

Intoxicación crónica con Manganeso: Cuantificación autorradiográfica de los receptores colinérgicos muscarínicos en el cerebro de ratón.

Georgina Cano^{*}, Ernesto Bonilla^{*}, Fidel Castro^{*},
Mario Alburges^{**}, James K. Wamsley^{**}

^{*}Departamento de Neurobiología, INBIOMED-FUNDACITE. Apartado 376, Maracaibo 4001-A. Venezuela, ^{**}Neuropsychiatric Research Institute. 700 1st Avenue S., Fargo, North Dakota (U.S.A.).

Palabras claves: manganeso, receptores muscarínicos, quinuclidinil benzilato.

Resumen. El tratamiento crónico con cloruro de manganeso (5mg Mn/kg/día), durante 9 semanas, no afectó la unión del radioligando [³H]-quinuclidinil benzilato a los receptores colinérgicos muscarínicos en el cerebro de ratón. Mediante técnicas autorradiográficas se determinó la localización anatómica precisa de los receptores y se procedió a la cuantificación de los mismos en los cortes coronales del bulbo olfatorio y del cerebro medio. A la luz de los resultados obtenidos podemos concluir que, en nuestras condiciones experimentales, no se producen alteraciones en la densidad de los receptores colinérgicos muscarínicos en el cerebro de ratones intoxicados con manganeso.

Recibido: 21-04-92. Aceptado: 28-07-92.

INTRODUCCION

La exposición crónica a cantidades excesivas de manganeso causa trastornos neurológicos severos e irreversibles en algunos individuos expuestos (27). Este fenómeno ha generado un considerable interés porque puede aportar

información sobre los mecanismos subyacentes en enfermedades tanto neurológicas como neuropsiquiátricas (12), ya que en el hombre induce ambos efectos: síndrome extrapiramidal y alteración del comportamiento de tipo esquizofrénico (27).

Varios autores consideran que la administración crónica de manganeso produce síntomas similares a la enfermedad de Parkinson, y por tanto es un buen modelo para su estudio (2, 12, 14, 18, 23, 24, 29). Sin embargo, Barbeau (1) sostiene que el manganismo es, en realidad, una mezcla de bradicinesia extrapiramidal y síndrome distónico. Por otra parte, Donaldson (13) considera que la intoxicación aguda es clínicamente distinta a los efectos crónicos del metal, siendo los síntomas extrapiramidales de la intoxicación crónica similares a la enfermedad de Parkinson.

Las investigaciones clínicas y los estudios experimentales sugieren que existe una disfunción en el Sistema Nervioso Central, debida a alteraciones en los sistemas neurotransmisores (29), y un daño neuronal selectivo (31). Pero hasta ahora no ha sido posible localizar la lesión química inicial, responsable de las alteraciones patológicas en el manganismo crónico (30).

Una reducción significativa del contenido de dopamina en el estriado es la alteración bioquímica más frecuente (2, 3, 13-15, 24, 29). También se han observado cambios en el metabolismo de otros neurotransmisores, tales como norepinefrina, serotonina y GABA (4, 5, 13, 29, 31). Desde el punto de vista morfológico, algunos autores han reportado una reducción de la neuromelanina (2, 11, 13) y degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (4, 11, 13, 15), sugiriendo que este mecanismo podría ser el causante de la depleción de dopamina en la vía nigroestriatal (1, 13). Muchos autores han señalado destrucción

celular en los principales componentes del estriado, tales como el globo pálido, núcleo caudado y putamen (1, 2, 4, 12, 13, 18).

El estriado contiene los niveles endógenos más elevados de acetilcolina y dopamina (12) y la interacción entre los sistemas dopaminérgico y colinérgico es esencial para el correcto funcionamiento del sistema extrapiramidal (5, 23, 26). Existen evidencias de que los axones dopaminérgicos nigroestriatales establecen sinapsis inhibitorias, a través de receptores D2 (9, 10, 22), con las interneuronas colinérgicas estriatales; esto podría constituir el sustrato anatómico de la modulación dopaminérgica de la actividad motora extrapiramidal a nivel estriatal (10, 19, 25).

El estudio de los receptores muscarínicos podría ser útil para detectar anomalías en las neuronas colinérgicas y en las estructuras nerviosas colinoceptivas. La afinidad y el número de estos receptores se modifica en función de la disponibilidad de acetilcolina en la sinapsis y los cambios en la concentración de ésta pueden ser debidos a alteraciones en su síntesis o recaptura, o bien por destrucción de las neuronas que la liberan (29).

Varios investigadores han reportado el efecto del tratamiento crónico con manganeso en los receptores colinérgicos muscarínicos, utilizando un potente antagonista marcado radiactivamente. Los resultados de las investigaciones difieren; algunos autores señalan disminución en la unión del radioligando a los receptores (29), aumento (12) o ningún cambio (2, 23). En todos estos estudios se utilizaron homogeneiza-

dos de cerebro (36) para determinar la afinidad del ligando por los receptores (K_d) y el número máximo de éstos (B_{max}). La controversia en los resultados podría ser debida a que estas técnicas no son suficientemente sensibles para detectar pequeños cambios focalizados en determinadas estructuras cerebrales.

Por lo tanto, en el presente trabajo, se usaron técnicas autorradiográficas para determinar la localización topográfica precisa de los receptores colinérgicos muscarínicos y su densidad en distintas regiones de cerebros de ratones intoxicados con manganeso.

MATERIAL Y METODOS

El radioligando utilizado, el L-[Benzilic-4,4'- 3H]-quinuclidinil benzilato ($[^3H]$ -QNB) con una actividad específica de 44.9 Ci/mmol, fue suministrado por New England Nuclear-Du Pont, Boston, MA. Este ligando tiene una alta especificidad y persistencia en la acción, características óptimas para el marcaje de receptores, aunque no diferencie subtipos (36). Los estándares de tritio (3H -Microscales) y la película (3H -Hyperfilm) fueron suministrados por Amersham Corp., Arlington Heights, IL. El sulfato de atropina, usado como desplazador, fue proporcionado por Sigma Chemical Co., St Louis, MO, y como tampón de incubación se utilizó el PBS (fosfato sódico potásico, 0,05M, pH= 7,4).

Se utilizaron ratones albinos machos, con un peso de 35 a 40g, alimentados *ad libitum* con Ratarina y agua destilada, y mantenidos a 24°C con un fotoperiodo de 12 horas.

Los animales se dividieron en dos grupos: uno tratado, al cual se le inyectó una solución de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5 mg Mn/kg/día), y un grupo control inoculado con solución salina (0,9% NaCl). Ambos grupos fueron inyectados diariamente, durante 9 semanas (5 días por semana), con 0,1 ml de la solución correspondiente por vía intraperitoneal.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante perfusión cardíaca con 0.1% de formaldehído en PBS a 4°C. Los cerebros fueron extraídos rápidamente y congelados en O.C.T. Compound (Lab-Tek Products, Naperville, IL) con acetona y hielo seco; se guardaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Se obtuvieron secciones coronales seriadas, de 15 μ m de grosor, a -18°C (Microtomo Kryomat 1320, Leitz), correspondientes al bulbo olfatorio y cerebro medio. Los cortes se montaron sobre portaobjetos tratados con gelatina y $CrK(SO_4)_2$.

Los parámetros óptimos de incubación (33,34) y la metodología (7, 20, 34) se tomaron de la literatura existente, teniéndose en consideración los valores de la K_d obtenidos en estudios previos realizados en nuestro laboratorio. Las secciones, correspondientes a 10 cerebros de animales intoxicados y 6 controles, se preincubaron en PBS para eliminar el neurotransmisor endógeno unido a los receptores. Estos se marcaron mediante incubación en $[^3H]$ -QNB 1nM (valor aproximado de la K_d), durante dos horas a temperatura ambiente; en estas condiciones el $[^3H]$ -QNB se une al 80% de los receptores muscarínicos existentes. Para-

lamente, la unión no específica se definió en presencia de atropina (1 μ M), ya que a esta concentración desplaza completamente al [3 H]-QNB. Ambos grupos de láminas se sometieron a dos aclarados de 5 minutos en tampón frío para retirar el exceso de ligando; se secaron con aire seco y frío (pasado por acetona, hielo seco y Drierite) y se guardaron a 4°C durante una noche.

Las secciones marcadas y los estándares radiactivos se coexpusieron en un casete de rayos X junto con la película sensible al tritio. El tiempo de exposición fue de 7 días, 4°C, tras los cuales se revelaron las películas (D-19 Developer, Eastman Kodak), se fijaron y se secaron.

La densidad óptica de las imágenes autorradiográficas fue analizada y cuantificada con un microdensitómetro computarizado (MCID imaging processing system, Imaging Research, St. Catharine's, Ont., Canadá). Las correlaciones anatómicas de las distintas áreas se determinaron utilizando el atlas de Paxinos y Watson (láminas 1-5 y 13-17) (28).

Para cada animal, se tomaron un mínimo de 20 lecturas por área analizada y se calcularon los valores medios. La cantidad de radiactividad se determinó mediante un análisis de regresión polinomial generado por el computador, que compara las densidades de la película, producidas por el tejido, con los valores de los estándares radiactivos. Todos los datos presentados en este trabajo se obtuvieron a partir de los autorradiogramas, y se utilizó la prueba t de Student con el fin de comparar los valores obtenidos en los dos grupos de animales.

RESULTADOS

El [3 H]-QNB es un potente antagonista muscarínico central (36) ya que, en general, los valores de unión específica obtenidos fueron elevados. Hay que destacar que la unión no específica o residual fue muy baja (7-15 fmol/mg de tejido) y prácticamente indistinguible del fondo, de forma que la unión total y la específica se corresponden en las imágenes.

En la Tabla I se presentan los resultados correspondientes a la densidad de los receptores en las distintas áreas estudiadas. Casi todos los valores obtenidos lucen ligeramente superiores en los animales intoxicados, pero el tratamiento estadístico indica que las diferencias no son significativas.

La localización autorradiográfica de los sitios de unión al [3 H]-QNB se muestra en las Figuras 1 y 2. En la inspección visual no se detectan diferencias de concentración de receptores en las regiones analizadas para ambos grupos de animales.

La mayor densidad de receptores en el cerebro medio se observó en el ventrículo lateral (LV) y el caudado-putamen (CPu), corroborando la abundante inervación colinérgica que existe en estas áreas (8, 32). Se identificaron concentraciones algo menores en el tubérculo olfatorio e islas de Calleja (IC/Tu), e intermedias en las distintas láminas de la corteza frontoparietal (FrP I-III, IV, V-VI). La comisura anterior, parte anterior (aca) y el núcleo del limbo vertical (VNu) se caracterizaron por tener densidades relativamente bajas

TABLA I

EFFECTO DE LA INTOXICACION CRONICA CON MANGANESO SOBRE LA UNION DEL [³H]-QNB A LOS RECEPTORES COLINERGICOS MUSCARINICOS EN EL CEREBRO DE RATON *

Area	Controles	Tratados
Bulbo Olfatorio		
Capa plexiforme externa	478,1 ± 25,9	480,1 ± 10,1
Capa granular interna	313,1 ± 8,2	343,3 ± 7,8
Capa glomerular	70,6 ± 6,3	70,4 ± 3,5
Bulbo olfatorio accesorio	120,7 ± 7,5	123,6 ± 6,8
Núcleo olfatorio anterior	456,3 ± 22,5	493,2 ± 7,0
Comisura anterior, parte intrabulbar	136,6 ± 13,7	151,8 ± 5,4
Capa endodimal y sub-endodimal + ventrículo olfatorio	205,3 ± 23,8	231,1 ± 7,6
Caudado-putamen	963,0 ± 36,5	987,1 ± 42,6
Corteza frontoparietal		
Láminas I-III	496,5 ± 39,1	569,5 ± 40,1
Lámina IV	455,5 ± 19,8	530,8 ± 20,7
Láminas V-VI	502,7 ± 32,4	581,7 ± 21,6
Comisura anterior, parte anterior	255,2 ± 1,9	273,1 ± 17,5
Ventrículo lateral	1001,8 ± 48,2	1046,8 ± 40,2
Núcleo del limbo vertical	378,3 ± 23,2	374,7 ± 15,4
Islas de Calleja + tubérculo olfatorio	751,7 ± 36,0	782,8 ± 26,7

* Valores expresados en fmol/mg de tejido ± E.E.

en comparación con el resto de las regiones.

En cuanto al bulbo olfatorio, las mayores concentraciones de receptores se encontraron en la capa plexiforme externa (EPI) y el núcleo olfatorio anterior (AN). Se observó un número intermedio de receptores en la capa granular interna (IGr) y en la

capa endodimal y ventrículo olfatorio (E/OV). Las densidades más bajas se obtuvieron en la comisura anterior, parte intrabulbar (aci) y en el bulbo olfatorio accesorio (AOB). La capa glomerular (GI) contiene la menor concentración de receptores con respecto al resto de áreas examinadas.



Fig. 1.- Imágenes autorradiográficas de cortes coronales del cerebro medio de ratón. La superior corresponde a un animal control y la inferior a uno intoxicado (escala: fmol/mg de tejido).

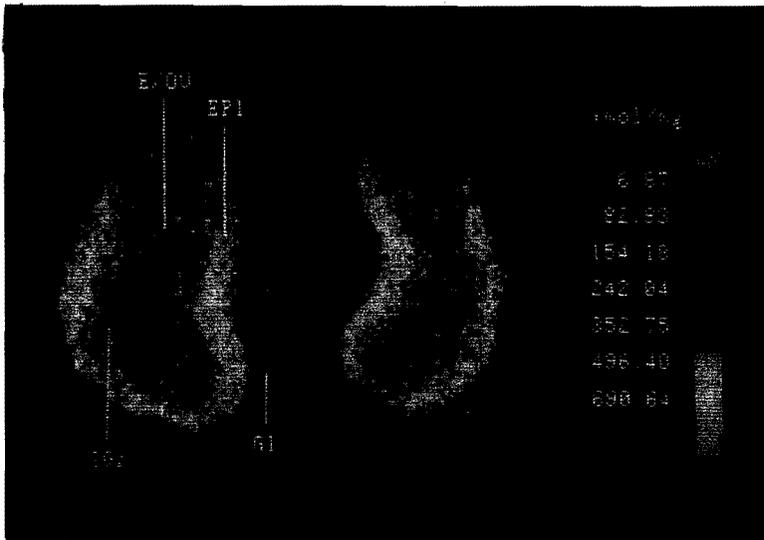


Fig. 2.- Imagen autorradiográfica de un corte coronal del bulbo olfatorio, correspondiente a un animal intoxicado (escala: fmol/mg de tejido).

En la tabla se observa que existen diferencias de densidad entre las partes anterior e intrabulbar de la comisura anterior; esto indica que la distribución de receptores no es homogénea en toda la comisura y la invervación muscarínica es mayor en la parte anterior que en el bulbo olfatorio.

DISCUSION

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento crónico con cloruro de manganeso no altera la densidad de los receptores muscarínicos en el cerebro de ratón, aún en áreas con una alta invervación colinérgica e involucradas con el sistema motor extrapiramidal como es el caudado-putamen. Tampoco se encontraron alteraciones en el bulbo olfatorio, el cual representa una puerta de entrada al SNC durante la intoxicación con manganeso por inhalación (5) y de los compuestos que son excluidos por la barrera hematoencefálica (17). Sin embargo, ha sido reportada una disminución significativa en los niveles de aminoácidos libres en el bulbo olfatorio de ratones intoxicados con manganeso (6).

Nuestros datos concuerdan con los estudios realizados por Bhargava (2) y Leung (23) en el estriado de rata, a distintas concentraciones de [^3H]-QNB (0,5 nM y 2 nM). Sin embargo, difieren de los resultados obtenidos por Seth y col (29) que encontraron una disminución del número de receptores muscarínicos en las membranas estriatales, utilizando una concentración de 1 nM. Donaldson (12) obtuvo una disminución de la unión del [^3H]-QNB (0,6 nM) en teji-

do cerebral, incubado con productos de la oxidación de la dopamina en presencia de manganeso. A su vez, reportó un incremento de la unión del ligando en el estriado de ratas neonatas tratadas con manganeso, así como una disminución de la peroxidación lipídica (12).

La disminución *in vitro* y la estimulación *in vivo* de los receptores muscarínicos, reportada por Donaldson, se corresponderían con los múltiples estados de oxidación del metal (5, 12, 35), ya que el manganeso puede actuar como oxidante o antioxidante en función de su valencia, del estado redox de la región donde se encuentre y de su concentración (5). Se ha determinado que la edad del animal, la vía de intoxicación, la duración del tratamiento y la dosis influyen en el grado de intoxicación y ésto podría explicar las diferencias encontradas por los distintos autores.

En el estriado se pueden distinguir varias poblaciones de receptores muscarínicos: 1. Receptores presinápticos de tipo no M1, localizados en las interneuronas colinérgicas (autorreceptores) (10) y 2. Receptores postsinápticos que se encuentran en estructuras nerviosas colinoceptivas (8), tales como, los axones dopamínicos procedentes de la sustancia nigra (heterorreceptores) (9). El [^3H]-QNB se une a todas estas poblaciones por igual, de forma que si existieran variaciones en el número de receptores no se podría determinar qué elemento nervioso ha sido afectado.

El manganeso no parece provocar una degeneración de las interneuronas colinérgicas, ya que no produce una disminución de los

marcadores colinérgicos como la colina acetiltransferasa, en el estriado de ratas tratadas con cloruro de manganeso, por vía oral, durante 8 meses (26). Una reducción de los niveles sinápticos de acetilcolina produciría una regulación hacia arriba en el número de receptores muscarínicos en las estructuras colinoceptivas (29). Al no encontrar este aumento podríamos deducir que las neuronas colinérgicas estriatales son resistentes al efecto tóxico del metal.

Con respecto a las neuronas dopaminérgicas, el manganesismo crónico puede producir degeneración de las mismas en la sustancia nigra; ésto se traduciría en una disminución de los receptores muscarínicos localizados en los axones que llegan al estriado. No conocemos el número de receptores muscarínicos localizados en las fibras dopaminérgicas, pero debe ser una proporción pequeña con respecto al total de receptores muscarínicos estriatales, ya que su densidad no está disminuida en el estriado de ratones intoxicados con manganeso, en los cuales ha sido previamente reportada una disminución de las fibras dopaminérgicas (1, 13).

No se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual la inhalación de manganeso produce neurotoxicidad, pero existen varias hipótesis concernientes a ésto. Se cree que el mecanismo fundamental es el efecto tóxico de los productos de la oxidación de la dopamina (quinonas citotóxicas) y el incremento en la producción de radicales libres, debido a la reducción parcial del oxígeno (4, 12-16, 18, 21, 24). Otros mecanismos propuestos son la producción de

catecolaminas tóxicas, como la 6-hidroxidopamina, acompañada de una disminución de los tioles protectores (13, 16, 18, 24) y la toxicidad directa de las especies del manganeso de valencia alta (24). Todo esto, en conjunto, conduce a un aumento de la peroxidación lipídica (12, 13, 35) y a un daño irreversible de las membranas neuronales (12, 13). La generación de productos tóxicos (quinonas y radicales libres) se dará en cualquier área donde las concentraciones de dopamina y la acumulación de manganeso, preferentemente en estados oxidativos altos (trivalente), sean suficientemente elevadas.

Se desconoce cual es el mecanismo de resistencia de las neuronas colinérgicas a estas sustancias citotóxicas. Las concentraciones de manganeso son variables en el estriado y no hay ningún estudio sobre el estado redox de esta región, pero probablemente ambos factores influyan en la explicación de este mecanismo.

A la luz de los resultados podemos concluir que la intoxicación crónica con manganeso, en nuestras condiciones experimentales, no produce alteraciones en la densidad de los receptores colinérgicos muscarínicos en el cerebro de ratón.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Srta. Candy Johnson por la colaboración prestada en la realización del presente trabajo. Financiado parcialmente por Lagoven y Cervecería Modelo.

ABSTRACT

Chronic manganese poisoning: Autoradiographic quantitation of muscarinic cholinergic receptors in mouse brain. Cano G. (Inbiomed-Fundacite, Apartado 376, Maracaibo 4001-A, Venezuela), Bonilla E., Castro F., Alburges M., Wamsley J.K. *Invest Clin* 33(2): 69 - 79, 1992.

Chronic administration of manganese chloride (5 mg Mn/kg body weight/day) during nine weeks, did not affect the [³H]-quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in mouse brain. The quantitation and anatomical distribution of the receptors were determined by autoradiographic methods on coronal sections of midbrain and olfactory bulb. It is concluded that, in our experimental conditions, no alteration in the density of the muscarinic cholinergic receptors is produced in the brain of manganese intoxicated mouse.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- BARBEAU A.: Manganese and Extrapyramidal Disorders. *NeuroToxicol* 5(1):13-36, 1984.
- 2- BHARGAVA H.N.: Effect of repeated administration of Manganese on the striatal cholinergic and dopaminergic receptors in the rat. *Toxicol Lett* 37:135-141, 1987.
- 3- BONILLA E.: Chronic manganese poisoning and striatal Adenylate Cyclase activity. *Invest Clin* 26(1):45-50, 1985.
- 4- BONILLA E.: Intoxicación crónica con Manganeso. Avances recientes. Revisión. *Invest Clin* 27(1):49-64, 1986.
- 5- BONILLA E.: El Manganeso y su importancia biomédica. Ed. Astro Data S.A., Maracaibo, Venezuela, 1987.
- 6- BONILLA E., ARRIETA A., DAVILA J.O., QUIROZ I.: Manganese toxicity: Free aminoacids and trace elements in the mouse brain. *Neuroscience Abs*, 15:141, 1989.
- 7- BYLUND D.B., YAMAMURA H.I.: Methods for Receptor Binding en: *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*. p 1-35. Yamamura H.I. et al. eds., Raven Press, Ltd. New York, 1990.
- 8- COOPER J.R., BLOOM F.E., ROTH R.H.: Acetylcholine en: *The Biochemical Basis of Neuropharmacology* 5th ed. p 191. Oxford University Press, New York, 1986.
- 9- DAWSON T.M., DAWSON V.L., GAGE F.M., FISHER L.J., HUNT M.A., WAMSLEY J.K.: Downregulation of muscarinic receptors in the rat caudate-putamen after lesioning of the ipsilateral nigro-striatal dopamine pathway with 6-hydroxydopamine (6-OHDA): normalization by fetal mesencephalic transplants. *Brain Res* 540:145-152, 1991.
- 10- DAWSON V.L., DAWSON T.M., WAMSLEY J.K.: Muscarinic and Dopaminergic Receptor Subtypes on Striatal Cholinergic Interneurons. *Brain Res Bull* 25:903-912, 1990.
- 11- DONALDSON J.: Involvement of Manganese in Physiological and Biochemical Processes: An overview. *NeuroToxicol* 5(1):1-4, 1984.
- 12- DONALDSON J., LaBELLA F.: The Effects of Manganese on the Cholinergic Receptor "in vivo" and "in vitro" may be mediated through modulation of Free Radicals. *NeuroToxicol* 5(1):105-112, 1984.
- 13- DONALDSON J.: The physiopathologic Significance of Manganese in Brain: Its Relation to Schizophrenia

- and Neurodegenerative Disorders. *NeuroToxicol* 8(3):451-462, 1987.
- 14- FLORENCE T.M., STAUBER J.L.: Neurotoxicity of Manganese. *The Lancet*, Febr 13:363, 1988.
 - 15- GRAHAM D.G.: Catecholamine Toxicity: A proposal for the molecular pathogenesis of Manganese Neurotoxicity and Parkinson's disease. *NeuroToxicol* 5(1):83-96, 1984.
 - 16- HALLIWELL B.: Manganese ions, Oxidation reactions and the Superoxide Radical. *NeuroToxicol* 5(1):113-118, 1984.
 - 17- HASTINGS L.: Sensory Neurotoxicology: Use of the Olfactory System in the Assessment of Toxicity. *Neurotoxicol and Teratol* 12:455-459, 1990.
 - 18- HUANG C.C., CHU N.S., LU C.S., WANG J.D., TSAI J.L., TZENG J.L., WOLTERS E.C., CALNE D.B.: Chronic Manganese Intoxication. *Arch Neurol* 46:1104-1106, 1989.
 - 19- KUBOTA Y., INAGAKI S., SHIMADA S., KITO S., ECKENSTEIN F., TOHYAMA M.: Neostriatal cholinergic neurons receive direct synaptic inputs from dopaminergic axons. *Brain Res* 413:179-198, 1987.
 - 20- KUHARM.J., UNNERSTALL J.R.: Receptor Autoradiography en: Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis. p 177-218. Yamamura H.I. et al., eds. Raven Press, Ltd., New York, 1990.
 - 21- LeBEL C.P., BONDY S.C.: Oxygen Radicals: Common Mediators of Neurotoxicity. *Neurotoxicol and Teratol* 13:341-346, 1991.
 - 22- LEHMANN J., LANGER S.Z.: The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals?. *Neurosci* 4:1005-1120, 1983.
 - 23- LEUNG T.K.C., LAI J.C.K., LIM L.: [³H]-Spiperone and [³H]-QuinuclidinilBenzilate binding in striatal membranes from rats chronically treated with Manganese chloride throughout development and for over two years. *Gen Pharmac* 17(1):121-123, 1986.
 - 24- LICCIONE J.J., MAINES M.D.: Selective Vulnerability of Glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in cat striatum to manganese. *J Pharmacol Exp Ther* 247(1):156-161, 1988.
 - 25- LLOYD K.G.: Neurotransmitter interactions related to central dopamine neurons en: *Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology* Vol 3. p 131. Youdim M.B.H., Lovenberg W., Sharman D.F., Lagnado J.R. eds., John Wiley & sons, New York, 1987.
 - 26- MARTINEZ H., BONILLA E.: Water intake and brain Choline-Acetyltransferase and Acetylcholinesterase activities in Manganese treated rats. *Neurobehav Toxicol Teratol* 3:277-280, 1981.
 - 27- MENAI., MARINO., FUENZALIDA S., COTZIAS G.: Chronic manganese poisoning, clinical picture and manganese turnover. *Neurology* 17:128-136, 1967.
 - 28- PAXINOS G., WATSON C.: *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd. ed. Academic Press, New York, 1986.
 - 29- SETH P.K., CHANDRA S.V.: Neurotransmitters and Neurotransmitter Receptors in Developing and Adult rats during Manganese poisoning. *NeuroToxicol* 5(1):67-76, 1984.
 - 30- SHI X., DALAL N.S.: The Glutathionyl Radical Formation in the reaction between Manganese and Glutathione and its neurotoxic implications. *Med Hypothes* 33:83-87, 1990.
 - 31- SUBHASH M.N., PADMASHREE T.S.: Regional distribution of Dopamine B-hydroxylase and Monoamine oxidase in the brains of rats exposed to Manganese. *Fd Chem Toxic* 28(8):567-570, 1990.
 - 32- WAMSLEY J.K., ZARBIN M.A., BIRDSALL N.J.M., KUCHAR M.J.: Muscarinic Cholinergic Receptors: Autoradiographic localization of high

- and low affinity agonist binding sites. *Brain Res* 200:1-12, 1980.
- 33- WAMSLEY J.K., LEWIS M.S., YOUNG III W.S., KUHAR M.J.: Autoradiographic localization of Muscarinic Cholinergic receptors in rat brainstem. *J Neurosci* 1(2):176-191, 1981.
- 34- WAMSLEY J.K., PALACIOS J.M.: Apportion techniques of Autoradiography for Microscopic Receptor Localization en: *Current Methods in Cellular Neurobiology*. p 241-267. Barker J.L., Mc Kely J.F., eds., John Wiley & sons, New York, 1982.
- 35- WEBSTER W.S., VALOIS A.A.: Reproductive Toxicology of Manganese in rodents, including exposure during the postnatal period. *NeuroToxicol* 8(3):437-444, 1987.
- 36- YAMAMURA H.I., SNYDER S.H.: Muscarinic Cholinergic Binding in rat brain. *Proc Nat Acad Sci USA* 71(5):1725-1729, 1974.