

EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON MANGANESO SOBRE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DEL ESPIROPERIDOL (^3H) EN CEREBRO DE RATÓN: ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Effects of Chronic Manganese Treatment on Mouse Brain (^3H) Spiroperidol Binding Parameters: *In vivo* and *in vitro* studies

Virginia Villalobos¹, Jesús Estévez², Ernesto Novo³ y Ernesto Bonilla²

¹Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. E-mail: enovo@iamnet.com.

²Instituto de Investigaciones Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Apartado 1151. Maracaibo, Venezuela.

³Instituto de Investigaciones, Facultad de Odontología, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

RESUMEN

En este estudio se determinaron los efectos *in vivo* e *in vitro* del manganeso (Mn) sobre la fijación del espiroperidol (^3H) en diferentes regiones de cerebro de ratón. Los parámetros de fijación del espiroperidol (^3H) (K_d y B_{max}) en estriado, hipotálamo y bulbo olfatorio, no fueron alterados por la administración de Mn (5mg/kg/día) por 9 semanas. Por otro lado, la preincubación de homogeneizados de cerebro de ratón con concentraciones crecientes de Mn (0,05-10 mM) y dopamina (10 mM) produjo un incremento significativo en la fijación específica del espiroperidol (^3H) con una concentración de Mn de 75 μM o mayor. El B_{max} y el K_d del espiroperidol (^3H) se incrementaron significativamente en los homogeneizados tratados con Mn 75 μM y dopamina 10 mM. Estos resultados indican que la administración de Mn a los ratones no produce cambios de la cinética de fijación del espiroperidol (^3H) a sus receptores. El incremento en el B_{max} y en el K_d observado en los ensayos *in vitro*, en presencia de dopamina y Mn en el medio de incubación, puede ser debido a cambios en la membrana celular que conducen a la exposición de nuevos y diferentes sitios de fijación del ligando.

Palabras clave: Manganeso, espiroperidol (^3H), receptores, dopamina

ABSTRACT

The *in vivo* and *in vitro* effects of Mn on the binding of (^3H) spiroperidol to mouse brain was assessed. (^3H) spiroperidol bind-

ing parameters (K_d and B_{max}) in striatum, hypothalamus and olfactory bulb did not change by Mn administration (5mg/kg/day) for 9 weeks. On the other hand, preincubation of mouse brain homogenates with increasing concentrations of Mn (0.05-10 mM) and dopamine (10 mM) resulted in a significant rise in the (^3H) spiroperidol specific binding with a Mn concentration of 75 μM or higher. Binding assays carried out using homogenates preincubated with 10 mM dopamine and 75 μM Mn showed an increase in B_{max} and K_d . These studies demonstrated that Mn administration does not alter the binding pattern of (^3H) spiroperidol. The increase in B_{max} and K_d observed in the *in vitro* assays, when dopamine and Mn are added to the incubation medium seem to be originated from changes in cell membranes, leading to the exposure of new and different binding sites.

Key words: Manganese, (^3H) spiroperidol, receptors, dopamine.

INTRODUCCIÓN

El Mn es un nutriente esencial en el metabolismo de los seres vivos, pero la exposición a altas concentraciones de este metal produce un daño irreversible del sistema extrapiramidal y síntomas similares a los encontrados en la enfermedad de Parkinson [21, 36]. Existen estudios neuropatológicos [1, 15, 22], bioquímicos [4] y farmacológicos [20, 36] que apoyan fuertemente la existencia de semejanzas entre la intoxicación con Mn y ésta patología. La intoxicación con Mn se caracteriza por degeneración celular del núcleo caudado, el putamen, el globo pálido y la sustancia negra [15, 31, 47]. Sin embargo, también se ha observado pérdida neuronal en cerebelo e hipocam-

po[16, 19]. Los resultados de diferentes estudios realizados en pacientes intoxicados y en animales tratados con Mn arrojan que la alteración bioquímica mas importante es una disminución en la concentración de dopamina en el estriado [2, 6, 10, 12, 26]. Otros autores han encontrado incremento o ninguna alteración en la concentración estriatal de dopamina [14, 22, 44]. Estos resultados contradictorios probablemente reflejan el carácter bifásico de las alteraciones producidas por el metal durante el curso de esta enfermedad [10]. Existen numerosas investigaciones que demuestran que el Mn causa alteraciones en el metabolismo de varios neurotransmisores, tales como dopamina, serotonina, GABA, norepinefrina, y en menor intensidad acetilcolina, regulando su formación, liberación y recambio a nivel neuronal [11, 19, 32]. Con respecto a los estudios sobre receptores a neurotransmisores, diversos investigadores han descrito en el tratamiento con Mn un aumento, disminución o ninguna alteración en las características de fijación de los ligandos a los receptores dopaminérgicos [23, 24, 40, 41], gabaérgicos [37] y muscarínicos [5, 33, 46]. Estos hallazgos no coincidentes, se corresponden probablemente con la cambiante sintomatología neurológica y psiquiátrica observada en el curso de las intoxicaciones en humanos, en los cuales, un cuadro de excitación maníaca inicial (locura mangánica) es precedido por una demencia con acusados componentes de alteración extrapiramidal [36].

Varias hipótesis se han formulado para explicar la patogénesis de la toxicidad del Mn. Entre ellas tenemos: a) aumento en la autooxidación de la dopamina, con un incremento en la producción de radicales libres nocivos [29, 42], b) procesos excitotóxicos indirectos secundarios a la disminución de la energía causada por este metal [3, 13] y, c) toxicidad directa sobre las neuronas dopaminérgicas. Entre estos mecanismos mencionados, la autooxidación de la dopamina ha sido propuesta como la principal responsable de la alta sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas al Mn [28, 43]. Sin embargo, las alteraciones producidas por este metal a nivel de los mecanismos de unión de la dopamina a sus receptores neuronales no ha sido totalmente esclarecida. Por esta razón, este trabajo evaluó el efecto del tratamiento con Mn sobre las características de fijación del espiroperidol (^3H), un antagonista específico de los receptores dopaminérgicos D-2 en cerebro de ratones adultos en un doble ensayo *in vivo* e *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El espiroperidol (^3H) y el Gamma Flúor (líquido de centelleo) fueron obtenidos de New England Nuclear (Boston, MA, USA), la ketanserina fue gentilmente cedida por Janssen Pharmaceutical N.V., el hidrocloreuro de pargilina, el sulpiride y el resto de los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO).

Estudios *in vivo*

Intoxicación de animales: Se utilizaron ratones albinos machos adultos (NMRI-IVIC) con un peso promedio entre 25-30 g, alimentados *ad libitum* con Ratarina (Protinal) y agua destilada y mantenidos a una temperatura de 25°C bajo un esquema de 12 horas luz/oscuridad. Los animales fueron divididos en dos grupos: uno se inyectó intraperitonealmente con Mn (5mg Mn/kg peso/día) y el otro (grupo control), se inyectó con solución salina (0,9%). Ambos grupos recibieron una dosis diaria de 0,1 mL de la solución correspondiente, durante 9 semanas (5 días/semana). Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, dos días después de finalizado el tiempo de tratamiento, e inmediatamente los cerebros fueron removidos, disecándose el bulbo olfatorio, el estriado y el hipotálamo, de acuerdo a la técnica descrita por Glowinsky e Iversen [27]. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de los ensayos. La dosis de Mn seleccionada para estos experimentos estuvo basada en estudios previos realizados por Bonilla y col. [12]

Determinación de manganeso: El contenido de Mn de cada región cerebral, fué analizado por espectrofotometría de absorción atómica en horno de grafito según la técnica desarrollada por Bonilla y col. [8].

Experimentos de fijación: La fijación del espiroperidol (^3H) a los homogeneizados cerebrales se realizó de acuerdo al método descrito por Bhargava [5] con ligeras modificaciones: las regiones cerebrales se homogeneizaron en 40 volúmenes de Tris-HCl 50 mM (pH 7,7 a 25°C), utilizando un homogeneizador Polytron Brinkman (paso 3 por 15 segundos). El tejido homogeneizado se centrifugó dos veces a 49.000 g por 15 min en una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B). El precipitado final se resuspendió en solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM (pH 7,4 a 25°C), que contenía 0,1% de ácido ascórbico, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM y pargilina 10 μM . La mezcla de incubación incluía 0,1 mL de espiroperidol (^3H) (19 Ci/mmol), 50 nM de ketanserina y solución amortiguadora, en un volumen total de 1 mL. El rango de concentración del espiroperidol (^3H) fue de 0,1-3 nM.

Después de un período de incubación de 15 min a 25°C, el contenido de la mezcla de reacción fue filtrado a través de un cosechador de células automático (Skatron Inc., USA) y lavado dos veces con solución amortiguadora de Tris 50 mM pH 7,4 (en hielo). Los filtros fueron transferidos a viales que contenían 4 mL de líquido de centelleo. La radioactividad de las muestras se determinó en un contador Beta LKB modelo 1219 (Wallac, Finlandia) con una eficiencia en el conteo de las cuentas por minuto (cpm) del 68%. La fijación específica del espiroperidol (^3H) fue definida como la fijación total menos la que se observa en presencia de sulpiride 3 μM . Los datos obtenidos fueron analizados a través de el programa Ligand [38]. Los gráficos de Scatchard fueron usados para calcular la densidad de los sitios receptores (Bmax) y la constante de disociación (Kd).

Estudios *in vitro*

Preparación de los homogeneizados: Para determinar el efecto *in vitro* del Mn en presencia de dopamina sobre la fijación específica del espiroperidol (³H) fue utilizado el siguiente procedimiento: el cerebro completo de ratón (sin cerebelo) fue homogeneizado y centrifugado como se describió anteriormente. El precipitado final se resuspendió en 40 volúmenes de solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 7,7; y se preincubó a 25°C por 15 o 60 min en los siguientes medios: a) dopamina (10 mM), solución amortiguadora de Tris-HCl (50 mM, pH 7,7), 1,5 mL del homogeneizado cerebral y concentraciones crecientes de Mn (0,05; 0,075; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 mM), b) un control, sin dopamina ni Mn, c) dopamina como se describe en "a" pero sin Mn, d) Mn como se describe en "a" sin dopamina. El volumen final de todas las soluciones fue de 1,55 mL. Experimentos similares fueron realizados en la oscuridad, para determinar la influencia de la luz en el proceso. Después de la preincubación los homogeneizados fueron lavados tres veces con solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 7,7; centrifugados a 49.000 g por 15 min y luego resuspendidos en el volumen original con solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM pH 7,4; 0,1% de ácido ascórbico, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM y pargilina 10 µM.

Experimentos de fijación: Con el fin de determinar la fijación del espiroperidol (³H) los precipitados resuspendidos fueron incubados con una concentración fija de espiroperidol (³H) (3 nM) de acuerdo al procedimiento descrito.

También fueron evaluados los parámetros de fijación del espiroperidol (³H) (Bmax y Kd) a una concentración de Mn de 75 µM (concentración mínima de Mn que produce alteraciones en la fijación específica del espiroperidol (³H)). Con las muestras preincubadas "c" (dopamina) y "a" (dopamina + Mn) se obtuvo una curva de actividad.

El Bmax y el Kd del espiroperidol (³H) también fueron determinados de forma similar al descrito en el estudio *in vivo*.

Determinación de proteínas: La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry y col. [34]

Análisis estadístico: Para analizar los datos obtenidos de los experimentos se utilizó el análisis de variancia (ANOVA) de una sola vía. La prueba "t" de Student fue utilizada para de-

terminar las medias significativamente diferentes. Se consideraron significativos los valores de p menores de 0,05.

RESULTADOS

Estudios *in vivo*

Debido al tratamiento con Mn, todas las regiones cerebrales mostraron un aumento significativo en la concentración de este metal como se muestra en la TABLA I. En la fijación del espiroperidol (³H) a las membranas de las diferentes regiones cerebrales de ratones, se observó un solo sitio de unión de alta afinidad, FIG. 1. El tratamiento con Mn no produjo ningún efecto en los valores del Bmax y Kd en las tres regiones analizadas, TABLA II.

Estudios *in vitro*

En los estudios *in vitro* se observó que la preincubación de los precipitados con dopamina y Mn (solución "a"), por 15 min, no causó ninguna alteración en la fijación específica (datos no mostrados). Por otro lado, la preincubación por 60 min resultó en un aumento significativo en la fijación específica del espiroperidol (³H). Como se muestra en la FIG.2, este aumento estuvo directamente relacionado con la concentración del Mn. La concentración mínima del metal capaz de producir alteraciones significativas en la fijación del espiroperidol (³H), fue de 75 µM. Las mezclas de preincubación con dopamina sin Mn (solución "c") y Mn sin dopamina (solución "d") no produjeron ninguna alteración en los parámetros de fijación. Un precipitado oscuro se produjo durante la preincubación en todas las mezclas que contenían dopamina y dopamina más Mn. La cantidad de este precipitado fue proporcional a la concentración de Mn. En experimentos realizados en la oscuridad por 15 ó 60 min se observaron resultados similares a los encontrados en presencia de luz.

Los estudios sobre los parámetros de la fijación del espiroperidol (³H), realizados con la mezcla de dopamina mas Mn (solución a) y, la mezcla de dopamina sin Mn (solución c utilizada como control en este ensayo), mostraron un aumento significativo en los valores del Bmax y del Kd en la primera solución con respecto a la última. Los parámetros de fijación (Bmax y Kd) fueron: para la solución que contenía dopamina Mn 0,36 ±

TABLA I
CONCENTRACIÓN DE MANGANESO EN DIVERSAS REGIONES
CEREBRALES DE RATONES TRATADOS CON EL METAL

Región Cerebral	Mn (µg/g) de peso seco	
	Control	Tratado con Mn
Estriado	2,65 ± 0,71 ^a	8,33 ± 1,09 ^b
Bulbo Olfatorio	2,05 ± 0,56	9,38 ± 1,45 ^b
Hipotálamo	2,37 ± 0,08	11,07 ± 1,14 ^b

^aLas cifras representan la media ± E.E. de seis observaciones. ^bDiferentes significativamente del control (P<0,01).

TABLA II
EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON Mn SOBRE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DEL ESPIROPERIDOL (^3H)
EN DIVERSAS REGIONES CEREBRALES DE RATÓN

Región Cerebral	N ^a	Kd (pM)		Bmax (fmol/mg proteína)	
		Control	Tratado con Mn	Control	Tratado con Mn
Estriado	8	4,37 ± 0,57 ^b	3,27 ± 0,40	474,1 ± 49,5	508,7 ± 7,5
Bulbo Olfatorio	5	2,69 ± 0,31	2,59 ± 0,17	127,7 ± 22,8	144,7 ± 8,6
Hipotálamo	5	2,18 ± 0,83	3,32 ± 1,35	51,4 ± 13,1	59,9 ± 18,8

^aNúmero de observaciones. ^bLos valores representan la media ± E.E.

0,05 pmol/mg de proteína (media ± E.E.) y $2,63 \pm 1,24$ pM y para la mezcla que contenía dopamina + Mn $16,78 \pm 5,44$ pmol/mg de proteína y $43,17 \pm 7,44$ pM.

DISCUSIÓN

Con la concentración de Mn alcanzada en los cerebros de los ratones tratados, no se observaron alteraciones en los parámetros de fijación del espiroperidol (^3H). Los resultados de los estudios *in vivo* concuerdan con los obtenidos por Bhargava en ratas [5]. Eriksson y col. [24], utilizando técnicas autorradiográficas, no observaron ninguna alteración en los receptores dopaminérgicos del tipo D₂ en estriado y putamen de monos tratados con Mn durante 26 meses. Aunque los receptores muscarínicos y gabaérgicos también permanecieron inalterados, por el contrario, en los receptores dopaminérgicos del tipo D₁ se observó una disminución del Bmax. Por otro lado, Leung y col. [33] detectaron una disminución en la actividad específica del espiroperidol (^3H) (2nM) en el estriado de ratas tratadas con Mn por vía oral durante dos años, pero cuando usaron 0,5 nM del radioligando en el medio de incubación no detectaron ninguna alteración. Seth y col. [40] reportaron un aumento de la fijación del espiroperidol (^3H) en estriado de ratas utilizando un régimen de intoxicación similar al descrito por Bhargava [5]. Sin embargo, Leung y col. [33] y, Seth y col. [40] realizaron sus experimentos de fijación empleando una o dos concentraciones del radioligando mientras que, en los estudios de Bhargava [5] y en el presente trabajo, se realizaron curvas de saturación completas. Estas diferencias en la metodología, así como en el tipo de animal utilizado, pueden ser unas de las razones de las discrepancias observadas en los resultados obtenidos en estos estudios.

La intoxicación con Mn es un proceso patológico el cual muestra diferentes estados con características bioquímicas y neurológicas opuestas. En efecto, la actividad de la hidroxilasa de la tiroxina (HT) [9], en el cerebro de ratas tratadas con Mn durante 8 meses muestra un efecto bifásico. En los primeros, dos meses diferentes regiones cerebrales (neostriado, cerebro medio e hipocampo) presentaron un aumento significativo de la actividad de la HT. La actividad enzimática retornó a los valores normales a los 3-5 meses y luego disminuyó solamente en el estriado, después de 7 meses de tratamiento. Igual-

mente, las concentraciones cerebrales de catecolaminas en ratas intoxicadas con Mn mostraron cambios dependientes del tiempo de exposición [18]. Estas alteraciones bioquímicas parecen influir en la actividad motora espontánea de estos animales [10]. En ratas tratadas con Mn agregado al agua de bebida, se observó un incremento en la actividad motora durante la primera semana y una disminución significativa en la séptima y octava semanas. Este efecto bifásico del Mn, sobre el metabolismo de las catecolaminas y la actividad motora, guarda similitud con lo observado en humanos durante la intoxicación con Mn. Estos resultados parecen indicar que el componente presináptico de las vías dopaminérgicas no es afectado en los estados tempranos de la intoxicación con Mn. Chandra y Srivastava [17] reportaron resultados similares al no encontrar alteraciones anatómicas en el cerebro de ratones tratados con Mn durante los primeros noventa días de tratamiento. Por otro lado, Martínez y Bonilla [35], observaron que en ratas adultas tratadas con 10 mg de MnCl₂/mL en el agua de bebida durante 8 meses, la actividad de la colina-acetiltransferasa no se modificó en ninguna de las regiones cerebrales analizadas, indicando que las neuronas colinérgicas, incluidas las interneuronas postsinápticas a la vía dopaminérgica nigroestriada, son resistentes al efecto tóxico del Mn.

Al contrario de los hallazgos obtenidos en los estudios *in vivo*, las concentraciones de Mn utilizadas en los estudios *in vitro* provocaron un cambio de la cinética de la fijación del espiroperidol (^3H). La alteración producida sobre la fijación específica parece depender principalmente de dos condiciones: a) de las concentraciones de Mn en el medio de incubación y b) el tiempo de incubación del tejido cerebral en presencia de Mn y dopamina. Donaldson y La Bella [23] mostraron que el incremento en la autooxidación de la dopamina depende de su concentración en el medio. Estos hallazgos parecen indicar que, en conjunto, Mn y dopamina actúan produciendo un efecto directo y extenso sobre las membranas celulares. La relación entre Mn-dopamina y daño celular fue demostrada *in vitro*, por Sun y col. [45], quienes encontraron que los secuestradores de radicales libres bloqueaban solo el incremento en la peroxidación lipídica estimulada por Mn, pero no afectaban el resto de los mecanismos tóxicos que causan muerte celular. De acuerdo a este estudio, el Mn únicamente aumentaba la tasa de muerte celular en el cultivo de células PC-12, cuando el medio de cultivo contenía tirosina, que es el precursor de la dopamina. Además, Graham y col.

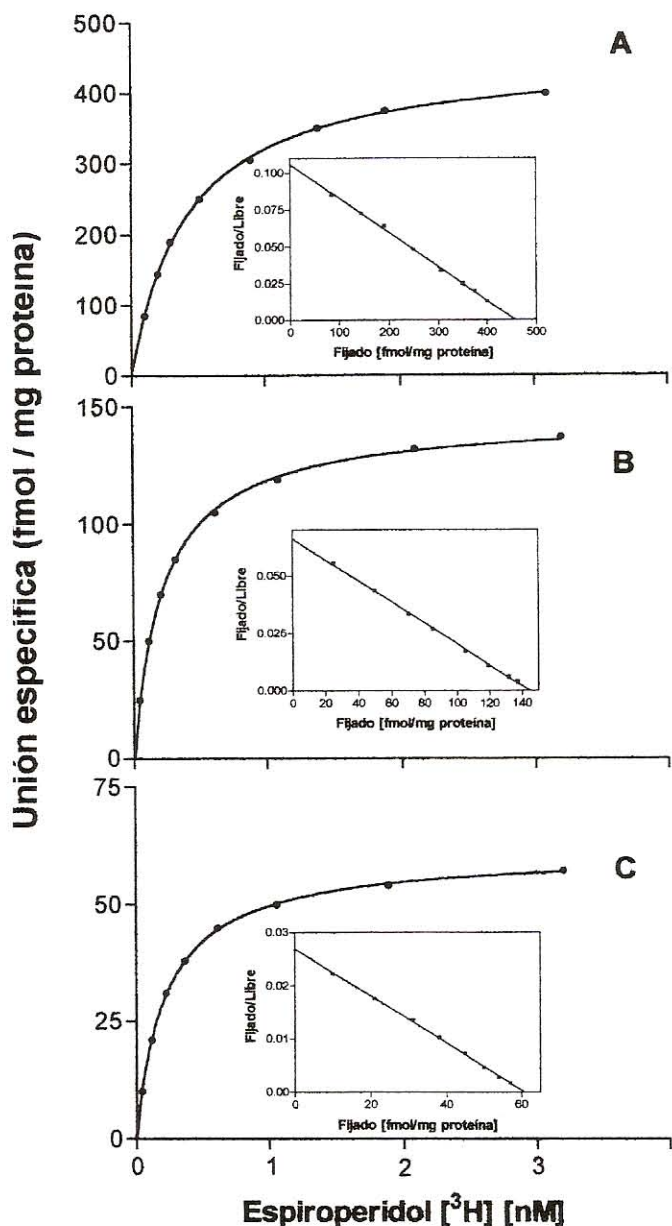


FIGURA 1. CURVAS DE SATURACIÓN Y GRÁFICOS DE SCATCHARD (INSERTO) DE LA UNIÓN ESPECÍFICA DE ESPIROPERIDOL (^3H) EN HOMOGENIZADOS DE CEREBRO DE RATÓN. A. ESTRÍADO. B. BULBO OLFATORIO. C. HIPOTÁLAMO.

[29] habían demostrado anteriormente que los efectos deletéreos de la dopamina son mediados en forma específica por la producción de quinonas y semiquinonas, las cuales producen daño celular a través de la inhibición de las enzimas nucleofílicas y la reacción con los grupos nucleofílicos. Por otro lado, Florence y Stauber [25] determinaron que los radicales peróxidos generados por las reacciones oxidativas de la dopamina tuvieron una toxicidad celular baja y los radicales hidroxilo se generaron en muy baja cantidad.

El precipitado oscuro observado en las mezclas de preincubación que contenían dopamina, y dopamina + Mn, ha

sido descrito [25, 28, 39] y parece corresponder a la formación de dihidroxiindoles derivados de la autooxidación de la dopamina. El hecho de que la cantidad de precipitado se incrementó cuando se aumentó la concentración de Mn, parece corroborar que este induce un aumento en la oxidación no enzimática de la dopamina.

Estos estudios *in vitro* también demuestran que el Mn afecta solo los parámetros de fijación en presencia de dopamina (la dopamina o el manganeso cuando se usaron en forma aislada fueron inefectivos). En base a esto, se puede especular que los efectos deletéreos del Mn sobre el tejido cerebral serían originados por el aumento acelerado en la formación de los productos de la autooxidación de la dopamina, los cuales exceden la capacidad de los mecanismos de protección celular.

El Bmax y la Kd del espiroperidol (^3H) en los homogeneizados cerebrales, preincubados en un medio que contenía Mn y dopamina, comenzaron a presentar alteraciones a concentraciones de Mn mayores de 50 μM , similares a las que producen muerte celular en los cultivos de tejidos descritos por Sun y col. [45]. Posiblemente las alteraciones observadas en los parámetros de fijación del espiroperidol (^3H) *in vitro* se debieron a rupturas o alteraciones de la membrana, las cuales permiten la exposición de diferentes sitios de fijación de baja afinidad. La carencia de alteraciones observadas en el estudio *in vivo* pueden ser dadas a que no se alcanzó las concentraciones elevadas a nivel celular necesarias para producir tales efectos. Esto último parece ser demostrado por los hallazgos encontrados en el estudio *in vitro*. Es necesario la realización de posteriores experimentos para tratar de encontrar cuáles son las alteraciones bioquímicas que causan este efecto deletéreo en los estudios *in vitro* y, a su vez dilucidar los posibles mecanismos celulares protectores responsables de la ausencia de alteraciones en los parámetros de fijación del espiroperidol (^3H) en los estudios *in vivo*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de este estudio sugieren que la interacción manganeso-dopamina es uno de los mecanismos responsables de las alteraciones observadas en las neuronas dopaminérgicas durante el tratamiento con manganeso. Es necesario realizar otros estudios para identificar los subproductos de esta interacción y su responsabilidad en el daño neuronal.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) y a la Fundación para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología en la Región Zuliana (FUNDACITE-ZULIA).

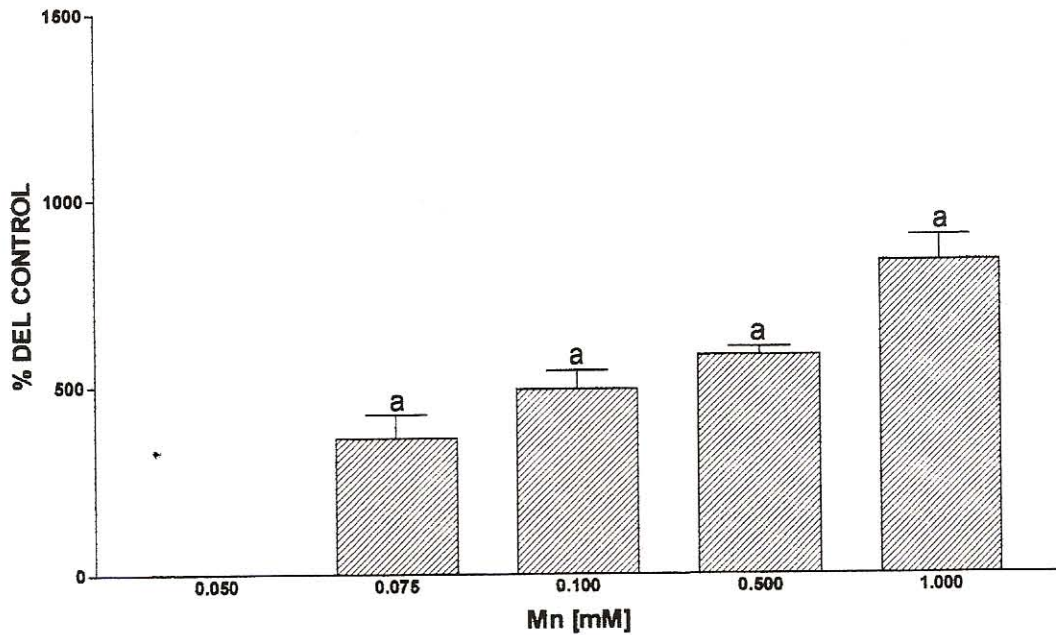


FIGURA 2. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE ESPIROPERIDOL (^3H) EN HOMOGENEIZADOS DE CEREBRO COMPLETO DE RATÓN INCUBADOS CON DOPAMINA 10 mM Y CONCENTRACIONES CRECIENTES DE Mn. ^aDIFERENTES SIGNIFICATIVAMENTE DEL CONTROL ($P < 0.05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABD, E.L.; NABY,S.; HASSANIEM, M. Neuropsychiatric manifestations of chronic manganese poisoning. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.** 28:282-288.1965.
- [2] AUTISSIER, N.; ROCHETT, L.; DUMAS, P.; BELEY, A.; LOIREAU, A.; BRALET, J. Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of rat brain after chronic manganese chloride administration. **Toxicology.** 24:175-182.1982.
- [3] BEAL, M.F.; HYMAN, B.T.; KOROSHETZ, H. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative disease?. **TINS.** 16:125-131. 1993.
- [4] BERHEIMER, H.; BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWIEZ, K.; JELLINGER, K.; SEITELBERGER F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **J. Neurol. Sci.** 20:415-455.1973.
- [5] BHARGAVA, H.N. Effect of repeated administration of manganese on striatal cholinergic and dopaminergic receptors in the rat. **Toxicol. Lett.** 37:135-141.1987
- [6] BIRD, E.D.; ANTON, A.H.; BULLOCK, B. The effect of manganese inhalation on basal ganglia dopamine concentrations in rhesus monkey. **Neurotoxicology.** 5:59-66.1984.
- [7] BONILLA, E.; DIEZ-EWALD, M. Effect of L-Dopa on the brain concentration of dopamine and homovanillic acid in rats after chronic manganese chloride administration. **J. Neurochem.** 22:297-299.1974.
- [8] BONILLA, E. Flameless atomic absorption spectrophotometric determinations of manganese in rat brain and other tissues. **Clin. Chem.** 24:471-474. 1978.
- [9] BONILLA, E. Tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. **Neurobehav. Toxicol.** 2:37-41. 1980.
- [10] BONILLA, E. Chronic manganese intake induces changes in the motor activity of rats. **Exp. Neurol.** 84:696-700.1987.
- [11] BONILLA, E. Chronic manganese poisoning and striatal adenylate cyclase activity. **Invest. Clin.** 2:45-50.1985
- [12] BONILLA, E.; ARRIETA, A.; CASTRO, F.; DÁVILA, J.O.; QUIROZ I. Manganese toxicity: Free amino acids in striatum and olfactory bulb of the mouse. **Invest. Clin.** 35:175-181.1994.
- [13] BROUILLET, E.P.; SHINOBU, L.; MCGARVEY, U.; HOCHBERG, F.; BEAL, M.F. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. **Exp. Neurol.** 120:89-94.1993.
- [14] BULL, R.J. Paradoxical decrease in corpus striatal manganese concentrations with manganese load. **Com-muns. Psychopharmacol.** 2:17-20. 1978.
- [15] CANAVAN, M.M.; COBB, S.; DRINKER, C.K. Chronic manganese poisoning. Report of a case with autopsy. **Arch. Neurol. Psychiat.** 32:501-512.1934.

- [16] CARDOZO, J.; BONILLA, E. The neuropathology of experimental chronic manganese poisoning in rats. A preliminary report. **Invest. Clin.** 26:117-124. 1985
- [17] CHANDRA, S.V.; SRIVASTAVA, S.P. Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese chloride. **Acta Pharmacol. Toxicol.** 28: 177-183. 1970.
- [18] CHANDRA, S.V.; SHUKLA, G.S. Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water. **J. Neurochem.** 36:683-687. 1981.
- [19] CHANDRA, S.V.; MALHATRA, K.M.; SHUKLA G.S. GABAergic neurochemistry in manganese exposed rats. **Acta Pharmacol. Toxicol.** 51:456-458. 1982.
- [20] COOK, D.G.; FAHN S.; BRAIT K.A. Chronic manganese intoxication. **Arch. Neurol.** 30:59-64. 1974.
- [21] COTZIAS, G.C.; PAPAVALIOU, P.S.; GINOS, J.; STECK, A.; DUBY, S. Metabolic modifications of Parkinson's disease and of chronic manganese poisoning. **Ann. Rev. Med.** 22:305-326. 1971.
- [22] COTZIAS, G.C.; PAPAVALIOU, P.S.; MENA, I.; TANG, L.C.; MILLER S.T. Manganese and catecholamines. **Adv. Neurology.** 5:235-243. Raven Press, New York. 1974.
- [23] DONALDSON, J.; LA BELLA, F.S. The effects of manganese on the cholinergic receptor in vivo and in vitro may be mediated through modulation of free radicals. **Neurotoxicology.** 5:105-112. 1984.
- [24] ERIKSSON, H.; GILLBERG, P.G.; AQUILONIUS, S.M.; HEDSTROM, K.G.; HEILBRONN E. Receptor alterations in manganese intoxicated monkeys. **Arch. Toxicol.** 66:359-364. 1992.
- [25] FLORENCE, T.M.; STAUBER, J.L. Manganese catalysis of dopamine oxidation. **Sci. Total Environ.** 78: 233-240. 1989.
- [26] GIANUTSOS, G.; SELTZER, M.D.; SAYMEH, R.; WU, M.L.W.; MICHEL, R.G. Brain manganese accumulation following systemic administration of different forms. **Arch. Toxicol.** 57: 272-275. 1982.
- [27] GLOWINSKY, J.; IVERSEN, L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of (³H)-nor-epinephrine, (³H)-dopamine and (³H)-Dopa in various regions of the brain. **J. Neurochem.** 13: 655-669. 1966.
- [28] GRAHAM, D.G. Oxidative pathway for the catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. **Molecular Pharmacology.** 14: 633-643. 1978.
- [29] GRAHAM, D.G.; TIFFANY, S.M.; BELL, W.R.; GUTKNECHT, W.F. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine and related compounds toward C1300 neuroblastoma cell in vitro. **Molecular Pharmacology.** 14:644-653. 1978.
- [30] GRAHAM, D.G. Catecholamines Toxicity: A proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. **Neurotoxicology.** 5:83-96. 1984.
- [31] GUPTA, S.K.; MURTHY, R.C.; CHANDRA, S.V. Neuromelanin in manganese-exposed primates. **Toxicol. Lett.** 6:17-20. 1980.
- [32] KIMURA, M.; YAGI, M.; ITOKAWA, Y. Effect of subcutaneous manganese feeding on serotonin metabolism in the rat. **J. Environ. Pathol. Toxicol.** 2:455-461. 1978.
- [33] LEUNG, T.K.C.; LAI, J.C.K.; LIM, L. (3H) -Quinuclidinil benzilate binding in striatal membranes from rats chronically treated with manganese chloride throughout development and for over two years. **Gen. Pharmacol.** 17:121-123. 1986.
- [34] LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.L. Protein measurements with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275. 1951.
- [35] MARTINEZ, H.; BONILLA, E. Water intake and brain choline-acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in manganese treated rats. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.** 3:277-280. 1981.
- [36] MENA, I.; MARIN, O.; FUENZALIDE, S.; COTZIAS, G.C. Chronic manganese poisoning. **Neurology.** 17:128-136. 1967.
- [37] MORENO, C.M.; BONILLA, E. Disminución de la captación de ³H-GABA en cerebelo de ratas intoxicadas con manganeso. **Invest. Clin.** 25 (2): 193-197. 1984.
- [38] MUNSON, P.J.; RODBARD, D. LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. **Anal. Biochem.** 107:220-239, 1980.
- [39] NATCHTMAN, J.P.; DELOR, S.; BRENNAM, C.E. Manganese neurotoxicity: Effects of varying oxygen tension and EDTA on dopamine auto-oxidation. **Neurotoxicology.** 8:249-254. 1987.
- [40] SETH, P.K.; HONG, J.S.; KILTS, C.D.; BONDY, S.C. Alterations of cerebral neurotransmitter receptor function by exposure of rats to manganese. **Toxicol. Lett.** 9:247-454. 1981.
- [41] SETH, P.K.; CHANDRA, S.V. Neurotransmitter and neurotransmitter receptor in developing and adult rats during manganese poisoning. **Neurotoxicology.** 5:67-76. 1984.
- [42] SHEN, X.M.; DRYHURST, G. Iron- and manganese-catalysed autooxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: possible insights into iron- and manganese-

mediated dopaminergic neurotoxicity. **Chem. Res. Toxicol.** 11(7):824-837. 1998.

- [43] SHINOTOH, H.; SNOW, B.J.; CHU, N.S.; HUANG, C.C.; LU, C.S.; LEE, C.; CALNE, D.B. Presynaptic and post-synaptic striatal dopaminergic function in patients with manganese intoxication: a positron emission tomography study. **Neurology**. 48 (4): 1053-6.1997.
- [44] SHUKLA, G.S.; CHANDRA, S.V. Species variation in manganese induced changes in brain biogenic amines. **Toxicol. Lett.** 3: 249-453. 1979.
- [45] SUN, A.Y.; YANG, W.L.; KIM, H.D. Free radical and lipid peroxidation in manganese-induced neuronal cell injury. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 679: 358-363.1993.

- [46] VILLALOBOS, V.; CASTRO, F.; BONILLA, E.; ESTÉVEZ, J.; DÁVILA, J.O. Manganese toxicity: Muscarinic receptor binding in the mouse brain. **J. Toxicol. Environ. Health.** 42: 185-191.1994.
- [47] YAMADA, M.; OHNO, S.; OKAYASU, Y.; OKEDA, R.; HATAKEYAMA, S.; WATANABE, H.; USHIO, K.; TSU, KAGOSHI H. Chronic manganese poisoning: A neuropathological study with determination of manganese distribution in the brain. **Acta Neuropathol.** 70:273-278. 1986.