mn, se observa disminución en la habilidad para emitir respuesta motora tanto en la viga de equilibrio como en el “reaching task”, por otro lado, la pérdida neuronal y la disminución en el número de espinas dendríticas se ven aumentadas. Lo que podría indicar que la L-DOPA potencia el daño provocado por el Mn.

Literatura Citada

- Agid Y. 1991. Parkinson's disease: pathophysiology. *The Lancet*; 337:1321-1324.
- Alaimo A. 2012. Neurotoxicidad inducida por manganeso. Vías de muerte apoptóticas y rol de la dinámica mitocondrial. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 211 pp.
- Alarcón AA, Abel SA, Mina KF. 2010. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*; 29: 92-100 pp.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*; 12: 366-375.
- Ali SF, Duhart MH, Newport DG, Lipe GW, Slikker W. 1995. Manganese-induced reactive oxygen species: Comparison between Mn^{+2} and Mn^{+3} . *Neurodegeneration*; 4: 329-334.
- Anaya-Martnez V, Gutierrez AL, Avila-Costa MR. 2012. Cambios citológicos inducidos por tratamientos dopaminérgicos. Editorial Academia Española. 72 pg.
- Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Montiel-Flores E, Sánchez-Betancourt J, Reynoso-Erazo L, Tron-Alvarez R, Avila-Costa MR. 2014. The presence of perforated synapses in the striatum after dopamine depletion, is this a sign of maladaptive brain plasticity?. *Microscopy*; 63:427-35.
- Anglade P, Mouatt-Prigent A, Agid, Hirsch EC. 1996. Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *Neurodegeneration*; 5: 121-128.
- Archibald FS, Tyree C. 1987. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch Biochem Biophys*; 256:638-650.
- Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. 2003. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2003; 5:165-76.
- Aschner M, Aschner JL. 1990. Manganese transport across the blood-brain barrier: relationship to iron homeostasis. *Brain Res Bull*; 24: 857-860.
- Aschner M, Gannon M. 1994. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res Bull*; 33:345-9.
- Aschner M, Erikson KM, Dorman DC. 2005. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol*; 35:1-32.
- Avila-Costa MR, Colín-Barenque L, Aley-Medina P, Gutiérrez VAL, Ordoñez-Librado JL, Flores ME, Fortoul TI. 2005. Bilateral increase of perforated synapses after unilateral dopamine depletion. *Int J Neurosci*. 115:79-86.

Avila-Costa MR, Fortoul TI, Niño-Cabrera G, Colín-Barenque L, Bizarro-Nevarés P, Gutiérrez-Valdez AL, Ordóñez-Librado JL, Rodríguez-Lara V, Mussali-Galante P, Díaz-Bech P, Anaya-Martínez V. 2006. Hippocampal cell alterations induced by the inhalation of vanadium pentoxide (V(2)O(5)) promote memory deterioration. *Neurotoxicol*; 27:1007-12.

Avila-Costa MR, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Anaya-Martínez V, Colin- Barenque L, Vázquez MCS, Reynoso-Erazo L. 2008. The presence of perforated synapses in the striatum after dopamine depletion. is this a sign of negative brain plasticity? En: Kaiser T.F. y Peters F.J. *Synaptic Plasticity: New Research*. Nova Publisher, New York U.S.A: 113-142.

Avila-Costa M, Gutierrez-Valdez A, Ordoñez-Librado J, Martinez V, Colin-Barenque L, Espinosa-Villanueva J, Aley-Medina P, Montiel-Flores E, Velazquez-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*; 30:1068-74.

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

Bast-Pettersen R, Ellingsen DG, Hetland SM, Thomassen Y. 2004. Neuropsychological function in manganese alloy plant workers. *Int Arch Occup Environ Health*; 77: 277–287.

Beal MF. 2003. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci*; 991: 120–131.

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

Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B, Gross CE. 1997. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. *Brain Res*; 766:107-12.

Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. 2004. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci*; 24:1245–1254.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ*; 5:9-19.

Bonilla E. 1984. Chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats. *Exp Neurol*; 84: 696-700.

Bonilla, E. 1986. Intoxicación Crónica con manganeso. *Avances recientes. Rev Invest clín*; 27: 49-64 pp.

Boveris A, Navarro A. 2008. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*; 60: 308–314.

- Brouillet EP, Shinobu L, McGarvey U, Hochberg, Beal MF. 1993. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp Neurol*; 120: 86-94.
- Calabresi P, Ammassari M, Gubellini P, Sancesario G, Morello M, Centonze D, Marfia G, Saulle E, Passino E, Picconi B, Bernardi G. 2001. A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication. *Neurobiol Dis*; 8: 419–432.
- Calverley RK, Jones DG. 1987. A serial-section study of perforated synapses in rat neocortex. *Cell Tissue Res*; 247: 565–572.
- Calverley RKS, Jones DG. 1990. Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity. *Brain Res Rev*; 15: 215-249.
- Cantello R, Gianelli M, Civardi C, Mutani R. 1995. Parkinson's disease rigidity EMG in a small hand muscle at rest. Electromyography and motor control-electroencephalography and clinical. *Neurophysiol*; 97: 215-222.
- Cardozo J, Bonilla E. 1985. The neuropathology of experimental chronic manganese poisoning in rats. A preliminary report. *Invest Clín*. 26:117-124.
- Chang JY, Lui LZ. 1999. Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Mol Brain Res*; 68: 22-28.
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK. 1996. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*; 16: 276-84.
- Colín-Barenque L, Avila-Costa MR, Espinosa-Villanueva J, Machado-Salas J. 2000. Análisis Ultraestructural Comparativo en Pacientes con Enfermedad de Parkinson y Ratas Viejas. *Arch de Neuroci*; 5:168-173.
- Coyle JT, Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*; 262: 689-95.
- Crossgrove JS, Allen DD, Bukaveckas BL, Rhineheimer SS, Yokel RA. Manganese distribution across the blood–brainbarrier I. 2003. Evidence for carrier-mediated influx of manganese citrate as well as manganese and manganese transferrin. *Neuro-Tox*; 24:3–13.
- Crossgrove J, Yokel RA. 2004. Manganese distribution across the blood–brain barrier III the divalent metal transporter-1 is not the major mechanism mediating brain manganese uptake. *Neurotoxicology*; 25: 451–460.
- Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*; 39: 889-909.
- Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham CA, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier

DJ. 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nat Neurosci*; 9:251-9.

Deutch A, Colbran R, Winder D. 2007. Striatal plasticity and medium spiny neuron dendritic remodeling Parkinsonism. *Parkinsonism and Relat Disord*; 13: S251–S258.

Dhillon AS, Tarbutton GL, Levin JL, Plotkin GM, Lowry LK, Nalbone JT, Shepherd S. 2008. Pesticide/environmental exposures and Parkinson's disease in east Texas. *J Agromedicine*; 13: 37-48.

Dobson AW, Erikson KM, Aschner M. 2004. Manganese Neurotoxicity. *Ann N.Y. Acad Sci*; 1012: 115-128.

Dong XX, Wang Y, Qin ZH. 2009. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 30:379-87.

Dorman DC, McManus BE, Parkinson CU, Manuel CA, McElveen AM, Everitt JL. 2004. Nasal toxicity of manganese sulfate and manganese phosphate in young male rats following subchronic (13-week) inhalation exposure. *Inhal Toxicol*; 16: 481-8.

Drukarch B, van Muiswinkel FL. 2000. Drug treatment of Parkinson's disease. Time for phase II. *Biochem Pharmacol*; 59:1023-31.

Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. 1996. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*; 48:1-19.

Erikson KM, Aschner M. 2003. Manganese neurotoxicity and glutamate GABA interaction. *Neurochem Int*; 43: 475–480.

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

Fahn S. 2003. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann N Y Acad Sci*; 991:1-14.

Fhan S, Coenen G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Annals of Neurol*; 32: 804–812.

Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, Da Cunha C. 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods*; 148: 78-87.

Fechter LD, Johnson DL, Lynch RA. 2002. The relationship of particle size to olfactory nerve uptake of a non-soluble form of manganese into brain. *Neurotoxicology*; 23:177-83.

- Filipov NM, Seegal RF, Lawrence DA. 2005. Manganese potentiates in vitro production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicol Sci*; 84: 139–148.
- Finley JW, Davis CD. 1999. Manganese deficiency and toxicity: are high or low dietary amounts of manganese cause for concern?. *Biofactors*; 10:15-24.
- Fitsanakis VA, Au C, Erikson KM, Aschner M. 2006. The effects of manganese on glutamate, dopamine and gamma-aminobutyric acid regulation. *Neurochem Int*; 48: 426–433.
- Florán G, Rangel B. 2005. Activación de receptores dopaminérgicos por L-DOPA. De la acción terapéutica a las discinesias. *Rev Biomed*; 16: 273-280.
- Freund TF, Powell JF, Smith AD. 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci*; 13:1189-215.
- Freund TF, Bolam JP, Bjorklund A, Stenevi U, Dunnett SB, Powell JF, Smith AD 1985. Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: A tyrosine hydroxylase Immunocytochemical study. *Neurosci*; 5: 603-616.
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. 2002. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem*; 81:1285-97.
- García SJ, Gellein K, Syversen T, Aschner M. 2006. A manganese-enhanced diet alters brain metals and transporters in the developing rat. *Toxicol sci*; 92: 516–525.
- García FB, Pedraza C, Tornero D, Navarro JF. 2006. Dopamina y neurotoxicidad. *Psiquiatr Biol*; 13:14-21.
- Geinisman YL, Toledo-Morrell L, Morrell F. 1991. Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res*; 566: 77–88.
- Gómez-Chavarín M, Díaz-Pérez R, Morales-Espinosa R, Fernández-Ruiz J, Roldán-Roldán G, Torner C. 2013. Efecto de la exposición al pesticida rotenona sobre el desarrollo del sistema dopaminérgico nigro-estriatal en ratas. *Salud Mental*; 36:1-8.
- González-Torres LC, Armendáriz-Borunda J. 2005. Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocienc*; 10: 168-169.
- Greenough WT, De Voogd TJ. 1978. Subsynaptic plate perforations: Changes with age and experience in the rat. *Science*; 202: 1096–1098.

- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE. 1999. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soci Sympo*; 66:85-97.
- Halliwell B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Neurochem*; 59:1609-23.
- Hanrott K, Gudmunsen L, O'Neill MJ, Wonnacott S. 2006. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem*; 281:5373-82. Epub 2005 Dec 16.
- Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira HV. 1994. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in pc12 cells: relevance to Parkinson's disease. *Neurochem*; 63: -90.
- Hatcher JM, Pennell KD, Miller GW. 2008. Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. *Trends Pharmacol Sci*; 29:322-9.
- Hauser DN, Hastings TG. 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic Parkinsonism. *Neurobiol Dis*; 51:35-42.
- Hazell AS. 2002. Astrocytes and manganese neurotoxicity. *Neurochem Int*; 41: 271-277.
- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. 1984. Dopaminergic neurotoxicity of 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 5, 6-Tetrahydropyridine in mice. *Science*; 224:1451-3.
- Henriksson J, Tallkvist J, Tjälve H. 1999. Transport of manganese via the olfactory pathway in rats: dosage dependency of the uptake and subcellular distribution of the metal in the olfactory epithelium and the brain. *Toxicol Appl Pharmacol*; 156:119-28.
- Herms J, Dorostkar MM. 2016. Dendritic spine pathology in Neurodegenerative diseases. *Rev. Pathol; Mech Dis*; 11:221-50.
- Herrero MT, Barcia C y Navarro JM. 2002. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst*; 18:386-404.
- Hoehn MM, Yahr MD. 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurol*; 17:427-442.
- Huang CC1, Chu NS, Lu CS, Wang JD, Tsai JL, Tzeng JL, Wolters EC, Calne DB. 1989. Chronic manganese intoxication. *Arch Neurol*; 46:1104-6.
- Ingham CA, Hood SH y Arbuthnott GW. 1991. A light and electron microscopical study of enkephalin-immunoreactive structures in the rat neostriatum after removal of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Neuroscience*; 42: 715-730.
- Ingham CA, Hood SH, Van Maldegem B, Weenink A y Arbuthnott GW. 1993. Morphological changes in the rat neostriatum after unilateral 6-hydroxydopamine injections into the nigrostriatal pathway. *Exp Brain Res*; 93:17-27.

Ingham CA, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott G.W. 1998 Plasticity of synapses in the rat neostriatum after unilateral lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Neurosci*; 18: 4732–4743.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. De limitación de las zonas metropolitanas de México 2005. INEGI.México, 2007.

Jakel RJ, Kern JT, Johnson DA, Johnson JA. 2005. Induction of the protective antioxidant response element pathway by 6-hydroxydopamine in vivo and in vitro. *Toxicol Sci*; 87: 176-186.

Jankovic J. 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 79:368-376.

Jenner P, Olanow CW.1996. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol*; 6:S161-70.

Jenner P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*; 53:S26-S38.

Juri CC, Chaná CP.2006. Levodopa for Parkinson's disease: What have we learned? *Rev Med Chil*; 13:893-901.

Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-Hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol*; 152: 259–277.

Knott C, Stern G, Wilkin GP. 2000. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, Lipocortin-1, and Cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*; 16: 724–739.

Koller WC. 1984. The diagnosis of Parkinson's disease. *Arch Intern Med*; 144:2146–2147.

Koller WC, Lyons KE, Truly W. 2004. Effect of levodopa treatment for parkinsonism in welders. *Neurol*; 62:730–3.

Kordowel JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY, Chu Y, Leventhal L, McBride J, Chen EY, Palfi S, Roitberg BZ, Taylor MD, Carvey P, Ling Z, Trono D, Hantraye P, Déglon N, Aebischer P. 2000. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science*; 290:767-73.

Kreitzer AV, Malenka RC. 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*; 60: 543-54.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*; 219:979-80.

Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. 1984. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6 tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res*; 292:390-4.

Latchoumycandane C, Anantharam V, Kitazawa M, Yang Y, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. 2005. Protein kinase c delta is a key downstream mediator of manganese-induced apoptosis in dopaminergic neuronal cells. *Pharmacol Exp Ther*; 313:46-55.

Le W, Rowe D, Xier W, Ortiz, He Y, Appel SH. 2001. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *Neurosci*; 21:8447-8455.

Lin MT, Beal MF. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*; 443 787-795.

Liu B, Hong JS. 2003. Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: Mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *Pharmacol Exp Ther*; 304:1-7.

Lucchini RG, Martin CJ, Doney BC. 2009. From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. *Neuromolecular Med*; 1:311-21.

Madison JL, Wegrzynowicz M, Aschner M, Bowman AB. 2011. Gender and manganese exposure interactions on mouse striatal neuron morphology. *Neurotoxicology*; 32:896-906.

Madison JL, Wegrzynowicz M, Aschner M y Bowman AB. 2012. Disease-toxicant interactions in manganese exposed huntington disease mice: early changes in striatal neuron morphology and dopamine metabolism. *PLoS ONE*; 7: 1-12.

McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. 2002. Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide Paraquat. *Neurobiol*; 10:119-27.

Mena I, Court J, Fuenzalida S, Papavasiliou PS, Cotzias GC. 1970. Modification of chronic manganese poisoning. Treatment with L-dopa or 5-OH tryptophane. *N Engl J Med*; 282:5-10.

Meshul CK, Emre N, Nakamura CM, Allen C, Donohue MK, Buckman JF. 1999. Timedependent changes in striatal glutamate synapses following a 6-hydroxydopamine lesion. *Neurosci*; 88:1-16.

Metz GA, Farr T, Ballermann M, Whishaw IQ. 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. *Eur Neurosci*; 14:27-37.

- Migheli R, Godani C, Sciola L, Delogu MR, Serra PA, Zangani D, Natale DE, Miele GE, Desole MS. 1999. Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *Neurochem*; 73: 1155 -1163.
- Mink JW. 1996. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol*; 50:381-425.
- Moore DJ, West AB, Dawson VL y Dawson TM. 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci*; 28: 57-87.
- Morris M, Iansek R, Smithson F, Huxham F. 2000. Postural instability in Parkinson's disease: a comparison with and without a concurrent task. *Gait Posture*; 12: 205-216.
- Mounayar S, Boulet S, Tandé D, Jan C, Pessiglione M, Hirsch EC, Féger J, Savasta M, François C, Tremblay L. 2007. A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain*; 130:2898-914.
- Muñiz LEC. 2015. *Neurología Clínica. Editorial El manual moderno. Bogotá, Colombia. 645pp.*
- Nieuwenhuys R, Voogd J, Van Huijzen C. 2009, *Sistema nervioso central humano. Editorial medica panamericana. Madrid, España. 961 pp.*
- Olanow CW, Good PF, Shinotoh H, Hewitt KA, Vingerhoets F, Snow BJ, Beal MF, Calne DB, Perl DP. 1996. Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurol*; 46:492-498.
- Ordoñez-Librado JL, Gutierrez-Valdez A, Colín-Barenque L, Anaya-Martínez V, Díaz-Bech P, Avila-Costa MR. 2008. Inhalation of divalent and trivalent manganese mixture induces a Parkinson's disease model: Immunocytochemical and behavioral evidences. *Neurosci*; 155: 7-16 pp.
- Ordoñez-Librado JL. 2012. *Caracterización de un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson por inhalación de manganeso: aspectos bioquímicos morfológicos y conductuales (Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias). Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México.*
- Ordoñez - Librado JL, Anaya - Martínez V, Gutierrez - Valdeza AL, Montiel - Flores E, Reyes Corona D, Martinez - Fong D, Avila - Costa MR. 2010. L - DOPA treatment reverses the motor alterations induced by manganese exposure as a Parkinson disease experimental model. *Neurosci Lett*; 471: 79 – 82
- Parent A. 1990. Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci*; 13: 254-258.
- Parent A, Côté PY, Lavoie B. 1995. Chemical anatomy of primate basal ganglia. *Prog Neurobiol*; 46:131-97.

- Parenti M, Flauto C, Parati E, Vescovi A, Groppetti A. 1986. Manganese neurotoxicity: Effects of L-DOPA and pargyline treatments. *Brain Res*; 5:8-13.
- Parenti M, Rusconi L, Cappabianca V, Parati EA, Groppetti A. 1988. Role of dopamine in manganese neurotoxicity. *Brain Res*; 473: 236- 240.
- Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL. 1992. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull*; 29:699-701.
- Prabhakaran K, Ghosh D, Chapman GD, Gunasekar PG. 2008. Molecular mechanism of manganese exposure-induced dopaminergic toxicity. *Brain Res Bull*; 76:361-7.
- Reaney SH, Bench G, Smith DR. 2006. Brain accumulation and toxicity of Mn (II) and Mn(III) exposures. *Toxicol. Sci*; 93: 114-124.
- Repetto J, Repetto G. 2009. *Toxicología fundamental*. Editorial Díaz de santos. 620 pp.
- Rodier J. 1995. Manganese poisoning in moroccan miners. *J industr Med*; 12: 21.
- Rodríguez-Violante, Villar-Velarde A, Valencia-Ramos C, Cervantes-Arriaga A. 2011. Características epidemiológicas de pacientes con enfermedad de Parkinson de un hospital de referencian en México *Arch Neuroci*; 16: 64-68.
- Rosenstock HA, Simons DG, Meyer JS. 1971. Chronic manganese neurologic and laboratory studies during treatment with Levodopa. *JAMA*; 217:1354-1358.
- Sánchez-Betancourt J, Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Montiel-Flores E, Espinosa-Villanueva J, Reynoso-Erazo L, Avila-Costa MR. 2012 Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neurotoxicology*; 33:1346-55
- Scorticati M, Micheli F. 2006. *Enfermedad del Parkinson y trastornos relacionados*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 669 pp.
- Segal M. 1995. Dendritic spines for neuroprotection: a hypothesis. *Trends Neurosci*; 18:468-71.
- Serra P.A, Esposito G, Enrico P, Mura MA, Migheli R, Delogu MR, Miele M, Desole MS, Grella G, Miele E. 2000. Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease. *British J Pharma*; 130: 937-945.
- Shapira AHV. 1994. Evidence for mitochondria1 dysfunction in Parkinson's disease-a critical appraisal. *Movement disorders*; 9:125-138.
- Shen XM, Dryhurst G. 1998. Iron- and manganese-catalyzed autoxidation of dopamine in the presence of L-Cysteine: Possible insights into iron- and

manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*; 11:824-37.

Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. 2003. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*; 179:9-16.

Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Takashi T. 2003. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med*; 9: 360–365.

Sloot WN, Gramsbergen JB. 1994. Axonal transport of manganese and its relevance to selective neurotoxicity in the rat basal ganglia. *Brain Res*; 657:124-32.

Smith TS, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. 1994. L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity?. *Neuroreport*; 5:1009-101.

Smith Y, Villalba RM, Raju DV. 2009. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not?. *Parkinsonism Relat Disord*; 3:S156-161.

Solis O, Ilimó D, Flores-Hernández, Flores G. 2007. Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse*; 61:450–458.

Stephens B, Mueller AJ, Shering AF, Hood SH, Taggart P, Arbuthnott GW, Bell JE, Kilford L, Kingsbury AE, Daniel SE, Inghama CA. 2005. Evidence of a breakdown of corticostriatal connections in Parkinson's disease. *Neurosci*; 132:741-54.

Takeda A, Ishiwatari S, Okada S. 2000. Influence of transferrin on manganese uptake in rat brain. *Neurosci. Res*; 59:542–552.

Takeda A. 2003. Manganese action in brain function. *Brain Res Rev*; 41: 79–87.

Tjälve H, Henriksson J, Tallkvist J, Larsson BS, Lindquist NG. 1996. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharma Toxi*; 79:347-56.

Tolosa E, Wenning G, Poewe W. 2006. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*; 5:75-86.

Truong LH, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. 2006. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: A study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. *Behav Brain Res*; 169:1–9.

Ungerstedt, U. 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *J Pharmacol*; 5:107-10.

Uversky V. 2004. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res*; 318: 225–24.

- Valverde F. 1970. The Golgi method. A tool for comparative structural analyses. In: Nauta W.J.H., Ebesson S.O.E. (eds) Contemporary research methods in neuroanatomy. New York: Springer.
- Villalba RM, Lee H, Smith Y. 2009. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP treated monkeys. *Exp Neurol.*; 215:220–227.
- Wang X, Miller DS, Zheng W. 2008. Intracellular localization and subsequent redistribution of metal transporters in a Rat choroid plexus model following exposure to manganese or iron. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 230:167-174.
- Whishaw I, Suchowersky O, Davis L, Sarna J, Metz G, Pellis S. 2002. Impairment of pronation, supination, and body co - ordination in reach - to - grasp tasks in human Parkinson's disease (PD) reveals homology to deficits in animal models. *Behav Brain Res* 133: 165 – 176.
- Yamada M, Ohno S, Okayasu, Okeda R, Hatakeyama S, Watanabe H, Ushio K, Tsukagoshi H. 1986. Chronic manganese poisoning: A neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. *Acta Neuropathol*; 70: 273 – 278.
- Yelnik MD. 2002. Functional anatomy of the basal ganglia. *Mov Disor*; 17: S15–S21.
- Yokel RA. 2009. Manganese flux across the blood-brain barrier. *Neuromol Med*; 11:297-310.
- Youdim MB H, Grünblatt E, Mandel S. 1999. The pivotal role of iron in NF-κB activation and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for neuroprotection in Parkinson's disease with iron chelators. *Ann N.Y Acad Sci*; 890:7-25.
- Zaja-Milatovic S, Milatovic D, Schantz AM, Zhang J, Montine KS, Samii A, Deutch AY, Montine TJ. 2005. Dendritic degeneration in neostriatal medium spiny neurons in Parkinson's disease. *Neurol*; 64:545–547.
- Zhao F, Cai T, Liu M, Zheng G, Luo W, Chen J. 2009. Manganese induces dopaminergic neurodegeneration via microglial activation in a rat model of manganism. *Toxicol Sci*; 107:156-164.
- Zhang S, Zhou Z, Fu J. 2003. Effect of manganese chloride exposure on liver and brain mitochondria function in rats. *Environ Res*; 93:149-57.

Anexos

Anexo 1. - Conducta Motora: Prueba de viga de equilibrio.

Todos los animales fueron entrenados durante dos semanas en un aparato de madera con dos pedestales a los cuales va unida una viga de madera de 1m de largo, elevada del suelo, con inclinación de 15°, la cual tiene un grosor de 6 mm y otra de 12mm. Se registró con un cronómetro el tiempo en que los animales tardaron en atravesar la viga de un extremo a otro con un tiempo límite de dos minutos (120 segundos) por rata (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2012).

Anexo 2.- Prueba motora “reaching task”.

Los animales fueron entrenados, empleando una caja de acrílico, la cual tiene al frente una abertura de 1 cm por la cual el animal tiene que alcanzar utilizando el miembro anterior preferente un pellet y comerlo, se cuentan como aciertos cada vez que el animal toma el trozo de alimento y lo lleva hasta su hocico, y como error si se le cae o no lo puede sujetar, a cada animal se le pusieron 20 pellets y se cuantificaron los aciertos y errores en un lapso de dos minutos. La evaluación en ambas pruebas se realizó periódicamente, una vez por semana durante los días que no inhalaban en un lapso de 26 semanas. Para la realización de esta prueba los animales fueron privados de alimento al 90% de su peso (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2012).

Anexo 3.- Método de impregnación argéntica de Golgi

1.- Las muestras ya fijadas se lavan en buffer fosfatos y se sumergen en una mezcla de osmio/dicromato de potasio (OsO₄ 1g, K₂Cr₂O₇ 8g, H₂O 300ml) durante 7 días a temperatura ambiente en la oscuridad (se utilizaron 10ml de la mezcla para cada cerebro).

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

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

4.-Los cortes se deshidratan en 2 baños de alcohol absoluto 10 minutos cada uno, posteriormente en esencia de clavo durante 10 minutos para ser aclarados, y después dos cambios de xilol, finalmente se montan en un portaobjetos con resina sintética (Valverde, 1970)

Posteriormente se realizó el conteo de espinas dendríticas de las NEM; donde se seleccionaron 5 dendritas secundarias de 10 neuronas por animal y se contaron las espinas en una longitud de 10 μm (Avila-Costa *et al.*, 2006).

Anexo 4.- Inmunohistoquímica anti TH

Se realizaron cortes histológicos a nivel de mesencéfalo que contiene a la SNc de todos los grupos experimentales, y se realizó inmunohistoquímica anti-TH. Para lo cual se realizaron cortes de entre 25-50 μm , posteriormente se hicieron lavados sucesivos en el siguiente orden: En amortiguador PBS 3 veces por 10 minutos; 3 lavados en amortiguador TRIS de 10 minutos; amortiguador TRIS y peróxido de hidrógeno 0.3 % (30 min.); amortiguador TRIS y borohidrido de sodio 0.01 % (30 min); amortiguador TRIS con 1% de suero normal de cabra y 0.3 % de tritón (durante 1 h), todos con agitación, posteriormente se incubaron los cortes en una alícuota de anticuerpo primario anti-TH en amortiguador TRIS 1:1000 con 1 % de suero normal de cabra por 3 días a 4 °C. Posteriormente se lavaron los cortes 3 veces en amortiguador TRIS con 1 % de suero normal de cabra durante 10 min con agitación. Se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario. Anti-IGg de conejo 1:200 en TRIS con 1 % de suero normal de cabra. Se hizo un lavado en TRIS con 1 % de suero normal de cabra, para después incubar en Abidina-Biotina (2 Hrs) a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en TRIS con agitación se reveló la tinción en los tejidos con 3-3 Diaminobencidina (DAB) al 0.05 % y 0.003 % de peróxido de hidrógeno. El tejido se lava una última vez en TRIS por 10 min y se montan en portaobjetos previamente gelatinizados, se dejan secar un día. Para cubrir con resina se realizó la deshidratación de los cortes con alcoholes de concentraciones crecientes (60, 70, 80, 90 y 96 %) diez minutos en cada uno y 3 cambios en alcohol de 100 % de 10 min. y finalmente dos cambios en tolueno de 10 min. cada uno. Para su posterior análisis en un fotomicroscopio, haciendo un conteo de las neuronas inmunorreactivas a TH en la SNc en un área de 1500

μm^2 en 10 cortes por animal a partir del inicio del núcleo terminal medial del tracto óptico accesorio (Ordoñez-Librado, 2012).

Anexo 5.- Microscopia Electrónica

Usando un microscopio de disección, se tomaron pequeños fragmentos del NE y de la SNc para el análisis ultraestructural. Los fragmentos se lavaron en PBS, y fueron colocados durante una hora en tetraóxido de Osmio al 1% preparado con PBS para la postfijación; posteriormente, los fragmentos se lavaron con PBS en tres cambios de 10 minutos cada uno. El segundo paso consistió en la deshidratación del tejido con alcoholes de concentraciones crecientes (del 50 al 100 %) durante lapsos de 10 minutos cada uno y finalmente, el tejido, fue puesto en alcohol al 100 % por tres ocasiones de 10 minutos cada una; después se coloca el tejido en tolueno durante dos períodos de 10 minutos cada uno. Los fragmentos fueron infiltrados en una mezcla de resina 1:1 araldita-tolueno a 60 °C. Se mantuvieron por 12 horas en una mezcla 3:1 de araldita-tolueno a temperatura ambiente, los fragmentos ya infiltrados se incluyeron en araldita pura a 60 °C durante 24 horas. Una vez que se polimerizó la resina, se procedió a realizar los cortes finos de 900 Å en un ultramicrotomo Reichert-Jung utilizando cuchillas de diamante. Se montaron los cortes en rejillas de cobre y se contrastaron en acetato de uranilo al 5 % durante 20 minutos y con citrato de plomo al 0.4 % por 5 minutos (Avila-Costa *et al.*, 2008).

Posteriormente, se realizó el análisis ultraestructural con el microscopio electrónico Zeiss Gemini en 50 terminaciones sinápticas seleccionadas al azar por animal. En cada botón sináptico observamos todas sus características de membrana y organelos, se midieron:

- Diámetros del botón presináptico, mediante el software Orbicule Magnification for Mac, 2.0.1.
 - Tipo de contacto sináptico, es decir, si el contacto se lleva a cabo con la cabeza o con el cuello de la espina dendrítica.
- Los contactos sinápticos fueron clasificados en contactos con la cabeza de la espina y con el cuello, debido a que se ha evidenciado que las conexiones que se dan en la cabeza de la espina suelen ser preferentemente asimétricas y

excitatorias y, por el contrario las conexiones al cuello de la espina son generalmente, sinapsis simétricas y dopaminérgicas (Freund et al., 1984).

- El número de sinapsis perforadas:

Basándonos en la clasificación de sinapsis perforadas, descrita por Calverley y Jones en 1987:

- El sitio de la perforación se proyecta hacia la terminal presináptica.
- La zona activa tiene uno o más componentes curvados negativamente separados por una región central de la zona activa que proyecta hacia la terminal presináptica.
- La PSD está en estrecha asociación con el cuerpo de la espina o una extensión de este.

Se determinó que una sinapsis contenía una PSD perforada si había una hendidura en la PSD de >50 nm (el ancho de una vesícula sináptica) (Anaya-Martinez *et al.*, 2014).