

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA,
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL.**

FACULTAD DE FARMACIA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA
ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE MANGANESO:
IMPLICACIÓN DE LA INGESTA DE HIERRO.**

**MARY CRUZ SÁNCHEZ HIDALGO
TESIS DOCTORAL, 2005.**

D. ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada " **Estudio de los efectos producidos por la administración crónica de manganeso: Implicación de la ingesta de hierro** ", presentada por la Lda. Mary Cruz Sánchez Hidalgo para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 22 de noviembre de 2005.

Fdo: D. Alberto Machado de la Quintana.

D^a. JOSEFINA CANO GARCÍA Y D. ANTONIO AYALA GÓMEZ, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD Y CATEDRÁTICO DE ESCUELA UNIVERSITARIA RESPECTIVAMENTE, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada " **Estudio de los efectos producidos por la administración crónica de manganeso: Implicación de la ingesta de hierro** ", presentada por la Lda. Mary Cruz Sánchez Hidalgo para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección y reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla, a 22 de noviembre de 2005.

Fdo: D^a. Josefina Cano García

Fdo: D. Antonio Ayala Gómez

Parte de los resultados expuestos en esta tesis han sido publicados en el artículo siguiente:

Tomás-Camardiel M., Herrera A.J., Venero J.L., Cruz Sánchez-Hidalgo M., Cano J. , Machado A. (2002) Differential regulation of glutamic acid decarboxilase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats. *Brain Res Mol. Brain Res.* **103**: 116-129.

Expreso mi agradecimiento al director del departamento, el Dr. Alberto Machado, por haberme facilitado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en este departamento.

A la Dra. Josefina Cano por brindarme la oportunidad de trabajar en un laboratorio realizando estudios de neurociencia y dirigirme la tesis.

Al Dr. Antonio Ayala, co-director de la tesis, por compartir sus conocimientos sobre el estrés oxidativo.

A todos los compañeros del laboratorio que he ido conociendo en estos años (Esperanza, Mati, Marina, Mayka, Marisa, Angélica, Leila, Juan Pedro, Antonio J., Marti, José Luis Venero, Juan, Enrique, Miguel, José Antonio, Hadi, Sonia, Raquel, María, Laura, Olga, Rocío, Inma, Blanca, Juan Carlos, Pepe, Javier Vitorica, Diego, Juan Bautista, Mamen, Consuelo, Elisa, Sandro, Ruth, Isita, Miguel Angel, ...) porque me habéis aconsejado y mostrado cordialidad y disponibilidad en el trabajo.

Al personal de administración, Rosa y Carmen, por su asesoramiento en el tema burocrático.

A mis amigas de la facultad, en especial a Rocío y Ascen, que siempre os habéis interesado por mi trabajo preguntándome en miles de ocasiones: “¿ Cómo llevas tu tesis ? “.

A MI FAMILIA, muy especialmente, por su cariño, ayuda y comprensión en la tesis y en mi vida. Mis padres e Ildefonso merecen todo mi agradecimiento pues con su apoyo incondicional me han impulsado a recobrar la ilusión en este trabajo en numerosas ocasiones en las que te faltan las fuerzas para seguir.

Pero, la ilusión de mi vida son mis hijas, Adriana, Patricia y Judith, por las que todo lo que hago en cada instante tiene sentido. Ellas también han colaborado en la realización de esta tesis de la forma en que han podido y siempre se lo agradeceré. Espero que algún día ellas también valoren el sentido de la realización de este “ libro”.

*A mis hijas:
Adriana, Patricia y Judith*

ABREVIATURAS:

AVT	Área ventral tegmental
COMT	Catecol-O-Metiltransferasa
D	Desferroxamina
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenil acético
EA	Enfermedad de Alzheimer
EP	Enfermedad de Parkinson
GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
GFAP	Proteína fibrilar ácida de glía
GP	Globo pálido
HVA	Ácido homovanílico
L-AADC	L-aminoácido aromático descarboxilasa
MAO	Monoamino oxidasa
MnCl ₂	Cloruro de manganeso
3-MT	3-metoxitiramina
6OHDA	6-hidroxidopamina
RL	Radicales libres
SDH	Succinato deshidrogenasa
SN	Sustancia negra
SNe	Sustancia negra compacta
SNC	Sistema nervioso central
SNr	Sustancia negra reticulada
SOD	Superóxido dismutasa
TH	Tirosina hidroxilasa
TVDA	Transportador vesicular de dopamina

ÍNDICE

INTRODUCCCIÓN	1
1. introducción.....	1
1.1. Radicales libres	3
1.2. Estrés oxidativo.....	6
1.3. Antioxidantes	8
1.4. Dopamina: metabolismo	11
1.5. Tirosina hidroxilasa	17
1.6. Transportador de dopamina	18
1.7. Neurodegeneración del sistema nigro-estriado	19
2. Aspectos anatómicos-funcionales de los ganglios basales.....	22
3. Enfermedades neurodegenerativas.....	31
3.1. Enfermedad de Parkinson.....	31
3.2. Corea.....	34
3.3. Balismo.....	36
3.4. Enfermedad de Alzheimer.....	36
4. Manganeso: esencial y tóxico.....	39
5. Relación existente entre hierro y manganeso.....	47
6. Respuesta glial.....	51
6.1. Astrocitos.....	51
6.2. Microglía.....	53
OBJETIVOS	56
MATERIAL Y MÉTODOS	60

RESULTADOS.....	80
1. Tratamiento con MnCl ₂ a dosis baja.....	80
1.1. Inmunocitoquímica frente a TH en SN, AVT, estriado y N. Accumbens.....	81
1.2. Cambios en la actividad SDH.....	83
1.3. Expresión de mRNA de TH y mRNA de DAT en la SN y AVT.....	85
1.4. Análisis de la localización de la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP y OX-42	91
1.5. Inmunorreactividad frente a GFAP y OX-42.....	93
1.6. Expresión de mRNA de GAD67 en estriado y Globo pálido después del tratamiento con manganeso.....	101
2. Estudio " <i>in vitro</i> " del estrés oxidativo en lípidos y proteínas producido por el MnCl ₂	103
2.1. Estudio del estrés oxidativo en lípidos.....	103
2.2. Estudio del estrés oxidativo en proteínas.....	107
3. Estudio de la relación entre hierro y manganeso a nivel cerebral.....	111
3.1. Estudio de la reacción glial.....	112
3.1.1. Estudio de la respuesta de los astrocitos en estriado y SN.....	112
3.1.2. Morfología de la astrogía en estriado y SN.....	116
3.1.3. Morfología de la astrogía en corteza.....	124
3.1.4. Estudio de la respuesta de la microglía en estriado y SN.....	130
3.1.5. Morfología de la microglía en estriado y SN.....	135
3.2. Estudio inmunohistoquímico del estrés oxidativo.....	143

4. Estudio de la relación entre los cambios histológicos a nivel cerebral y el estrés oxidativo en suero y tejidos inducidos por los distintos tratamientos.....	151
4.1. Parámetros de estrés oxidativo en suero y tejidos.....	151
4.1.1. Peróxidos lipídicos.....	151
4.1.2. MDA.....	154
4.1.3. Grupos carbonilos.....	156
4.1.4. Capacidad antioxidante	159
4.2. Estudio de la correlación existente entre los parámetros marcadores de estrés oxidativo en los distintos órganos con los datos de cuantificación glial del estudio inmunohistoquímico.....	162
4.2.1. Estudio de la correlación de los parámetros oxidativos y los niveles de células inmunopositivas frente a GFAP en estriado en los distintos tratamientos.....	163
4.2.2. Estudio de la correlación entre los parámetros oxidativos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP en la SN en los distintos grupos de tratamiento.....	165
4.2.3. Estudio de la correlación entre los parámetros oxidativos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en el estriado.....	167
4.2.4. Estudio de la correlación entre los parámetros oxidativos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en la SN.....	169

DISCUSIÓN	171
1. Estudio de la toxicidad inducida por el manganeso. Modelo experimental de intoxicación crónica.....	171
2. Efecto del MnCl ₂ en el metabolismo energético. Reacción glial en sistemas dopaminérgicos.....	176
3. Estudio del efecto del manganeso a nivel de neurotransmisión en el sistema dopaminérgico nigro-estriado y otros sistemas relacionados.....	183
4. Estudio del estrés oxidativo inducido por el tratamiento con MnCl ₂	190
5. Estudio de la reacción glial inducida por manganeso ante deficiencia de hierro.....	200
CONCLUSIONES	211
BIBLIOGRAFÍA	214

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

El envejecimiento biológico se puede definir como el conjunto de cambios y alteraciones que se producen con la edad como consecuencia de procesos intrínsecos que dan lugar a la pérdida generalizada de las funciones óptimas del organismo (Cutler , 1984).

A pesar de haberse postulado muchas teorías sobre el envejecimiento aún no se han esclarecido las causas y los mecanismos por los cuales se produce.

Así pues, se pueden implicar en la etiología del envejecimiento a las alteraciones genéticas del desarrollo, los procesos patológicos, las toxinas medioambientales o explicarse como un proceso innato de la célula.

Entre todas estas teorías (Tabla 1), la *Teoría de los Radicales Libres (RL)* y *Envejecimiento de Harman (1956)* es una de las más aceptadas. Dicha teoría postula que el envejecimiento es causado por reacciones mediadas por RL, las cuales ocurren al azar y de manera no específica, originando una serie de daños en las moléculas biológicas.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Teorías sobre el Envejecimiento.

<i>Teoría de las Mutaciones somáticas</i>	Szilard, 1959 Orgel, 1963 Curtis, 1963, 1966 Brunet, 1974 Rosemberger, 1991
<i>Teoría de las Mitocondrias Defectuosas</i>	Richter, 1988 Linnane y col., 1989 Wallace, 1999
<i>Teoría de los Radicales libres</i>	Harman, 1956,1981 Stadman, 1992 Sohal y Orr, 1995
<i>Teoría de la Desdiferenciación</i> <i>Teoría de los Telómeros</i>	Culter, 1982 Harley y col., 1990, 1995.

1.1. RADICALES LIBRES (RL).

Los RL son átomos o moléculas que tienen un orbital con un electrón desapareado, lo que les hace inestables y, por lo tanto, altamente reactivos, siendo capaces de extraer un electrón de otros átomos o moléculas para así estabilizarse completando la vacante en su orbital. Los RL derivados del oxígeno o especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo (OH^\cdot) y, en especial, el anión superóxido, $\text{O}_2^\cdot^-$, se producen constantemente en el organismo durante el metabolismo normal de los organismos aerobios (Yu y Yang, 1996).

Otros tipos de RL son el óxido nítrico (NO^\cdot) y el peroxinitrito (ONOO^\cdot) (Tabla 2).

Tabla 2. Principales Especies Reactivas de Oxígeno.

<i>Radical anión superóxido</i>	$\text{O}_2^\cdot^-$
<i>Radical hidroxilo</i>	HO^\cdot
<i>Radical peróxido</i>	ROO^\cdot
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	H_2O_2
<i>Oxígeno singlete</i>	$^1\text{O}_2$
<i>Óxido nítrico</i>	NO^\cdot
<i>Peroxinitrito</i>	ONOO^\cdot

INTRODUCCIÓN

Existen varias fuentes de especies reactivas de oxígeno en los organismos, siendo la cadena respiratoria y las reacciones de destoxificación los procesos metabólicos en los que más compuestos reactivos de oxígeno se producen (Schoenberg y Beger, 1995).

A pesar de que los RL intervienen en funciones beneficiosas para el organismo (por ejemplo, poseen poder bactericida) su extremada reactividad hace que ocasionen alteraciones moleculares importantes, siendo altamente perjudiciales tanto a nivel celular como molecular.

La fosforilación oxidativa es la principal fuente de generación de RL en la célula, ya que el O_2^- aparece como subproducto de la reducción del O_2 por el sistema de transporte de electrones en la mitocondria (Ambrosio y col., 1993 ; Guidot y col., 1993). Este anión se genera también mediante la reducción de iones Fe^{2+} y otros metales de transición (entre los que se encuentra el manganeso).



Por lo tanto, una alteración de la fosforilación oxidativa puede dar lugar a una producción elevada de los RL, los cuales a su vez actúan sobre la misma cadena respiratoria aumentando aún más la producción de dichas especies.

Así pues, la disfunción de la fosforilación oxidativa puede ser el paso inicial de un proceso que podría llevar a una degeneración progresiva de la función celular.

El $O_2^{\cdot -}$ mediante la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) se transforma en H_2O_2 , que se suma al H_2O_2 generado por el metabolismo celular. De esta forma, la vida media del ión $O_2^{\cdot -}$ en tejidos depende de la presencia de la enzima superóxido dismutasa en los diferentes compartimentos celulares. Tanto el anión $O_2^{\cdot -}$ como el H_2O_2 son poco reactivos y sin embargo pueden causar daño al generar radicales hidroxilos (Warner y col., 1994), mediante las reacciones de Haber Weiss (1) y Fenton (2) :



De entre todos los radicales libres, el OH^{\cdot} es una de las especies más reactivas, con una vida media muy corta en los sistemas biológicos y que ataca a importantes moléculas de la célula (Tappel y Tappel, 2003)

Por tanto, como se deduce de las reacciones citadas anteriormente, la concentración citosólica de iones metálicos Fe^{2+} , Cu^+ o Mn^{2+} constituye uno de los factores clave que determinan la tasa de producción de RL por los tejidos (Aust y Morehouse, 1985).

INTRODUCCIÓN

Así pues, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno inician una amplia variedad de reacciones de oxidación, incluyendo oxidaciones de bases en el ADN (Dizdaroglu y col., 2002), oxidaciones de los aminoácidos de las cadenas laterales de las proteínas (Stadtman, 1992; Ostdal y col., 2002) y peroxidaciones de los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados en los lípidos (Boots y col., 2002), dando lugar a lo que se denomina “ *Estrés oxidativo* ”.

1.2. ESTRÉS OXIDATIVO.

El estrés oxidativo es el conjunto de daños causados por las especies reactivas de oxígeno. El estado o grado de estrés oxidativo está determinado por la tasa de producción de estas especies, por el nivel de los sistemas antioxidantes y por la velocidad a la que el daño es reparado (Fig. 1).

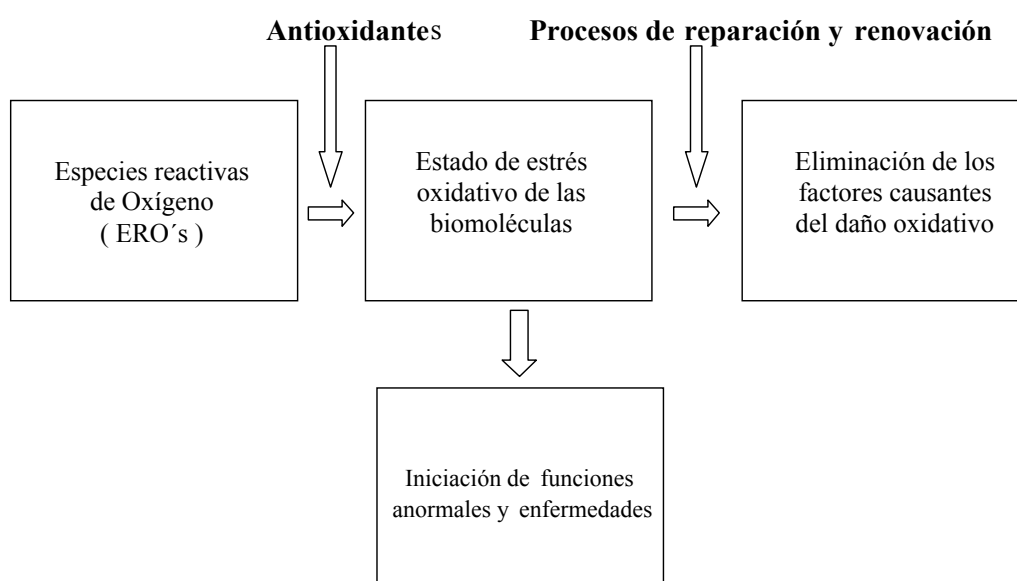


Fig. 1. Factores que determinan el estado de estrés oxidativo.

El aumento de estrés oxidativo produce daño en los tejidos. Entre los desórdenes moleculares ocasionados por los RL se pueden citar los cambios en la función, estructura y fluidez de la membrana debidos a la peroxidación lipídica (Alvarez y col., 1993). Dichos hidroperóxidos lipídicos y sus productos de degradación son altamente citotóxicos, causan daños a enzimas y membranas dando lugar a una pérdida de resistencia eléctrica y fluidez de la membrana y, finalmente, a una pérdida de la integridad de la misma (Pauls y Thomson, 1980; Axelsson y col., 1999), provocando alteraciones en el flujo de calcio (Bast y Goris, 1989), pudiendo causar incluso efecto mutagénico (Halliwell y Gutteridge col., 1999).

Como sucede con otros radicales, la oxidación *in vitro* de ácidos grasos y de lípidos puros es un proceso lento. Sin embargo en presencia de iones metálicos de transición (especialmente hierro y cobre) y de compuestos con grupos hemo está acelerado (Welch y col., 2002).

Una vez iniciada, la peroxidación es un proceso autocatalítico. Los radicales OH^\cdot son indicadores de la peroxidación de lípidos por captación de un H^\cdot de la molécula de ácido graso. Por ello, el peróxido de hidrógeno, que en presencia de metales de transición da lugar a radicales hidroxilo, causa daños importantes a las membranas celulares (Aime y col., 1999).

INTRODUCCIÓN

Los RL también actúan sobre polisacáridos, producen modificaciones en moléculas como el colágeno (Dunn y col., 1991); además, en el ADN inducen la formación de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OH-dG) y pueden dar lugar también a deleciones cromosómicas o a una expresión génica alterada que conduzca a la muerte celular (Breen y Murphy, 1995). Por último, sobre las proteínas, dan lugar a la formación de grupos carbonilos por oxidación directa de los residuos aminoacídicos o mediante glucosilación (Stadtman, 1992) y también pueden formar puentes y fragmentar cadenas polipeptídicas.

Las moléculas dianas inicialmente atacadas por los RL dependen del tejido que sufre el daño (Halliwell, 1995).

1.3. ANTIOXIDANTES.

En contraposición al efecto destructor que poseen los RL existen los denominados sistemas antioxidantes, los cuales median un equilibrio para evitar el estrés oxidativo.

Halliwell y Gutteridge (1989) definieron como *antioxidantes* cualquier sustancia que, encontrándose a concentraciones más bajas que las de un sustrato oxidable, son capaces de retrasar significativamente o prevenir la oxidación de ciertos sustratos. El término sustrato oxidable incluye todo tipo de moléculas encontradas *in vivo*.

Entre los sistemas antioxidantes destacan:

- Superóxido dismutasa y Catalasa.
- Glutati6n (GSH)
- Vitamina E.
- Vitamina C.

De estos sistemas antioxidantes es importante se~alalar el de la enzima Super6xido dismutasa (SOD) y catalasa debido a su relaci6n con los metales pesados. La Super6xido dismutasa engloba una familia de metaloenzimas que catalizan la conversi6n:



Existen tres isoformas de esta enzima en mam6feros: Zn-SOD, Mn-SOD y una tercera que contiene cobre que se considera SOD extracelular, la cual est6 ampliamente distribuida en los tejidos y principalmente en plasma.

Por otra parte la enzima catalasa es la responsable de la conversi6n del H_2O_2 en H_2O y O_2 . Esta enzima se encuentra localizada en los peroxisomas (Grabenbauer y col., 2001; Hellemans y col., 2003), lo cual puede explicar por qu6 en el cerebro, donde la cantidad de peroxisomas es peque~a (Lee y col., 2003), el contenido en catalasa es tan bajo. La afinidad de esta enzima por su sustrato es muy baja, de forma que s6lo elimina el per6xido formado en el interior de los peroxisomas.

INTRODUCCIÓN

Por lo tanto, el peróxido que se forma en la mitocondria o en el citosol es eliminado por el sistema GSH.

En síntesis, se puede afirmar que un adecuado equilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes es determinante en la homeostasia de los seres vivos (Figura 2).

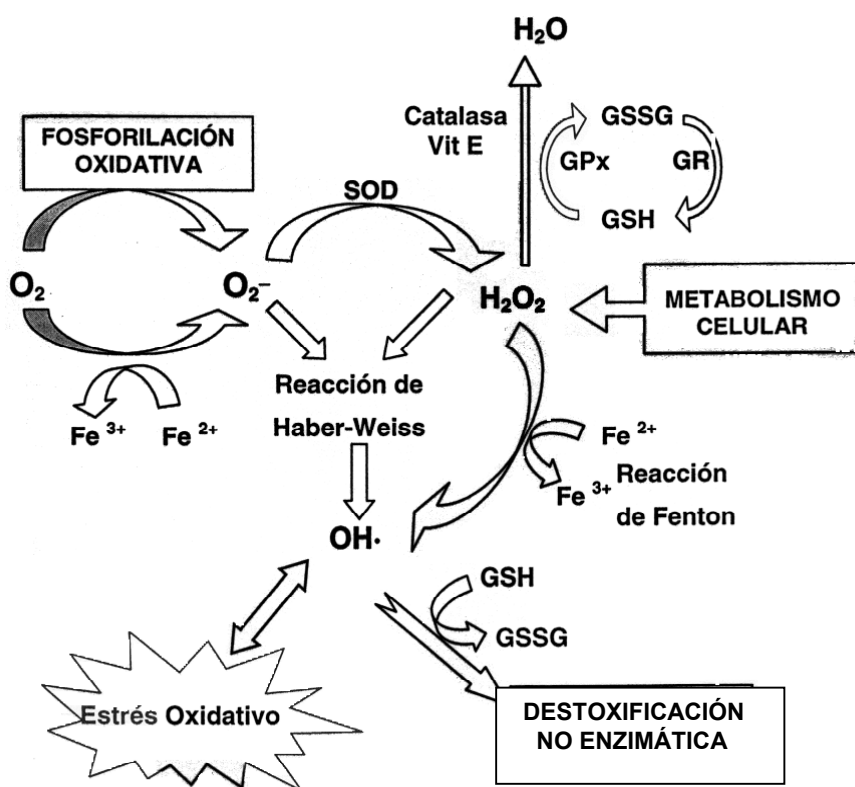


Fig. 2. Representación esquemática de los procesos de generación de radicales libres y sistemas antioxidantes.

A nivel del SNC hay que destacar que el metabolismo del neurotransmisor Dopamina es una importante fuente de radicales libres por lo que se procederá a su estudio.

1.4. DOPAMINA: METABOLISMO.

La Dopamina (DA) se incluye en el grupo de las catecolaminas que, como su nombre indica, son compuestos que poseen un grupo catecol (anillo bencénico con dos sustituyentes hidroxilos adyacentes) y un grupo amino. Su síntesis se realiza a partir del aminoácido L-tirosina (Tyr) que se encuentra disponible en los depósitos tisulares y llega al cerebro con el flujo sanguíneo, atravesando la barrera hematoencefálica mediante el sistema transportador de aminoácidos neutros.

Posteriormente, en las neuronas catecolaminérgicas se hidroxila por la enzima Tirosina hidroxilasa (Tirosina-3-monooxigenasa, TH) (EC. 1.14.16.2) y se forma 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La tasa de hidroxilación *in vivo* de la Tyr depende de la concentración y de la disponibilidad de sustratos específicos y de inhibidores endógenos. Bajo condiciones fisiológicas, la concentración de Tyr posiblemente satura a la enzima, por lo tanto, no parece ser un factor limitante en la síntesis de DA (Goldstein M., 1995).

El segundo paso de esta ruta es la conversión de L-DOPA en DA mediante una reacción de descarboxilación realizada por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC) (EC.4.1.1.28).

INTRODUCCIÓN

Esta enzima es piridoxal fosfato- dependiente pero no es específica ni con respecto a los sustratos que utiliza , ni con respecto a su localización, ya que también puede encontrarse en neuronas serotoninérgicas y en otros órganos como hígado y riñón. La actividad de la enzima L-AADC es bastante superior a la de la TH, por lo que se considera al paso de la hidroxilación del aminoácido como el limitante de la síntesis de DA (Berry y col., 1976).

Una vez sintetizada, la DA se almacena en vesículas sinápticas a cuyo interior es transportada activamente a través del *Transportador vesicular de DA (TVDA)*, quedando así protegida de la degradación intraneuronal hasta su posterior liberación en respuesta a un potencial de acción (Erickson y col., 1992; Liu y col., 1992).

Una vez que la DA actúa sobre los receptores correspondientes es recaptada por la propia neurona presináptica o por la célula glial para ser degradada, o bien, difunde hacia lugares lejanos donde puede seguir ejerciendo su acción (Elhwuegi, 2004). El proceso de recaptación lo lleva a cabo una proteína, la cual pertenece a la familia de Transportadores Na^+/Cl^- que transporta selectivamente esta catecolamina, por lo que se la ha denominado *Transportador de Dopamina (DAT)* (Lester y col., 1996).

Por otra parte, la DA puede degradarse por dos rutas diferentes, pero en cada una de estas dos vías participan las mismas enzimas, la monoamino oxidasa (MAO) (EC. 1.4.3.4.) y la Catecol-O-metiltransferasa (COMT) (EC. 2.1.1.6.) .

Una primera vía consiste en que, en el interior de las neuronas que recaptan la dopamina del espacio sináptico, la MAO cataliza la desaminación oxidativa de la DA dando lugar al 3,4-dihidroxifenilacetaldehido (DHFA) mediante la siguiente reacción:



Es importante señalar que el metabolismo de la DA está estequiométricamente ligado a la formación de peróxido de hidrógeno que a su vez puede generar radicales hidroxilos.

Se distinguen dos isoenzimas de la MAO, A y B, que fueron identificadas por Johnston en 1968 y se diferencian en base a la afinidad por el sustrato, especificidad del inhibidor, distribución tisular y celular, propiedades inmunológicas y las secuencias aminoacídica y nucleotídica (Shih, 1994). Esta enzima se encuentra unida a la membrana externa de la mitocondria y tanto la MAO A como la B son capaces de metabolizar la DA.

En el cerebro humano el 70% de la actividad total de la MAO es del tipo B, mientras que en la rata ésta sólo es de un 50% (Oreland y col., 1983; Kuwahara y col., 1990).

INTRODUCCIÓN

La MAO-A es de localización intraneuronal y la MAO-B se encuentra mayoritariamente en la glía (Vitalis y col., 2002).

Así pues, en humanos la desaminación oxidativa de la DA ocurre mayoritariamente a través de la Isoforma B extraneuronamente (Orelan y col., 1983; Glover y Sandler, 1986), mientras que en la rata tiene lugar principalmente por la Isoforma A, de manera intraneuronal (Azzaro y col., 1985; Butcher y col., 1990).

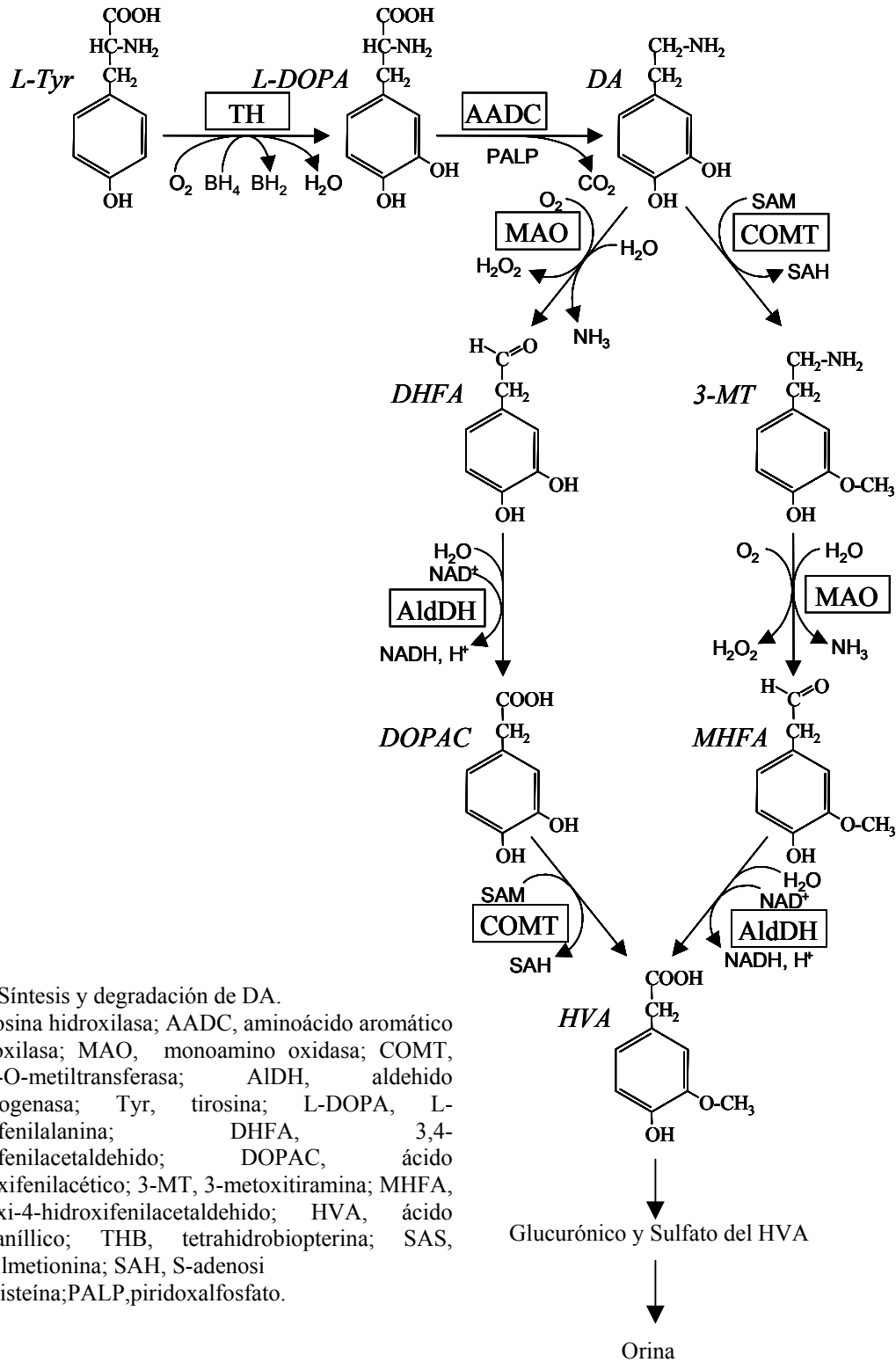
El DHFA formado por acción de la MAO es muy inestable y es oxidado por la enzima Aldehído deshidrogenasa dando lugar al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), el cual seguidamente sale de la neurona y es tomado por la glía actuando sobre él la COMT.

La COMT cataliza la transferencia de grupos metilos a grupos catecoles a partir de la S- adenosilmetionina (SAM), para lo que requiere cationes divalentes, de ahí también la importancia del Manganese. Se han caracterizado dos isoformas distintas de la COMT: una soluble (S-COMT) y otra unida a membranas (MB-COMT), apuntándose la posibilidad de que la S-COMT se localice principalmente en células gliales. La COMT actúa sobre el DOPAC generando ácido homovanílico (HVA).

La segunda vía consiste en la recaptación de la DA del espacio sináptico directamente por la glía, con lo que actuará sobre ella la COMT formando 3-metoxitiramina (3- MT).

A continuación la 3-MT será metabolizada por la MAO dando lugar al 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehido (MHFA) que es rápidamente oxidado hasta ácido homovanílico (HVA) por acción de la Aldehido deshidrogenasa. Finalmente, el HVA es conjugado como sulfatos o glucuronatos, lo que facilita su eliminación del SNC para ser después expulsados por la orina (Figura 3).

INTRODUCCIÓN



1.5. TIROSINA HIDROXILASA.

Como se ha descrito anteriormente, la tirosina hidroxilasa es una monooxigenasa que cataliza la formación de L-DOPA a partir de L-Tirosina en neuronas catecolaminérgicas centrales y periféricas, en ganglios simpáticos, en células cromafines de la médula adrenal y en células PC 12 de feocromocitoma de rata (Lamensdorf y col., 2000) mediante la reacción:



La enzima utiliza tirosina como sustrato, requiere oxígeno molecular para su actividad y el cofactor pterínico reducido (6R)-5,6,7,8- Tetrahidrobiopterina (BH₄). En la reacción el cofactor es oxidado a dihidrobiopterina (BH₂), la cual de nuevo es reducida a tetrahidrobiopterina mediante la enzima dihidrobiopterina reductasa (Kaufman, 1993). Además de los sustratos mencionados, la enzima necesita el ión ferroso (Fe²⁺) para su actividad (Haavik y col., 1991), el cual coordina en el residuo His³³¹ (Ramsey y col., 1995), dándose actividad máxima a pH 6.

La enzima se encuentra presente en todas las células que sintetizan catecolaminas, siendo la médula adrenal el tejido con mayor contenido de TH.

INTRODUCCIÓN

Los trabajos dirigidos a estudiar la localización subcelular de la enzima sugieren que ésta se encuentra en el citoplasma y también unida a membrana (Cosentino y col, 2002).

Estas isoformas muestran diferente afinidad por el cofactor pterínico y diferente sensibilidad a la inhibición por DA. La enzima de rata ha sido clonada y expresada en cultivos celulares de insectos (Fitzpatrick y col., 1990) y además se han encontrado cuatro isoenzimas de TH humana que han sido clonadas y expresadas en células eucariotas (Horellou y col., 1988) y E.coli (Haavik y col., 1991).

1.6. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA.

El gen del transportador de DA ha sido clonado en rata (Shimada y col., 1991), vaca (Usdin y col., 1991) y humano (Giros y col., 1992) habiéndose determinado que es una proteína con 12 dominios transmembranales. Pertenece a la familia de transportadores Na^+/Cl^- dependientes dentro de la que se encuentran también el transportador de noradrenalina (67% de homología de secuencia), el de serotonina (49%), GABA (45%), Glicina (41%) y Prolina (44%) entre otros (Miller y col., 1997). Posee un peso molecular de 69000 daltons con cuatro sitios posibles de N- glicosilación y aunque no se tiene aún certeza absoluta sobre el papel de estos carbohidratos, parecen estar implicados en la regulación de su actividad (Meiegerd y Schenk, 1994).

Asociado al proceso de neurotransmisión dopaminérgica, el ARNm del transportador de DA se expresa de manera intensa en las neuronas mesencefálicas de la sustancia negra compacta (SNc) y en menor medida en el área ventral tegmental (AVT), así como en las respectivas áreas de proyección, estriado y el Núcleo accumbens (N. Accumbens) (Giros y col., 1991; Usdin y col., 1991). A su vez, es sumamente importante el mantenimiento del equilibrio entre el espacio intracelular y extracelular en el proceso de transporte. En una primera etapa el Na^+ y la DA se disocian y al transportador se une K^+ que es liberado al exterior produciéndose a la vez la orientación de la proteína; seguidamente, el restablecimiento de los gradientes iónicos lo lleva a cabo la bomba Na^+/K^+ (Krueger, 1990; Chen y Reith, 2000).

1.7. NEURODEGENERACIÓN DEL SISTEMA NIGRO-ESTRIADO.

De todos los procesos y fenómenos que engloban el envejecimiento humano los que componen el llamado envejecimiento cerebral, son los que parecen estar relacionados directamente con la aparición de radicales libres y estrés oxidativo. Este cuadro de alteraciones por daño oxidativo parece tener una participación destacada en enfermedades asociadas al envejecimiento cerebral como son la enfermedad de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, llegando algunos autores a hablar del

INTRODUCCIÓN

envejecimiento como un factor de riesgo conducente a estas patologías (Bowling y Beal, 1995).

Esto es debido a que varios factores hacen del cerebro el órgano más vulnerable a los daños originados por el estrés oxidativo (Figura 4). El cerebro utiliza el 20% del oxígeno total inspirado, lo que supone una cantidad muy elevada si se tiene en cuenta que constituye sólo el 2% del peso total del individuo. A este alto consumo de O_2 contribuye entre otros procesos, la elevada tasa de metabolismo catecolaminérgico. Esto hace que la generación de RL en el cerebro sea comparativamente mayor, especialmente porque es un tejido relativamente deficiente en mecanismos protectores (Bondy, 1997). Además, el cerebro es rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que precisamente debido a las insaturaciones son especialmente vulnerables al ataque de RL, sirviendo como sustrato para la peroxidación lipídica (Sevanian y McLeod, 1997).

También otro hecho es que el líquido cefalorraquídeo (LCF) contiene poca transferrina y ceruloplasmina, que son moléculas capaces de quelar metales, y por lo tanto juegan un papel esencial en la catálisis del estrés oxidativo. Esto se suma a que el LCF contiene complejos de bajo peso molecular que contienen hierro y cobre, capaces de catalizar la generación de RL. El tejido neuronal es además rico en hierro libre (Yehuda y Youdim, 1988), lo cual unido a las altas

concentraciones de ácido ascórbico, supone una elevada probabilidad de que se genere estrés oxidativo, ya que el ácido ascórbico en presencia de hierro actúa como prooxidante.

Finalmente, los aminoácidos excitatorios que actúan como neurotransmisores en el cerebro (como por ejemplo el glutamato), una vez liberados generan una reacción en cadena que activa vías intracelulares de generación de RL.

Se ha podido comprobar que el sistema dopaminérgico presenta una mayor degeneración con la edad que otros sistemas neuronales. De hecho, el 4% del conjunto de neuronas productoras de dopamina desaparece durante cada decenio de la vida adulta como consecuencia del envejecimiento.

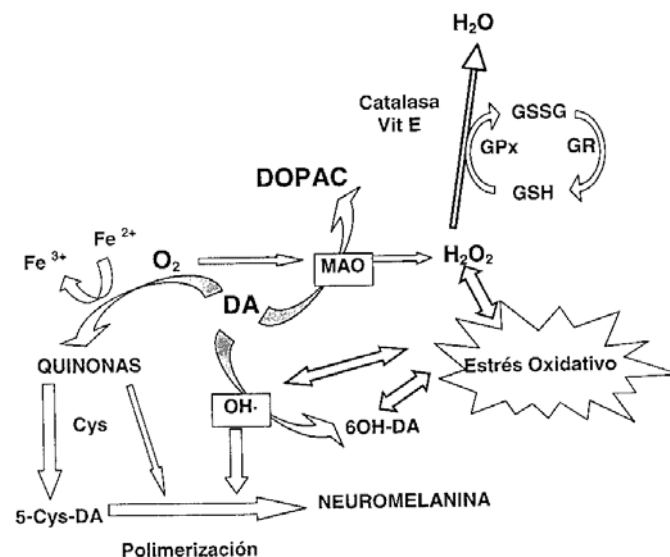


Fig 4. Mecanismos de generación de RL y subproductos de oxidación de la DA. Mediante la oxidación enzimática o no de la DA, se producen quinonas y 6-OH-DA que contribuyen a la polimerización de la melanina y a la generación de una cascada de estrés oxidativo.

INTRODUCCIÓN

2. ASPECTOS ANATÓMICO- FUNCIONALES DE LOS GANGLIOS BASALES.

Los ganglios basales son cinco grandes núcleos subcorticales que participan en el control de la actividad motora. Estos núcleos son: el *caudado*, el *putamen*, el *globo pálido (GP)*, los *núcleos subtalámicos*, la *sustancia negra (SN)* y el *AVT (Figura 5)*.

Evolutivamente, el caudado y el putamen provienen de la misma estructura telencefálica, por lo que están constituidos por el mismo tipo de células, fusionándose además en la parte anterior; así pues, al conjunto se le denomina *cuerno estriado*, nombre que se le da en la rata, una especie anatómicamente menos diferenciada, donde ambas estructuras constituyen un núcleo único.

Por otra parte, el GP se divide en dos segmentos: el externo y el interno, recibiendo este último el nombre de *núcleo entopeduncular* en la rata.

Asimismo la SN se divide en tres zonas: la parte lateral, la *sustancia negra reticulada (SNr)*, que citológicamente se parece al GP y, por último, una parte dorsal, pigmentada, debido a la presencia de neuromelanina, que es la *SNc*.

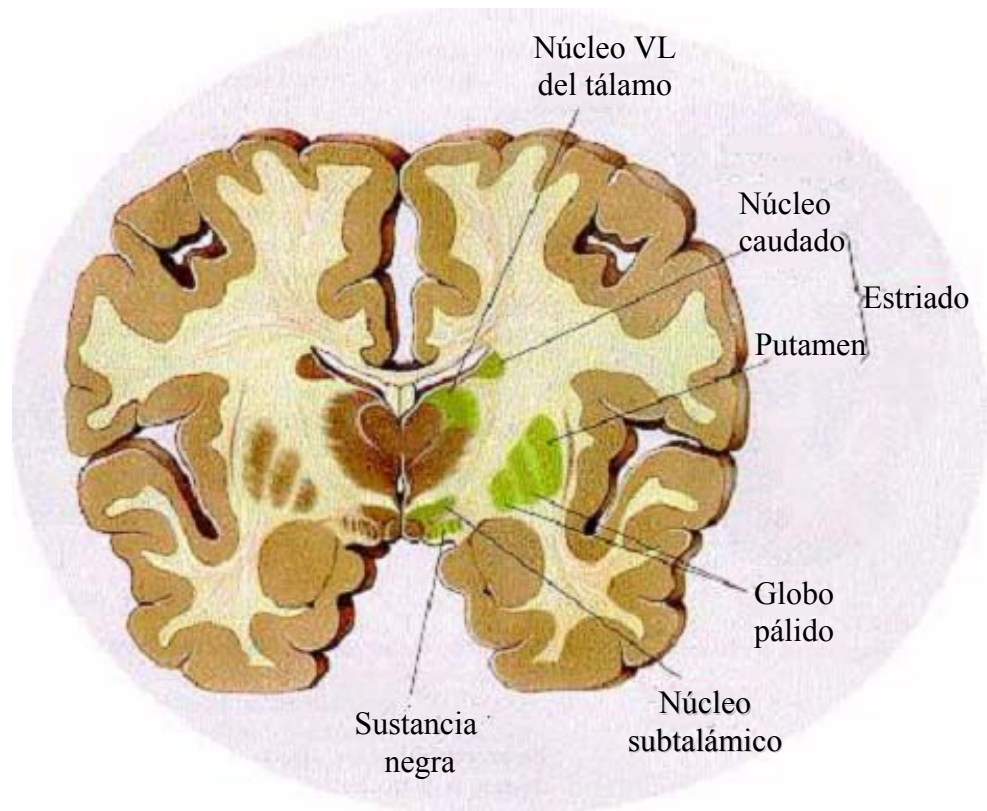


Fig. 5. Distribución anatómica de los ganglios basales.

En relación con la función motora mediada por los ganglios basales, es importante destacar que este sistema, a diferencia de la mayoría de los componentes del sistema motor, no recibe ni tampoco envía ninguna conexión a la médula espinal. De forma breve podemos describir que sus aferencias principales provienen de la corteza, concretamente de las regiones prefrontal, premotora y motora.

Por lo tanto, junto con el cerebelo, los ganglios basales constituyen el más importante bucle subcortical del sistema motor.

INTRODUCCIÓN

Sin embargo, la diferencia entre ambos estriba en que, si bien el cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, los ganglios basales están implicados en aspectos cognitivos y de orden superior del control motor. Esta participación de los ganglios basales en las funciones afectiva y cognitiva se debe fundamentalmente a las extensas conexiones que poseen con la corteza asociativa y también con estructuras límbicas.

Las proyecciones más importantes que reciben los ganglios basales son las aferencias excitatorias que llegan de la corteza cerebral al estriado.

Desde el punto de vista electrofisiológico, en condiciones de reposo las neuronas estriatales están en estado quiescente y su actividad es generada por esta aferencia excitatoria. La gran mayoría de las neuronas del estriado (90-95 %) son las denominadas neuronas espinosas de tamaño medio y a su vez, dentro de estas neuronas estriatales se distinguen dos subpoblaciones con aproximadamente el mismo número de células que alcanzan a la SN a través de vías diferentes. Así pues, una subpoblación neuronal proyecta directamente a la SNr (en menor medida a la SNc) y al segmento interno del GP (*vía estriadonigral*) y por otra parte, la otra subpoblación alcanza la SNr mediante conexiones polisinápticas (*vía estriadopalidal*), que se caracteriza por una primera proyección al segmento externo del GP, el cual

posteriormente proyectará a los núcleos subtalámicos y a la SNr, lo que supone la *vía palidonigral*.

La vía estriadonigral y la estriadopalidal se diferencian por presentar distinta expresión peptidérgica y de receptores dopaminérgicos.

La vía estriadopalidal así como la palidonigral contienen el péptido Encefalina expresándose el receptor D₂ (efecto inhibitor de la enzima Adenilato ciclasa), mientras que la vía estriadonigral expresa el receptor D₁ (activador), y como péptidos, la Sustancia P y la Dinorfina (Vicent y col., 1982; Gerfen, 1992) (Figura 6).

Respecto a la localización de los cuerpos celulares dopaminérgicos, se encuentran en la parte compacta de la SN y en dos zonas asociadas a ésta como son la SN parte lateral y el área retrorrubral, así como en el AVT.

El estriado es inervado mayoritariamente por la SNc, mientras que el AVT inerva estructuras más ventrales como el N. Accumbens y el tubérculo olfatorio.

Las neuronas dopaminérgicas ejercen un papel muy importante en la modulación de las aferencias estriatales, así como en las de los ganglios basales en general.

Tanto las proyecciones corticoestriatales, como las estriadopalidales y las estriadonigrales están organizadas topográficamente, lo que significa que partes específicas de la

INTRODUCCIÓN

corteza actúan a través de zonas concretas del estriado, en localizaciones específicas del GP y la SN, considerándose así todo el complejo como una extensión de la organización laminar de la corteza. Esto es posible principalmente gracias a la segregación de las neuronas espinosas de tamaño medio en dos compartimentos distintos con áreas de proyección diferenciadas: el de los estriosomas y el de la matriz, los cuales difieren en el patrón de inmunorreactividad de neuropéptidos estriatales como encefalinas, sustancia P y dinorfina (Parent y col., 2000; Gerfen, 2000).

El circuito comienza en la corteza, inerva al estriado y llega a la SN, bien a través de la vía estriadonigral o bien mediante la vía estriadopalidal y se cierra mediante las neuronas GABAérgicas (y por tanto inhibitoras) de la SNr y del segmento interno del GP que constituyen la mayor eferencia de los ganglios basales, inervando los núcleos talámicos mediodorsal y ventromedial (los cuales proyectan a la corteza frontal) e intralaminar (el cual proyecta al estriado), el colículo superior y el núcleo pedúnculo-pontino. Estas neuronas son tónicamente activas y producirán, por tanto, la inhibición de las células talámicas que proyectan a su vez a las zonas de la corteza implicadas en el control motor. Es importante destacar, que el movimiento, a nivel de ganglios basales, se origina cuando las neuronas talámicas son liberadas

de esta inhibición tónica con la consiguiente actividad motora de la corteza (Figura 6).

Esta inhibición de las neuronas talámicas se puede producir a través de las dos vías que conectan en el estriado y la SN, es decir, la estriadonigral (*vía directa*) y la estriado-palidal (*indirecta*).

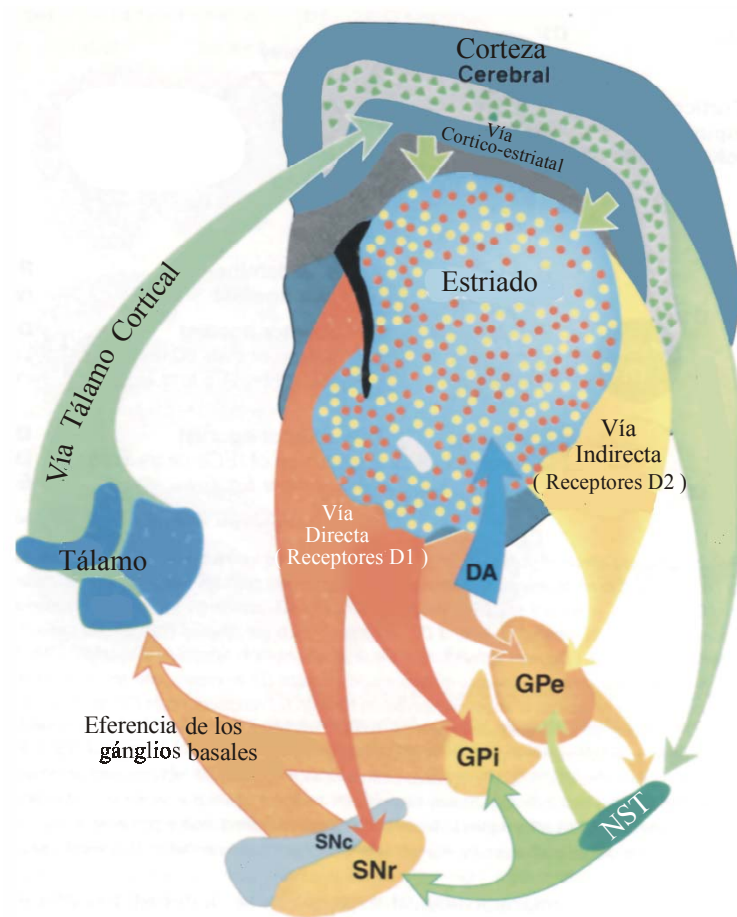


Fig. 6. Esquema que representa las principales conexiones de los ganglios basales. DA: Dopamina, GPe y GPi: segmento externo e interno del globo pálido, respectivamente; Glu: Glutamato; SNr y SNc: sustancia negra reticulada y compacta, respectivamente; NST: Núcleo subtalámico.

INTRODUCCIÓN

En la vía directa, cuando la proyección corticoestriatal, mediada por el neurotransmisor glutamato produce la excitación de las neuronas estriatales, se produce una inhibición fásica, es decir, una inhibición del disparo de las neuronas de proyección de la SN, lo que va a dar lugar a una desinhibición de las neuronas tálamo-corticales (Figura 7).

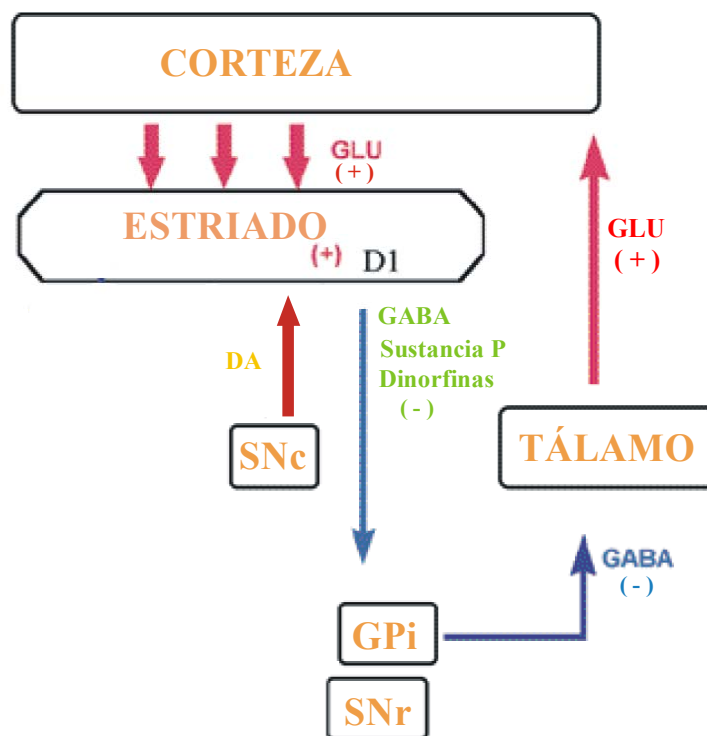


Fig. 7. Esquema que representa la conexión directa en los ganglios basales. DA: Dopamina; Glu: Glutamato; SNr y SNc: sustancia negra reticulada y compacta respectivamente.

Por otra parte, la vía indirecta opera de forma diferente: la excitación córticoestriatal da lugar a la inhibición del segmento externo del GP (también mediada por GABA) y éste a su vez envía una eferencia que también es GABAérgica e inhibe a los núcleos subtalámicos; ahora bien, al verse inhibido el GP produce la desinhibición de los núcleos subtalámicos, cuya proyección a la SN es glutamatérgica y, por lo tanto, excitadora. Esto traería consigo la excitación de las neuronas nigrotalámicas y, por tanto, la inhibición de la vía tálamo-cortical (Figura 8).

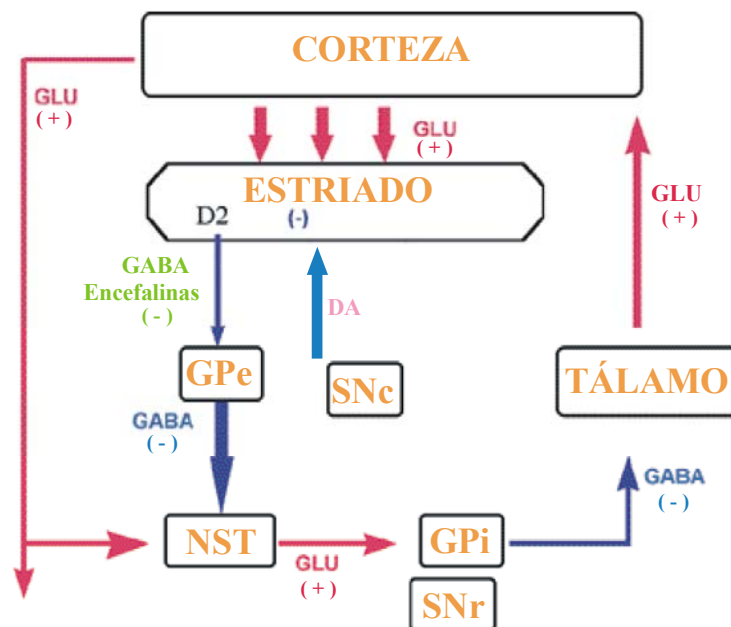


Fig. 8. Esquema que representa la conexión indirecta en los ganglios basales. DA: Dopamina; GPi y GPe: segmento interno y externo del globo pálido, respectivamente; Glu: Glutamato; SNr y SNc: sustancia negra reticulada y compacta respectivamente; NST: Núcleo subtalámico.

INTRODUCCIÓN

Así pues, el resultado de estas dos vías sería opuesto si no se mediara la actividad de la proyección dopaminérgica nigroestriatal. Sobre la vía directa la DA ejerce un efecto excitador, debido a la activación de los receptores D_1 (Figura 7), mientras que sobre la vía indirecta el efecto es inhibitorio mediado por los receptores D_2 puesto que el resultado último es la desinhibición de las neuronas tálamo-corticales (Figura 8). De esta forma, la acción de la proyección dopaminérgica sobre el estriado, a través de las dos vías descritas anteriormente, es una acción facilitadora del movimiento.

Una de las patologías mejor estudiadas de los ganglios basales es la Enfermedad de Parkinson, que se caracteriza por una pérdida de DA estriatal como consecuencia de la muerte de células nigrales (estudiada con más profundidad en el capítulo de Enfermedades neurodegenerativas).

3. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.

Entre las diferentes enfermedades neurodegenerativas destacan:

3.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después de la enfermedad de Alzheimer. La prevalencia de la EP es aproximadamente 0.5 a 1% de las personas entre 65 y 69 años de edad, alcanzándose de 1% a 3% en personas de 80 años de edad y superior.

La etiología de la EP es desconocida, aunque la degeneración fisiológica que acontece con la edad es un factor predisponente, se asocia a factores genéticos y, no existe evidencia alguna para considerar un origen infeccioso de la enfermedad. Estos datos negativos han dado lugar a la búsqueda de factores etiológicos ambientales, y se ha demostrado, por ejemplo, que la EP es algo menos frecuente en pacientes fumadores y que el empleo crónico de insecticidas se asocia a una mayor incidencia de la enfermedad.

Esta enfermedad, conocida también como *parálisis agitante*, es casi invariablemente el resultado de la destrucción extensa de la SN, pero con frecuencia se asocia con lesiones del GP y otras áreas relacionadas.

INTRODUCCIÓN

Clínicamente se caracteriza por: 1) *rigidez* de la musculatura en áreas extensas del cuerpo o en áreas aisladas, 2) *temblor en reposo* en las áreas comprometidas, en la mayoría pero no en todos los casos, y 3) una seria incapacidad de iniciar el movimiento, denominada *acinesia*.

La causa o causas de estas alteraciones motoras son casi desconocidas. Sin embargo, están muy relacionadas con la disminución de la liberación de DA en el núcleo caudado y putamen por las terminaciones nerviosas de la vía nigroestriada. La destrucción de la SN hace que las terminales dopaminérgicas degeneren y que ya no esté presente la DA, liberada en el núcleo caudado y putamen. No obstante, aún existe un gran número de neuronas que liberan el neurotransmisor Acetilcolina (Ach), y éstas transmiten señales excitatorias en estos núcleos. Así pues, en ausencia de la liberación de DA, las vías colinérgicas se tornan excesivamente activas, lo que justifica muchos de los síntomas motores de la EP.

La *rigidez* parkinsoniana es de tipo " plástico ", el movimiento brusco no encuentra habitualmente resistencia intensa a partir de los reflejos de estiramiento y los músculos tanto sinergistas como antagonistas permanecen fuertemente contraídos a lo largo del movimiento. En consecuencia, se cree que la rigidez característica de esta enfermedad es en gran parte el resultado del exceso de impulsos transmitidos por el sistema corticoespinal.

Habitualmente se produce *temblor*, siendo su frecuencia normalmente de cuatro a seis ciclos por segundo. El mecanismo desencadenante del temblor no se conoce, aunque un tipo de tratamiento que lo alivia frecuentemente es la destrucción quirúrgica del núcleo ventrolateral del tálamo, que es una de las vías de retroalimentación desde los ganglios basales hacia la corteza motora. Por esto, se presume que la pérdida de la influencia inhibitoria de la DA en los ganglios basales lleva al estímulo de la actividad del circuito de retroalimentación corticobasal ganglionar-talámico-cortical, provocando una oscilación que produce el temblor muscular.

Aunque la rigidez muscular y el temblor son ambos angustiantes para el paciente parkinsoniano, más seria es la *acinesia* que se produce en los estadios finales de la enfermedad, de manera que para realizar incluso los movimientos más simples la persona debe ejercer el más alto grado de concentración. La causa de la acinesia aún no se conoce aunque se presume que la falta de liberación de DA en el núcleo caudado y putamen por las fibras nigroestriadas permite una actividad excesiva de las neuronas productoras de Ach.

En resumen, la actividad normal de los ganglios basales requiere un equilibrio entre las actividades excitatorias e inhibitorias, y la pérdida de este equilibrio lleva a un sistema de ganglios basales no funcional.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista anatómico-patológico en el examen macroscópico destaca la despigmentación de la SN mesencefálica, secundaria a la intensa pérdida de las neuronas nigrales que contienen melanina. A nivel microscópico se observa gliosis reactiva y en el citoplasma de las escasas neuronas que persisten se observan cuerpos de Lewy que son inclusiones redondeadas, eosinofílicas, constituidas por filamentos de 10 nm de grosor que reaccionan con anticuerpos antineurofilamento y ubiquitina. No hay lesiones estriatales ni palidales. Es un parkinsonismo en el que se degeneran las terminales dopaminérgicas presinápticas y en el que se conservan los receptores dopaminérgicos mayoritariamente postsinápticos, esto es, estriatales.

3.2. COREA.

La corea, término que procede del griego *coreus*, baile, consiste en movimientos involuntarios irregulares, rápidos e imprevisibles, que fluyen de una parte a otra del cuerpo de forma continua y aleatoria.

Generalmente la corea se asocia a una impersistencia motora con incapacidad para mantener una contracción muscular sostenida.

Existen numerosas causas que pueden provocar este tipo de movimiento anormal. Entre las coreas hereditarias existen dos de gran importancia: la *enfermedad de Wilson* cuyo gen se halla en el cromosoma 13 y la *enfermedad de Huntington*, de herencia dominante, localizada en el brazo corto del cromosoma 4. La enfermedad de Huntington es una afección degenerativa crónica caracterizada por movimientos coreicos, y deterioro mental progresivo que normalmente se inicia en la edad adulta.

En este tipo de corea existe una degeneración difusa y extensa de neuronas tanto en el núcleo caudado como en el putamen. Las neuronas más comprometidas son las que liberan el transmisor inhibitorio GABA, pero también degeneran algunas de las neuronas que liberan Ach. De esta forma la falta de las neuronas que liberan GABA elimina la inhibición de la vía estriadonigral y permite que las neuronas secretoras de DA de la SN se tornen sumamente hiperactivas. Esto a su vez permite la liberación excesiva de DA por las fibras nigroestriadas que vuelven al núcleo caudado y putamen, inhibiendo de forma importante a ambos núcleos. Además, la degeneración de neuronas que liberan Ach produce depresión adicional en estos núcleos, pudiendo interrumpir alguno de los haces de retroalimentación desde la corteza hacia los ganglios basales y nuevamente hacia la corteza a través del tálamo, causando así los movimientos anormales.

INTRODUCCIÓN

3.3. BALISMO.

El término Balismo se utiliza para designar un movimiento anormal proximal, brusco, rápido y violento, con un patrón motor prácticamente constante y estereotipado. Normalmente se halla limitado a un hemisferio (hemibalismo), aunque raras veces puede ser bilateral (parabalismo). El hemibalismo se asocia en general a lesiones del núcleo subtalámico, aunque se ha descrito también en lesiones de los núcleos caudado y putamen, el tálamo y la corteza.

3.4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

En 1911, Alois Alzheimer describió una alteración neuropsiquiátrica que afectaba a personas de edad avanzada, que actualmente es ampliamente conocida con el nombre de *enfermedad de Alzheimer* (EA). La EA es la enfermedad neurodegenerativa más común y supone aproximadamente los dos tercios de los casos de demencia (Helmer y col, 2001; Aronson y col, 1991).

La etiología de la EA se asocia con mutaciones de genes localizados en los cromosomas 21, 14, 1 y 19. Por lo tanto, la EA es genéticamente heterogénea, si bien es más aceptada actualmente la hipótesis de la mutación puntual del gen que codifica por la proteína precursora del amiloide (PPA), localizado en el cromosoma 21.

La enfermedad empieza entre los 40 y los 70 años de edad, siendo la sintomatología clínica la siguiente: *progresiva pérdida de memoria, juicio, orientación de la situación física y del lenguaje*, normalmente acompañado de *trastornos depresivos*. El diagnóstico clínico actualmente se realiza basándose en la observación de los síntomas y mediante tomografía de emisión de positrones (PET), aunque el diagnóstico definitivo se realiza por autopsia (Clark y col., 1998). Macroscópicamente hay una atrofia cerebral difusa con preservación relativa de las áreas motora primaria, somatosensorial y visual. Junto con la pérdida neuronal, las lesiones microscópicas características son los ovillos neurofibrilares y las placas seniles; puede observarse también depósitos amiloides en los vasos intracraneales y astrocitosis reactiva fundamentalmente en la corteza temporal. Estudios inmunocitoquímicos han revelado que en la composición de estos filamentos intervienen proteínas de los neurofilamentos, proteínas asociadas a los microtúbulos (especialmente la proteína tau), la ubiquitina, la proteína β -A4 y la proteína A68. Las placas seniles o amiloides tienen un diámetro que oscila entre 5 y 150 μm y constan de un núcleo central, que contiene amiloide y materiales inorgánicos como aluminosilicatos, rodeado de neuritas en diverso grado de degeneración.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha demostrado que las placas amiloides y el amiloide vascular comparten la misma estructura molecular y supramolecular, y aunque aún se desconocen los mecanismos que gobiernan la aparición de estas anomalías estructurales todo apunta a deficiencias en la formación y degradación de los neurofilamentos y microtúbulos, quizá debidas a modificaciones de su fosforilación, que implicarían la formación de polímeros anormales que se agregan como depósitos fibrilares insolubles.

Las lesiones básicas de la EA se distribuyen por el neocórtex y paleocórtex. El área entorrinal se ve gravemente afectada, lo que contribuye a la pérdida de aferencias del hipocampo. También se degeneran núcleos de proyección neocortical colinérgicos (núcleo basal de Meynert), serotoninérgicos (núcleos del rafe) y noradrenérgicos (locus coeruleus).

Desde el punto de vista de la fisiopatología de la EA la degeneración cortical difusa es responsable del deterioro de las funciones cognitivas del sistema nervioso y de la personalidad. La afectación y pérdida de aferencias del hipocampo y la degeneración de los núcleos colinérgicos basales justifican, al menos en parte, la relevancia de los trastornos amnésicos. En relación a la aparición de alteraciones de la atención y de fenómenos depresivos es probable que desempeñe un papel primordial la degeneración de los sistemas de proyección noradrenérgicos y serotoninérgicos.

4.- MANGANESO: ESENCIAL Y TÓXICO.

El manganeso es un metal pesado que se considera oligoelemento, siendo su ingesta diaria recomendada en individuos adultos de 2 mg/día. Este bioelemento se encuentra en fuentes de origen vegetal como son: piña y su zumo, almendras, cacahuetes, grano de avena, arroz, habas, espinacas, patatas, te verde y negro. El manganeso juega un papel muy importante en numerosos procesos fisiológicos como constituyente de algunas enzimas y activador de otras (Nielsen., 1999).

Entre las funciones del manganeso destacan:

1.- *Función antioxidante*, puesto que forma parte del centro activo de la enzima Manganeso Superóxido Dismutasa (MnSOD), que es el principal sistema antioxidante de la mitocondria. Este orgánulo consume el 90% del oxígeno utilizado por las células, lo que la hace especialmente vulnerable al estrés oxidativo, y el anión superóxido es una de las especies reactivas de oxígeno que se produce en la mitocondria durante la síntesis de ATP. De esta forma, la enzima MnSOD cataliza la conversión de los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno, que posteriormente es transformado en agua mediante otras enzimas antioxidantes (Leach, 1997).

INTRODUCCIÓN

2.- *Función metabólica*, ya que existen enzimas que se activan por manganeso, que intervienen en el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y colesterol (Hurley y Keen, 1987)

Así pues, la enzima Piruvato carboxilasa, enzima que posee manganeso, y la enzima Fosfoenolpiruvato carboxikinasa, enzima que se activa por manganeso, juegan un papel crítico en la Gluconeogénesis. Asimismo, la Arginasa, que también contiene manganeso participa en el ciclo de la urea (Leach, 1997).

3.- *Desarrollo del hueso*. Se ha comprobado que la deficiencia del manganeso origina un desarrollo anormal del esqueleto en un gran número de especies animales. Esto es así porque el manganeso es el cofactor preferido de una familia de enzimas denominadas Glucosiltransferasas, necesarias para la síntesis de proteoglicanos, compuestos esenciales para la síntesis adecuada de cartílago y hueso (Keen, 1996).

4.- *Cicatrización de heridas*. La cicatrización de heridas es un proceso complejo que requiere una elevada producción de colágeno.

Así pues, el manganeso es fundamental para la activación de la enzima Prolidasa que actúa proporcionando el aminoácido prolina para la síntesis de colágeno por las células humanas (Muszynska y col.,2000). También, la síntesis de glucosaminoglicanos, en la que intervienen las glucosiltransferasas activadas por manganeso, juega un papel muy importante en la cicatrización de heridas (Shetlar y Shetlar, 1994).

Sin embargo, en contraposición a estos efectos beneficiosos del manganeso se encuentra su toxicidad, ya que el manganeso es un metal que en elevadas concentraciones se considera tóxico ambiental puesto que se han descrito casos de intoxicación crónica por el mismo tras exposiciones laborales continuas, ya que su uso está muy extendido en la industria metalúrgica y también se emplean compuestos de manganeso como el Etilen-bis-ditiocarbamato de manganeso (MANEB) con acción herbicida y fungicida, así como el Metilciclopentadienil tricarbonilo de manganeso (MMT) utilizado como aditivo en varios países. Por lo tanto, normalmente la exposición al manganeso se produce por vía inhalatoria al inspirar partículas que contienen dicho metal (Keen y col., 1999; Pal y col., 1999) y, a diferencia del manganeso que es ingerido éste es transportado directamente al cerebro antes de poder ser metabolizado por el hígado (Davis, 1998).

INTRODUCCIÓN

Parece ser que el manganeso a nivel central actúa inicialmente sobre los astrocitos como células diana, debido a la elevada afinidad que presentan estas células mediante su sistema de transporte específico para este metal (Aschner y col., 1992) y su gran capacidad de almacenamiento. Se sabe que se almacena 200 veces la concentración extracelular, alcanzándose una concentración intracelular de manganeso de al menos 50-75 μ M (Tholey y col., 1987) de los cuales el 60-70% son secuestrados por la mitocondria y el resto queda en el citosol.

La exposición crónica de manganeso trae consigo una pérdida neuronal en las estructuras de los ganglios basales: GP, núcleo caudado, putamen, SN, presencia ocasional de cuerpos de Lewy (Pal y col., 1999; Calne y col., 1994), acompañado de unos cambios neuropatológicos muy significativos en los astrocitos, que se conocen como *Astrocitosis de la EA tipo II* (Olanow y col., 1996; Hazell, 2001). Estos astrocitos se caracterizan por presentar un núcleo pálido y alargado, una cromatina aislada y un nucleolo prominente.

En relación al mecanismo responsable de la acción tóxica del manganeso es importante destacar que el primer paso es la entrada del manganeso en la mitocondria donde inhibe la fosforilación oxidativa (Gavin y col., 1992) y a continuación se producen una serie de alteraciones bioquímicas, que son las siguientes:

- *Efectos del manganeso en el núcleo celular.*

El manganeso posee capacidad para unirse fuertemente a diferentes estructuras del ADN (Kennedy y Bryant, 1986; Wang y col., 1995) lo que produce la desestabilización de la cadena de ADN en los astrocitos tras la exposición crónica de manganeso. Estos efectos pueden conducir a cambios conformacionales en la estructura del ADN lo que altera la eficiencia de la transcripción génica. Además, el manganeso puede inducir mutagénesis al interactuar con el ADN y la enzima ADN Polimerasa I durante la replicación (El-Deiry y col., 1984), lo que produce alteraciones de la expresión génica. Además, un efecto propio del manganeso a diferencia de otros cationes divalentes es que especifica el sitio de inicio de la transcripción de la cromatina (Zhang- Keck y col., 1988), lo que sugiere que puede ser capaz de regular la inducción de ciertos genes.

INTRODUCCIÓN

- *Manganeso y radicales libres.*

El manganeso posee distintos estados de oxidación (Mn^{2+} , Mn^{3+} y Mn^{7+}) lo que le proporciona capacidad prooxidante y antioxidante (Kono y col., 1976; Donaldson, 1981). El paso de Mn^{2+} a Mn^{3+} produce aumento de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica y daño en la membrana celular (Sun y col., 1993; Desole y col., 1995).

Por otra parte esta transformación puede convertir a este metal en un antioxidante, lo que da lugar a la neutralización de las especies reactivas de oxígeno mediante la producción de peróxido de hidrógeno (Chang y Kosman, 1989). De hecho, el Mn^{2+} se ha considerado un efectivo *scavenger* de radicales libres (Gerber y col., 2002). Sin embargo, también es importante destacar que el peróxido de hidrógeno es una fuente para la producción de RL bajo condiciones apropiadas.

- *Descenso de la recaptación de Glutamato.*

El estudio cinético parece mostrar que el manganeso produce una inhibición no competitiva del transportador de glutamato (Hazell y Norenberg, 1997), es decir, se une a dicho transportador en una localización distinta al sustrato, lo que reduce la recaptación de este último por las células gliales y por tanto permanece el glutamato en el espacio sináptico durante más tiempo ejerciendo su acción excitadora. Este mecanismo corrobora estudios previos que mostraban que la acumulación de manganeso en el cerebro produce un tipo de

neuropatología que consiste en un mecanismo excitotóxico (Brouillet y col.,1993).

- *Aumento por manganeso en la densidad de los sitios de unión para el receptor de Benzodiazepinas de tipo periférico (PTBR).*

Este receptor se expresa fundamentalmente en la membrana externa mitocondrial de los astrocitos (Anholt y col.,1986) y se encuentra implicado en el metabolismo oxidativo, la proliferación mitocondrial y la síntesis de neuroesteroides (Papadoupoulos, 1993). De hecho, se sabe que algunos neuroesteroides como 3α -hidroxi- 5α -pregnano-20-ona y la pregnenolona pueden alterar la excitabilidad neuronal y además contribuir a un fallo en la regulación de la integridad funcional del cerebro (García-Segura y col., 1994; Jung-Testas et al., 1992).

- *Aumento de la expresión génica y la actividad de la enzima glicolítica Gliceraldehido-3-fosfatodeshidrogenasa (GADPH)* (Hazell y col., 1999a), que además de intervenir en el metabolismo energético se sabe que también está implicada en el mantenimiento de los elementos del citoesqueleto (Méjean y col.,1989; Minaschek y col., 1992), unión a ácidos nucleicos (Nagy y Rigby, 1995) y en el proceso de apoptosis (Ishitani y col., 1996; Saunders y col., 1997), procesos clave para explicar la toxicidad del manganeso.

INTRODUCCIÓN

- *Inhibición de enzimas de la cadena respiratoria* como Aconitasa, NADH-Ubiquinona reductasa (Complejo I) y Succinato Deshidrogenasa (Complejo II), lo que contribuye a la disfunción mitocondrial (Brouillet y col., 1993) (Fig. 9).

- *Aumento de la recaptación de L-Arginina*, precursor del óxido nítrico, junto con aumento de la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), lo que conducirá a la generación de Especies Reactivas de Oxígeno en exceso como consecuencia de la producción de óxido nítrico aumentada (Hazell y Norenberg, 1998).

Estas alteraciones en la expresión génica, fallo en el metabolismo energético, producción de especies reactivas de oxígeno, aumento extracelular de la concentración de glutamato y excitotoxicidad pueden jugar un papel esencial en la muerte celular producida por manganeso. Este hecho explica cómo tras producirse pérdida de neuronas en estructuras de los ganglios basales, la intoxicación crónica por manganeso se presenta con síntomas neuropsiquiátricos (Erikson y col., 2005) que se suelen manifestar como síntomas extrapiramidales parecidos a la enfermedad de Parkinson, entre los que se encuentran bradiquinesia y distonía, de manera que a este síndrome se le conoce con el nombre de parkinsonismo (Barbeau., 1984; Devenyi y col., 1994; Chang y Kosman, 1989; Wang y col., 1999), afectación que en ocasiones aparece precedida de síntomas psiquiátricos como irritabilidad, agresividad e incluso alucinaciones (Calne y col., 1994; Pal y col., 1999).

5. RELACIÓN EXISTENTE ENTRE HIERRO Y MANGANESO.

La neurotoxicidad de manganeso también se asocia a interacción con hierro a nivel sistémico y celular (Zheng y col., 1998; 1999; Zheng y Zhao, 2001). Debido a la exposición a manganeso existe una gran entrada de hierro de la sangre al fluido cerebroespinal, posteriormente a la matriz extracelular y desde ahí al espacio intracelular (Zheng y col., 1999; Zheng y Zhao., 2001).

Desde un punto de vista químico, el manganeso se parece al hierro en algunos aspectos como poseer las mismas valencias 2+ y 3+ que cambian bajo condiciones fisiológicas. Además, posee similar afinidad de unión a la *proteína plasmática transportadora transferrina* (Aschner y col., 1999). No obstante, la toxicidad del manganeso se debe principalmente al manganeso intracelular. Parece ser que el manganeso es introducido en las células a través de la *proteína transportadora de hierro DMT1* (Transportador de metales divalentes 1; Gunshin y col.,1997; Fleming y col., 1998). DMT1 es un transportador ubicuo de los metales divalentes y es el responsable de la recaptación de algunos metales divalentes incluyendo Fe^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} (Gunshin y col., 1997). Así pues, los efectos del manganeso se encuentran condicionados por la inhibición competitiva del transportador de hierro.

INTRODUCCIÓN

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que existen niveles de hierro elevados en determinadas regiones cerebrales en pacientes de una amplia variedad de enfermedades neurológicas, incluyendo la toxicidad por manganeso (Shoham y Youdim, 2000). El hierro es un agente oxidante extremadamente potente, y en presencia de peróxido de hidrógeno puede estimular la producción de gran cantidad de radical hidroxilo, mediante la reacción de Fenton, capaz de producir estrés oxidativo, peroxidación lipídica y eventualmente muerte celular.

Estos hechos han orientado a la realización de estudios empleando manganeso y desferroxamina, quelante del ión Fe^{3+} , pudiéndose observar que la desferroxamina incrementa la toxicidad del manganeso (Roth y col., 2002). Posiblemente este hecho se deba a que al disminuir los niveles de hierro libre, producido por la acción quelante de la desferroxamina, se favorezca el transporte de manganeso al interior de las células directamente mediante DMT1 (Roth y col., 2002).

Una vez en el interior de la célula, el manganeso se deposita principalmente en la mitocondria puesto que ésta toma $\text{Mn}(\text{II})$ a través del uniporte de $\text{Ca}(\text{II})$ (Wedler y col., 1989; Gavin y Gunter, 1996; Brown y Taylor, 1999) y se produce una salida lenta de manganeso de la misma, lo que da lugar a su acumulación en este orgánulo (Gavin y Gunter, 1996).

Algunas enzimas críticas de la cadena respiratoria mitocondrial contienen estructuras [Fe-S] en su centro activo y parece ser que el manganeso compite con el hierro y lo desplaza de su unión al S. Así pues, entre las enzimas que resultan afectadas destacan la Aconitasa, NADH-Ubiquinona reductasa (Complejo I) y Succinato deshidrogenasa (SDH) (Complejo II).

La aconitasa mitocondrial es responsable de la conversión enzimática de citrato en isocitrato en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Su centro activo posee una estructura cúbica formada por 4Fe-4S, que es donde se fija el citrato (Kennedy y Stout, 1992; Lauble y col., 1992). Por otra parte, la aconitasa citosólica también se conoce como proteína reguladora de hierro 1 (IRP-1 o ACO 1), ya que regula el metabolismo de hierro intracelular mediante su unión y desunión a ARNm, de manera que cuando los niveles de hierro celular son insuficientes IRP-1 asume una configuración [3Fe-4S] , pierde su actividad enzimática y se transforma en una proteína de unión al ARNm produciéndose un aumento de la recaptación de hierro intracelular (Klausner y col., 1993).

Sin embargo, se sabe que el manganeso se une al cuarto sitio de la aconitasa y aumenta la capacidad de ésta para unirse al ARNm. De esta forma se produce un aumento de los niveles celulares de hierro, lo que potencia la citotoxicidad por este metal (Zheng y col., 1998; Zheng y Zhao, 2001; Zheng, 2001).

INTRODUCCIÓN

El Complejo I, que cataliza la transferencia electrónica desde el cofactor NADH al aceptor Ubiquinona, también contiene grupos [Fe-S] en su centro activo (Ohnishi, 1998). Esta enzima de la cadena respiratoria mitocondrial se asocia a la etiología de alteraciones neurodegenerativas y de hecho se ha podido observar en estudios postmortem una reducción de la actividad del mismo en pacientes de enfermedad de Parkinson en la SN, plaquetas y el músculo esquelético.

Por tanto, todo esto desemboca en interrupción de la función mitocondrial, que conlleva cambios en el potencial de membrana, lo que causa alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, que en última instancia conducirá a la muerte celular (Gavin y col.,1992,1996; Galvani y col.,1995).

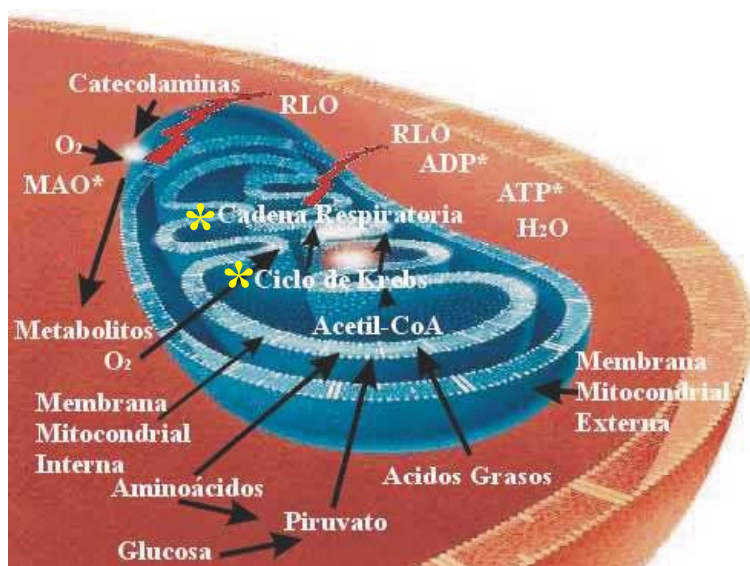


Fig. 9. Lugares de actuación del manganeso a nivel mitocondrial (asteriscos).

6. RESPUESTA GLIAL.

6.1. ASTROCITOS.

Los astrocitos constituyen una importante proporción de la población del SNC y participan en una gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos.

Una de las características más destacadas de los astrocitos es su vigorosa respuesta ante diversos daños neurológicos. La respuesta astrogliar se produce de manera rápida y se puede detectar una hora después de un trauma focal mecánico (Mucke,1991).

La existencia y rapidez de esta respuesta glial se pone de manifiesto en numerosas infecciones virales (Mrak y col., 2005), en daños agudos traumáticos al cerebro (Eclancher y col., 1990; Kahn y col., 1995; Craig y col., 1996; Rabchevsky y col., 1998) y en algunas enfermedades neurodegenerativas como es la EA (Delacourte, 1990; Mrak y col., 2005). Es importante destacar que el hecho de que esta respuesta se haya conservado evolutivamente en una gran cantidad de especies indica que los astrocitos reactivos deben realizar misiones importantes en el SNC. Así pues, el SNC responde al daño mediante un aumento en el número y en el tamaño de las células que expresan la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), fenómeno que se denomina “ astrocitosis reactiva “. Dicha proteína es una molécula del citoesqueleto celular que se expresa en la astrogliar (Ridet y col., 1997) y representa el marcador diferencial del fenotipo para estudiar la activación

INTRODUCCIÓN

astroglial (Levine,1994; Kreutzberg, 1996; Fawcett y Asher,1999; Raivich y col., 1999; Eng y col., 2000).

La activación de los astrocitos está asociada con la expresión de nuevas moléculas no detectables en la astrogliá residente, así como la sobreexpresión de algunos factores que se encuentran en la astrogliá normalmente en niveles bajos, como pueden ser el factor de crecimiento transformante y la proteína fibrilar ácida de glía (Logan y col., 1992; Eddleston y Mucke, 1993; Messersmith y col., 2000). Aunque desde hace bastante tiempo se ha pensado que los astrocitos secretan factores que promueven el crecimiento y prolongan la supervivencia de neuronas en cultivo (Moon y col., 2000; Rhodes y col., 2003), sólamente se han podido identificar un número limitado de moléculas gliales que ejerzan un efecto trófico sobre las neuronas, actuando en procesos de metabolismo y reparación neuronal. Entre estas moléculas se encuentran el NGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (b FGF) los cuales son factores que fomentan la supervivencia y la extensión neurítica en algunos tipos de neuronas en cultivo (Engele y Bohn, 1991; Yoshida y Cage, 1992; Brewer, 1999). De esta forma, después de un trauma los niveles de NGF aumentan; ocurre así por ejemplo en el nervio óptico (Walicke y col.,1991) y en el hipocampo (Woodward y col., 1992), siendo la fuente para este factor de crecimiento los astrocitos activados (Labourdette y Sensenbrenner, 1995).

6.2. MICROGLÍA.

Aunque su naturaleza e identidad se han estado debatiendo durante mucho tiempo, ahora se acepta que la microglía forma parte del sistema fagocítico mononuclear (Hickey y col., 1992; Ling y Wong, 1993). Las células microgliales son los " macrófagos del SNC " y forman la interfase entre el parénquima neural y el sistema inmune. La microglía es ubicua y de distribución heterogénea, habiendo más células microgliales en la sustancia gris que en la sustancia blanca; de manera que regiones con alta densidad microglial son el hipocampo, telencéfalo olfatorio, ganglios basales y SN (Perry y Gordon, 1991).

Así pues, en el SNC normal, la microglía es menos abundante que las neuronas y éstas se encuentran en contacto con una o más células microgliales satélite (Palacios G., 1990). Esa proximidad de las membranas de las neuronas y la microglía es necesaria para favorecer la comunicación célula-célula a través de factores que todavía resultan bastante desconocidos. De esta forma, la comunicación neurona- célula microglial se desarrolla mediante moléculas que difunden a través de las membranas, como las citoquinas y receptores de superficie (Harrison y col., 1998).

INTRODUCCIÓN

A pesar de que la comunicación entre las neuronas y la microglía es un proceso recíproco, se cree que las neuronas generan la señal inicial y la microglía actúa como elemento reactivo ante dichas señales; de hecho, se sabe que las neuronas generan una variedad de señales moleculares, algunas de las cuales promueven respuestas tróficas a través de la microglía y otras desencadenan respuestas tóxicas. Por tanto, la forma en la cual la microglía responde al daño neuronal viene determinado por señales neuronales específicas y una de las características más importantes de la microglía es su activación rápida en respuesta a un daño, siendo de vital importancia como factor defensivo del parénquima neural frente a infecciones, inflamaciones, trauma, isquemia y procesos neurodegenerativos (Giulian y col., 1989; Perry y col., 1993; Gehrmann y col., 1995 ; Mirza y col., 2000; De Nicola y col., 2003).

A diferencia de la microglía residente, su forma activada tiene más procesos, siendo éstos más cortos, gruesos y ramificados, mientras que el soma aparece engrosado. Además de los cambios morfológicos, la microglía activada tiene un fenotipo diferente al de la microglía residente, con un aumento de la expresión de antígenos o aparición de otros nuevos tales como el antígeno CR3 identificado mediante tinción con el anticuerpo OX 42 (Figura 10).

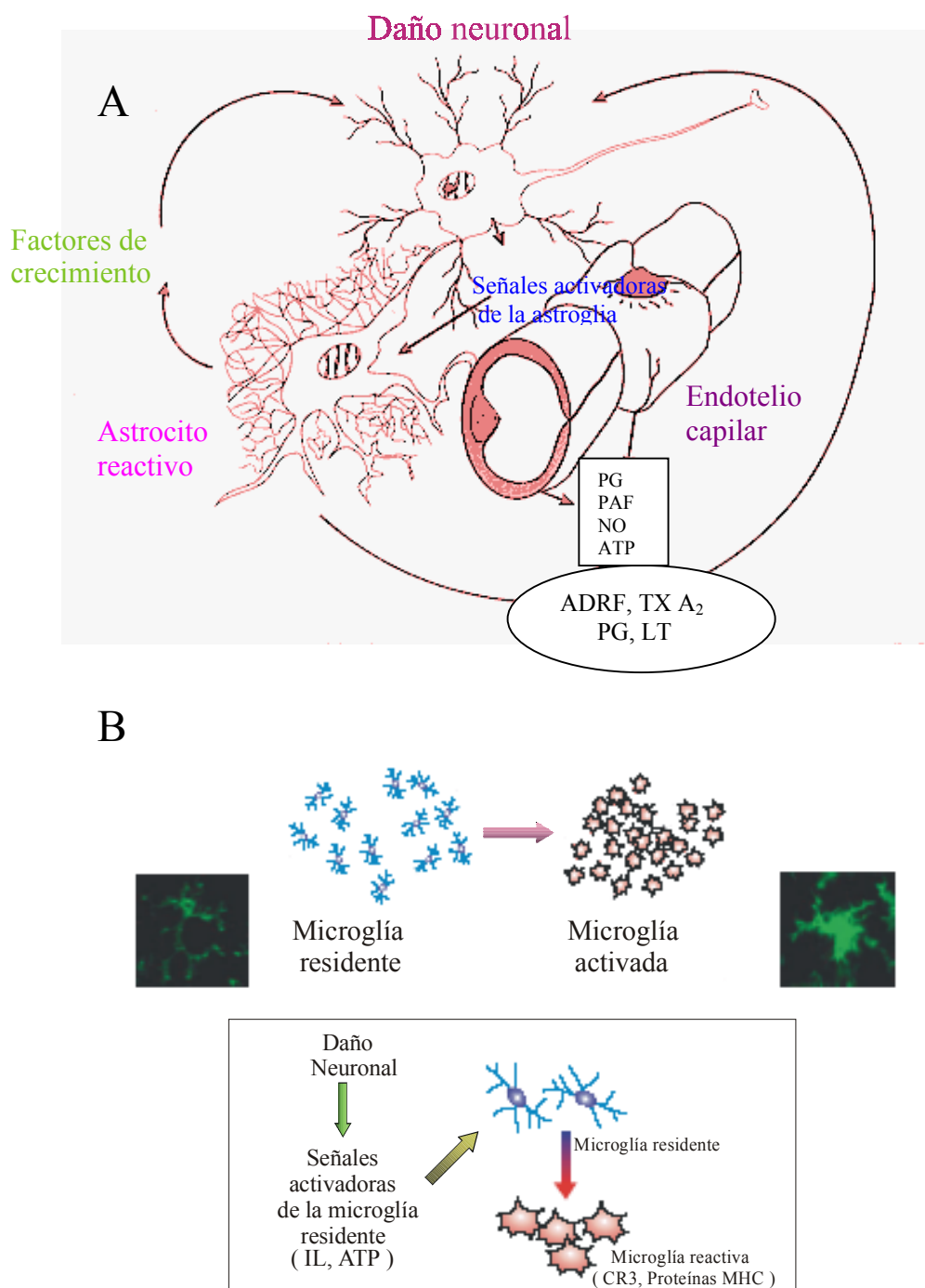


Fig.10. Plasticidad astrocitaria (A) y microglial (B). PG: prostaglandina, PAF: factor activador de plaquetas, TXA₂: tromboxano, NO: Óxido nítrico, ATP: adenosina trifosfato, ADRF (NO): Factor relajante del endotelio, LT: leucotrieno, IL: Interleukina.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Es conocido que el manganeso actúa como un compuesto tóxico en un gran número de procesos y de manera especial en el metabolismo energético, habiéndose descrito su acción en muy diversos órganos, siendo sin embargo el SNC uno de los más afectados, suponiéndosele responsable de un tipo de parkinsonismo. Teniendo en cuenta además que su mecanismo de actuación no está bien establecido nos interesa estudiar el efecto del manganeso, en distintos tejidos y administrado en diferentes condiciones.

En primer lugar estudiaremos su efecto, mediante la administración de una dosis de $MnCl_2$ relativamente baja (6 mg/kg/día) mediante administración parenteral; Y estudiaremos su efecto principalmente a nivel del SNC fijándonos de una manera especial en su posible acción sobre el sistema dopaminérgico y los ganglios basales ya que se ha descrito su posible responsabilidad en la aparición de parkinsonismo en trabajadores relacionados con este metal. Para ello utilizaremos ratas de 18 meses, ya que ha sido descrito un mayor efecto del manganeso en animales de más edad, considerando que animales de 18 meses son adultos mayores.

En este estudio, mediremos el comportamiento del metabolismo energético, mediante la determinación de la actividad Succinato deshidrogenasa (SDH), en distintas estructuras del SNC.

OBJETIVOS

En estas mismas estructuras llevaremos a cabo el estudio de los efectos sobre el sistema dopaminérgico, valorando los efectos sobre la enzima TH y el sistema transportador de DA. También se evaluarán los efectos sobre el sistema GABAérgico. A su vez, el daño o proceso degenerativo se pondrá de manifiesto estudiando el comportamiento de la glía, microglia y astrogliá, usando técnicas de inmunohistoquímica.

Una de las posibles actuaciones principales del manganeso es su acción inductora de estrés oxidativo, si bien no está completamente establecida. Nosotros estudiaremos esta acción pero no centrándonos únicamente en las estructuras del SNC posiblemente implicadas en su relación con el parkinsonismo, sino también en otras estructuras cerebrales y órganos periféricos. Esto nos permitirá conocer si la acción del manganeso es un efecto específico de órgano o si por el contrario es un efecto más generalizado, y que probablemente se vuelve específico por la mayor sensibilidad o vulnerabilidad de algunas estructuras. Para este estudio utilizaremos dos abordajes diferentes:

a) Un tratamiento mediante la inyección intraperitoneal de 20 mg/kg/día de $MnCl_2$ en animales jóvenes de 3 meses durante 15 días.

b) Asimismo es conocida la relación entre el hierro y el manganeso. Esta relación nos parece muy interesante, pues probablemente sea determinante de la acción tóxica del manganeso, desde el punto de vista de su transporte, acumulación, etc. Por esto nos ha parecido de suma importancia estudiar el efecto del manganeso en relación a la concentración de hierro. Para ello, utilizaremos distintos tipos de tratamientos que nos permitan modificar la concentración de hierro al mismo tiempo que la de manganeso. Con este fin emplearemos: A) Animales a los que se alimenta con dieta normal. De estos animales, a un grupo se le inyectará $MnCl_2$ y a otro, considerado grupo control, no se le efectuará dicha administración; B) Animales alimentados con una dieta sintética, ver Material y Metodos, exenta de hierro. Análogamente a lo anterior también se establecerán dos grupos: uno al que se administrará $MnCl_2$ y otro al que no se le inyectará dicha sustancia. En este estudio comparativo podremos observar el efecto de la disminución o al menos del mantenimiento de la concentración de hierro, teniendo en cuenta que el hierro acumulado es bastante importante y que tarda tiempo en ser eliminado, y por último; C) Animales a los que se trata con desferroxamina, un quelante de hierro, usado en clínica para producir la eliminación de hierro, (ver Material y Métodos) en primer lugar, y posteriormente se alimenta, durante todo el tiempo del experimento, con una dieta exenta de hierro.

OBJETIVOS

Una tanda de este último grupo de animales se tratará mediante inyección intraperitoneal con 20 mg/kg/día de $MnCl_2$ durante un mes.

Los animales sometidos a este estudio eran de 12 meses de edad.

Estos grupos de animales nos permitirán un estudio comparativo de la influencia del hierro sobre la acción tóxica del manganeso. Para ello se utilizarán prácticamente todos los órganos y tejidos de dichos animales. Así pues, los tejidos de los órganos periféricos se emplearán para llevar cabo los estudios del posible daño oxidativo, mediante la determinación de diferentes parámetros de oxidación: oxidación de lípidos, valorada mediante la cuantificación de peróxidos lipídicos y MDA y oxidación de proteínas, indicada por el nivel de grupos carbonilos. Esto permitirá conocer la acción inductora de estrés oxidativo del manganeso en función de la concentración de hierro, así como su mayor o menor efecto en los distintos órganos.

Por último, el SNC de dichos animales nos ayudará a conocer los efectos sobre sus estructuras. Aquí pondremos a punto una técnica de inmunohistoquímica que nos facilite hacer un estudio semicuantitativo, en cortes y estructuras de los grupos carbonilos de las proteínas, o sea, de su estado de oxidación. El proceso de degeneración se pondrá de manifiesto estudiando el comportamiento de la glía, astrogliá y microgliá por métodos inmunohistoquímicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo las directrices del Consejo de Europa (86/609/EU), la normativa española (B.O.E. 67/8509-12, 1988) y mediante técnicas aprobadas por el Comité científico de la Universidad de Sevilla.

En los experimentos realizados se utilizaron ratas macho de la raza Wistar de 3, 12 y 18 meses de edad criadas en nuestro laboratorio con libre acceso a agua y comida (dieta de mantenimiento A 04 de Panlab S.L.), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad.

Los animales utilizados para técnicas bioquímicas fueron sacrificados entre las 10 y 11 horas a.m. Los cerebros fueron rápidamente diseccionados sobre hielo, separándose las distintas estructuras según el atlas de Paxinos y Watson (1986). Todas las estructuras se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

2. REACTIVOS.

El Cloruro de Manganeso (MnCl_2) utilizado fue suministrado por Sigma.

MATERIAL Y MÉTODOS

La perfusión de los animales para las técnicas inmunocitoquímicas se realizó con paraformaldehído de CARLO ERBA.

En las determinaciones inmunocitoquímicas de TH, astrogliá y microgliá se utilizaron los siguientes productos: como anticuerpos primarios se usaron anti-OX42 hecho en ratón (microgliá, Serotec, Oxford, UK;), anti-GFAP hecho en ratón (GFAP, astrogliá, Chemicom, Temecula, CA, USA) y anti-TH hecho en ratón (Roche Diagnostic, Barcelona, España); el anticuerpo secundario utilizado fue en los tres casos un IgG biotinilado hecho en caballo contra ratón (Vector), mientras que como sistema de revelado se utilizó el Kit ABC (Pierce).

En la inmunocitoquímica frente a grupos carbonilos se utilizó como anticuerpo primario, un anti-dinitrofenilhidracina hecho en conejo (Dako) y como anticuerpo secundario un IgG biotinilado hecho en cerdo contra conejo (Dako). Del mismo modo, se empleó también el Kit ABC para el revelado.

El suero utilizado en ambas técnicas inmunocitoquímicas fue suero de caballo suministrado por Vector (UK).

Asimismo, en la inmunocitoquímica de grupos carbonilos se empleó 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) de Sigma para la tinción de los mismos, así como ácido clorhídrico de Panreac para eliminar el exceso de marcaje.

Para el revelado de ambas técnicas inmunocitoquímicas se utilizó tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB), Sigma.

En la técnica histoquímica la enzima SDH se empleó nitro- blue- tetrazolium de Sigma, Succinato de Merck y ácido nitropropiónico, inhibidor selectivo de la enzima, suministrado por Sigma.

En los estudios de hibridación *in situ* se usó dietilpirocarbonato de Serva, como inhibidor de las ribonucleasas a lo largo de todo el ensayo y uridina 5'- [³⁵ S] trifosfato (UTP) de New England Nuclear como marcador del ARNm. Para la transcripción de la sonda se empleó polimerasa de ARN SP6 facilitada por Boehringer Mannheim y microcolumnas ProbeQuant G-50 de Pharmacia Biotech para la separación del UTP no incorporado a la sonda.

Los reactivos de uso en el ensayo de hibridación *in situ* fueron de calidad para biología molecular. Los demás solventes y reactivos fueron de alto grado de pureza, obteniéndose todos ellos de los proveedores habituales.

En la determinación de ácido malondialdehído (MDA), indicador de oxidación de lípidos, se empleó una mezcla de reacción constituida por ácido tricloroacético de Merck, ácido clorhídrico de Panreac y ácido tiobarbitúrico de Sigma .

MATERIAL Y MÉTODOS

Por otra parte, para la determinación de los peróxidos lipídicos, también marcador de la oxidación de lípidos, se utilizó reactivo de FOX que incluye naranja de xilenol como colorante, butil- hidroxitolueno para evitar la oxidación de la muestra, ácido sulfúrico y sulfato ferroso amónico, de Sigma. Asimismo, el metanol empleado en esta técnica era de Merck.

Para la determinación de grupos carbonilos en las proteínas, indicador de oxidación de las mismas, se utilizó SDS de Sigma, 2,4-DNPH para unirse a los grupos carbonilos de Sigma, una solución constituida por: Trizma base de Sigma, ácido clorhídrico de Panreac, Glicerol de Panreac y β -mercaptoetanol de Sigma. Además también se empleó ácido tricloroacético para precipitar las proteínas de Merck y una solución de etanol y acetato de etilo para lavar los precipitados, ambos de Scharlau.

Finalmente, se utilizó Guanidina de Sigma para solubilizar las proteínas.

En la determinación de la capacidad antioxidante se empleó una mezcla de reacción que contenía tampón fosfato sódico, ficoeritrina, como compuesto fluoróforo, ambos de Sigma y 2-2'-Azobis (2- Amidinopropano) hidroclorehidrico (AAPH) de Polysciences, Inc.

Se realizó un experimento en el cual se empleó una dieta sintética, siendo su composición por kg de alimento la siguiente:

180 g de lactoalbúmina de Sigma

440 g de dextrina de Sigma

220 g de sacarosa de la marca Azucarera

110 g de aceite de maíz de la marca ASUA

50 g de complejo minerovitamínico, conteniendo hierro o bien desprovisto del mismo, dependiendo de los grupos de tratamiento, aportados por el laboratorio DEX IBERICA.

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación se adjunta la composición de dicho complejo minerovitamínico.

<u>Minerales</u>		<u>Vitaminas</u>	
Calcio	5.0g	A	0.7mg
Cloro	0.5g	D	0.025mg
Magnesio	0.5g	E	18.0mg
Fósforo	3.0g	K	1.0mg
Potasio	3.6g	Biotina	0.2mg
Sodio	0.5g	Colina	750.0mg
Cobre	5.0g	Ac.fólico	1.0mg
Hierro	35.0g	Niacina	15.0mg
Manganeso	10.0g	Pantotenato	10.0mg
Zinc	12.0g	Riboflavina	3.0mg
Yodo	150.0µg	Tiamina	7.0mg
Molibdeno	150.0µg	B ₆	6.0mg
Selenio	150.0µg	B ₁₂	50.0mg

Además a varios grupos de animales se les inyectó Desferroxamina, quelante del hierro, con el nombre comercial de Desferín® del laboratorio NOVARTIS.

3. TRATAMIENTO CON CLORURO DE MANGANESO.

Se trataron ratas de 18 meses mediante la inyección intraperitoneal de Cloruro de manganeso (6 mg/kg/día) durante 30 días.

En un segundo experimento se trataron ratas jóvenes de 3 meses con Cloruro de manganeso (20 mg/kg/día) durante 15 días.

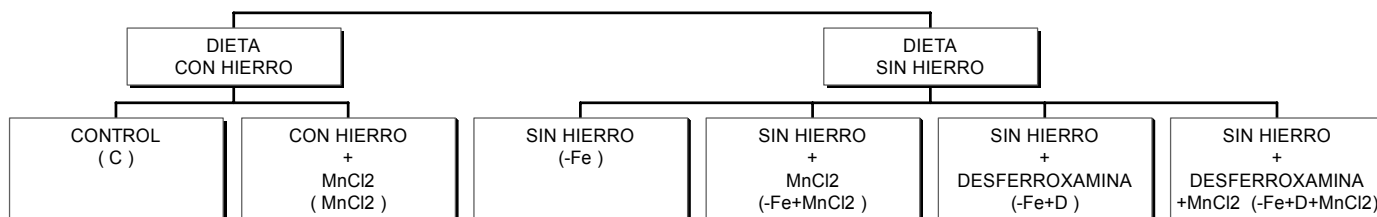
4. TRATAMIENTO CON DIETAS SINTÉTICAS.

En un último experimento para establecer la relación existente entre hierro y manganeso en el sistema nigroestriado, se trataron ratas de 12 meses durante 30 días con la dieta sintética descrita anteriormente, a la que se le adicionó a unos grupos un complejo minerovitamínico que contenía hierro y en otros grupos un complejo minerovitamínico carente del mismo.

Además, unos animales fueron tratados con inyección intraperitoneal de desferroxamina 10 mg/kg/día durante tres días y a su vez a unos grupos se les inyectó intraperitonealmente 20 mg/kg/día de $MnCl_2$ durante 30 días .

MATERIAL Y MÉTODOS

Así pues, el diseño del experimento se puede esquematizar de la forma siguiente:



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 días

CONTROL (DIETA PROVISTA DE HIERRO)



CONTROL+MnCl₂



-Fe (DIETA SIN HIERRO)



-Fe+MnCl₂



-Fe+DESFERROXAMINA



-Fe+DESFERROXAMINA+MnCl₂



5. PERFUSIÓN DE LOS ANIMALES PARA INMUNOCITOQUÍMICA .

Los animales se anestesiaron con hidrato de cloral (400 mg/ kg) y se perfundieron transcardíacamente con 100 ml de cloruro de sodio al 0.9% durante unos minutos y posteriormente con 250 ml de paraformaldehido frío al 4% en tampón fosfato, después de oclusionar la aorta descendente. Seguidamente, los cerebros se extrajeron y post-fijaron con la misma solución de paraformaldehido durante 3 horas a 4°C.

Después de esto, se sumergieron en diferentes concentraciones crecientes de sacarosa (10%, 20%, 30%), se congelaron a -15°C en isopentano y se cortaron en un criostato (Jung CM 1800, Leica) con un grosor de 30µm.

6. PREPARACIÓN DE TEJIDOS PARA HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

Los animales se sacrificaron y se extrajeron los cerebros, los cuales posteriormente se congelaron a -15°C en isopentano. A continuación se cortaron en un criostato (Jung CM 1800, Leica) a un grosor de 12 µm.

7. INMUNOCITOQUÍMICA.

7.1. Inmunocitoquímica frente a TH, OX42 y GFAP.

Los anticuerpos usados fueron:

- TH, que reconoce la enzima Tirosina hidroxilasa
- OX42, contra el complejo CR3 de la cascada inmunitaria
- GFAP, capaz de detectar la proteína fibrilar ácida de astrogía.

Estos tres anticuerpos fueron obtenidos del suero de ratón. Todas la inmunocitoquímicas se realizaron sobre secciones de criostato de 30 μm de grosor y todos los lavados del tejido y las diluciones se realizaron con tampón Tris pH 7.4.

Para los tres anticuerpos se siguió un protocolo común que sólo se diferenció en las concentraciones de los distintos anticuerpos primarios, siendo 1% para el cuerpo OX-42, 0.5% para TH y 0.3% para GFAP.

Las secciones se descongelaron y se dejaron secar durante unos minutos a 40°C en una placa caliente. Después de varios lavados se procedió a la inactivación de la peroxidasa endógena mediante una solución del 0.3% de H_2O_2 en metanol. Se incubaron durante una hora con suero de caballo al 1% en tampón Tris y durante 18 horas con una solución del anticuerpo primario que contenía 0.25% de Tritón X-100 y 1% de suero a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se trataron con una solución de IgG biotinilada de caballo frente a ratón preparada al 0.5% en tampón Tris conteniendo 0.25% de Tritón durante dos horas y una hora con el Kit ABC diluido en tampón Tris.

Finalmente, se procedió al revelado con DAB, deshidratación y montaje para su posterior estudio.

7.2. Inmunocitoquímica frente a grupos carbonilos.

Para la detección de grupos carbonilos, marcadores de oxidación de proteínas, se empleó un anticuerpo anti-DNPH hecho en conejo.

Dicha técnica consistió en lo siguiente:

Las secciones se descongelaron y se secaron en una placa caliente durante unos minutos, se inactivó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 0.3% en metanol y se incubó durante una hora con suero de caballo al 1% en tampón Tris.

Seguidamente, se procedió a la tinción de grupos carbonilos utilizando una solución de 2,4-DNPH (300 mg/100 ml) en etanol al 95% acidificado con ácido sulfúrico concentrado al 1.5% (v/ v). Esta reacción da lugar a la formación de hidrazonas entre la 2,4-DNPH y los grupos carbonilos presentes en las proteínas. La citada tinción se efectuó durante un tiempo de 24h.

Al día siguiente se realizó un lavado con una solución de HCl 2N durante 10 min y varios lavados con tampón Tris.

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, las secciones se trataron con una solución de anticuerpo primario, consistente en un anticuerpo anti-DNPH realizado en conejo al 0.5% en tampón Tris conteniendo 0.25% de tritón X-100 y 1% de suero de caballo, durante 24h.

Se prosigue realizando varios lavados del tejido y la adición del anticuerpo secundario, que es una solución de IgG biotinilada de cerdo frente a conejo, preparada a la dilución 1/50 en tampón tris conteniendo 0.25% de tritón X-100. Dicho anticuerpo se emplea durante dos horas y después de lavar el tejido con tampón Tris se efectúa el revelado con DAB, deshidratación y montaje para su posterior estudio.

8. HISTOQUÍMICA DE SUCCINATO DESHIDROGENASA.

Las secciones de tejido se incuban durante 45 min a 37°C en 50 ml de tampón fosfato 0.06 M (pH 7) que contiene 20 mg de nitro- blue- tetrazolium y 0.68 mg de succinato. Se confirmó la especificidad de la reacción mediante la incubación de las secciones con concentraciones crecientes de ácido 3- nitropropiónico, el cual es un inhibidor selectivo de la enzima.

Finalmente, la actividad enzimática de los animales control y los tratados se evaluó por densitometría óptica basada en una escala calibrada de grises.

9. DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE DE SECCIONES.

Para la deshidratación de las secciones se utilizó un procedimiento general mediante el cual se sumergieron en cada una de las siguientes concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 85, 95, 100%), y seguidamente se mantuvieron durante 15 min en Histolemon. El medio de montaje empleado una vez completado el proceso fue el DPX.

10. HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

10.1. Obtención de la ribosonda.

En nuestro estudio usamos diferentes plásmidos:

- a) El transcrito antisentido de TH se generó a partir de un plásmido facilitado amablemente por el profesor Dr. Sokoloff (INSERM, Paris, Francia), el cual contiene un fragmento de 282 nucleótidos del extremo 3' del gen de TH de rata clonado en el vector PGEM-4Z (Promega). Para preparar la ribosonda antisentido este plásmido se linealizó con EcoRI y se utilizó como molde con la ARN polimerasa T7.
- b) La ribosonda antisentido del DAT se generó a partir de un plásmido cedido amablemente por el Dr. M.P. Martres (INSERM) , el cual contenía un fragmento de 800 pb del cDNA del DAT clonado en el vector pRc /CMV (Invitrogen). Para preparar la ribosonda antisentido del DAT este plásmido se linealizó este con XbaI y se usó como molde con la ARN Polimerasa T7.

MATERIAL Y MÉTODOS

c) Los plásmidos pBbluescript SK, que contienen la secuencia de cDNA para GAD67 como un inserto de 3.2-kb EcoRI (clones 14 y 18), fueron proporcionados amablemente por el Dr. A.Tobín (UCLA, Los Angeles, CA, USA).

El cDNA de GAD67 se aisló de una librería de cDNA de 1 gt-11 realizada a partir de ARN poli (A) procedente de cerebro de rata adulta. Para preparar el transcrito antisentido de GAD67, el clon 14 se linealizó con Sall y se utilizó como un molde con la ARN polimerasa T3. Por otra parte, para preparar el transcrito sentido de GAD67, el clon 18 se linealizó con Sall y se usó también como molde con la ARN Polimerasa T3.

Las sondas antisentido de cDNA de cadena única se sintetizaron con ARN polimerasa T7 y T3 siguiendo el protocolo proporcionado por el laboratorio proveedor de la ARN polimerasa (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD, USA).

Además, la mezcla de reacción contenía: el tampón de reacción proporcionado con la ARN polimerasa, ATP, CTP y GTP cada uno en la concentración 1mM y [³⁵S] UTP (1300 Ci / mmol) 30 μM.

10.2. Reacción de hibridación.

Las secciones de tejido de 12 μm se descongelaron y se post-fijaron en paraformaldehído al 4% durante 30 min, continuándose con tres pasos de lavado en tampón fosfato salino pH 7.4 (PBS) de 10 min cada uno. A continuación, las secciones se trataron con trietanolamina 0.1 M pH 8.0 durante 1 min y con anhídrido acético al 0.25% en trietanolamina 0.1 M durante 10 min, con la finalidad de disminuir la unión inespecífica.

Seguidamente, se realizó un lavado de 1 min en SSC 2X, que contiene NaCl 3 M y citrato sódico 0.3 M, y se deshidrataron las secciones mediante paso por soluciones de concentraciones crecientes de etanol (30, 60, 90 y 100 %) y secadas al aire.

A continuación se procedió a la hibridación de la sonda de [^{35}S] cRNA con su secuencia complementaria. La hibridación se llevó a cabo durante 3 h a 50°C, sumergiéndose posteriormente las secciones, primero, en una solución de SSC 4X con DTT 20 mM y después en una solución de SSC 4X sólo.

Seguidamente, se sometieron durante 30 min a digestión con ribonucleasa (RNasa) a 37°C (20 μg / ml de RNasa A en NaCl 0.5M, Tris-HCl 0.01M y EDTA 1 μM , pH 8.00).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para aumentar la astringencia de las secciones se sumergieron durante 2 h en SSC 2X a 25°C y posteriormente 1 h en SSC 0.1X a 60°C. Finalmente, las secciones se deshidrataron en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (30, 60, 90 y 100%), secadas al aire y procesadas para emulsión autorradiográfica. Los autorradiogramas se generaron enfrentando el tejido marcado a una película β max Hiperfilm durante 2 semanas. Después de mirar los films autorradiográficos secos, los portaobjetos se sumergieron en una emulsión Amersham L1 (diluida 1:1 con agua) y expuesta en oscuridad durante 10-15 días a 4°C. Los portaobjetos fueron revelados en papel Kodak D-19 a 15°C durante 2.5 min, fijados durante 10 min con fijador Kodak y teñidos con cresil violeta (Sigma-Aldrich), para poder realizar la cuantificación de granos de plata.

11. HOMOGENIZACIÓN DE LOS TEJIDOS.

Los tejidos (hígado, corazón, bazo y riñón) fueron homogenizados en tampón 50 mM de ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), 0.2mM de fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF). El homogenizado se centrifugó a 800xg durante 10 min en una centrífuga Modelo J2-21 de BECKMAN. El sobrenadante obtenido, a su vez, fue centrifugado a 5000xg durante 15 min.

Finalmente, el sobrenadante se fraccionó y congeló a -40°C .

Por otra parte, las estructuras cerebrales se diluyeron 1/10 en el tampón citado anteriormente y se sonicaron en un sonicador modelo Vibra cell de SONKS & MATERIAL INC dando 4 pulsos de 15 s con 30 s de descanso entre los mismos. A continuación se centrifugó en una microcentrífuga Hettisch Mikroliter a 14000 r.p.m. durante 10 min y el sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar de nuevo a 14000 r.p.m durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante se fraccionó y congeló a -40°C .

12. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA.

Para determinar la cantidad de proteínas se utilizó el método descrito por Lowry utilizando albúmina bovina como estándar (Lowry y col., 1951).

13. DETERMINACIÓN DE MDA.

Para medir el ácido malondialdehído (MDA) en homogenizado, a una alícuota de 100 μl se le añadió 1ml de una solución que contenía ácido tricloroacético 15%, Ácido tiobarbitúrico 0.375% y HCl 0.25N. La mezcla se calentó 15 min a 100°C y a continuación se centrifugó 20 min a 13000 r.p.m.

MATERIAL Y MÉTODOS

Finalmente, se midió la absorbancia a 535nm ($\epsilon = 153 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro HITACHI U-2001.

14. DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS.

Se partió de una muestra de homogenizado de una concentración de proteínas de 5 mg/ml y a un volumen de 75 μ l se le adicionó 25 μ l de SDS 24% y se calentó 3 min a 100°C. A continuación se le añadió 100 μ l de DNPH 10 mM en ácido trifluoroacético al 10% y se dejó 10 min a 25°C. Seguidamente se le adicionó 100 μ l de una solución de Tris-HCl 2M, Glicerol 30% (v/v) y β -mercaptoetanol 15% (v/v). Luego se adicionó 20 μ l de ácido tricloroacético 50%, se centrifugó a 11000 r.p.m. durante 3 min, se lavó el precipitado 3 veces con etanol / acetato de etilo 1:1, centrifugando 10 min después de cada lavado. Finalmente, se resuspendió este precipitado en 600 μ l de Guanidina 6 M y se midió la absorbancia a 366 nm ($\epsilon = 21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

15. DETERMINACIÓN DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS.

Se determinaron los hidroperóxidos lipídicos mediante la oxidación de Fe^{2+} en presencia de naranja de xilenol (Reactivo de FOX), según el método de Jiang y colaboradores (1991).

Para ello el reactivo de FOX se preparó de la siguiente forma: 100 $\mu\text{moles/L}$ de naranja de xilenol, Butilhidroxitolueno 4 mM, ácido sulfúrico 25mM y sulfato ferroso amónico 250 μM .

A continuación las muestras se mezclaron con 900 μl de Reactivo de FOX y 35 μl de metanol. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 min y seguidamente los viales se centrifugaron a 2400 g durante 10 min. Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 560 nm ($\epsilon = 4.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en un espectrofotómetro HITACHI U-2001.

16. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó según el método descrito por Glaser (1990). Las soluciones de partida fueron tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.0, solución de ficoeritrina 1.7 mM, solución de AAPH 40 mM en tampón fosfato sódico. La longitud de onda de excitación fue 540 nm y la de emisión fue 575 nm. La mezcla de reacción se preparó usando los volúmenes siguientes: Tampón fosfato: 0.89 ml, ficoeritrina: 10 ml, AAPH : 10 ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

La fluorescencia de la ficoeritrina se midió durante 10-15 min en un fluorímetro HITACHI F-2500, tras lo cual se añadió el AAPH incubándolo 5 min antes de medir la capacidad antioxidante de la muestra.

17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los diferentes estudios estadísticos se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de test paramétrico de Scheffe, test " Least Significant Diference " (LSD) o mediante t-Student.

RESULTADOS

1. TRATAMIENTO CON $MnCl_2$ A DOSIS BAJA.

El primer estudio fue investigar el efecto del tratamiento con manganeso en el sistema nigro-estriado de ratas viejas, comparando con otros sistemas dopaminérgicos como el N. Accumbens y AVT. Además estudiamos el efecto en el GP, pues en diversas publicaciones se ha descrito que la intoxicación por manganeso afecta principalmente al GP (Shinotoh, H. y col., 1995), (M. Tomás-Camardiel y col., 2002).

Para ello, se trató con dosis baja (6mg/ kg/ día) de $MnCl_2$ mediante una inyección intraperitoneal durante 30 días a ratas Wistar de 18 meses como se indica en la sección de Material y Métodos.

De esta forma, para estudiar el efecto en el sistema dopaminérgico nigro-estriado se emplearon técnicas inmunocitoquímicas e hibridación *in situ*. También se ha estudiado el efecto del tratamiento con manganeso en el metabolismo energético midiendo la actividad de la enzima SDH, la expresión de mRNA para TH y DAT, marcadores del sistema dopaminérgico y, también, la expresión de mRNA para la enzima Ácido Glutámico Descarboxilasa (GAD67) en dos estructuras diferentes: GP y estriado.

RESULTADOS

También analizamos la respuesta glial tras el tratamiento con $MnCl_2$.

1.1. Inmunocitoquímica frente a TH en SN, AVT, estriado y N. Accumbens.

Las secciones se tiñeron como se indicó en Material y Métodos y la cuantificación de la inmunorreactividad a TH se realizó en la SN compacta, AVT, estriado y N. Accumbens. Cada grupo de tratamiento estaba constituido por cinco animales. El análisis se efectuó en cada sección a un aumento de 40x, lo que permite una visualización representativa de cada región. Así pues, se sumó el valor medio de la densidad para cada sección y se dividió por el número total de secciones analizadas para obtener la medida de la densidad de TH para cada animal. Los resultados se expresaron como porcentajes en relación con los animales controles.

Los niveles de la inmunorreactividad de TH se incrementaron significativamente en los cuerpos celulares de las siguientes regiones: SN (+44% niveles controles, $p < 0.01$) y AVT (+50% niveles controles, $p < 0.01$) tras el tratamiento con $MnCl_2$ (Fig. 1). Por el contrario, el tratamiento con $MnCl_2$ no alteró la densidad de la inmunorreactividad de TH en sus áreas de proyección dopaminérgica en el estriado y en el N. Accumbens (Fig.1).

RESULTADOS

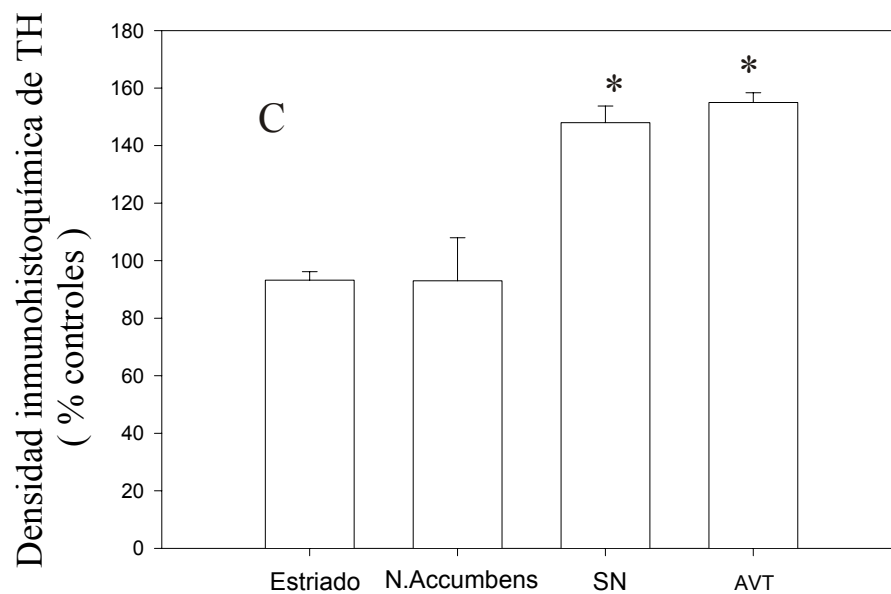
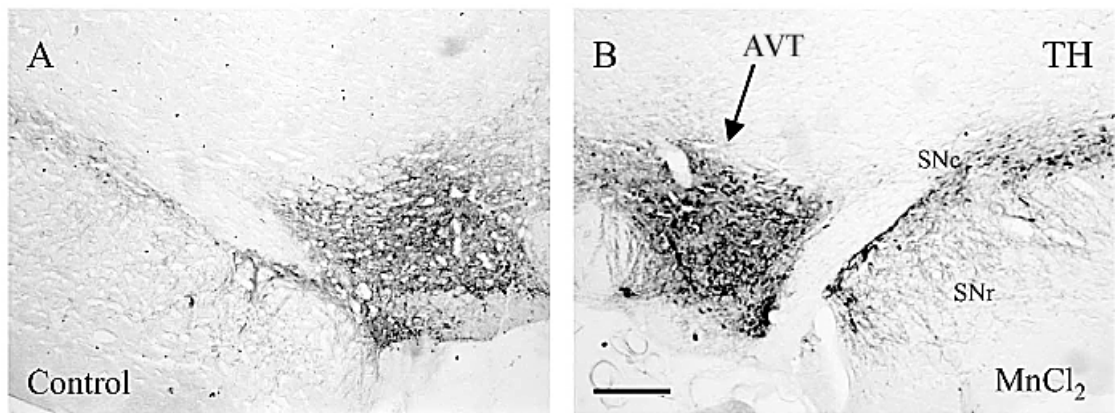


Fig. 1. Inmunorreactividad a TH en controles y en animales tratados con MnCl₂. (A) Control; (B) Tratamiento con MnCl₂. La inmunorreactividad aumentó en animales tratados en comparación con los controles. AVT, área ventral tegmental; SNc, sustancia negra parte compacta, SNr, sustancia negra parte reticulada. Escala = 500µm. (C) Cuantificación de la inmunorreactividad de TH.

Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes y se expresan como densidad óptica (% del control). Significación estadística (t de Student): *, $p < 0.01$.

RESULTADOS

1.2. Cambios en la actividad SDH.

Los análisis mostraron un descenso significativo de la actividad SDH en todo el cerebro. No obstante, los descensos más significativos se encontraron en el estriado, SN, AVT y Núcleos subtalámicos, lo cual se demuestra en la Figura 2. No se midió la actividad SDH en GP debido a la baja actividad intrínseca en este área del cerebro.

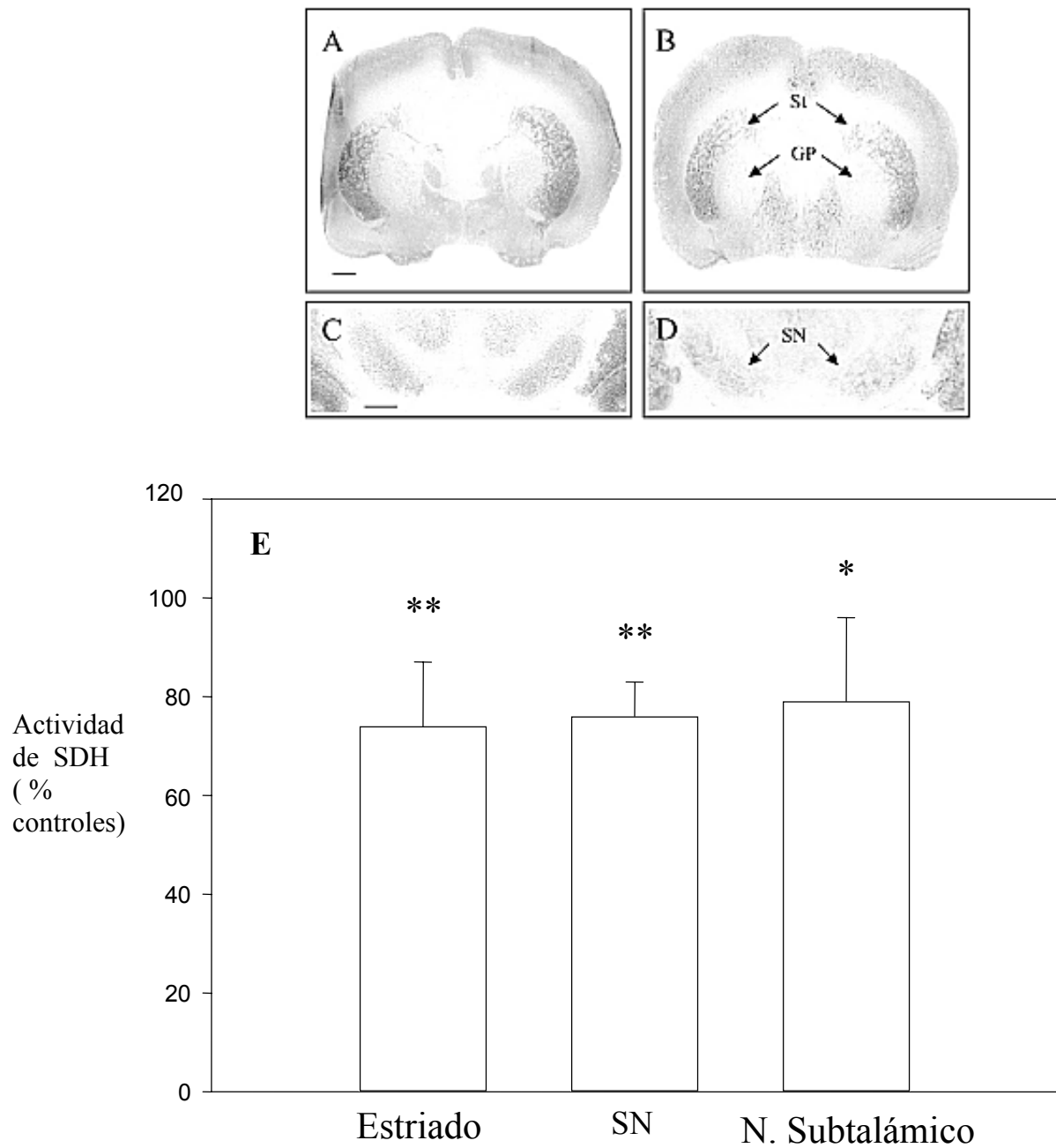


Fig. 2. Histoquímica de SDH en controles y en animales tratados con $MnCl_2$. (A, C) Control; (B, D) Tratamiento con $MnCl_2$; (E) Medidas de densidad óptica expresada en porcentaje del control. Los números son media \pm desviación media de cinco experimentos independientes. Significación estadística (t de Student): *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$. Escala de las barras = 1mm.

RESULTADOS

1.3. Expresión de TH mRNA y DAT mRNA en la SN y AVT.

La hibridación *in situ* de cerebros de animales control y animales tratados con $MnCl_2$ con la ribosonda antisentido para TH mRNA y DAT mRNA dio lugar a un marcaje específico en el mesencéfalo ventral (Fig.3). La disposición típica de las agrupaciones de granos sobre los cuerpos celulares y la localización precisa de estas neuronas en la SNc y el AVT, indica claramente que estas neuronas que expresan TH mRNA y DAT mRNA eran dopaminérgicas.

Para realizar la cuantificación, en una primera etapa se realizó un análisis de densidad óptica de los films autorradiográficos. Dicho análisis densitométrico mostró una elevación significativa de los niveles de mRNA de TH en SN y AVT después del tratamiento con manganeso en comparación con los controles, obteniéndose un nivel de mRNA de TH en animales tratados de 169% y 159% respecto de los niveles controles para la SN y AVT, respectivamente, $p < 0.01$ (Figs. 3 y 4A). Por el contrario, los niveles de DAT mRNA fueron similares en los animales tratados con manganeso a los de los niveles de los controles en ambas estructuras (Figs. 3 y 4A).

El análisis de la expresión celular de mRNA de TH en la SN y AVT mediante la cuantificación de los granos de plata demostró el efecto inducido por el manganeso sobre la expresión de mRNA de TH. Los niveles celulares de mRNA de TH en las neuronas dopaminérgicas individuales en respuesta al tratamiento con $MnCl_2$ fueron los siguientes: SN, 161% de los niveles controles, $p < 0.01$; AVT: 123% de los niveles controles, $p < 0.05$ (Figs. 3 y 4B).

RESULTADOS

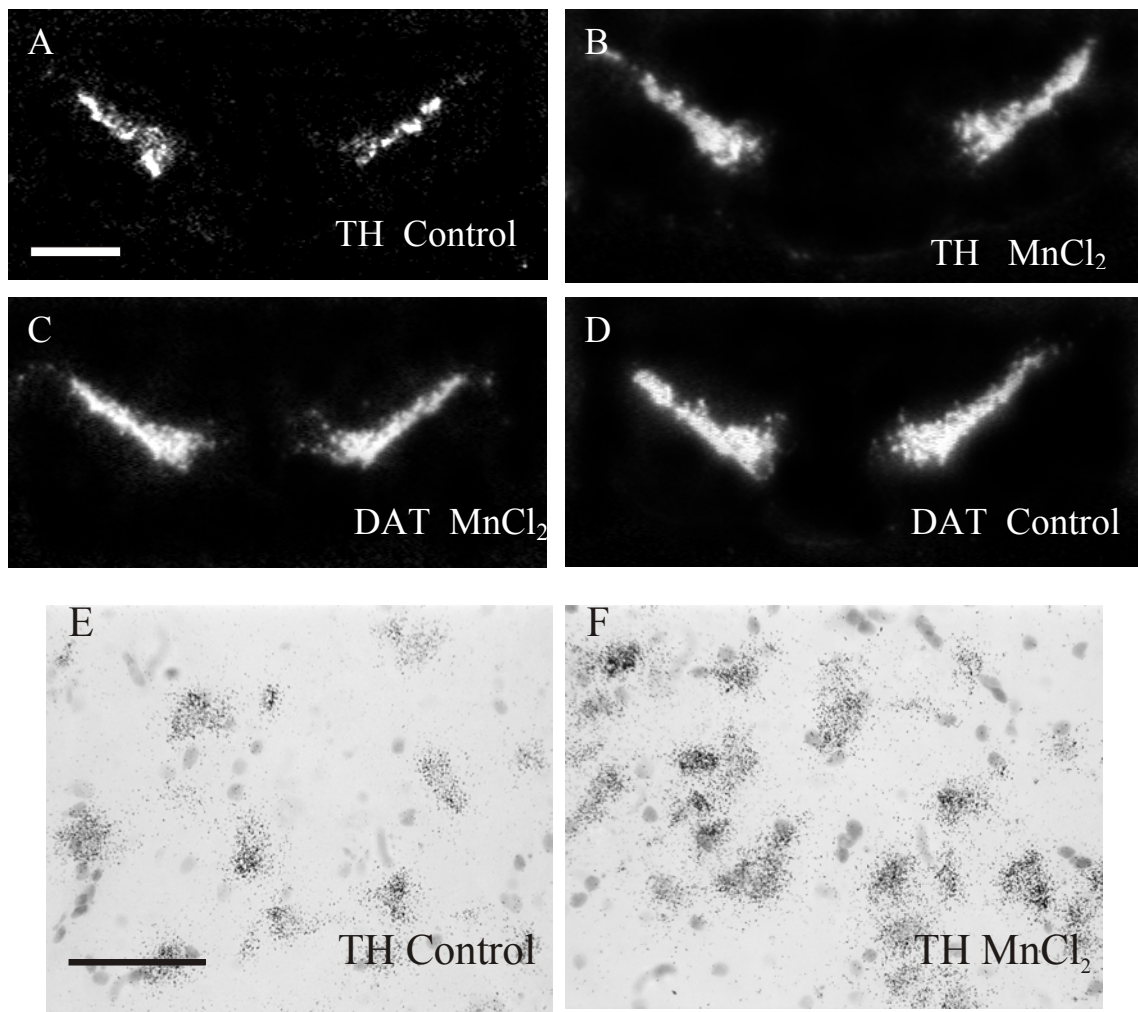


Figura 3

Fig. 3. Expresión de mRNAs de TH y DAT en la SN en animales controles y animales tratados con MnCl_2 .
(A) Control TH; (B) TH después del tratamiento con MnCl_2 ;
(C) Control DAT; (D) DAT después del tratamiento con MnCl_2 ; (E, F) Amplificación de los granos de plata de (A) y (B) respectivamente.

Escala de barras: A-D, 1mm; E-F, 50 μm .

RESULTADOS

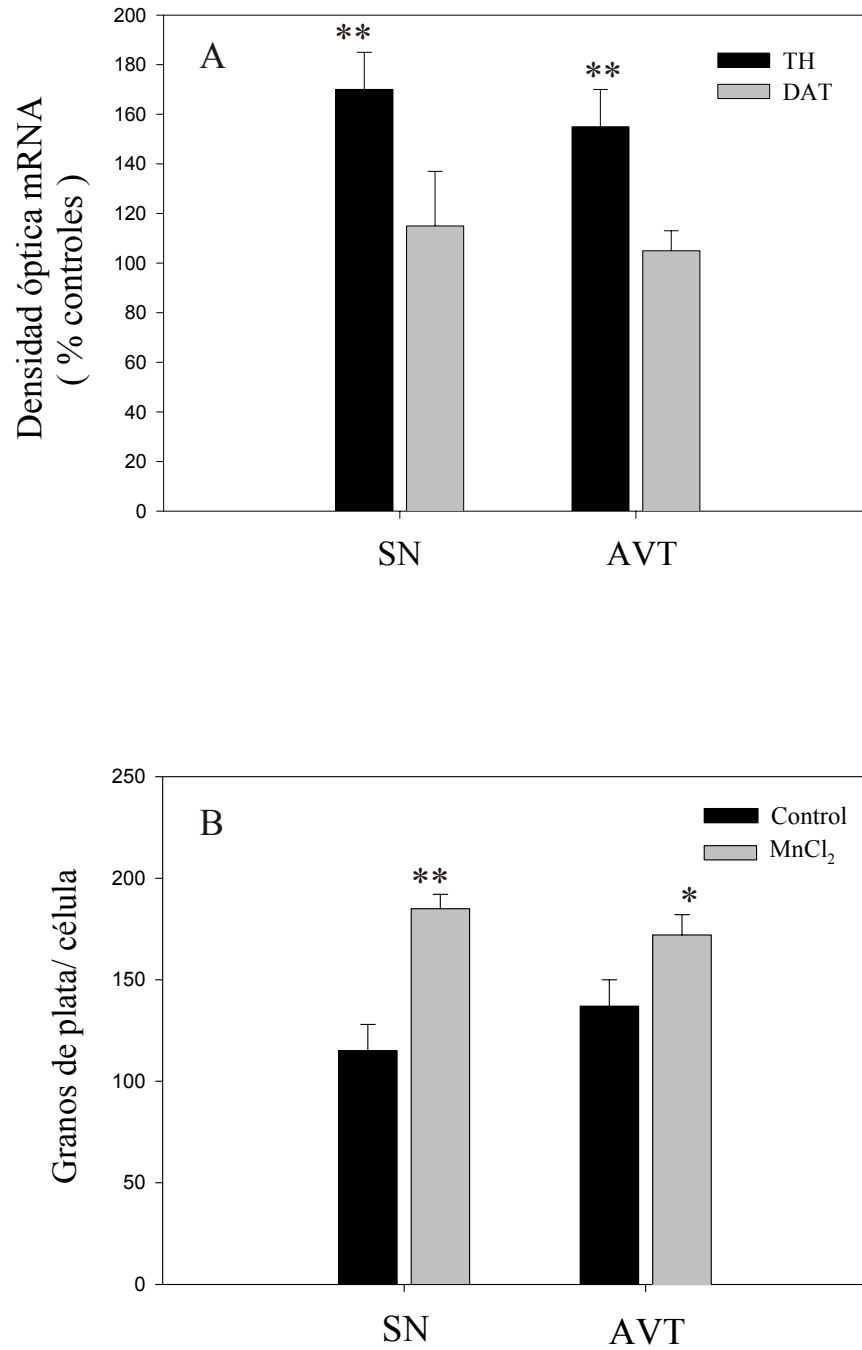


Figura 4

Fig. 4. Cuantificación de hibridación *in situ* de mRNA de TH y DAT en animales controles y tratados con MnCl₂.

(A) Densidad óptica medida a partir de films expresada como porcentaje respecto del control. Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes.

(B) Cuantificación de granos de plata. La expresión de mRNA de TH en SN y en AVT de los animales controles y de los animales tratados con MnCl₂ se cuantificó como granos de plata por célula. Los números eran media \pm desviación estandar de cinco experimentos diferentes.

Significación estadística (t de Student, comparando animales tratados con MnCl₂ con animales controles):
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

RESULTADOS

1.4. Análisis de la localización de la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP y OX-42.

Los astrocitos reactivos detectados como células inmunopositivas frente a GFAP y la microglía detectada mediante OX-42 se contaron en SN y en AVT en un nivel rostrocaudal específico (nivel 39 del atlas de cerebro de rata de Swanson; Swanson, L.M., 1998), debido a la heterogeneidad que presentan estas áreas cerebrales. En la SN, la cuantificación de astrocitos y microglía se llevó a cabo en tres localizaciones nigrales que corresponden a las zonas medial, central y lateral de este área cerebral, mientras que en el AVT la cuantificación se restringió a una única localización. Todas las cuantificaciones se efectuaron a una magnificación de 40x.

En el estriado y en el N.Accumbens las inmunocitoquímicas frente a GFAP y OX-42 se contaron cada serie de siete secciones frontales y la cuantificación en estriado se efectuó en tres localizaciones diferentes que corresponden al estriado medial, central y lateral (Fig.5).

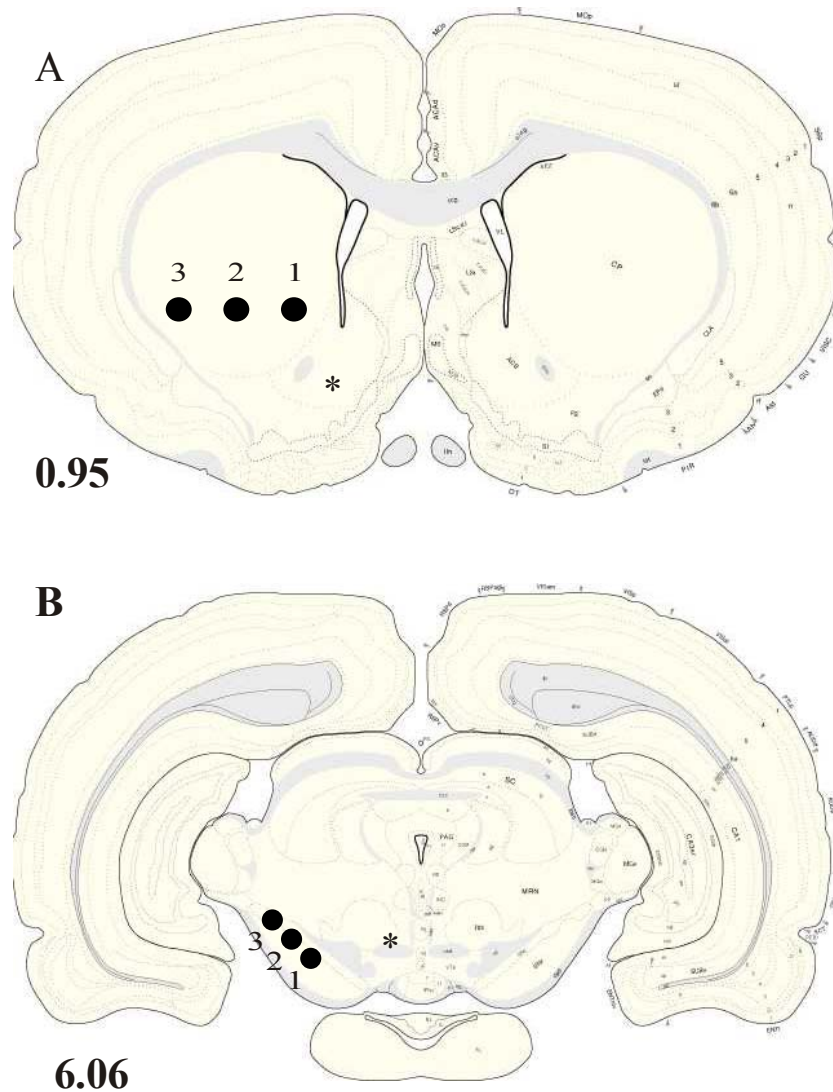


Fig. 5. Localización de la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP y OX-42 en varias estructuras cerebrales en los animales controles y tratados. (A) La cuantificación en el estriado se llevó a cabo en tres localizaciones distintas desde la zona medial hacia la lateral de este área cerebral (aparecen numeradas); El asterisco marca el N. Accumbens. El nivel de la sección fue de 0.95 mm anterior a bregma. (B) La cuantificación en la SN también se efectuó en tres localizaciones distintas desde la parte medial hacia la parte lateral de este área cerebral (señalado mediante números); El asterisco marca el AVT. El nivel de la sección fue 6.06 mm posterior a bregma.

RESULTADOS

1.5. Inmunorreactividad frente a GFAP y OX-42.

Como se vio en la Fig.5, la cuantificación de astrocitos reactivos en el estriado y en la SN se efectuó en tres localizaciones distintas desde la parte medial hacia la parte lateral de las estructuras considerándose así la heterogeneidad en los patrones de proyección de estas áreas cerebrales. Sin embargo, en las demás estructuras estudiadas: AVT, GP y N. Accumbens se analizaron en una sólo localización.

Como resultado, se observó un gradiente de disminución desde la zona medial hasta la lateral como patrón de distribución de los astrocitos inmunopositivos frente a GFAP en el estriado de animales controles y de animales tratados con $MnCl_2$. Así, la densidad de astrocitos en el estriado medial fue aproximadamente el doble de la que muestran los localizados en la parte lateral de este área cerebral. Por el contrario, la SN fue más homogénea ya que no mostró un gradiente topográfico característico.

En los animales tratados con manganeso, la densidad de astrocitos inmunorreactivos a GFAP aumentó significativamente en relación a los controles en estriado y SN. Además, el incremento de astrocitos inmunopositivos frente a GFAP fue similar en las tres localizaciones estriatales y nigrales analizadas después del tratamiento con manganeso en comparación con los controles (Figs. 6-8).

A diferencia de lo observado en el estriado y la SN, no se produjo cambio en la inmunorreactividad frente a GFAP en AVT ni en el N. Accumbens tras el tratamiento.

La morfología de los astrocitos reactivos fue diferente en las ratas tratadas con $MnCl_2$ en comparación con los controles. Mostraron procesos más grandes y abundantes que los astrocitos controles e incluso llegaron a ser hipertróficos, perdiendo su morfología estelar característica (Figs. 6 y 7).

Por otra parte, la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 también mostró un gradiente descendente, aunque no estadísticamente significativo, desde la parte medial hacia la lateral de la densidad de células microgliales, el cual pudo observarse en el estriado y en la SN tanto en animales controles como tratados con $MnCl_2$ (Fig. 9). En relación a la cuantificación, también es importante destacar que tras el tratamiento con $MnCl_2$ se produjo un aumento significativo de la microglía inmunorreactiva a OX-42 en el estriado y en la SN (Figs. 6, 7 y 9).

Las células inmunopositivas frente a OX-42 en los animales tratados presentaron un estadio de microglía reactiva o activada, mostrando un cuerpo celular y procesos engrosados respecto a los controles en ambas estructuras cerebrales (Figs. 6 y 7). Por otra parte, el tratamiento con $MnCl_2$ no modificó la densidad de la microglía inmunorreactiva a OX-42 en AVT y N. Accumbens.

RESULTADOS

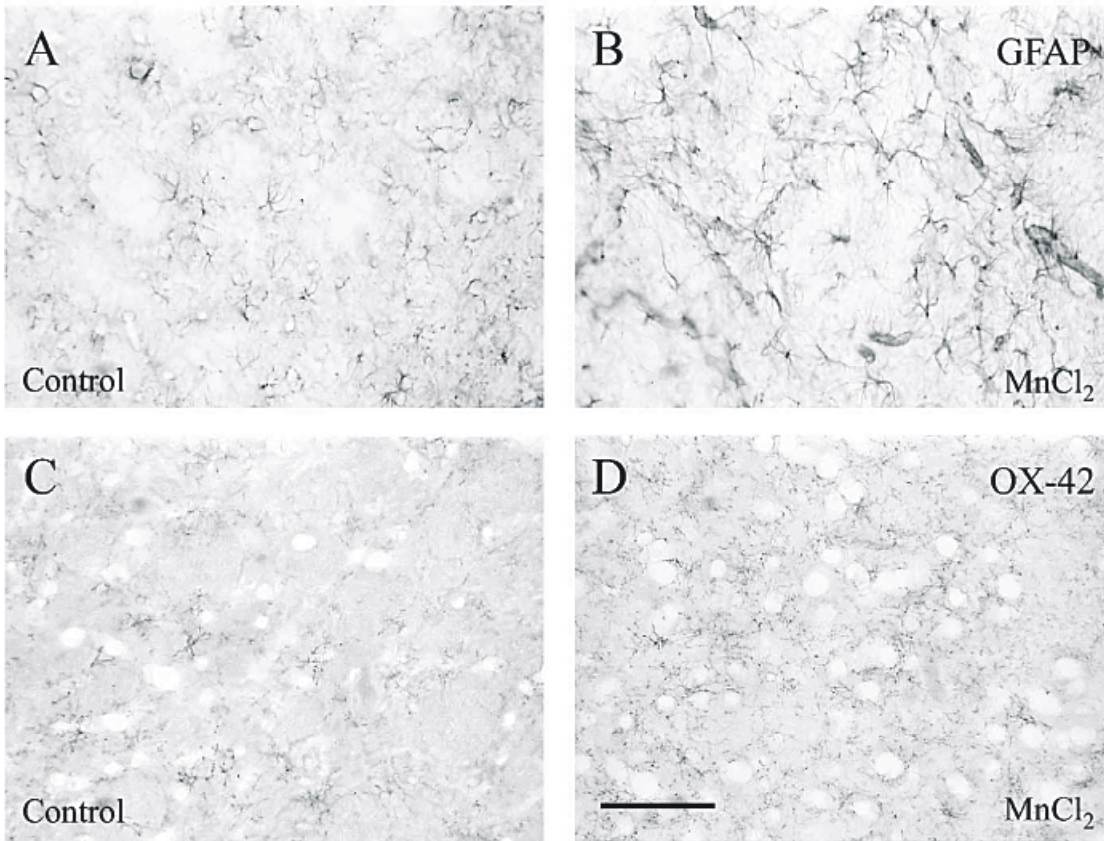


Fig. 6. Inmunorreactividad frente a GFAP y a OX- 42 en el estriado de animales controles y tratados con MnCl₂ .

(A,B) Tinción de GFAP en animales controles y animales tratados con manganeso, respectivamente. Los astrocitos en los animales tratados aparecen hipertróficos, con procesos grandes y abundantes.

(C, D) Tinción en animales controles y tratados, respectivamente. La tinción es más intensa en animales tratados. Escala = 200 μ m.

RESULTADOS

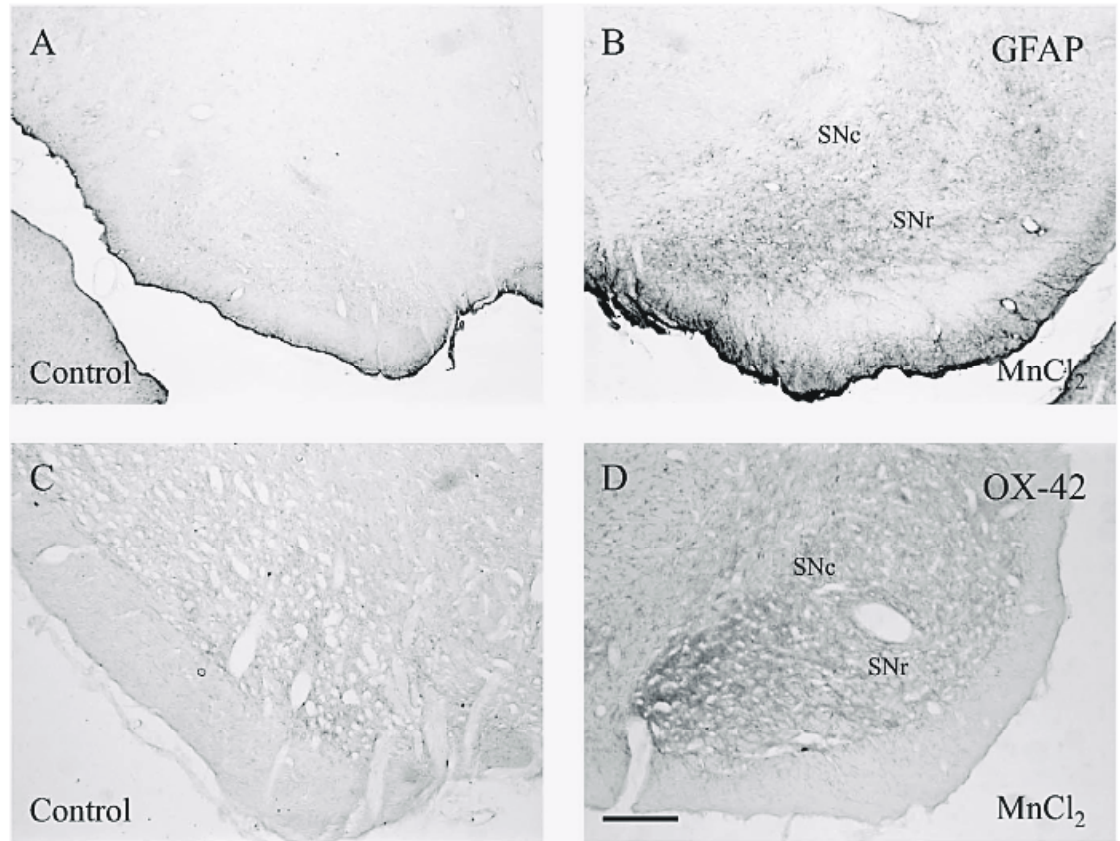


Fig. 7. Inmunorreactividad frente a GFAP y a OX-42 en la SN en animales controles y en animales tratados con MnCl₂.

(A, B) Tinción de GFAP en animales controles y en animales tratados respectivamente. La tinción es más intensa en ambas, Sustancia negra parte compacta (SNc) y Sustancia negra parte reticulada (SNr).

(C, D) Tinción de OX-42 en animales controles y tratados respectivamente. La tinción aparece más intensa en los animales tratados. Escala = 500 μ m.

Fig. 8. Cuantificación de las células inmunopositivas frente a GFAP en estriado y SN de animales controles y tratados con MnCl₂.

(A) Cuantificación de la inmunorreactividad frente a GFAP en estriado. Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes, expresados como células inmunopositivas a GFAP/ mm². Se observa un gradiente decreciente desde la zona medial hacia la lateral en ambos, tanto en animales controles como en animales tratados con MnCl₂.

(B) Cuantificación de la inmunorreactividad frente a GFAP en la SN. Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes, expresados como células inmunopositivas a GFAP/ mm². Significación estadística (t de Student, comparando animales tratados con MnCl₂ con animales controles): *, p< 0.01 .

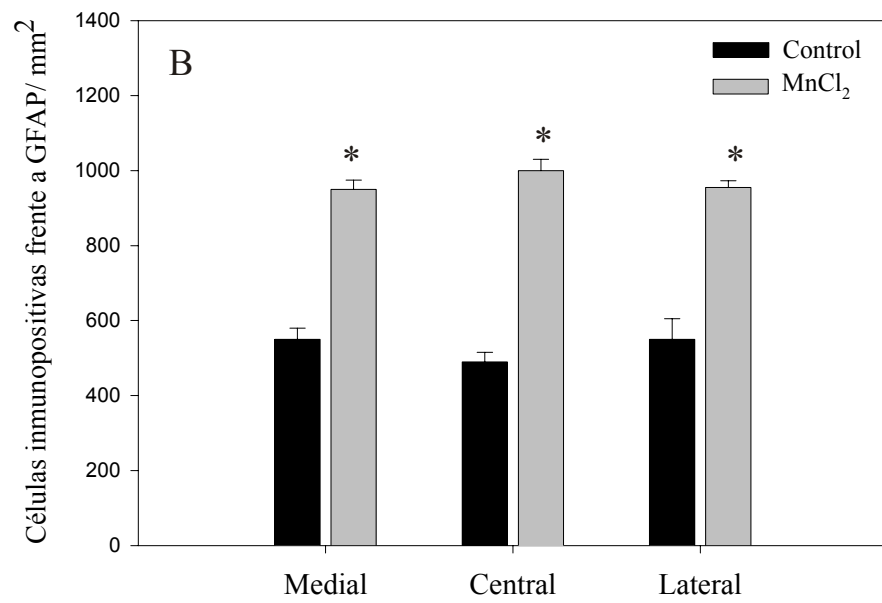
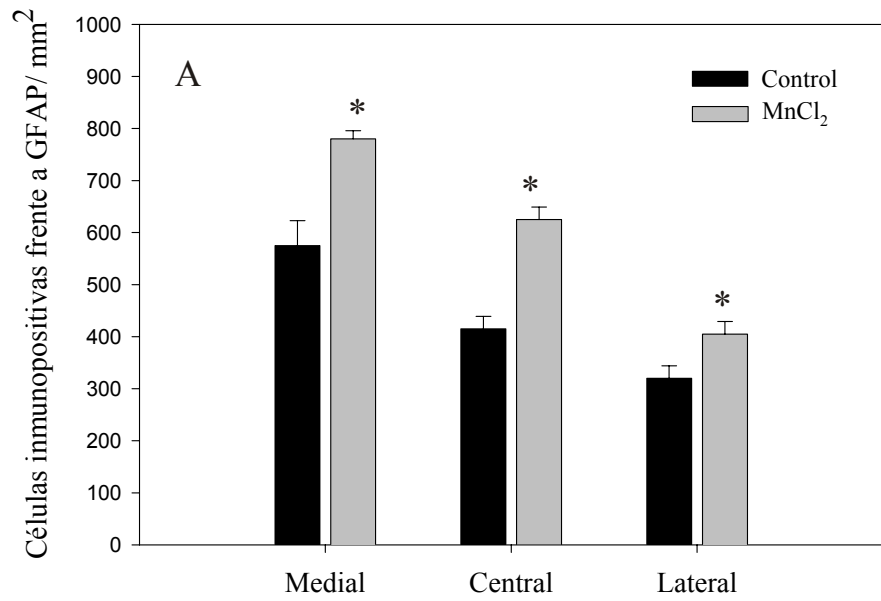


Figura 8

RESULTADOS

Fig. 9. Cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en estriado y SN de animales controles y tratados con MnCl₂.

(A) Cuantificación de inmunorreactividad a OX- 42 en estriado.

Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes, expresados como células inmunopositivas a OX- 42/mm². Se observó un gradiente decreciente desde la zona medial hacia la zona lateral en ambos, tanto en animales controles como en animales tratados con MnCl₂.

(B) Cuantificación de inmunorreactividad frente a OX- 42 en la SN.

Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes, expresados como células inmunopositivas a OX- 42/mm². Se hace patente un gradiente descendente desde la zona medial hacia la lateral en ambos, tanto en animales controles como tratados con MnCl₂.

Significación estadística (t de Student, comparando animales tratados con MnCl₂ con animales controles): *, p< 0.05 .

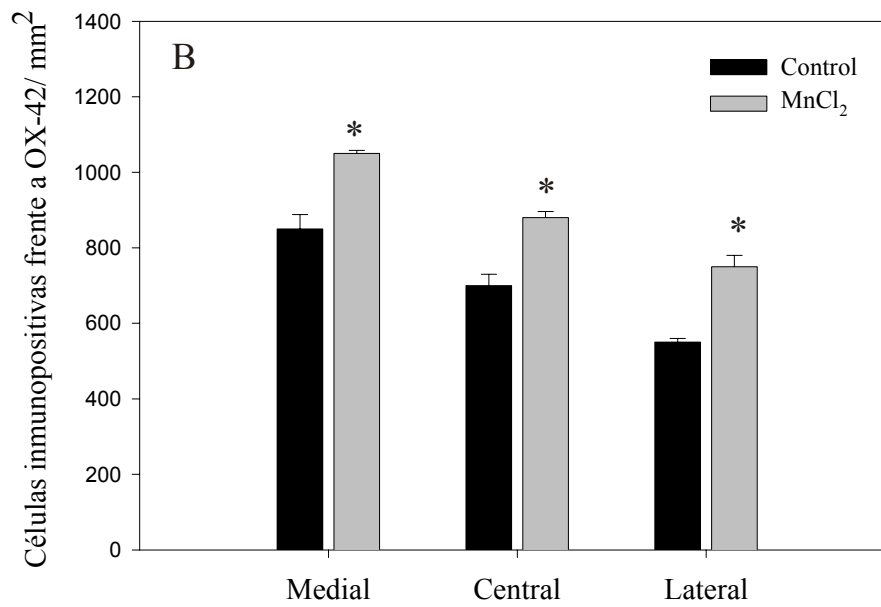
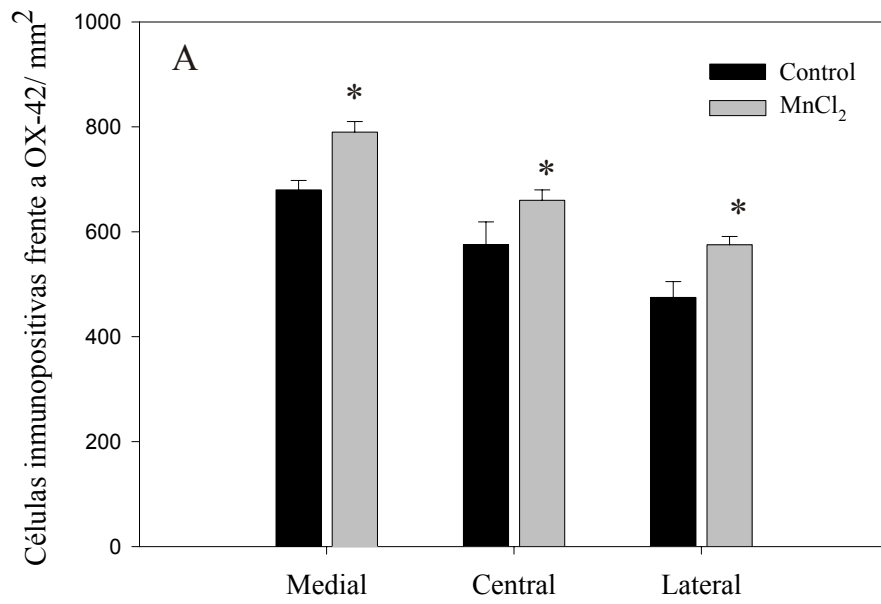


Figura 9

RESULTADOS

1.6. Expresión de mRNA para GAD67 en estriado y Globo pálido después del tratamiento con manganeso.

Una vez encontrado un incremento significativo en los animales tratados con manganeso respecto a los controles de los niveles de TH mRNA, enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, se estudió si este efecto se restringía únicamente al sistema dopaminérgico.

Para ello, se analizó el mRNA para GAD67, la enzima biosintética para GABA.

En el estriado y en el GP, la ribosonda utilizada para detectar mRNA para GAD67 marcó numerosos cuerpos celulares en ambas estructuras (Fig. 10).

Las cuantificaciones se realizaron en films autorradio-
gráficos y mostraron que después del tratamiento con manganeso había un descenso significativo de los niveles de GAD67 mRNA en GP con respecto a los controles (68.2% de los niveles controles, $p < 0.01$; Fig. 10). Por el contrario, no se encontraron diferencias en GAD mRNA con respecto a los controles en el estriado (Fig. 10).

RESULTADOS

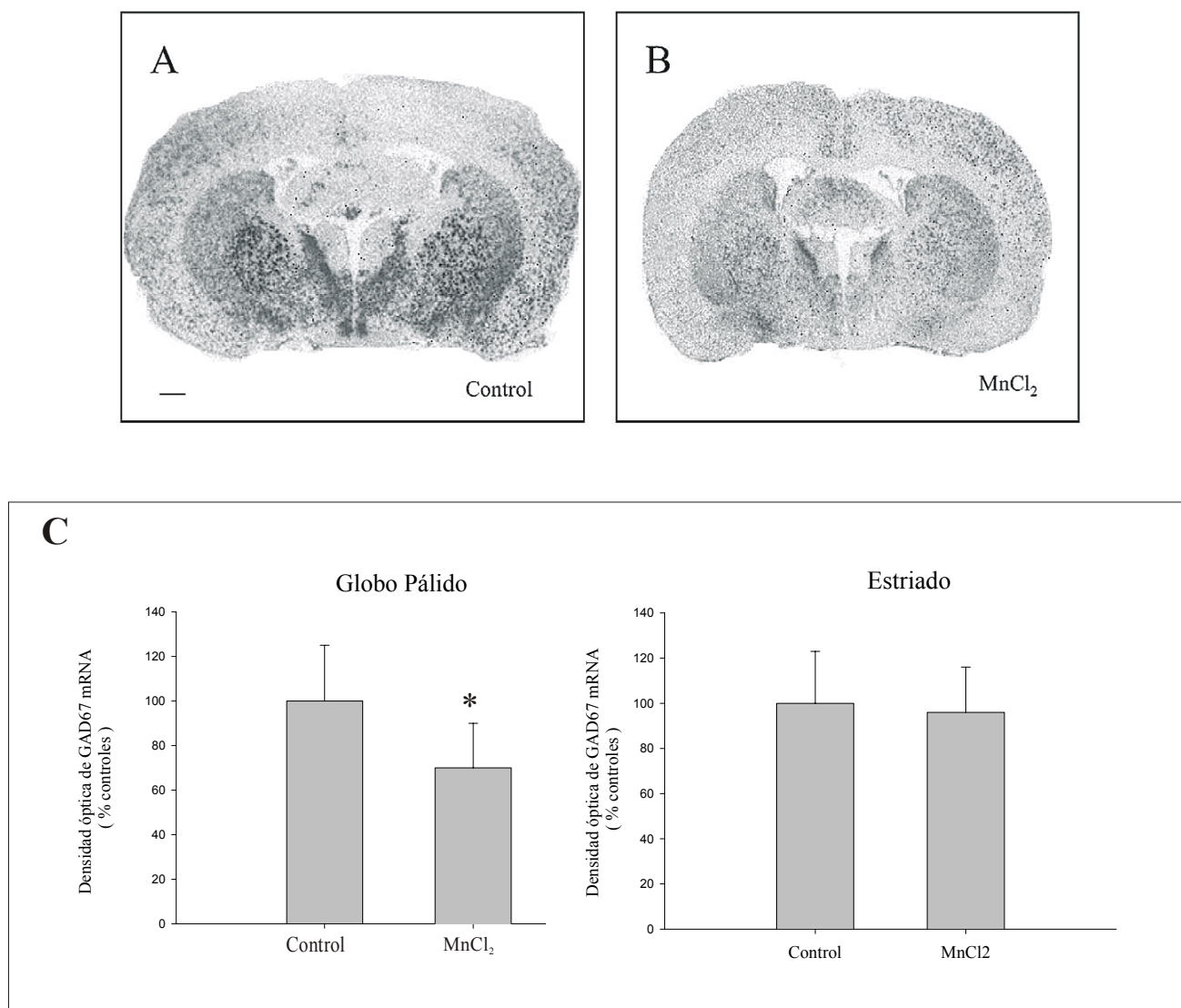


Fig. 10. Expresión de GAD67 mRNA en el estriado y en el globo pálido de animales tratados con MnCl₂ y animales controles. (A) Control; (B) Tratamiento con MnCl₂; (C) Densidad óptica medida de films expresada como porcentaje del control.

Los números son media \pm desviación estandar de cinco experimentos independientes. Significación estadística (t de Student, comparando animales tratados con MnCl₂ con animales controles): *, $p < 0.01$, Escala = 1 mm.

RESULTADOS

2. ESTUDIO " *IN VITRO* " DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LÍPIDOS Y PROTEÍNAS PRODUCIDO POR EL $MnCl_2$.

Debido a que la SN es una estructura especialmente vulnerable a los procesos oxidativos, procedimos a estudiar el estrés oxidativo que se producía tras tratar ratas Wistar de 3 meses con $MnCl_2$ a dosis alta (20 mg/ kg / día) durante 15 días. Para ello se estudiaron diversas estructuras del SNC (estriado, SN, cerebelo, bulbo, hipocampo, corteza cerebral (todas las cortezas exceptuando la corteza prefrontal), corteza prefrontal e hipófisis), siendo de especial interés SN y estriado. También se estudió el estrés oxidativo en órganos como son hígado, corazón y riñón. El estudio se llevó a cabo determinando la oxidación lipídica en las diversas estructuras mediante la medida de MDA y la oxidación proteica a través de la medida de grupos carbonilos de las proteínas.

2.1. Estudio del estrés oxidativo en lípidos.

El MDA es uno de los aldehidos más abundantes que se producen cuando los hidroperóxidos lipídicos se hidrolizan en los sistemas biológicos. Por lo tanto, es un indicador de la oxidación lipídica, y su determinación se realiza con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Esterbauer, 1990).

Se observó un aumento del estrés oxidativo en lípidos tras el tratamiento con MnCl_2 , siendo más significativo en SN (200% respecto a los valores controles), estriado y bulbo (ambos 180% de los controles). También se produjo un incremento moderado del estrés oxidativo en lípidos tras el tratamiento en las siguientes estructuras cerebrales: corteza cerebral (138% respecto de los controles), corteza prefrontal (137% respecto a los controles) e hipófisis (132% respecto de los niveles controles). Además es importante destacar que las estructuras cerebrales que mostraron un menor incremento del estrés oxidativo en lípidos tras el tratamiento con MnCl_2 fueron el hipocampo y el cerebelo (122% y 110% respecto de los controles respectivamente) (Fig. 11).

Por otra parte, también se produjo un aumento de oxidación de lípidos en los tejidos: hígado (190% respecto de los controles), corazón (170% respecto a los valores controles) y riñón (130% de los valores controles), siendo especialmente destacado incluso el elevado nivel basal de MDA presentado por el riñón en relación con los otros dos órganos (Figura 12).

RESULTADOS

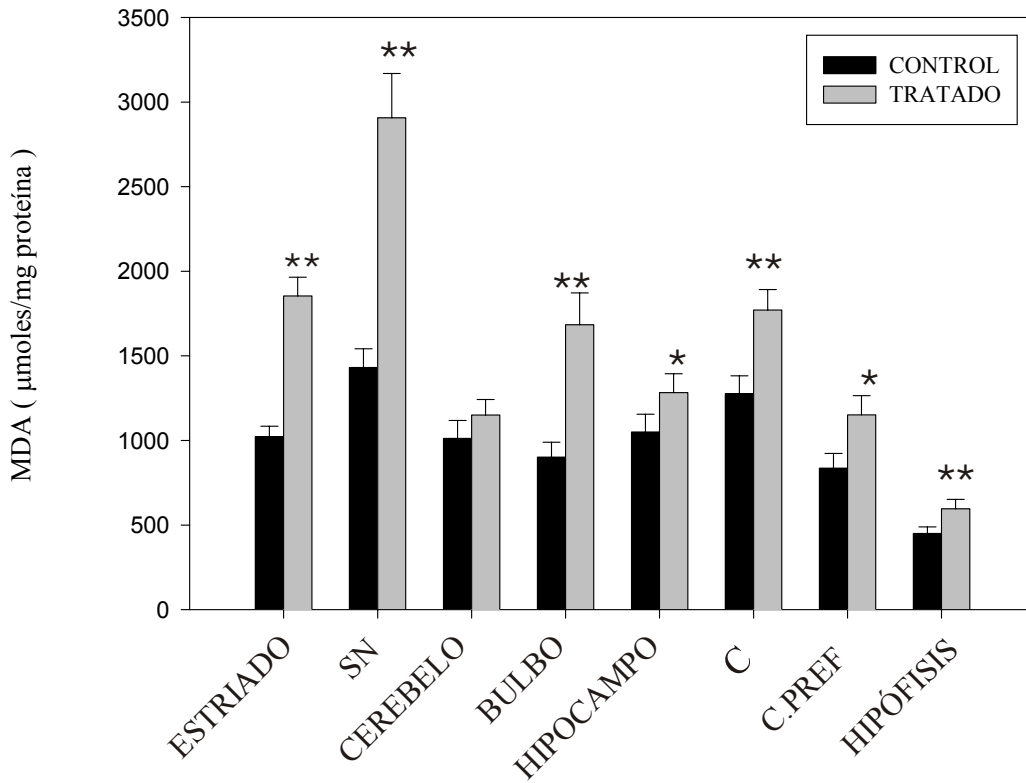


Fig. 11. Niveles de MDA en las diversas estructuras cerebrales estudiadas. Los resultados están expresados en μ moles MDA/ mg proteína y los valores son la media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. SN: sustancia negra, C: corteza cerebral, C.PREF: corteza prefrontal. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando con los valores controles.

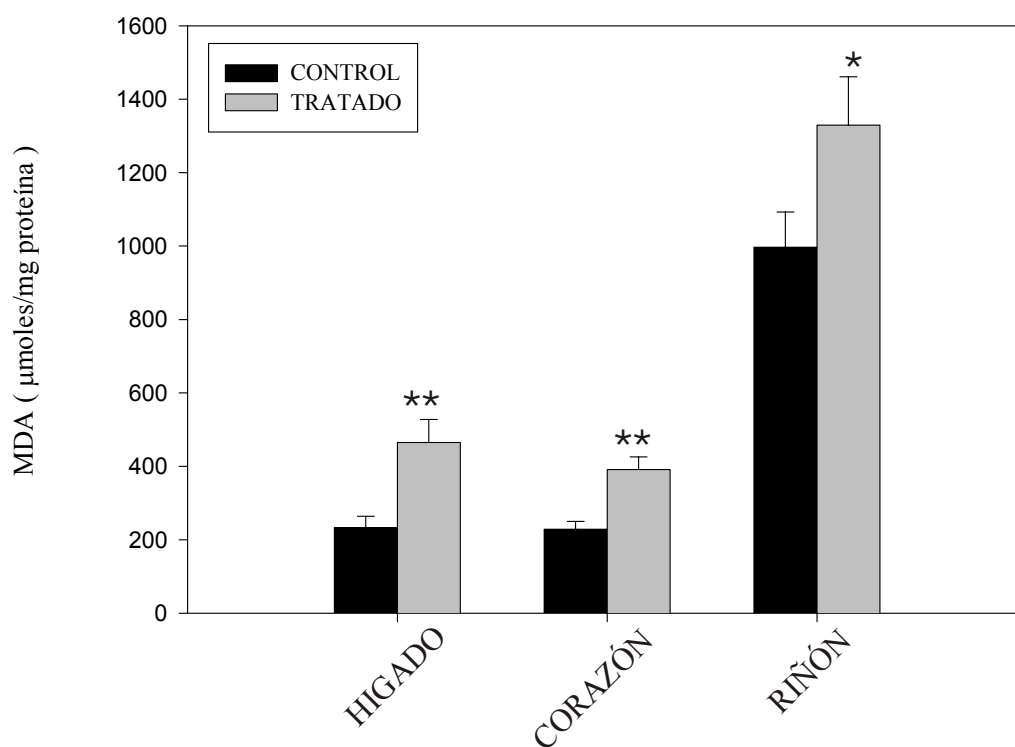


Fig. 12. Niveles de MDA en hígado, corazón y riñón. Los resultados están expresados en $\mu\text{moles MDA/ mg proteína}$ y los valores son la media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ comparando con los valores controles.

RESULTADOS

2.2. Estudio del estrés oxidativo en proteínas.

Para determinar si el tratamiento con $MnCl_2$ a dosis elevada produce cambios oxidativos en las proteínas se han determinado los niveles de grupos carbonilos en proteínas totales de diversos tejidos (hígado, corazón y riñón) y áreas cerebrales (estriado, SN, cerebelo, bulbo, hipocampo, corteza cerebral y corteza prefrontal).

Los resultados muestran un aumento general de grupos carbonilos en todas las estructuras estudiadas.

No obstante, es importante destacar que las estructuras que muestran un mayor aumento respecto a los controles, y, por lo tanto, se afectan más por el tratamiento con $MnCl_2$ son: estriado (230% respecto de los valores controles), cerebelo (250% respecto de los controles), bulbo e hipocampo (ambos un 210% de los niveles controles). También se observa un incremento del estrés oxidativo en proteínas, aunque en menor medida, en corteza cerebral y en SN (170% y 140% respecto de los controles respectivamente). Sin embargo, la corteza prefrontal, posee unos niveles basales elevados de grupos carbonilos y prácticamente no se encuentra influenciada por el tratamiento en cuestión (110% respecto de los controles) (Figura 13).

Respecto a los tejidos estudiados (hígado, corazón y riñón), se observa también un aumento significativo del nivel de oxidación proteica, aunque un mayor efecto por el tratamiento con $MnCl_2$ se observa en el riñón (230% respecto de los valores controles), mientras que el incremento del estrés oxidativo en proteínas en hígado y corazón es 200% y 170% respecto de los controles, respectivamente (Figura 14).

RESULTADOS

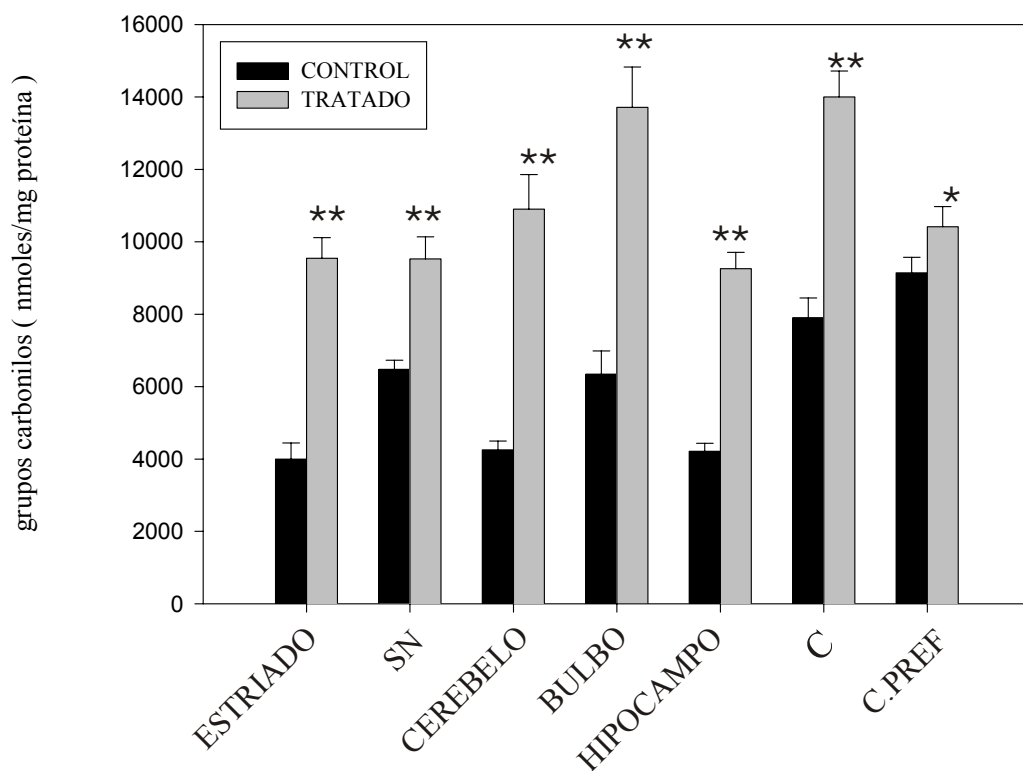


Fig. 13. Niveles de grupos carbonilos en las diversas estructuras cerebrales estudiadas. Los resultados están expresados en nmoles grupos carbonilos/ mg proteína y los valores son la media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. SN: sustancia negra, C: corteza cerebral, C.PREF: corteza prefrontal. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando con los valores controles.

RESULTADOS

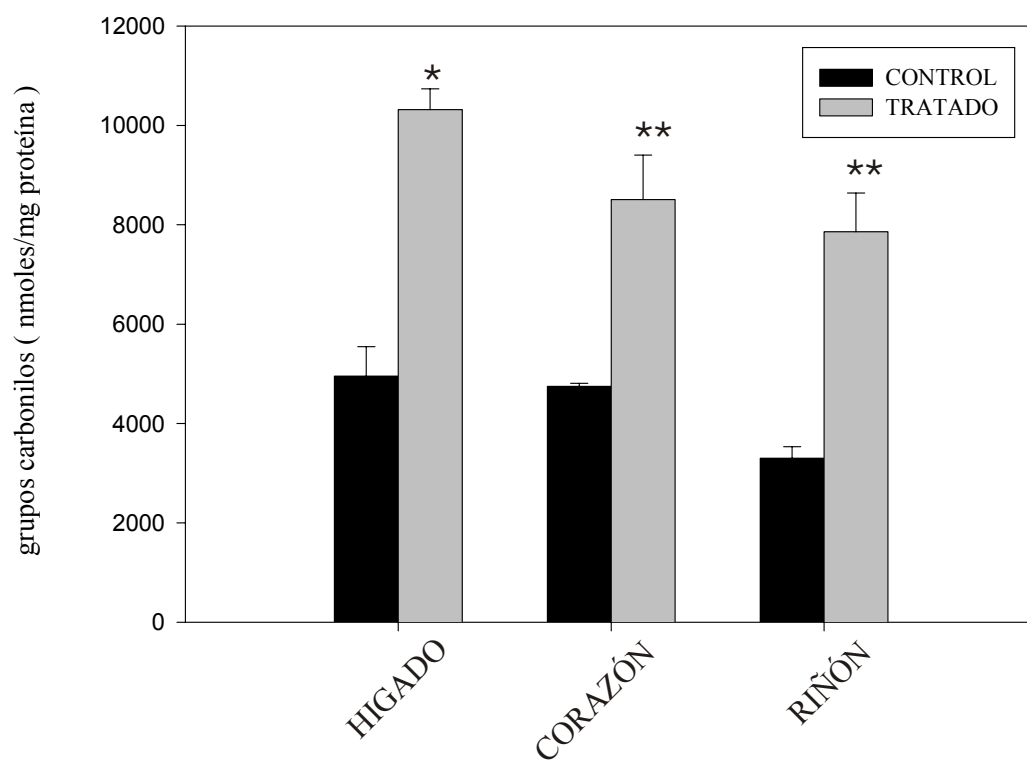


Fig. 14. Niveles de grupos carbonilos en hígado, corazón y riñón. Los resultados están expresados en nmoles grupos carbonilos/ mg proteína y los valores son la media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando con los valores controles.

3. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE HIERRO Y MANGANESO A NIVEL CEREBRAL.

Una vez conocidos los efectos del MnCl_2 a dosis baja (6 mg/ kg/ día) en diversas estructuras del SNC, así como el estrés oxidativo que produce a dosis alta (20 mg/ kg/ día) a nivel cerebral y en otros tejidos, resultaba de gran importancia profundizar en el conocimiento de los cambios histológicos producidos por el MnCl_2 a dosis elevada en el SNC.

Del mismo modo, consideramos interesante establecer el papel del hierro y el manganeso a nivel de neurodegeneración. Para ello se procedió a realizar un experimento en el que se emplearon dos dietas sintéticas: una con un complejo minerovitamínico con hierro y la otra conteniendo un complejo minerovitamínico desprovisto de él, cuya composición se describió en Material y Métodos. En dicho ensayo se alimentó a ratas Wistar de 12 meses de edad con las citadas dietas y unos grupos se trataron con desferroxamina, quelante del hierro, a una dosis de 10 mg/ kg/ día y a otros grupos además se les inyectó MnCl_2 a dosis alta (20 mg/ kg/ día) durante 30 días como se indicó en el apartado 4 de Material y Métodos.

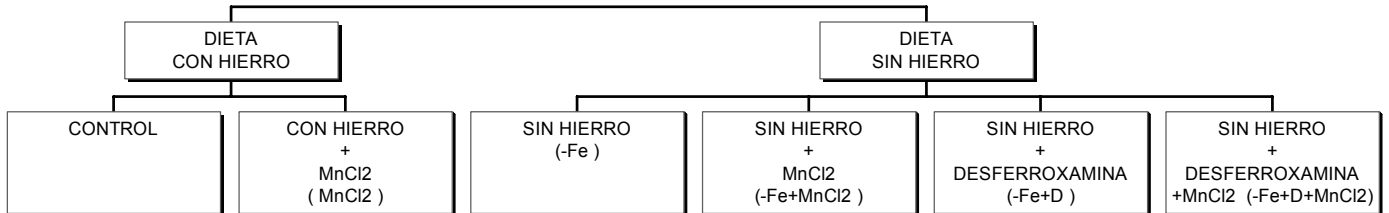


Fig. 15. Esquema del diseño del experimento con dietas sintéticas, en el que se reflejan los diversos grupos de tratamiento.

3.1. ESTUDIO DE LA REACCIÓN GLIAL .

3.1.1. Estudio de la respuesta de los astrocitos en estriado y SN.

Puesto que la activación de la glía se produce después de un daño neuronal, realizamos un estudio de la reacción de los astrocitos y la microglía en las ratas sometidas a los distintos tratamientos indicados en el apartado citado anteriormente.

En el estriado, los estudios inmunocitoquímicos frente a GFAP y OX-42 se contaron cada serie de siete secciones frontales y la cuantificación en estriado se efectuó en tres localizaciones diferentes que corresponden al estriado medial, central y lateral a una magnificación de 40x (Fig. 5A).

RESULTADOS

Los astrocitos reactivos detectados como células inmunopositivas frente a GFAP y la microglía detectada mediante OX-42 se contaron en SN en un nivel rostrocaudal específico (nivel 39 del atlas de cerebro de rata de Swanson; Swanson, L.M., 1998), debido a la heterogeneidad que presentan estas áreas cerebrales. En la SN, la cuantificación de astrocitos y microglía se llevó a cabo en tres localizaciones nigrales que corresponden a las zonas medial, central y lateral de este área cerebral y todas las cuantificaciones se efectuaron también a una magnificación de 40x (Fig. 5B).

Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en la cuantificación de astrocitos y microglía desde la zona medial hacia la lateral en estriado y SN, tanto en animales controles como en tratados, por lo que los valores se unificaron en un valor medio.

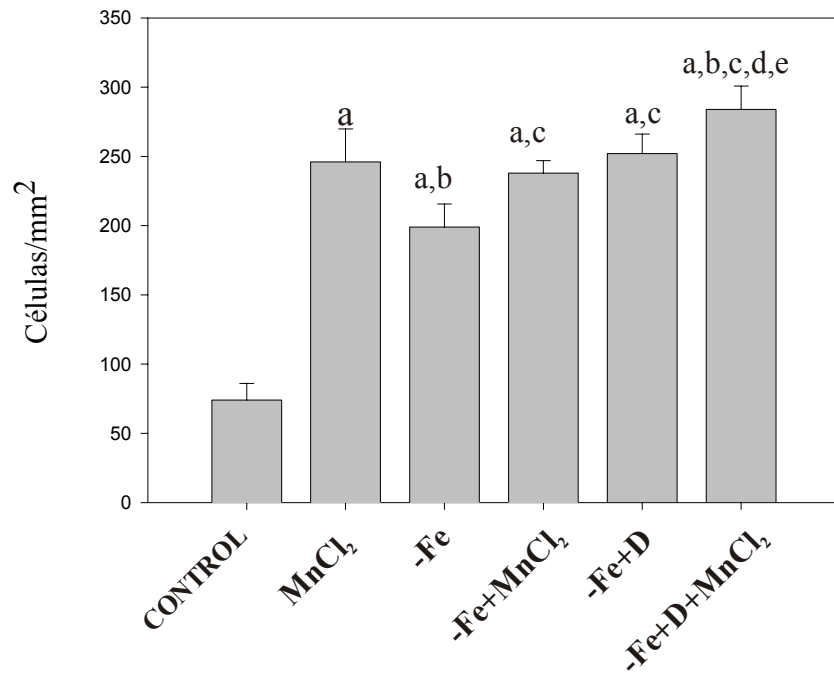


Fig. 16. Cuantificación de los astrocitos GFAP positivos en estriado. El conteo se realizó desde la zona medial hacia la lateral. Los resultados están expresados como células/mm² y los números son media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Significación estadística mediante ANOVA de una vía seguida de test Least significant difference (LSD): a, comparado con el control; b, comparado con MnCl₂; c, comparado con -Fe; d, comparado con -Fe+MnCl₂; e, comparado con -Fe+D; f, comparado con -Fe+D+MnCl₂; $p < 0.001$.

RESULTADOS

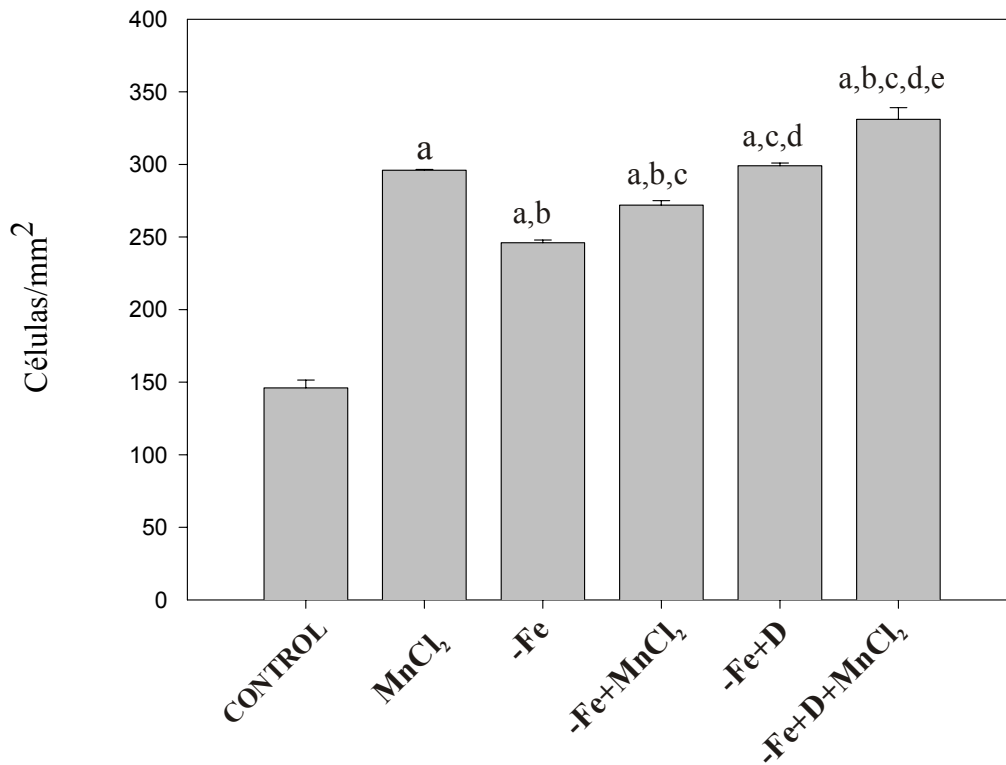


Fig. 17. Cuantificación de los astrocitos GFAP positivos en SN. El conteo se realizó desde la zona medial hacia la lateral. Los resultados están expresados como células/mm² y los números son media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Significación estadística mediante ANOVA de una vía seguida de test Least significant difference (LSD): a, comparado con el control; b, comparado con MnCl₂; c, comparado con -Fe; d, comparado con -Fe+MnCl₂; e, comparado con -Fe+D; f, comparado con -Fe+D+MnCl₂; $p < 0.001$.

3.1.2. Morfología de la astrogía en estriado y SN.

A.- Estriado

Los animales controles mostraron que en estriado hay pocos astrocitos (Fig.18C). Sin embargo, cuando el tratamiento fue -Fe+D+MnCl₂ se produjo el aumento más significativo (383% respecto al control). También se observó un aumento significativo con respecto al control en los diferentes tratamientos: MnCl₂ (332 %); -Fe (268 %); -Fe+MnCl₂ (321 %); -Fe+D (340 %) (Fig. 16).

En relación a la morfología, los astrocitos de los animales controles poseen un cuerpo pequeño, poco engrosado y asimismo sus procesos también son pequeños (Fig.18A y Fig. 18C). El tratamiento con MnCl₂ a la dosis alta de 20 mg/kg/día (MnCl₂) mostró un aumento significativo en el número de astrocitos, aunque no se apreciaron diferencias morfológicas considerables respecto a los controles (Fig. 18D).

En los animales alimentados con dieta desprovista de hierro (-Fe) se observan astrocitos de mayor tamaño con respecto a los controles, los cuales muestran hipertrofia y procesos engrosados con cierta ramificación, siendo, por lo tanto, astrocitos reactivos (Fig. 18E).

RESULTADOS

Por otra parte, los animales alimentados con dieta desprovista de hierro y además tratados con MnCl_2 (-Fe+ MnCl_2), a diferencia de los que pertenecían al tratamiento -Fe, presentan unos astrocitos más hipertróficos con procesos más abundantes y alargados contactando unos con otros mostrando una imbricación, por lo tanto, ocupando un espacio mayor del neuropilo (Fig. 18E y Fig. 18F).

Con respecto al tratamiento MnCl_2 , el tratamiento -Fe+ MnCl_2 se distingue básicamente en que los astrocitos son de mayor tamaño y procesos muy desarrollados, con un cuerpo considerablemente engrosado y procesos con alto grado de ramificación e imbricación o contactos entre ellos (Fig. 18D y Fig.18F).

Los animales a los que se les inyectó desferroxamina y se alimentó con dieta carente en hierro (-Fe+D) mostraron, a diferencia de los controles y los tratados con dieta desprovista de hierro (-Fe), astrocitos con bastantes signos de degeneración (Fig. 18G), al igual que le ocurre al grupo de tratamiento al que además se le inyectó MnCl_2 (-Fe+D+ MnCl_2) (Fig. 18H).

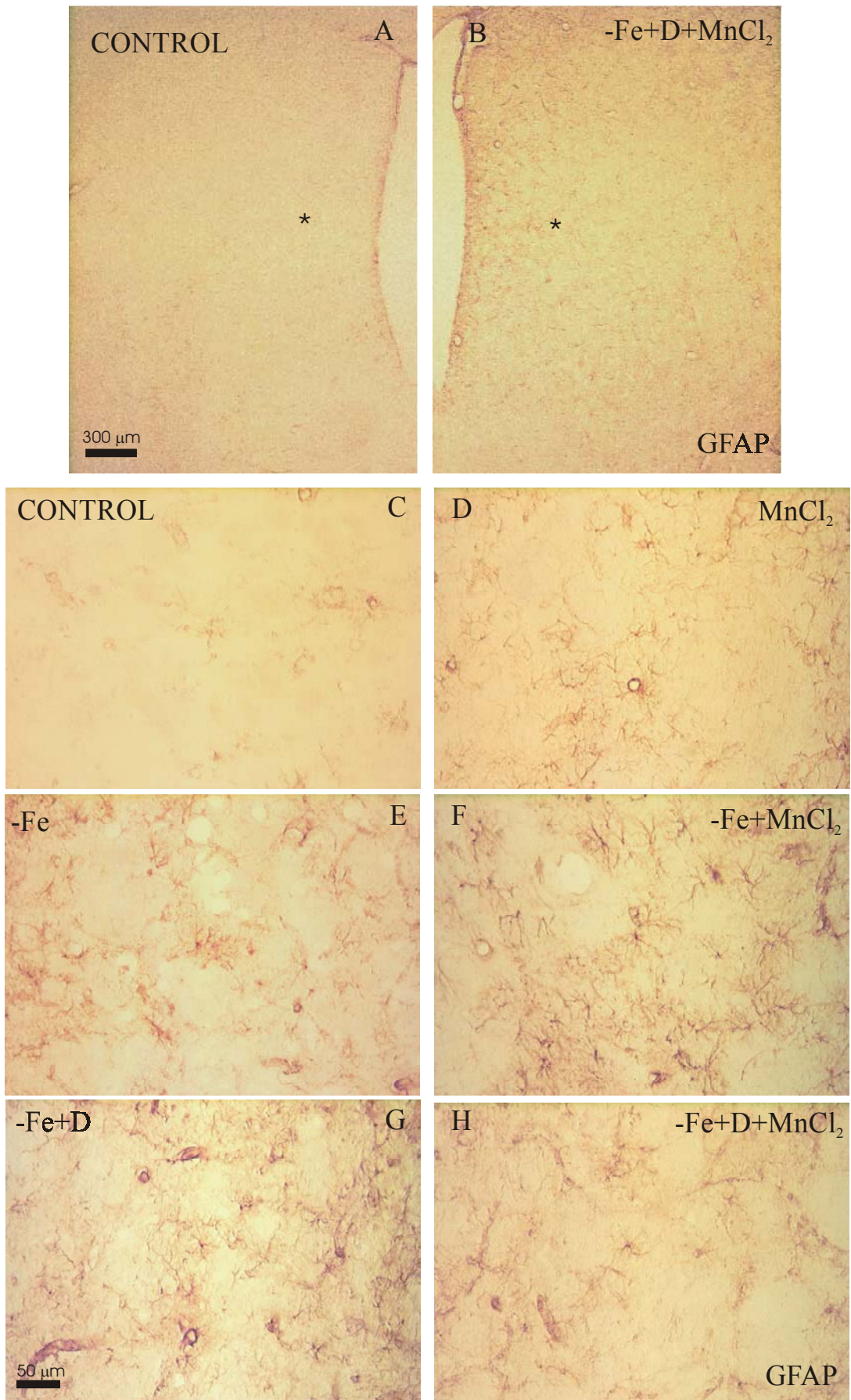


Figura 18

Fig. 18. Inmunorreactividad frente a GFAP en estriado en animales controles y en animales tratados.

(A) Animales controles (B) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ (C) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura A (D) Animales tratados con $MnCl_2$ (E) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro (F) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con $MnCl_2$ (G) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con desferroxamina (H) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura B.

RESULTADOS

B.- Sustancia negra

En todos los tratamientos se incrementaron los astrocitos con respecto a los controles, produciéndose el aumento mayor en la astroglía de la SN con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂ (226% respecto a los controles). Además, también se vio un aumento significativo con respecto al control en los distintos grupos de tratamiento: MnCl₂ (202 %); -Fe (168 %); -Fe+MnCl₂ (186 %); -Fe+D (204 %) (Figura 17).

En relación a la morfología, los astrocitos de los animales controles muestran cuerpo y procesos pequeños y poco engrosados (Fig. 19C). El tratamiento con MnCl₂ a la dosis alta de 20 mg/kg/ día (MnCl₂) produjo una hiperproliferación astrocitaria, mostrando estos astrocitos una reducción de tamaño con respecto a los controles (Fig. 19D) .

En los animales alimentados con dieta desprovista de hierro (-Fe) se observan astrocitos de mayor tamaño con respecto a los controles que muestran hipertrofia y procesos engrosados con ramificaciones, con la apariencia de astrocitos reactivos (Fig. 19E).

A su vez, cuando se alimentan animales con dieta carente en hierro y MnCl₂ (-Fe+MnCl₂), a diferencia de los tratados únicamente con dieta desprovista de hierro (-Fe), se observan astrocitos con menos contactos entre ellos cuyas

prolongaciones son menos abundantes y más cortas, asemejándose a los controles. Además, los animales sometidos al tratamiento $-Fe+MnCl_2$ poseen una astrogliá que muestra un grado mayor de hipertrofia que los animales tratados solamente con $MnCl_2$ (Fig. 19F).

Cuando se alimenta animales con una dieta desprovista de hierro y se les inyecta desferroxamina ($-Fe+D$) se pueden observar astrocitos muy hipertróficos y con muchas ramificaciones, que se diferencian del grupo tratado con dieta desprovista de hierro ($-Fe$) en que poseen pocos contactos entre sí, es decir, no están imbricados (Fig. 19G).

Finalmente, podemos afirmar que no se aprecian diferencias morfológicas en los astrocitos cuando los tratamientos son $-Fe+D$ y $-Fe+D+MnCl_2$ (Figs. 19G y 19H).

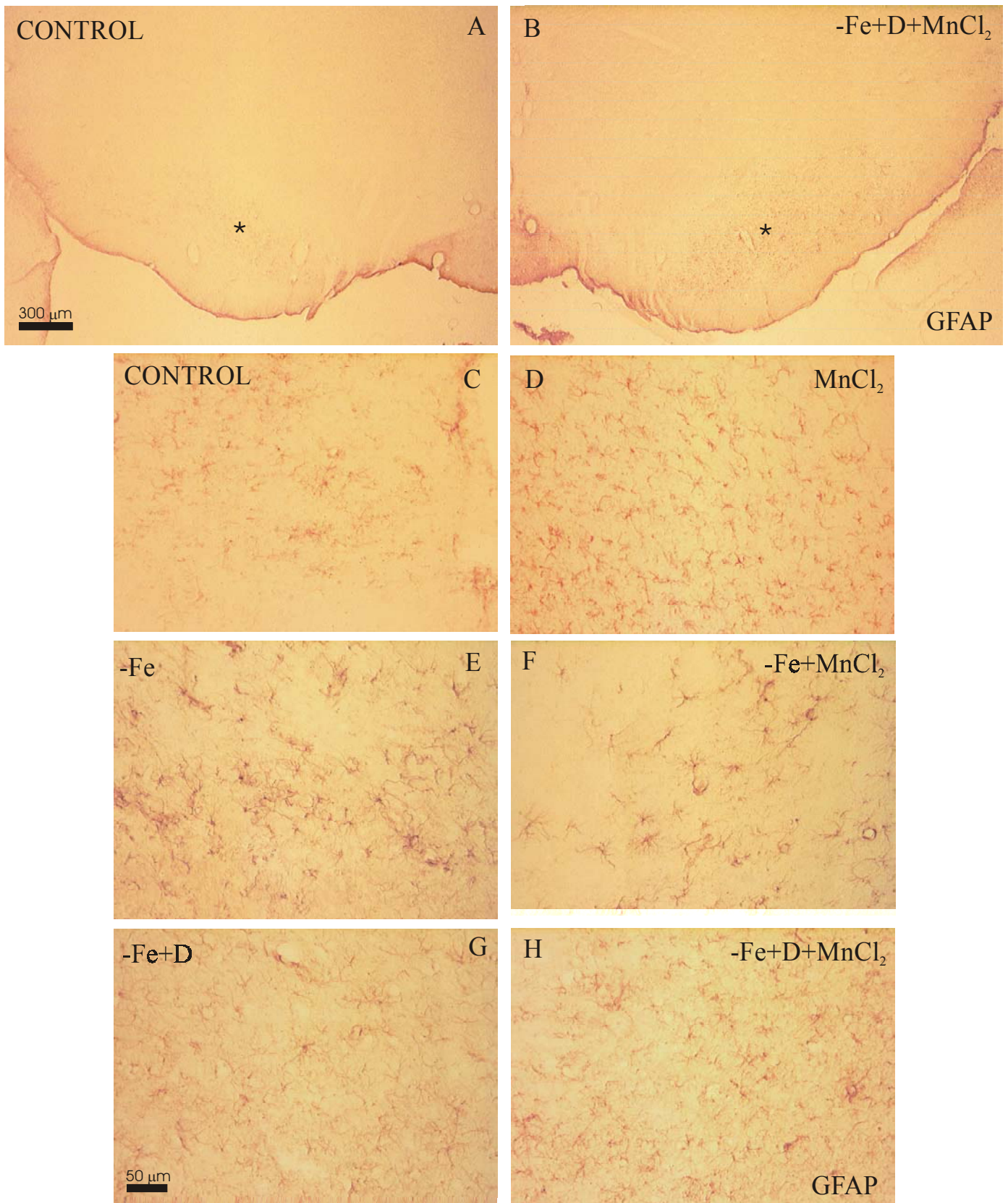


Figura 19

Fig. 19. Inmunorreactividad frente a GFAP en SN en animales controles y tratados.

(A) Animales controles (B) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ (C) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura A (D) Animales tratados con $MnCl_2$ (E) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro (F) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con $MnCl_2$ (G) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con desferroxamina (H) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura B.

RESULTADOS

3.1.3. Morfología de la astroglia en la corteza.

La última estructura cerebral en la cual evaluamos los cambios morfológicos de la astroglia producidos por los diferentes tratamientos fue la corteza. Así pues, al estudiar las distintas zonas de la misma se observaron las diferencias más significativas en las capas 1 y 2 de la corteza prefrontal, en la corteza cingulada anterior, así como en la corteza piriforme (Figura 20).

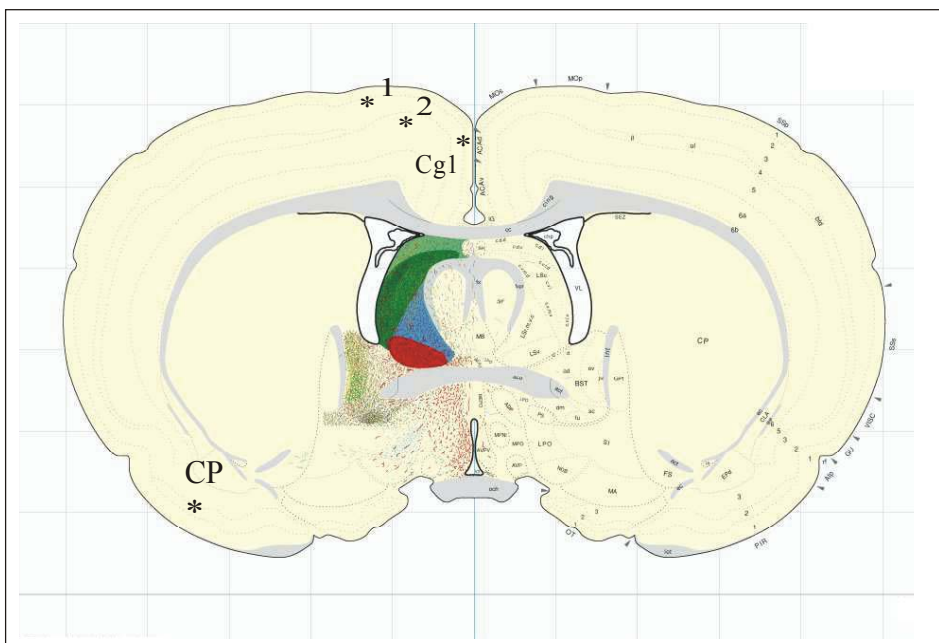


Fig. 20. Localización de las distintas zonas de la corteza cerebral. El asterisco marca las capas 1 y 2 de la corteza prefrontal respectivamente, la corteza cingulada anterior (Cg1), así como la localización de la corteza piriforme (CP).

El nivel de la sección fue el nivel 19 del atlas de cerebro de rata de Swanson (Swanson, L.M. 1998).

De forma general, se produjo un aumento de la astroglia en las distintas zonas de corteza cerebral con todos los tratamientos, si bien es importante destacar que el aumento más significativo de la misma se produjo con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂.

Análogamente, los mayores cambios morfológicos respecto a los controles se observaron en los animales alimentados con dieta carente en hierro, a los cuales también se trató con desferroxamina y con MnCl₂ (-Fe+D+MnCl₂), que presentaron unos astrocitos reactivos hipertróficos y procesos muy engrosados y abundantes respecto a los controles en las capas 1 y 2 de la corteza prefrontal (Figs. 21B y 21C), en la corteza cingulada anterior (Fig. 21F), así como en la corteza piriforme (Fig. 22B).

Asimismo, en la corteza prefrontal de los animales con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂ se observó una dilatación de los vasos sanguíneos y se apreciaron astrocitos perivasculares tapizando el endotelio capilar (Fig. 21D).

Por otra parte, la corteza piriforme de los animales tratados con -Fe+D+MnCl₂ presentaba una astroglia reactiva hipertrófica con signos de degeneración, siendo importante destacar el avance de la astroglia hacia la zona interior de la misma (Fig. 22B).

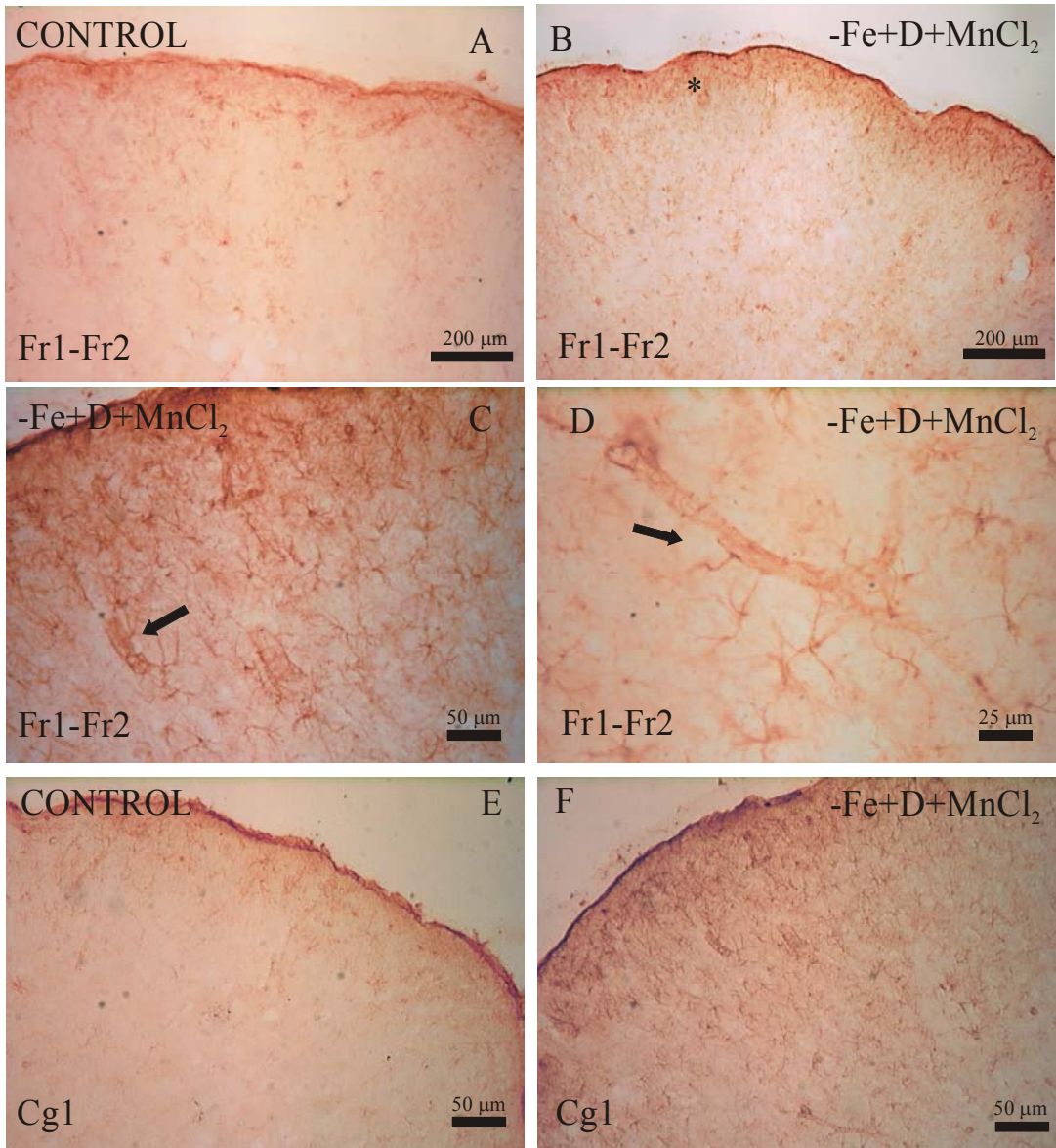
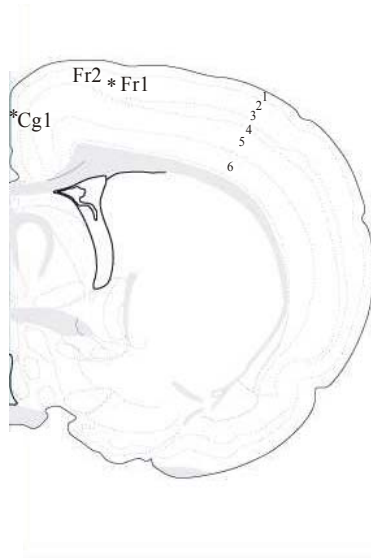


Figura 21

Fig. 21. Inmunorreactividad frente a GFAP en la corteza prefrontal (Fr1-Fr2) y en la corteza cingulada anterior (Cg1) de animales controles y en animales alimentados con dieta desprovista de hierro a los que se ha inyectado desferroxamina y además se ha tratado con $MnCl_2$. El esquema muestra la sección coronal del nivel 19 del atlas de cerebro de rata de Swanson (Swanson, L.M., 1998). El asterisco corresponde a la corteza prefrontal (Fr1-Fr2) y a la corteza cingulada anterior (Cg1).

(A) Animales controles en la corteza prefrontal (B) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ en la corteza prefrontal (C) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura B. La flecha muestra un vaso sanguíneo dilatado característico en la corteza prefrontal en animales tratados con $-Fe+D+MnCl_2$ (D) Sección longitudinal de un vaso sanguíneo donde se aprecia la dilatación del mismo y la presencia de astrocitos perivasculares contactando con el mismo (flecha) tras el tratamiento $-Fe+D+MnCl_2$ (E) Animales controles en la corteza cingulada anterior (Cg1) (F) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ en la corteza cingulada anterior (Cg1).

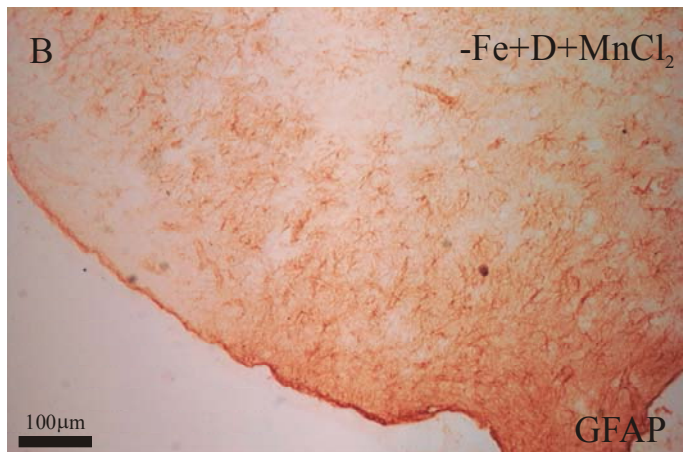
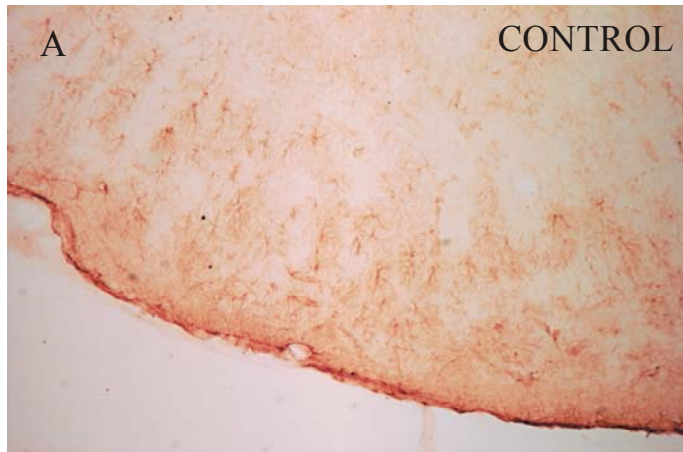
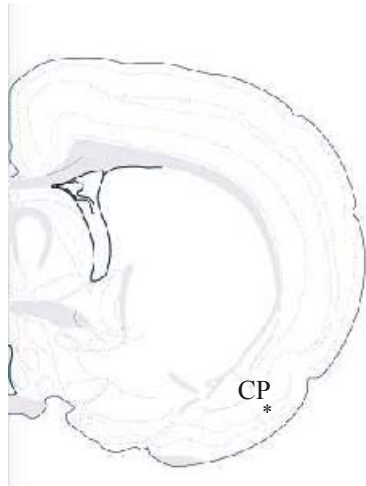


Figura 22

Fig. 22. Inmunorreactividad frente a GFAP en la corteza piriforme de animales controles y en animales alimentados con dieta desprovista de hierro a los que se ha inyectado desferroxamina y además se ha tratado con $MnCl_2$. El esquema muestra la sección coronal del nivel 19 del atlas de cerebro de rata de Swanson (Swanson, L.M., 1998). El asterisco corresponde a la corteza piriforme (CP).

(A) Animales controles en la corteza piriforme (B) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ en la corteza piriforme.

RESULTADOS

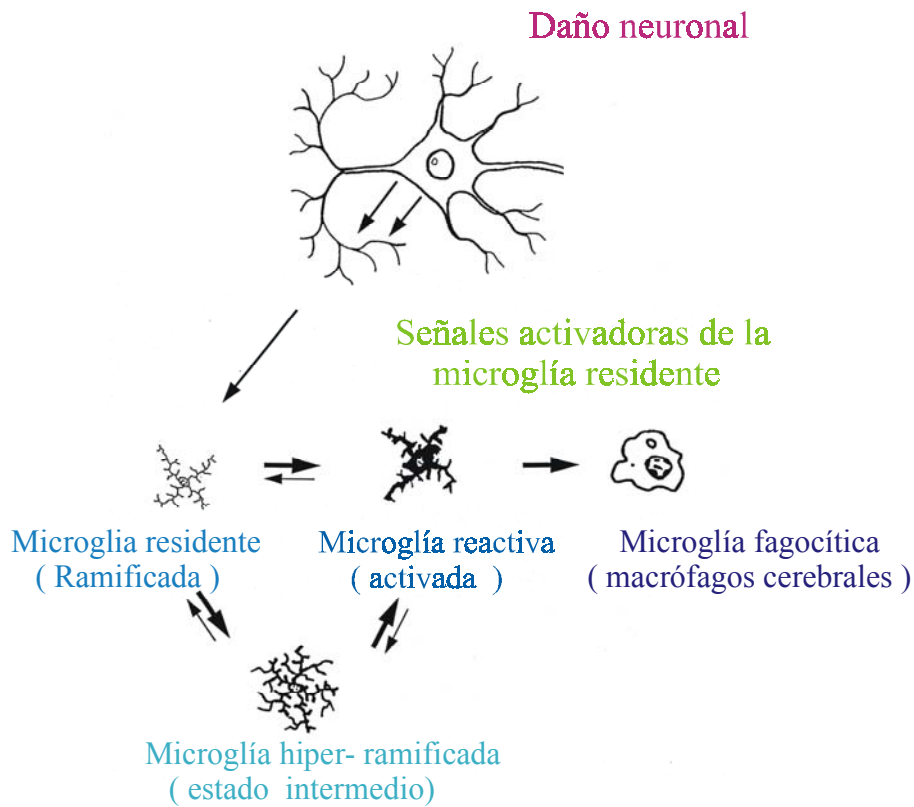


Fig. 23. Plasticidad funcional de la microglía. Las neuronas dañadas inducen a la microglía residente a convertirse en microglía activada mediante la emisión de señales indicadoras de daño y el grado de activación microglial dependerá de la severidad del daño neuronal en cuestión. Los daños más leves sólo producen hiper-ramificación de la microglía (Wilson y Molliver, 1994), sin embargo la mayoría de los daños neuronales producen el cambio de la microglía residente en microglía reactiva. Si se produce la muerte neuronal, la microglía se transforma en macrófagos cerebrales que eliminan las células muertas. Si, por el contrario, el daño neuronal cesa, la microglía hiper-ramificada y la reactiva pueden revertir de nuevo a la forma original de microglía residente; En cambio, la microglía que pasó al estadio de macrófagos cerebrales no pueden revertir a microglía residente sino que muere.

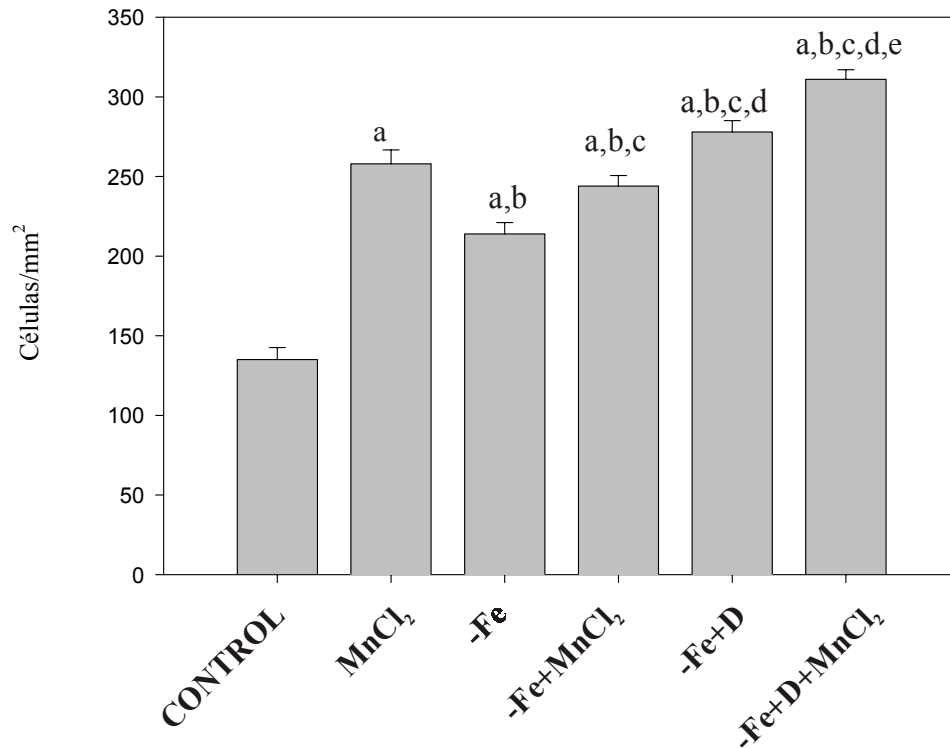
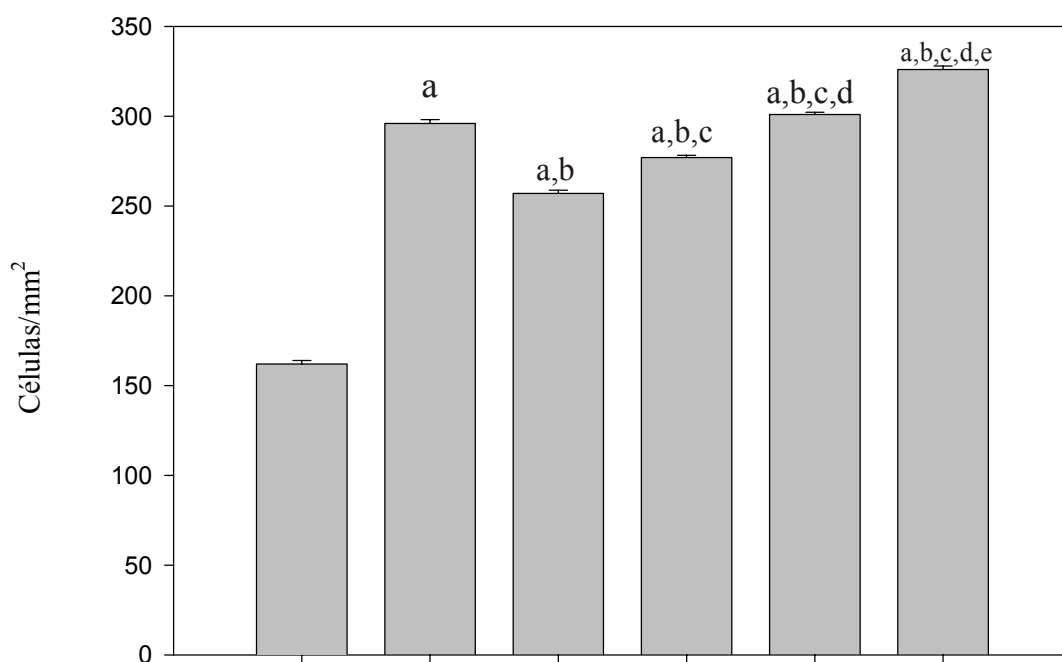


Fig. 24. Cuantificación de las células inmunopositivas frente a OX-42 en estriado. El conteo se realizó desde la zona medial hacia la lateral. Los resultados están expresados como células/mm² y los números son media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Significación estadística mediante ANOVA de una vía seguida de test de LSD: a, comparado con el control; b, comparado con MnCl₂; c, comparado con -Fe; d, comparado con -Fe+MnCl₂; e, comparado con -Fe+D; f, comparado con -Fe+D+MnCl₂; $p < 0.001$.

RESULTADOS



TRATAMIENTOS

Fig. 25. Cuantificación de las células inmunopositivas frente a OX-42 en SN. El conteo se realizó desde la zona medial hacia la lateral. Los resultados están expresados como células/mm² y los números son media \pm desviación estandar de cuatro experimentos independientes. Significación estadística mediante ANOVA de una vía seguida de test de LSD: a, comparado con el control; b, comparado con MnCl₂; c, comparado con -Fe; d, comparado con -Fe+MnCl₂; e, comparado con -Fe+D; f, comparado con -Fe+D+MnCl₂; p < 0.001.

3.1.5. Morfología de la microglía en estriado y SN.

Estriado

Se observó un aumento generalizado de la microglía en estriado con todos los tratamientos. No obstante, con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂ se produjo el aumento más significativo en el número de microglía en estriado (230 % respecto a los controles). También se encontró un aumento significativo en el número de microglía respecto a los controles en los siguientes tratamientos: C+MnCl₂ (191 %); -Fe (158 %); -Fe+MnCl₂ (180 %); -Fe+D (205 %) (Figura 24).

La microglía que se observa en el estriado de animales controles es de las características descritas de la microglía residente, es decir, su cuerpo celular es pequeño y posee abundantes procesos (Figura 26A).

En cambio, los animales alimentados con dieta carente en hierro a los que se les inyectó desferroxamina y MnCl₂ (-Fe+D+MnCl₂) presentaban una microglía de mayor tamaño con respecto a los controles y a los demás tratamientos, hiper-ramificada y con procesos engrosados (Figura 26B).

RESULTADOS

Asimismo, el tratamiento con dieta desprovista de hierro y además desferroxamina (-Fe+D) mostró en estriado una microglía muy desarrollada, de cuerpo muy engrosado y procesos muy cortos y gruesos presentando, así pues, mayor grado de activación microglial que el tratamiento sólo con dieta carente en hierro (-Fe), si bien sus procesos eran menos ramificados que los observados con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂ (Fig. 26C).

Por otra parte, los animales tratados con MnCl₂ (MnCl₂) mostraban claramente una microglía activada, con un cuerpo celular de mayor tamaño y procesos más cortos y engrosados con respecto a los controles, aunque su tamaño era menor que el de la microglía observada en los animales tratados con -Fe+D y con -Fe+D+MnCl₂ (Figura 26D).

Los animales tratados con dieta desprovista de hierro (-Fe) poseían también una microglía activada, aunque presentando un mayor grado de ramificación que con el tratamiento MnCl₂ (Figura 26E).

Finalmente, es importante destacar que el tratamiento con dieta carente en hierro y además MnCl₂ (-Fe+MnCl₂) daba lugar a una microglía de similares características morfológicas que la mostrada por los animales alimentados con dieta carente de hierro (Fig. 26E).

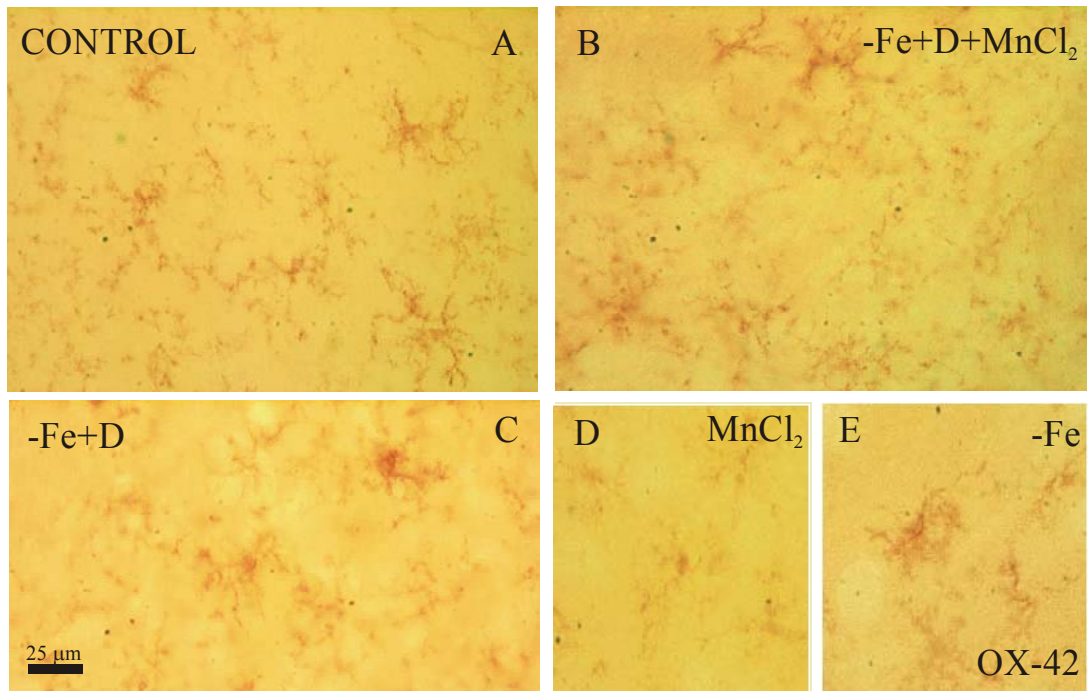


Figura 26

RESULTADOS

Fig. 26. Inmunorreactividad frente a OX-42 en estriado en animales controles y en animales tratados.

(A) Animales controles (B) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y MnCl_2
(C) Animales alimentados con dieta carente en hierro y tratados con desferroxamina (D) Animales tratados con MnCl_2 (E) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro.

RESULTADOS

B.- Sustancia Negra

Análogamente a lo que se observó en estriado, también en la SN se encontró un aumento generalizado de la microglía con todos los tratamientos, produciéndose el mayor aumento con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂ respecto a los controles (201%). Además, también se pudo observar un aumento significativo en el número de microglía respecto a los controles con los siguientes tratamientos: MnCl₂ (182 %); -Fe (158 %); -Fe+MnCl₂ (170 %); -Fe+D (185 %) (Figura 25).

Los animales controles muestran una morfología estelar típica de la microglía residente cuyo cuerpo celular es pequeño y posee procesos abundantes (Figs. 27A y 27C).

Sin embargo, el tratamiento con MnCl₂ (MnCl₂) dio lugar a una microglía activada con un cuerpo celular y prolongaciones engrosadas (Fig. 27D).

El tratamiento con dieta desprovista de hierro (-Fe) muestra una microglía activada muy desarrollada, cuyo cuerpo celular y prolongaciones son más engrosadas que con el tratamiento MnCl₂ (Fig. 27E).

Por otra parte, es importante destacar que los animales alimentados con dieta carente en hierro y tratados con MnCl_2 (-Fe+ MnCl_2) presentan una microglía de morfología hiper-ramificada (Fig. 27F).

Los animales alimentados con dieta desprovista de hierro que han sido tratados con desferroxamina (-Fe+D) muestran en la SN una microglía activada que, a diferencia de la observada tras el tratamiento MnCl_2 y -Fe, posee mayor tamaño, y se caracteriza por ser muy desarrollada con un cuerpo celular y procesos más engrosados (Fig. 27G).

Asimismo, se puede observar que el tratamiento con dieta carente de hierro, desferroxamina y MnCl_2 (-Fe+D+ MnCl_2) produce una microglía activada con morfología similar a -Fe+D (Fig. 27H).

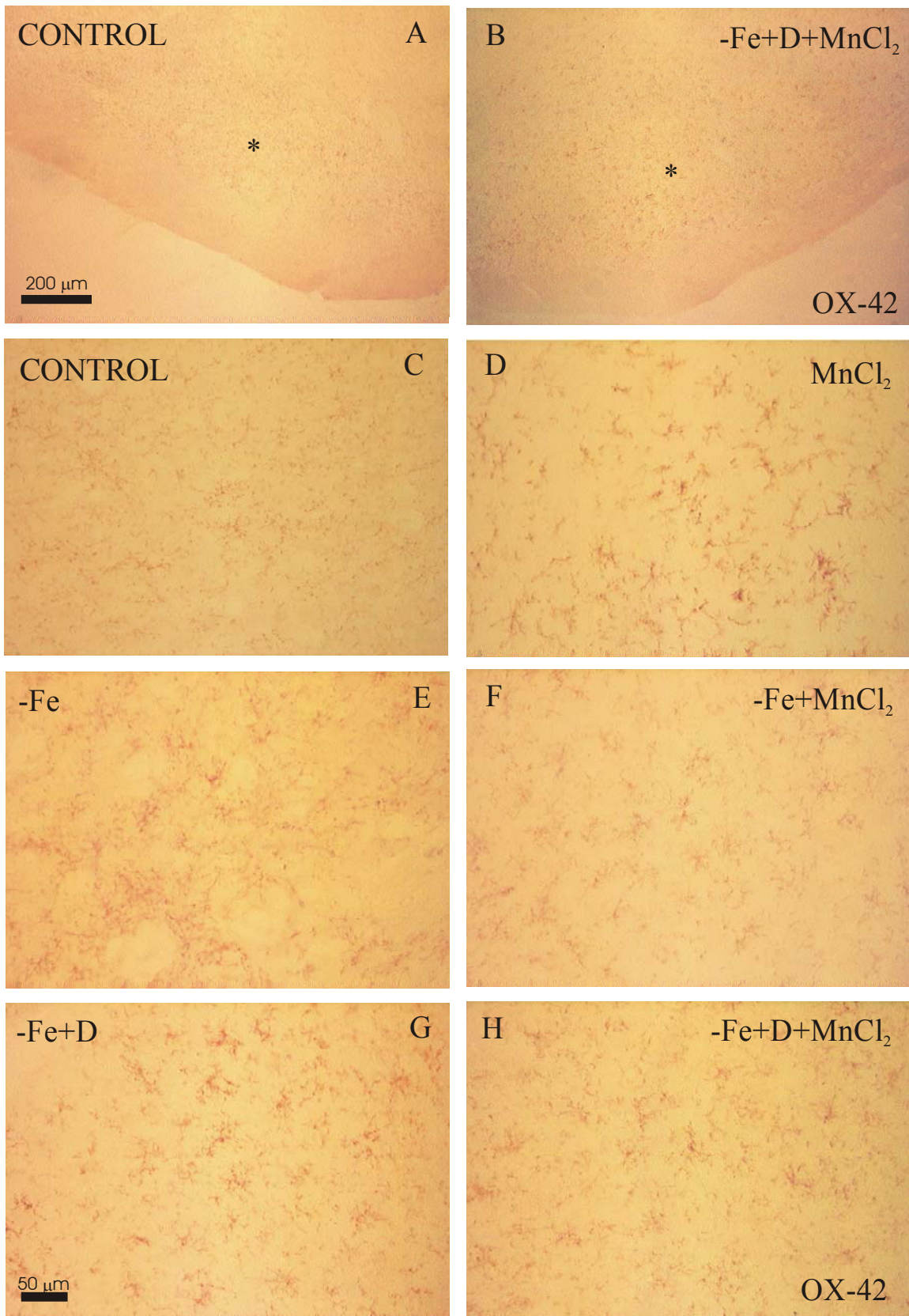


Figura 27

Fig. 27. Inmunorreactividad frente a OX-42 en SN en animales controles y en animales tratados.

(A) Animales controles (B) Animales alimentados con dieta carente de hierro, tratados con desferroxamina y MnCl_2 (C) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura A (D) Animales tratados con MnCl_2 (E) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro (F) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con MnCl_2 (G) Animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con desferroxamina (H) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura B.

3.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

Las macromoléculas endógenas modificadas por oxidación se pueden emplear como indicadores de estrés oxidativo, ya que tanto las proteínas, como el ADN y los lípidos sufren modificaciones químicas por esta causa (Stadtman, 1993).

Las modificaciones de las proteínas y los polinucleótidos pueden producirse de dos formas:

- a) Reacciones de adición producidas por productos intermedios de la peroxidación lipídica altamente reactivos.
- b) Modificaciones oxidativas directas de las macromoléculas.

En el caso de las proteínas, potentes agentes oxidantes como el radical hidroxilo modifican directamente los grupos amino de las cadenas peptídicas, dando lugar a aminoácidos alterados que se pueden emplear para valorar el daño oxidativo (Stadtman, 1993). Por otra parte, existe una modificación de las proteínas que se considera específica de daño oxidativo, que es la formación de grupos carbonilos (Levine y col., 1994). Así pues, la 2,4-DNPH reacciona con los grupos carbonilos y se puede utilizar como marcador del daño oxidativo de las proteínas (Szweida y col., 1993).

La 2,4-DNPH derivatiza los grupos carbonilos en las biomoléculas, dando lugar a la adición del grupo dinitrofenil (DNP) al grupo carbonilo contenido en las biomoléculas oxidadas. Cuando se asocia la reacción química de la 2,4-DNPH a una técnica inmunocitoquímica para detectar la unión del grupo DNP se marcan aductos de DNP en los grandes vasos sanguíneos y también en los cuerpos celulares neuronales aunque en menor intensidad.

Se ha podido observar de forma cualitativa, mediante tinción inmunohistoquímica de grupos carbonilos con dinitrofenilhidracina, una oxidación de proteínas mayor en los animales alimentados con dieta desprovista de hierro y tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ con respecto a los controles.

Este hecho se ha producido en las diversas estructuras estudiadas: el estriado, la SN y la corteza, obteniéndose un destacado marcaje de proteínas oxidadas en el parénquima y en el endotelio de los vasos sanguíneos, así como parece ser que también se han teñido proteínas oxidadas expresadas por los astrocitos perivasculares. Además, es importante destacar que también se aprecia una cierta dilatación vascular debido, probablemente, al efecto del manganeso en la producción de óxido nítrico mediante activación de la enzima iNOS (Figs. 28, 29 y 30).

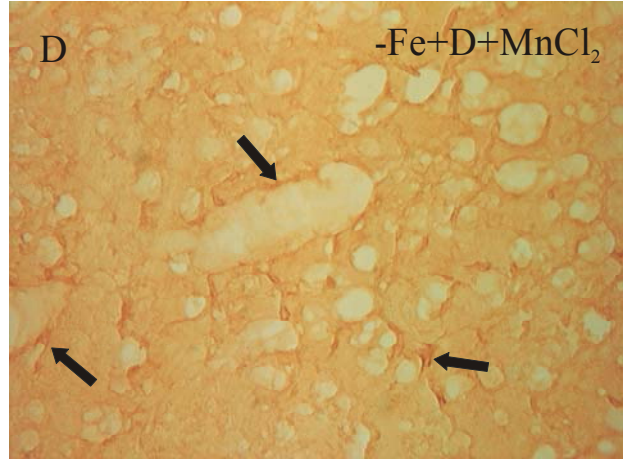


Figura 28

Fig.28. Inmunohistoquímica de oxidación de grupos carbonilos en el estriado en animales controles y en animales alimentados con dieta desprovista de hierro a los que se ha inyectado desferroxamina y además se ha tratado con $MnCl_2$. (A) Animales controles (B) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ (C) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura A (D) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura B. Se muestran vasos sanguíneos dilatados cuyo endotelio aparece marcado por la presencia de proteínas oxidadas (flechas).

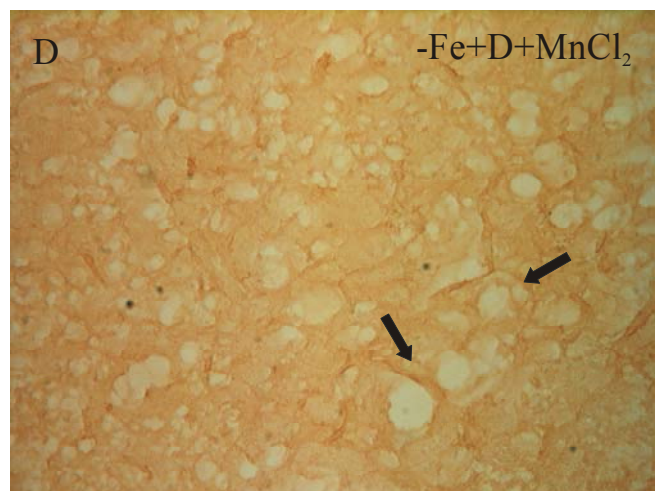
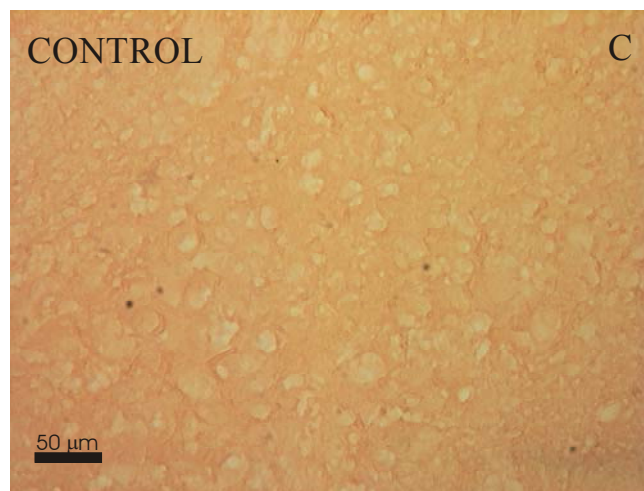
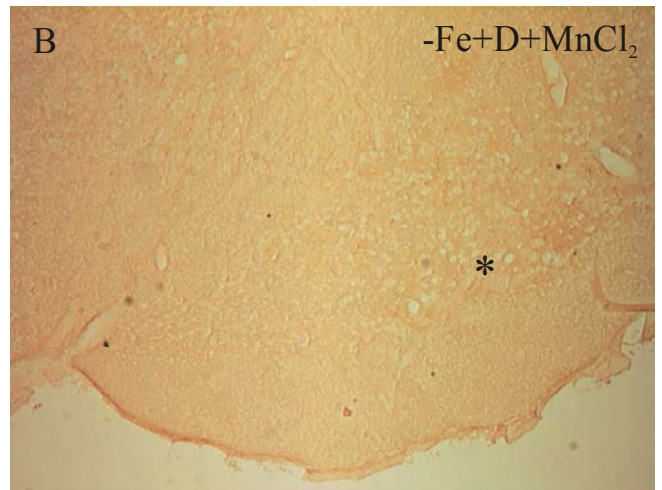
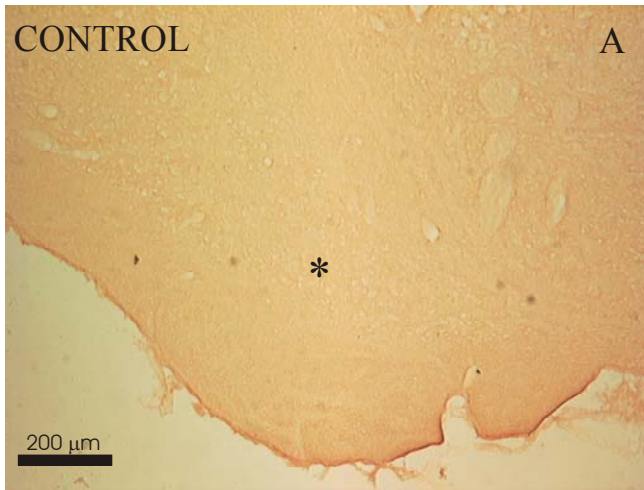


Figura 29

Fig.29. Inmunohistoquímica de oxidación de grupos carbonilos en la SN en animales controles y en animales alimentados con dieta desprovista de hierro a los que se ha inyectado desferroxamina y además se ha tratado con $MnCl_2$. A, B, C, D, Ver Figura 28. Se muestran vasos sanguíneos dilatados cuyo endotelio aparece marcado por la presencia de proteínas oxidadas (flechas).

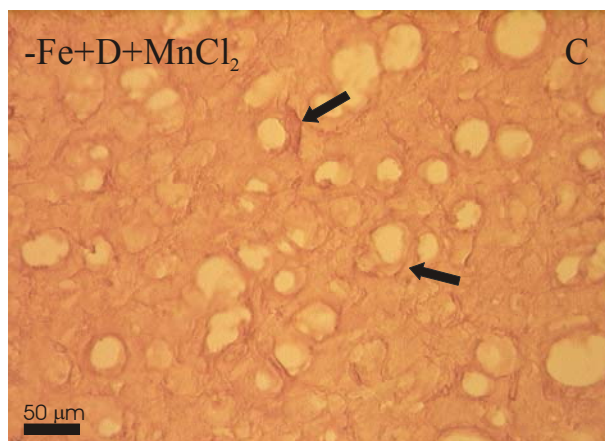
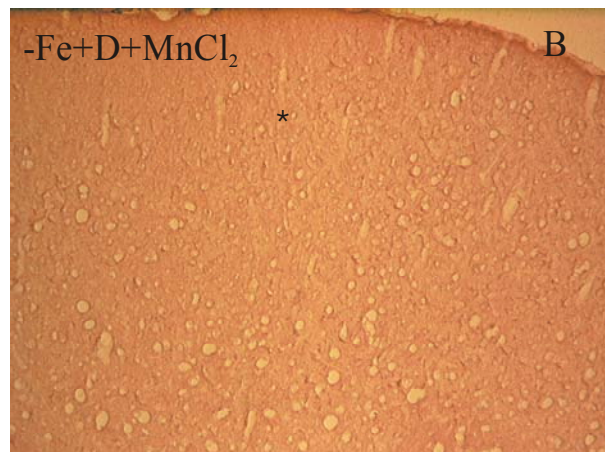
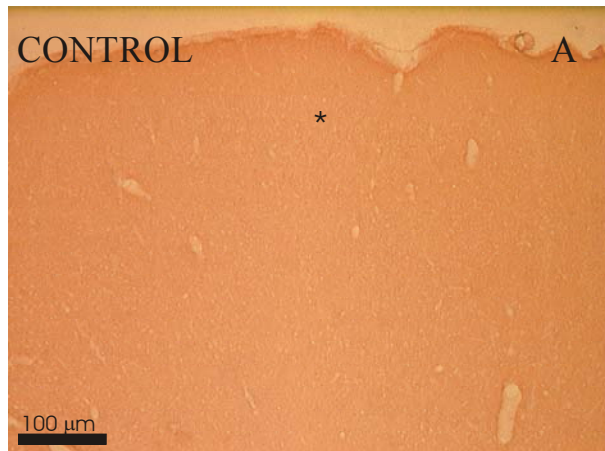


Figura 30

Fig. 30. Inmunohistoquímica de oxidación de grupos carbonilos en la corteza prefrontal en animales controles y en animales alimentados con dieta desprovista de hierro a los que se ha inyectado desferroxamina y además se ha tratado con $MnCl_2$.

(A) Animales controles (B) Animales con dieta desprovista de hierro, tratados con desferroxamina y $MnCl_2$ (C) Alta magnificación correspondiente al asterisco de la Figura B. Se muestran vasos sanguíneos dilatados cuyo endotelio aparece marcado por la presencia de proteínas oxidadas (flechas).

4. ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS A NIVEL CEREBRAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN SUERO Y TEJIDOS INDUCIDOS POR LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.

Paralelamente al estudio inmunohistoquímico, se determinaron una serie de marcadores de estrés oxidativo en suero y en diversos órganos (hígado, corazón, bazo y riñón) de estas ratas pertenecientes al experimento con dietas sintéticas.

Así pues, se midieron peróxidos lipídicos y MDA como indicadores de oxidación lipídica, grupos carbonilos, marcadores de oxidación de proteínas y la capacidad antioxidante, para valorar una posible correlación entre los citados parámetros y las cuantificaciones de astroglia y microglía realizadas en el estriado y en la SN así como con las características histológicas observadas tras los distintos tratamientos.

4.1. PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN SUERO Y TEJIDOS.

4.1.1. Peróxidos lipídicos.

En el suero se observó que la mayor cantidad de peróxidos lipídicos lo presentaban los animales alimentados con una dieta provista de hierro a los que se les había inyectado $MnCl_2$ (2.87 veces respecto a los controles). (Tabla 1).

RESULTADOS

Un aumento significativo, aunque menor, se observó en el grupo tratado con dieta carente de hierro y con MnCl_2 ($-\text{Fe}+\text{MnCl}_2$), así como los animales alimentados con dieta desprovista de hierro a los que se ha tratado con desferroxamina y MnCl_2 ($-\text{Fe}+\text{D}+\text{MnCl}_2$).

Los animales tratados con dieta desprovista de hierro ($-\text{Fe}$) y los animales pertenecientes al grupo de tratamiento $-\text{Fe}+\text{D}$ tenían una menor cantidad de peróxidos lipídicos en el suero con respecto a los controles.

Resultó bastante significativo el hecho de que los animales alimentados con dieta provista de hierro a los que se había inyectado MnCl_2 (MnCl_2) presentaron la mayor concentración de peróxidos lipídicos respecto a los controles en los órganos estudiados así como en el suero. Además, es importante destacar que el hígado y el riñón presentan un mayor aumento de peróxidos lipídicos que los demás órganos estudiados y que el suero (14.12 y 14.31 veces respecto a los controles, respectivamente).

Por otra parte, los tratamientos en los que se observa la menor concentración de peróxidos lipídicos fueron $-\text{Fe}+\text{D}$ en el hígado, corazón y riñón (0.200 ± 0.03 , 0.26 ± 0.030 y 0.25 ± 0.010 nmoles/mg proteína, respectivamente) y $-\text{Fe}+\text{D}+\text{MnCl}_2$ en el bazo (0.235 ± 0.020 nmoles/mg proteína). (Tabla 1).

RESULTADOS

TRATAMIENTO	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
CONTROL	1,175 ± 0,095	0,255 ± 0,005	0,770 ± 0,090	2,450 ± 0,350	0,255 ± 0,005
-Fe	0,825 ± 0,065	0,250 ± 0,020	0,775 ± 0,095	1,100 ± 0,010*	1,252 ± 0,020*
-Fe+MnCl₂	1,760 ± 0,100*	2,005 ± 0,005*	1,560 ± 0,300*	5,500 ± 0,500*	1,800 ± 0,200*
MnCl₂	3,360 ± 0,280* (2,87 veces)	3,600 ± 0,100* (14,12 veces)	1,900 ± 0,100* (2,47 veces)	6,730 ± 0,300* (2,75 veces)	3,650 ± 0,150* (14,31 veces)
-Fe+D	0,875 ± 0,100	0,200 ± 0,03	0,440 ± 0,040*	0,260 ± 0,030*	0,250 ± 0,010
-Fe+D+MnCl₂	1,902 ± 0,060*	0,210 ± 0,020	0,235 ± 0,020*	0,730 ± 0,080*	0,280 ± 0,110

Tabla 1. Niveles de Peróxidos lipídicos en el suero y en los órganos hígado, bazo, corazón y riñón de los animales pertenecientes al experimento con dietas sintéticas. Los resultados están expresados en nmoles peróxidos lipídicos/mg proteína y los valores son la media ± desviación estándar de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$ comparando con los valores controles.

RESULTADOS

4.1.2. MDA.

En el suero se observó que la mayor concentración de MDA la presentaron los animales pertenecientes al tratamiento -Fe+D+MnCl₂ (3.67 veces respecto a los controles).(Tabla 2).

Los animales alimentados con dieta provista de hierro a los que se les ha inyectado MnCl₂ (MnCl₂) y los animales alimentados con dieta carente en hierro también tratados con MnCl₂ (-Fe+ MnCl₂) mostraron aumentos significativos de MDA (0.495±0.025 y 0.502±0.027 nmoles/mg proteína, respectivamente).

Finalmente, los grupos de tratamiento que produjeron mayor concentración de MDA en el suero fueron -Fe+D y -Fe+D+MnCl₂ (0.740±0.020 y 1.100±0.040 nmoles/mg proteína, respectivamente).

Análogamente a lo observado en la determinación de los peróxidos lipídicos también fue bastante significativo que los animales alimentados con dieta provista de hierro y tratados con MnCl₂ (MnCl₂) presentaron las mayores cantidades de MDA respecto a los controles en los órganos estudiados, aunque no sucedió así en el suero. Además es importante señalar el gran aumento que experimentó el nivel de MDA en el corazón con el citado tratamiento adquiriendo un valor de 1.450±0.250 nmoles/mg proteína (27.88 veces el nivel de los controles). Por otra parte, hígado, bazo y riñón mostraron un aumento de 3.39, 2.89 y 3.95 veces respecto a los controles.

RESULTADOS

TRATAMIENTO	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
CONTROL	0,300 ± 0,030	0,230 ± 0,012	0,382 ± 0,005	0,052 ± 0,010	0,222 ± 0,025
-Fe	0,325 ± 0,005	0,222 ± 0,017	0,415 ± 0,005	0,076 ± 0,005	0,325 ± 0,015
-Fe+MnCl₂	0,502 ± 0,027*	0,285 ± 0,040	0,735 ± 0,015*	0,770 ± 0,065*	0,445 ± 0,065*
MnCl₂	0,495 ± 0,025*	0,782 ± 0,15* (3,39 veces)	1,100 ± 0,030* (2,89 veces)	1,450 ± 0,250* (27,88 veces)	0,875 ± 0,032* (3,95 veces)
-Fe+D	0,740 ± 0,020*	0,270 ± 0,015	0,270 ± 0,013*	0,075 ± 0,005	0,370 ± 0,010
-Fe+D+MnCl₂	1,100 ± 0,040* (3,67 veces)	0,340 ± 0,017	0,420 ± 0,012	0,550 ± 0,030*	0,460 ± 0,020*

Tabla 2. Niveles de MDA en el suero y en los órganos hígado, bazo, corazón y riñón de los animales pertenecientes al experimento con dietas sintéticas. Los resultados están expresados en nmoles MDA/ mg proteína y los valores son la media ± desviación estándar de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$ comparando con los valores controles.

RESULTADOS

4.1.3. Grupos carbonilos.

El mayor nivel de grupos carbonilos, marcador de oxidación proteica, en el suero lo mostró el grupo de tratamiento -Fe+D+MnCl₂ (23290 ± 1860 nmoles/ mg proteína, 1.58 veces respecto a los controles) (Tabla 3), habiéndose observado además en el estudio inmunohistoquímico que ese tratamiento es el que ejerce mayor efecto en las estructuras cerebrales analizadas.

Los grupos de tratamiento -Fe, MnCl₂ y -Fe+D mostraron 21142 ± 5297, 19562 ± 356 y 20900 ± 1860 nmoles/mg proteína respectivamente. Finalmente, los animales alimentados con dieta carente de hierro y tratados con MnCl₂ (-Fe+MnCl₂) así como los animales controles presentaron la menor concentración de grupos carbonilos en el suero (17995 ± 578 y 14786 ± 639 respectivamente).

Es importante destacar que el mayor incremento del nivel de grupos carbonilos respecto a los controles en el hígado se produce con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂ (1.38 veces respecto a los controles), al igual que sucede en el suero, mientras que en el corazón ocurre con el tratamiento -Fe+D (1.66 veces respecto a los controles).

RESULTADOS

También resulta interesante destacar que el bazo y el riñón presentan un elevado nivel basal de grupos carbonilos (22000 ± 4444 y 12476 ± 1481 nmoles/mg proteína respectivamente), observándose una disminución del nivel de grupos carbonilos con los distintos tratamientos en el bazo y en el riñón, excepto en este último con el tratamiento -Fe+D+MnCl₂, que experimenta un leve incremento respecto a los controles (13100 ± 2220 nmoles/mg proteína).(Tabla 3).

RESULTADOS

TRATAMIENTO	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
CONTROL	14786 ± 639	9968 ± 269	22000 ± 4444	15340 ± 1390	12476 ± 1481
-Fe	21142 ± 5297*	7936 ± 897	15142 ± 2648*	22920 ± 1100*	7873 ± 269*
-Fe+MnCl₂	17995 ± 578	9142 ± 3771	15312 ± 1092*	14990 ± 2710	5428 ± 673*
MnCl₂	19562 ± 356*	13121 ± 1597	15841 ± 134*	23020 ± 1870*	6338 ± 1331*
-Fe+D	20900 ± 370*	12170 ± 1900	15520 ± 3230*	25530 ± 2170* (1,66 veces)	10850 ± 1950
-Fe+D+MnCl₂	23290 ± 1860* (1,58 veces)	18250 ± 238* (1,83 veces)	17200 ± 1910*	19950 ± 1886*	13100 ± 2220

Tabla 3. Niveles de grupos carbonilos en el suero y en los órganos hígado, bazo, corazón y riñón de los animales pertenecientes al experimento con dietas sintéticas. Los resultados están expresados en nmoles grupos carbonilos/ mg proteína y los valores son la media ± desviación estándar de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$ comparando con los valores controles.

4.1.4. Capacidad antioxidante.

Debido a que el manganeso es considerado por algunos autores como un efectivo *scavenger* de radicales libres (Gerber y col., 2002), lo que le confiere una acción antioxidante (Chang y Kosman, 1989) consideramos de gran interés determinar la capacidad antioxidante en suero y los órganos sistémicos hígado, bazo, corazón y riñón con los distintos tratamientos.

Se observó en el suero un aumento generalizado de la capacidad antioxidante respecto a los controles (29.53 ± 1.28 meq Trolox/mg proteína) con todos los tratamientos excepto con -Fe+D+MnCl₂ , donde se produjo un leve descenso de la misma (28.48 ± 12.8 meq Trolox/mg proteína). No obstante, el grupo de animales alimentados con dieta provista de hierro a los que se había inyectado MnCl₂ mostraron la mayor capacidad antioxidante en el suero (56.14 ± 3.01 meq Trolox/mg proteína).

En el hígado todos los grupos mostraron un incremento de la capacidad antioxidante respecto a los controles (62.30 ± 5.77 meq Trolox/mg proteína), siendo los tratamientos -Fe+D y -Fe+D+MnCl₂ los que presentaron mayor elevación de este parámetro (116.81 ± 6.1 y 100 ± 5.4 meq Trolox/ mg proteína, respectivamente).

RESULTADOS

Al estudiar la capacidad antioxidante en el bazo con los distintos tratamientos se encontró un aumento de la misma respecto a los controles (83.40 ± 1.66 meq Trolox/mg proteína) excepto en el grupo de animales alimentados con dieta provista de hierro a los que se ha inyectado MnCl_2 y los animales pertenecientes al grupo $-\text{Fe}+\text{D}+\text{MnCl}_2$, que muestran una disminución de la capacidad antioxidante (72.83 ± 6.45 y 78.62 ± 5.82 meq Trolox /mg proteína respectivamente).

En el corazón todos los tratamientos dan lugar a un descenso de la capacidad antioxidante respecto a los controles (136.20 ± 7.07 meq Trolox/ mg proteína), si bien es importante señalar que la mayor disminución se produjo con los tratamientos $-\text{Fe}+\text{D}$ y $-\text{Fe}+\text{D}+\text{MnCl}_2$, que presentaron unos niveles de 89.94 ± 8.57 y 95.01 ± 9.4 meq Trolox/mg proteína respectivamente (Tabla 4).

RESULTADOS

TRATAMIENTO	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
CONTROL	29,53 ± 1,28	62,30 ± 5,77	83,40 ± 1,66	136,20 ± 7,07	81,82 ± 3,02
-Fe	43,19 ± 9,15*	65,58 ± 11,68	83,71 ± 5,91	130,6 ± 25,25	96,0 ± 7,05
-Fe+MnCl₂	47,50 ± 11,09*	64,03 ± 14,44	93,4 ± 39,4	111,3 ± 17,84	87,17 ± 12,61
MnCl₂	56,14 ± 3,01*	88,18 ± 4,74*	72,83 ± 6,45	131,57 ± 19,66	69,85 ± 6,59
-Fe+D	46,88 ± 2,15*	116,81 ± 6,1*	97,75 ± 5,46*	89,94 ± 8,57	72,81 ± 6,49
-Fe+D+MnCl₂	28,48 ± 12,8	100,56 ± 5,4*	78,62 ± 5,82	95,01 ± 9,4	77,83 ± 1,84

Tabla 4. Capacidad antioxidante en el suero y en los órganos hígado, bazo, corazón y riñón de los animales pertenecientes al experimento con dietas sintéticas. Los resultados están expresados en meq de Trolox/ mg proteína y los valores son la media ± desviación estándar de cuatro experimentos independientes. La significación estadística se calculó mediante t de Student: *, $p < 0.05$ comparando con los valores controles.

4.2 ESTUDIO DE LA CORRELACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS PARÁMETROS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS DISTINTOS ÓRGANOS CON LOS DATOS DE CUANTIFICACIÓN GLIAL DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Para establecer si los cambios observados en estriado y SN se podrían reflejar a nivel sistémico consideramos necesario estudiar la posible correlación existente entre los distintos marcadores de estrés oxidativo y los niveles de células inmunopositivas frente a GFAP y OX-42, indicadores de reacción glial en los distintos grupos de animales tratados con las dietas sintéticas.

Así pues, se estudió la correlación entre los parámetros oxidativos: concentración de peróxidos lipídicos, MDA, grupos carbonilos, así como la capacidad antioxidante en el suero y en tejidos (hígado, bazo, corazón y riñón) con los niveles de células inmunorreactivas a GFAP y a OX-42, indicadores de la reacción de la astrogliá y la microglía respectivamente en el estriado y en la SN, estructuras implicadas en múltiples procesos cerebrales degenerativos.

4.2.1. Estudio de la correlación de los parámetros oxidativos y los niveles de células inmunopositivas frente a GFAP en estriado en los distintos tratamientos.

Tras estudiar la correlación de los parámetros oxidativos en el suero y los órganos hígado, bazo, corazón y riñón con la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP en estriado, se observó una correlación estadísticamente significativa entre el nivel de grupos carbonilos en el suero y la citada cuantificación de astrogliá en estriado ($r= 0.835$, $p= 0.038$). (Tabla 5).

RESULTADOS

	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
Peróxidos lipídicos-GFAP Estriado	0,353	0,258	0,015	0,024	0,247
	0,492	0,62	0,977	0,963	0,636
MDA-GFAP Estriado	0,722	-0,021	0,242	0,452	0,535
	0,104	0,967	0,644	0,367	0,273
Grupos carbonilos-GFAP Estriado	0,835	0,549	-0,804	0,487	-0,236
	0,038	0,258	0,053	0,327	0,652
Capacidad antioxidante-GFAP Estriado	0,382	0,638	0,027	-0,686	-0,302
	0,454	0,172	0,959	0,132	0,559

Tabla 5. Correlación entre los parámetros oxidativos estudiados en suero, hígado, bazo y riñón y la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP en estriado en los distintos grupos de tratamiento. En cada cuadro la primera cifra corresponde al valor del coeficiente de correlación (r) y la segunda al valor de la significación estadística (p).

4.2.2. Estudio de la correlación entre los parámetros oxidativos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP en la SN en los distintos grupos de tratamiento.

En este caso, también se observó una correlación estadísticamente significativa en el suero, entre la concentración de grupos carbonilos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP en la SN ($r= 0.856$, $p= 0.029$).(Tabla 6).

RESULTADOS

	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
Peróxidos lipídicos-GFAP SN	0,377	0,241	-0,028	-0,008	0,226
	0,46	0,645	0,957	0,987	0,666
MDA-GFAP SN	0,766	0,378	0,227	0,453	0,553
	0,075	0,459	0,664	0,366	0,254
Grupos carbonilos-GFAP SN	0,856	0,625	-0,754	0,523	-0,158
	0,029	0,185	0,083	0,286	0,764
Capacidad antioxidante-GFAP SN	0,342	0,696	-0,029	-0,693	-0,373
	0,507	0,124	0,955	0,126	0,465

Tabla 6. Correlación entre los parámetros oxidativos estudiados en suero, hígado, bazo y riñón y la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP en SN en los distintos grupos de tratamiento. En cada cuadro la primera cifra corresponde al valor del coeficiente de correlación (r) y la segunda al valor de la significación estadística (p).

4.2.3. Estudio de la correlación entre los parámetros oxidativos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en el estriado.

Se ha observado una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de MDA en el suero y la cuantificación de células inmunorreactivas a OX-42 en el estriado ($r= 0.844$, $p= 0.034$). Igualmente se observó una correlación estadísticamente significativa entre el nivel de grupos carbonilos en el suero y la cantidad de células inmupositivas a OX-42 en el estriado ($r= 0.858$, $p= 0.028$). (Tabla 7).

RESULTADOS

	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
Peróxidos lipídicos- OX-42 Estriado	0,319	0,146	-0,136	-0,096	0,107
	0,536	0,782	0,797	0,856	0,839
MDA- OX-42 Estriado	0,844	0,307	0,129	0,38	0,476
	0,034	0,553	0,806	0,456	0,339
Grupos Carbonilos- OX-42 Estriado	0,858	0,693	-0,678	0,493	-0,035
	0,028	0,127	0,138	0,319	0,947
Capacidad antioxidante- OX-42 Estriado	0,234	0,749	0,0103	-0,771	-0,407
	0,655	0,086	0,984	0,072	0,422

Tabla 7. Correlación entre los parámetros oxidativos estudiados en suero, hígado, bazo y riñón y la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en estriado en los distintos grupos de tratamiento. En cada cuadro la primera cifra corresponde al valor del coeficiente de correlación (r) y la segunda al valor de la significación estadística (p).

4.2.4. Estudio de la correlación entre los parámetros oxidativos y la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en la SN.

Al valorar la correlación entre el nivel de grupos carbonilos en el suero y en los distintos órganos estudiados y la cuantificación de microglía inmunopositiva frente a OX-42 en la SN se ha obtenido una correlación estadísticamente significativa entre las dos variables en el suero ($r= 0.865$, $p= 0.025$). (Tabla 8).

RESULTADOS

	Suero	Hígado	Bazo	Corazón	Riñón
Peróxidas lipídicos- OX-42 SN	0,355	0,23	-0,033	-0,021	0,224
	0,488	0,661	0,95	0,967	0,669
MDA- OX- 42 SN	0,752	0,363	0,216	0,436	0,541
	0,084	0,479	0,681	0,386	0,267
Grupos carbonilos- OX-42 SN	0,865	0,601	-0,774	0,29	-0,171
	0,025	0,207	0,07	0,576	0,745
Capacidad antioxidante- OX-42 SN	0,353	0,689	-0,016	-0,69	-0,347
	0,492	0,129	0,976	0,129	0,499

Tabla 8. Correlación entre los parámetros oxidativos estudiados en suero, hígado, bazo y riñón y la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 en SN en los distintos grupos de tratamiento. En cada cuadro la primera cifra corresponde al valor del coeficiente de correlación (r) y la segunda al valor de la significación estadística (p).

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR EL MANGANESO. MODELO EXPERIMENTAL DE INTOXICACIÓN CRÓNICA.

El manganeso es un elemento traza ubicado en todos los tejidos que es necesario para el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Así pues, el manganeso es esencial para un funcionamiento adecuado del sistema inmunitario, la regulación de la concentración de la glucosa sanguínea y la energía celular, el crecimiento del hueso, defensa frente a la acción de los radicales libres y junto a la vitamina K ayuda a la coagulación de la sangre. Asimismo, el manganeso actúa como cofactor de varias enzimas entre las que destacan la arginasa (interviene en la formación de la urea), glutamina sintetasa (crítica para el metabolismo cerebral del amoníaco), fosfoenolpiruvato descarboxilasa (gluconeogénesis) y manganeso superóxido dismutasa (antioxidante) (Hurley y Keen, 1987).

Sin embargo, el manganeso también actúa como un tóxico cerebral, de forma que su exposición crónica conlleva la acumulación del mismo en el cerebro, especialmente en los gánglios basales, lo que da lugar a alteraciones neurológicas similares a la enfermedad de Parkinson (Donaldson, 1987; Ono y col.,1995 ; Aschner, 1997).

DISCUSIÓN

La identificación del compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), una heroína sintética que destruye las neuronas dopaminérgicas de la SN, sugirió la hipótesis del papel tóxico de determinados factores ambientales en la etiología de la EP. Así pues, otros compuestos con homología estructural con el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), metabolito activo del MPTP, como por ejemplo el herbicida 1-1'-dimetil-4,4'-bipiridinio (paraquat), se han propuesto como posibles factores de riesgo; De hecho, la exposición laboral a paraquat se ha asociado a parkinsonismo (Disalzi y col., 2000; Liou y col., 1997).

Además, el fungicida etilenbisditiocarbamato de manganeso (maneb) disminuye la actividad locomotora (Morato y col., 1989), potencia los efectos del MPTP (Morato y col., 1989) y también se ha asociado con parkinsonismo; asimismo, el compuesto metilciclopentadienil tricarbonilo de manganeso (MMT), utilizado como aditivo en la gasolina también se relaciona con este síndrome (Lynam y col., 1999).

Del mismo modo, la exposición crónica al manganeso y compuestos derivados dan lugar a encefalopatía hepática causando síntomas neuropsiquiátricos (Chandra y col., 1983; Yamada y col., 1986) que, a menudo, se manifiestan con síntomas extrapiramidales parecidos a los de la EP, entre los

que se encuentran bradiquinesia y distonía (Barbeau y col., 1984; Devenyi y col., 1994; Donaldson y col., 1987; Wang y col., 1989).

La forma de administrar el manganeso, el compuesto de manganeso empleado y la evaluación del daño producido por éste varía de unos estudios a otros en función del efecto a valorar. Así, en unos estudios se emplea la administración de manganeso en agua de bebida (Ahmed Elbetieha y col., 2000; Lai y col., 1992; Lai y col., 1999), mediante dietas sintéticas (Dorman y col., 2001), por vía parenteral (Ono y col., 1995), por vía inhalatoria (Brennedan y col., 2000; Newland y col., 1999; Roels y col., 1997), por vía intravenosa (Zheng y col., 2000), mediante inyección intraperitoneal (Chen y col., 2001; Roels y col., 1997; Serra y col., 2000) y mediante inyección intraestriatal (Brouillet y col., 1993; Sloom y col., 1994).

En relación al compuesto de manganeso, los más utilizados son: $MnCl_2$ (Ahmed Elbetieha y col., 2000; Brennedan y col., 2000; Chen y col., 2001; Lai y col., 1992; Lai y col., 1999; Roels y col., 1997; Zheng y col., 2000), MnO_2 (Roels y col., 1997), $MnSO_4$ (Dorman y col., 2001; Ranasinghe y col., 2000), MMT (Zheng y col., 2000), maneb (Thiruchelvam y col., 2000) y paraquat (Thiruchelvam y col., 2000).

DISCUSIÓN

Considerando los estudios farmacocinéticos comparativos entre $MnCl_2$ y MnO_2 (Roels y col., 1997) y entre $MnCl_2$ y MMT (Zheng y col., 2000) hemos elegido el modelo de intoxicación crónica por $MnCl_2$ dada su mayor capacidad de acumulación en los tejidos, especialmente en estriado (Roels y col., 1997; Zheng y col., 2000).

Asimismo, se ha podido observar también una variabilidad respecto a las dosis utilizadas en las diversas investigaciones y a la edad de los animales considerados. Además, se sabe que el manganeso modifica diferentes marcadores de actividad monoaminérgica en el cerebro y que este efecto es mayor en animales viejos (Desole y col., 1994), por lo que hemos empleado animales de 18 meses para valorar los efectos del mismo en el metabolismo energético, síntesis de determinadas enzimas y reacción glial en el sistema dopaminérgico nigro- estriado, otros sistemas dopaminérgicos (N. Accumbens y AVT), así como en otras estructuras de los ganglios basales.

Por otra parte, se ha demostrado que la disfunción mitocondrial es uno de los sucesos subyacentes en el proceso de envejecimiento biológico, así como en las enfermedades neurodegenerativas (Ames, 2004), y que los niveles de sistemas antioxidantes se modifican con la edad sin seguir un patrón determinado, tanto en cerebro como en órganos sistémicos (Kim y col., 2003), lo que significa un aumento del estrés oxidativo en animales viejos.

Así pues, basándonos en este planteamiento empleamos animales jóvenes de 3 meses para la determinación de oxidación proteica y lipídica en diversas estructuras cerebrales y sistémicas.

Todo lo anteriormente descrito nos llevó a utilizar como modelo de intoxicación crónica por manganeso la administración de $MnCl_2$ por vía intraperitoneal en ratas durante 30 días.

2. EFECTO DEL $MnCl_2$ EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO. REACCIÓN GLIAL EN SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS.

Inicialmente hemos administrado $MnCl_2$ a la dosis baja de 6 mg/kg/ día durante 30 días para realizar el estudio de los efectos del manganeso en el metabolismo celular. Partíamos de la premisa de que el manganeso altera el metabolismo energético mitocondrial a distintos niveles (Brown y col., 1999; Zheng y col., 1998). Con esta investigación hemos puesto de manifiesto que el tratamiento con manganeso disminuye significativamente la actividad SDH en casi todas las estructuras estudiadas (estriado, SN, GP, N.Accumbens, AVT y núcleos subtalámicos). De hecho, es importante destacar que el descenso de la actividad de la enzima SDH fue de casi el 30% en la SN y en el estriado, y dada la implicación de estas estructuras cerebrales en el circuito de los ganglios basales, este hecho podría explicar los síntomas extrapiramidales (distonía, hipoquinesia, rigidez y temblor), conocidos como parkinsonismo y descritos en la intoxicación crónica por manganeso. Por lo tanto, este hallazgo confirma el hecho de que la inyección de manganeso en el estriado de rata produce lesiones excitotóxicas mediante alteración del metabolismo energético (Brouillet y col., 1993) y pone de manifiesto otro mecanismo a través del cual el manganeso

DISCUSIÓN

afecta a la mitocondria, ya que se acepta que interfiere en la fosforilación oxidativa inhibiendo la F1-ATPasa (Gavin y col., 1992; Gavin y col., 1999) y el complejo I (Chen y col., 2002), lo que conducirá a la depleción de ATP (Chen y col., 1999; Roth y col., 2000) .

Como se sabe, la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial se traduce en un aumento de radicales libres de oxígeno que puede conducir a una situación de estrés oxidativo, la cual, en última instancia, puede concluir con la muerte celular ocasionada por necrosis o apoptosis (Nicotera y Orrenius, 1994).

Además, dado que la astrogliá y las células microgliales reaccionan ante las señales provenientes de las neuronas (Giulian y col., 1989; Delacourte, 1990; Eclancher y col., 1990; Mucke, 1991; Perry y col., 1993; Gehrman y col., 1995; Kahn y col., 1995; Craig y col., 1996; Rabchevsky y col., 1998; Mirza y col., 2000; De Nicola y col., 2003; Mrak y col., 2005) esto las hace buenos indicadores de procesos que implican daño y degeneración neuronal. Por lo tanto, fue estudiada la reacción glial tras el tratamiento con manganeso.

Para ello realizamos el estudio inmunocitoquímico de la población astrocitaria y de la microglía después del tratamiento con $MnCl_2$.

La reactividad astrocitaria se define primariamente como un incremento en el número y en el tamaño de las células que expresan GFAP y normalmente es provocado por muchas formas diferentes de daño neuronal.

Pudimos observar un aumento significativo de la densidad de células inmunopositivas frente a GFAP en relación a los controles tanto en el estriado como en la SN, es decir, tanto en la terminal como en la región del cuerpo celular; es interesante destacar la existencia de un gradiente de distribución negativo o decreciente desde la zona medial hacia la lateral en el estriado, de manera que la densidad de astrocitos en el estriado medial fue aproximadamente el doble de la que muestran los localizados en la parte lateral de este área cerebral. Sin embargo, la SN fue más homogénea y no mostró un gradiente topográfico característico.

Por otra parte, no se produjo cambio en la inmunorreactividad frente a GFAP en el AVT, en el N. Accumbens ni en el GP, estructuras pertenecientes a otros sistemas dopaminérgicos distintos del nigro-estriado.

En estudios previos se ha descrito la inducción de astrocitosis por el manganeso (Spranger y col., 1998). Además, el manganeso administrado en ratas por vía intranasal durante 3 semanas produjo un aumento de los niveles de GFAP y S-100 en los bulbos olfatorios.

DISCUSIÓN

Así pues, los cambios en la inmunorreactividad a GFAP se consideran un indicador sensible de la reacción astrocitaria ante cualquier daño ocurrido en el tejido cerebral.

Análogamente a lo observado en la astrogliá, también se observó un aumento de la microglía inmunorreactiva a OX-42, tanto en el estriado como en la SN, si bien se pudo apreciar un gradiente descendente, aunque no estadísticamente significativo, desde la zona medial hacia la lateral en ambas estructuras. Por otra parte, las células microgliales presentaron una morfología característica de la microglía activada e incluso se pudieron observar células fagocíticas en respuesta al tratamiento con $MnCl_2$ en la SN y, sobre todo, en el estriado. Estos cambios en la densidad y morfología de las células microgliales inducidos por manganeso se produjeron en estas áreas cerebrales específicamente, mientras que no se observaron en otras regiones estudiadas como son el AVT, N. Accumbens y el GP. La activación microglial inducida por manganeso en el sistema nigro-estriado podría ser una consecuencia de un daño tisular específico, una activación específica de células gliales o ambos. También se ha descrito que niveles elevados de manganeso potencian la producción de óxido nítrico microglial como respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS), potente agente proinflamatorio; Esta interesante actividad del manganeso no la poseen otros metales de transición como el hierro, cobalto, cobre y zinc (Chang y col., 1999).

En este contexto, es importante destacar la presencia de microglía reactiva en la SN de pacientes de EP (Fiszler y col., 2001), así como esta respuesta también se ha descrito en modelos animales de EP (Castaño y col., 1998; Herrera y col., 2000; Kohutnicka y col., 1998). Otro hecho importante es que la SN contiene la mayor concentración de microglía del cerebro (Lawson y col., 1990) y posee un tejido vascular específico que supone una barrera hematoencefálica ineficaz (Ross y col., 1995).

Nuestros resultados son congruentes con la hipótesis que afirma que el manganeso provoca un estímulo inflamatorio para la SN y el estriado, que podría ser deletéreo para el sistema nigro-estriado. De hecho, se sabe que la microglía y los astrocitos activados secretan diferentes citoquinas proinflamatorias y moléculas citotóxicas como interleukina-1 (IL-1), Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y óxido nítrico (NO) (Benveniste y col., 1992; Chang y col., 1999; Chung y col., 1990; Lieberman y col., 1989); Se ha descrito aumento en la producción de estas sustancias por manganeso, el cual induce la iNOS de la microglía (Spranger y col., 1998) y los astrocitos, aunque parece que el manganeso no es citotóxico para las células gliales.

Según los estudios de Olanow y colaboradores (1996), realizados en mono, el GP se afectaba al inicio de la enfermedad por manganeso mostrando gliosis. También, existen casos de parkinsonismo descritos en humanos donde se

DISCUSIÓN

observa mayor intensidad de señal en el GP y en la SN mediante resonancia magnética (Katsuragi y col., 1996). Por otra parte, Spadoni y colaboradores (2000) emplearon un modelo de intoxicación crónica por manganeso administrando a ratas Wistar soluciones de Mn^{2+} en agua de bebida a la dosis 20 mg/ kg/ día durante 3 meses y, al igual que en nuestro estudio, tampoco se observó gliosis en el GP ni tampoco pérdida neuronal. No obstante, en el estudio de Spadoni y colaboradores (2000) las células del GP de animales tratados resultaban extremadamente vulnerables en cultivo respecto a las de los controles.

Este aumento , tanto de la densidad de la astroglia como de la microglía, acompañados de cambios morfológicos, indicadores de reactividad astrogliar, en el estriado y en la SN, a diferencia de las demás áreas cerebrales estudiadas, corroboran los estudios realizados por Roels y colaboradores (1997), donde se pone de manifiesto la preferencia del $MnCl_2$ por el estriado y nos hace pensar en una selectividad del mismo por el sistema dopaminérgico nigro-estriado. Dado que los cuerpos de las neuronas dopaminérgicas se encuentran en la SNc y proyectan al estriado, estableciendo sinapsis mediante el neurotransmisor DA, estos hallazgos nos orientan también hacia la búsqueda de una explicación referente al metabo-

lismo de la DA como principal mecanismo responsable de la toxicidad crónica del $MnCl_2$, ya que su implicación se ha postulado en diversas investigaciones (Cuesta de Di Zio y col., 1995; Miller y col., 1999; Serra y col., 2000).

3. ESTUDIO DEL EFECTO DEL MANGANESO A NIVEL DE NEUROTRANSMISIÓN EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGRO-ESTRIADO Y OTROS SISTEMAS RELACIONADOS.

Dado que los cambios energéticos y la mayor reactividad glial se observó en el estriado y la SN nos centramos en determinar los posibles mecanismos a través de los cuales el manganeso afecta al sistema dopaminérgico nigro-estriado.

Así pues, la activación de las células gliales en respuesta a la administración de manganeso podría estar asociado con la toxicidad de DA, puesto que las áreas dopaminérgicas estaban especialmente afectadas. Se acepta que la DA puede ejercer efectos neurotóxicos a través del metabolismo enzimático formando H_2O_2 que puede dar lugar a RL en presencia de metales (Olanow y col., 1999; Spina y col., 1989) o también puede autooxidarse produciendo varios compuestos reactivos (Halliwell y col., 1984; Stokes y col., 1999); de hecho, Linert y col (1996) han mostrado que el Mn (II) aumenta significativamente el rango de auto-oxidación de la DA *in vitro*.

También se ha descrito que el manganeso, además de favorecer la autooxidación de la DA también potencia la autooxidación del precursor de la misma, L-DOPA, en células

DISCUSIÓN

en cultivo y en estudios con ratas empleando la técnica de microdiálisis (Serra y col., 2000).

Parece ser que el manganeso altera la liberación y/o permanencia de la DA en el espacio sináptico en el estriado (Ingersoll y col., 1999).

Además, se sabe que inhibe de forma no competitiva al transportador de glutamato, aumentando el nivel de dicho neurotransmisor, lo que podría explicar los efectos excitotóxicos del $MnCl_2$ (Brouillet y col., 1993).

Así, en la fase más temprana de la intoxicación por manganeso existe una pérdida de regulación de la liberación de DA mediada por los receptores presinápticos D2 de DA en las terminales corticoestriatales que vuelve a restablecerse cuando el tratamiento con manganeso se prolonga (Cuesta de Di Zio y col., 1995). De hecho, se postula que la pérdida de regulación inicial se produce como mecanismo compensatorio para contrarrestar la excesiva liberación de glutamato en la intoxicación con manganeso (Calabresi y col., 2000), ya que curiosamente parece ser que los receptores D2 localizados en las terminales corticoestriatales controlan la liberación de glutamato en el estriado (Maura y col., 1998) y tiene una importancia decisiva en las alteraciones del comportamiento inducidas por manganeso que se aprecian, sobre todo, en la fase más temprana de la enfermedad (Brouillet y col., 1993).

Hemos estudiado la expresión de diversos marcadores de actividad dopaminérgica como son el ARNm de la enzima TH y el ARNm del DAT mediante hibridación *in situ*, obteniendo un marcaje específico en el mesencéfalo ventral, de manera que se apreciaron neuronas dopaminérgicas en la SNc y el AVT. Es importante destacar que el análisis densitométrico mostró una elevación significativa de los niveles de ARNm de la TH en la SN y AVT después del tratamiento con MnCl₂ en comparación con los controles (169% y 159%, respectivamente).

En cambio, los niveles del ARNm del DAT de los animales tratados con manganeso fueron similares a los niveles controles.

También se determinó la densidad inmunohistoquímica de TH donde mostramos un incremento significativo en los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas de la SN y AVT (44% y 50% de los niveles controles, respectivamente). Sin embargo, no se alteró la densidad de la inmunorreactividad de TH en sus áreas de proyección dopaminérgica en el estriado y en el N. Accumbens.

Estos resultados están de acuerdo con los que muestran que las ratas tratadas de forma crónica con una dosis alta por vía oral de MnCl₂ mostraron un aumento significativo de la actividad de TH en neostriado e hipocampo (Bonilla y col., 1980).

DISCUSIÓN

Así pues, al encontrarse incrementada la concentración y la actividad de la proteína TH y no aumentarse la recaptación de la DA en el estriado tras el tratamiento, esto supondría una alteración de la permanencia de la DA en el espacio sináptico y, por consiguiente, un aumento de la concentración de DA en esa zona, si bien otros estudios ponen de manifiesto que el manganeso afecta la recaptación de la DA mediante inhibición del DAT (Ingersoll y col., 1999).

En nuestra investigación valoramos diferentes indicadores de actividad dopaminérgica y, opuestamente a lo que esperábamos, ninguno de ellos disminuyó en respuesta a la administración de $MnCl_2$. Por el contrario, la expresión de mRNA de TH y la inmunorreactividad frente a TH aumentó en la SNc y AVT en animales experimentales. Estos resultados están de acuerdo con los que muestran que las ratas tratadas de forma crónica con una dosis alta por vía oral de $MnCl_2$ mostraron un aumento significativo en la actividad de TH en neostriado, mesencéfalo e hipocampo (Bonilla y col.,1980). Además, en otras investigaciones (Calabresi y col., 2001) tampoco se encontraron diferencias en relación con las fibras nerviosas TH-positivas y las neuronas nigrales TH-positivas en el sistema nigro-estriado. No obstante, nuestros datos contrastan con otros estudios. Así, el manganeso intratecal disminuyó la concentración de DA sin producir cambios en los niveles de HVA y DOPAC, aumentó la concentración de manganeso en la SN y en el estriado y disminuyó la actividad

motora espontánea (Ingersoll y col., 1995) Además, se ha descrito que el manganeso induce cambios bifásicos en los niveles estriatales de DA y sus metabolitos (Desole y col., 1995). A dosis más bajas, el manganeso incrementó los niveles de DA y sus metabolitos, mientras que se vio el efecto opuesto a dosis más elevadas (Desole y col., 1995). Estos diferentes efectos pueden estar relacionados con distintos factores como son: la edad de los animales, la concentración empleada de manganeso y la vía de administración.

El aumento del mRNA de TH y de la proteína en respuesta a la administración de $MnCl_2$ podría ser de interés clínico, ya que la intoxicación humana por manganeso comienza con una fase temprana caracterizada por trastornos psiquiátricos que muestran semejanza con la esquizofrenia, en la cual la principal alteración se cree que es debida a una hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas (Bonilla y col., 1980). Sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales se produjo el incremento en la expresión de mRNA de TH y de la traducción como respuesta al tratamiento con $MnCl_2$. En este contexto, se ha descrito una sobrerregulación del mRNA de TH en las neuronas dopaminérgicas no pigmentadas A10 del mesencéfalo en individuos parkinsonianos, lo que sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio a nivel presináptico (Tong y col., 2000). Por otra parte, se ha comprobado que la administración de manganeso produce un descenso de los niveles estriatales

DISCUSIÓN

de GSH en ratas viejas (Desole y col., 1995); Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que una dieta deficiente en selenio, la cual disminuyó la concentración de la enzima GPx y, por consiguiente, los niveles de GSH, aumentó la expresión de mRNA de TH en la SN (Romero-Ramos y col., 2000), lo que indica que existe una relación entre el estado oxidativo y la expresión de mRNA de TH. De hecho, se ha comprobado que la expresión de mRNA de TH está regulada por el nivel de oxígeno en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas en cultivos. Así pues, las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas en cultivo muestran niveles de DA acusadamente más elevados y/o aumentan las neuronas que expresan TH cuando se expusieron a condiciones anóxicas (0% O₂) (Gross y col., 1999) o hipóxicas (5% O₂) (Colton y col., 1995); Asimismo, las condiciones hipóxicas favorecen la expresión del gen de TH (Czyzyk-Krzeska y col., 1994; Paulding y col., 1999). Por otra parte, la disponibilidad de oxígeno puede depender de la eficiencia de la fosforilación oxidativa y se ha propuesto que el manganeso puede intervenir en el funcionamiento mitocondrial dando lugar a una disminución de la misma en la terminal sináptica (Verity, 1999). Estos resultados son congruentes con el descenso de SDH que hemos observado y descrito anteriormente.

Asimismo, nos resultó interesante conocer el efecto del manganeso en otros sistemas no dopaminérgicos. Para ello,

analizamos el mRNA para GAD, la enzima biosintética del aminoácido GABA, observándose numerosos cuerpos celulares de neuronas GABAérgicas en el estriado y el GP. La cuantificación mostró un descenso significativo de los niveles de mRNA de GAD67 en el globo pálido con respecto a los controles (68.2%) y, sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles de ARNm GAD67 con respecto a los niveles controles en el estriado.

Estos hallazgos difieren de lo esperado, ya que al estudiar la reacción glial no se produjo gliosis en el GP y, en cambio, observamos que el manganeso causa efecto sobre esta estructura; No obstante, este hecho es congruente con estudios que muestran que la intoxicación crónica por manganeso en ratas (20 mg/kg/día, durante 3 meses) no indujo pérdida neuronal ni gliosis en el GP (Spadoni y col., 2000). La intoxicación por manganeso también induce desinhibición del comportamiento sin producir alteraciones motoras mayores (Calabresi y col., 2001); Las ratas experimentales estaban mas activas que los animales controles. Estos cambios de comportamiento podrían estar asociados con el descenso significativo de la expresión de mRNA de GAD en el GP.

Por otra parte, cabría esperar un aumento de la expresión del ARNm para GAD67 en el estriado puesto que existen estudios que han mostrado que el manganeso incrementa la concentración de glutamato a nivel corticoestriatal, ya que inhibe su transportador (Brouillet y col., 1993).

4. ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL TRATAMIENTO CON MnCl₂.

Hemos estudiado el efecto del MnCl₂ a dosis baja en el sistema dopaminérgico nigro-estriado así como en otros sistemas dopaminérgicos relacionados y, dado que la toxicidad por manganeso se puede manifestar con síntomas neuropsiquiátricos y motores que a menudo se han atribuido a un intenso estrés oxidativo en el sistema dopaminérgico (Hamai y col., 2001), estudiamos el estrés oxidativo en diversas estructuras cerebrales así como sistémicas para determinar cuáles resultan más vulnerables.

Está bien establecido el equilibrio existente entre la generación de RL y las defensas antioxidantes, lo cual mantiene el control de la homeostasis del estado oxidativo celular (Bains y Shaw, 1997) y que los niveles de estos sistemas antioxidantes se modifican con la edad (Kim y col., 2003) aumentando el estrés oxidativo con el proceso de envejecimiento biológico. Así pues, para confirmar el daño oxidativo causado por el manganeso empleamos animales de 3 meses y se les administró intraperitonealmente 20 mg/ kg/ día de MnCl₂.

DISCUSIÓN

En la cascada de eventos que tienen lugar desde la generación de RL hasta la producción de daño celular uno de los efectos más devastadores es la formación de peróxidos de hidrógeno. Además, un rasgo de estos peróxidos de hidrógeno es su acción sobre los lípidos de membrana, con la formación subsiguiente de radicales peróxidos (Halliwell, 1992). Estos radicales, a su vez, son capaces de atacar las proteínas de membrana, dañando así receptores de membrana y enzimas (Picklo y col., 2002).

Para determinar si el manganeso da lugar realmente a daño oxidativo medimos los niveles de grupos carbonilos, como indicador de oxidación proteica y de MDA , marcador de oxidación lipídica en distintas estructuras cerebrales: estriado, SN, cerebelo, bulbo, hipocampo, corteza total, corteza prefrontal e hipófisis, así como sistémicas: hígado, corazón y riñón.

La determinación de grupos carbonilos se acepta como parámetro cuantitativo de daño oxidativo y es el método definitivo para la valoración de las oxidaciones catalizadas por metales (Stadtman, 1986; Ahn y col., 1987; Levine y col., 1990; Stadtman, 1990; Bowling y col., 1993; Ayala y Cutler, 1996). Por su parte, como la peroxidación lipídica consiste en una serie compleja de reacciones que dan lugar a la fragmentación de ácidos grasos poliinsaturados para producir

aldehidos α , β - insaturados altamente reactivos, como el malondialdehido, acroleína y 4-hidroxi-2 - nonenal (HNE) y col., 1991) (Esterbauer y col., 1991) la determinación de estos tres compuestos se emplea como índice de la oxidación de lípidos.

Nuestras determinaciones de oxidación de lípidos y proteínas han mostrado de forma evidente un efecto mayor del manganeso en el sistema dopaminérgico nigro-estriado, si bien no actúa de forma selectiva, puesto que, en general, todas las estructuras cerebrales y sistémicas muestran estrés oxidativo.

No obstante, hemos observado un grado de oxidación lipídica similar en la SN y en el estriado (200% y 180% respecto a los niveles controles, respectivamente), mientras que el estriado ha resultado bastante más afectado por la oxidación de proteínas que la SN (230% y 140% respecto a los niveles controles).

Por otra parte, la corteza, total y prefrontal, se afectaron moderadamente por la oxidación lipídica (138% y 137%, respectivamente, en relación a los niveles controles, y la corteza total se afectó más por la oxidación proteica (170%) mientras que la corteza prefrontal, que presentó unos niveles basales elevados de grupos carbonilos, prácticamente no se vio influenciada por el tratamiento en cuestión (110% respecto de los controles).

DISCUSIÓN

También debemos destacar que otras estructuras cerebrales como son cerebelo, bulbo e hipocampo sufren importante oxidación proteica, si bien el bulbo también muestra gran oxidación lipídica, a diferencia del cerebelo y el hipocampo que resultaron ser las estructuras cerebrales menos afectadas por este último tipo de oxidación.

Así pues, pudimos evidenciar que el $MnCl_2$ a dosis alta produce, de forma generalizada, un incremento de estrés oxidativo que puede contribuir a la neurodegeneración.

De hecho, en alteraciones neurodegenerativas como la EA los niveles de HNE aparecen aumentados de manera general en las diversas áreas cerebrales consideradas en pacientes en relación a los niveles que presentan individuos de edad avanzada considerados como controles. Además, Smith y colaboradores (1991) han encontrado que los niveles de carbonilos en el cerebro se elevan con la edad y no se observan diferencias en cerebros de individuos sanos y personas con EA.

Nuestros resultados presuponen que la toxicidad del manganeso en el SNC se basa en el aumento generalizado del estrés oxidativo, si bien las regiones que poseen intrínsecamente una elevada actividad del metabolismo oxidativo, como le ocurre a la SN, se encuentren más afectadas por su acción.

Por lo tanto, esto justifica cómo el manganeso produce un efecto devastador del SNC manifestándose con síntomas degenerativos similares a los de la esquizofrenia y la EP (Mena y col., 1967; Butterworth y col., 1995), atribuidos a exposición crónica.

Quisimos profundizar en los efectos de este metal en órganos sistémicos, fundamentalmente en el hígado, ya que se han descrito casos de disfunción dopaminérgica y encefalopatía hepática asociados a intoxicación crónica por manganeso (Butterworth y col., 1995). Curiosamente, se han encontrado síntomas de parkinsonismo comunes en trabajadores expuestos a manganeso, pacientes con hepatopatía e individuos sometidos a nutrición parenteral que excede en parte la cantidad diaria recomendada de manganeso; además, poseen una elevada concentración plasmática de manganeso y una intensidad mayor de señal en el diagnóstico por imagen mediante resonancia magnética en la región palidal (Lucchini y col., 2000).

Hemos obtenido un elevado incremento de la oxidación lipídica y proteica también en los órganos sistémicos hígado, corazón y riñón, siendo mayor la oxidación proteica que se produce a nivel renal (230% respecto a los niveles controles), seguido del corazón (200% de los niveles controles); por su parte, el hígado presenta un aumento mayor de la oxidación de lípidos (190% de los controles).

DISCUSIÓN

De esta forma se puede especular con la posibilidad de que, al producir daño hepático y renal, se vea disminuida la excreción del manganeso, se aumente su concentración en plasma y se favorezca su acumulación en los distintos tejidos.

En el último experimento, los animales fueron alimentados con dietas con y sin hierro y algunos de los grupos fueron inyectados con $MnCl_2$. Con el uso de la desferroxamina se pretendía aumentar la toxicidad del manganeso, ya que al secuestrar el hierro extracelular, el transporte de manganeso estaría favorecido. Hierro y manganeso comparten las mismas rutas de absorción. Si bien el hierro es claramente un componente esencial de una dieta saludable, puede ser tóxico si se sobrepasa la capacidad de unión de las proteínas que se unen a él. La unión del hierro por las proteínas es una manera de aumentar su solubilidad, reducir la toxicidad potencial del hierro libre y ejerce un control sobre el metabolismo de este mineral. Cada vez que el hierro excede las necesidades metabólicas de la célula puede actuar produciendo mediante la reacción de Fenton el radical hidroxilo, el cual es altamente reactivo. La transferrina es la proteína encargada de transportar entre los tejidos el hierro no incluido en el grupo hemo. La ferritina une intracelularmente el hierro protegiendo a la célula de sus efectos tóxicos. Las “Iron regulatory proteins” (IRP’s) son sensores de los niveles de hierro citoplasmático.

En el caso de una deficiencia de hierro actúan estabilizando los mRNA de los receptores de la transferrina en la superficie celular y disminuyendo la traducción de la ferritina. Lo contrario ocurre cuando hay exceso de hierro: los receptores de la transferrina disminuyen para reducir la captación de hierro y la síntesis de ferritina aumenta para unir el exceso de hierro. Se ha descrito que las especies reactivas de oxígeno inactivan las IRP's (Eisenstein y col., 2000).

En relación al manganeso, su uso como agente inductor del estrés oxidativo supone cierta controversia, ya que este mineral es importante para ciertos sistemas enzimáticos protectores. Sin embargo, aparte de su acción fisiológica, hay mucha bibliografía referente a la toxicidad del mismo cuando se excede la concentración óptima.

Cuando el manganeso entra en la célula, compite con el hierro por el centro activo de las enzimas que contienen grupos [Fe-S]. La consecuencia es un aumento del hierro libre intracelular, el cual puede aumentar el estrés oxidativo. El manganeso puede también actuar directamente sobre ciertas enzimas cuyo centro activo contiene este grupo, como la aconitasa y los complejos I y II de la cadena respiratoria, dando lugar a una alteración de la producción de energía y, consecuentemente, a una disfunción mitocondrial.

DISCUSIÓN

Por tanto, la toxicidad del manganeso puede ser debida a distintos mecanismos directos e indirectos: depleción del estado energético de la célula (Zheng y col., 1999; Zheng y col., 1998), estimulación de la liberación del hierro de las proteínas que unen hierro (Roth y col., 2003), disminución de los niveles de antioxidantes como la catalasa y glutatión (Stredrick y col., 2004) y neurotoxicidad debida a la excesiva exposición al manganeso (McMillan y col., 1999; Zatta y col., 2003). El aumento de especies reactivas de oxígeno y la disminución de los niveles de antioxidantes contribuirían a la toxicidad del manganeso.

El primer marcador de estrés oxidativo medido fue el MDA, analizado en suero y tejidos de los seis grupos de ratas. A pesar del papel del hierro como agente pro-oxidante, los niveles de MDA no disminuyeron en ninguno de los tejidos de animales alimentados con una dieta sin hierro (grupo “-Fe”). Tampoco se observó una tendencia general cuando se administró desferroxamina, un quelante de hierro.

En el grupo “-Fe+MnCl₂”, el manganeso produjo un aumento significativo de MDA en todos los tejidos salvo en el hígado. El aumento fue general y mayor cuando el hierro estaba presente en la dieta y se inyectó MnCl₂ (grupo “MnCl₂”), destacando el tremendo aumento encontrado en el corazón.

En relación a los peróxidos lipídicos, el manganeso los aumentó en todos los tejidos del grupo “-Fe+MnCl₂”. Este efecto fue mayor en el grupo “MnCl₂”, debido probablemente a efecto sinérgico del hierro de la dieta y del incremento del hierro libre intracelular como consecuencia del efecto del manganeso sobre la aconitasa.

Un efecto menos claro se encontró en los niveles de grupos carbonilos y en la capacidad antioxidante, lo cual se puede explicar considerando la tremenda heterogeneidad de las moléculas de proteínas y antioxidantes presentes en los distintos tejidos. Además, debido a que las proteínas oxidadas se degradan en el mismo tejido, no es probable que puedan ser exportadas al suero. Además, el metabolismo de los productos resultantes de las oxidaciones de proteínas puede ser diferente en cada tejido. Todos estos factores pueden contribuir a que los grupos carbonilos en los diferentes tejidos estudiados no se correlacionen en general. Con respecto a la actividad antioxidante, es evidente que no se puede afirmar que una elevada capacidad antioxidante del suero signifique que los tejidos se encuentren más protegidos del ataque por las especies reactivas de oxígeno.

En este estudio también se pone de manifiesto la utilidad de los marcadores de estrés oxidativo medidos en suero para reflejar el estado general de oxidación de un individuo, ya que puede verse que tan sólo los peróxidos lipídicos del suero cambian de forma paralela a los tejidos.

DISCUSIÓN

Por el contrario, los grupos carbonilos del suero parecen reflejar exclusivamente el estrés oxidativo del sistema circulatorio, lo cual tiene especial interés puesto que de este grado de estrés oxidativo dependen las oxidaciones de las LDL. Los grupos carbonilos del suero podrían reflejar, por tanto, el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

5. ESTUDIO DE LA REACCIÓN GLIAL INDUCIDA POR MANGANESO ANTE DEFICIENCIA DE HIERRO.

Actualmente se reconoce que el hierro es un elemento esencial pero que, a su vez, ejerce una acción neurotóxica en el cerebro (Halliwell, 1989).

De hecho, en algunas enfermedades neurodegenerativas como la EP, se ha demostrado que los niveles de hierro se encuentran aumentados (Dexter y col., 1989; Youdim y col., 1989; Ben- Shachar y col., 1992; Jellinger y col., 1993) y se ha propuesto que el daño oxidativo en esta enfermedad se produce por compuestos oxidantes generados en el turnover de DA o en la autooxidación de la misma catalizada por hierro (Chiueh y col., 1993; Fahn y col., 1992; Gerlach y col., 1994; Jenner y col., 1996).

Además, numerosas evidencias demuestran que inyecciones de hierro en la SN produce parkinsonismo (Sengstock y col., 1992; Gerlach y col., 1994; Sengston y col., 1994)

Por otra parte, existen estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que ponen de manifiesto que el manganeso a dosis muy bajas posee un efecto antioxidante atípico, inhibiendo la formación de radicales hidroxilo y la peroxidación lipídica inducida por hierro (Sziraki y col., 1998; Rauhala y col., 2000).

DISCUSIÓN

En cambio, existe una gran controversia entre el efecto de hierro y manganeso a nivel cerebral, ya que otras investigaciones postulan el papel de catalizador del hierro y el manganeso en la autooxidación de la DA en presencia de L-Cisteína (Shen y col.,1998).

Otros estudios muestran que empleando un modelo de intoxicación crónica por manganeso inyectando intraperitonealmente 6 mg/kg/día durante 30 días se altera la homeostasis del hierro, posiblemente porque se encuentra aumentado el paso de hierro de la circulación sistémica al compartimento cerebral facilitado por el transportador de hierro a través de la barrera hematoencefálica, lo que supone un aumento de la concentración de hierro a nivel cerebral (Zheng y col., 1999).

Además, también se ha descrito que las ratas viejas presentan un aumento de hierro en la SN (Roskam y Connor, 1994).

En el SNC el manganeso se acumula principalmente en los astrocitos, probablemente porque la enzima Glutamina sintetasa, que es específica de este tipo de glía, representa una diana para el mismo (Ascher y col., 1999).

Sin embargo, no se conoce aún el papel que el hierro puede jugar en la acción tóxica del manganeso.

Diversas investigaciones muestran que la deficiencia de hierro da lugar a un aumento de la concentración de manganeso en el cerebro (Chua y Morgan, 1996; Kwik-Urbe y col., 2000; Erikson y col., 2002), dado que ambos metales son transportados a los tejidos extrahepáticos, incluido el cerebro, a través de endocitosis mediada por transferrina (Crowe y Morgan, 1992; Malecki y col., 1999).

De esta forma, la deficiencia de hierro produce un aumento de la concentración de transferrina y del receptor de transferrina especialmente en el estriado y en la SN (Chen y col., 1995a; Erikson y col., 1997; Pinero y col., 2000), lo que conlleva que estas áreas cerebrales muestren la mayor acumulación de manganeso ante la deficiencia de hierro (Erikson y col., 2002).

Así pues, hemos valorado la influencia de la concentración de hierro sobre los efectos tóxicos del MnCl_2 a la dosis alta de 20 mg/kg/ día. La variación en la concentración de hierro la hemos llevado a cabo en tres condiciones diferentes:

- a) Condición “ dieta control”, en la que el tratamiento con MnCl_2 realiza sin modificación de la dieta. En este caso no debe haber cambio en la concentración de hierro, ya que la administración de MnCl_2 se hace mediante inyección peritoneal.

DISCUSIÓN

b) Condición en la que no se produzca aumento de la concentración de hierro, sino por el contrario una cierta disminución. En esta circunstancia la dieta con la que se alimenta a las ratas durante todo el período se encuentra exenta de hierro. Por tanto, teniendo en cuenta que el acúmulo de este metal en el organismo es generalmente bastante grande, y que su pérdida se produce de una forma extraordinariamente lenta, dicha condición se debe producir con pequeñas variaciones de hierro.

c) Para asegurar una disminución de la concentración de hierro hemos llevado a cabo la tercera condición, en la cual en primer lugar tratamos con desferroxamina, un quelante de hierro, que facilita la eliminación del mismo y que es usado en clínica con este fin en aquellas patologías producidas por acúmulo de este metal. El tratamiento con $MnCl_2$ se hace usando la dieta exenta de hierro por lo que se mantienen los niveles de hierro más bajos.

En estas condiciones hemos llevado a cabo el estudio morfológico de la glía, un buen indicador del estado del SNC. Estudios previos han demostrado que la desferroxamina protege de la acción tóxica de sustancias como la 6-OH-DA (Ben- Shachar y col., 1991), la cual debe su neurotoxicidad a su interacción con el hierro y a su capacidad de inducir liberación del mismo de los depósitos de ferritina (Monteiro y Winterbourn, 1985).

Nosotros observamos un aumento significativo de las células inmunopositivas frente a GFAP en relación a los controles en el estriado y en la SN y, a diferencia de lo observado cuando se administra dosis baja, al emplear una dosis de MnCl_2 de 20 mg/kg/día no existe un gradiente de distribución característico en el estriado; No obstante, la cuantificación de células inmunopositivas frente a GFAP así como la morfología celular son equivalentes a la que se produce cuando la dosis es baja, lo que nos indica que no se aprecia una proliferación astrogial dosis-dependiente.

En las tres estructuras del circuito de los ganglios basales estudiadas: estriado, SN y corteza cerebral, la mayor proliferación astrocitaria así como los mayores cambios morfológicos se produjeron cuando se alimentó a los animales con dieta carente en hierro, se administró desferroxamina y se inyectó MnCl_2 ; se apreciaron astrocitos con bastantes signos de degeneración, al igual que cuando sólo se trata a los animales con dieta desprovista de hierro y desferroxamina, sin embargo, la administración de MnCl_2 induce la hiperproliferación de las células inmunorreactivas a GFAP.

También realizamos el estudio morfológico de la microglía observándose un incremento significativo de las células inmunopositivas frente a OX-42 en relación a los controles en estriado y SN. Sin embargo, cuando la dosis de MnCl_2 administrada es 20 mg/ kg/ día, a diferencia de lo

DISCUSIÓN

obtenido a la dosis baja de 6 mg/kg/día, no se produce patrón o gradiente de distribución celular típico.

Análogamente a lo observado con las astroglia, la cuantificación de células inmunopositivas frente a OX-42 así como su morfología eran similares con el empleo de dosis baja de 6 mg/kg/día y dosis alta de 20 mg/kg/día, lo que demuestra que el efecto del manganeso sobre la microglía tampoco es dosis- dependiente.

Del mismo modo, las tres estructuras del circuito de los gánglios basales estudiadas: estriado, SN y corteza cerebral, la mayor proliferación de la microglía así como los mayores cambios morfológicos se produjeron en los animales tratados con dieta desprovista de hierro, desferroxamina y $MnCl_2$, siendo la proliferación microglial mayor en la SN y mostrando una microglía de morfología activada en la SN y en la corteza, mientras que la microglia en el estriado mostró una fase de activación hiper-ramificada.

Estos resultados indican una vulnerabilidad mayor por parte de la SN ante el efecto tóxico del manganeso manifestado por hiperproliferación celular e importante activación glial.

No obstante, a diferencia del efecto protector que cabría esperar con el tratamiento con dieta carente en hierro y el quelante selectivo de hierro, desferroxamina (Sloot y col., 1996) se observa un efecto bastante similar a cuando también se administra $MnCl_2$, sino que la proliferación glial es menor.

Así pues, estos hallazgos demuestran que un nivel bajo de hierro libre en el cerebro induce también una importante respuesta glial indicativa de un daño en el SNC.

Estos hechos señalan que en todas estas circunstancias se produce un significativo efecto tóxico con producción de daño celular mostrado por la gliosis y activación de células gliales puesta de manifiesto por grandes cambios morfológicos. Los datos demuestran que la disminución de hierro ya produce una acción “tóxica” sobre el SNC probablemente debido a que este metal participa en funciones de gran importancia. Estos efectos se producen con una especial relevancia en el sistema dopaminérgico, lo que puede ser debido a que en este sistema las necesidades de hierro son fundamentales e implicadas en la producción de DA, participando en la proteína enzimática TH. Este resultado está de acuerdo con Youdim y colaboradores (1986) que demuestran una fuerte disminución en la concentración de algunas proteínas, incluidas los receptores D2, en estas estructuras. Por otra parte, el transporte de manganeso es mayor en las mismas y parece que usa para dicho transporte y acúmulo el mecanismo de uptake de DA (Ingersoll y col., 1999). Existe bastante controversia sobre la interacción entre el mecanismo de transporte de ambos metales a distintos órganos incluido el SNC. La mayoría de las evidencias indican que tiene un efecto sinérgico (Chua y Morgan, 1996).

DISCUSIÓN

Sin embargo, se ha descrito un efecto competitivo a nivel del sistema digestivo, por lo que el transporte de ambos metales varía en relación a la concentración del otro en la dieta. El efecto más destacable es la mayor acción tóxica producida por el manganeso a menores concentraciones de hierro, como se observó tras el tratamiento con desferroxamina. Un efecto semejante ha sido encontrado por otros autores y es justificado por un aumento en la acumulación de manganeso y su incrementado efecto tóxico generalizado. Sin embargo, una de las causas principales del aumento de su efecto, no tiene que estar tanto en función de su mayor acúmulo sino en la posible competencia que puede sufrir con el hierro en su unión con algunas proteínas.

Una de las proteínas mejor estudiadas es la enzima aconitasa. La aconitasa es una enzima que requiere hierro para su actividad y es inhibida *in vitro* por manganeso. Este efecto inhibitorio depende de la concentración de hierro. Así pues, cuando se disminuye la concentración de éste por distintos mecanismos como puede ser el empleo de desferroxamina, se produce un marcado aumento de la acción inhibitoria del manganeso. Este hecho se justifica, ya que al menos una de las acciones inhibitorias del manganeso se produce por desplazar al hierro de la proteína, por lo que este desplazamiento es mucho más fácil y, por tanto, mayor a bajas concentraciones de hierro (Zheng et al., 1998).

Zheng y colaboradores (1998) demuestran, también, que el tratamiento con manganeso produce la inhibición de la actividad aconitasa de distintas estructuras del SNC, siendo máxima en la corteza prefrontal (48,5 % de reducción) seguida por el estriado y la SN (33.7 y 20.6 % respectivamente). Estos hechos justifican nuestros resultados. Por otra parte, la inhibición de la aconitasa del metabolismo oxidativo conlleva el aumento en la producción de radicales libres y el daño oxidativo.

Asimismo, basándonos en la técnica inmunocitoquímica descrita por Smith y colaboradores (1998) para mostrar grupos carbonilos de proteínas oxidadas, observamos que con el tratamiento con dieta carente en hierro, desferroxamina y $MnCl_2$ se produce un marcaje mayor de proteínas oxidadas en la zona del endotelio de los vasos sanguíneos cerebrales coincidiendo con la localización de la astrogliá perivascular.

También, es importante destacar que el tratamiento con dieta carente en hierro, desferroxamina y $MnCl_2$ da lugar a un aumento de tamaño de los vasos sanguíneos, apareciendo anillos concéntricos perivasculares y también en el parénquima.

Se han descrito ciertas sustancias agonistas y antagonistas que regulan la homeostasis local, la inflamación y la reactividad en los vasos sanguíneos.

DISCUSIÓN

La interacción de estas sustancias con la interfase del endotelio de los vasos sanguíneos es responsable del inicio del daño y de la progresión de la lesión cerebral durante las primeras horas de isquemia (Hallenbeck, 1996). Algunos estudios de biología vascular han puesto de manifiesto que cuando se produce la activación de los vasos sanguíneos en el cerebro de rata sustancias como son: factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de necrosis tumoral- alfa (TNF-alfa), hemooxigenasa-1 (HO-1) y Mn SOD muestran anillos concéntricos perivasculares envolviendo la pared de los vasos sanguíneos y alrededor del parénquima (Ruetzler y col., 2001; Krum y col., 2002) semejante a nuestros hallazgos. De hecho, se sabe que el manganeso aumenta la transcripción del gen que codifica por la enzima iNOS en la microgía activada, propiedad que no poseen otros metales de transición como el hierro, cobalto, níquel, cobre y zinc, lo que conduce al aumento de la producción de óxido nítrico neurotóxico y de acción vasodilatadora (Chang y col., 1999).

Esto da lugar a una situación bastante similar a lo que ocurre en la isquemia cerebral por lo que se observan afectados en gran medida los vasos sanguíneos y el parénquima cerebral.

También se sabe que sustancias que de forma espontánea generan superóxido y radicales libres, en general, inducen la relajación de los vasos sanguíneos cerebrales en respuesta al estímulo del endotelio (Girard y col., 1995; Niwa y col., 2001; Tsutsui y col., 1996).

De esta forma, postulamos que en todas las estructuras estudiadas: estriado, SN y corteza cerebral, el manganeso a dosis alta induce un daño oxidativo devastador que desencadena la activación glial liberándose factores y sustancias que ejercen su acción a nivel vascular y el parénquima cerebral.

La especial acción tóxica en estas condiciones de bajos niveles de hierro, es interesante ya que esto puede justificar también la diferente susceptibilidad de los individuos a la toxicidad del manganeso. De hecho, es muy extendido la acción tóxica producida por metales, principalmente por manganeso, en los individuos en diálisis. Por lo tanto, como se desprende de nuestro estudio, los niveles de hierro pueden ser cruciales para que se produzca un mayor o menor efecto por manganeso.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento con $MnCl_2$ disminuye la actividad de la enzima Succinato deshidrogenasa en casi todas las estructuras cerebrales estudiadas y, especialmente en el estriado y la SN, lo que origina una alteración del metabolismo energético mitocondrial en el SNC, fundamentalmente en el sistema dopaminérgico nigro-estriado.
2. Este mayor efecto sobre el sistema dopaminérgico nigro-estriado se encuentra reflejado también en la respuesta glial. El tratamiento con $MnCl_2$ produjo la activación tanto astrogliar como microglial en el estriado y la SN, mientras que no se produjo en el área ventral tegmental, en el núcleo accumbens ni en el globo pálido, estructuras pertenecientes a otros sistemas dopaminérgicos distintos del nigro-estriado.
3. La intoxicación crónica por $MnCl_2$ produjo un aumento de la cantidad de la enzima TH así como de su transcripción al encontrarse elevados los niveles de ARNm de la TH en la SN y en el área ventral tegmental.
No se produjo alteración de la densidad de la inmunorreactividad de TH en estriado y núcleo accumbens.

4. En cambio, no se observó aumento de la transcripción del transportador de dopamina (DAT) tras el tratamiento con $MnCl_2$, ya que los niveles del ARNm del DAT de los animales tratados con $MnCl_2$ fueron similares a los niveles controles.
5. El incremento de la concentración y la actividad de la enzima TH en la SN no se acompañó de aumento de la transcripción del DAT, implicado en la recaptación de la dopamina en el estriado, tras el tratamiento con $MnCl_2$. Así pues, esto unido a la acción inhibitoria del $MnCl_2$ sobre la recaptación de DA, sugiere que produce un aumento de la concentración sináptica de la misma.
6. La administración de $MnCl_2$ no modificó la transcripción de la enzima Ácido glutámico descarboxilasa en el estriado mientras que produjo un descenso de la transcripción de la misma, manifestado por descenso de los niveles de ARNm de GAD67 en el globo pálido. Así pues, concluimos que la intoxicación crónica por manganeso, además de afectar al sistema dopaminérgico nigro-estriado, también afecta a la población de neuronas GABAérgicas del globo pálido (vía pálido nigral), si bien no se detecta gliosis.

7. Nuestras determinaciones de oxidación de lípidos y proteínas han mostrado de forma evidente un efecto mayor del manganeso en el sistema dopaminérgico nigro-estriado, si bien no actúa de forma selectiva, puesto que, en general, todas las estructuras cerebrales estudiadas muestran estrés oxidativo. Así pues, la toxicidad del manganeso en el SNC se basa en el aumento generalizado del estrés oxidativo, aunque se ha observado que las regiones que poseen intrínsecamente una elevada actividad del metabolismo oxidativo, como le ocurre a la SN, se encuentren más afectadas por su acción.
8. El modelo de intoxicación crónica por manganeso también pone de manifiesto el aumento de estrés oxidativo en órganos sistémicos, entre los que destaca el hígado, pudiéndose especular con la posibilidad de entre la disfunción de este órgano y el desarrollo de encefalopatía hepática.
9. La deficiencia de hierro favorecida por dieta desprovista del mismo y desferroxamina, y elevados niveles de manganeso en el SNC presentan un efecto tóxico sinérgico desencadenando una gran respuesta glial así como afectación vascular y del parénquima cerebral.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmed Elbetieha, Hammeed Bataineh, Homa Darmani y Mohammed Hassan Al-Hamood (2001) Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility and femail mice. *Toxicol. Lett.* **119**: 193-201.

Ahn B., Rhee S.G. y Stadtman E.R. (1987) Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorimetric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* **161**: 245-257.

Aime S., Calzoni S., Digilio G., Giraud S., Fassano M. y Maffeo D. (1999) A novel ¹⁹F-NMR method for the investigation of the antioxidant capacity of biomolecules and biofluids. *Free Rad.Biol.Med.* **27**: 356-363.

Alvarez E., Ruíz-Gutierrez V., Santa María C. y Machado A. (1993) Age dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech. Ageing Dev.* **71**: 1-12.

BIBLIOGRAFÍA

Ambrosio G., Zweier J.L., Duilio C., Kuppusamy P., Santoro G., Elia P.,P., Tritto I., Cirillo P., Condorelli M., y Laherty J.T. (1993) Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J. Biol. Chem.* **268**: 18532-18541.

Ames B.N. (2004) Delaying the mitochondrial decay of aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1019**: 406-411.

Anholt R.R.H., Peterson P.L., DeSouza E.B. y Snider S.H.. (1986) The peripheral-type benzodiazepine receptor: localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **261**: 576-583.

Aronson M.K., Ooi W.L., Geva D.L., Masur D., Blau A. y Frishman W. (1991) Dementia: age-dependent incidence, prevalence, and mortality in the old old. *Arch. Intern. Med.* **151**: 989-992.

Aschner M., Gannon M. y Kimelberg H.K. (1992) Manganese uptake and efflux in culture rat astrocytes. *J. Neurochem.* **58**: 730-735.

Aschner M. (1997) Manganese neurotoxicity and oxidative damage, in: J.R. Connor (Ed.), *Metal and Oxidative Damage in Neurological Disorders*, Plenum Press, New York, pp. 77-93.

Aschner M. Vrana K.E. y Zheng W. (1999) Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS). *Neurotoxicology* **20**: 173-180.

Aust S.D. y Morehouse L.A. (1985) Role of metals in oxygen radicals reactions. *Free Rad. Biol. Med.* **1**: 3-25.

Axelsson S. (1999) Research-overview article: Membrane lipolysis and cholinergic priority. *Med. Hypotheses* **53**: 157-165.

Ayala A. y Cutler R.G. (1996) The utilisation of 5-hydroxyl-2-amino valeric acid as a specific marker of oxidized arginine and prolines residues in proteins. *Free Rad. Biol. Med.* **21**: 65-80.

Azzaro A., King J., Kotzuk D., Frost J. y Schochet S. (1985) Guinea pig striatum as a model of human dopamine deamination: the role of monoamine oxidase isozyme ratio, localization and affinity for substrate in synaptic dopamine metabolism. *J. Neurochem.* **45**: 949-956.

BIBLIOGRAFÍA

Bains J.S. y Shaw C.A. (1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress- mediated neuronal death. *Res Brain.Rev.* **25**: 335-358.

Barbeau A. (1984) Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicology* **5**: 13-36.

Bast A.K. y Goris R.I.A.. (1989) Oxidative stress, biochemistry and dopamine neurons. *Pharmacol. Rev.* **35**: 53-68.

Benveniste E.N. (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am.J.Physiol.* **263** (1 Pt 1) C1-C2.

Ben -Shachar D., Riederer P. y Youdim M.B.H. (1991) Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implication for Parkinson's disease. *J.Neurochem.* **57**: 1609-1614.

Ben-Shachar D., Eshel G., Riederer P y Youdim M.B.H. (1992) Role of iron and iron chelation in dopaminergic-induced neurodegeneration: implication for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **32**: 105-110.

Berry M.D., Juorio A.V., Li X.M. y Boulton A.A. (1996) Aromatic L-aminoacid decarboxilase: a neglected and misunderstood enzyme. *Neurochem. Res.* **21**: 1075-1087.

Bignami A. y Dahl D. (1976) The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFAP) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* **2**: 99-100.

Blackburn K.J., French P.C. y Merrills R.J. (1967) 5- Hydroxytryptamina uptake by rat brain in vitro. *Life Sci.* **6**: 1653-1663.

Bondy S.C. (1997) Free- radical- mediated toxic injury to the nervous system. *En: Free Radical Toxicology* (Wallace, K. D: 221-248 Washington: Taylor and Francis.

Bonilla E. (1980) L-Tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav. Toxicol.* **2**: 37-41.

Boots A.W., Haenem G. R.M.M., Den Harton G.J.M. y Bast A. (2002) Oxidative damage shifts from lipid peroxidation to thiol arylation by catechol- containing antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta* **1583**. 279-284.

BIBLIOGRAFÍA

Bowling A.C., Schulz J.B., Brown R.H. y Beal M.F. (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familiar and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **61**: 2322-2325.

Bowling A.C. y Beal M.F. (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* **56**: 1151-117.

Brenneman K.A., Wong B.A., Buccellato M.A., Costa E.R., Gross E.A. y Dorman D.C. (2000) Direct olfactory transport of inhaled manganese ((54) MnCl₍₂₎) to de rat brain: toxickinetic investigations in a unilateral nasal occlusion model. *Toxicol. App. Pharmacol.* **169**: 238-48.

Brouillet E.P., Shinobu L., McGarvey U., Hochberg F. y Beal M.F. (1993) Manganese injection into rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp. Neurol.* **120**: 89-94.

Breen A.P.y Murphy J.A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 1033-1077.

Brewer G.J. (1999) Regeneration and proliferation of embryonic and adult rat hippocampal neurons in culture. *Exp.Neurol.* **159**: 237-247.

Brown S. y Taylor N.L. (1999) L-Tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav. Toxicol.* **2**: 37-41.

Brouillet E.P., Shinobu I., McGarvey U., Hochberg F. y Beal M.F. (1993) Manganese injection into rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp. Neurol.* **120**: 89-94.

Brown S. y Talylor N.L. (1999) Could mitochondrial dysfunction play a role in manganese toxicity ? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **7**: 49-57.

Butcher S.P., Fairbrother I.S., Kelly J.S. y Arbuthnott G.W. (1990) Effects of selective monoamine oxidase inhibitors on the in vivo release and metabolism of dopamine in the rat striatum. *J. Neurochem.* **55**: 981-988.

Butterworth R.F., Spahr L., Fontaine S. y Layrarques G.P. (1995) Manganese toxicity, dopaminergic dysfunction and hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* **10**: 259-267.

BIBLIOGRAFÍA

Calabresi P., Ammassari M., Gubellini P., Sancesario G., Morello M., Centonze D., Marfia G., Saulle E., Passino E., Picconi B. y Bernardi G. (2001) A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication. *Neurobiol.Dis.* **3**: 419-432.

Calabresi P., Ammassari M., Gubellini P., Sancesario G., Morello M., Centonze D., Marfia G., Saulle E., Passino E., Picconi B. y Bernardi G. (2001) A synaptic mechanism underlying the behavioral abnormalities induced by manganese intoxication. *Neurobiol.Dis.* **10**: 1-13.

Calne D.B., Chu N.S., Huang C.C., Lu C.S. y Olanow W. (1994) Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* **44**: 1583-1586.

Castaño A., Herrera A.J., Cano J. y Machado A. (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J. Neurochem.* **70**: 1584-1592.

Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Rasini E., Lecchini S. y Frigo G.M. (2002) Stimulation with phytohaemoagglutinin induces the synthesis of catecholamine in human peripheral blood mononuclear cells: role of protein kinase C and contribution of intracellular calcium. *J. Neuroimmunol.* **125**: 125-133.

Craig C.G., Tropepe V., Morshead C.M., Reynolds B.A., Weiss S. y van der Kooy D. (1996) *In vivo* growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J. Neurosci.* **16**: 2649-2658.

Crowe A. y Morgan E.H. (1992) Iron and transferrin uptake in brain and cerebrospinal fluid in the rat. *Brain Res.* **592**: 8-16.

Cuesta de Di Zio M.C., Gomez G., Bonilla E. y Suarez-Roca H. (1995) Autoreceptor presynaptic control of dopamine release from striatum is lost at early stages of manganese poisoning. *Life Sci.* **56**: 1857-1864.

Cutler R.G. (1984) Urate and ascorbate: their possible roles as antioxidants in determining longevity of mammalian species. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **3**: 321-348.

BIBLIOGRAFÍA

Chang E.C. y Kosman D.J. (1989) Intracellular Mn II associated superoxide scavenging activity protects Cu Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. *J. Biol. Chem.* **264**: 12172-12178.

Chang J.Y. y Liu L.Z. (1999) Manganese potentiates nitric oxide production by microglia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **68**: 22-28.

Chen M.T., Sheu J.Y. y Lin T.H. (2000) Protective effects of manganese against lipid preoxidation. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **61**: 569-577.

Chen N. y Reith M.E.A. (2000) Structure and function of the dopamine transporter. *Eur. J. Pharmacol.* **405**: 329-339.

Chen Q., Connor J.R. y Beard J.L. (1995a) Brain iron, transferrin and ferritin concentrations are altered in developing iron-deficient rats. *J. Nutr.* **125**: 1529-1535.

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

Chua A.C. y Morgan E.H. (1996) Effects of iron deficiency and iron overload on manganese uptake and deposition in the brain and other organs of the rat. *Biol. Trace. Elem. Res.* **55**: 39-54.

Chung J.Y. y Benveniste E.N. (1990) Tumor necrosis factor α production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN- γ , and IL-1 β . *J.Immunol.* **144**: 2999-3007.

Clark C.M., Ewbank D., Lee V.M.-Y. y Trojanowski J.Q. (1998) Molecular pathology of Alzheimer's disease: neuronal cytoskeletal abnormalities. In: Growdon H.H., Rossor M.N., eds. The dementias. Vol. 19 of Blue books of practical neurology. Boston: Butterworth-Heinemann, 285-304.

Colton C.A., Pagan F., Snell J., Colton J.S., Cummins A. y Gilbert D.L. (1995) Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. *Exp. Neurol.* **132**: 54-61.

Czyzyk-Krzeska M.F., Furnari B.A., Lawson E.E. y Millhorn D.E. (1994) Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 760-764.

BIBLIOGRAFÍA

Davis J.M. (1998) Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl: health risk uncertainties and research directions. *Environmental Health Perspectives* **106**: 191-201.

Delacourte A. (1990) General and dramatic glial reaction in Alzheimer brains. *Neurology* **37**: 562-569.

De Nicola A.F., Labombarda F., Gonzalez S.L., Gonzalez Deniselle M.C., Guennoun R. y Schumacher M. (2003) Steroid effects on glial cells: detrimental or protective for spinal cord function ? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1007**: 317-328.

Desole M.S., Esposito G., Migheli R., Fresu L. Sircana S., Miele M., De Natale G. y Miele E. (1995) Allopurinol protects against manganese-induced oxidative stress in the striatum and in the brainstem of the rat. *Neurosci. Lett.* **192**: 73-76.

Desole M.S., Esposito G. Migheli R., Fresu L., Sircana S. Zangani D., Miele M. y Miele E. (1995) Cellular defence mechanisms in the striatum of young and aged rats subchronically exposed to manganese. *Neuropharmacology* **34**: 289-295.

Dester D.T., Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P. y Marsden C.D. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **52**: 381-389.

Devenyi A.G., Barron T.F. y Mamourian A.C. (1994) Dystonia, hyperintense basal ganglia, and high whole blood manganese levels in Alagille's syndrome. *Gastroenterology* **106**: 1068-1071.

Dietz M.C., Ihrig A., Wrazidlo W., Bader M., Jansen O. y Triebig G. (2001) Results of magnetic resonance imaging in long- term manganese dioxide-exposed workers. *Environ. Res.* **85 (1)**: 37-40.

Discalzi G., Pira E. Hernández E.H., Valentini C., Turbiglio M. y Meliga F.(2000) Magnetic resonance imaging and clinical patterns following CaNa_2 - EDTA chelation. *Neurotoxicology* **21**: 863-866.

Discalzi G., Pira E., Hernandez E.H., Valentini C., Turbiglio M. y Meliga F.(2000) Occupational Mn parkinsonism: magnetic resonance imaging and clinical patterns following CaNa_2 -EDTA chelation. *Neurotoxicology* **21**: 863-866.

BIBLIOGRAFÍA

Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M. y Rodriguez H. (2002) Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Rad. Biol. Med.* **32**: 1102-1115.

Donaldson J. (1987) The physiopathologic significance of manganese in brain: its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicology* **8**: 451-462.

Dorman D.C., Struuve M.F., James R.A., McManus B.E., Marshall M.W. y Wong B.A. (2001) Influence of dietary manganese on the pharmacokinetics of inhaled manganese sulfate in male CD rats. *Toxicol. Sci.* **60**: 242-251.

Dunn J.A., McChance D.R., Thropew S.R., Lyons T.J. y Baynes J.W. (1991) Age dependent accumulation of N-(carboxymethyl) lysine and N-(carboxymethyl) hydroxy-lysine in human skin collagen. *Biochem.* **30**: 1205-1210.

Eclancher F., Perraud F., Faltin J., Labourdette G. y Sensenbrenner M. (1990) Reactive astrogliosis after basic fibroblast growth factor (b FGF) injection in injured neonatal rat brain. *Glia* **3**: 502-509.

Eddleston M. y Mucke L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes. Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* **54**: 15-36.

Eisenstein, R.S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **20**: 627-62.

El-Deiry W.S., Downey K.M. y So A.G. (1984) Molecular mechanisms of manganese mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 7378-7382.

Elhwuegi A.S. (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **28**: 435-451.

Eng L.F. y DeArmond S.J. (1982) Immunocytochemical studies of astrocytes in normal development and disease, In: *Advances in cellular Neurobiology*, Vol 3, edited by S. Fedoroff and L. Hertz. New York: Academic press, pp 145-170.

Eng L.F., Ghimikar R.S. y Lee Y.L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP, thirty-one years (1969 - 2000). *Neurochem. Res.* **25**: 1439-1451.

Engle J. y Bohn M.C. (1991) The neurotrophic effect of fibroblast growth factors on dopaminergic neurons *in vitro* are mediated by mesencephalic glia. *J. Neurosci. Res* **30**: 359-371.

BIBLIOGRAFÍA

Erickson J.D., Eiden L.E. y Hoffman B.J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10993-10997.

Erikson K.M., Pinero D.J., Connor J.R. y Beard J.L. (1997) Regional brain iron, ferritin, and transferrin concentrations during iron deficiency and iron repletion in developing rats. *J. Nutr.* **127**: 2030-2038.

Erikson K.M., Shihabi Z.K., Aschner J.L. y Aschner M. (2002) Manganese accumulates in iron deficient rat brain regions in a heterogeneous fashion and is associated with neurochemical alterations. *Biol. Trace. Elem. Res.* **87**: 143-156.

Erikson K.M., Syversen T., Aschner J.L. y Aschner M. (2005) Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **19**: 415-421.

Esterbauer H. y Cheeseman K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **186**: 407-421.

Esterbauer H., Schaur R. y Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* **11**: 81-128.

Fahn S. y Cohen G. (1992) The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* **32**: 804-812.

Fawcett J.W. y Asher R.A.. (1999) The gliar scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**: 377-391.

Fiszer U. (2001) Does Parkinson's disease have an immunological basis ? The evidence and its therapeutic implications. *BioDrugs* **15**: 351-355.

Fitzpatrick P.F., Chlumsky L.J., Daubner S.C. y O'Malley K.L. (1990) Expression of rat tyrosine in insect tissue culture cells and purification and characterisation of cloned enzyme. *J. Biol. Chem.* **265**: 2042-2047.

Fleming M.D., Romano M.A., Su M.A., Garrick L.M. Garrick M.D. y Andrews N.C. (1998) Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 1148-1153.

Galvani P., Fumagalli P. y Santagostino A. (1995) Vulnerability of mitochondrial complex I in PC12 cells exposed to manganese. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol.* **293**: 377-383.

BIBLIOGRAFÍA

Garcia-Segura L.M., Luquin S., Párducz A. y Naftolin F. (1994) Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia* **10**: 59-69.

Gavin C.E., Gunter K.K. y Gunter T.E. (1992) Mn^{2+} sequestration by mitochondria and inhibition of oxidative phosphorylation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**: 1-5.

Gavin C.E. y Gunter T.E. (1996) Manganese dynamics in brain mitochondria. In *Mineral and Metal Neurotoxicology* (M. Yasui, M.J. Strong , K. Ota y M.A. Verity, Eds), pp 305-310. CRC Press, New York.

Gehrmann J., Matsumoto Y. y Kreutberg G.W. (1995) Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.* **20**: 269-287.

Gerber G.B., Léonard A. y Hantson P. (2002) Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Crit. Rev. Oncol./ Hematol.* **42**: 25-34.

Gerfen C.R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* **15**: 133-139.

Gerfen C.R. (2000) Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. *Trends. Neurosci.* **23 (Supp)**: S64-S70.

Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P. y Youdim M.B.H (1994) Altered brain metabolism of iron as a cause neurodegenerative disease ?. *J. Neurochem.* **63**: 793-807.

Girard P., Sercombe R., Sercombe C., LeLem G., Seylaz J. y Potier P. (1995) A new synthetic flavonoid protects endothelium-derived relaxing factor-induced relaxation in rabbit arteries in vitro: evidence for superoxide scavenging. *Biochem. Pharmacol.* **49**: 1533-1539.

Giros B., El Mestikawy S., Bertrand L. A. y Caron M.G. (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS lett.* **295**: 149-154.

Giros B., El Mestinkawy S., Godinot N., Zheng K., Han H. Yang-Fen T. y Caron M.G. (1992) Cloning, pharmacological characterisation and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Nature* **379**: 606-612.

BIBLIOGRAFÍA

Giulian D., Chen J., Ingeman J.E., George J.K. y Noponen M. (1989) The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J. Neurosci.* **9**: 4416- 4429.

Glover V. y Sandler M. (1996) Clinical chemistry of monoamine oxidase. *Cell Biochem. Funct.* **4**: 89-97.

Goldstein M. (1995) Long - and shorte-term regulation of tyrosine hydroxylase, in: F.E. Bloom. D.J. Kupfer (Eds), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, Raven Press, New York, pp. 189-195.

Grabenbauer M., Fahimi H.D. y Baumgart E. (2001) Detection of peroxisomal proteins and their mRNAs in seria sections of fetal and newborn mouse organs. *J. Histochem. Cytochem.* **49**: 155-64.

Gross J., Ungethum U., Andreeva N., Heldt J., Gao J., Marschhausen G., Altmann T., Muller I., Husemann B. y Anderson K. (1999) Hypoxia during early developmental period induces long-term changes in the dopamine content and release in a mesencephalic cell culture. *Neuroscience* **92**: 699-704.

Guidot D.M., McCord J.M., Wright R.M. y Repine J.E. (1993) Absence of electron transport (Rho° state) restore growth of manganese- superoxide dismutase- deficient *saccharomyces cerevisiae* in hiperoxia: Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **268**: 26699-26703.

Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L. y Hediger M.A. (1997) Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* **388**: 482-488.

Haavick J., Le Bourdelles B., Martinez A., Flatmark T. y Mallet J. (1991) Recombinant human tyrosine hydroxylase isoenzymes. Reconstitution with iron and inhibitory effect of other metals ions. *Eur. J. Biochem.* **199**: 371-378.

Hallenbeck J.M. (1996) Significance of the inflamatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir. Suppl (Wien)* **66**: 27-31.

Halliwell B. y Gutteridge J.M. (1984) Oxygen toxicity, oxigen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.

BIBLIOGRAFÍA

Halliwell B. (1989) Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke ?. *Acta Neurol. Scand.* **126**: 23-33.

Halliwell Barry y Gutteride J.C. (1989) Free radicals in Biology and Medicine. *Oxford: Claredon Press.*

Halliwell Barry (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**: 1609-1623.

Halliwell Barry (1995) Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **49**: 1341-1348.

Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine. *Oxford: Oxford Science.*

Hamai D., Campbell A. y Bondy S.C. (2001) Modulation of oxidative events by multivalent manganese complexes in brain tissue. *Free Rad. Biol. Med.* **31**: 763-768.

Harman D. (1956) Aging: A theory based on free radical radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300.

Harrison J.K., Jiang Y., Chen S., Xia Y., Maciejewski D. y col. (1998) Role for neuronally-derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 10896-10901.

Hazell A.S. y Norenberg M.D. (1997) Manganese decreases glutamate uptake in cultures astrocytes. *Neurochem. Res.* **22**: 1443-1447.

Hazell A.S. y Norenberg M.D. (1998) Ammonia and manganese increase arginine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Res.* **22**: 1443-1447.

Hazell A.S., Desjardins P. y Butterworth R.F. (1999a) Increased expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured astrocytes following exposure to manganese. *Neurochem. Int.* **35**: 11-17.

Hazell A.S. (2001) Astrocytes and manganese neurotoxicity. *Neurochem. Int.* **41**: 271-277.

Hellemans L., Corstjens H., Neven A. y col. (2003) Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 434-439.

BIBLIOGRAFÍA

Helmer C., Joly P., Letenneur L., Commenges D. y Dartigues J.F. (2001) Mortality with dementia: results from a French prospective community- based cohort. *Am. J. Epidemiol.* **154**: 642-648.

Herrera A.J., Castaño A., Venero J.L., Cano J. y Machado A. (2000) The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol. Dis.* **7**: 429-447.

Hickey W.F., Vass K. y Lassmann H. (1992) Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **51**: 246-256.

Horellou P., Le Bourdelles B., Clot-Humbert J., Guilbert B., Leviet V. y Mallet J. (1988) Multiple human tyrosine hydroxylases enzymes generated through alternative splicing in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.* **51**: 652-655.

Hurley L.S. y Keen C.L. (1987) Manganese. In: Underwood E., Mertz W. (Eds), Trace Elements in Human Health and Animal Nutrition. Academic Press, New York, pp. 185-225.

Ingersoll R.T., Montgomery E.B. Jr. y Aposhian H.V. (1995) Central nervous system toxicity of manganese.I: Inhibition of spontaneous motor activity in rats after intrathecal administration of manganese chloride. *Fund. Appl. Toxicol.* **27**: 106-113.

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

Ishitani R., Sunaga K., Hirano A., Saunders P., Katsube N. y Chuang D.M. (1996) Evidence that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J. Neurochem.* **66**: 928-935.

Jellinger K. y Kniezl E. (1993) Iron deposits in brain disorders. In: Riederer P. y Youdim M.B.H. (eds.), Iron in Central Nervous System Disorders, Springer-Verlag, Vienna-New York, pp.19-36.

Jenner P. y Olanow C.W. (1996) Oxidative stress and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiology* **47 Suppl.** S160-S170.

BIBLIOGRAFÍA

Jung-Testas I., Renoir M., Bugnard H., Greene G.L. y Baulieu E.E (1992) Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **41**: 621-631.

Kahn M.A., Ellison J.A., Spleight G.J. y de Vellis J. (1995) CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res.* **685**: 55-67.

Katsuragi T., Takahashi T., Shibuya K., Nagamoto H y Iwabuchi K. (1996) A patient with parkinsonism presenting hyperintensity in the globus pallidus on T1-weighted MR images: the correlation with manganese poisoning. *Rinsho Shinkeigaku* **36 (6)**: 780-782.

Kaufman S. (1993) New tetrahydrobiopterin-dependent systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**: 261-286.

Keen C.L. y Zidenberg-herr S. (1996) Manganese. In Ziegler E.E. y Filer L.J. Eds Present Knowledge in Nutrition, 7th Edition. Washington D.C.: ILSI Press. pp 334-343.

Keen C.L. y colaboradores (1999) Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* **20**: 213-224.

Kennedy M.C. y Stout C.D. (1992) Aconitase: an iron-sulfur enzyme. In *Advances in Inorganic Chemistry* (Cammack, R. y Sykes A.G., eds), vol **38**, pp.323-339, Academic Press Inc, London.

Kennedy S.D. y Bryant R.G. (1986) Manganese-deoxyribonucleic acid binding modes. Nuclear magnetic relaxation dispersion results. *Biophys. J.* **50**: 669-676.

Kim H.G., Hong S.M., Kim S.J., Park H.J., Jung H.I., Lee Y.Y., Moon J.S. y Lim H.W., Park E.H., Lim C.J. (2003) Age- related changes in the activity of antioxidant and redox enzymes in rats. *Mol. Cells.* **16**: 278-284.

Klausner R.D., Rouault T.A. y Harford J.B. (1993) Regulating the face of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* **72**: 19-28.

Kohutnicka M., Lewandowska E., Kurkowska- Jastrzebska I., Czlonkowski A. y Czlonkowska A. (1998) Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1- methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* **39**: 167-180.

BIBLIOGRAFÍA

Kreutzberg G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**: 312-318.

Krueger B.K. (1990) Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J.Neurochem.* **55**: 260-267.

Krum J.M., Mani N. y Rosenstein J.M. (2002) Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience* **110**: 589-604.

Kuwahara T., Takamoto S. y Ito A. (1990) Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 253-257.

Kwik-Urbe C.L., Golub M.S. y Keen C.L. (2000) Chronic marginal iron intakes during early development in mice alter brain iron concentrations and behavior despite postnatal iron supplementation. *J. Nutr.* **130**: 2040-2048.

LaBourdette G. y Sensenbrenner M. (1995) Growth factors and their receptors in the central nervous system. In: *Neuroglia*. Eds: Kettenman H., Ransom B.R., Oxford University Press 441-440.

Lai C.S., Grover T.A. y Piette L.H. (1979) Hydroxyl radical production in a purified NADPH-cytochrome C (P₄₅₀) reductase system. *Arch. Biochem.* **193**: 373-378.

Lai J.C., Chan A.W., Leung T.K., Minski M.J. y Lim L. (1992) Neurochemical changes in rats chronically treated with a high concentration of manganese chloride. *Neurochem. Res.* **17**: 841-847.

Lamensdorf I., He L.P., Nechushtan A., Harvey-White J., Eisenhofer G., Milan R., Rojas E y Kopin I.J. (2000) Effect of glipizide on dopamine synthesis, release and metabolism in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **388**: 147-154.

Lauble H., Kennedy M.C., Beinert H. y Stout C.D. (1992) Crystal Structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry* **31**: 2735-2748.

Lawson L.J., Perry V.H., Dri P. y Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**: 151-170.

Leach R.M. y Harris E.D. (1997) Manganese. In O'Dell B.L. y Dunde R.A. Eds. Handbook of nutritionally essential mineral. New York: Marcel Dekker, pp 335-355.

BIBLIOGRAFÍA

Lee C.H., Olson P. y Evans R.M. (2003) Lipid metabolism, metabolic disease, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144**: 2201-2207.

Lester H.A., Cao Y. y Mager S. (1996) Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* **17**: 807-810.

Levine J.M. (1994) Increased Expression of the NG2 chondroitin-sulphate proteoglycan after brain injury. *J. Neurosci.* **14**: 4716-4730.

Levine R.L., Grandland D., Oliver C.N., Amici A., Climet I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S. y Stadtman E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**: 464-478.

Lieberman A.P., Pitha P.M., Shin H.S. y Shin M.L. (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6348-6352.

Linert W., Herlinger E., Jameson R.F., Kienzi E., Jellinger K. y Youdim M.B. (1996) Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron and dioxygen- their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1316**: 160-168.

Ling E.A. y Wong W.C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* **7**: 9-18.

Liu Y., Peter D., Roghani A., Schuldiner S., Prive G.G., Eisenberg D., Brecha N. y Edwards R.H. (1992) A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* **70**: 539-551.

Logan A., Frautschy S.A., Gonzalez A-M, Sporn M.B. y Baird A. (1992) Enhanced expression of transforming growth factor beta-1 in the rat brain after a localised cerebral injury. *Brain Res.* **587**: 216-225.

Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L. y Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Lucchini R., Albin E., Placidi D., Gasparotti R., Pigozzi M.G., Montani G. y Alessio L. (2000) Brain magnetic resonance imaging and manganese exposure. *Neurotoxicology* **21**: 769-775.

BIBLIOGRAFÍA

Lynam D.R., Roos J.W., Pfeifer G.D. Fort G.F. y Pullin T.G. (1999) Environmental effects and exposures to manganese from use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in gasoline. *Neurotoxicology* **20**: 145-150.

Malecki E.A., Devenyi A.G., Beard J.L. y Connor J.R. (1999) Existing and emerging mechanism for transport of iron and manganese to the brain. *J. Neurosci. Res.* **56**: 113-122.

Marty S., Dusart I. y Peschanski M. (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS, 1. Microglia/macrophages. *Neuroscience* **45**: 529-539.

Maura G., Giardi A. y Raiteri M. (1988) Release- regulating D2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**: 680-684.

McMillan D.E. (1999) A brief history of the neurobehavioral toxicity of manganese: some unanswered questions. *Neurotoxicology* **20**: 499-507

Meiegerd S.M. y Schenk J.O. (1994) Striatal transporter for dopamine: Catechol structure- activity studies and susceptibility to chemical modification. *J.Neurochem.* **62**: 998-1008.

Méjean C., Pons F., Benyamin Y. y Roustan C. (1989) Antigenic probes locate binding sites for the glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase and phosphofructokinase on the actin monomer in microfilaments. *Biochem. J.* **264**: 671-677.

Mena I., Marin O., Fuenzalida S. y Cotzias G.C. (1967) Chronic manganese poisoning. *Neurology* **17**: 1123-1129.

Messersmith D.J., Murtie J.C., Le T.Q., Frost E.E. y Armstrong R.C. (2000) Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and FGF receptor expression in an experimental demyelinating disease with extensive remyelination. *J.Neurosci. Res.* **62**: 241-256.

Miller G.W., Staley J.K., Heilman C.J., Perez J.T., Mash D.C., Rye D.B. y Levey A.I. (1997) Immunochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **41**: 530-539.

BIBLIOGRAFÍA

Miller G.W., Erickson J.D., Perez J.T., Penland S.N., Mash D.C., Rye D.B. y Levey A.I. (1999) Immunochemical analysis of vesicular monoamine transporter (VMAT2) protein in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **156**: 138-148.

Minaschek G., Groschel-Stewart U., Blum S. y Bereiter-Hahn J. (1992) Microcompartmentalization of glycolytic enzymes in cultured cells. *Eur. J. Cell. Biol.* **58**: 418-428.

Mirza B., Hadberg H., Thomson P. y Moos T. (2000) The absence of reactive astrocytes is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* **95**: 425-432.

Monteiro H.P. y Winterbourn C.C (1989) 6-Hydroxydopamine releases iron from ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 4177-4182.

Moon L.D., Brecknell J.E., Franklin R.J., Dunnett S.B. y Fawcett J.W. (2000) Robust generation of CNS axons through a track depleted of CNS glia. *Exp. Neurol.* **161**: 49-66.

Morato G.S., Lemos T. y Takahashi R.N. (1989) Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. *Neurotoxicol. Teratol.* **11**: 421-425.

Mrak R.E. y Griffin W.S.T. (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* **26**: 349-354.

Mucke L., Oldstone M.B., Morris J.C. y Nerenberg M.I. (1991) Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol.* **3**: 465-474.

Muszynska A y colaboradores (2000) The mechanism of daunorubicin-induced inhibition of prolidase activity in human skin fibroblasts. *Exp. Toxicol. Pathol.* **52**: 149-155.

Nagy E. y Rigby W.F.C. (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectivity binds AU-rich RNA in the NAD⁺-binding region (Rossman Fold) *J. Biol. Chem.* **270**: 2755-2763.

Newland M.C. (1999) Animal models of manganese's neurotoxicity. *Neurotoxicology* **20**: 415-432.

Nicotera P. y Orrenius S. (1994) Molecular mechanism of toxic cell death: an overview. *Meth. Toxicol.* **1B**: 2328.

BIBLIOGRAFÍA

Nielsen F.H. (1999) Ultratrace minerals. In Shils, M. y col. Eds. *Nutrition in Health and Disease*. 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, pp 283-303.

Niwa K., Haensel C., Ross M.E. y Iadecola C. (2001) Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilatory responses of cerebral circulation. *Circ. Res.* **88**: 600-608.

Ohnishi T. (1998) Iron-sulfur clusters/ semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1364**: 186-206.

Olanow C.W., Good P.F., Shinotoh H., Hewitt K.A., Vingerhoets F., Snow B.J., Beal M.F., Calne D.B. y Perl D.P. (1996) Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology* **46**: 492-508.

Olanow C.W. y Tatton W.G. (1999) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 123-144.

Ono J., Harada K. Kodaka R., Sakurai K., Tajiri H., Takagi T. Harada T, Nihei A. y Osaka A. (1995) Manganese deposition in the brain during long-term total parenteral nutrition. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **19**: 310-312.

Oreland L., Arau Y. y Stenstrom A. (1983) The effect of Deprenyl on intra and extraneuronal dopamine oxidation. *Acta Neurol. Scand.* 05:S139-s146.

Ostdal H., Davies M.J. y Andersen H.J. (2002) Reaction between protein radicals and other biomolecules. *Free Rad. Biol. Med.* **33**: 201-209.

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

Palacios G. (1990) A double immunocytochemical and histochemical technique for demonstration of cholinergic neurons and microglial cells in basal forebrain and neostriatum of the rat. *Neurosci. Lett.* **115**: 13-18.

Papadopoulos V. (1993) Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocrine Rev.* **14**: 222-240.

Parent A., Sato F., Wu Y., Gauthier J., Lévesque M. y Parent M. (2000) Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci.* **23 (Suppl)**: S20-S27.

BIBLIOGRAFÍA

Paulding W.R. y Czyzyk-Krzeska M.F. (1999) Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA stability by protein-binding, pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region. *J.Biol.Chem.* **274**: 2532-2538.

Pauls K.P. y Thompson S.E. (1980) In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature* **283**: 504-506.

Perry V.H. y Gordon S. (1991) Macrophages and the central nervous system. *Int. Rev. Cytol.* **125**: 203-244.

Perry V.H., Andersson P.B. y Gordon S. (1993) Macrophages and the inflammation in the central nervous system . *Trends. Neurosci* **16**: 268-273.

Picklo M.J., Montine T.J., Amarnath V. y Neely M.D. (2002) Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease (review). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **184**: 187-197.

Pinero D.J., Li N.Q., Connor J.R. y Beard J.L. (2000) Variations in dietary iron alter brain iron metabolism in developing rats. *J. Nutr.* **130**: 254-263.

Rabchevsky A.G., Weinitz J.M., Coulpier M., Fages C., Tinel M. y Junier M.P. (1998) A role for transforming growth factor alpha as an inducer of astrogliosis. *J. Neurosci.* **18**: 10541-10552.

Ramsey A.J., Daubner S.C., Ehrlich J.I. y Fitzpatrick P.F. (1995) Identification of iron ligands in tyrosine hydroxylase by mutagenesis of conserved histidiny residues. *Protein Sci.* **4**: 2082-2086.

Ranasinghe J.G., Liu M.C., Sakakibara Y. y Suiko M. (2000) Manganese administration induces the increased production of dopamine sulfate and depletion of dopamine in Sprague-Dawley rats. *J.Biochem.* **128**: 477-480.

Rauhala P. y Chiueh C.C. (2000) Effects of atypical antioxidative agents, S-nitrosoglutathione and manganese, on brain lipid peroxidation induced by iron leaking from tissue disruption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**: 238-254.

Rhodes K.E., Moon L.D. y Fawcett J.W. (2003) Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience* **120**: 41-56.

BIBLIOGRAFÍA

Ridet J.L., Malhotra S.K., Privat A. y Gage F.H. (1997)
Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological
function. *Trends Neurosci.* **20**: 570-577.

Rio Hortega P. (1932) In " Cytology and cellular pathology
of the nervous system " (W. Penfield, ed.) pp 481-584.
Hocker, New York.

Roels H., Meiers G., Delos M., Ortega I., Lauwerys R.,
Buchet J.P. y Lison D. (1997) Influence of the route of
administration and the chemical form ($MnCl_2$, MnO_2) on the
absorption and cerebral distribution of manganese in rats.
Arch. Toxicol. **71**: 223-230.

Romero-Ramos M., Venero J.L., Cano J. y Machado A.
(2000) Low selenium diet induces tyrosine hydroxylase
enzyme in nigrostriatal system of the rat. *Brain Res. Mol.*
Brain Res. **84**: 7-16.

Ross H.R., Romrell L.J. y Kaye G.I. Histology: A Test and
Atlas, Williams and Wilkins, Baltimore, 1995.

Roskams A.J.I. y Connor J.R. (1994) Iron, transferrin, and
ferritin in the rat brain during development and aging.
J. Neurochem. **63**: 709-716.

Roth J. A., Feng L., Dolan K.G., Lis A y Garrick M. D. (2002) Effect of the iron chelator desferrioxamine on Manganese-Induced Toxicity of Rat Pheochromocytoma (PC12) Cells. *J. Neurosci. Res.* **68**: 76-83.

Roth J.A. y Garrick M.D.(2003) Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem. Pharmacol.* **66**: 1-13.

Ruetzler C.A., Furuya K., Takeda H. y Hallenbeck J.M. (2001) Brain vessels normally undergo cyclic activation and inactivation: evidence from tumor necrosis factor- alpha, hemoxygenase-1, and manganese superoxide dismutase immunostainig of vessels and perivascular brain cells. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* **21**: 244-252.

Saunders P.A., Chalecka-Franaszek E. y Chuang D.M. (1997) Subcellular distribution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cerebellar granule cells undergoing cytosine arabinoside-induced apoptosis. *J. Neurochem.* **69**: 1820-1828.

Schoenberg M.H. y Beger H.G. (1995) Oxygen radicals and postischemic organ damage: pathophysiology, clinical relevance and therapy. *Zentralbl. Chir.* **120**: 174-185.

BIBLIOGRAFÍA

Sengstock G.J., Olanow C.W., Dunnet A.J. y Arendash G.W. (1992) Iron induces degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res. Bull.* **28**: 645-649.

Sengstock G.J., Olanow C.W., Dunnet A.J., Barone S. Jr y Arendash G.W. (1994) Progressive changes in striatal dopaminergic markers, nigral, volume, and rotational behavior following iron infusion into rat substantia nigra. *Exp. Neurol.* **130**: 82-94.

Serra P.A. , Esposito G., Enrico P., Mura M.A., Migheli R., Delogu M.R., Miele M., Desole M.S. Grella G. y 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. *Br. J. Pharmacol.* **130**: 937-945.

Sevanian A., y McLeod L. (1997) Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. En: *Free radical Toxicology* (Wallace K.D.47-70 Washington: Taylor and Francis).

Shen X.M. y 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**: 824-837.

Shetlar M.R. y Shetlar C.L. (1994) The role of manganese in wound healing. In klimis-Tavantzis D.L. Ed. Manganese in health and disease. pp 747-752.

Shih J.C. (1994) Molecular basis of human MAO A and B. *Neuropsychopharmacology* **4**: 1-7.

Shimada S., Kitayama S., Lin C.L., Patel A., Nanthakumar E., Gregor P., Kuhar M.J. y Uhl G. (1991) Cloning and expression of a cocaine- sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* **254**: 576-578.

Shinotoh H., Snow B.J., Hewitt K.A., Pate B.D., Doudet D., Nugent R., Perl D.P., Olanow W. y Calne D.B. (1995) MRI and PET studies of manganese-intoxicated monkeys. *Neurology* **45**: 1199-1204.

Shoham S. y Youdim M.B.H. (2000) Iron involvement in neuronal damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol.* **46**: 743-760.

Sloot W.N., van der Sluijs-Gelling A.J. y Gramsbergen J.B. (1994) Selective lesions by manganese and extensive damage by iron after injection into rat striatum or hippocampus. *J. Neurochem.* **62**: 205-216.

BIBLIOGRAFÍA

Slot W.N., Korf J., Koster J.F., Wit L.E.A. y Gramsbergen J.B.P. (1996) Manganese-induced hydroxyl radical formation in rat striatum is not attenuated by dopamine depletion or iron chelation *in vivo*. *Exp. Neurol.* **138**: 236-245.

Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A. y Markesbery W.R. (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal ageing and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10540-10543.

Smith M.A. y Anderson L.M. (1998) Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer's disease by immunohistochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 731-735.

Smith M.E., Somera F.P. y Eng L.F. (1983) Immunocytochemical staining for glia fibrillary acid protein and the metabolism of cytoskeletal proteins in experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res.* **264**: 241-253.

Spadoni F., Stefani A, Morello M., Lavaroni F., Giacomini P.y Sancesario G. (2000) Selective vulnerability of pallidal neurons in the early phases of manganese intoxication. *Exp. Brain Res.* **135**: 544-551.

Spina M.B. y Cohen G. (1989) Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1398-1400.

Spranger M., Schwab S., Desiderato S., Bonmann E., Krieger D. y Fandrey J. (1998) Manganese augments nitric oxide synthesis in murine astrocytes: a new pathogenetic mechanism in manganese ? *Exp. Neurol.* **149**: 277-283.

Stadtman E.R. (1986) Oxidation of protein by mixed function oxidation system: implications in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 11-12.

Stadtman E.R. (1990) Metal-ion catalyzed oxidation of protein *biochemical mechanism and biological consequences.* *Free Rad. Bio. Med.* **9**: 315-325.

Stadtman E.R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224.

Stokes A.H., Hastings T.G. y Vrana K.E. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J. Neurosci. Res.* **55**: 659-665.

BIBLIOGRAFÍA

Stredrick D.L., Stokes A.H., Worst T.J., Freeman W.M., Johnson E.A., Lash L.H., Aschner M. y Vrana K.E. (2004) Manganese-induced cytotoxicity in dopamine-producing cells. *Neurotoxicology* **25**: 543-553.

Sun A.Y., Yang W.L. y Kim H.D. (1993) Free radical and lipid peroxidation in manganese-induced neuronal cell injury. *Ann. NY Acad. Sci.* **679**: 358-363.

Suzuki M., Obara K., Sasaki Y., Matoh K., Kitabatake A., Sasaki K. y Nunosawa F. (2003) Comparison of perivascular astrocytic structure between white matter and gray matter of rats. *Brain Res.* **992**: 294-297.

Swanson L.M. (1998) Brain Maps: Structure of the Rat Brain, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam.

Sziraki I., Mohanakumar K.P., Rauhala P., kim H.G. Yeh K.J. y Chiueh C.C. (1998) Manganese: a transition metal protects nigrostriatal neurons from oxidative stress in the iron-induced animal model of parkinsonism. *Neuroscience* **85**: 1101-1111.

Tappel A. y Tappel A. (2004) Oxidant initiated chain polymerization of protein and other biomolecules and its relationship to diseases. *Med.. Hypotheses* **63**: 98-99.

Thiruchelvam M, Richfiel E.K., Baggs R.B., Tank A.W. and Cory-Slechta D.A. (2000). *J. Neurosci.* **20**: 9207-9214.

Tholey G., Ledig M., Mandel P., Sargentini L., Frivold A.H., Leroy M., Grippo A.A. y Wedler F.C. (1987) Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* **12**: 45-50.

Tomás-Camardiel M., Herrera A.J., Venero J.L., Cruz Sánchez-Hidalgo M., Cano J. , Machado A. (2002) Differential regulation of glutamic acid decarboxilase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats. *Brain Res Mol. Brain Res.* **103**: 116-129.

Tong Z.Y., Kingsbury A.E. y Foster O.J. (2000) Upregulation of tyrosine hydroxylase mRNA in a subpopulation of A10 dopamine neurons in Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **79**: 45-54.

Tsutsui M., Milstien S. y Katusic Z.S. (1996) Effect of tetrahydrobiopterin on endothelial function in canine middle cerebral arteries. *Circ. Res.* **79**: 336-342.

Usdin T.B., Mezey E., Chen C., Brownstein M.J. y Hoffman B.J. (1991) Cloning of the cocaine-sensitive bobine dopamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11168-11171.

BIBLIOGRAFÍA

Verity M.A. (1999) Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis. *Neurotoxicology* **20**: 489-497.

Vicent S., Höckfelt T., Christenson I. y Terenius L. (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striatonigral pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **85**: 251-252.

Vitalis T., Fouquet C., Alvarez C., Seif I., Price D., Gaspar P. y Cases O. (2002) Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous system of the mouse. *J. Comp. Neurol.* **442**: 331-347.

Walicke P.A. y Baird A. (1991) Internalization and processing of basic fibroblast growth factor by neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* **11**: 2249-2258.

Wang K.Y., Gerena L., Swaminathan S. y Bolton P.H. (1995) Determination of the number and location of the manganese binding sites of DNA quadruplexes in solution by EPR and NMR. *Nucl. Acids Res.* **23**: 844-848.

Warner H.R., Fernandes G. y Wang E (1994) A unifying hypothesis to explain the retardation of aging and tumorigenesis by caloric restriction. *J. Gerontol.* **50A**: B107-B109.

Wedler F.C., Ley B.W. y Grippo A.A. (1989) Manganese (II) dynamics and distribution in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* **14**: 1129-1135.

Welch K.D., Davis T.Z., van Eden M.E. y Aust S.D. (2002) Deleterious iron- mediated oxidation of biomolecules. *Free Rad. Biol. Med.* **32**: 577-583.

Wilson M.A. y Molliver M.E. (1994) Microglial response to degeneration of serotonergic axon terminals. *Glia* **11**: 18-34.

Woodward W., Nishi R. y Meshul C.K. (1992) Nuclear and cytoplasmatic localization of basic fibroblast growth factor in astrocytes and CA2 hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **12**: 142-152.

Yehuda S., y Youdim M.B.H. (1988) Brain iron deficiency. Biochemistry and behaviour. En: Brain iron. Neurochemical and Behavioural Aspects (Youdim M.B.H. 88-114 London: Taylor and Francis.

Yoshida K. y Cage F.H. (1992) Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis secretion by astrocytes. *Brain Res.* **538**: 118-126.

BIBLIOGRAFÍA

Youdim M.B., Sills M.A., Heydorn W.E., Creed G.J. y Jacobowitz D.M. (1986) Iron deficiency alters discrete proteins in rat caudate nucleus and nucleus accumbens. *J. Neurochem.* **47**: 794-799.

Youdim M.B.H., Ben-Shachar D. y Riederer P. (1989) Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neuro-degeneration ?. *Acta Neurol. Scand.* **126**: 47-54.

Zatta P., Lucchini R., van Rensburg S.J. y Taylor A. (2003) The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res. Bull.* **62**: 15-28.

Zhang-Keck Z.Y., Eckstein F., Washington L.D. y Stallcup M.R. (1988) A role for divalent cations in specifying the start site for transcription from chromatin templates in vitro. *J. Biol. Chem.* **263**: 9550-9556.

Zheng W., Ren S. y Graziano J.H. (1998) Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res.* **799**: 334-342.

Zheng W., Zhao Q., Slavkovich, V., Aschner M. y Graziano J.H. (1999) Alteration of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rats. *Brain Res.* **833**: 125-132.

Zheng W., Kim H. y Zhao Q. (2000) Comparative toxicokinetics of manganese chloride and methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in sprague-dawley rats. *Toxicol. Sci.* **54**: 295-301.

Zheng W. (2001) Toxicology of choroid plexus: Special reference to metal-induced neurotoxicities. *Microsc. Res. Tech.* **52**: 89-103.

Zheng W. y Zhao Q. (2001) Cellular overload of iron following manganese exposure in cultured neuronal, but not neuroglial cells. *Brain Res.* **897**: 334-342.

