
Actividad motora espontánea y catecolaminas en cerebro de ratones negros C57BL/6 y albinos tratados con manganeso.

Humberto José Martínez¹, Fidel Castro-Caraballo², Arelis Arrieta² y Ernesto Bonilla¹.

¹Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia e ²Inbiomed, Fundacite-Zulia. Maracaibo, Venezuela.
Correo electrónico: hmartine@luz.ve

Palabras clave: Catecolaminas, manganeso, ratones C57BL/6, actividad locomotora.

Resumen. Se realizó el presente estudio con el propósito de determinar diferencias fenotípicas en la sensibilidad a la exposición crónica al manganeso. Para ello se utilizaron ratones albinos y ratones negros C57BL/6J, divididos en dos grupos. A un grupo de cada cepa se le administraron inyecciones i.p. diarias de MnCl₂ durante 9 semanas. El grupo control de cada cepa fue tratado en forma similar con solución salina. La administración prolongada de Mn no produjo alteraciones en la actividad locomotora en ninguna de las cepas examinadas. Se analizaron varias monoaminas y sus metabolitos mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión con detección electroquímica, en la sustancia negra (SN), el cuerpo estriado (CE) y el *locus coeruleus* (LC). El tratamiento crónico con Mn no alteró en forma significativa ninguna de las aminas biogénicas analizadas en las dos cepas de ratones. Sin embargo, los resultados revelaron diferencias importantes en los niveles endógenos de catecolaminas presentes en ambas cepas: las concentraciones de dopamina en SN y en CE de los C57, fueron marcadamente inferiores a las encontradas en ratones albinos. Se encontraron niveles de ácido dihidroxi-fenilacético mayores en el CE de los ratones C57; mientras que no se evidenciaron diferencias en el ácido homovanílico. Los contenidos de adrenalina y serotonina, fueron inferiores en el estriado de los ratones C57, pero no fueron diferentes en SN y el LC. Por otro lado y, contrastando con los hallazgos obtenidos para los otros neurotransmisores, se encontraron niveles de noradrenalina (NA) significativamente mayores en el LC y en el estriado de los ratones negros C57 cuando se compararon con los niveles de NA presentes en los ratones albinos. Se concluye que, a pesar de las diferencias observadas en el contenido endógeno de catecolaminas entre ambas cepas, los ratones C57 no son, aparentemente, más sensibles al efecto del manganeso que los ratones albinos.

Spontaneous motor activity and brain catecholamines in C57BL/6 and albino mice treated with manganese.

Invest Clín 2004; 45(1): 3 - 15

Key words: Catecholamines, manganese, C57BL/6 mice, locomotor activity.

Abstract. The present study was conducted to further examine the observed phenotypic differences in the sensitivity to chronic manganese exposure. Albino mice (NMRI-IVIC strain) and C57BL/6 black mice were divided into two groups. One group of mice was given daily i.p. injections of manganese during 9 weeks. The control group of each strain was treated with saline. After treatment, we examined their spontaneous motor activity. Manganese administration did not alter the measured locomotor activity in any of the strains. We also determined the concentrations of several monoamines and their metabolites, in the substantia nigra (SN), corpus striatum (CS) and locus coeruleus (LC), by High Pressure Liquid Chromatography with electrochemical detection. In our study, the administration of Mn did not change any of the brain amines analyzed. However, it was evident that there were striking differences in the endogenous levels of monoamines between both strains: dopamine concentrations in SN and CS of C57 mice were markedly lower than those present in albino mice. Dihydroxy phenyl acetic acid levels were higher in CS of C57 mice; whereas there was no difference in the homovanillic acid content. The concentrations of adrenalin and serotonin were lower in the CS of C57 mice, but did not differ in SN and LC. We found higher levels of noradrenaline in the LC and CS of C57 mice. We conclude that in spite of the observed differences in the amine concentrations of the two strains, C57 black mice were not more susceptible to the effects of manganese, than the albino mice strain studied.

Recibido: 04-11-2001. Aceptado: 27-10-2003.

INTRODUCCIÓN

La intoxicación crónica con manganeso (Mn) es una enfermedad ocupacional cuyas manifestaciones clínicas aparecen después de la inhalación o ingestión continua de Mn durante tiempo prolongado (1, 2). Desde el punto de vista clínico, el manganeso crónico puede ser considerado como un modelo de bradicinesia extrapiramidal acompañada de un síndrome distónico de naturaleza estriatal. La aparición de este último síndrome, al parecer está relacionada con la intensidad de la exposición a los pol-

vos de Mn; mientras que la bradicinesia depende más de la duración de la exposición al exceso de metal (3). El manganeso crónico es una enfermedad invalidante que produce incapacidades permanentes debido a la combinación de hipertonía, marcha en "paso de gallo" e inestabilidad postural, signos que le son característicos (4). Desde el punto de vista anatomopatológico la lesión más característica es la destrucción neuronal en el globo pálido, núcleo caudado y putamen (5). En ratas intoxicadas con cloruro de manganeso se ha observado degeneración neuronal en la corteza cerebral y el ce-

rebelo (6), así como alteraciones neuronales en el hipocampo, neocórtex, cerebro medio y puente (7). Desde el punto de vista bioquímico, el hallazgo más consistente en animales experimentales, es un cambio bifásico en las concentraciones de dopamina en el cerebro, con un aumento inicial en la fase aguda de la intoxicación, seguido de un descenso en dichas concentraciones en las etapas tardías del proceso (8). El sistema dopaminérgico nigroestriatal representa la vía dopaminérgica central principal. Se origina en la *pars compacta* de la sustancia negra (SN) y envía axones que proveen una densa inervación a los núcleos caudado y putamen que conforman el cuerpo estriado (CE). En la enfermedad de Parkinson, la vía nigroestriatal degenera debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SN, ocasionando una profunda disminución de dopamina (DA) del estriado y la sintomatología del desorden neurológico. Así mismo, la ingestión o administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a humanos causa cambios bioquímicos y clínicos idénticos a los observados en la enfermedad de Parkinson (9).

Los ratones y ratas albinos no sufren trastornos extrapiramidales típicos al ser expuestos a concentraciones elevadas de Mn, debido a que ellos no tienen pigmentación en la sustancia negra (10). La neuromelanina de la sustancia negra es similar al compuesto formado por la autooxidación de la DA. Este hecho es importante porque una de las hipótesis que se han formulado para explicar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, durante la intoxicación crónica con Mn, postula que la misma se debe al incremento en la oxidación enzimática de las catecolaminas (11). Una de las características más importantes del Mn es, precisamente, su habilidad para acelerar la oxidación de las catecolaminas. Esta propiedad resultaría en la facilidad para oxidarse de Mn^{2+} a Mn^{3+} . El Mn^{3+} oxidaría las ca-

tecolaminas mediante reacciones de transferencia de un electrón, las cuales generarían semiquinonas, ortoquinonas y los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo (8, 12). Esta catálisis generativa sería la responsable de la lesión de las neuronas catecolaminérgicas, debido al aumento de la peroxidación lipídica, a las alteraciones del ADN y a la inhibición irreversible de las enzimas sulfidrilas. Sin embargo, en el manganesismo crónico también se afectan otros tipos neuronales. Para explicar las alteraciones en otras neuronas, Graham (12), especuló sobre la existencia de una degeneración transináptica.

La poca sensibilidad de los roedores albinos adultos a la intoxicación con Mn, ya que es necesario administrarles elevadas dosis por largos períodos de tiempo, nos ha motivado a la búsqueda de un animal experimental más sensible, que permita el estudio de los mecanismos fisiopatológicos y bioquímicos de la intoxicación por el metal. Después del descubrimiento de que el MPTP y el MPPP (1-metil-4-fenilpropionoxipiperidina) son los componentes primarios de las drogas ilícitas que han producido Enfermedad de Parkinson en adictos, estos dos compuestos fueron ensayados en animales experimentales (13). Los primates son sumamente sensibles al MPTP y en ellos se producen cambios neuropatológicos, neuroquímicos y conductuales semejantes a los observados en humanos con Enfermedad de Parkinson (9, 14, 15). Por otro lado, se ha demostrado que el MPTP es neurotóxico para las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales del ratón (9, 16, 17). A pesar de que estos roedores son menos sensibles al MPTP que los primates, la administración de esta droga produce marcados, pero transitorios déficits de conducta y alteraciones bioquímicas y patológicas en los ratones, comparables a los humanos con Enfermedad de Parkinson. Estas alteraciones dependen no solamente del esquema de dosis ad-

ministrado, sino también del tipo de cepa de ratones utilizado en el experimento.

El uso de cepas endogámicas de ratones ofrece grandes ventajas para los estudios dirigidos a investigar el papel que juegan los sistemas neurotransmisores sobre diferentes tipos de conducta y los efectos de diferentes drogas psicotrópicas. Una cepa endogámica es un conjunto de animales que es producido por al menos 20 generaciones consecutivas de apareamientos de hermano-hermana o p(m)adre-hijo(a) y que pueden ser rastreados a un par ancestral único en la 20ª o subsiguientes generaciones. Los animales de una cepa endogámica son casi completamente homocigotos, lo cual provee un genotipo consistente y bien definido para el análisis (18).

Heikkila y col. (19), demostraron que la cepa endogámica de ratones negros C57BL/6J es mucho más sensible al MPTP que las cepas de ratones albinos CFW y BALB/c. Esta sensibilidad se manifiesta por una disminución del contenido de dopamina neostriatal, un gran descenso en la actividad de la tirosina hidroxilasa, una marcada pérdida de las neuronas de la zona compacta de la sustancia negra y déficits de conducta acentuados (19).

El hecho de que el Mn y el MPTP afecten preferencialmente a los primates, de que los roedores sean menos sensibles a ambos compuestos y de que tanto el MPTP como el manganeso actúen preferencialmente sobre neuronas catecolaminérgicas centrales, nos conduce a pensar que posiblemente ambos compuestos compartan el mismo mecanismo de acción. En vista de la alta sensibilidad de los ratones negros C57 al MPTP podría esperarse que esta cepa sea también muy sensible al efecto de la intoxicación crónica con Mn y por lo tanto constituya el animal ideal para estudiar los mecanismos fisiopatológicos mediante los cuales se producen las alteraciones observadas en el manganesismo crónico.

El presente trabajo fue realizado para continuar explorando posibles diferencias entre especies, en cuanto a la sensibilidad a la exposición crónica al Mn. A tal fin, se determinaron los efectos del metal sobre la actividad motora espontánea y sobre los niveles de varias monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina) y sus metabolitos (ácido homovanílico, ácido dihidroxi-fenil acético, ácido hidroxil-indol acético), en diferentes regiones cerebrales de dos cepas endogámicas de ratones: la cepa albina (NMRI-cepa IVIC) y la cepa de ratones negros C57BL/6J.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para este estudio se utilizaron ratones machos de las cepas C57BL/6J (C57) y albinos (NMRI - cepa IVIC), obtenidos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, cuyos pesos promedios al inicio del estudio fueron de $20 \pm 2,55$ y $25 \pm 2,62$ g, respectivamente. Los ratones de cada cepa se dividieron en un grupo control y en un grupo tratado. A los grupos tratados de ambas cepas se les administró por vía intraperitoneal una solución de $MnCl_2$ (5mg Mn/kg/día) cinco días por semana, durante nueve semanas. Los grupos controles de ambas cepas fueron tratados con solución salina (0,9% NaCl).

Durante el período de tratamiento los ratones fueron alimentados *ad libitum* con Ratarina® (Protinal-Maracaibo) y agua destilada y mantenidos con un fotoperíodo normal de 12 horas de luz y 12 de oscuridad en una habitación a 22°C.

Estudio de la actividad motora espontánea

A la novena semana del período de tratamiento se procedió a evaluar la actividad motora de los ratones tratados con Mn. De la actividad motora espontánea (AME) se exa-

minó el total de actividad horizontal y el tiempo total de actividad (20). Para este estudio se utilizó un monitor óptico-digital de actividad animal (Opto-Varimex Minor, Columbus Instruments). Cada cepa se estudió en días diferentes a la novena semana del período de intoxicación. El protocolo seguido fue el siguiente: de cada cepa se seleccionaron al azar diez ratones tratados y diez controles. Los ratones seleccionados se examinaron individualmente introduciendo en el monitor un ratón control y luego un ratón tratado en forma alternativa, con el fin de minimizar el efecto del ritmo diurno sobre la actividad motora (Procedimiento de Contrabalanceo). Las mediciones de actividad motora se realizaron en un período pre-prueba de 5 min, seguido de un período de prueba de 30 min para cada animal.

Sacrificio de los ratones

Dos días después de finalizado el período de tratamiento se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. El cerebro se extrajo de la cavidad craneal y se disecó sobre una superficie enfriada con hielo granizado en las siguientes regiones: cuerpo estriado (CE), sustancia negra (SN) y *locus coeruleus* (LC), siguiendo la técnica descrita por Glowinski e Iversen (22). Las muestras posteriormente se almacenaron a -70°C hasta el momento en el que se procedieron a efectuar los análisis de monoaminas y manganeso.

Determinaciones de Manganeso

El contenido de Mn cerebral fue determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica sin llama, utilizando un equipo Perkin-Elmer modelo 2380 AAS con un horno de grafito HGA-2100, tal como fue descrito anteriormente (21).

Determinaciones de las concentraciones de monoaminas

El contenido endógeno de las catecolaminas cerebrales, se determinó utilizando

la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplada a detección electroquímica tal como fue descrito (23). Las catecolaminas determinadas fueron las siguientes: dopamina (DA), ácido dihidroxifenil-acético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), noradrenalina (NA), adrenalina (A), serotonina (5-HT) y el ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA).

Análisis estadístico

Se realizó mediante el Análisis de Varianza de dos vías, comparando tratamiento con Mn y cepa de ratón, como los dos factores principales. En caso de significación estadística, la prueba fue seguida del test de Newman-Keuls, para determinar diferencias entre los promedios. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Durante el lapso del estudio, los animales no mostraron cambios evidentes en su peso. Después de nueve semanas de tratamiento, las concentraciones de Mn aumentaron significativamente en el cuerpo estriado y en el bulbo olfatorio de los grupos tratados de ambas cepas de ratones. Los promedios \pm errores estándares ($n = 6$) del contenido de Mn (expresados en $\mu\text{g/g}$ de peso seco) en el cuerpo estriado fueron los siguientes: albinos controles $2,38 \pm 0,61$, albinos tratados $3,93 \pm 0,95$, negros controles $2,60 \pm 0,71$, negros tratados $4,94 \pm 1,24$. Las diferencias entre controles y tratados fueron significativas.

Para determinar si existían diferencias en la conducta de ambas cepas de ratones en respuesta al tratamiento con Mn, se midieron diferentes parámetros de actividad motora, los cuales se muestran en la Tabla I. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados entre los grupos de animales controles y tratados

TABLA I
ACTIVIDAD MOTORA ESPONTÁNEA EN RATONES ALBINOS Y C57BL/6
TRATADOS CON MANGANESO *

Parámetro de Actividad Motora	Albinos		C57BL/6	
	Controles	Tratados-Mn	Controles	Tratados-Mn
Tiempo No Ambulatorio	10012,6 ± 930,08	10514,8 ± 958,10	11402,0 ± 1093,96	11796,9 ± 778,95
Movimientos Ambulatorios	1342,6 ± 735,99	1011,2 ± 451,63	1245,0 ± 556,99	1820,0 ± 261,53
Tiempo Ambulatorio	2150,0 ± 1032,97	1792,1 ± 745,31	2850,1 ± 1071,92	3304,4 ± 827,50
Nº de Movimientos	244,1 ± 66,49	234,3 ± 83,58	326,8 ± 115,09	436,4 ± 40,38
Tiempo de Reposo	6302,4 ± 1463,58	6106,9 ± 1322,32	4745,1 ± 1625,50	3929,8 ± 1334,15
Actividad Horizontal Total	4313,7 ± 1488,10	3768,3 ± 863,12	4158,6 ± 905,15	4653,3 ± 887,88
Tiempo de Actividad Total	11746,1 ± 1451,77	11970,3 ± 1334,55	13342,4 ± 1610,41	14134,9 ± 1321,9

*Las cifras representan los promedios ± desviación estándar del número de pulsos × 30 min. n = 9.

de cada cepa; ni se evidenciaron diferencias cuando se comparó la conducta de las cepas entre sí.

En las Tablas II-IV se muestran las concentraciones de dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina y alguno de sus metabolitos en la sustancia negra, cuerpo estriado y *locus coeruleus* (LC).

Bajo las condiciones cromatográficas descritas previamente, las catecolaminas pudieron ser fácilmente detectadas y separadas completamente en menos de 20 minutos. Como puede observarse en las Tablas, el ANOVA de dos vías no reveló diferencias significativas en las concentraciones de catecolaminas en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas, cuando se compararon, para cada cepa, el grupo tratado con manganeso con su respectivo grupo control. Sin embargo, dicho análisis estadístico demostró diferencias importantes en los niveles de catecolaminas, cuando la cepa de ratones albinos se comparó con la de ratones C57BL/6.

De esta forma, puede observarse que las concentraciones de dopamina en la sustancia negra y en el estriado de los ratones C57 (tanto controles como tratados con Mn), son marcadamente inferiores a las concentraciones de DA en las mismas regiones cerebrales de los ratones albinos. Los niveles de DOPAC, principal metabolito de la DA, son significativamente mayores en el estriado de los ratones negros C57; mientras que no se evidenciaron diferencias en el ácido homovanílico (HVA) en ninguna de las regiones. Por otro lado, los índices de recambio de dopamina, HVA/DA y DOPAC + HVA/DA, en ratones C57, se encontraron aumentados en el cuerpo estriado y el DOPAC HVA/DA solamente en la SN.

En forma similar a la dopamina, los contenidos de adrenalina y serotonina, fueron inferiores en el estriado de los ratones C57, pero no fueron diferentes en la sustancia negra y el LC. El principal metabolito de la 5HT, el 5HIAA, se encontró aumentado en la SN y el LC; mientras que el índi-

TABLA II
CONCENTRACIONES DE CATECOLAMINAS EN SUBSTANCIA NEGRA DE RATONES ALBINOS
Y C57BL/6 TRATADOS CON MANGANESO (i)

Catecolamina	Albinos		C57BL/6	
	Controles	Tratados-Mn	Controles	Tratados-Mn
Dopamina (DA)	5,8 ± 0,43	5,7 ± 0,29	3,7 ± 0,39*	3,4 ± 0,82*
DOPAC	4,5 ± 0,53	3,5 ± 1,16	2,3 ± 0,59	2,8 ± 0,74
Ácido Homovanílico (HVA)	6,1 ± 0,63	5,2 ± 0,57	4,2 ± 1,09	5,3 ± 0,73
HVA/ DA	1,1 ± 0,07	0,9 ± 0,08	1,1 ± 0,23	1,9 ± 0,54
DOPAC/DA	0,8 ± 0,05	0,6 ± 0,16	1,0 ± 0,23	0,9 ± 0,23
HVA + DOPAC/DA	1,8 ± 0,07	1,5 ± 0,18	2,1 ± 0,14*	2,7 ± 0,68*
Noradrenalina	16,8 ± 2,20	18,5 ± 1,36	14,3 ± 0,47	12,3 ± 2,25
Adrenalina	1,0 ± 0,12	0,9 ± 0,09	0,9 ± 0,17	0,8 ± 0,18
Serotonina (5HT)	4,4 ± 0,60	5,3 ± 0,82	5,0 ± 1,02	3,4 ± 1,07
5HIAA	11,3 ± 0,85	26,1 ± 8,3	40,9 ± 4,88*	36,9 ± 5,14*
5HIAA/5HT	2,7 ± 0,30	5,5 ± 2,51	8,7 ± 1,51*	12,4 ± 2,27*

(i) Los resultados se expresan como nmoles por gramo de tejido húmedo (Promedio ± Error estándar). n = 5-7.
* Significativamente diferente del grupo albino control (p < 0,05).

TABLA III
CONCENTRACIONES DE CATECOLAMINAS EN CUERPO ESTRIADO DE RATONES ALBINOS
Y C57BL/6 TRATADOS CON MANGANESO (i)

Catecolamina	Albinos		C57BL/6	
	Controles	Tratados-Mn	Controles	Tratados-Mn
Dopamina (DA)	50,3 ± 2,75	54,2 ± 2,10	39,8 ± 6,80*	38,3 ± 3,37*
DOPAC	18,1 ± 2,25	18,1 ± 2,35	24,6 ± 4,23*	24,4 ± 3,55*
Ácido Homovanílico (HVA)	7,0 ± 0,41	7,9 ± 0,61	8,4 ± 1,53	7,9 ± 0,70
HVA/DA	0,14 ± 0,16	0,16 ± 0,014	0,21 ± 0,015*	0,21 ± 0,021*
DOPAC/DA	0,36 ± 0,058	0,33 ± 0,044	0,62 ± 0,034*	0,65 ± 0,102*
HVA + DOPAC/DA	0,51 ± 0,072	0,47 ± 0,053	0,83 ± 0,048*	0,86 ± 0,122*
Noradrenalina	0,79 ± 0,131	0,91 ± 0,075	1,55 ± 0,135*	1,66 ± 0,079*
Adrenalina	4,4 ± 0,53	4,7 ± 0,41	2,5 ± 0,38*	2,4 ± 0,40*
Serotonina (5HT)	4,9 ± 0,51	5,5 ± 0,47	3,1 ± 0,38*	3,4 ± 0,02*
5HIAA	3,5 ± 0,17	3,8 ± 0,15	3,2 ± 0,18	3,8 ± 0,21
5HIAA/5HT	0,74 ± 0,116	0,7 ± 0,44	1,2 ± 0,167*	1,0 ± 0,043*

(i) Los resultados se expresan como nmoles por gramo de tejido húmedo (Promedio ± Error estándar). n = 5-6
* Significativamente diferente del grupo albino control (p < 0,05).

TABLA IV
 CONCENTRACIONES DE CATECOLAMINAS EN *LOCUS COERULEUS* DE RATONES ALBINOS
 Y C57BL/6 TRATADOS CON MANGANESO (i)

Catecolamina	Albinos		C57BL/6	
	Controles	Tratados-Mn	Controles	Tratados-Mn
Dopamina (DA)	1,7 ± 0,22	1,5 ± 0,20	2,1 ± 0,50	1,3 ± 0,17
DOPAC	0,8 ± 0,19	0,7 ± 0,11	1,2 ± 0,10	1,3 ± 0,53
Ácido Homovanílico (HVA)	3,2 ± 0,53	3,5 ± 0,96	2,4 ± 0,19	2,1 ± 0,75
HVA/DA	2,1 ± 0,50	2,4 ± 0,67	1,5 ± 0,50	1,7 ± 0,62
DOPAC/DA	0,5 ± 0,14	0,5 ± 0,08	0,7 ± 0,33	0,9 ± 0,34
HVA + DOPAC/DA	2,7 ± 0,62	2,8 ± 0,68	2,1 ± 0,81	2,7 ± 0,68
Noradrenalina	4,7 ± 0,09	5,2 ± 0,77	12,7 ± 1,09**	9,8 ± 1,07**
Adrenalina	0,6 ± 0,18	0,6 ± 0,05	0,6 ± 0,15	0,6 ± 0,13
Serotonina (5HT)	4,1 ± 0,72	3,4 ± 0,64	3,2 ± 0,89	4,9 ± 0,75
5HIAA	15,4 ± 1,36	16,8 ± 2,50	24,8 ± 1,92*	20,5 ± 2,13
5HIAA/5HT	4,1 ± 1,13	6,01 ± 1,04	8,9 ± 1,55	4,5 ± 1,20

(i) Los resultados se expresan como nmoles por gramo de tejido húmedo (Promedio ± Error estándar). n = 5-6
 *Significativamente diferente del grupo albino control (p < 0,05). ** (p < 0,01).

ce de recambio de la serotonina (5HIAA/5HT) se encontró aumentado en SN y CE.

Por otro lado, el análisis estadístico reveló niveles de noradrenalina significativamente mayores en el LC y en el estriado de los ratones negros C57 cuando se compararon con los niveles de NA presentes en los ratones albinos.

DISCUSIÓN

El presente trabajo fue realizado para explorar posibles diferencias entre especies, observadas en la sensibilidad a la exposición crónica al Mn (8, 12). A tal fin, se determinaron los efectos del metal sobre la AME y sobre los niveles de varias monoaminas y sus metabolitos, en diferentes regiones cerebrales de dos cepas endogámicas de ratones, la C57 y la de ratones albinos.

En nuestro estudio, la administración de Mn durante 9 semanas no produjo diferencias significativas en la actividad horizontal total, en el tiempo total de actividad ni en ninguno de los otros parámetros de AME examinados, en las dos cepas de ratones estudiadas. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Cano y col. (24) y Talavera y col. (20) en los cuales el tratamiento con Mn produjo una disminución significativa de la AME a las dos semanas, con una recuperación parcial después de la 4ª semana, la cual se mantuvo hasta la 8ª semana de tratamiento. Se considera que la disminución de la AME en las etapas iniciales de la intoxicación se deba a hipoactividad o daño a los sistemas monoaminérgicos cerebrales y que durante las etapas tardías, no se observaron diferencias debido a que la AME estaba también muy reducida en los animales controles ocasiona-

da tal vez por trauma experimental, hábito o envejecimiento.

La observación de que no hubo diferencias significativas en los parámetros de conducta entre ambas cepas contrasta con los numerosos reportes de diferencias marcadas en varios patrones de conducta de los ratones C57 cuando se comparan con otras cepas, principalmente DBA/2J y BALBc. En efecto, se han demostrado diferencias significativas en su actividad locomotora espontánea (25), en su elevado consumo espontáneo y preferencia por el etanol (26, 27), en su mayor susceptibilidad y sensibilidad a los efectos de agonistas de la DA sobre la actividad locomotora y trepadora (para una revisión, ver ref. 18). Además, se ha demostrado una mayor susceptibilidad de estos ratones C57 al estrés, indicada por su efecto sobre la AME y sobre el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado de Porsolt (28). La falta de diferencias observables en la AME entre ratones albinos y C57 en el presente estudio, hace que los efectos de la exposición crónica al Mn sean comparables en ambas especies; sin embargo, no se encontraron diferencias entre ambas cepas.

Para determinar si existen diferencias en la respuesta neuroquímica a la administración crónica del metal, se determinaron las concentraciones de varias aminas y sus metabolitos en tres regiones cerebrales. El análisis estadístico de los resultados muestra que bajo las condiciones estudiadas, la administración de Mn intraperitonealmente durante 9 semanas, no produjo cambios en las concentraciones de catecolaminas en ninguna de las dos cepas de ratones. Efectivamente, ni DA, NA, A ó 5HT o sus metabolitos estuvieron alterados al final del período de intoxicación.

Este hallazgo contrasta con reportes previos de éste y otros laboratorios. Se ha encontrado que el contenido de DA cerebral varía dependiendo de la dosis y de la duración de la intoxicación oral con el me-

tal. Bonilla y Diez-Ewald (29) reportaron que después de administrar Mn por vía oral durante 7 meses, se produjo una disminución significativa en las concentraciones de DA y HVA en hemisferios cerebrales de ratas adultas. Deskin y col. (30) encontraron niveles de DA disminuidos en el hipotálamo de ratas en desarrollo, intoxicadas desde su nacimiento, sin variaciones en DA y NA en el estriado. Mientras que Chandra y Shukla (31) demostraron que la administración oral de Mn durante un mes a ratas en desarrollo, produjo una elevación significativa en los niveles de DA y NA en cerebro total. Así mismo, se han demostrado aumentos en las concentraciones de DA en cerebro de ratones adultos durante las etapas iniciales de la exposición a Mn (32) y en el contenido de DA y NA en el cuerpo estriado de ratones lactantes expuestos al metal a través de la leche materna (31). Bonilla y col. (23) utilizando diferentes concentraciones orales de Mn en ratas, durante 8 meses, encontraron niveles de NA disminuidos en estriado y puente, DA inalterada, DOPAC disminuido en estriado e hipotálamo, HVA disminuido en estriado y 5HT disminuida en cerebro medio.

De todos estos estudios se puede inferir que la gran diversidad en los hallazgos reportados se deba a varios factores, incluyendo las diferentes especies de animales utilizadas; su edad y estado de desarrollo; la región cerebral estudiada; la vía de administración, duración del período de intoxicación, concentración de manganeso y tipo de compuesto administrado; y finalmente, variaciones en los métodos de análisis de los contenidos de las monoaminas. Por otro lado, diversos factores ambientales y endógenos afectan las tasas de síntesis, metabolismo y recaptación de las aminas biogénicas centrales, pero los niveles basales o "steady state" de las mismas permanecen relativamente constantes dentro de los terminales nerviosos (33). Consecuentemente,

el estudio de la actividad de la enzima L-tirosina hidroxilasa (EC 1.14.16.2), el paso limitante en la tasa de síntesis de catecolaminas (34), puede ser utilizado como un mejor índice de la actividad neuronal catecolaminérgica central (35). Efectivamente, se ha encontrado en forma consistente, que esta enzima se encuentra diferencialmente alterada en las etapas iniciales y tardías de la intoxicación crónica con manganeso (36). En efecto, en ratas tratadas crónicamente con MnCl se observó un incremento significativo de la actividad de esta enzima en el neostriado, cerebro medio e hipocampo al mes de iniciado el tratamiento. La actividad enzimática permaneció aumentada en el neostriado, cerebro medio e hipotálamo al tercer mes y se mantuvo elevada en el neostriado al sexto mes. Después del octavo mes se observó un descenso significativo en la actividad enzimática en el neostriado, sin cambios en las otras regiones estudiadas (36); por estas razones el estudio de la actividad de la L-tirosina hidroxilasa debiera implementarse bajo las presentes condiciones experimentales, ante la falta evidente de cambios en el contenido de las monoaminas.

A pesar de que no observamos diferencias en las monoaminas, debidas a la administración de Mn, el ANOVA de dos vías utilizado para el análisis estadístico de las concentraciones de las mismas, reveló que existen diferencias importantes entre los ratones C57 y los ratones albinos. Así, observamos que los contenidos de DA en la SN y el CE de los ratones C57 son significativamente inferiores a los encontrados en los ratones albinos; mientras que los niveles de DOPAC son superiores en el CE y la tasa de recambio se encuentra aumentada en el CE y la SN de los ratones C57.

Casi el 80% de toda la DA del cerebro se encuentra en el CE (37), de allí que las bajas concentraciones de DA en los ratones C57 pudieran representar un estado de hi-

poactividad dopaminérgica. Nuestros hallazgos confirman los reportados por otros investigadores (18, 27, 38), que han demostrado diferencias en los niveles endógenos de DA; así como diferencias en la cantidad y calidad de la respuesta de receptores dopaminérgicos, en la densidad de estos receptores en diferentes áreas cerebrales y en la tasa de recambio de DA en dichas áreas, especialmente, cuando se comparan los ratones C57 con las cepas DAB/2J y BALBc. Sin embargo, nuestros resultados difieren de los presentados por George y col. (27) en los cuales reportan bajos niveles de DA en el tubérculo olfatorio e hipotálamo (estructuras pertenecientes al sistema dopaminérgico mesolímbico), pero no en el estriado. Así mismo, estos investigadores encontraron una disminución significativa en la tasa de recambio de DA en las áreas cerebrales mencionadas. Estas diferencias pueden deberse a las distintas cepas utilizadas en la comparación. A esta hipoactividad dopaminérgica endógena, se le han atribuido las variaciones de conducta mostrada por los ratones C57 cuando se comparan con otras cepas y que fueron discutidas anteriormente. En nuestro caso, las bajas concentraciones de DA no se tradujeron en cambios de la actividad motora espontánea.

De la misma manera que la DA, los ratones C57 también mostraron menores niveles de serotonina y adrenalina en el estriado, pero éstos no fueron diferentes en la SN y en el LC. Por el contrario, Messinha y col. (25) reportaron niveles de 5HT y de 5HIAA más elevados en el cerebro de ratones C57, comparados con varias cepas, incluyendo una cepa de ratones albinos. Esta diferencia es difícil de explicar, pero su esclarecimiento es importante dadas las implicaciones que ambas sustancias tienen para la expresión de diferentes tipos de conducta. Hasta ahora, no se habían reportado diferencias en el contenido cerebral de adrenalina.

Se ha propuesto que cambios funcionales en el sistema noradrenérgico central están involucrados en desórdenes psiquiátricos, incluyendo depresión y ansiedad (39, 40). El *locus coeruleus* representa el mayor grupo neuronal noradrenérgico cerebral y ha sido, junto a sus áreas de inervación, objeto de numerosos estudios sobre las bases neurofarmacológicas de la ansiedad y la depresión (41). De allí, la importancia de nuestro hallazgo de un mayor contenido de noradrenalina en el LC y el CE de ratones C57. Diferencias similares han sido reportadas anteriormente (28), incluyendo un aumento de los sitios de recaptación de NA.

En conclusión, a pesar de las diferencias observadas en el contenido endógeno de catecolaminas entre ambas cepas, los ratones C57 no son, aparentemente, más sensibles al efecto del Mn que los ratones albinos.

REFERENCIAS

1. **Bonilla E, Levine S, de Salazar E.** Intoxicación crónica con manganeso. *Acta Cient Vzlana* 1978; 29:332-337.
2. **McNally WD.** Industrial manganese poisoning with a review of the literature. *Industr Med* 1935; 4:458-599.
3. **Barbeau A.** Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicology* 1984; 5: 13-36.
4. **Cook DG, Fahn S, Brait KA.** Chronic manganese intoxication. *Arch Neurol* 1974; 30:59-64.
5. **Canavan MM, Cobb S, Drinker CK.** Chronic manganese poisoning. Report of a case, with autopsy. *Arch Neurol Psychiat (Chicago)* 1934; 32:501-512.
6. **Chandra SV, Srivastava SP.** Experimental production of early brain lesion in rats by parenteral administration of manganese chloride. *Acta Pharmacol Et Toxicol* 1970; 28: 177-183.
7. **Cardozo J, Bonilla E.** The neuropathology of experimental chronic manganese poisoning in rats. A preliminary report. *Invest Clín* 1985; 26:117-124.
8. **Bonilla E.** El manganeso y su importancia biomédica. Ediciones Astro Data SA, Maracaibo, Venezuela. 1987.
9. **Przedborski S, Jackson-Lewis V.** Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disor* 1998; 13(Suppl): 35-38.
10. **D'Amato RJ, Lipman ZP, Zinder SH.** Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP. Toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. *Science* 1986; 231:987-989.
11. **Donaldson J, Labellal FS, Gesser D.** Enhanced autoxidation of dopamine and a possible basis of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 1981; 2:53-64.
12. **Graham DG.** Catecholamine toxicity: A proposal for the molecular pathogenesis of manganese. *Neurotoxicity and Parkinson's disease.* *Neurotoxicology* 1984; 45:83-96.
13. **Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I.** Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-980.
14. **Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ.** A primate model of parkinsonism: Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1983; 80:4546-4550.
15. **Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwing I.** Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkeys. *Brain Res* 1984; 292: 390-394.
16. **Heikkila RE.** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). A dopaminergic neurotoxin. *Neurotransmissions* 1988; 4:1-4.
17. **Tipton KF, Singer TP.** Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 1993; 61:1191-1206.
18. **Puglisi-Allegra S, Cabib S.** Pharmacology of dopamine. The contribution of comparative studies in inbred strains of mice. *Prog Neurobiol* 1997; 51:637-661.
19. **Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC.** Dopaminergic neurotoxicity of MPTP in mice. *Science* 1984; 244:1451-1453.

20. **Talavera EJ, Arcaya JL, Giraldoto D, Suárez J, Bonilla E.** Decrease in spontaneous motor activity and in brain lipid peroxidation in manganese and melatonin treated mice. *Neurochem Res* 1999; 24(5): 705-708.
21. **Cuesta de DiZio MC, Gómez G., Bonilla E, Suárez-Roca H.** Auroreceptor presynaptic control of dopamine release from striatum is lost at early stages of manganese poisoning. *Life Sci* 1995; 56(22):1857-1864.
22. **Glowinski J, Iversen L.** Regional studies of catecholamines in rat brain. I. The disposition of 3H-dopamine and 3H-dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* 1966; 13:655-669.
23. **Bonilla E, Prasad ALN.** Effect of chronic manganese intake on the levels of biogenic amines in rat brain regions. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1984; 6:341-344.
24. **Cano G, Suárez-Roca, Gómez G, Arcaya JL, Aversano G, Latan JC, Bonilla E.** Alterations of animal motor activity in early stages of experimental manganese poisoning. In: *Metal Ions in Biology and Medicine*, Vol 4, Collery Ph, Corbella J, Domingo JL, Etienne JC and Llobat JM (Eds). Paris: John Libbery Eurotext; 1996. PP 472-474.
25. **Messiha FS, Martin NJ, Bucher KD.** Behavioral and genetic interrelationships between locomotor activity and brain biogenic amines. *Gen Pharmacol* 1990; 21(4): 459-464.
26. **Belknap JK, Crabbe JC, Young ER.** Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 1993; 112(4):503-510.
27. **George SR, Fan T, Ng G YK, Jung SY, O'Dowd BF, Naranjo CA.** Low endogenous dopamine function in brain predisposes to high alcohol preference and consumption: Reversal by increasing synaptic dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 273(1) 373-379.
28. **Hwang BH, Kinkler PE, Tarricone BJ, Hingtgen JN, Nurnberger Jr. JI.** Stress-induced changes in norepinephrine uptake sites in the locus coeruleus of C57BL/6J and DBA/2J mice: a quantitative autoradiographic study using ³H-tomoxetine. *Neurosci Lett* 1999; 265: 151-154.
29. **Bonilla E, Diez-Ewald M.** Effect of L-DOPA on brain concentration of dopamine and homovanilic acid in rats after chronic manganese chloride administration. *J Neurochem* 1974; 2:297-299.
30. **Deskin RS, Bursian J, Edenis FW.** Neurochemical alterations induced by manganese chloride in neonatal rats. *Neurotoxicology* 1980; 2:65-73.
31. **Chandra SV, Shukla GS, Saxena DK.** Manganese induced behavioral dysfunction and its neurochemical mechanisms in growing mice. *J. Neurochem* 1979; 33:1217-1221.
32. **Cotzias GC, Papavaseliou PG, Mena I, Tang LC, Miller ST.** Manganese and catecholamines. In: F McDowell and A Barbeau, Eds. *Advances in Neurology*, vol 5: Second Canadian-American Conference on Parkinson's Disease. New York: Raven Press; 1974. PP 235.
33. **Alousi A, Weiner N.** The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: Effect of nerve stimulation, cocaine and catecholamine-releasing agents. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1966; 56:1491-1496.
34. **Levitt MS, Spector A, Sjoerdesina A, Vdenfriend S.** Elucidation of the rate-limiting step in NE biosynthesis in the perfused guinea pig-heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 148:1-8.
35. **Bacopolous NG, Bhartnagar RK.** Correlation between tyrosine hydroxylase activity and catecholamine concentration or turnover in brain regions. *J Neurochem* 1977; 29: 639-643.
36. **Bonilla E.** L-tyrosine hydroxylase activity in rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav Toxicol* 1980; 2: 37-41.
37. **Weiner N, Molinoff P.B.** Catecholamines In: G.S. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, P.B. Rodisioff, Eds. *Basic Neurochemistry*. New York: Raven Press; 1994.
38. **Ng GY, O'Dowd BF, George SR.** Genotypic differences in brain dopamine receptor function in the DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains. *Eur J Pharmacol* 1994; 269(3): 394-364.

-
39. **Amsman H, Zacharko RM.** Múltiple neurochemical and behavioral consequences of stressors: Implications for depresión. *Pharmacol Ther* 1990; 46: 119-136.
40. **Kostoswski W, Plaznik A, Danysz W.** The role of the locus coeruleus-limbic noradrenergic transmission in the action of antidepressant drugs. *Psychopharmacol Bull* 1986; 22: 512-522.
41. **Simson PG, Weiss JM.** Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. *Neuropsychopharmacology* 1988; 1: 287-295.