

1.16.1.— Los individuos fallecidos a causa de hemocromatosis tienen una concentración de manganeso hepático significativamente mayor que otras personas fallecidas por cirrosis hepática debida a otras causas.

1.16.2.— Los infartos del miocardio producidos en perros, por ligadura de la rama descendente anterior de la coronaria izquierda, se acompañan de aumentos del manganeso sérico. En humanos, este incremento es inconsistente y no exclusivo de esta afección (157).

1.16.3.— El contenido de manganeso en el sarcoma osteogénico es mayor que en el hueso normal (83). Este hallazgo es importante, en virtud de la hipótesis según la cual, algunos metales pueden causar cáncer, por modificación de la actividad anabólica y catabólica de las células (65).

PARTE 2.— BREVE EXPOSICION DE LOS PROBLEMAS A RESOLVER.

2.1.— La vía biliar es la principal ruta excretora del manganeso, pero existen otras vías menos importantes, a saber: páncreas, mucosa intestinal, glándulas mamarias, etc. Las células serosas de la parótida, y las de las glándulas submaxilares, presentan similitud estructural con las de la porción exocrina del páncreas (15). Por ello, nos propusimos estudiar el papel de las glándulas submaxilares en el metabolismo del metal. Ellas, a diferencia de las parótidas, son relativamente grandes en las ratas (0,3-0,6 g) y muy fáciles de identificar.

2.2.— La enfermedad de Parkinson (13, 55) y el manganismo crónico experimental (111, 115) se caracterizan por una deficiencia de Dopamina; los síntomas de ambas entidades clínicas son mejorados sensiblemente, con la administración de L-Dopa (37). Sin embargo, no se conoce el efecto de la L-Dopa en los niveles de Dopamina cerebral, en el manganismo experimental. Esto nos condujo a determinar las concentraciones de Dopamina y de su principal metabolito (Acido Homovanílico), en el cerebro de ratas tratadas crónicamente con cloruro de manganeso, y a estudiar los efectos de la L-Dopa en estos animales.

2.3.— A pesar de que Mena y col (106) han demostrado el valor de la L-Dopa en el tratamiento del manganismo crónico, no se conocían reportes de los cambios metabólicos, que se suceden en estos pacientes. Los datos experimentales que se han publicado, se refieren al uso de la L-Dopa en animales normales, pero se ignora si la droga afecta a éstos, y a los intoxicados con manganeso, en forma similar. Papavasiliou y col (124) demostraron que la L-Dopa disminuye la excreción del Mn^{54} , administrado por vía endovenosa, y consideraron que esos hallazgos eran

debidos al aumento de la concentración del AMP-cíclico tisular.

Estas observaciones nos impulsaron a estudiar el efecto de la L-Dopa en la incorporación de Mn^{54} en hígado, cerebro, suero y glándulas submaxilares de ratas normales y sobrecargadas con manganeso.

2.4.— Los metabolismos del hierro y del manganeso están íntimamente relacionados (19, 51, 132), pero se sabe muy poco sobre las interrelaciones entre el manganeso y otros metales. En la presente tesis describimos algunos efectos de los iones metálicos sobre la captación del Mn^{54} , por homogeneizados de hígado de ratón, así como ciertos aspectos de la cinética de esa captación.

MATERIAL Y METODOO

Las ratas usadas en nuestros experimentos pertenecían a la raza Sprague-Dawley y su peso oscilaba entre 200 y 300 gramos. Para los estudios *in vitro*, se utilizaron ratones albinos suizos, MRT, de 20 a 25 g de peso.

El $Mn^{54} Cl_2$, libre de transportador (Amersham/Searle, Illinois), se utilizó tanto en los estudios *in vivo* como en los estudios *in vitro*. Para los estudios *in vivo* se inyectó a cada animal, 1, 6 ó 20 μC de $Mn^{54} Cl_2$ disueltos en 0.5 ml de solución salina fisiológica.

La radioactividad corporal, y la de los órganos aislados, se midió en un contador de cuerpo entero tipo ARMAC (Packard). para los estudios *in vitro* se utilizó un contador de pozo (Packard).

1.— Determinación de la retención corporal y de la distribución tisular de $Mn^{54} Cl$ en ratas normales y en ratas sobrecargadas con manganeso.

Doce ratas fueron alimentadas *ad libitum* con Ratarina (Protinal); a 6 de esos animales, se les ofreció agua destilada y desmineralizada que contenía 0.50 mg de $MnCl_2$ por ml y a las otras seis ratas se les administró solamente agua destilada y desmineralizada y fueron usadas como control. Tres meses después de estar recibiendo este tratamiento, cada rata fue inyectada en la vena dorsal de la cola, con 1 μC de $Mn^{54} Cl_2$ disuelto en 0.5 ml de solución fisiológica. La radioactividad corporal total, de cada animal, fue determinada diariamente en un contador de cuerpo entero. Diez y nueve días después de la inyección, todos los animales fueron sacrificados en una atmósfera de éter, procediéndose luego, a la medición de la radioactividad de sus hígados, glándulas submaxilares y tractos gastrointestinales, lavados estos últimos, con solución salina normal antes

de ser pesados y contados.

2.— Estudio de la incorporación de Mn^{54} en hígado y glándulas submaxilares, a diferentes intervalos después de la administración del isótopo radioactivo.

Se inyectaron 20 ratas normales, por vía endovenosa, con 1 μC de Mn^{54} para cada animal y luego se sacrificaron, en grupos de dos, a diferentes intervalos de tiempo. El hígado y las glándulas submaxilares fueron extraídos y pesados, después de lo cual, se determinó su radioactividad.

3.— Determinación del efecto de la ligadura del conducto colédoco en la incorporación de Mn^{54} por hígado y glándulas submaxilares.

Para estos estudios los animales se anestesiaron con nembutal, inyectado por vía interaperitoneal, ya que este barbitúrico no afecta la excreción biliar del manganeso (124). A cinco de las ratas inyectadas se les extirparon las glándulas submaxilares. A otro grupo de 5 animales se le ligó el conducto colédoco y en otras 5 ratas se ligaron los colédocos y se extrajeron las glándulas submaxilares. Cada grupo se acompañó de su propio control, constituido por animales falsamente operados. Un grupo final, de 3 animales, no fue intervenido. A continuación, cada rata fue inyectada por vía endovenosa con 1 μC de $Mn^{54}Cl_2$ y la radioactividad corporal se determinó diariamente, durante 8 días, al cabo de los cuales los animales se sacrificaron, procediéndose inmediatamente a pesar y a medir la radioactividad de los hígados y de las glándulas submaxilares.

4.— Estudio de la distribución subcelular del Mn^{54} en glándulas submaxilares.

Seis ratas fueron inyectadas por vía intraperitoneal con 20 μC de $Mn^{54}Cl_2$ y 16 horas después fueron sacrificadas. Una vez extraídas las glándulas submaxilares, se procedió a estudiar la distribución subcelular del metal, siguiendo la técnica de Potter y Axelrod (135).

Las glándulas submaxilares se homogeneizaron en 5 volúmenes de sacarosa 0.25 M, pH 7.4. Se utilizó un homogeneizador eléctrico provisto de un pestillo de teflón. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se preparó un gradiente contínuo de sacarosa (0.25-2.2 M) en tubos de 5 ml para el rotor Spinco SW50L. En la superficie de cada gradiente, se agregó cuidadosamente, un volumen de 0.5 ml del homogeneizado y la preparación se centrifugó a 125.000 x g x 30 minutos. Al terminar la centrifugación los tubos se punzaron en el fondo con el fin de recoger las diferentes capas formadas. Las fracciones aparecieron en el siguiente orden: nuclear, gránulos de amilasa, mitocondrial, microsomal y sobrenadante. Posteriormente, se determinó la radioactividad de cada una de ellas.

5.— Estudio de los niveles de Dopamina y Acido Homovanílico en el cerebro de ratas tratadas crónicamente con cloruro de manganeso. Efecto de la L-Dopa (administrada a la dosis de 100 mg x Kg peso, suspendida en 0.5 ml de solución salina).

Se utilizaron 20 ratas Sprague-Dawley de 200-300 gr de peso, alimentadas ad libitum con Ratarina (Protinal). Nueve animales recibieron 5 mg de $MnCl_2$ por ml del agua de bebida (destilada y desmineralizada); las restantes ingirieron agua libre de manganeso. Siete meses después de haber comenzado esta dieta, se inyectó L-Dopa por vía intraperitoneal a 5 de las ratas sobrecargadas con manganeso y a 6 ratas control. Los restantes animales (4 sobrecargadas con manganeso y 5 no sobrecargadas) sirvieron de control de los inyectados con L-Dopa. Sesenta minutos después de la inyección, las ratas fueron sacrificadas y sus hemisferios cerebrales rápidamente removidos y congelados a $-30^{\circ}C$ hasta su ulterior análisis.

Se utilizó el procedimiento de Spano y Neff (1966) para el aislamiento de la Dopamina y del Acido Homovanílico. Esta técnica está basada en la habilidad que tiene la alúmina para adsorber catecoles, a partir de una solución alcalina débil, y liberarlos en una solución ácida.

5.1.— Procedimiento para el aislamiento de la Dopamina y del Acido Homovanílico.

Los cerebros se homogeneizan en 4 volúmenes de Metabisulfito Sódico 0.05%, en solución Perclórica 0.4N. El homogeneizado se centrifuga a 12000 x g durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada (Sorval, Rotor SS-34). 1.5 ml del sobrenadante resultante se transfieren a un tubo de centrifuga de 15 ml provisto de tapa, al cual se le agregan 4.5 ml de Buffer Tris/HCl 0.5M, pH 9.0, y 500 mg de alúmina (óxido de aluminio neutral Woelm, Alemania). El pH resultante, en la mezcla, es de 8.3. La Dopamina se adsorbe a la alúmina al agitar el tubo por 10 minutos. A continuación, se centrifuga a 12000 x g x 15 minutos. Cinco ml de sobrenadante se transfieren a un tubo de centrifuga de 50 ml al cual se le agregan 10 ml de acetato de n-butilo, cloruro de potasio hasta saturar (aprox. 1,5 gr) y 1 ml de HCl 8N. El tubo se agita por 10 minutos y se centrifuga de nuevo a 12000 x g x 15 minutos. Luego se transfieren 9 ml del acetato de butilo (con el Acido Homovanílico disuelto) a un tubo de centrifuga de 15 ml que contenga 2 ml de NH_4OH , 5N. Se agita por 5 minutos y las fases resultantes se separan por centrifugación, en una centrifuga clínica, a máxima velocidad, por 5 minutos. 1 ml del NH_4OH se transfiere a un tubo de ensayo y se determina la concentración del Acido Homovanílico.

A continuación se elimina el exceso de buffer tris que ha quedado sobre la alúmina y se lava esta última con 5 ml de agua. Luego se le agregan 2 ml de ácido acético 0.2N y se eluye la Dopamina mediante agitación manual

durante 5 minutos. La mezcla se centrifuga en una centrífuga clínica, a máxima velocidad, y se transfiere 1 ml del sobrenadante a un tubo de ensayo para determinar la concentración de Dopamina.

En cada experimento se usaron además de las muestras, dos tubos de recuperación a los cuales se les había agregado 1 ug de Dopamina y 1 ug de Acido Homovanílico.

5.2.— Análisis del Acido Homovanílico.

Se utilizó el procedimiento de Anden y col (6). A 1 ml de la solución de NH_4OH obtenida previamente, se le agrega 0.1 ml de Ferrocianuro de Potasio al 0.02%. A los 4 minutos exactos se agrega 0.2 ml de Hidrocloruro de Cisteína al 0.1% y se determina la fluorescencia en un Espectrofotofluorímetro Aminco-Browman (λ de activación: 315 mu; λ de emisión: 430 mu).

Al invertir el orden de adición del Ferrocianuro de Potasio y de la Cisteína, se obtiene una lectura "blanco".

5.3.— Análisis de la Dopamina.

Se usó el método de Chang (44). A 1 ml del ácido acético 0.2N, obtenido anteriormente, se le agrega 1 ml de EDTA (se prepara disolviendo 37,2 gr de EDTA- $2\text{H}_2\text{O}$ disódica en 500 ml de Acetato de Sodio 1M; el volumen se lleva a 900 ml y el pH se ajusta a 7.0, con 5N NaOH; finalmente se aumenta el volumen a 1 litro). Luego se adiciona 0.2 ml de la solución de Iodo (1,27 gr de Iodo en 100 ml de Etanol al 95%) y, a los 2 minutos exactos, se agrega 0.2 ml de la solución de Sulfito (1 ml de Sulfito de Sodio al 25% y 9 ml de Hidróxido de Sodio 5N) la cual se prepara inmediatamente antes de usarla. Dos minutos después, se agrega 0.2 ml de Acido Acético 5N y los tubos se calientan por 3 minutos a 100°C . Luego de enfriados, se determina la fluorescencia a la λ de 370 mu, después de haber activado a la λ de 320 mu.

Los "blancos" se preparan invirtiendo la secuencia de adición del Iodo y del Sulfito alcalino.

6.— Determinación del efecto de la L-Dopa en la incorporación tisular de Mn^{54} .

Cincuenta y cuatro ratas hembras fueron alimentadas ad libitum con Ratarina. De ellas, 23 recibieron 5 mg de MnCl_2 por ml de agua de bebida (destilada y desmineralizada) y las 31 restantes ingirieron el mismo tipo de agua pero sin manganeso; estas últimas se usaron como control. Siete meses después, todos los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 6 uC de $\text{Mn}^{54} \text{Cl}_2$ disueltos en 0.5 ml de solución de Cloruro de

Sodio al 0.85%. Trece ratas del grupo sobrecargado con manganeso, y 20 del grupo control, fueron seleccionadas al azar e inyectadas con una suspensión de L-Dopa (100 mg x kg peso) en la misma solución Mn^{54} -salina. El resto de los animales sirvió de control de los inyectados con L-Dopa. Se investigó la absorción de L-Dopa a partir de la cavidad peritoneal, mediante inspección ocular de la misma. A los 30, 60 y 120 minutos después de la inyección, se sacrificaron varios grupos de animales en una atmósfera de éter, después de haberles extraído sangre por punción cardíaca. A continuación, se separaron los cerebros, hígados y glándulas submaxilares y la radioactividad de los órganos y del suero se determinó en un contador de pozo.

7.— Estudio de la captación de manganeso por homogeneizados de hígado.

Se utilizaron ratones albinos suizos, sacrificados por dislocación cervical. Los hígados se homogeneizaron en 10 volúmenes de buffer tris/HCl, frío (0.05M, pH 7.4). A menos que se especifique de otra manera, en casi todos los experimentos se tomaron alícuotas del homogeneizado y se incubaron con 0.02 μ C de $Mn^{54}Cl_2$ disuelto en el mismo buffer, el cual no tiene ninguna actividad quelatante del manganeso (171). La reacción se inició con el agregado del homogeneizado y el volumen final fue de 1 ml. La incubación se realizó a 37°C durante 10 minutos, en una incubadora metabólica Dubnoff (60 desplazamientos por minuto).

Al finalizar los 10 minutos, al cabo de los cuales no se produjo ningún cambio de pH, la reacción se detuvo mediante el agregado de 2 ml de etanol absoluto frío (4°C), y los tubos se centrifugaron inmediatamente, a temperatura ambiente, en una centrífuga Sorvall GLC-1, a 1650 x g x 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado con 2 ml del buffer Tris y centrifugado por 15 minutos. Este lavado se repitió una vez más y luego se procedió a determinar la radioactividad del precipitado final. La captación de Mn^{54} se expresó como porcentaje del standard utilizado, o en c.p.m. por mg de proteína. En cada experimento se utilizaron controles apropiados. Cuando el $Mn^{54}Cl_2$ se incubó con el buffer Tris/HCl, en ausencia del homogeneizado, no se detectó radioactividad en el tubo, después del último lavado.

Si no se especifica de otra manera, los valores reportados representan la media \pm D.S. de 3 experimentos realizados por triplicado, cuyas diferencias no fueron mayores del 10%.

8.— Proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col (94). Se utilizó albúmina bovina cristalizada (Pentex Inc) como standard.

9.— Reactivos.

Todos los reactivos utilizados fueron de un alto grado de pureza (analíticos) y no ameritaron purificación ulterior.

10.— Análisis estadístico.

Se calcularon los valores de t (Student's t-test) para demostrar la significación de los resultados obtenidos con los controles y los grupos problemas⁽¹¹⁾.

RESULTADOS

1.— Retención corporal y distribución tisular del Mn^{54} .

Como había sido demostrado previamente, los animales sobrecargados con manganeso excretaron el Mn^{54} a una velocidad mayor que los controles⁽²⁹⁾. En el día 19º, la retención corporal total del radioisótopo fue del 20% para las ratas sobrecargadas y del 30% para los controles (Fig 2). La radioactividad de las glándulas submaxilares no varió en las ratas sobrecargadas y las controles, en tanto que en el hígado y en el tracto gastrointestinal⁽¹²³⁾ fue mayor en los controles (Tabla 11). Al expresar la radioactividad en relación al peso tisular, no se observaron diferencias en el tracto gastrointestinal pero si en el hígado; en las glándulas submaxilares no hay diferencias entre ambos grupos pero la radioactividad, expresada por gramo de tejido, fue casi 11 veces mayor que la del hígado de los animales sobrecargados y más de 4 veces mayor que la del hígado de los controles.

2.— Incorporación del Mn^{54} en hígado y en glándulas submaxilares.

Como se observa en la tabla 12, el hígado incorporó inicialmente una gran cantidad de Mn^{54} (31%) pero, en las primeras 24 horas se produjo un descenso del 50%, debido al paso inicial rápido del metal hacia la bilis y su redistribución en otros tejidos⁽¹²³⁾.

Si expresamos la radioactividad, como porcentaje de la radioactividad corporal total, observamos que, con el transcurso del tiempo, las glándulas incrementan su contenido de Mn^{54} . Este hallazgo parece sugerir que el resto de los tejidos elimina más rápidamente el Mn^{54} que las glándulas submaxilares. Al expresar los valores en cpm/mg de tejido, la radioactividad de las glándulas se mantiene, con escasas variaciones, durante 5 días, mientras que en ese lapso, el Mn^{54} hepático disminuyó en unas 4 veces su valor inicial.

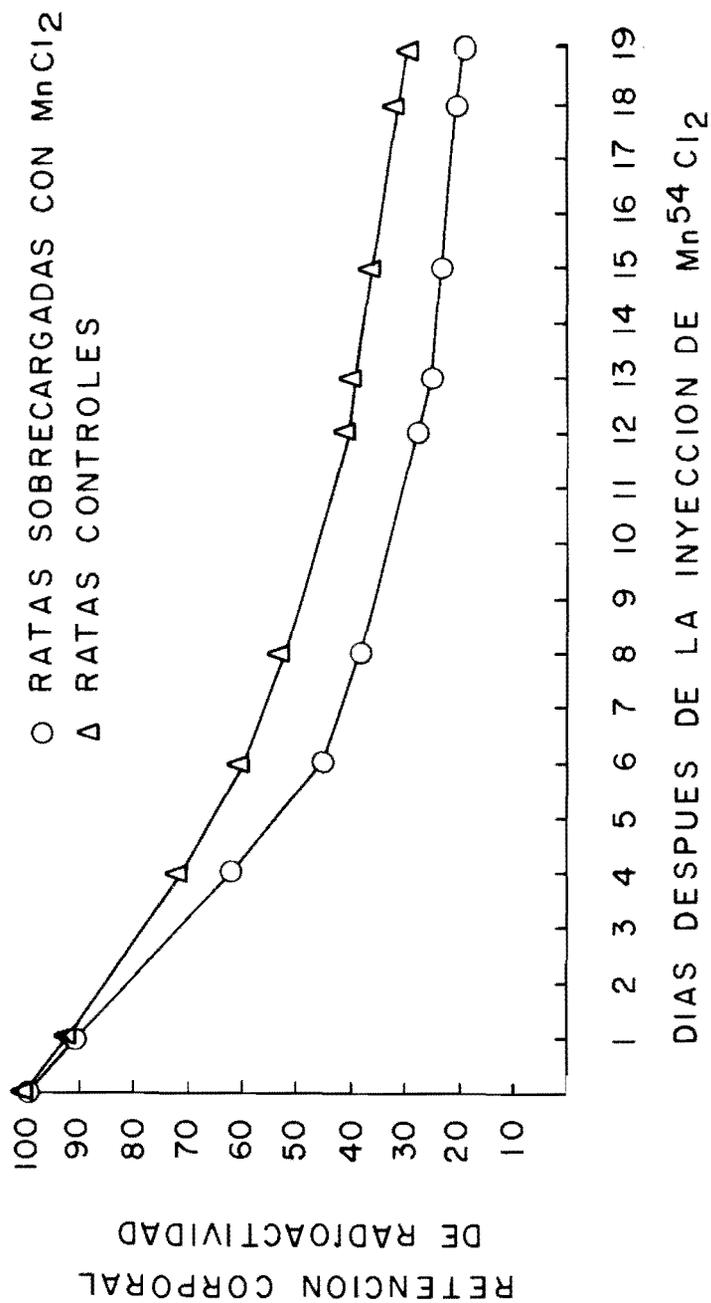


Fig. 2.

Retención corporal de Mn⁵⁴, en animales normales y en sobrecargados con manganeso, después de la inyección de 1 uC de Mn⁵⁴ Cl₂.

TABLA II

GRUPOS	PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD CORPORAL			RADIOACTIVIDAD POR GRAMO DE TEJIDO (PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD CORPORAL)		
	HIGADO	GLANDULA SUBMAXILAR	TRACTO GASTRO-INTESTINAL	HIGADO	GLANDULA SUBMAXILAR	TRACTO GASTRO-INTESTINAL
RATAS SOBRECARGADAS CON Mn^{54}	4.03 ± 0.69	2.00 ± 0.40	5.33 ± 1.53	0.38 ± 0.08	4.00 ± 0.80	0.20 ± 0.08
CONTROL	9.33 ± 0.51	1.49 ± 0.41	6.31 ± 0.50	0.75 ± 0.00	2.98 ± 0.82	0.25 ± 0.02
P	< 0.001	NS	< 0.01	< 0.01	NS	NS

Tabla 11.

Distribución del Mn^{54} en algunos órganos de ratas normales y sobrecargadas con manganeso, 19 días después de la inyección endovenosa de 1 uC de $Mn^{54}Cl_2$.

TABLA 12

HORAS DESPUES DE LA INYECCION DE $Mn^{54}Cl_2$	HIGADO			GLANDULAS SUBMAXILARES		
	PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD INYECTADA	PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD CORPORAL	C P M POR μg DE TEJIDO	PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD INYECTADA	PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD CORPORAL	C P M POR μg DE TEJIDO
1	31.15	29.43	41	0.93	0.88	26
2	25.23	23.83	35	0.95	0.91	32
8	21.58	19.25	26	1.07	0.95	23
24	14.43	18.40	19	0.81	1.04	28
48	16.60	24.90	17	0.78	1.17	22
72	17.73	29.19	18	0.99	1.62	33
96	15.09	23.41	13	0.94	1.46	25
120	10.31	16.44	10	1.06	1.70	29
192	7.85	16.95	6	0.56	1.23	12
288	4.93	15.08	2	0.59	1.79	17

Tabla 12.

Incorporación del Mn^{54} en el hígado y en las glándulas submaxilares de ratas, a diferentes intervalos de tiempo, después de la administración endovenosa de $1 \mu C$ de $Mn^{54}Cl_2$.

3.- Efecto de la ligadura del conducto colédoco en la incorporación del Mn^{54} .

En la figura 3 se observa que la retención corporal del Mn^{54} es igual en

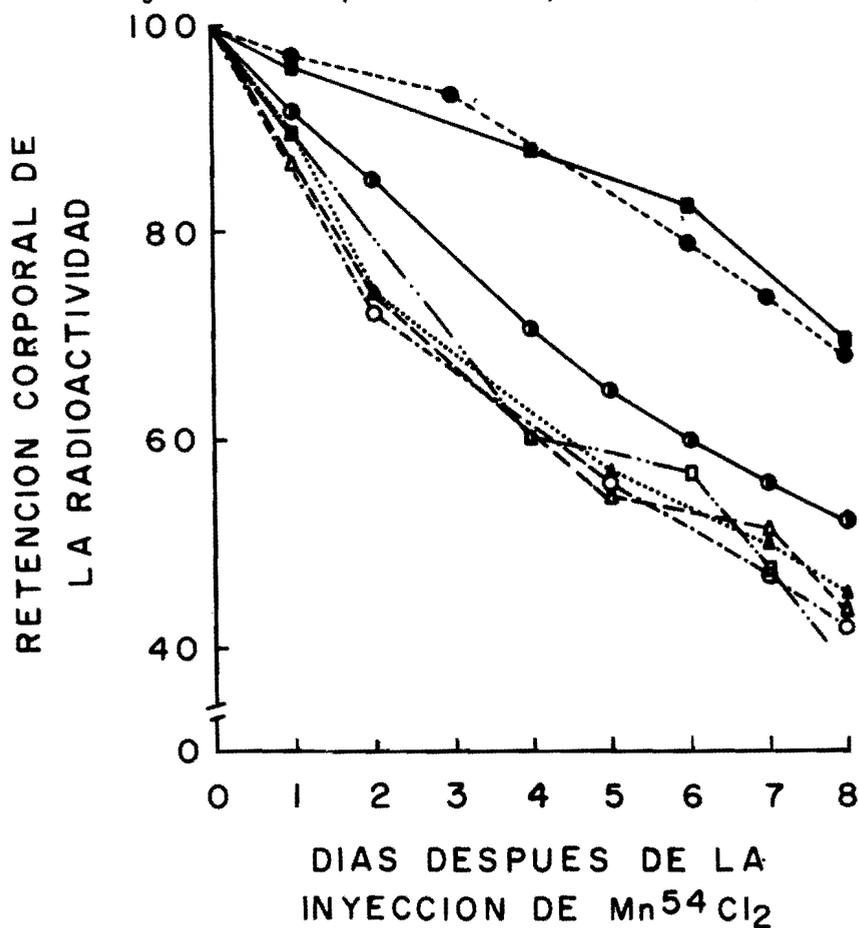


Fig. 3.

Retención corporal del Mn^{54} . Las condiciones del experimento están descritas en el texto.

- ▲ ▲ : Glándulas submaxilares extirpadas
- △ △ : Control
- ■ : Colédoco ligado y glándulas submaxilares extirpadas
- □ : Control
- ● : Animales no operados
- ● : Colédoco ligado
- ○ : Control

las ratas controles y en aquellas cuyas glándulas submaxilares fueron extirpadas. Respuesta similar se comprobó entre el grupo con colédoco ligado y el grupo con glándulas submaxilares extirpadas y colédoco ligado. Los animales no operados presentaron una excreción mas lenta que los controles (123). En general, las ratas que tenían el colédoco ligado retuvieron mucho más Mn^{54} que los otros grupos. Los hígados de las ratas, a las que se les había ligado el conducto colédoco, tenían una radioactividad 4 veces mayor que los hígados controles; mientras que la radioactividad de las glándulas submaxilares no se diferenció de la de los controles (Tabla 13). Resultados semejantes se verificaron en los hígados de los grupos con colédoco ligado y glándulas submaxilares extraídas. Al extirpar solamente las glándulas submaxilares, no se observó diferencia en el contenido hepático de Mn^{54} entre los animales problemas y sus controles.

4.— Distribución del Mn^{54} en las fracciones subcelulares de las glándulas submaxilares.

La tabla 14 muestra que el Mn^{54} se localiza en todas las fracciones particuladas de la célula, especialmente en la fracción microsomal y en la mitocondrial.

5.— Efecto de la L-Dopa sobre los niveles de Dopamina y Acido Homovanílico en el cerebro de ratas tratadas crónicamente con cloruro de manganeso, por vía oral.

Ninguno de los animales presentó signos de rigidez muscular, temblor o parálisis, a pesar del alto contenido de manganeso que ingirieron. Los estudios histopatológicos del núcleo caudado revelaron picnosis moderada de algunas neuronas, hallazgo que fue confirmado con el microscopio electrónico (García Tamayo J., Díez-Ewald M. y Bonilla E., resultados inéditos).

En la tabla 15 se observa que en los cerebros de los animales sobrecargados con manganeso, se produce una reducción significativa del contenido de Dopamina y de Acido Homovanílico ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente). La administración de L-Dopa incrementa la concentración de ambos compuestos, tanto en el grupo sobrecargado como en el control. Al inyectar L-Dopa a los animales sobrecargados, se observó un incremento del 300% en la concentración basal de la Dopamina ($p < 0.001$) y de alrededor del 110% en la del Acido Homovanílico ($p < 0.02$). El grupo control aumentó 80% ($p < 0.001$) y 34% ($p < 0.001$) sus concentraciones de Dopamina y Acido Homovanílico, respectivamente. Si se comparan los dos grupos de animales inyectados con L-Dopa, no se observa ninguna diferencia entre ellos.

TABLA 13

GRUPOS DE ANIMALES	(PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD CORPORAL)	
	HIGADO	GLANDULAS SUBMAXILARES
COLEDOCO LIGADO	54.30 ± 3.0	1.05 ± 0.2
CONTROL	12.57 ± 1.4	1.53 ± 0.3
COLEDOCO LIGADO Y GLANDULAS SUBMAXILARES EXTRAIDAS	47.25 ± 6.7	—
CONTROL	13.97 ± 2.7	1.46 ± 0.0
GLANDULAS SUBMAXILARES EXTRAIDAS	12.27 ± 1.5	—
CONTROL	11.16 ± 1.2	1.37 ± 0.56

Tabla 13.

Retención de la radioactividad en el hígado y en las glándulas submaxilares de ratas sometidas a las condiciones descritas en el texto.

TABLA 14
DISTRIBUCION SUBCELULAR DEL $Mn^{54} Cl_2$
EN GLANDULA SUBMAXILAR DE RATA

FRACCION	RADIOACTIVIDAD c.p.m.	PORCENTAJE DE LA RADIOACTIVIDAD TOTAL
HOMOGENEIZADO	9 800	—
SOBRENADANTE	3 407	35
MICROSOMAL	2 715	28
MITOCONDRIAL	1 694	17
GRANULOS DE AMILASA	1 191	12
NUCLEAR	785	8

TABLA 15

GRUPOS	DOPAMINA (μg / g de tejido húmedo)	ACIDO HOMOVANILICO (μg / g de tejido húmedo)
CONTROL (5) *	2.52 ± 0.14	0.30 ± 0.00
CONTROL + L-DOPA (6)	$4.54 \pm 0.00^{\dagger}$	$0.43 \pm 0.04^{\ddagger}$
RATAS SOBRECARGADAS CON MnCl_2 (4)	$1.34 \pm 0.39^{\dagger}$	$0.21 \pm 0.06 \text{ g}$
RATAS SOBRECARGADAS CON MnCl_2 + L-DOPA (5)	$5.40 \pm 0.88^{\ddagger}$	$0.44 \pm 0.10 \text{ g}$

Tabla 15.

Efecto de la administración intraperitoneal de L-Dopa (100 mg x kg peso) en la concentración de Dopamina y Acido Homovanílico, en el cerebro de ratas tratadas crónicamente con cloruro de manganeso.

Las cifras reportadas representan las medias \pm D.S. de las determinaciones practicadas.

* Número de determinaciones, entre paréntesis

+ $p < 0.01$, comparados con el control

++ $p < 0.001$, comparados con el control

∞ $p < 0.05$, comparado con el control

6.- Efecto de la L-Dopa en la incorporación tisular de Mn^{54}

6.1.- Hígado.

La incorporación fue mayor en los animales alimentados con dieta normal, tratados con L-Dopa, que en los controles correspondientes (Fig 4). La incorporación de Mn^{54} en los animales sobrecargados inyectados con L-Dopa fue menor que en los no sobrecargados no inyectados con la droga. No se observó ninguna diferencia significativa en la incorporación de los 2 grupos tratados con exceso de manganeso en la dieta. Los animales no sobrecargados que recibieron L-Dopa lograron la mayor incorporación a

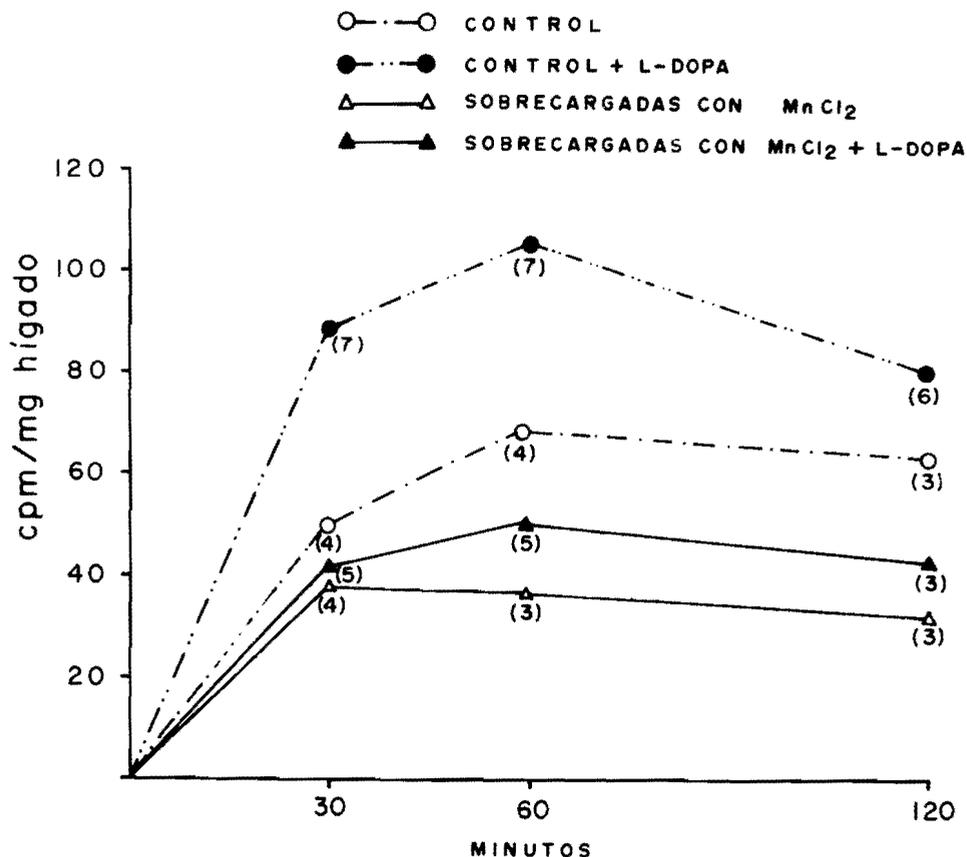


Fig. 4.

Retención hepática del Mn^{54} después de la inyección de L-Dopa. Las cifras entre paréntesis corresponden al número de animales.

los 60 minutos después de la inyección ($p < 0.02$). Cuando se comparan los 2 grupos tratados con L-Dopa (sobrecargados y normales) la diferencia encontrada es significativa a los 60 minutos ($p < 0.01$) y a los 120 minutos ($p < 0.05$). La figura 4 demuestra claramente que la L-Dopa produce el máximo efecto a los 60 minutos después de su inyección intraperitoneal.

6.2.— Glándulas submaxilares.

En contraste con lo observado en el hígado, las glándulas submaxilares de las ratas sobrecargadas y la de sus controles, captaron la misma proporción de Mn^{54} . Cuando se les administró L-Dopa, no se produjo ninguna diferencia significativa entre los grupos examinados (Fig 5).

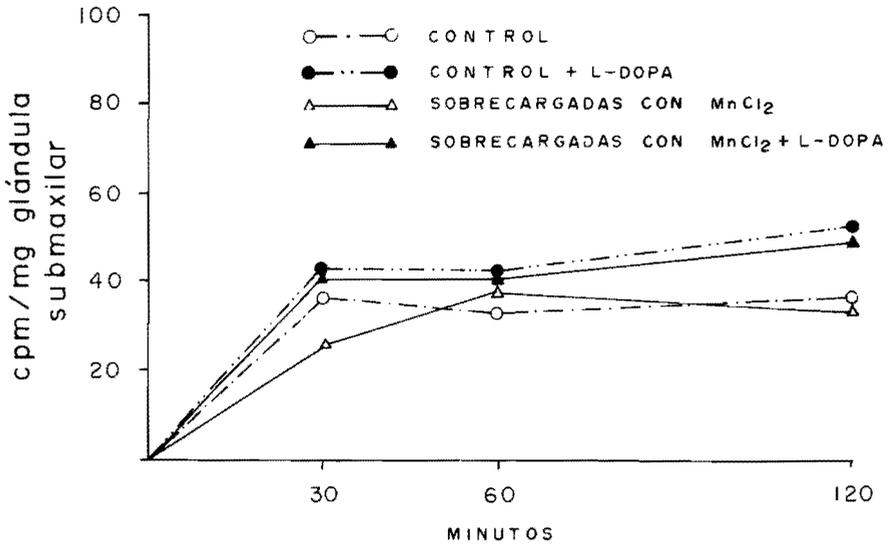


Fig. 5.

Retención del Mn^{54} , por parte de las glándulas submaxilares, después de la administración de L-Dopa.

6.3.- Cerebro.

Dos horas después de la administración de L-Dopa, la radioactividad del cerebro de las ratas normales y la de las sobrecargadas, permaneció elevada ($p < 0.02$), en comparación con la de los animales que no recibieron L-Dopa. Si se analizan los 2 grupos tratados con L-Dopa, no se observa diferencia entre ellos (Fig 6).

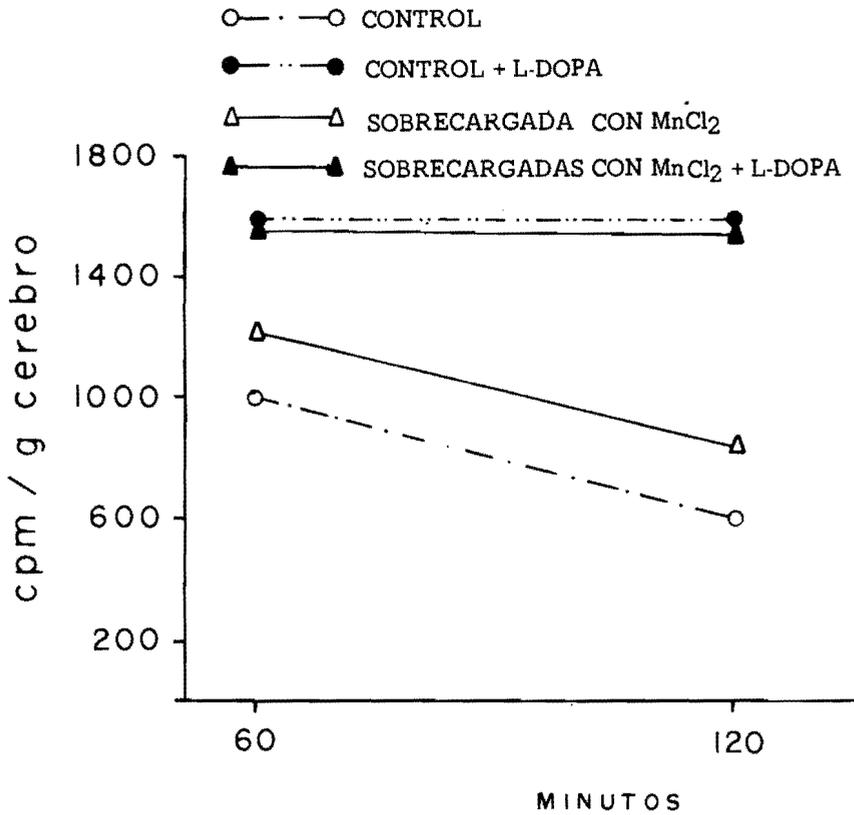


Fig. 6.

Retención cerebral del Mn⁵⁴ después de la inyección de L-Dopa.

6.4.- Suero.

Los grupos inyectados con L-Dopa mostraron efectos contrarios a los de los órganos descritos anteriormente (Fig 7). En efecto, la radioactividad

fue menor en los animales tratados con la amina que en sus correspondientes controles. Este hallazgo fue más pronunciado a los 30 minutos después de la inyección de L-Dopa ($p < 0.001$) sin embargo, a los 60 minutos, no encontramos diferencia entre los grupos controles (con y sin L-Dopa) pero sí en los animales sobrecargados ($p < 0.001$). De las ratas que no fueron inyectadas con L-Dopa, las sobrecargadas con manganeso tenían más Mn^{54} en el suero, que los controles con dieta normal, 60 minutos después de la inyección ($p < 0.001$).

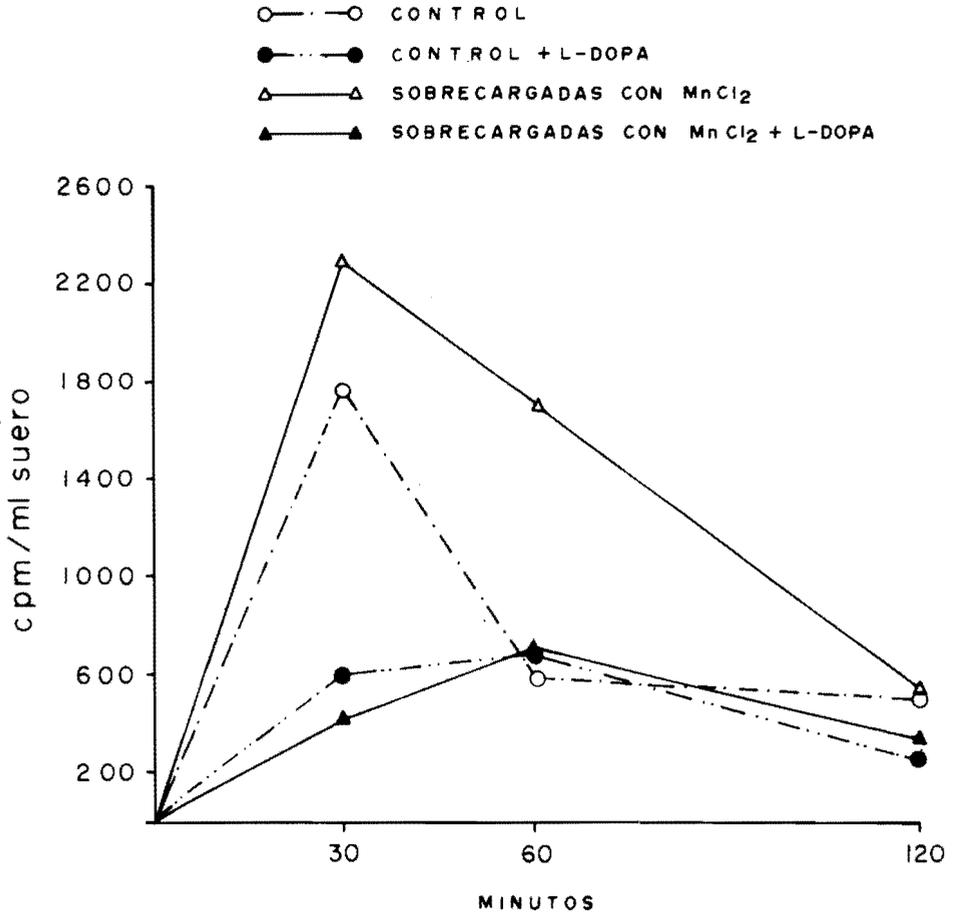


Fig. 7.

Retención sérica del Mn^{54} después de la administración de L-Dopa.

7.- Captación de Mn^{54} por homogeneizados de hígado.

7.1.- Efecto del tiempo de incubación en la captación de Mn^{54} .

La reacción fue muy rápida en los primeros segundos, a juzgar por la incorporación encontrada un minuto después de haber iniciado la incubación. La captación del Mn^{54} fue lineal durante los primeros 20 minutos de incubación. El agregado de $MnCl_2$ (10 mM y 20 mM), al medio de incubación, provocó un descenso en la incorporación aunque no cambió su linealidad. Para los ensayos posteriores se utilizó un tiempo de incubación de 10 minutos (Fig 8).

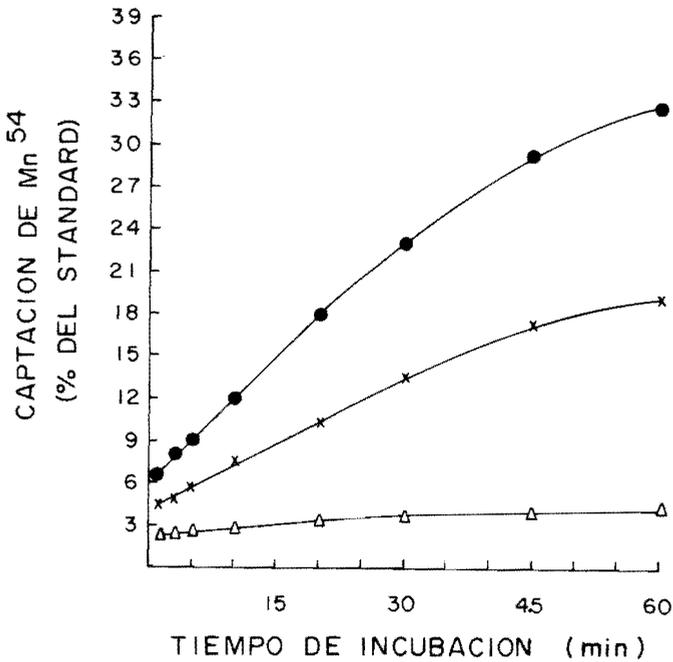


Fig. 8.

Efecto del tiempo de incubación en la captación de Mn^{54} por homogeneizados de hígado de ratón. Los homogeneizados (2.19 mg de proteína) se incubaron a $37^{\circ}C$ con: buffer tris-HCl (50 mM, pH 7.4), $Mn^{54}Cl_2$ (0.02 uC) y los siguientes compuestos: $MnCl_2$, 10 mM (X), $MnCl_2$, 20 mM (Δ) y un control, sin $MnCl_2$ (●). Los tiempos de incubación se señalan en la figura.

7.2.- Efecto de la temperatura.

La incorporación máxima se obtuvo a los 45°C, descendió rápidamente al aumentar la temperatura, y a los 70°C la captación fue similar a la obtenida a 10°C. La energía de activación de esta captación, calculada por la ecuación de Arrhenius, fue de 16700 cal/mol (Fig 9).

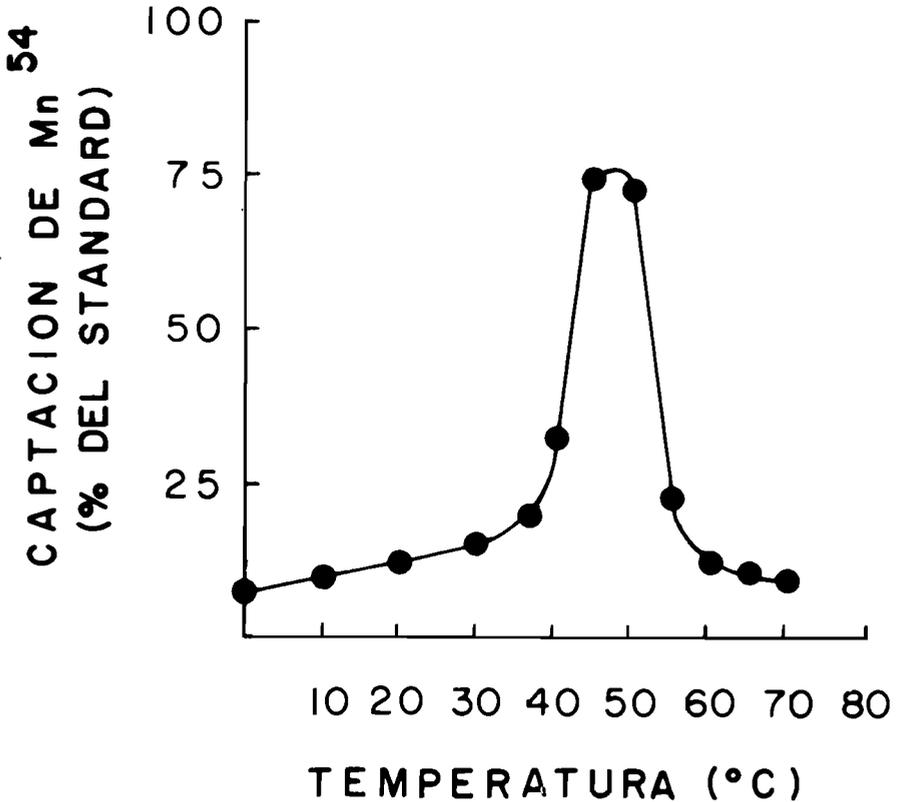


Fig. 9.

Efecto de la temperatura en la captación de Mn^{54} . Los homogeneizados de hígado de ratón (2.19 mg de proteína) se incubaron durante 10 min a diferentes temperaturas, en presencia de buffer tris-HCl (50 mM, pH 7.4) y 0,02 μ C de $Mn^{54}Cl_2$.

7.3.- Efecto del pH.

La captación del manganeso se midió a diferentes valores de pH, desde 4 hasta 10. La figura 10 señala que la máxima incorporación se produce a pH 9.5, usando buffer Tris-HCl 0.05M (rango de pH: 7-10). Con el buffer acetato 0.2M (rango de pH: 4-6) y con el buffer fosfato 0.2M (rango de pH: 5-7) las máximas captaciones fueron 4 y 5.6 veces menores, respectivamente, que el pH óptimo logrado con el buffer Tris-HCl.

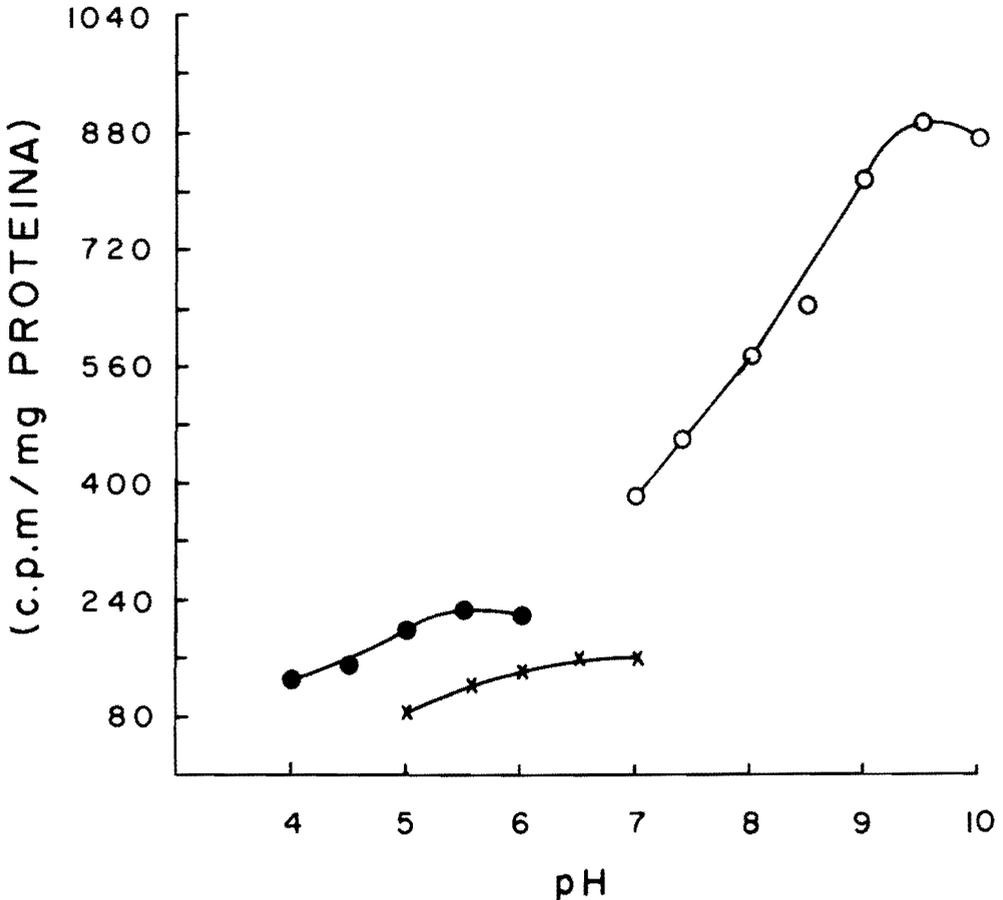


Fig. 10.

Efecto de pH en la captación de Mn^{54} por homogeneizados de hígado de ratón. Los homogeneizados (2.00 mg de proteína) se incubaron a 37° C durante 10 min. con 0.02 μ C de $Mn^{54}Cl_2$ en un volumen final de 1.0 ml que contenía buffer Acetato de Sodio 200 mM (●) buffer Fosfato, 200 mM (X) o buffer Tris-HCl, 50 mM (O), a los valores de pH indicados.

7.4.- Efecto de la concentración de proteína.

La captación de Mn^{54} aumentó en función de la cantidad de proteína agregada al medio, hasta los 7 mg. La adición de $MnCl_2$ (0.01 mM) ocasionó un descenso significativo de la captación de Mn^{54} (Fig 11).

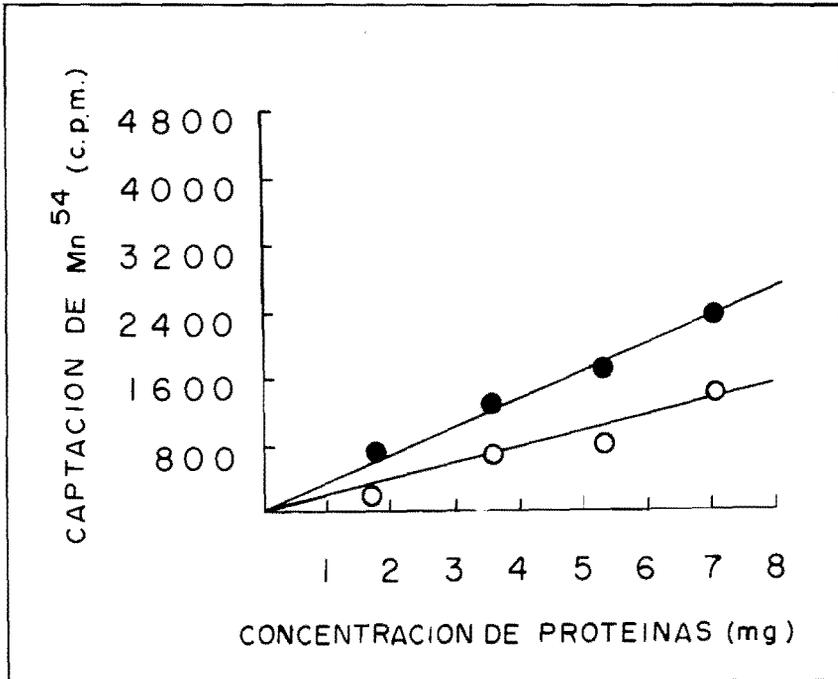


Fig. 11.

Efecto de la concentración de proteína en la captación de Mn^{54} , por homogeneizados de hígado de ratón. La incubación se realizó a $37^{\circ}C$ durante 10 min. en un volumen final de 1.0 ml, que contenía: a) buffer tris-HCl (50mM pH 7,4); b) $Mn^{54}Cl_2$ (0.02 μC , 16.000 cpm.); y los siguientes compuestos: $MnCl_2$, 0.01 mM (○) y un control sin $MnCl_2$, (●). Las concentraciones de proteínas se señalan en la figura.

7.5.- Dependencia de la captación del Mn^{54} , del $MnCl_2$ agregado al medio de incubación.

La adición de $MnCl_2$ al medio de incubación, en concentraciones de 1.00 μM hasta 10 μM , descendió la captación del Mn^{54} desde el 18% hasta el 7% del standard (Fig 12).

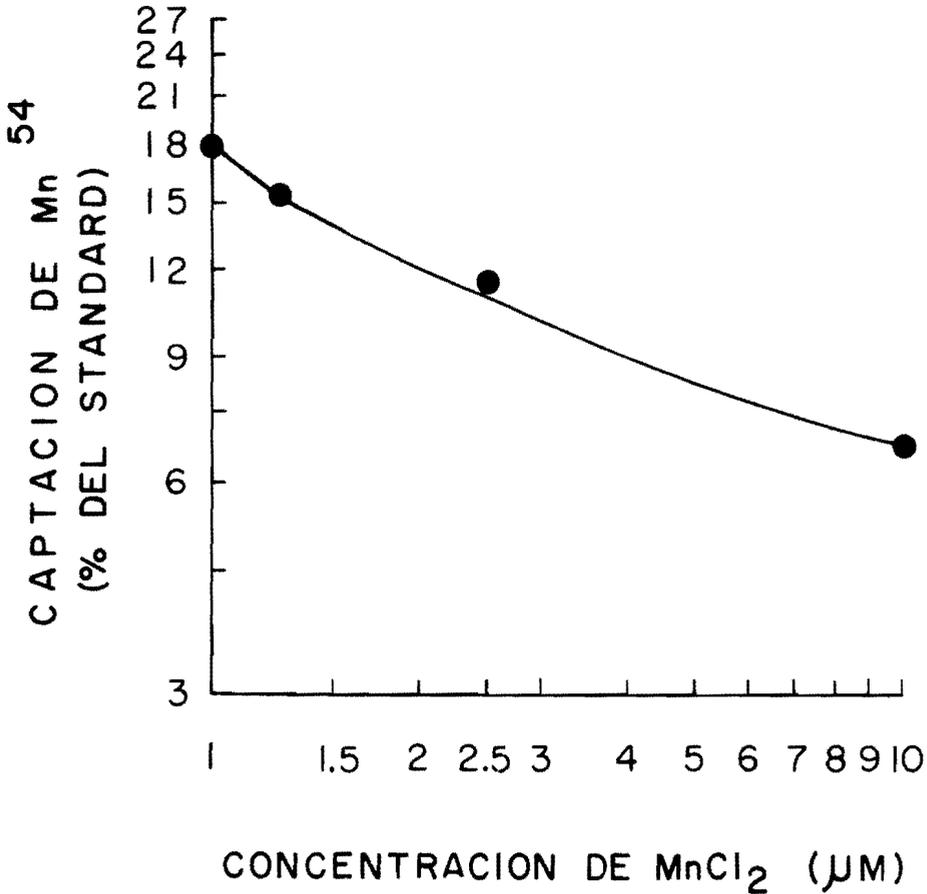


Fig. 12.

Representación semilogarítmica de la captación de Mn^{54} por homogeneizados de hígado de ratón, en presencia de diferentes concentraciones de $MnCl_2$. Los homogeneizados (2.35 mg de proteína) se incubaron por 10 min. a 37°C en 1.0 ml del siguiente medio de ensayo: buffer tris-HCl (50 mM, pH 7.4), $Mn^{54}Cl_2$ (0.02 μC , 16000 cpm) y las concentraciones de $MnCl_2$ indicadas en la figura.

7.6.— Efecto de los cationes en la captación del Mn^{54} .

Varios cationes pueden influenciar la captación del Mn^{54} (Tabla 16). De los 14 ensayados, los siguientes aumentaron la captación: Sn^{2+} (1 y 10 mM), Ca^{2+} (0.1 y 1 mM), Ba^{2+} (0.1, 1, 10 y 100 mM), Mg^{2+} (1 y 10 mM) y Fe^{3+} (0.1 y 1 mM). A la concentración de 1 mM la efectividad de estos cationes decreció en el siguiente orden de $Fe^{3+} > Ba^{2+} > Mg^{2+} > Sn^{2+} \geq Ca^{2+}$.

TABLA 16
EFECTO DE DIFERENTES CATIONES EN LA CAPTACION
DE Mn^{54} POR HOMOGENEIZADOS DE HIGADO^a

CATION	PORCENTAJE DEL CONTROL (MEDIA \pm D.S.)				
	0.01mM	0.1mM	1mM	10 mM	100 mM
$CaCl_2$	-	109 \pm 19	115 \pm 18	115 \pm 9	90 \pm 6
$NaCl$	-	104 \pm 11	110 \pm 12	98 \pm 3	92 \pm 11
KCl	-	107 \pm 5	112 \pm 15	115 \pm 21	98 \pm 20
$LiCl$	106 \pm 6	96 \pm 9	90 \pm 4	96 \pm 13	-
NH_4Cl	-	98 \pm 9	105 \pm 4	111 \pm 4	-
$CuCl$	111 \pm 4	102 \pm 3	96 \pm 4	-	-
$BaCl_2$	-	170 \pm 50 ^b	241 \pm 56 ^c	306 \pm 57 ^{ch}	296 \pm 82 ^c
$SnCl_2$	106 \pm 19	113 \pm 10	128 \pm 11 ^{ch}	141 \pm 4 ^d	-
$HgCl_2$	95 \pm 5	88 \pm 12	96 \pm 4	-	-
$CoCl_2$	-	138 \pm 32 ^b	126 \pm 15 ^c	66 \pm 13 ^c	19 \pm 2 ^d
$CuCl_2$	115 \pm 23	115 \pm 15	94 \pm 17	-	-
$ZnCl_2$	-	82 \pm 2 ^b	49 \pm 3 ^{ch}	15 \pm 1 ^d	6 \pm 3 ^d
$MgCl_2$	-	120 \pm 24	197 \pm 8 ^d	197 \pm 13 ^d	105 \pm 19
$FeCl_3$	-	148 \pm 28 ^b	266 \pm 45 ^{ch}	6 \pm 1 ^d	7 \pm 0 ^d

Tabla 16.

a) Los homogeneizados de hígado de ratón (2.37 mg de proteína) se incubaron a 37°C durante 10 min. en presencia de buffer tris-HCl. (50 mM, pH 7.4) $Mn^{54}Cl_2$ (0.02 μ C, 16000 cpm.) y los cationes indicados. Los valores representan las medias \pm D.S. de 4 experimentos realizados por triplicado.

- b Diferente de control, $p < 0.05$
- c Diferente del control, $p < 0.02$
- ch Diferente del control, $p < 0.01$
- d Diferente del control, $p < 0.001$

Por el contrario, se observó inhibición marcada con los siguientes cationes: Ca^{2+} (10 y 100 mM), Fe^{3+} (10 y 100 mM), Zn^{2+} (0.1, 1, 10 y 100 mM).

Los cationes Na^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+ , Cu^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} y Cs^{2+} no modificaron la captación del Mn^{54} . El agregado de ZnCl_2 (10 mM), después de la incubación del homogeneizado, no desplazó el Mn^{54} incorporado durante la incubación.

7.7.— Efecto del Fe^{3+} (1.0 mM) en la captación de Mn^{54} , con diferentes concentraciones de MnCl_2 en el medio de incubación.

En estas condiciones, cualesquiera que sean las concentraciones del MnCl_2 agregado (desde 1-20 μM), el incremento en la captación de Mn^{54} , producido por el Fe^{3+} , se mantuvo en los alrededores del 267%. Es decir, tanto en ausencia, como en presencia del Fe^{3+} , el descenso en la captación de Mn^{54} , producido por el agregado de MnCl_2 al medio de incubación (Tabla 17), permanece constante.

TABLA 17
EFECTO DEL FeCl_3 EN LA CAPTACION DE Mn^{54} POR
HOMOGENEIZADOS DE HIGADO, EN PRESENCIA DE
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MnCl_2 EN EL
MEDIO DE INCUBACION^a

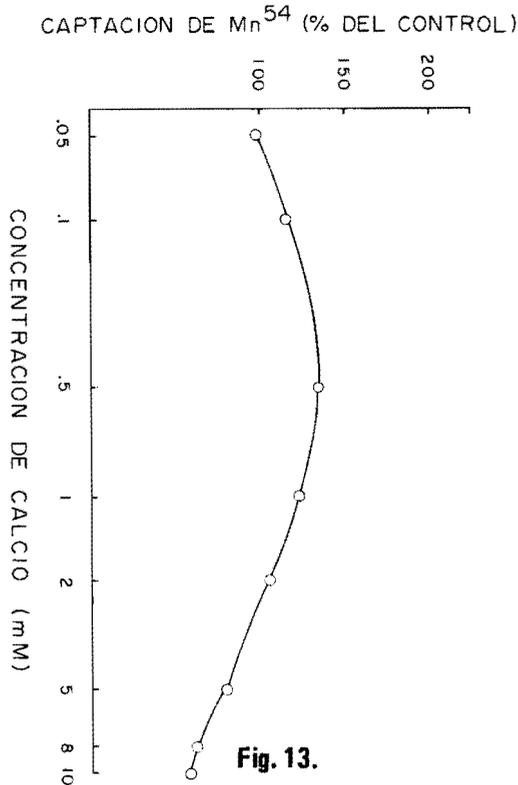
MnCl_2 AGREGADO (μM)	CAPTACION DE Mn^{54} (c.p.m.)		INCREMENTO (%)
	$[\text{Fe}^{3+}] = 0$	$[\text{Fe}^{3+}] = 1.0 \text{ mM}$	
0.0	2064 ± 188	5425 ± 253	263
1.0	2031 ± 127	5235 ± 307	258
2.5	1847 ± 194	4785 ± 392	259
5.0	1715 ± 133	4728 ± 335	276
10.0	1640 ± 16	4629 ± 110	282
20.0	1603 ± 82	4220 ± 81	263

Tabla 17.

^a Los homogeneizados de hígado de ratón (1.97 mg de proteína) se incubaron a 37°C, durante 10 min, en presencia de buffer tris HCl (50 mM, pH 7.4) y $\text{Mn}^{54}\text{Cl}_2$ (0.02 μC , 16000 cpm). El cloruro de manganeso y el cloruro férrico se agregaron a las concentraciones indicadas. Los valores representan las medias ± D.S. de 4 experimentos realizados por triplicado.

7.8.— Efecto de CaCl_2 en la captación del Mn^{54} .

Un estudio más detallado del efecto del calcio, reveló que éste, en concentraciones de 0.1 a 2.0 mM, produce un incremento en la captación de Mn^{54} . La concentración óptima fue de 0.5 mM, la cual produce una activación de 133%. Cantidades de calcio, superiores a 2.0 mM, disminuyeron la captación (Fig 13).



Efecto del CaCl_2 en la captación de Mn^{54} , por homogeneizados de hígado. Los homogeneizados (2.41 mg de proteína) se incubaron por 10 min. a 37°C en 1.0 ml del siguiente medio: buffer tris-HCl (50 mM, pH 7.4), $\text{Mn}^{54}\text{Cl}_2$ (0.02 μC , 16000 cpm.) y diferentes concentraciones de CaCl_2 .

7.9.) Aumento de la captación del Mn^{54} producida por FeCl_3 .

Como se observa en la Fig 14 la activación máxima (375%) se obtuvo al agregar 2.5 mM FeCl_3 . Con 10 mM de FeCl_3 se produjo una fuerte inhibición (6% de los valores controles).

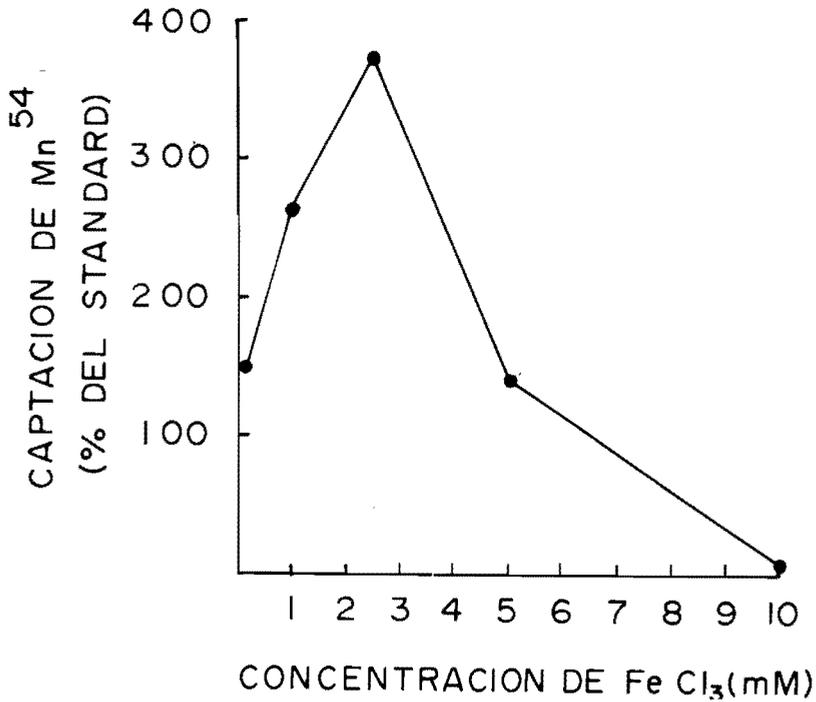


Fig. 14.

Efecto de FeCl₃ en la captación de Mn⁵⁴, por homogenizados de hígado. Los homogeneizados (2.35 mg proteína) se incubaron por 10 min. a 37° C en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.4), con 0.02 uC de Mn⁵⁴Cl₂ (16000 cpm) y las concentraciones de FeCl₃ indicadas en la figura.

DISCUSION

1.- Papel de las glándulas submaxilares en el metabolismo del Mn⁵⁴.

Diez y nueve días después de la administración del Mn⁵⁴, la radioactividad es relativamente mayor en las glándulas submaxilares que en el hígado, cuando la expresamos con relación al peso del tejido. Estos resultados pudieran interpretarse en base a 2 posibilidades: a) Las glándulas son órganos que retienen el metal; b) Las glándulas se comportan como órganos de excreción y de retención del elemento. Los resultados

mostrados en la tabla 12 apoyan la primera posibilidad; mientras que en el hígado se observa una caída progresiva en su contenido de Mn^{54} , las glándulas submaxilares retienen concentraciones mas o menos invariables, por mayores períodos de tiempo. Por otro lado, la figura 3 parece indicar que las glándulas no son órganos excretores o que la excreción no es lo suficientemente elevada como para revelarse, cuando se mide la retención corporal del isótopo. Los resultados señalados en la tabla 13 sugieren que si las glándulas submaxilares fueran órganos de excreción del manganeso, ellas no aumentan su tasa de eliminación, cuando se bloquea la principal ruta excretora, puesto que tanto en las glándulas submaxilares de los animales controles como en la de las ratas con colédoco ligado, la retención de Mn^{54} fue similar.

La presencia del manganeso en las mitocondrias, y su importancia en la fosforilación oxidativa, ha sido reportada previamente (91, 100). La ubicuidad observada en la distribución del metal, en los organelos intracelulares, puede explicarse en base al gran número de enzimas que requieren manganeso para su activación.

En resumen, las glándulas submaxilares retienen el manganeso por períodos mayores que el hígado y no parecen ejercer ningún papel importante en su excreción.

2.— L-Dopa e intoxicación crónica con manganeso.

Los hallazgos señalados en la tabla 15 muestran un descenso en la concentración de Dopamina y de Acido Homovanílico, en el cerebro de las ratas que recibieron una elevada dosis de manganeso, durante siete meses. Neff y col (115) y Mustafa y Chandra (111) encontraron también un descenso de Dopamina en monos y conejos, respectivamente, pero no estudiaron las concentraciones del Acido Homovanílico. La reducción de este último, parece eliminar la posibilidad de que haya un incremento en el recambio de la Dopamina. Por otra parte, la enzima Decarboxilasa de L-Dopa no parece afectarse, puesto que la administración de L-Dopa es seguida, en cada caso, con un incremento en el contenido cerebral de Dopamina, el cual es mas acentuado en las ratas sobrecargadas con manganeso; pareciera que en estos últimos animales existiera una menor concentración de L-Dopa disponible para la actividad de la Decarboxilasa. Además, tanto los animales controles como los sobrecargados con manganeso, al inyectarse con L-Dopa aumentan, a un mismo nivel, sus concentraciones de Dopamina y de Acido Homovanílico, lo que apoya el concepto de que el manganeso no está afectando a las enzimas Decarboxilasa de L-Dopa, Monoaminoxidasa y Catecoloximetiltransferasa. Por lo tanto, si nuestros resultados son debidos a un bloqueo enzimático, éste

debe encontrarse a nivel de la Hidroxilasa de la Tirosina, la cual actúa como limitante de la tasa de síntesis de las catecolaminas (112, 166). De hecho, tal bloqueo enzimático produciría un descenso en la síntesis de L-Dopa y de su disponibilidad para la descarboxilación. Se ha demostrado que aún en casos graves de emaciación, por hambre, las concentraciones de Tirosina no disminuyen más allá de los niveles de saturación de la Hidroxilasa de la Tirosina (166). En consecuencia, el bajo contenido de Dopamina cerebral, encontrado en los animales sobrecargados con manganeso, probablemente no es debido a un descenso en la concentración de Tirosina.

Se sabe que los iones ferrosos se requieren como cofactores para la actividad de la Hidroxilasa de la Tirosina, en el Núcleo Caudado Bovino, y el Km para el hierro es de 4×10^{-4} M. Los iones manganeso, por el contrario, no son necesarios para la actividad de esa enzima, como lo sugieren los estudios in vitro (113). Trabajos previos han demostrado que, en ratas alimentadas con altas dosis de manganeso, se produce un descenso acentuado en la concentración del hierro hepático (51), hasta alcanzar valores de 17 ug/g de tejido. Estas concentraciones son inferiores al Km de la enzima del Núcleo Caudado. Si resultados similares se produjeran en el hierro cerebral, de los animales sobrecargados con manganeso, es posible que sus niveles desciendan por debajo del Km de la Hidroxilasa de la Tirosina, produciendo una disminución de su actividad, lo cual se traduciría en un descenso en la producción de Dopamina.

En el presente trabajo, las anomalías bioquímicas e histopatológicas se hicieron aparentes antes de que se evidenciaran manifestaciones clínicas, atribuibles al exceso de manganeso ingerido en la dieta. Si nos fuera lícito extrapolar estos resultados al hombre, pudieran conducir a la realización de estudios bioquímicos (por ejemplo, en suero) para detectar cualquier anomalía bioquímica antes de que aparezca la sintomatología típica del manganesismo crónico.

3.— L-Dopa e incorporación tisular de Mn^{54} .

Los resultados concuerdan con los reportados por Papavasiliou y col (124) en el hígado de ratas normales. Sin embargo, el incremento en la captación de Mn^{54} , después de la administración de L-Dopa, parece ser un fenómeno que ocurre en otros órganos, por ejemplo en cerebro. La baja radioactividad encontrada en el suero, después de la inyección de L-Dopa, muy probablemente indica un incremento en la captación del Mn^{54} , por los tejidos. Las ratas sobrecargadas con manganeso también aumentan la incorporación hepática y cerebral de Mn^{54} , después de la inyección de L-Dopa. Papavasiliou y col (124) han sugerido que este efecto es mediado

por una activación de la enzima Adenilato Ciclasa. Si ese es el mecanismo de producción, la Adenilato Ciclasa parece afectarse en los animales sobrecargados con manganeso. A pesar de que el hígado de estos últimos, incrementa la captación de Mn^{54} , después de la inyección de L-Dopa, este aumento es mucho menor que en animales normales no inyectados con la amina, lo que sugeriría una inhibición de la Adenilato Ciclasa debida al acúmulo del manganeso. Hemos demostrado, en estos estudios, que la sobrecarga de manganeso no afecta la captación de Mn^{54} por parte de las glándulas submaxilares. La L-Dopa parece incrementar la captación del isótopo, aunque no a un nivel de significación estadística.

En el cerebro, la tasa de incorporación de Mn^{54} , después de la inyección de L-Dopa, fue similar en las ratas normales y en las sobrecargadas, lo que posiblemente se debe a una menor sobrecarga cerebral con el metal, a pesar de los 7 meses de exceso del manganeso dietario. Esta menor sobrecarga ha sido reportada en monos (102) en quienes la inyección intraperitoneal de Cloruro de Manganeso, durante 10-20 meses, causó un incremento en la concentración del manganeso hepático, hasta niveles 40 veces mayores que los normales, en tanto que en el cerebro los aumentos fueron 5 a 7 veces mayores que en los controles. Esos hallazgos, y nuestros resultados, corroboran la presunción de que la penetración del manganeso al cerebro está sometida a las restricciones impuestas por la barrera hematoencefálica. Además, la Adenilato Ciclasa cerebral tiene una actividad, 22 veces mayor que la del hígado y su concentración en unidades por 100 g de peso húmedo es 8 veces mayor que la de ese órgano (159). En virtud de estas observaciones, es posible que a pesar de que aumente el contenido cerebral del manganeso, la concentración alcanzada pudiera no ser suficiente para inhibir toda la enzima presente. En todo caso, la comprobación definitiva vendría dada por el análisis de esta enzima, en animales sobrecargados con manganeso.

El incremento en la captación tisular de Mn^{54} , producido por la L-Dopa, pudiera explicarse también en base a la formación de quelatos entre L-Dopa y el metal. Se ha demostrado que varios aminoácidos se unen al manganeso, y estudios previos sugieren la posibilidad de la formación de tal tipo de unión entre el manganeso y la L-Dopa (38). El menor incremento en la captación de Mn^{54} , producida por L-Dopa en los animales sobrecargados, se explicaría en base a que en ellos hay un aumento en las disponibilidades de Mn^{55} para formar quelatos con L-Dopa, lo que dejaría libre una menor cantidad de esta última para unirse con el Mn^{54} . En nuestro laboratorio hemos reunido evidencias de esta posibilidad, mediante estudios *in vitro* (Bonilla E y Martínez H, resultados inéditos).

Parece ser que la mayor parte de la L-Dopa, administrada en forma aguda, se transforma en Dopamina en los tejidos extracerebrales, y a nivel del endotelio de los capilares cerebrales (50). Puesto que la Dopamina no cruza la barrera hematoencefálica (14), el incremento en la captación de Mn^{54} , producido por L-Dopa, pudiera ocurrir a nivel del endotelio capilar. La respuesta a este problema puede hallarse en estudios autoradiográficos, de la distribución del trazador, después de la inyección de L-Dopa.

4.— Captación de Mn^{54} por homogeneizados de hígado.

Nuestros resultados indican, que son varios los factores que pueden influenciar la captación del Mn^{54} , in vitro.

Cuando la temperatura se eleva de 10 a 45°C la incorporación del isótopo incrementa 7.5 veces. Más allá de los 50°C se produce una caída rápida de la captación, coincidiendo con la desnaturalización térmica de las proteínas. Esta conducta es compatible con un proceso activo, a causa de su dependencia de la temperatura, lo que la diferencia de la captación pasiva. Una dependencia similar ha sido demostrada para la acumulación del metal en mitocondrias (90). En contraste, la incorporación del manganeso a la mucosa intestinal de rata, parece ser un proceso de difusión simple, independiente de la temperatura (62). Una difusión pasiva es responsable de la captación del Mn^{54} por eritrocitos humanos (171).

A pH fisiológico y a concentraciones de Mn^{2+} en exceso de 5×10^{-4} M, las soluciones oxigenadas de manganeso producen un precipitado, probablemente un hidróxido (171). La centrifugación de soluciones de sales de manganeso a altas velocidades (11×10^4 g), pH 7.2, también sedimenta al metal. Nuestras condiciones experimentales descartan estas 2 posibilidades de precipitación del manganeso ya que, el isótopo usado era libre de transportador y, por otro lado, se disolvía en el buffer tris inmediatamente antes de la incubación. Además, como ya hemos señalado oportunamente, la incubación del Mn^{54} en buffer, en ausencia del homogeneizado no se acompaña de radioactividad en el fondo del tubo, después de la centrifugación final.

Los protones parecen actuar como inhibidores de la captación del manganeso, la cual disminuyó grandemente con títulos bajos de pH. Los fosfolípidos zwitteriónicos (Fosfatidilcolina, Fosfatidiletanolamina y Esfingomiolina), los cuales representan la mayor parte de los lípidos polares de las membranas celulares, tienen una carga neta negativa a altos pH, lo que los hace capaces de unirse a los iones manganeso.

La captación de Mn^{54} es sensible al agregado de diferentes cationes al medio de incubación. El manganeso y el calcio son acumulados por las mitocondrias, en un proceso dependiente de energía (45). Por otro lado, las mediciones con azul de bromotimol y con resonancia electrónica paramagnética han demostrado que pequeñas cantidades de Ca^{2+} facilitan la captación de Mn^{2+} (41). En nuestros estudios, también observamos una interacción cooperativa entre el manganeso y el calcio. Sin embargo, concentraciones de calcio mayores de 2 mM ocasionaron una inhibición marcada de la captación del Mn^{54} . No nos es posible postular ninguna explicación de este efecto, en virtud del gran número de diferentes sitios de unión que pudieran estar presentes en el homogeneizado de hígado. Los estudios de Reynafarje y Lehninger (137) han demostrado que el número de sitios mitocondriales capaces de unir el Ca^{2+} y el Mn^{2+} , es más o menos el mismo, y consideran que es muy probable que ambos iones se unan a los mismos sitios. Así que, por lo menos en las mitocondrias, las altas concentraciones de calcio inhiben competitivamente la captación de Mn^{54} .

Como lo hemos señalado previamente, numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el manganeso y el magnesio son intercambiables (91, 110). En los eritrocitos humanos, el magnesio no compite con el manganeso, a bajas concentraciones, pero a concentraciones entre 8 y 60 mM, el Mg^{2+} reduce la incorporación del Mn^{2+} (171). En contraste, la captación de Mn^{54} , por los homogeneizados de hígados, se incrementa en presencia de Mg^{2+} , en concentraciones entre 1 y 10 mM.

Los estudios del manganismo crónico humano han demostrado que si un individuo es anémico, y se expone a polvos de manganeso, la concentración tisular de este último aumenta notablemente. De hecho, los ex-mineros enfermos de manganismo, presentan una absorción intestinal de hierro, mayor que los sanos, posiblemente debido a que padecen de una deficiencia de hierro (105). Nuestros experimentos, *in vitro*, evidencian que bajas concentraciones de Fe^{3+} (< 5 mM), agregado a los homogeneizados, aumentan la captación del Mn^{54} , mientras que altas concentraciones de Fe^{3+} , la disminuyen. Todos estos factores y el hallazgo de una co-excreción de hierro en los mineros (105) nos permiten recomendar la administración profiláctica de sales ferrosas, en cantidades apropiadas, a los individuos expuestos a polvos de manganeso, con el objeto de disminuir la absorción del metal y su captación tisular, así como evitar el desarrollo de anemias por deficiencia de hierro.

El zinc, en virtud de su mayor capacidad de unión, inhibe la captación de Mn^{54} , pero no lo desplaza de sus sitios de fijación, puesto que el agregado de Zn^{2+} , después de la incubación del homogeneizado con Mn^{54} , no afectó la unión del isótopo radioactivo. A diferencia de esta disminución en la captación de Mn^{54} producida por el Zn^{2+} , Brierley (21)

ha demostrado que el Zn^{2+} incrementa la acumulación del Mg^{2+} , en mitocondrias aisladas.

Los iones de bario favorecieron la captación del Mn^{2+} a todas las concentraciones examinadas, en tanto que ninguno de los cationes monovalentes (Na^+ , K^+ , Li^+ , Cu^+ , Cs^+ y NH_4^+) afectaron dicha captación. Esta falta de competencia sugiere la existencia de diferentes sitios de unión para el Mn^{54} y los iones monovalentes, o que el manganeso tiene una mayor afinidad por esos sitios que los otros iones.

En resumen, los estudios *in vitro* apoyan las siguientes conclusiones: a) Los homogeneizados de hígado de ratón son capaces de fijar manganeso; b) La captación de este metal es un proceso dependiente de temperatura, e inhibido por protones; c) La captación de Mn^{54} puede ser influenciada por varios cationes y algunos de ellos ejercen diferentes tipos de influencia; d) La unión del manganeso no es afectada por los cationes monovalentes.

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su profunda gratitud a la Dra. María Diez-Ewald, sin cuya colaboración no habría sido posible la ejecución de la mayor parte de estos trabajos, y al Dr. Américo Negrette por su constante entusiasmo y estímulo. Agradece también al personal Secretarial del Instituto de Investigación Clínica, especialmente a la Srta. Yudis Castellano y a la Sra. Marina de López, y a los técnicos José Omar Dávila, Mario Salazar e Iris de Quiroz por su dedicación y empeño en realizar una buena labor. A los señores Eduardo Añez y Alonso Quintero por su asistencia técnica en la elaboración de las tomas fotográficas, y al señor Aurelio Bohórquez por su trabajo artístico. Finalmente al Br. Humberto Martínez, por su excelente colaboración.

In vivo e in vitro studies of manganese metabolism. Experimental chronic manganese poisoning and catecholamines.

Bonilla E (Instituto de Investigación Clínica, Apartado 1151, Maracaibo, Venezuela). *Invest Clin* 15: (2) 2-79, 1974.— 1. Rat submaxillary glands incorporated Mn^{54} injected intraperitoneally and their radioactivity in liver decreased to insignificant levels under similar conditions. The glands did not seem to excrete manganese in significant amount since, after blockage of the main excretory route, there was no difference between the Mn^{54} content in control rats and the rats with bile duct ligated. In rats overloaded with stable manganese, the Mn^{54} incorporation by submaxillary glands did not differ from the normal animals. Our results seem to indicate that the metal reaches the gland and is bound to membranous structures, specially the mitochondrial and the microsomal fractions forming metal-protein or metal-phospholipid complexes.

2. Rats chronically treated with high oral load of $MnCl_2$ showed decreased brain concentration of Dopamine and Homovanillic Acid. A return to normal values was observed after L-Dopa injections. This suggests a disturbance in catecholamine metabolism in chronic manganese poisoning possibly at the level of L-Tyrosine Hydroxylase.

3. ^{54}Mn incorporation by tissues was studied in 23 rats fed with excess manganese diet and 31 fed a normal diet. The effect of intraperitoneally administered L-Dopa (100 mg/kg) on randomly selected rats in each group was determined. Manganese uptake in liver was higher in normally fed rats that received L-Dopa; however, the manganese-loaded rats showed a lower level of ^{54}Mn incorporation than those on a normal diet. No difference in ^{54}Mn incorporation was found in submaxillary glands from any of the groups studied. In brain tissue, two hours after injection of L-Dopa the ^{54}Mn radioactivity was the same in normal and manganese-loaded animals and significantly higher than in rats not given the amine. The reverse effect was found in serum from L-Dopa treated rats which showed lower radioactivity than the controls, suggesting an increased passage of the tracer to the tissues. The different response of tissues from manganese-loaded rats could mean that the enzyme Adenyl cyclase may be affected by the excess of manganese or that L-Dopa chelated manganese. Our in vitro studies support the last possibility.

4. Liver homogenates have been found to bind Mn^{54} in an active, temperature-dependent, and proton inhibited process. This uptake is activated by several cations whose effectiveness decreased in the order $Fe^{3+} > Ba^{2+} > Mg^{2+} > Sn^{2+} \geq Ca^{2+}$. On the contrary, Zn^{2+} was highly inhibitory. Higher concentrations of Ca^{2+} and Fe^{3+} ($10 \times 10^{-3} M$ and $100 \times 10^{-3} M$) also decreased the manganese binding. None of the monovalent cations assayed (Na^+ , K^+ , Li^+ , Cu^+ , Ca^+ and NH_4^+) affected the Mn^{54} uptake meaning that the anionic sites of binding are different for manganese and those monovalent cations or that the latter have a lower binding affinity than Mn^{2+} for the same sites.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ABD EL NABY S, KAYED KS, AREF MA: EEG induced fast activity in Chronic manganese poisoning. *Acta Neurol Scand* 40: 259-268, 1964.
- 2— ABD EL NABY S, HASSANEIN M: Neuropsychiatric manifestations of chronic manganese poisoning. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 28: 282-288, 1965.

- 3- AJEMIAN RS, WHITMAN NE: Determination of Manganese in Urine by Atomic Absorption Spectrometry. *Amer Ind Hyg Assoc J* 30: 52-56, 1969.
- 4- AIKAWA JK, GORDON GS, RHOADES BL: Magnesium metabolism in human beings: studies with Mg^{28} . *J Appl Physiol* 15: 503-507, 1960.
- 5- ALBERT A, REES CW: Activity of the tetracyclines for the cations of the metals. *Nature (London)* 177: 433-434, 1956.
- 6- ANDEN NE, ROOS BF, WERDINIUS B: On the occurrence of homovanillic acid in brain and cerebrospinal fluid and its determinations by a fluorometric method. *Life Sci* 2: 448-458, 1963.
- 7- ANONG NILUBOL ML, CHAYAWATANANGKUR K, KRITA-LUGSANA S: Manganese toxication in the human body determined by activation analysis. *J Nucl Med* 9: 178-180, 1967.
- 8- ASLING CW, HURLEY LS, WOOTEN E: Abnormal development of the otic labyrinth in young rats following maternal dietary manganese deficiency. *Anat Rec* 136: 157, 1960.
- 9- ASLING CW, HURLEY LS: The influence of trace elements on the skeleton. *Clin Orthopaed* 27: 213-264, 1963.
- 10- BAADER EW: Manganvergiftungen in Elementefabriken. *Arch Gewerbepath Gewerbehyg* 4: 101-116, 1932.
- 11- BANCROFT H: *Introducción a la Bioestadística*. Buenos Aires, Editorial Universitaria, 1960, p 205.
- 12- BARAK AJ, BECKENHAUER HC, KERRIGAN FJ: Zinc and manganese levels in serum and liver after alcohol feeding and development of fatty cirrhosis in rats. *Gut* 8: 454-457, 1967.
- 13- BARBEAU A, MURPHY G, SOURKES TL: Excretion of dopamine in diseases of basal ganglia. *Science* 133: 1706-1707, 1961.
- 14- BERTLER A, FALCK B, ROSENGREN E: The direct demonstration of a barrier mechanism in the brain capillaries. *Acta Pharmacol* 20: 317-321, 1963.
- 15- BLOOM W, FAWCETT DW: *A textbook of Histology*. Philadelphia, WB Saunders, 1968, p 100.
- 16- BOGAERT L VAN, DALLEMAGNE MJ: Approches experimentales des troubles nerveux du manganisme. *Mshr Psychiat Neurol* 111: 60, 1945.

- 17-BOND GC: *Catalysis by Metals*. New York, Academic Press, 1962.
- 18-BOND JS: Effect of manganese and aminoacids on proteolytic inactivation of beef liver arginase. *Biochim Biophys Acta* 327: 157-165, 1973.
- 19-BORG DC, COTZIAS GC: Incorporation of manganese into erythrocytes as evidence for a manganese porphyrin in man. *Nature* (London) 182: 1677-1678, 1958.
- 20-BOWEN HJM: The determination of manganese in biological material by activation analysis with a note on the gamma spectrum of blood. *J Nucl Energy* 3: 18, 1956.
- 21-BRIERLEY GP: Ion transport by heart mitochondria. VII Activation of the energy-linked accumulation of Mg^{2+} by Zn^{2+} and other cations. *J Biol Chem* 242: 1115-1122, 1967.
- 22-BRITTON AA, COTZIAS GC: Dependence of manganese turnover on intake. *Am J Physiol* 211: 203-206, 1966.
- 23-BRUCE ROWE W, RONZIO RA, WELLNER UP, MEISTER A: Glutamine synthetase (sheep brain), section VIII in *Methods in Enzymology*, Vol XVII (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1970, p 205.
- 24-UCHER T: Enolase from Brewer's Yeast, Section II in *Methods in Enzymology*, Vol I (Colowick SP, Kaplan NO ed) New York, Academic Press, 1955, p 427.
- 25-BURNETT WT, BIGELOW RR, KIMBALL AW, SHEPPARD CW: Radiomanganese studies on the mouse, rat and pancreatic fistula dog. *Am J Physiol* 168: 620-625, 1952.
- 26-BUTT EM, NUSBAUM RE, GILMOUR TC, DIDIO SL, MARIANO S: Trace metals levels in human serum and blood. *Archs Envir Hlth* 8: 52-57, 1964.
- 27-CANAVAN MM, COBB S, DRINKER CK: Chronic manganese poisoning. Report of a case, with autopsy. *Arch Neurol Psychiat* (Chicago) 32: 501-512, 1934.
- 28-COMENS P: Manganese depletion as an etiological factor in hydralazine disease. *Am J Med* 20: 944, 1956.
- 29-COTZIAS GC, GREENOUGH JJ: The high specificity of the manganese pathway through the body. *J Clin Inv* 37: 1298-1305, 1958.

- 30- COTZIAS GC: Metabolic Relations of Manganese to other minerals. *Fed Proc* 19: 655-658, 1960.
- 31- COTZIAS GC: Manganese versus magnesium; why are they so similar in vitro and so different in vivo? . *Fed Proc* 20: 98-103, 1961.
- 32- COTZIAS GC, PAPAVALIIOU PS, MILLER ST: Manganese in melanin. *Nature (London)* 201:1228-1229, 1964.
- 33- COTZIAS GC, PAPAVALIIOU PS: Primordial homeostasis in a mammal as shown by the control of manganese. *Nature (London)* 201: 828-829, 1964.
- 34- COTZIAS GC, MILLER ST, EDWARDS J: Neutron activation analysis; the stability of manganese concentrations in human blood and serum. *J Lab Clin Med* 67: 836-849, 1966.
- 35- COTZIAS GC, HORIUCHI K, FUENZALIDAS S, MENA I: Chronic Manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology* 18: 376-382, 1968.
- 36- COTZIAS GC, PAPAVALIIOU PS, HUGHES E, TANG L, BORG DC: Slow turnover of manganese in active rheumatoid arthritis accelerated by prednisone. *J Clin Invest* 47: 992-1001, 1968.
- 37- COTZIAS GC, PAPAVALIIOU PS, GINOS J, STECK A, DUBYS: Metabolic modification of Parkinson's disease and of chronic manganese poisoning. *Ann Rev Med* 22: 305-326, 1971.
- 38- COTZIAS GC, TANG LC, MILLER ST, SLADIC-SIMIC D, HURLEY LS: A mutation influencing the transportation of manganese, L-Dopa and L-Tryptophan. *Science* 176: 410-412, 1972.
- 39- COUPER J: On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs. *Brit Ann Med Pharm* 1: 41-42, 1837.
- 40- CURZON G: Brain amine metabolism in some neurological and psychiatric disorders, chapter V in *Biochemicals Aspects of Nervous Diseases* (Cummings JN, ed) London, Plenum Press, 1972.
- 41- CHANCE B, MELA L: Calcium and manganese interactions in mitochondrial ion accumulation. *Biochemistry* 5: 3220-3223, 1966.
- 42- CHANCE B, MELA L: Hydrogen Ion Concentration Changes in Mitochondrial Membranes. *J Biol Chem* 241: 4588-4599, 1966.
- 43- CHANDRA SV, SRIVASTAVA SP: Experimental production of early brain lesion in rats by parenteral administration of manganese

- chloride. *Acta Pharmacol et Toxicol* 28: 177-183, 1970.
- 44- CHANG CC: A sensitive method for spectrophotofluorometric assay of Catecholamines. *Intern J Neuropharmacol* 3: 643-649, 1964.
- 45- CHAPPELL JB, COHN M, GREVILLE GP: *Energy-linked functions of mitochondria* (Chance B, ed) New York, Academic Press, 1963, p 219.
- 46- CHEMISTRY: *An Experimental Science*, chapter 22 (Pimentel GC, ed) San Francisco, WH Freeman and Company, 1966.
- 47- CHOLAK J, HUBBARD DM: Determination of Manganese in Air and Biological Material. *Amer Ind Hyg Assoc J* 21: 356-360, 1960.
- 48- DASTUR DK, MANGHANI DK, RAGHAVENDRAN KV, JEEJEEBHOY KN: Distribution and fate of Mn^{54} in the rat, with special reference to the C.N.S. *Q JIExp Physiol* 54: 322-331, 1969.
- 49- DASTUR DK, MANGHANI DK, RAGHAVENDRAN KV: Distribution and fate of Mn^{54} in the monkey: studies of different parts of the C.N.S. and other organs. *J Clin Inv* 50: 9-20, 1971.
- 50- DE LA TORRE JC, MULLAN S: Experimental evaluation of L-Dopa penetration in brain. *Trans Amer Neurol Assoc* 96: 227-229, 1972.
- 51- DIEZ-EWALD M, WEINTRAUB LR, CROSBY WH: Interrelationship of Iron and Manganese Metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med* 129: 448-451, 1968.
- 52- DONALDSON J, St PIERRE T, MINNICHIL JL, BARBEAU A: Determination of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} in rat brain regions. *Can J Biochem* 51: 87-92, 1973.
- 53- DRUCE JGF: *Rhenium, Dvi-Manganese, the Element of Atomic Number 75*. Cambridge, The University Press, 1948.
- 54- EDSALL DL, WILBUR FP, DRINKER CK: The occurrence, course and prevention of chronic manganese poisoning. *J Ind Hyg* 1: 183-193, 1919.
- 55- EHRINGER H, HORNYKIEWICZ O: Verteilung von Noradrenalin und dopamin (3-hydroxytyramin) im Gehirn des Meuschen und ihr Verhalteu bei Erkrankungen des extrapyramidalen system. *Klin Wochschr* 38: 1236-1239, 1960.
- 56- ELLIS GH, SMITH SE, GATES EM: Further studies of manganese deficiency in the rabbit. *J Nutr* 34: 21-31, 1947.

- 57-ERWAY L, HURLEY LS, FRASER A: Neurological defect: manganese in phenocopy and prevention of a genetic abnormality of inner ear. *Science* 152: 1766-1768, 1966.
- 58-EVANS RJ, RHIAM M, DRAPER CI (Citados por Cotzias GC): *Fed Proc* 19: 655-658, 1960.
- 59-EVERSON GJ, SHRADER RE: Abnormal glucose tolerance in manganese deficient guinea pigs. *J Nutr* 94: 89-94, 1968.
- 60-FONNESU A, DAVIES RE: The prevention of swelling of liver mitochondria in vitro. *Biochem J* 64: 769, 1956.
- 61-FORADORI AC, BERTINCHAMPS A, GULIBON JM, COTZIAS GC: The Discrimination between magnesium and manganese by serum proteins. *J Gen Physiol* 50: 2255-2266, 1967.
- 62-FORADORI A, FERNANDEZ B: Incorporación de manganeso a la mucosa intestinal de rata. *Rev Med Chile* 100: 158-163, 1972.
- 63-FORE H, MORTON RA: Manganese in bone. *Biochem J* 51: 598-599, 1952.
- 64-FUENZALIDA S, MENA I: Intoxicación crónica por manganeso y sus relaciones con las enfermedades del sistema extrapiramidal. *Rev Med Chile* 95: 667-674, 1967.
- 65-FURST A: Chelation and cancer, a speculative review: metal binding in medicine. Proceedings of a Symposium sponsored by Hahnemann Medical College and Hospital. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1960 pp 336-344.
- 66-GATES EM, ELLIS GH: A microcolorimetric method for the determination of manganese in biological materials with 4,4-tetra-methyldiaminotriphenylmethane. *J Biol Chem* 168: 537, 1947.
- 67-GOFMAN JW, DE LALLA O, KOVICH EL, LOWE O, MARTIN W, PILUSO DL, TANDY RK, UPHAM F: Chemical elements of the blood of man. *Archs Envir Hlth* 8: 105-109, 1964.
- 68-GREENBERG DM, COPP DH, CUTHBERTSON EM: Studies in mineral metabolism with the aid of artificial radioactive isotopes. VII. Th distribution and excretion, particularly by way of the bile, of iron, cobalt, and manganese. *J Bio Chem* 147: 749-756, 1942.
- 69-GREENBERG DM: *The Enzymes*. New York, Academic Press, 1951, p 893.
- 70-GREGOLIN C, RYDER E, LANE MD: Liver Acetyl Coenzyme A

Carboxylase I. Isolation and Catalytic properties. *J Biol Chem* 243: 4227-4235, 1968.

- 71—HANNA WJ, GRANT CL (Citados por Schroeder HA y col): *J Chron Dis* 19: 545-571, 1966.
- 72—HAVEN MC, HAVEN GT, DUNN AL: Simultaneous determination of calcium, copper, manganese, and magnesium by neutron activation analysis. *Anal Chem* 38: 141-143, 1966.
- 73—HERS HG: Fructokinase (Ketohehexokinase), section II in *Methods in Enzymology*, vol I (Colowick SP, KAPLAN NO, ed) New York, Academic Press, 1955, p 286.
- 74—HORNYKIEWICZ O: Neurochemistry of Parkinsonism, chapter 19 in *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha A, ed) 1972.
- 75—HUGHES ER, COTZIAS GC: Adrenocorticosteroid hormones and manganese metabolism. *Am J Physiol* 201: 1061-1064, 1961.
- 76—HUGHES ER, MILLER ST, COTZIAS GC: Tissue Concentrations of manganese and adrenal function. *Am J Physiol* 211: 207-210, 1966.
- 77—HURLEY LS, ASLING CW: Localized epiphyseal dysplasia in offspring of manganese-deficient rats. *Anat Record* 145: 25-37, 1963.
- 78—HURLEY LS: Approaches to the study of nutrition in mammalian development. *Fed Proc* 27: 193-198, 1968.
- 79—HURLEY LS, GOWAN J, MILHAUD G: Calcium metabolism in manganese-deficient and zinc-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 130: 856-860, 1969.
- 80—HURLEY LS, THERIAULT LL, DREOSTI IE: Liver mitochondria from manganese deficient and palid mice: Function and Ultrastructure. *Science* 170: 1316-1318, 1970.
- 81—HUTCHINSON E: *Chemistry: The Elements and their reactions*. Philadelphia, WB Saunders, 1959, p 687.
- 82—JAKSCH R: Ueber manganotoxikosen und manganophobie. *Munch Med Wschr* 54: 969-972, 1907.
- 83—JANES JM, McCALL JT, ELVEBACK LR: Trace metals in human osteogenic sarcoma. *Mayo Clin Proc* 47: 476-478, 1972.
- 84—KEEFER RC, BARAK AJ, BOYETT JD: Binding of manganese and transferrin in rat serum. *Biochim Biophys Acta* 221:390-393, 1970.

- 85- KENDALL J: *Química General*. México, Editora Nacional, 1956, p 704.
- 86- LAKIN HW, THOMPSON CE, DAVIDSON DF: Tellurium content of marine manganese oxides and other manganese oxides. *Science* 142: 1568, 1963.
- 87- LANE MD, CHANG HC, MILLER RS: Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from Pig liver mitochondria, section II in *Methods in Enzymology*, Vol XIII (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1969, p 270.
- 88- LEACH RM, MUENSTER AM: Studies on the role of manganese in bone formation. I. Effect upon the mucopolysaccharide content of Chick bone. *J Nutr* 78: 51-56, 1962.
- 89- LEACH RM: Role of manganese in mucopolysaccharide metabolism. *Fed Proc* 30: 991-994, 1971.
- 90- LEHNINGER AL, CARAFOLI E, ROSSI CS: Energy-linked ion movements in mitochondrial systems. *Advan Enzymol* 29: 259-320, 1967.
- 91- LINDBERG O, ERNSTER L: Manganese, a cofactor of oxidative phosphorylation. *Nature (London)* 173: 1038-1039, 1954.
- 92- LIVINGSTON DM, WACKER EC: Trace metal methods for nutritional studies. *Am J Clin Nutr* 24: 1082-1085, 1971.
- 93- LOUNAMAA J (Citado por Schroeder HA y col) *J Chron Dis* 19: 545-571, 1966.
- 94- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
- 95- MAGASANIK B, KAMINSKAS E, KIMHI Y: N-formimino-L-glutamate formiminohydrolase (*Bacillus subtilis*), section I in *Methods in Enzymology*, Vol XVII (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1971, p 57.
- 96- MAHONEY JP, SMALL WJ: Studies on manganese. III. The biological half-life of radiomanganese in man and factors which affect this half-life. *J Clin Inv* 47: 643-653, 1968.
- 97- MAHONEY J, SARGENT K, GRELAND M, SMALL W: Studies on manganese. I. Determination in serum by atomic absorption spectrophotometry. *Clin Chem* 15: 312-322, 1969.

- 98—MARSHALL M, COHEN PP: A kinetic study of the mechanism of crystalline carbamate kinase. *J Biol Chem* 241: 4197-4208, 1966.
- 99—MATRONE G, HARTMAN RH, CLAWSON AJ: Manganese-Iron Antagonism. *Citado en Nutrition Rev* 17: 349-350, 1959.
- 100—MAYNARD LS, COTZIAS GC: The partition of manganese among organs and intracellular organelles of the rat. *J Biol Chem* 214: 489-495, 1955.
- 101—McNALLY WD: Industrial manganese poisoning with a review of the literature. *Industr Med* 4: 581-599, 1935.
- 102—MELLA H: The experimental production of basal ganglion symptomatology in *Macacus rhesus*. *Arch Neurol Psychiat* 11: 405-417, 1924.
- 103—MENA I, MARIN O, FUENZALIDA S, COTZIAS GC: Chronic manganese poisoning; clinical picture and manganese turnover. *Neurology (Minneapolis)* 17: 128-136, 1967.
- 104—MENA I, VASQUEZ A, HORIUCHI K, COTZIAS GC: Absorción intestinal del manganeso, factor de susceptibilidad de manganimismo crónico. *Rev Biol Med Nucl* 1: 27-33, 1969.
- 105—MENA I, HORIUCHI K, BURKE K, COTZIAS GC: Chronic manganese poisoning. Individual susceptibility and absorption of iron. *Neurology* 19: 1000-1006, 1969.
- 106—MENA I, COURT J, FUENZALIDA S, PAPAVALIIOU PS, COTZIAS GC: Modification of chronic manganese poisoning. Treatment with L-Dopa or 5-OH-Tryptophane. *New Eng J Med* 282: 5-10, 1970.
- 107—MENA I, LOPEZ G, HORIUCHI K, ARANDA L: La Barrera hematoencefálica y los oligoelementos; manganeso. *Rev Med Chile* 100: 171-174, 1972.
- 108—MERO JL: Mineral resources of the sea. *Trans N.Y. Acad Sci* 26: 525, 1964.
- 109—MICHAELSON A, SAUERHOFF MW: The effect of chronically ingested inorganic lead on brain levels of Fe, Zn, Cu, and Mn of 25 day old rat. *Life Sci* 13: 417-428, 1973.
- 110—MOHAMED MS, GREENBERG DM: Liver Arginase. I. Preparation of extracts of high potency, chemical properties, activation, inhibition and pH activity. *Arch Biochem* 8: 349, 1945.

- 111-MUSTAFA SJ, CHANDRA SV: Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine, and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J Neurochem* 18: 931-933, 1971.
- 112-NAGATSU T, LEVITT M, UDEFRIEND S: Tyrosine hydroxylase. The Initial step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 2910-2917, 1964.
- 113-NAGATSU T, SUDO Y, NAGATSU I: Tyrosine Hydroxylase in Bovine Caudate Nucleus. *J Neurochem* 18: 2179-2189, 1971.
- 114-NAJIB M: Manganese as an industrial poisoning. *J Egypt Publ Health Ass* 10: 1-20, 1936.
- 115-NEFF NH, BARRETT RE, COSTA E: Selective depletion of Caudate Nucleus Dopamine and Serotonin during Chronic manganese dioxide administration to squirrel Monkeys. *Experientia* 25: 1140-1141, 1969.
- 116-NORRIS GR, KLEIN JR: Incorporation of manganese into duck erythrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 106: 288-291, 1961.
- 117-NORTH BB, LEICHSENRING JM, NORRIS LM: Manganese metabolism in College women. *J Nutr* 72: 217, 1960.
- 118-OCHOA S: Isocitric Dehydrogenase system (TPN) from pig heart, section IV in *Methods in Enzymology*, Vol I (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1955, p 699.
- 119-OCHOA S: Malic Enzyme from pigeon liver and wheat germ, section IV in *Methods in Enzymology*, Vol I (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1955, p 739.
- 120-PAKKENBERG H, BRODY H: The number of nerve cells in the substantia nigra in paralysis agitans. *Acta Neuropath (Berlin)* 5: 320-324, 1965.
- 121-PANIC B: In vitro binding of manganese to serum transferrin in cattle. *Acta Vet Scand* 8: 228-233, 1967.
- 122-PAPAVASILIOU PS, COTZIAS GC: Neutron activation analysis; the determination of manganese. *J Biol Chem* 236: 2365-2369, 1961.
- 123-PAPAVASILIOU PS, MILLER ST, COTZIAS GC: Role of liver in regulating distribution and excretion of manganese. *Amer J Physiol* 211: 211-216, 1966.
- 124-PAPAVASILIOU PS, MILLER ST, COTZIAS GC: Functional Interactions between Biogenic Amines, 3',5'-cyclic AMP and man-

ganese. *Nature* 220: 74-75, 1968.

- 125- PASSIOMA JB, LEEPER GW: Soil Composition and manganese deficiency. *Nature* (London) 200: 29, 1963.
- 126- PAULING L: *Química General*. Madrid, Aguilar S.A, 1951, p 185.
- 127- PAULING L: *Uniones Químicas*. Buenos Aires, Editorial Kaelusz, 1960, p 429.
- 128- PENTSCHEW A, EBNER FF, KOVATCH RM: Experimental manganese encephalopathy in monkeys. *J Neuropath Exp Neurol* 22: 488-499, 1963.
- 129- PEÑALVER R: Manganese poisoning. *Ind Med* 24: 1, 1955.
- 130- PEÑALVER R: Diagnosis and treatment of manganese intoxication. *Arch Ind Health* 16: 64-66, 1957.
- 131- PERRY HM, PERRY EF: Normal concentration of some trace metals in human urine: Changes produced by ethylenediaminetetraacetate. *J Clin Inv* 38: 1452, 1959.
- 132- POLLACK S, GEORGE JN, REBA RC, KAUFMAN RM, CROSBY WH: The absorption of nonferrous metals in iron deficiency. *J Clin Invest* 44: 1470-1473, 1965.
- 133- PONTREMOLI S: Fructosa-1,6-diphosphatase. I. Rabbit liver (crystalline), section VII in *Methods in Enzymology*, Vol IX (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1966, p 625.
- 134- POPJAK G, GOSSELIN L, YOUHOTSKY GORE I, DE WAARD A, BUCHER NLR, HORNING M: Studies in biosynthesis of squalene and cholesterol from mevalonic acid, in *Biochemistry of Lipids* (Popjak G, ed) New York, Pergamon Press, 1960, p 163.
- 135- POTTER LT, AXELROD J: Subcellular localization of catecholamines in tissues of the rat. *J Pharmac Exp Therap* 142: 291-298, 1963.
- 136- RAVEL JM, NORTON SJ, HUMPHREYS JS, SHIVE W. Asparagine biosynthesis in *Lactobacillus arabinosus* and its control by asparagine through enzyme inhibition and repression. *J Biol Chem* 237: 2845-2849, 1962.
- 137- REYNAFARJE B, LEHNINGER AL: High affinity and low affinity binding of Ca^{2+} by rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 244: 584-593, 1969.

- 138—ROBISON GA, SCHMIDT MJ, SUTHERLAND EW: On the development and properties of the brain Adenyl Cyclase System, in *Role of Cyclic AMP in cell function* (Greengard P, Costa E, ed) New York, Raven Press, 1970, p 11.
- 139—RODIER J: Manganese poisoning in Moroccan miners. *Brit J Industr Med* 12: 23, 1955.
- 140—ROSEN OM, GOREN EN, ERLICHMAN J, ROSEN SM: Synthesis and degradation of cyclic 3'5'-adenosine monophosphate in frog erythrocytes, in *Role of Cyclic AMP in cell function* (Greengard P, Costa E, ed) New York, Raven Press, 1970, p 31.
- 141—ROSSMANN R, CALLENDER E: Manganese nodules in lake Michigan. *Science* 162: 1123-1124, 1968.
- 142—ROUTH JI, EYMAN DP, BURTON DJ: *Essentials of General, Organic and Biochemistry*. Philadelphia, WB SAUNDERS, 1969, p 272.
- 143—RUBENSTEIN AH, LEVIN NW, ELLIOT GA: Hypoglycaemia induced by manganese. *Nature (Lond)* 194: 188-189, 1962.
- 144—RUDRA MN: Manganese hunger in animals. *Nature (London)* 153: 111-112, 1944.
- 145—SANDSTEAD HH, BURK RF, BOOTHGH, DARBY WJ: Current concepts on trace minerals. *Clinical Considerations. Med Clin N A* 54: 1509-1531, 1970.
- 146—SAX NI, GABAY JJ: Occurrence of Mn^{54} in human and bovine livers. *Health Physics* 11: 585-586, 1965.
- 147—SCANDER A, SALLAM HA: A report on eleven cases of chronic manganese poisoning. *J Egypt Med Ass* 19: 57-62, 1936.
- 148—SCRUTTON MC, OLMSTED MR, UTTER MF: Pyruvate carboxylase from chicken liver, section II in *Methods in Enzymology*, Vol XIII (Coloxick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1969, p 235.
- 149—SCHADE SG, FELSHER BF, GLADER BE, CONRAD ME: Effect of cobalt on iron absorption. *Proc Soc Exptl Biol Med* 134: 741-743, 1970.
- 150—SCHLOCKOW: Ueber eine eigenartiges Ruckenmarks leiden der Zinkhutenarbeiter. *Dtsch Med Wschr* 5: 208-210, 1879.

- 151-SCHROEDER HA, BALASSA JJ, TIPTON IH: Essential trace metals in man: manganese. A study in homeostasis. *J Chron Dis* 19: 545-571, 1966.
- 152-SHEMIN D: Delta-aminolevulinic acid dehydratase, section II in *Methods en Enzymology*, Vol XVII (Colowick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1970, p 205.
- 153-SHRADER RE, EVERSON GJ: Pancreatic pathology in manganese-deficient guinea pigs. *J Nutr* 94: 269-281, 1968.
- 154-SIENKO MJ, PLANE RA, HESTER RE: *Inorganic Chemistry*. Part II. New York, WA Benjamin, 1965. p 33.
- 155-SMITH SE, ELLIS GH: Studies on the manganese requirements of rabbits. *J Nutr* 34: 33-38, 1947.
- 156-SPANO PF, NEFF NH: Procedure for simultaneous determinations of dopamine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in brain. *Anal Biochem* 42: 113-118, 1971.
- 157-SPARKMAN TC, MORELAND FB: Serum manganese in myocardial Infarction. *Proc Soc Exp Biol Med* 116: 778-781, 1964.
- 158-SUKONDHABHANT S, SINGCHUWONG L: Chronic manganese intoxication vs L-Dopa. *Excerpta Medica* 296: 237, 1973.
- 159-SUTHERLAND EW, RALL TW, MENON T. Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties. *J Biol Chem* 237: 1220-1227, 1962.
- 160-THIERS RE: Contamination in trace element analysis and its control, in *Methods of Biochemical Analysis*, Vol V (Glick D, ed) New York Interscience Publisher, 1957, p 273.
- 161-THIERS RE, VALLEE BL: Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem* 226: 911-920, 1957.
- 162-THOMPSON ABR, OLATUNBOSUN D, VALBERG LS: Interrelation of intestinal transport system for manganese and iron. *J Lab Clin Med* 78: 642-655, 1971.
- 163-THOMPSON ABR, SHAVER C, LEE DJ, JONES BL, VALBERG LS: Effect of varying iron stores on site of intestinal absorption of cobalt and iron. *Amer J Physiol* 220: 674-678, 1971.
- 164-THOMPSON ABR, VALBERG LS: Intestinal uptake of iron, cobalt, and manganese in the iron-deficient rat. *Amer J Physiol* 223:

1327-1329, 1972.

- 165- TIMM JA: *Química General*. New York, Mc Graw Hill, 1968, p 610.
- 166- UDEFRIEND S: Tyrosine Hydroxylase. *Pharmac Rev* 18: 43-51, 1966.
- 167- UNDERWOOD EJ: *Trace elements in Human and Animal Nutrition*. New York, Academic Press, 1962.
- 168- VAGELOS PR, LARRABEE AR: Acyl Carrier Protein Hydrolase, section I, in *Methods in Enzymology*, Vol XIV (Colwick SP, Kaplan NO, ed) New York, Academic Press, 1969, p 81.
- 169- VALLEE BL: Zinc and metalloenzymes Vol X in *Advances in Protein Chemistry* (Anfinsen CB, Anson ML, Bailey K, Edsall JT, ed) New York, Academic Press, 1955, p 317.
- 170- VINOGRADOV AP (Citado por Schroeder HA y col): *J Chron Dis* 19: 545-571, 1966.
- 171- WEED RI, ROTHSTEIN A: The uptake of divalent manganese ion by mature normal human red blood cells. *J Gen Physiol* 44: 301-314, 1960.
- 172- WHITLOCK CM, AMUSO SJ, BITTENBENDER JB: Chronic neurological disease in two manganese steel workers. *Am Indust Hyg As J* 27: 454-459, 1966.
- 173- WILGUS HS, NORRIS LS, HEUSER GF: The role of certain inorganic elements in the cause and prevention of perosis. *Science* 84: 252, 1936.
- 174- WITZLEBEN CL, PITLICK P, BERGMAYER J, BENOIT R: Acute manganese overload. A New experimental model of intrahepatic cholestasis. *Am J Path* 53: 409-423, 1968.
- 175- WONG PY, FRITZE K: Determination by neutron activation of copper, manganese, and zinc in the Pineal Body and other areas of Brain tissue. *J Neurochem* 16: 1231-1234, 1969.
- 176- ZETTERSTROM R, ERNSTER L: Bilirubin an uncoupler of oxidative phosphorylation in isolated mitochondria. *Nature (London)* 178: 1335-1337, 1956.