

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EFECTO DEL MANGANESO Y PLOMO SOBRE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANAS SH-SY5Y Y DE RATAS B-35”

Tesis presentada por los Bachilleres:
Mayron Antonio Candia Puma
Juan Kenedy Ramirez Choquehuanca

Para optar el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Asesor:
José Antonio Villanueva Salas, PhD

AREQUIPA – PERÚ

2016

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, quien nos dio la fortaleza, el ímpetu y la protección para nuestro desarrollo personal y profesional.

Estamos agradecidos con las personas e instituciones que mediante su apoyo se realizó la presente tesis:

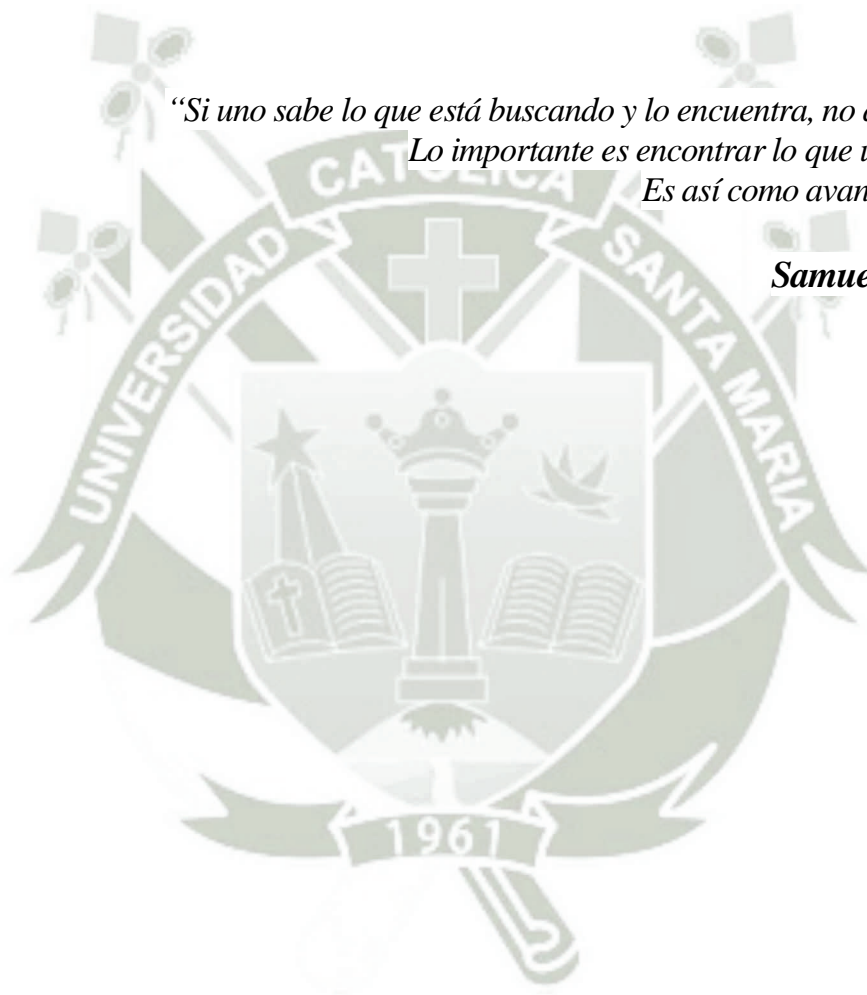
A nuestra familia, por brindarnos su cariño y apoyo incondicional para conseguir todos nuestros objetivos.

A la Universidad Católica de Santa María y los docentes de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, por sus valiosos conocimientos compartidos.

A la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS University), por haber permitido el desarrollo de la presente tesis en sus laboratorios; y a sus docentes, por sus inestimables recomendaciones compartidas.

*“Si uno sabe lo que está buscando y lo encuentra, no aprende nada.
Lo importante es encontrar lo que uno no espera.
Es así como avanza la ciencia”*

Samuel Ting, Ph.D



ÍNDICE

RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VII
INTRODUCCIÓN	IX
HIPÓTESIS.....	XI
OBJETIVOS	XII

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO.....	1
1. Manganeso	1
1.1. Fuentes de exposición al manganeso	2
1.2. Cinética	5
1.3. Cuadro clínico.....	8
1.4. Mecanismos de toxicidad.....	10
1.5. Lineamientos de exposición al manganeso.....	12
1.6. Efectos sobre la neurotransmisión	13
1.7. Tratamiento.....	15
2. Plomo	15
2.1. Fuentes de exposición al plomo.....	16
2.2. Cinética	19
2.3. Cuadro Clínico.....	22
2.4. Mecanismos de toxicidad.....	23
2.5. Lineamientos de exposición al plomo	24
2.6. Efectos sobre la neurotransmisión	25
2.7. Tratamiento.....	26
3. Combinaciones de metales.....	27
3.1. Factores relacionados a las exposiciones combinadas.....	27
3.2. Combinación de manganeso y plomo	28
4. Células neuroblastomas.....	29
4.1. Línea celular de neuroblastoma	30
5. Estudios en células	32
5.1. Método de exclusión de viabilidad celular	32
5.2. Ensayo de viabilidad celular	32
5.3. Análisis isoblográfico	33

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. Materiales.....	34
1.1. Material biológico.....	34

1.2. Otros materiales	34
2. Reactivos	34
3. Equipos.....	35
4. Métodos.....	35
4.1. Cultivo celular.....	35
4.2. Método de exclusión de viabilidad celular	38
4.3. Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad celular	38
4.4. Análisis estadístico	42
4.5. Análisis Isobolográfico.....	42

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
1. Cultivo celular.....	44
1.1. Células neuroblastomas humanas SH-SH5Y.....	44
1.2. Células neuroblastomas de ratas B-35	45
2. Exclusión de viabilidad celular	45
2.1. Conteo de células viables en la suspensión celular.....	45
3. Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad celular de neuroblastomas humanas SH-SY5Y	48
3.1. Efecto del manganeso sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y	49
3.2. Efecto del plomo sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y	51
3.3. Efecto de la combinación de manganeso y plomo, sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y	53
3.4. Análisis isobolográfico del efecto de la combinación de manganeso y plomo, sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y... ..	54
4. Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad celular de neuroblastomas de ratas B-35	56
4.1. Efecto del manganeso sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35	58
4.2. Efecto del plomo sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35	60
4.3. Efecto de la combinación de Manganeso y Plomo sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35	61
4.4. Análisis isobolográfico del efecto de la combinación de manganeso y plomo, sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35.....	62
CONCLUSIONES	65
SUGERENCIAS	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	77

RESUMEN

El manganeso (Mn) es un elemento traza esencial requerido para el desarrollo y funcionamiento normal de organismos vivos. Sin embargo, la exposición a niveles altos de este metal puede producir efectos neurotóxicos. Por otro lado, el plomo (Pb) aparentemente no tiene función biológica, pero se conoce su considerable toxicidad. Además, estos dos metales pueden encontrarse juntos, teniendo como fuentes de contaminación a diversas actividades antropogénicas (minería, galvanoplastia, petroquímica, eliminación de desechos, etc.), de modo que hay una alta probabilidad de co-exposición.

El presente estudio se realizó en los laboratorios de investigación de la escuela de farmacia–Boston de la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS University); en el que se evaluó el efecto del Mn y Pb de forma individual y combinado, en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35, mediante la determinación de la viabilidad celular (%) por el método colorimétrico de la bio-reducción de MTS y se realizó un análisis isoblográfico para determinar el tipo de interacción de ambos metales.

El Mn produjo una significativa disminución de la viabilidad celular ($p < 0.05$), dependiente de la concentración, a partir de $0.15 \mu\text{M}$ y $0.25 \mu\text{M}$ en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35, respectivamente; además se determinó un IC_{50} de $2.269 \mu\text{M}$ para las primeras e IC_{50} de $2.249 \mu\text{M}$ para las otras

células. Adicionalmente, el Pb produjo una significativa disminución de la viabilidad celular ($p < 0.05$), dependiente de la concentración, a partir de $0.50 \mu\text{M}$ para ambas células, y los IC_{50} de este metal fueron $4.141 \mu\text{M}$ y $4.576 \mu\text{M}$ para las células SH-SY5Y y B-35, respectivamente.

Mediante el análisis isoblográfico se determinó los índices de combinación (CI) de ambos metales y fueron menores a la unidad, tanto en las células humanas como en las de ratas; estos resultados demostraron que la combinación de Mn y Pb produjo un daño sinérgico en estas células.

Además, el daño producido por estos metales sobre ambas células fue evidenciado mediante microscopía óptica invertida, observándose alteraciones del crecimiento celular que incluye la disminución de la población de células y el daño estructural evidenciado por la pérdida de neuritas, siendo éstas observaciones más acentuadas en el crecimiento de las células en presencia de la combinación del Mn y Pb.

Se concluye que el Mn y el Pb, de forma individual, producen una significativa disminución de la viabilidad celular; además, la combinación de estos metales produce un daño sinérgico sobre las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35.

ABSTRACT

Manganese (Mn) is an essential trace element required for normal development and functioning of living organisms. However, exposure to this metal at elevated levels may produce neurotoxic effects. On the other hand, lead (Pb) apparently has no biological function, but its considerable toxicity is known. Moreover, these two metals may be found together, having as sources of contamination to various anthropogenic activities (mining, electroplating, petrochemical, waste disposal, etc.), so that there is a high probability of co-exposure.

This study was realized in the school of pharmacy research Labs-Boston of the Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University (MCPHS University); in which the effect of Mn and Pb individually and in combination, in SH-SY5Y human and B-35 rat neuroblastoma cells, was evaluated through determining of cell viability (%) by the colorimetric method of MTS bio-reduction and isobolographic analysis was performed to determinate the interaction type of both metals.

Mn produced a significant concentration-dependent decrease of cell viability ($p < 0.05$) from 0.15 μM and 0.25 μM in SH-SY5Y human and B-35 rat neuroblastoma cells, respectively; furthermore, a IC_{50} of 2.269 μM for the first ones and IC_{50} of 2.249 μM for the other cells were determined. In addition, Pb produced a significant concentration-dependent decrease of cell viability ($p < 0.05$) from 0.50 μM in both

cells and the IC_{50} of this metal were $4.141 \mu\text{M}$ and $4.576 \mu\text{M}$ for SH-SY5Y and B-35 cells, respectively.

Analysis isobolographic of both metals allowed to determine the combination indices (CI), which were lower than the unit ($CI < 1$), both in human and rat cells; these results demonstrate that the combination of Mn and Pb produced a synergistic damage in these cells.

Besides, the damage caused by these metals in both cells was evidenced by inverted optical microscopy, where there were changes in cell growth that include decreased cell population and structural damage evidenced by loss of neurites, and these observations are more pronounced in cell growth in presence of the Mn and Pb combination.

It is concluded that Mn and Pb, individually, produce a significant decrease of cell viability; in addition, the combination of these metals produce a synergistic damage in SH-SY5Y human and B-35 rat neuroblastoma cells

INTRODUCCIÓN

En el mundo industrializado de hoy, existen diversas fuentes de exposición a metales, tales como: los lugares de trabajo, el agua contaminada, los alimentos y el ambiente, donde la exposición de los seres humanos a estos metales es un problema de magnitud mundial.^{1,2} El plomo (Pb) y el manganeso (Mn) se encuentran entre los metales que representan los principales problemas de salud pública.^{3,4} La contaminación por Pb y Mn es causada por actividades antropogénicas como la minería, galvanoplastia, petroquímica y eliminación de desechos, que llegan a contaminar el agua, aire y suelo cuando son liberados al ambiente.⁵ Tanto Pb y Mn están presentes en el aire como partículas en suspensión en las zonas urbanas y rurales que pueden llegar a los pulmones.⁶ Además, se debe considerar que el Pb presente en la gasolina y la pintura puede permanecer en el suelo y el polvo durante muchos años, adicionalmente los alimentos y cosméticos pueden contener niveles peligrosos de Pb.⁷ Por otro lado, el uso del tricarbonil metilciclopentadienil manganeso (MMT), un sustituto del plomo en la gasolina; productos agroquímicos e industria siderúrgica se han asociado con una mayor exposición al Mn.⁸

En cuanto al Pb, es un elemento ubicuo, considerado un xenobiótico con un rol fisiológico no conocido.⁹ Mientras que el Mn es un oligoelemento esencial, pero es un potencial tóxico en concentraciones altas.¹⁰ Ambos son neurotóxicos, que producen cambios bioquímicos en el sistema nervioso central, que pueden dar lugar a efectos significativos sobre el comportamiento. En nuestro país los niveles de exposición ocupacional no están estrictamente controlados, por lo tanto, existen fuentes de exposición que contienen mezclas metálicas que contaminan la biosfera a bajos niveles.¹¹ Debido a esto, la preocupación principal son las intoxicaciones crónicas más que las intoxicaciones agudas.

Dada su coexistencia en el suelo y la atmósfera, la exposición a Pb y Mn no se produce de forma aislada. De hecho, en el mundo real, la exposición a mezclas complejas es la regla, no la excepción.¹² Mientras que los efectos sobre la salud de las exposiciones individuales de estos metales pueden ser conocidos, hay una escasez de

información en cuanto a los efectos sobre la salud de la combinación de estos metales. Por lo tanto, el estudio de las exposiciones a metales de forma individual, puede que no muestre adecuadamente los riesgos sobre la salud.

Recientemente, se ha demostrado una interacción positiva entre los niveles sanguíneos de Pb y Mn, con una correlación negativa entre los niveles de exposición y la inteligencia de niños en edad escolar co-expuestos a estos metales.¹³ Hasta ahora, los estudios en células que han evaluado los efectos combinados del Pb y Mn sobre la viabilidad celular han sido inexistentes.

De acuerdo a esta problemática, el presente trabajo estableció el efecto del Pb y del Mn de forma individual y en combinación, sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35. Además, se determinó que tipo de efecto (aditivo, sinérgico o antagónico) produjo la combinación de estos metales sobre la viabilidad de estas células. Los datos obtenidos serán de gran ayuda para el futuro establecimiento de políticas y valores de referencia de la exposición a estos metales.

HIPÓTESIS

Dado que existen antecedentes investigativos sobre la neurotoxicidad de manganeso y plomo de forma individual; es probable que, el efecto de la combinación de ambos metales tenga mayor importancia toxicológica, pudiéndose presentar un efecto aditivo, sinérgico o antagónico en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto neurotóxico del manganeso y plomo, individualmente y en combinación, sobre la viabilidad de las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35.
2. Determinar las concentraciones de manganeso y plomo que producen efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad de estas células.
3. Establecer si la combinación de manganeso y plomo produce un efecto aditivo, sinérgico o antagónico sobre estas células.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Manganeso

El manganeso (Mn) es un elemento muy común en el medio ambiente, es el quinto metal traza más abundante, el duodécimo con más abundancia en la corteza terrestre y está presente en la naturaleza en formas inorgánicas y orgánicas.¹⁴

El Mn tiene un peso atómico de 54,94 g/mol y una densidad de 7,21 a 7,44 g/cm³, dependiendo de su forma alotrópica. Tiene un punto de fusión a 1244 °C y un punto de ebullición a 1962 °C. Pertenece al Grupo VIIB en el sistema de elementos y entre los principales estados de oxidación se tiene: Mn(II), Mn(III), Mn(IV) y Mn(VII). Las sales de Mn(II) son las más estables, Mn(IV) (MnO₂) es el que predomina en la naturaleza.¹⁵

Es un nutriente esencial para el organismo, ya que está involucrado en la formación de tejido y hueso; en la coagulación de la sangre; en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. También está implicado en el sistema inmune, además se le ha asociado con la prevención del cáncer, ya que juega un papel importante en las defensas antioxidantes formando parte de una superóxido dismutasa (MnSOD). Es un co-factor de enzimas como la piruvato carboxilasa, la glutamina sintetasa, la fosfatasa alcalina y la arginasa.¹⁶

La deficiencia de Mn en el hombre ha sido observada en raras ocasiones, pero cuando esta se produce se caracteriza por síntomas de pérdida de peso, alteraciones en el crecimiento, pobre formación de huesos, reducción de la fertilidad, malformaciones, alteración del metabolismo, problemas en la coagulación e incremento de la susceptibilidad de convulsiones epilépticas,¹⁷ es por esto que se ha visto que las tasas de mortalidad infantil son más bajas cuando los niveles de Mn en sangre se mantienen a un cierto nivel.¹⁶

Sin embargo, la mayoría de patologías humanas asociadas con el Mn resultan de la excesiva exposición al mismo; por lo que el Mn presenta un dilema especial, ya que este es un nutriente esencial a dosis bajas, pero es un potencial neurotóxico a dosis altas, éste se acumula en el cuerpo, especialmente en el cerebro, y causa daño neurológico debido a su acumulación en el sistema nervioso central.¹⁸

1.1. Fuentes de exposición al manganeso

El Mn es ubicuo y se encuentra normalmente en niveles bajos en agua, aire, suelo y los alimentos,⁴ es detectable en casi todas las muestras de partículas suspendidas en el aire.¹⁹

1.1.1. Dieta

El Mn está presente en niveles bajos (aproximadamente 0.2 mg/kg) en alimentos como carne, lácteos y pescado, mientras que en niveles altos (20 mg/Kg) en el té, nueces, cereales, legumbres y frutos frescos. Generalmente, la concentración de Mn en agua es baja (<10 µg/L).¹⁹

La mayor ingesta de Mn se produce a través de la dieta y el Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos ha establecido una ingesta alimentaria estimada, inocua y adecuada de 2-5 mg/día para adultos. El nivel mínimo que provoca un efecto adverso observable (LOAEL) para el Mn en el agua es de 0,06 mg Mn/kg.día o 4,2 mg Mn/día para un individuo de 70 kg.²⁰

1.1.2. MMT

Una fuente de Mn es el metilciclopentadienil manganeso tricarbonil (MMT), un aditivo de gasolina que contiene aproximadamente un 24,4 % de Mn en peso. El MMT mejora la combustión en calderas y motores, puede sustituir al plomo en éste combustible como un agente anti-detonante para elevar su octanaje. Su uso comenzó en los Estados Unidos en 1975, pero este fue prohibido

desde 1977 hasta 1995, luego en diciembre de 1995 es legalizado como aditivo para el combustible a un nivel de 1/32 g de Mn/galón, es por eso que se le considera como la mayor fuente de exposición del Mn,^{21,22} una muestra de esto son los altos niveles de Mn encontrados en sangre de niños que viven cerca a zonas de tráfico.²³

La combustión de MMT en el motor de un automóvil produce partículas inorgánicas de Mn.²⁴ Estas partículas contienen principalmente al Mn en forma de fosfato y sulfato, aunque los óxidos de manganeso divalentes también son formados.²⁵

En el Perú, actualmente se utiliza el MMT como aditivo mejorador de octanaje, además del alcohol carburante (7.8%v) que se obtiene a partir de la caña de azúcar, el cual contiene 97 a 98% de etanol anhidro, y ambos reemplazan al plomo.²⁶

1.1.3. Formulas infantiles

La leche materna contiene bajas concentraciones de Mn (3-10 $\mu\text{g/L}$), y lo encontramos en forma trivalente, en esta forma el Mn puede unirse a la lactoferrina. Los receptores para esta proteína están presentes en los cepillos del borde de la membrana de las células epiteliales, estos regulan la absorción del Mn proveniente de la leche materna. Sin embargo, las formulas infantiles basadas en la leche de vaca contienen mayores niveles de Mn (30–50 $\mu\text{g/L}$), mientras que las fórmulas de soya contienen incluso cantidades mayores (200–300 $\mu\text{g/L}$). Además, el Mn en estas fórmulas se encuentra en forma divalente, la cual es incapaz de unirse a la lactoferrina, entonces la absorción del Mn no puede ser regulada por los cepillos del borde de la membrana de las células epiteliales.¹⁷ Por lo tanto, los niños alimentados con formula de leche están expuestos a niveles considerables de Mn en comparación de los alimentados con leche materna, y algunas investigaciones han sugerido una mayor incidencia de problemas de aprendizaje en este grupo.¹⁴

1.1.4. Nutrición parenteral total

Las soluciones nutricionales son comúnmente formuladas para incluir Mn junto con otros metales traza esenciales. Sin embargo, el Mn adicional de estas soluciones nutricionales también puede presentarse como un tóxico, y todavía no se ha establecido una dosis estándar diaria para estos metales en la nutrición parenteral total. Además, hay que destacar que los recién nacidos o bebés prematuros que reciben una prolongada nutrición parenteral total tienen mayor riesgo de padecer una toxicidad por Mn, esto puede ser atribuido al pobre desarrollo de la barrera hematoencefálica y las vías de excreción biliar. También cabe considerar, que la absorción y retención de Mn proveniente de la leche materna es aproximadamente el 80%, mientras que la administración intravenosa de nutrición parenteral total conlleva a un 100% de exposición a la dosis.²⁷

1.1.5. Exposición ocupacional

El Mn es el cuarto metal más usado en el mundo. La exposición al polvo y vapores de Mn es mayormente observada en mineros, fundidores, soldadores y trabajadores involucrados en empresas de acero, vidrio, cerámica y pilas secas.²⁸ En la industria, el Mn está presente en la siderurgia y en los procesos de fundición de hierro y manganeso. También, el Mn se utiliza comúnmente como un producto agroquímico.²⁹ Por otro lado, compuestos de Mn reemplazaron a los complejos de gadolinio como agentes de contraste específicos de tejido en la tomografía de resonancia magnética nuclear, por ejemplo, se usa al difosfato dipiridoxil manganeso (Mn-DPDP para las exploraciones del hígado y páncreas).³⁰

1.1.6. Sub poblaciones con mayor riesgo

La exposición crónica a niveles bajos de Mn puede que no produzca efectos visibles en la mayoría de la población; sin embargo, ciertos grupos como los neonatos, los niños y adultos que reciben prolongada nutrición parenteral

total, pacientes ancianos con parkinsonismo asintomático y pacientes con enfermedades de hígado o deficiencia de hierro; pueden ser negativamente afectados incluso por niveles moderadamente elevados de Mn. Este último grupo es especialmente relevante si consideramos la prevalencia de la deficiencia de hierro (alrededor del mundo afecta a 2 000 millones de personas)¹⁷ e incluso, en esta afección se produce una mayor absorción de Mn.¹⁶ Similitudes entre el manganeso y el hierro han sido reconocidas como causas de competición entre estos dos metales. Además, la deficiencia de hierro puede llegar a incrementar la absorción cerebral de Mn debido a la alteración en la regulación de la transferrina (TF), la TF está involucrada en el transporte de Mn a través de la barrera hematoencefálica.³¹ Por otro lado, el humo del cigarrillo también contiene Mn, lo que podría provocar que sea una fuente de exposición al Mn, en particular para los niños que viven en hogares donde hay fumadores.³²

1.2. Cinética

1.2.1. Absorción

Normalmente, sólo una pequeña fracción (1-5%) de Mn ingerido se absorbe. Sin embargo, cuando los niveles de Mn alimenticio son altos, la absorción gastrointestinal de Mn se reduce en gran medida. El mecanismo por el cual el Mn se absorbe en el tracto gastrointestinal (TGI) no se comprende todavía, pero probablemente incluye la difusión pasiva y el transporte activo. La absorción de Mn en el TGI es extremadamente compleja y está influenciado no sólo por la cantidad de Mn en la dieta, sino también por el hierro y otros nutrientes. En particular, la deficiencia de hierro, es un factor de riesgo frecuente que puede dar lugar a una mayor absorción de Mn en el TGI, que puede ocasionar un aumento en su transporte al SNC.³³ El Mn(II) absorbido desde el TGI, generalmente está unido a β -globulina y albúmina, mientras que el Mn(III) puede estar unido a la TF. La hipoproteinemia puede alterar la disposición de Mn. La absorción de Mn en el TGI depende de la edad del individuo, los neonatos tienen apreciablemente mayor absorción que los adultos.³⁴

1.2.2. Distribución

El Mn se encuentra en el SNC y todos los demás tejidos de los mamíferos. El transporte del Mn ingerido que va hacia el SNC y otros tejidos, está influenciado por el intrincado equilibrio entre la ingesta de Mn y su eliminación. El Mn no se acumula en todos los tejidos con el mismo grado. Los huesos, hígado, páncreas y riñón usualmente tienen mayores concentraciones de Mn que otros tejidos;³⁴ además, los tejidos ricos en mitocondrias y pigmentos (por ejemplo, la retina, la piel oscura y cabello) tienden a tener mayores concentraciones de Mn. En la sangre la mayor parte de Mn se une a los eritrocitos, estos contienen aproximadamente cinco veces más Mn que el encontrado en el suero.³⁵ Por otro lado, el sistema olfativo forma una interfaz directa entre el SNC y el medio ambiente externo, lo que puede proporcionar una vía por donde se inhala al Mn y este puede ser translocado desde la cavidad nasal a las áreas del cerebro.³⁶ El Mn puede cruzar las sinapsis dentro de la vía olfativa y luego viajar a lo largo de las neuronas secundarias y terciarias a más sitios distales dentro del cerebro.³⁷

1.2.2.1. Transporte a través de la barrera hematoencefálica

El cerebro es el órgano más vulnerable a la toxicidad por Mn, la mayor parte del Mn absorbido por el cuerpo se encuentra en estado de oxidación de Mn(II) o Mn(IV). La proteína transportadora DMT1 ha sido involucrada en el transporte del Mn en el duodeno, y la vía de transporte de esta proteína se da por un proceso activo. Las formas divalentes y tetravalentes pueden unirse a la macroglobulina α_2 , que conduce su rápida eliminación de la circulación. El Mn en estos estados de oxidación puede atravesar la barrera hematoencefálica, ya sea como iones libres, unidos a la DMT1 o como pequeños complejos tales como Mn-citrato.¹⁸

El Mn(II) puede ser oxidado a Mn(III) en la sangre por acción de la enzima ceruloplasmina, y dentro de las células por la enzima superóxido. El

Mn(III) no es capaz de unirse a la macroglobulina α_2 , entonces forma un conjugado con la TF, dando lugar a su eliminación lenta del organismo. El Mn(III) puede llegar al SNC por una vía de endocitosis a través del complejo TF-Mn. Una vez dado el proceso, la TF permanece en la superficie luminal dentro de la célula endotelial, después de la liberación endosomal de Mn(III). Subsecuentemente, el Mn(III) es convertido a Mn(II), que puede ser captado por las mitocondrias que utilizan un uniporte de calcio. El Mn liberado en el fluido extracelular puede ser captado por las neuronas y oligodendrocitos para su almacenamiento y uso.³⁸

1.2.2.2. Acumulación del manganeso en regiones del cerebro

Se ha visto que el Mn se acumula rápidamente en el plexo coroideo, con una afluencia de 150 veces más que lo que entra en la corteza cerebral, todo esto a niveles de plasma constantes. La distribución de Mn difiere entre animales jóvenes y adultos. Mientras que la acumulación es mayor en el estriato, mesencéfalo y cerebelo en animales jóvenes de 21 días de edad, los adultos tienen mayores niveles en la corteza, estriato, globo pálido y la sustancia negra.³⁹

1.2.3. Metabolismo y excreción

El Mn no es metabolizado, este metal es absorbido y excretado sin sufrir alteraciones. La eliminación de Mn del organismo puede ser alterada por las tasas de ingreso de este. La excreción biliar es el mecanismo principal por el que el Mn se excreta en las heces y se retira del cuerpo. La excreción biliar es reducida en los animales recién nacidos y la exposición durante este período de desarrollo puede dar lugar al aumento del transporte de Mn hacia el cerebro y otros tejidos. También se produce la excreción del Mn a través del páncreas, pero es probable que sólo represente una pequeña fracción de la cantidad absorbida de Mn. La excreción urinaria de Mn es generalmente baja. Pequeñas cantidades de Mn también se excretan en la leche materna y pueden variar durante la

lactancia. El Mn es eliminado desde el cerebro a través del tiempo (vida media de aproximadamente 50 - 75 días en roedores y primates no humanos). En general, hay poca variación entre especies con respecto a la concentración de Mn en los tejidos.^{4,34}

1.3. Cuadro clínico

1.3.1. Toxicidad aguda

La inhalación de los vapores de Mn, como los de otros metales, puede causar la denominada “fiebre de humos metálicos” en algunas personas, que se caracteriza por neumonitis aguda, traqueobronquitis y edema pulmonar. Una intoxicación oral produce gastroenteritis aguda hemorrágica, edema de glotis, infección respiratoria aguda, pérdida de electrolitos y perforación de vísceras.¹⁶

1.3.2. Toxicidad crónica

La toxicidad crónica por Mn fue reconocida por primera vez en 1837 en Chile, entre los trabajadores dedicados a la molienda de los minerales de Mn, donde los síntomas incluían temblores, enlentecimiento motor, alteraciones en la marcha y el habla, cambios de humor, alucinaciones y un enlentecimiento cognitivo general. A este estado se le refirió inicialmente como “locura mangánica”, el cual fue finalmente llamado manganismo, lo que paso a ser un riesgo ocupacional importante en las regiones mineras relacionadas a este metal, por ejemplo, en países de Sudamérica y África.³¹ Por otro lado, a lo largo de los últimos 25 - 30 años, la soldadura ha sido reconocida como una de las ocupaciones de mayor riesgo a desarrollar toxicidad por la exposición al Mn.⁴⁰ Además, se observó que el consumo de agua contaminada con este metal, también es causa de intoxicaciones.⁴¹

La toxicidad crónica por Mn inhalado, especialmente el que va al SNC, es mucho más importante que la toxicidad aguda; en algunos casos, se han

observado síntomas después de la exposición de los trabajadores a menos de 1 mg de Mn/m³. Varios estudios en personas expuestas en el trabajo a niveles relativamente bajos de Mn (y por lo general de forma simultánea a otros metales), confirman la acción tóxica a largo plazo del Mn sobre el SNC y la fertilidad; también es relacionado con posibles efectos cancerígenos.¹⁶

La neurotoxicidad producida por el Mn se da en cuatro fases, generalmente caracterizadas por síntomas típicos. Esta toxicidad comienza con una (i) fase prodrómica con síntomas generales como calambres, anorexia, hipersomnias, dolor de cabeza y fatiga; y luego sigue con (ii) cambios en el neuro-comportamiento, a menudo descrito como “locura mangánica”, con agitación general y una reducción en la habilidad de concentración, esta fase también incluye psicosis y alucinaciones. (iii) Sigue una fase parkinsoniana con rasgos característicos como temblores, rigidez, cara de máscara y un habla monótona, acompañados con problemas en el andar. La última fase involucra (iv) distonía, esta ha sido descrita como un síntoma prevalente en casos de intoxicación severa por Mn.^{42,43}

1.3.3. Manganismo versus la enfermedad de Parkinson

El trastorno neurológico más importante causado por la excesiva exposición al Mn, es el manganismo, los primeros síntomas de manganismo severo son la anorexia, debilidad y apatía. Tras una fase maníaca inicial, que se caracteriza por una risa inadecuada, aumento del deseo sexual, insomnio, delirios o alucinaciones, un período de depresión, alteraciones en el equilibrio, impotencia y exceso de sueño.⁴⁴

El Parkinson es un síndrome clínico que consiste en temblores, bradiquinesia, rigidez, problemas de equilibrio, además de diversos síntomas no motores. Hay muchas causas de parkinsonismo, tales como enfermedades neurodegenerativas, drogas, causas vasculares, lesiones estructurales, infecciones y sustancias tóxicas. La enfermedad de Parkinson o también llamada

parkinsonismo idiopático, es la forma más común de parkinsonismo observado en clínica. Existe degeneración de la sustancia negra, lo que resulta en la pérdida de dopamina estriatal.⁴⁵

Existen muchas similitudes entre las manifestaciones clínicas entre el manganismo y la enfermedad de Parkinson. Ambos estados se caracterizan por rigidez, temblores, distonía y bradiquinesia, lo que puede ser explicado parcialmente por la implicación de los ganglios basales en ambos casos. Sin embargo, se encuentran diferencias como menor frecuencia de temblores, mayor frecuencia de distonía y una característica “caminada de gallo” con la propensión de caer hacia atrás en el manganismo. Mientras que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra es la lesión primaria en la enfermedad de Parkinson, el manganismo se caracteriza por la disfunción de este sistema o la incapacidad de liberar dopamina.⁴⁶

1.4. Mecanismos de toxicidad

1.4.1. Interacciones entre el manganeso y otros metales

La mayoría de los efectos del Mn a nivel celular y subcelular son similares a los del hierro. Ambos son metales de transición, adyacentes entre sí en la tabla periódica, y por lo tanto tienen radios iónicos similares. En condiciones fisiológicas, ambos llevan cargas similares (II y III). También ambos se unen fuertemente a la transferrina y son preferentemente captados por la mitocondria celular. Se ha encontrado que el Mn interfiere con muchas funciones celulares donde interviene el hierro, especialmente al involucrarse con enzimas que tienen grupos activos tales como la aconitasa, NADH-ubiquinona reductasa y la succinato deshidrogenasa. La aconitasa se encuentra en dos formas, aconitasa 1 (forma citoplasmática) que participa en la regulación de la homeostasis del hierro, mientras que la aconitasa 2 (forma mitocondrial) que es responsable de la interconversión de L-citrato e isocitrato en ácido tricarbóxico.⁴⁷ El Mn es un antagonista de hierro, puede sustituir al Mg(II) en

ciertas enzimas y debido a su radio iónico similar puede interferir con el metabolismo del calcio.¹⁶

1.4.2. Daño oxidativo

El daño oxidativo a lípidos, proteínas y al ácido desoxirribonucleico también ha sido estudiado como un posible mecanismo de acción para la toxicidad inducida por Mn. Se considera al cerebro como el más susceptible al daño oxidativo, ya que este tiene una alta tasa de metabolismo oxidativo, y solo moderados niveles de enzimas antioxidantes. El hierro actúa como potente pro-oxidante cuando está en estado trivalente. El metabolismo de la dopamina también puede actuar como un factor de riesgo para el stress oxidativo por someterse a una autooxidación espontánea para formar quinonas citotóxicas. La producción de especies reactivas del oxígeno por la oxidación del hierro y la dopamina puede ser acelerada por la presencia del Mn, aunque el Mn también es capaz de producir especies reactivas del oxígeno independientemente de estos procesos. Aumentando la expresión de las proteínas de respuesta al hierro, como la TF, el Mn puede conducir a la absorción excesiva de hierro, que puede facilitar la citotoxicidad mediada por el hierro.⁴⁸

El daño oxidativo causado por el Mn puede causar que la mitocondria sea un blanco importante, debido a la acumulación selectiva de este metal en este compartimiento subcelular. El Mn(II) llega a la mitocondria por vía uniporte de Ca(II), donde este flujo es lento. Además, el ADN mitocondrial es más susceptible a daño oxidativo producido por Mn que el ADN nuclear, debido a (i) falta de protección a las histonas, (ii) ausencia de intrones, (iii) estrecha proximidad a la membrana mitocondrial (lugar de generación de especies reactivas del oxígeno) y (iv) mecanismos de reparación limitados. El Mn puede tener efecto dual sobre los niveles de stress oxidativo mitocondrial, por servir como un cofactor para la enzima MnSOD, esto puede ayudar a la conversión de superóxido a peróxido de hidrogeno, que luego puede dividirse en productos no tóxicos, agua y oxígeno. Sin embargo, este peróxido de hidrogeno también puede

formar radicales altamente reactivos del hidroxilo por medio de la reacción de Fenton.⁴⁹ Las especies reactivas del oxígeno producidas por el Mn pueden también inducir oxidación de lípidos poliinsaturados, y está asociado con una respuesta inflamatoria.⁵⁰

El Mn también puede alterar los niveles de enzimas antioxidantes, y esto acelera el daño oxidativo. La glutamina sintetasa, es una enzima que cataliza la conversión de glutamato a glutamina, esta es altamente susceptible a degradación oxidativa. Además, el glutatión y la metalotioneína, ambas enzimas antioxidantes involucradas en la neutralización de especies reactivas de oxígeno, son afectadas por niveles excesivos de stress oxidativo.⁵¹⁻⁵³ Se ha visto que estas vías de toxicidad inducidas por Mn podrían ser bloqueadas por pretratamientos con antioxidantes, dando soporte al stress oxidativo como un mecanismo de acción en la toxicidad por Mn.⁵⁴

1.5. Lineamientos de exposición al manganeso

La concentración de referencia (RFC) es definida por la EPA como una estimación de la exposición por inhalación continua de la población humana, sin causarle deterioro en sus funciones, en este caso para el Mn se basan en el deterioro de la función neuro-conductual, el valor de RFC de inhalación para el Mn respirable es de 50 ng Mn/m³.⁵⁵

Los valores límite de la concentración media ponderada de tiempo para una jornada laboral de 8 horas diarias y 40 horas semanales a la que todos los trabajadores pueden estar expuestos repetidamente sin efectos adversos, según la Conferencia Americana de Higienistas Industriales, para la fracción de aerosol inhalable de compuestos elementales e inorgánicos de Mn es de 0,2 mg Mn/m³ y 0,1 mg Mn/m³ para el aditivo de gasolina MMT.⁵⁶

La concentración de Mn, recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su publicación “*Air Quality Guidelines for Europe*”, es de 0,15

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ en aire.⁵⁷ La Agencia de Protección Ambiental (EPA), recomienda 0.05mg/L de Mn en agua potable, y un consumo máximo de Mn en agua de 140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$.⁵⁸

1.6. Efectos sobre la neurotransmisión

1.6.1. Efecto sobre los sistemas norepinefrina y dopaminérgico

La norepinefrina y la dopamina cumplen roles en la regulación de la función motora, la fase inicial de hiperactividad de animales en desarrollo expuestos a altos niveles de Mn está acompañada por un incremento complementario en los niveles de estas catecolaminas y los metabolitos de dopamina como son el ácido 3,4 dihidroxifenilacético y el ácido homovanílico. El incremento de la actividad de la monoamino oxidasa en el estrato produce niveles altos de ácido homovanílico, lo que indica altos volúmenes de rotación de las catecolaminas. Sin embargo, la existencia de elevados niveles de catecolaminas a pesar de los altos volúmenes de rotación, dan la posibilidad a una mayor tasa de síntesis de catecolaminas en la fase temprana de la toxicidad por Mn.⁵⁹

La tirosina hidroxilasa, la enzima limitante de la velocidad de síntesis de las catecolaminas, es estimulada por Fe(II). Ya que existen reportes de las similitudes metabólicas entre Mn(II) y Fe(II), los elevados niveles de dopamina y norepinefrina se presumen que son resultado de la sobreactivación de tirosina hidroxilasa por Mn(II). Además, se ha demostrado un incremento en la actividad de la tirosina hidroxilasa durante la fase inicial (1-3 meses) de la toxicidad por Mn. Por lo tanto, se ha planteado la hipótesis de que la fase psiquiátrica temprana de la intoxicación por Mn con síntomas de hiperactividad podría deberse a la elevación de los niveles estriatales de dopamina y norepinefrina, como resultado del incremento en la estimulación de la tiroxina hidroxilasa.⁶⁰

Estudios en roedores y primates han mostrado una reducción de los niveles de dopamina debido a la acumulación de Mn en subestructuras de los

ganglios basales, especialmente el globo pálido, lo que sugiere que este metal interrumpe de alguna manera el sistema dopaminérgico.⁶¹

1.6.2. Efectos sobre los niveles de catecolaminas

En un estudio se observó que después del incremento en la fase inicial, los niveles de catecolaminas disminuyen, llegando a compararse a los niveles del control después de 120 a 180 días de tratamiento. Aunque el incremento en la acumulación de Mn en el estriato se niveló después de 240 días de tratamiento (último punto de tiempo en estudio). Esta fase final se piensa que es resultado de la degeneración neuronal producida por la toxicidad crónica por Mn o debido a una disminución de la inducción del Mn en la actividad de la tirosina hidroxilasa.⁶⁰

1.6.3. Efectos sobre el sistema GABAérgico

Una exposición a corto plazo de Mn con una dosis de 6 mg/Kg/día administrada intraperitonealmente, provoca una disminución de los niveles de GABA, con una disminución simultánea en el sistema inhibitorio cerebral.⁶² Por el contrario, una exposición acumulativa a largo plazo de 14.4 mg/Kg de $MnCl_2$ intraperitonealmente por 5 semanas, provoca un incremento del nivel de GABA extracelular sin efectos sobre la dopamina.

Otro experimento expuso a las ratas a una dieta de 100 ppm de Mn durante su periodo de desarrollo (7 días de gestación a 21 días post-nacimiento) y se observó un incremento del nivel de GABA y una disminución del nivel de glutamato en el cerebro. El aumento inicial de la actividad motora que se ve con la exposición a niveles bajos de Mn, es probable que se produzca debido a una disminución en el efecto inhibitorio, con un incremento simultáneo en los niveles de dopamina. Después de las exposiciones acumulativas de Mn, el aumento de los niveles de GABA puede provocar la inhibición de la liberación de dopamina estriatal a un nivel estadísticamente significativo.⁶³

1.6.4. Efectos sobre el sistema glutamatérgico

Con la exposición crónica, el Mn puede acumularse en la sinapsis glutamatérgica, y puede ser liberado de estas neuronas por los canales de Ca(II) e impulsarse de forma dependiente. Esta liberación de Mn(II) entonces puede bloquear los canales voltaje dependiente de calcio, suprimiendo la actividad neuronal y los parámetros de recaptación del glutamato en las células vecinas. En el cerebro el Mn está unido a metaloproteínas, siendo la más relevante la glutamina sintetasa en los astrocitos. La neurotoxicidad del Mn puede deberse a un evento excitotóxico indirecto causado por la alteración del metabolismo del glutamato.⁶⁴

1.7. Tratamiento

Clínicamente, la levodopa se ha utilizado para tratar los síndromes extrapiramidales, pero con beneficios limitados, la terapia de quelación con ácido etileno-diamino tetraacético (EDTA) ha demostrado en algunos casos producir resultados clínicos prometedores.⁶⁵

Ya que todavía no se tiene un tratamiento viable para la intoxicación por Mn, en la actualidad se ha encontrado nuevas alternativas como el ácido para-aminosalicílico (PAS) y el ebselen (Ebs) que han demostrado ser eficaces en la reducción de la carga de Mn en el cuerpo, la neuroinflamación, el estrés oxidativo y alteraciones de actividad locomotora inducidos por Mn.⁶⁶

Se ha determinado el uso de antioxidantes como estrategia terapéutica para la protección contra el daño oxidativo del ADN inducido por Mn(II).⁶⁷

2. Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado con un color gris azulado que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre. Sin embargo, rara vez se encuentra en forma

natural como un metal, por lo general se encuentra combinado con dos o más elementos para formar compuestos de Pb. Estos compuestos de Pb comprenden 0,002% de la corteza terrestre.⁶⁸

El Pb tiene un peso atómico de 207.2 g/mol y una densidad de 11.34 g/cm³. Tiene un punto de fusión bajo de 327.46 °C. Pertenece al Grupo IVA en el sistema de elementos y se encuentra en tres estados de oxidación principales Pb(0), Pb(II) y Pb(IV).⁶⁹

Éste metal ha sido utilizado por los seres humanos durante miles de años y está muy extendido hoy en día en productos tan diversos como: tubos, baterías de almacenamiento, pigmentos y pinturas; esmaltes, productos de vinilo; pesas, municiones, cubiertas de cables y protección contra la radiación.⁶⁸

El Pb es un contaminante ambiental ubicuo, y el envenenamiento por éste es considerado como una de las afecciones prevenibles más importantes de origen ambiental. El amplio espectro de efectos tóxicos, la prevalencia en el medio ambiente y el gran número de individuos afectados hace de la exposición al Pb un problema de salud de magnitud mundial.⁷⁰

2.1. Fuentes de exposición al plomo

2.1.1. Pintura con plomo

La pintura con Pb fue comúnmente usada hasta 1978. La exposición al Pb a partir de la pintura es común en casas antiguas. Las pinturas pueden deteriorarse y el Pb que se desprende puede contaminar el aire y suelo, y éste puede también situarse sobre varias superficies. Los niños con pica y a los que les gusta meterse la mano a la boca corren mayor riesgo de exposición al Pb a partir de fragmentos de pintura y suelos contaminados con partículas Pb. Los juguetes pintados con pinturas con Pb importadas de otros países son también una fuente de exposición para niños pequeños. Otra fuente de exposición

relacionada son las tuberías de Pb que todavía son usadas en un gran número de edificaciones.⁷¹

2.1.2. Plomo en alimentos

Los alimentos guardados en recipientes pintados con pinturas a base de Pb o esmaltes cerámicos pueden contaminarse con una cantidad significativa de Pb. Las latas con puntos de soldadura a base de Pb continúan siendo usadas por industrias de envasado de alimentos de varios países.⁷² El Pb puede introducirse en los alimentos a través del proceso que siguen las plantas al absorber nutrientes del suelo o la deposición atmosférica en superficie de las plantas, durante el transporte al mercado, el procesamiento y la preparación de los alimentos. El agua puede contaminarse con Pb debido a tuberías de Pb o tuberías de cobre con puntos de soldadura a base de Pb, usadas para suministrar el agua en las viviendas.³

2.1.3. Gasolina con plomo

En la combustión de gasolina con Pb se estima que se ha dispersado alrededor de 4 millones de toneladas métricas de Pb(II) a la atmósfera y al suelo durante 1923 a 1986. La Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) ha estimado que la gasolina con Pb ha sido responsable del 90% del Pb depositado en la atmósfera. Mientras que el uso de convertidores catalíticos en los automóviles ha disminuido los niveles de emisión de Pb, algunos países en vías de desarrollo de África, América y el Medio Oriente que continúan usando gasolina con Pb, tienen cargas ambientales significativamente elevadas del mismo y subsecuentemente mayores niveles de Pb en sangre en sus poblaciones.³

El tetra-etilo de plomo se utiliza como un aditivo de la gasolina para mejorar el rendimiento del motor. Este ha sido eliminado de los suministros de gasolina de la mayoría de países, pero todavía se utiliza en cerca de 12 países.⁷³

En el Perú se comenzó a reducir el límite máximo de contenido de Pb en la gasolina progresivamente desde el año 1998 y se dio plazo para una eliminación total del mismo hasta inicios del 2005.⁷⁴

2.1.4. Exposición ocupacional

Ocupaciones de alto riesgo de exposición al Pb incluyen a la plomería, pintura en aerosol, soldadura y fundición de mineral. Las exposiciones al Pb son también altas en trabajadores industriales involucrados en la producción de baterías recargables, esmaltes cerámicos, tarjetas de circuitos, municiones y equipos militares. La Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades reportó que el 2003 entre 0.5 y 1.5 millones de trabajadores están expuestos a Pb(II) cada año en sus lugares de trabajo.³

El Pb utilizado por la industria proviene de minerales extraídos o de metal reciclado de chatarra o baterías. Hoy en día, la mayor parte de la iniciativa en el comercio global se obtiene a partir del reciclaje de baterías de Pb. La mayoría (97%) de las baterías en el mundo se reporta que son recicladas, principalmente en los países de bajos ingresos y sobre todo en contextos informales, en gran medida sin control.³

2.1.5. Sub-poblaciones con mayor riesgo

La exposición continua a bajos niveles de Pb debido a la contaminación generalizada en el ambiente ha causado mayor preocupación que los casos de toxicidad aguda por Pb. Los niños expuestos a elevados niveles de Pb durante su infancia pueden mostrar efectos perjudiciales persistentes hasta su adolescencia.⁷⁰ Mientras que los efectos de la exposición temprana al Pb se pueden compensar, estos pueden llegar a ser desenmascarados con el envejecimiento, cuando el cerebro comienza a perder su plasticidad y su potencial de reservas.⁷⁵

Las mujeres embarazadas y post-menopáusicas, madres lactantes y pacientes con osteoporosis son también poblaciones con alto riesgo, ya que los almacenes de Pb en el hueso son movilizados durante estos periodos. Los niños con deficiencia en hierro y personas que sufren de enfermedad renal también constituyen grupos con alto riesgo.⁷⁶

El nivel socioeconómico ha sido reconocido como un factor en la prevalencia de toxicidad por Pb. La ATSDR ha reportado que las poblaciones de bajos ingresos presentan elevados niveles de Pb en sangre.³ Por otro lado, los fetos expuestos indirectamente al Pb a través de la madre (in útero) también constituyen una población con alto riesgo de padecer ésta intoxicación.⁷⁷

2.2. Cinética

2.2.1. Absorción

La absorción del Pb se da por un proceso activo, a través de los enterocitos del intestino delgado. La captación de Pb a través del tracto gastrointestinal es mayor en los niños, y decrece con el aumento de la edad. Una dieta deficiente en calcio puede conducir a un incremento de la movilización del Pb hacia los huesos.⁷⁸

El estado nutricional de una persona puede afectar la cantidad de Pb absorbido, se ha observado una mayor absorción cuando existe deficiencia de calcio y hierro.⁷⁷ En los niños que viven en ambientes con alta exposición al Pb, los niveles de éste metal en sangre fueron mayores en los que presentaban deficiencia de hierro.⁷⁹ Además, se ha reportado una relación inversa entre los niveles de Pb en sangre en recién nacidos y los niveles de hierro en sus madres. Estos estudios indican que ambos metales estarían utilizando un transportador común, como es la proteína transportadora DMT1, aunque la sobreexpresión de la DMT1 resultó en un incremento en el transporte de Pb(II)⁸⁰ y un estudio en animales sin DMT1 no mostró ningún efecto sobre los niveles de captación

Pb(II).⁸¹ Por lo tanto, aunque la DMT1 posee la habilidad de transportar Pb(II), es probable que no sea el mecanismo de transporte principal.

2.2.2. Distribución

El Pb en la sangre está ligado a proteínas plasmáticas y eritrocitos, y solo el 0.01% de Pb en el plasma está en una forma biodisponible libre. Las proteínas ligadoras de Pb de bajo peso molecular han sido encontradas en tejido sanguíneo, cerebral y renal, tanto en humanos como en ratas. Estas proteínas están involucradas en la mediación de la biodisponibilidad y el potencial tóxico del Pb. Después de unirse al Pb, estas pueden agregarse y formar cuerpos de inclusión intranucleares.⁸²

El hueso es el principal depósito de Pb en el organismo. La fracción de Pb almacenado presente en los huesos se incrementa con la edad, desde aproximadamente 73% en la infancia a alrededor de 80 a 95% durante la adultez. Sin embargo, estas fracciones son una mayor carga sobre los tejidos blandos de los niños que de los adultos, y esto se debe a una mayor absorción de Pb por huesos blandos y el mayor recambio óseo en niños.⁸³ El Pb puede pasar a través de la placenta y también formar parte de la leche materna, presentándose como un riesgo adicional de los neonatos en casos de exposición de las madres al Pb.⁸⁴

2.2.2.1. Transporte a través de la barrera hematoencefálica

A pesar de que se ha reportado que niveles elevados de Pb pueden comprometer la integridad de la barrera hematoencefálica, hay poca evidencia que niveles de Pb en sangre de 20–50 µg/dL causen daño. La captación de Pb a través de la barrera hematoencefálica se lleva a cabo a una velocidad considerable. Para estudiar la cinética del transporte de Pb se utilizó el radio-trazador 203-Pb. Se observó que la acumulación en el cerebro en presencia de concentraciones plasmáticas bajas de 203-Pb fue lineal, lo que indica una gran capacidad de unión dentro del cerebro.⁸⁵

El Pb puede cruzar la barrera hematoencefálica por medio de varios mecanismos. Una captación no específica puede tener lugar cuando el Pb está en forma de ion hidróxido de plomo (PbOH^+).⁸⁵ Por otro lado el transporte de Pb a través de la membrana celular se podría realizar por medio de los canales de calcio voltaje dependientes o por la activación del depósito de los canales de calcio.^{86,87} El Pb no tiene afinidad por los receptores de TF y aunque el transporte se ha observado que se produce a través de la DMT1, esta ruta no es el único medio.⁸¹

2.2.2.2. Acumulación del plomo en regiones del cerebro

Después de atravesar la barrera hematoencefálica, el Pb se acumula dentro del cerebro, y las concentraciones se mantienen altas, incluso cuando los niveles en sangre caen rápidamente. En el cerebro maduro, los astrocitos sirven como el sumidero del Pb(II). Interpuestos entre las células endoteliales capilares que forman la barrera hematoencefálica y neuronas en el SNC, estas células gliales capturan al Pb(II) dentro de los sitios no mitocondriales, protegiendo así sus propios sitios de respiración y también los sitios de respiración de las neuronas más vulnerables. Sin embargo, la acumulación de Pb en los astrocitos y en los capilares cerebrales puede dar lugar a niveles elevados de Pb que se mantienen en el cerebro; a pesar de que los niveles de Pb en sangre caigan rápidamente.⁸⁸ El Pb se acumula preferentemente en el hipocampo, la amígdala cerebral y el cerebelo. Se ha encontrado que el daño cerebral inducido por el Pb se produce preferentemente en el córtex prefrontal (mediador de las funciones cognitivas), el cerebelo (mediador de la ejecución de las habilidades motoras) y el hipocampo (mediador del almacenaje de memoria).⁸⁹

2.2.3. Metabolismo y excreción

El Pb inorgánico que es absorbido se excreta sin cambios, principalmente en la orina. El Pb no absorbido puede ser eliminado en las heces. El Pb orgánico

de la gasolina, en la forma de tetraetilo o tetrametilo de plomo, puede someterse a una desalquilación oxidativa y convertirse en metabolitos altamente neurotóxicos tales como trietilo de plomo y Pb inorgánico.⁹⁰ La vida media de Pb en sangre es de 35 días, además puede permanecer en el cerebro por alrededor de 51-74 días y en los huesos por décadas.⁹¹

2.3. Cuadro Clínico

2.3.1. Toxicidad aguda

En adultos la toxicidad aguda por Pb se manifiesta con dolor abdominal, constipación, vómitos, anorexia e hiperirritabilidad, a niveles de Pb en sangre en un rango de 60-100 $\mu\text{g/dL}$. La parálisis nerviosa se da a niveles mayores de Pb en sangre (90-120 $\mu\text{g/dL}$); mientras que los signos de encefalopatía (coma, convulsiones y vómitos explosivos) se ponen en manifiesto solo en niveles de Pb en sangre mayores a 120 $\mu\text{g/dL}$.⁹² La neuropatía periférica precede a los síntomas neurológicos de la toxicidad por Pb, y ocurre a niveles de Pb en sangre de aproximadamente 50-60 $\mu\text{g/dL}$. La mayoría de los síntomas experimentados por los adultos se pueden observar cuando cesa la exposición al Pb. No existe un nivel de concentración de Pb en sangre que pueda considerarse exento de riesgo.⁹³

Los niños que sufren toxicidad aguda por Pb manifiestan síntomas como letargia, marcha inestable, cefalea, reducción de la sensibilidad, convulsiones, anorexia, vómitos, coma y encefalopatía. Ciertos signos son síntomas del trastorno de hiperactividad con déficit de atención (THDA) como la mayor distracción y la incapacidad para inhibir las respuestas del comportamiento inapropiado observado tanto en niños como en animales expuestos a Pb. El Pb puede dañar varios sistemas en el organismo (Ej. renal, hematopoyético y esquelético), pero el SNC es el blanco principal. La encefalopatía aguda ocurre en respuesta a la exposición aguda al Pb y es conocida por causar un daño permanente al SNC.³

Los niveles de Pb en sangre mayores a 90 $\mu\text{g/dL}$ pueden causar una encefalopatía hemorrágica con edema severo y una alta mortalidad. Esto es en parte debido a la habilidad de éste metal de interrumpir la integridad de las células capilares endoteliales de la barrera hematoencefálica, comprometiendo sus funciones.³

2.3.2. Toxicidad crónica

Lo más común es la exposición a niveles bajos de Pb, dependiendo de la dosis se observa una disminución en las funciones intelectuales en niños expuestos al Pb durante la primera infancia.⁷⁰

Este sutil efecto sobre los circuitos neuronales se manifiesta como anomalías en el aprendizaje y el comportamiento, las cuales pueden estar acompañadas de convulsiones recurrentes y retardo mental. La hiperactividad y déficit de atención también han sido reportadas. Aunque no se ha observado ninguna evidencia de lesión cerebral a este nivel de exposición, el déficit neurológico sufrido puede ser permanente.⁹⁴

2.4. Mecanismos de toxicidad

2.4.1. Interacciones entre plomo y otros metales

Se cree que el plomo y el zinc interactúan con proteínas transportadoras idénticas, y por lo tanto compiten por su absorción a través del tracto gastrointestinal. Además, el plomo compete con el zinc por el sitio de unión rico en cisteína de la enzima ácido δ -aminolevulínico deshidratasa. Ésta enzima cataliza el segundo paso en la vía de síntesis del grupo hemo. El bloqueo no competitivo por este sitio de unión al sustrato por parte del Pb puede ayudar a explicar la aparición de la anemia como uno de los síntomas de la intoxicación por Pb.⁹⁵

Aunque los radios iónicos del Ca(II) (99 pm) y del Pb(II) (120 pm) son significativamente diferentes, se conoce que estos dos cationes compiten por sitios de unión y vías de transporte similares. El Pb puede ser transportado por múltiples vías específicas para Ca(II) como los canales de calcio voltaje dependientes.⁸⁷

2.4.2. Daño Oxidativo

La exposición al Pb ha sido asociada con el daño oxidativo. La exposición a niveles bajos de Pb ha mostrado que incrementa los productos de oxidación lipídica tanto en la sangre como en el cerebro, con niveles más altos de estrés oxidativo medidos en el estriato, el tálamo y el hipocampo. El Pb puede causar muerte neuronal por inducir apoptosis. Mediante la interrupción del homeostasis del calcio, el Pb puede aumentar los niveles de calcio celular, lo que a su vez puede estimular la apertura de los poros mitocondriales. La liberación del citocromo C desde la mitocondria puede activar las caspasas, provocando una muerte celular apoptótica.⁹⁶

2.5. Lineamientos de exposición al plomo

El centro de control de enfermedades de los Estados Unidos ha revisado los niveles permisibles de Pb en sangre varias veces a lo largo de los años. El rango de referencia fue originalmente establecido a 60 µg/dL (1971), y fue progresivamente reduciéndose a 40 µg/dL (1975), 30 µg/dL (1978), 25 µg/dL (1985), 10 µg/dL (1991) y finalmente a 5 µg/dL (2012).⁹⁷

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que los niveles mínimos de Pb en la sangre, a los cuales no se observa un efecto sobre la salud de las personas 5 µg/dl, y que sobre esta base la OMS recomienda, un nivel de concentración de Pb en el aire de 0.5 µg/m³ y en el agua 10 µg/L anual.⁹⁸

En el Perú el estándar de calidad de aire para Pb es de $0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (valor anual), y el valor de tránsito anual de concentración de Pb es de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$.⁹⁹

2.6. Efectos sobre la neurotransmisión

2.6.1. Efectos sobre el sistema glutamatérgico

Este sistema es el punto focal de la neurotoxicidad inducida por el Pb. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio principal del cerebro, mediante la transmisión sináptica que se da por la unión a diversos receptores ionotrópicos y metabotrópicos.¹⁰⁰

La liberación de glutamato sináptico es afectada por el Pb de una manera bifásica, con soluciones en agua potable de acetato de Pb a dosis bajas (0.1 y 0.2%) se disminuye la liberación, mientras que exposiciones más altas (0.5 y 1.0%) se incrementa la liberación.¹⁰⁰ Se ha observado un patrón similar en la liberación total de glutamato que disminuye, tanto en grupos como en tipos de exposiciones diferentes. Esto permite concluir que el Pb puede afectar la liberación de los neurotransmisores independientemente que las exposiciones tengan lugar durante la gestación o la lactancia, y que sean de corta duración o continúen durante toda la vida.¹⁰¹

2.6.2. Efectos sobre el sistema colinérgico

Exposiciones a niveles bajos (0.2% de acetato de plomo) han mostrado que provocan un déficit persistente en la inervación colinérgica del hipocampo.¹⁰² La disminución de la expresión de ácido ribonucleico mensajero del transportador de acetilcolina y la colina-acetil transferasa ha sido reportada en ratas expuestas a dosis similares de Pb. A niveles altos de exposición (50 mg/kg de acetato de plomo por vía oral), reduce la actividad de la acetilcolinesterasa.¹⁰³

2.6.3. Efectos sobre el sistema dopaminérgico

Con exposiciones durante el periodo de desarrollo, 0.2% de acetato de plomo en el agua potable se reportó que causa un incremento en los niveles de dopamina y su metabolito, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético; indicando desregulación en los procesos sintéticos y metabólicos. Por el contrario, la exposición a 1% de acetato de plomo en el agua potable durante el desarrollo ha mostrado un decrecimiento en los niveles de dopamina, lo cual se ha sugerido que se debe a un efecto de daño celular inducido por Pb.¹⁰⁴

A niveles altos de exposición mejora la neurotransmisión catecolaminérgica y se reduce la actividad dopaminérgica en animales expuestos a Pb.¹⁰³ Estos efectos podrían deberse al decrecimiento de las actividades de la tirosina hidroxilasa y la monoamino oxidasa causado por el Pb. El decrecimiento de los niveles de dopamina y tirosina hidroxilasa también han sido reportados en exposiciones crónicas al Pb en ratas adultas.¹⁰⁴

2.6.4. Efectos sobre los sistemas noradrenérgico/adrenérgico

Se ha observado un aumento de la neurotransmisión catecolaminérgica en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo a exposiciones de 0.2% de Pb en solución, y se piensa que es debido a un incremento de la norepinefrina. Sin embargo, exposiciones a altos niveles (1% de Pb en solución o 50 mg/kg de acetato de plomo por vía oral) han mostrado disminuir los niveles de norepinefrina y epinefrina, además de mermar las actividades de la tirosina hidroxilasa y la monoamino oxidasa.¹⁰⁴

2.7. Tratamiento

Cuando el envenenamiento por Pb se ha diagnosticado, el primer curso de acción es suspender la exposición. Si la interrupción de la exposición es suficiente para tratar el envenenamiento depende del nivel de Pb en la sangre, la gravedad de

los síntomas clínicos, los trastornos bioquímicos y hematológicos, así como la naturaleza y la historia de la exposición. El enfoque terapéutico actual para el envenenamiento por Pb es aumentar la excreción de Pb por quelación. Varios quelantes están disponibles y se prescriben de acuerdo con las concentraciones de Pb en la sangre del paciente entre ellos tenemos al: Dimercaprol (BAL en aceite de cacahuete), Etilendiamino tetra-acetato disódico y cálcico (CaNa_2EDTA), D-penicilamina y el succimero. Además, se ha registrado que agentes antioxidantes pueden contribuir en la terapia de intoxicación por Pb.¹⁰⁵

3. Combinaciones de metales

Los datos actualmente establecidos en la evaluación de riesgos, límites de exposición y niveles permisibles de exposición de los productos químicos encontrados en el medio ambiente y los lugares de trabajo, se basan en estudios experimentales que observan los efectos de cada una de estas sustancias químicas de forma aislada. Aunque diversos factores como la edad, género y especie se han tomado en cuenta en diferentes estudios, esta metodología no incluye los efectos de la exposición a combinaciones de sustancias químicas, algo a lo que probablemente estaríamos expuestos en un ambiente de la vida real.¹² La probabilidad de una exposición a la combinación de metales se espera que sea mayor que la exposición a un solo metal. Actividades como la minería, soldadura, combustión de combustibles fósiles, uso de fertilizantes inorgánicos y la fabricación de papel, ladrillos, cemento, etc., contribuyen a esta contaminación multi-metal compleja de la biosfera.¹⁰⁶ Incluso cuando se trabaja con un solo metal, un trabajador probablemente puede estar expuesto a una combinación de varios otros metales, aunque en concentraciones mucho más bajas.

3.1. Factores relacionados a las exposiciones combinadas

Factores que deben ser considerados cuando se dan exposiciones combinadas:

- Las propiedades cinéticas de los compuestos en forma individual pueden cambiar en una mezcla como resultado de competición por rutas comunes

de absorción, unión a proteínas del suero, vías metabólicas o de excreción. Esto puede resultar en un aumento o disminución de los niveles de las sustancias químicas libres en los lugares de acción, en comparación con los niveles alcanzados en las exposiciones individuales de los tóxicos.

- Incluso con diferentes modos de acción, las sustancias químicas presentes en una mezcla pueden afectar el mismo sistema. Mientras que el cuerpo tiene mecanismos de compensación para hacer frente a los daños químicos, una “hipótesis de ataque múltiple” ha sido sugerida para daños por químicos en combinación. Esta hipótesis establece que cuando múltiples blancos dentro de un mismo sistema son atacados por diferentes sustancias químicas, el sistema ya no es capaz de mantener la homeostasis, lo cual puede ocasionar un daño acumulativo.
- La exposición a una combinación de químicos, especialmente en el periodo prenatal tardío o postnatal temprano, probablemente causaría alteraciones en los procesos de desarrollo del SNC. Los efectos en una parte del sistema pueden ser vastamente amplificados y retransmitidos a otras partes del sistema. Además, las diferencias entre los efectos de exposición a sustancias químicas de forma individual o múltiple puede que no sean evidentes hasta períodos tardíos en la vida.¹⁰⁶

3.2. Combinación de manganeso y plomo

Varios estudios sobre el Pb y el Mn de forma individual se han llevado a cabo, demostrando que ambos metales pueden ser extremadamente neurotóxicos. Estos dos metales son comúnmente encontrados juntos; por lo tanto, la posibilidad de una co-exposición es alta. Con el incremento del conocimiento sobre los efectos de la exposición a estos metales, las exposiciones ocupacionales en entornos industriales han ido disminuyendo en los últimos años. Sin embargo, como estos metales aún están siendo ampliamente usados en la producción de aleaciones ferrosas y no ferrosas, baterías, electrodos y pigmentos cerámicos, es por esto que los efluentes

con mezcla de metales emanados por estas industrias continúan contaminando la biosfera a niveles bajos. Por lo tanto, la preocupación se ha desplazado de una intoxicación aguda a una intoxicación crónica debida a la exposición a niveles bajos de estos metales. Los informes de la asociación entre los niveles bajos o subclínicos de los metales y los déficits de comportamiento y de aprendizaje se están incrementando. Los humos de soldadura pueden contener combinaciones de plomo, manganeso, arsénico, zinc, cromo, níquel y azufre, junto con gases tales como dióxido de carbono, monóxido de carbono y fluoruro de hidrógeno.¹⁰⁷

Los estudios epidemiológicos han mostrado niveles elevados de Pb y Mn en sangre, después de la exposición simultánea a ambos metales, a través de las emisiones vehiculares y la pica.¹⁰⁸ También, se ha demostrado que existe una relación positiva entre los niveles de Pb y Mn en sangre de niños y trabajadores expuestos a estos metales.¹⁰⁹ La deficiencia de hierro también dio lugar a una mayor acumulación de Pb con la exposición al Mn, y viceversa.¹¹⁰

Cada vez es más evidente que en la vida real, la incidencia de la toxicidad en el desarrollo neurológico es dependiente a la co-exposición a múltiples neurotóxicos presentes en el ambiente.¹² La co-exposición a diferentes metales puede tener efecto aditivo, sinérgico o antagónico. Datos sobre los efectos de las interacciones entre neurotóxicos, son vitales para el futuro establecimiento de políticas y valores de referencia de la exposición aceptable de niños en edad escolar. Recientemente se ha demostrado una interacción positiva entre los niveles sanguíneos de Pb y Mn, con una correlación negativa entre los niveles de inteligencia de niños en edad escolar co-expuestos a estos metales.¹³

4. Células neuroblastomas

El neuroblastoma es un tumor maligno del sistema nervioso simpático (SNS), y se presenta con mayor frecuencia en los niños menores de 5 años; rara vez ocurre en adultos. Se presenta en 1 de cada 100.000 niños. Es un tumor extracraneal pediátrico, y se produce cuando las células nerviosas inmaduras (neuroblastos) se vuelven

anormales y se multiplican sin control formando un tumor. Es un tumor que surge a partir de las células primitivas simpáticas que se derivan de la cresta neural y comprometen las células que forman los ganglios simpáticos o la medula suprarrenal. En consecuencia, los tumores primarios se encuentran más frecuentemente a lo largo del abdomen (30%), cuello y tórax (20%) y glándula suprarrenal (35%), por lo tanto, el neuroblastoma es considerado como un tumor del sistema nervioso simpático (SNS).¹¹¹

4.1. Línea celular de neuroblastoma

En 1946, Murray y Stout encontraron que células de tumores llevados a un medio de cultivo por un periodo corto, fácilmente elaboraban axones por lo que utilizaron cultivos *in vitro* de neuroblastoma como una herramienta para el diagnóstico del mismo cáncer. El cultivo del tumor de neuroblastoma por un periodo largo y la capacidad de diferenciación que muestran las células en medios de cultivos despertó el interés de investigadores en estudios de la propensión de células neuroblastomas para diferenciarse *in vivo* e *in vitro*.

El tejido tumoral puede obtenerse a partir de muestras de tumores primarios obtenidos de resecciones quirúrgicas, aspirados de medula ósea y ocasionalmente de sangre periférica. Comúnmente, las muestras de tumor sólido son colocadas en medios de cultivo, conteniendo suero fetal de bovino y la combinación de antibióticos penicilina-estreptomycin, la incubación es a 37°C en una atmosfera húmeda que contiene 5% CO₂.¹¹²

Los cultivos celulares proporcionan una plataforma eficiente para caracterizar la funcionalidad de las proteínas y los mecanismos moleculares, para entender la patología de la enfermedad y la infección, y para realizar evaluaciones preliminares de los efectos de drogas. En la neurobiología, los principales tipos de modelos de cultivo celular incluyen cultivos neuronales primarios derivados de ratas y ratones, y las líneas celulares de neuroblastoma tales como células B-35 de rata, células Neuro-2A de ratón, células PC12 de rata y células SH-SY5Y de humano.¹¹³

4.1.1. Neuroblastoma humana SH-SY5Y

Las células neuroblastomas SH-SY5Y son un subclon de la línea celular neuroblastoma parental SK-N-SH. Esta línea celular parental fue generada en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea. Las células SH-SY5Y presentan un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas. Esta línea celular se ha usado ampliamente como modelo de neuronas desde principios de la década de 1980, debido a que estas células poseen muchas propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas. Esta línea celular presenta actividad neuronal enzimática (tirosina y dopamina- β -hidroxilasas), captación específica de noradrenalina y expresa uno o más proteínas de neurofilamentos; estas células también expresan receptores opioides, muscarínicos y de factor de crecimiento nervioso.¹¹³

Las células SH-SY5Y poseen la capacidad de proliferar en cultivo durante largos períodos sin contaminación, un prerrequisito para el desarrollo de un modelo celular *in vitro*. En consecuencia, la línea celular SH-SY5Y se ha utilizado ampliamente en estudios neurológicos experimentales, incluyendo el análisis de diferenciación neuronal, metabolismo, función relacionada con neurodegeneración y procesos neuroadaptativos, neurotoxicidad, y neuroprotección.¹¹⁴

4.1.2. Neuroblastoma de rata B-35

La línea celular B-35 fue derivada de tumores del SNC de una rata neonatal en 1974. Esta línea celular ofrece una serie de ventajas para los investigadores que estudian las neuronas del SNC *in vitro*: presentan un fácil crecimiento, diferenciación y transferencia. Esta línea celular se ha usado ampliamente en el estudio de muerte celular neuronal, toxicología, diferenciación, análisis molecular de endocitosis, vías de señalización, etc.¹¹⁵

Las células B-35 tienen un cariotipo casi normal y muestran propiedades neuronales como la excitabilidad de la membrana y la expresión de las enzimas

para el metabolismo de neurotransmisores. Además, esta línea celular expresa acetilcolinesterasa, ácido glutámico descarboxilasa, ácido γ -aminobutírico, y niveles normales de enolasa específica neuronal, pero no tirosina hidroxilasa, receptores de acetilcolina, o marcadores gliales como el S100. En cultivo, las células B-35 crecen débilmente unidas a las placas de cultivo, probablemente debido a un bajo nivel de producción de colágeno. Adicionalmente, esta línea celular tiene la capacidad de establecer líneas celulares estables.¹¹⁶

5. Estudios en células

5.1. Método de exclusión de viabilidad celular

La prueba de exclusión con colorante se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul tripán, la eosina o el propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. En esta prueba, una suspensión de células se mezcla con el tinte y luego se llevan a un contador automático de células para determinar si las células incluyen o no al colorante. Por lo tanto, una célula viable tendrá un citoplasma claro, mientras que una célula no viable tendrá un citoplasma azul.¹¹⁷

5.2. Ensayo de viabilidad celular

El CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad, ésta solución contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones, el etosulfato de fenazina (PES). El PES mejora la estabilidad química, lo que le permite ser combinado con el MTS para formar una solución estable. El MTS (reactivo de Owen) es bio-reducido por las células formando el producto coloreado formazán (**Fig. 1**), que es soluble en medio de cultivo tisular. Esta conversión es presumiblemente llevada a cabo por NADPH o NADH, los cuales son producidos por deshidrogenasas en las células

metabólicamente activas. La absorbancia del producto formazán se puede medir usando el lector de 96 micro placa a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.¹¹⁸

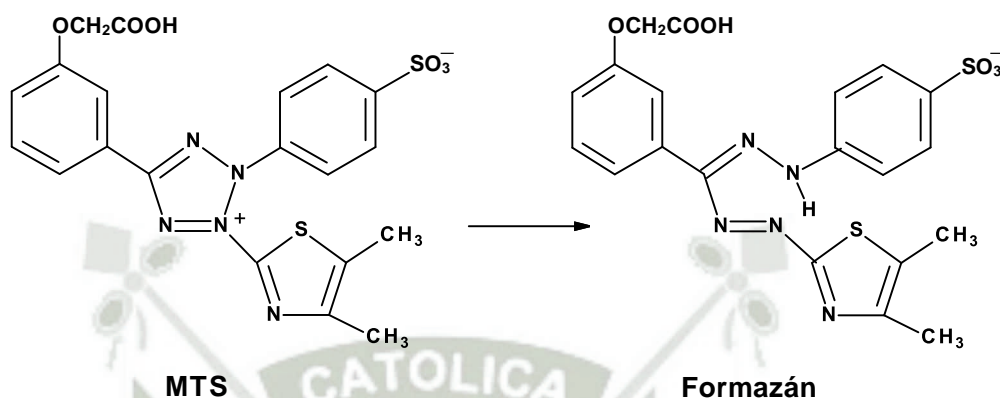


Fig. 1 Estructuras del MTS tetrazolio y su producto formazán¹¹⁹

5.3. Análisis isoblográfico

Una herramienta importante para discernir el tipo de interacción presente en las combinaciones es el isoblograma. Este es un método gráfico que recurre al empleo de pares de dosis equiefectivas para obtener un determinado nivel de efecto (isobola) y ofrece una evaluación visual del comportamiento de la combinación al establecer una línea de aditividad que surge del nivel de efecto determinado para cada compuesto individual (IC_{50} , IC_{30} , etc.) como puntos axiales de un plano cartesiano. La citada línea formada entre estos dos puntos corresponde a todas las posibles combinaciones entre dos compuestos que teóricamente presentarían ese efecto en forma aditiva (sin interacción). Si los puntos se encuentran debajo de esta línea, hay superaditividad (sinergismo), y si se encuentran por encima de esta línea, hay subaditividad (antagonismo).¹²⁰

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material biológico

- Neuroblastomas humanas SH-SY5Y (CRL-2266), de la casa ATCC®.
- Neuroblastomas de ratas B-35 (CRL-2754), de la casa ATCC®.

1.2. Otros materiales

- Tanque criogénico de nitrógeno líquido en fase de vapor, de la casa Bio-Cane™.
- Frascos estériles Greiner de la casa Sigma Aldrich®.
- Cámaras de conteo desechables de la casa Nexcelom.
- Placas de 96 pocillos estériles de la casa Thermo Scientific.
- Filtros de jeringa estériles de 0.2 µm de la casa UNIFLO®.
- Micropipetas de un solo canal de la casa VWR®.

2. Reactivos

- Medio Eagle Modificado de Dulbecco, DMEM, (con 4.5 g/L de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), de la casa Cellgro®.
- Suero bovino fetal (10%), de la casa Global Cell Solutions.
- Solución de penicilina-estreptomina (10,000 unidades/mL de Penicilina y 10,000 µg/mL de estreptomina) de la casa HyClone®.
- Solución de tripsina-EDTA (0.25%) de la casa ATCC®.
- Solución de azul de tripán (0.4 %) de la casa Sigma Aldrich®.
- Solución CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay de la casa Promega.

- Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (peso molecular 197.91 g/mol, reactivo ACS), de la casa Sigma Aldrich®.
- Acetato de plomo (II) trihidratado (peso molecular 379.33 g/mol, reactivo ACS), de la casa Sigma Aldrich®.
- Buffer fosfato salino pH 7.4 de la casa Cellgro®.

3. Equipos

- Incubadora de CO₂ con chaqueta de agua VWR® Symphony 3078.
- Microscopio invertido CKX31 de la casa OLYMPUS®.
- Cellometer® Auto T4 (contador automático de células), de la casa Nexcelom.
- Equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas) de Bio-Tek®.
- Cabina de bioseguridad clase II tipo A2 de la casa ESCO®.
- Comparador manual de masas CCE106 de la casa Sartorius®.
- Equipo de Baño María Fisher Scientific™.
- Equipo de centrifugación Dynac® III

4. Métodos

4.1. Cultivo celular

4.1.1. Preparación del medio

Se preparó dos medios utilizando dos frascos de medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) de 500 mL:

- Medio blanco: Se le añadió 5 mL de una solución de penicilina - estreptomicina (10,000 unidades/mL de Penicilina, 10,000 µg/mL de estreptomicina), para mantener la esterilidad del medio.
- Medio enriquecido con suero bovino fetal (SBF): Se retiró 50 mL de DMEM; luego se añadió 50 mL de SBF, llegando a una concentración final de este del 10%; por último, se añadió 5 mL de una solución de penicilina -

estreptomina (10,000 unidades/mL de Penicilina, 10,000 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina).

4.1.2. Acondicionamiento celular

Tanto las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35 fueron criopreservadas en viales dentro de un tanque criogénico de nitrógeno líquido en fase de vapor (**Fig. 2**), a una temperatura aproximada de $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Fig. 2 Tanque criogénico de nitrógeno líquido en fase de vapor.
Fuente: elaboración propia.

Se sacaron los viales, que contienen la suspensión primaria de las células neuroblastomas, del tanque de criogenización y se llevaron a un baño maría a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, por un periodo de 2 horas. Luego, en la cabina de bioseguridad (CB), se colocó 2 mL de ésta suspensión en un frasco estéril, posteriormente se añadió el medio enriquecido con SBF hasta completar un volumen de 5 mL. Finalmente se llevó el frasco a la incubadora con una atmósfera de 5% CO_2 , 95% aire a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 y 3 días para las células SH-SY5Y y B-35, respectivamente.

4.1.3. Obtención de la suspensión celular

Luego de la incubación, se llevó el frasco a la CB, allí se desechó el medio en un recipiente que contenía lejía (para evitar una posible contaminación biológica), quedando una capa de células. Seguidamente se enjuagó con 1 mL

de tripsina para eliminar los restos de SBF que contiene el inhibidor de tripsina. Posteriormente, se volvió a añadir 3 mL de tripsina para disociar la capa de células adheridas entre sí y la superficie del frasco, ya que la tripsina es una enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas que permiten esa adhesión. Para acelerar el proceso de disociación, se incubó el frasco durante 12 minutos, agitando suavemente cada 4 minutos; a continuación, se inactivó a la tripsina con 6 mL del medio blanco. Inmediatamente después se transfirió el contenido del frasco a un tubo de centrifuga de 50 mL, se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, se desechó el líquido sobrenadante y se resuspendió las células con 5 mL de medio enriquecido con SBF. Ésta suspensión celular se utiliza para realizar un nuevo pasaje y ensayos experimentales; repitiéndose este proceso las veces necesarias para completar los objetivos del presente estudio.

4.1.4. Obtención del nuevo pasaje celular

Se tomó 2 mL de la suspensión antes obtenida y se transfirió en un nuevo frasco estéril, adicionando el medio enriquecido con SBF hasta completar un volumen de 5 mL. Finalmente se llevó el frasco a la incubadora (**Fig. 3**) con una atmósfera de 5% CO₂, 95% aire a 37 °C por 5 y 3 días para SH-SY5Y y B-35, respectivamente.

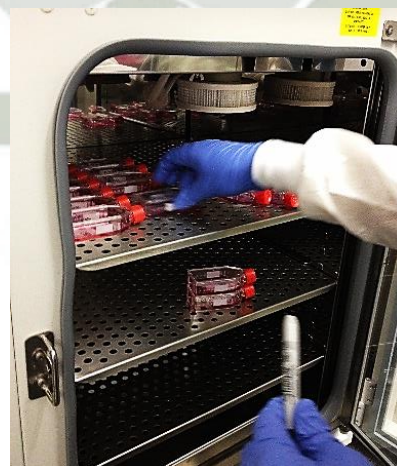


Fig. 3 Obtención del cultivo celular en una incubadora de CO₂ con camisa de aire.

Fuente: elaboración propia

4.2. Método de exclusión de viabilidad celular

En un tubo eppendorf se colocó 20 μL de azul de tripán (0.4%) y 20 μL de la suspensión celular previamente obtenida, luego se mezcló evitando la formación de burbujas, seguidamente se sacó 20 μL de esta mezcla y se colocó en la cámara de recuento celular desechable (CRCD). Posteriormente se colocó la CRCD en el Cellometer Auto T4 (contador automático de células, **Fig. 4**) y utilizando el software del equipo con los parámetros correspondientes al tipo de células a contar, ya sea el caso de las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y o de ratas B-35; además, se colocó el factor de disolución que en nuestro caso fue de 1/2. Finalmente, el equipo mostró el número de células vivas y muertas, el promedio del diámetro de las células, la concentración de células vivas (células/mL) y el porcentaje de viabilidad que debió ser mayor al 90% para proseguir con los siguientes ensayos.



Fig. 4 *Ensayo de exclusión de viabilidad celular, utilizando el Cellometer Auto T4.*
Fuente: elaboración propia.

4.3. Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad celular

4.3.1. Preparación de las soluciones patrón

Se preparó las soluciones madre para el manganeso y plomo de 1000 μM , a partir de las cuales se prepararon las soluciones patrón de (1, 3, 5, 10, 15, 20,

40 y 100 μM). Todas estas soluciones fueron preparadas en buffer fosfato salino (BFS), ya que presenta características de isotonicidad, pH 7.4 y baja toxicidad en las células.

4.3.2. Efecto del manganeso y plomo, individualmente, sobre la viabilidad celular

Una vez que se obtuvo la concentración de células vivas en la suspensión celular, como se observa en la **Tabla 1** para cada pocillo de la placa de 96 pocillos, se calculó el volumen de ésta suspensión para transferir 20000 células, posteriormente se añadió medio enriquecido con SBF hasta completar un volumen de 190 μL y seguidamente se agregó 10 μL de las soluciones de manganeso o plomo (1, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 100 y 1000 μM). Además, se realizó un control (en lugar de la solución metálica, se agregó 10 μL de BFS).

Todo este procedimiento se realizó por cuadruplicado en tres diferentes días, dentro de la CB (**Fig. 5**). Finalmente, se llevó las placas a la incubadora con una atmósfera de 5% CO_2 , 95% aire a 37 °C por 1 día. Cabe mencionar que en el presente estudio las células fueron utilizadas a partir del pasaje N° 9 y 12 para las células neuroblastomas de ratas B-35 y humanas SH-SY5Y, respectivamente.



Fig. 5 *Cabina de bioseguridad clase II tipo A2, donde se realizaron los ensayos experimentales.*

Fuente: elaboración propia.

Es necesario aclarar que las concentraciones de los metales cambiaron al producirse una disolución (1:20) en los pocillos, siendo las nuevas concentraciones 0.05; 0.15; 0.25; 0.50; 0.75; 1.0; 2.0; 5.0 y 50.0 μM a las que expusieron las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35 y se reportan en los resultados.

Tabla 1 Esquema del ensayo para evaluar el efecto del manganeso y plomo, individualmente, sobre la viabilidad celular.

	Blanco	Concentración del manganeso o plomo (μM)								
		0.05	0.15	0.25	0.50	0.75	1.0	2.0	5.0	50.0
Células + medio enriquecido con SBF (μL)	190	190	190	190	190	190	190	190	190	190
Soluciones patrón de Mn o Pb (μL)*	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Solución de BFS (μL)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Las soluciones patrón corresponde a las soluciones de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 100 y 1000 μM de Mn o Pb.
Fuente: elaboración propia.

4.3.3. Efecto de la combinación de manganeso y plomo sobre la viabilidad celular

Para evaluar el efecto de la combinación del manganeso y plomo sobre las células neuroblastomas SH-SY5Y y B-35, como se observa en la **Tabla 2** para cada pocillo de la placa de 96 pocillos, se calculó el volumen de la suspensión celular para transferir 20000 células, posteriormente se añadió medio enriquecido con SBF hasta completar un volumen de 180 μL y seguidamente se agregó 10 μL de las soluciones de manganeso (1, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 100 y 1000 μM), y 10 μL de la solución de plomo (1, 3, 5 ó 10 μM). Además, se realizó un control (en lugar de la solución metálica, se agregó 20 μL de BFS).

Todo este procedimiento se realizó por cuadruplicado en tres diferentes días. Finalmente, se llevó las placas a la incubadora con una atmósfera de 5% CO_2 , 95% aire a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 1 día.

Tabla 2 Esquema del ensayo para evaluar el efecto de la combinación de manganeso y plomo sobre la viabilidad celular.

	Blanco	Concentración del manganeso (μM)								
		0.05	0.15	0.25	0.50	0.75	1.0	2.0	5.0	50.0
Células + medio enriquecido con SBF (μL)	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
Soluciones patrón de Mn (μL) *	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Solución patrón de Pb (μL) **	-	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Solución de BFS (μL)	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Las soluciones patrón corresponde a las soluciones de Mn (1, 3, 5, 10, 15, 20, 40, 100 y 1000 μM).

**La solución patrón de Pb corresponde a las soluciones de 1, 3, 5 ó 10 μM ; por lo que este esquema se repite para cada solución de Pb.

Fuente: elaboración propia.

4.3.4. Determinación de la viabilidad celular por MTS

Luego de la incubación de las placas, se agregó 10 μL del reactivo CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay a cada pocillo. Posteriormente se deja incubar nuevamente (en las mismas condiciones antes descritas), durante 3 horas. El reactivo mencionado tiene un compuesto de tetrazolio (MTS), el cual es bio-reducido (por las células viables), formando un producto formazán, cuya longitud de onda de máxima absorbancia es 490 nm. Luego de éste tiempo de incubación se llevó la placa al equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas, **Fig. 6**), donde se midió la absorbancia de los pocillos a la longitud de onda mencionada. Ésta absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.



Fig. 6 Ensayo de viabilidad celular, utilizando el equipo Synergy HT (Lector multimodal de microplacas).

Fuente: elaboración propia.

4.4. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como promedio del porcentaje de la viabilidad celular \pm SEM. Además, los datos fueron analizados por la prueba de análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 13.

Por otro lado, la determinación de la concentración del metal que produce el 50% de inhibición de crecimiento celular (IC_{50}), se realizó usando el software GraphPad Prism 7.01; el cual emplea el modelo matemático observado en la **Ecuación (1)**; donde “Y” es el porcentaje de viabilidad celular y “X” el logaritmo de la concentración del metal en estudio. El análisis realizado con el software mencionado, es frecuentemente utilizado en estudios que hallan el IC_{50} .¹²¹⁻¹²³

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(X - \text{Log}(IC_{50}))}} \quad \text{Ecuación (1)}$$

4.5. Análisis Isobolográfico

El Análisis isobolográfico permite determinar (de forma gráfica), si existe un efecto aditivo, sinérgico o antagónico de la combinación de dos o más agentes. Uno de los métodos es el que utiliza el teorema del índice de combinación (CIT, **Ecuación (2)**) y la ecuación del efecto de la mediana (**Ecuación (3)**), que fueron desarrollados por Chou.¹²⁴

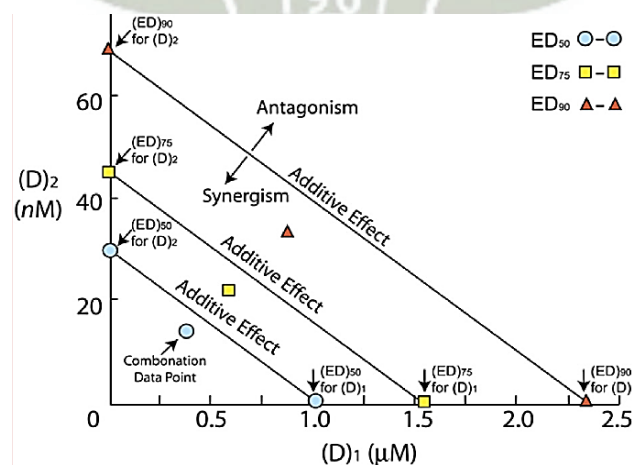


Fig. 7 Ejemplo ilustrativo de un isoblograma.¹²⁴

La **Ecuación (2)** muestra el índice de combinación (CI), en el que un valor mayor, igual o menor a la unidad ($CI > 1$; $CI = 1$; $CI < 1$), indica un efecto sinérgico, aditivo o antagónico, respectivamente. El CI se determinó utilizando el software CompuSyn 1.0; el cual se basa en las siguientes ecuaciones:

$$CI = \frac{(C)_1}{(C_x)_1} + \frac{(C)_2}{(C_x)_2} \quad \text{Ecuación (2)}$$

El valor de C_x (concentración para un “x” porcentaje de efecto, observado en la **Ecuación (3)**). Dónde: “ F_a ” es fracción del efecto a una determinada concentración; “ C_m ” es la concentración del efecto de la mediana (análogo a los valores de IC_{50} , ED_{50} o LD_{50}) y “ m ” es la pendiente, que indica la sigmoidicidad de la curva concentración efecto (ejemplo: $m=1$; para sistemas hiperbólicos).

$$C_x = C_m \left[\frac{f_a}{1 - f_a} \right]^{1/m} \quad \text{Ecuación (3)}$$

Asumiendo que la concentración de los metales para producir un efecto “x”, es la suma de las concentraciones de cada metal (“ C_1 ” y “ C_2 ”); como sigue:

$$(C_x)_{1,2} = (C)_1 + (C)_2 \quad \text{Ecuación (4)}$$

Además, la proporción de las concentraciones de los metales es:

$$\frac{(C)_1}{(C)_2} = \frac{P}{Q} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Los valores de “ C_1 ” y “ C_2 ”, necesarios para calcular el índice de combinación de la **Ecuación (2)**, son despejados de las ecuaciones 4 y 5; obteniéndose las siguientes ecuaciones:

$$(C)_1 = (C_x)_{1,2} \times \frac{P}{P + Q} \quad \text{Ecuación (6)}$$

$$(C)_2 = (C_x)_{1,2} \times \frac{Q}{P + Q} \quad \text{Ecuación (7)}$$

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cultivo celular

1.1. Células neuroblastomas humanas SH-SH5Y

Bajo las condiciones descritas en la metodología de obtención del primer pasaje (5% CO₂, 95% aire y 37°C), condiciones que fueron utilizadas por diversos autores que emplearon esta línea celular,^{67,125,126} se obtuvo el crecimiento de las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y mostradas en la **Fig. 8** y se observa la proliferación y diferenciación en diferentes días; evidenciándose un cambio morfológico y aumento del número de células con el paso del tiempo. Por lo que una incubación de cinco días fue suficiente para obtener células maduras que pudieron ser usadas en los siguientes cultivos y ensayos experimentales empleando estas células.

Con estos resultados se dedujo que el medio de cultivo enriquecido con SBF utilizado permitió un adecuado crecimiento de estas células tal como lo reportan otras investigaciones.^{127,128}

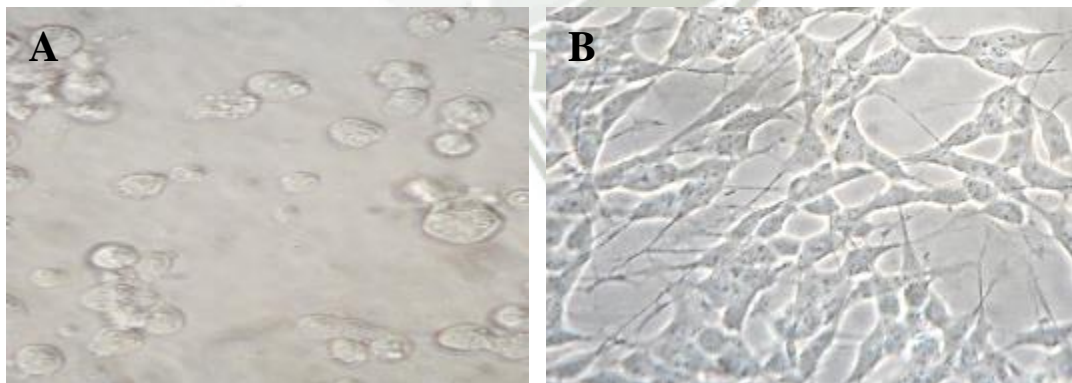


Fig. 8 Crecimiento de las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y, 1 día (A) y 5 días (B) observados en microscopio invertido (40x).

Fuente: elaboración propia.

1.2. Células neuroblastomas de ratas B-35

Como se observó en el punto anterior; las condiciones de incubación utilizadas para realizar el cultivo de células neuroblastomas de ratas B-35 (5% CO₂, 95% aire y 37°C), encontrándose metodologías similares en otras investigaciones que emplearon esta línea celular,^{129,130} permitieron el crecimiento de las células mencionadas mostradas en la **Fig. 9** donde se observa la proliferación y diferenciación durante uno y tres días de incubación, dándose un cambio morfológico y un aumento del número de células al transcurrir el tiempo. Por lo que una incubación de tres días fue suficiente para obtener células maduras que pudieron ser usadas en los siguientes cultivos y ensayos experimentales empleando estas células. El uso del medio de cultivo enriquecido con SBF permitió un adecuado crecimiento de estas células tal como lo reportan otros autores.^{131,132}

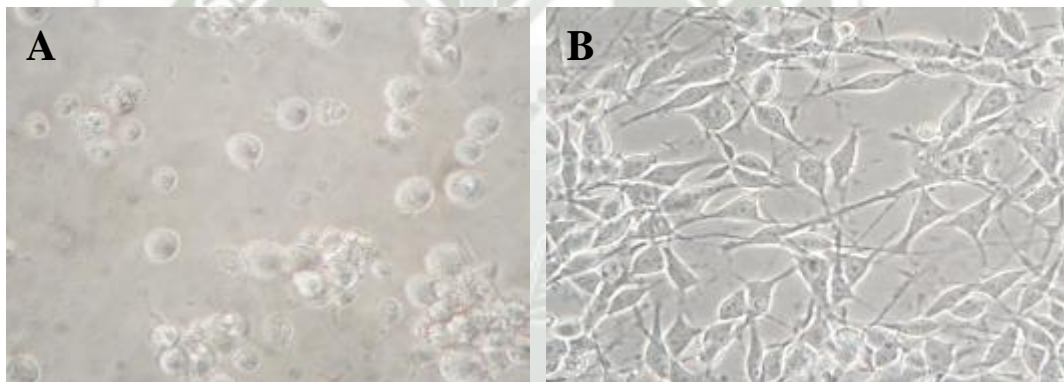


Fig. 9 Crecimiento de las células neuroblastomas de rata B-35, 1 día (A) y 3 días (B), observadas en microscopio invertido (40x).
Fuente: elaboración propia.

2. Exclusión de viabilidad celular

2.1. Conteo de células viables en la suspensión celular

En el método utilizado para el conteo de células viables en la suspensión celular (visto en metodología), se empleó como colorante el azul de tripán, empleado por otros autores,¹³³⁻¹³⁵ el que permitió diferenciar las células vivas de las muertas, debido a que las primeras presentan una membrana celular intacta que impide su coloración, mientras que las otras no responden de forma similar.¹¹⁷

El conteo celular se realizó utilizando el cellometer® Auto T4, instrumento utilizado en otros estudios,^{136,137} mediante el cual se obtuvo el número de células vivas y muertas, promedio del diámetro de las células, viabilidad celular y concentración de células vivas en la suspensión (como se observa en las **Fig. 10** y **Fig. 11**), de los cuales, estos dos últimos resultados fueron considerados para los ensayos experimentales.

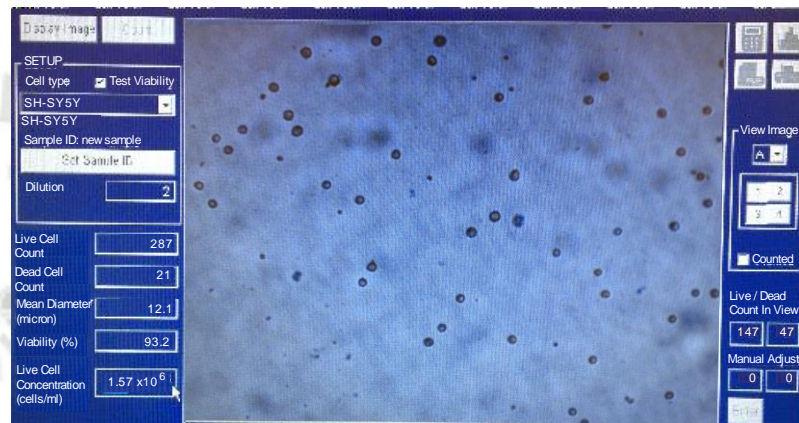


Fig. 10 *Conteo de células neuroblastomas SH-SY5Y viables, utilizando el cellometer® Auto T4.*

Fuente: elaboración propia.

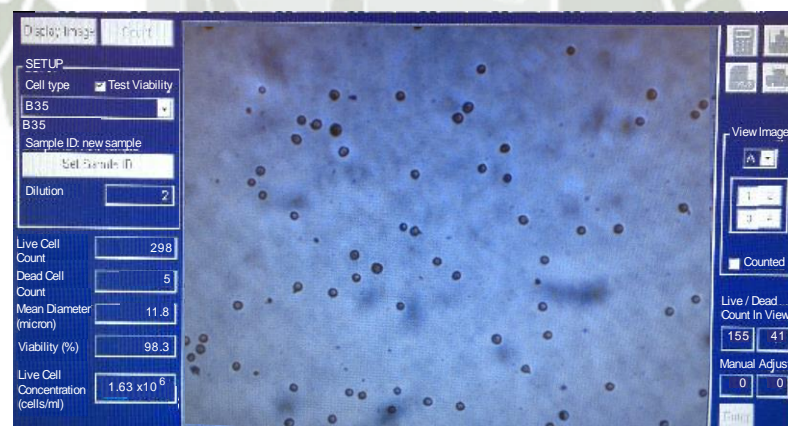


Fig. 11 *Conteo de células neuroblastomas B-35 viables, utilizando el cellometer® Auto T4.*

Fuente: elaboración propia.

La evaluación del efecto del manganeso y plomo sobre las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35, se realizó utilizando suspensiones de células con una viabilidad superior a 90%, debido a que un porcentaje mayor a este indica una tasa óptima de crecimiento (crecimiento en fase

logarítmica)¹³⁸. Por otro lado, en las mismas tablas se observa la concentración de células en las suspensiones en un rango de $(1.34 \times 10^6 - 1.98 \times 10^6)$ células/mL para las células SH-SY5Y y $(1.14 \times 10^6 - 2.22 \times 10^6)$ células/mL para células B-35; estas concentraciones fueron utilizadas para determinar el volumen necesario de la suspensión celular con el objetivo de transferir 20000 células a cada pocillo de la placa de ensayo, esta cantidad de células es tomada como referencia de investigaciones relacionadas^{138,139} y además permite obtener rangos óptimos de absorbancia (< 1).¹⁴⁰ Estos datos se observan en las **Tabla 3** y **Tabla 4**.

Tabla 3 Datos de las suspensiones celulares neuroblastomas SH-SY5Y, obtenidos de la lectura del cellometer® Auto T4.

N° suspensión	Viabilidad celular (%)	Concentración de células en suspensión (cél/mL)	Volumen de suspensión que contiene 20000 células (µL)	Utilización en efecto de:
1	93.2	1.57×10^6	12.7	Mn, Pb*
2	91.2	1.34×10^6	14.9	Mn, Pb*
3	93.4	1.69×10^6	11.8	Mn, Pb*
4	98.1	1.98×10^6	10.1	Mn + Pb**
5	95.4	1.15×10^6	17.4	Mn + Pb**
6	90.1	1.47×10^6	13.6	Mn + Pb**
7	92.7	1.81×10^6	11.0	Mn + Pb**
8	94.5	1.55×10^6	12.9	Mn + Pb**
9	95.9	1.76×10^6	11.4	Mn + Pb**

*Suspensiones utilizadas para el estudio del efecto individual de Mn y Pb.

**Suspensiones utilizadas para el estudio del efecto de la combinación de Mn y Pb.

Fuente: elaboración propia.

Tabla 4 Datos de las suspensiones celulares neuroblastomas B-35, obtenidos de la lectura del cellometer® Auto T4.

N° suspensión	Viabilidad celular (%)	Concentración de células en suspensión (cél/mL)	Volumen de suspensión que contiene 20000 células (µL)	Utilización en efecto de:
1	98.3	1.63×10^6	12.3	Mn, Pb*
2	94.7	2.22×10^6	9.0	Mn, Pb*
3	91.6	1.66×10^6	12.0	Mn, Pb*
4	92.4	1.97×10^6	10.2	Mn + Pb**
5	94.5	1.56×10^6	12.8	Mn + Pb**
6	93.1	2.15×10^6	9.3	Mn + Pb**
7	92.0	2.01×10^6	10.0	Mn + Pb**
8	93.6	1.14×10^6	17.5	Mn + Pb**
9	96.7	1.61×10^6	12.4	Mn + Pb**

*Suspensiones utilizadas para el estudio del efecto individual de Mn y Pb.

**Suspensiones utilizadas para el estudio del efecto de la combinación de Mn y Pb.

Fuente: elaboración propia.

3. Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad celular de neuroblastomas humanas SH-SY5Y

El efecto que producen el manganeso y plomo sobre las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y se evaluó observando los cambios morfológicos, haciendo uso de un microscopio invertido, y la viabilidad celular por el método de MTS.

El crecimiento de las células bajo condiciones estándares de cultivo (señaladas en la metodología), mostraron una morfología caracterizada por una buena delimitación, cuerpos celulares aplanados y conectados por extensas neuritas (axones y dendritas) como se observa en la **Fig. 14**.



Fig. 12 Crecimiento de células neuroblastomas SH-SY5Y. Observadas en microscopio invertido (40x).

Fuente: elaboración propia.

La presencia de Mn y Pb (individualmente) en el crecimiento de estas células, produce cambios tales como disminución del número de células, alteración de la forma celular y pérdida de neuritas (**Fig. 13, A, B**). Las investigaciones que evalúan los efectos individuales de estos metales utilizando esta línea celular, reportan efectos similares a los descritos en el presente estudio.^{126,128}

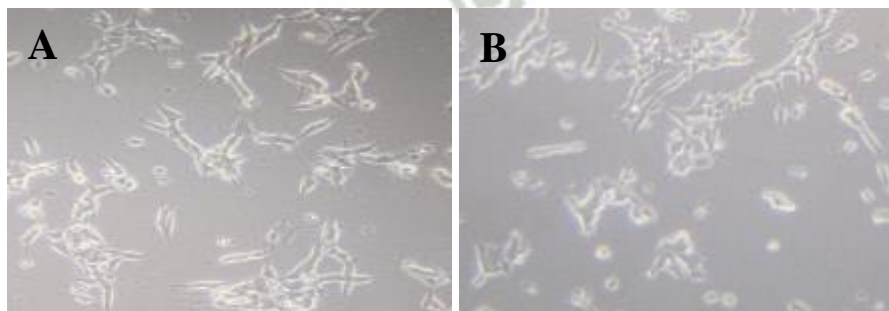


Fig. 13 Crecimiento de células neuroblastomas SH-SY5Y, en presencia de 2 μM de Mn (A), y 4 μM de Pb (B). Observadas en microscopio invertido (40x).

Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, la presencia de la combinación de ambos metales produce los mismos efectos que los que provoca el Mn y Pb individualmente, con la diferencia de que son más marcados (**Fig. 14**), aún no se reportan estudios similares en células.

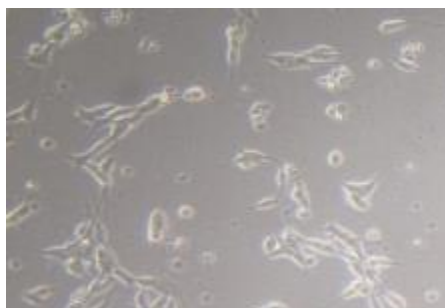


Fig. 14 Crecimiento de células neuroblastomas SH-SY5Y, combinación de Mn ($2 \mu\text{M}$) y Pb ($4 \mu\text{M}$). Observadas en microscopio invertido (40x).
Fuente: elaboración propia.

Además, estos cultivos celulares fueron sometidos a un conteo celular utilizando el cellometer[®] Auto T4, resultados mostrados en la **Tabla 5**, los cuales respaldan las observaciones obtenidas por el microscopio en cuanto al número de células y la viabilidad de las mismas.

Tabla 5 Conteo de células neuroblastomas SH-SY5Y viables en presencia de Mn y Pb, utilizando el cellometer[®] Auto T4.

Crecimiento en presencia de:	Viabilidad celular (%)	Concentración de células en suspensión (células/mL)
Control	92.6	1.59×10^6
Mn ($2 \mu\text{M}$)	45.3	1.07×10^5
Pb ($4 \mu\text{M}$)	47.1	1.21×10^5
Mn ($2 \mu\text{M}$) + Pb ($4 \mu\text{M}$)	12.8	7.45×10^4

Fuente: elaboración propia.

3.1. Efecto del manganeso sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

La **Fig. 15** muestra el efecto neurotóxico concentración-dependiente del manganeso ($0.05 \mu\text{M}$ - $50 \mu\text{M}$) sobre las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y luego de 24 horas de exposición al metal. Los datos experimentales fueron analizados mediante una prueba de ANOVA (análisis de varianza) con *post-hoc* test

de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que a partir de la concentración de $0.15 \mu\text{M}$ de Mn existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) comparada con el control (crecimiento de células en ausencia de Mn). Por otro lado, un estudio que evalúa la toxicidad del manganeso en células SH-SY5Y, muestra un decrecimiento de la viabilidad celular a concentración-dependiente del metal en un rango de concentración de $2 \mu\text{M} - 62 \mu\text{M}$, después de 24 horas.⁶⁷

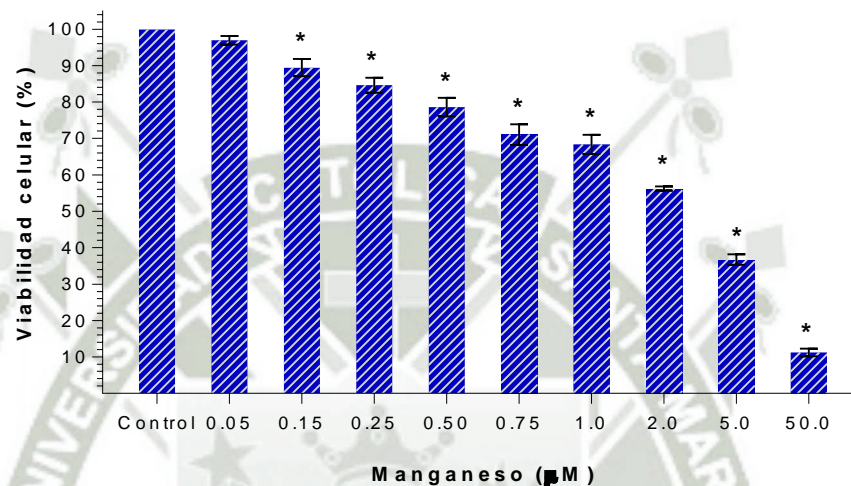


Fig. 15 Neurotoxicidad inducida por Mn en células neuroblastomas SH-SY5Y, luego de la exposición con diferentes concentraciones de MnCl_2 ($0.05 \mu\text{M} - 50.00 \mu\text{M}$) durante 24 horas. Los valores representan el promedio \pm S.E.M.* ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

Además, debido a que las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y presentan el sistema dopaminérgico,¹¹³ el efecto neurotóxico del Mn en estas células puede deberse a la modificación de los niveles de dopamina inhibiendo al transportador activo de este neurotransmisor (DAT)^{141,142} y catalizando su oxidación que da lugar a compuestos y radicales libres que también son neurotóxicos.¹⁴³ Otro de los posibles mecanismos de toxicidad del Mn es la reducción de los niveles de glutatión (GSH), el cual es uno de los principales antioxidantes.^{144,145}

Como se observó la susceptibilidad de las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y al manganeso, luego de 24 horas de exposición de las células al metal, se determinó la IC_{50} , el cual fue calculado por el software GraphPad Prism 7.01 a

partir del modelo matemático antes mencionado, el cual se ajustó adecuadamente ($R^2 = 0.9608$) a los datos experimentales (**Fig. 16**).

Stephenson *et al.*⁶⁷ determinaron un IC_{50} de 12.98 μM , mientras que en el presente estudio el IC_{50} obtenido fue 2.269 μM de manganeso. Esta variación podría deberse a los diferentes métodos empleados para hallar la viabilidad celular.

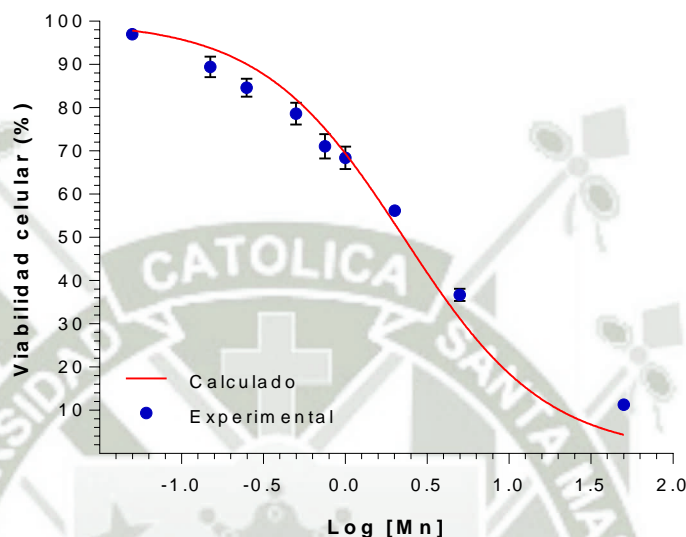


Fig. 16 Viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y vs. Log[Mn]. Para la determinación de IC_{50} , utilizando el software GraphPad Prism 7.01.

Fuente: elaboración propia.

3.2. Efecto del plomo sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

Se evaluó el efecto tóxico de la exposición de las células SH-SY5Y a diferentes concentraciones de plomo (0.05 μM - 50.0 μM), durante 24 horas y se determinó que este metal produce un efecto neurotóxico dependiente de su concentración, tal como se observa en la **Fig. 17**. Además, el análisis estadístico muestra que la disminución de la viabilidad celular es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a concentraciones iguales o mayores a 0.50 μM , este valor es cercano al resultado hallado por otros estudios, en el que reportaron que 0.1 μM de Pb inhibió significativamente el crecimiento celular;^{146,147} en otra investigación se reportó que 10 μM de Pb inhibió la viabilidad celular de manera significativa ($p < 0.01$). Estos estudios mencionados utilizaron la misma línea celular.¹⁴⁸

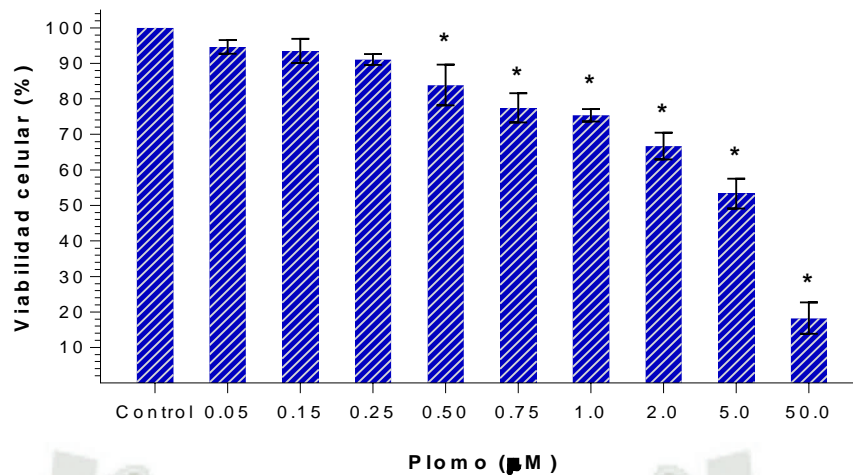


Fig. 17 Neurotoxicidad inducida por Pb en células neuroblastomas SH-SY5Y, luego de la exposición con diferentes concentraciones de $Pb(C_2H_3O_2)_2$ (0.05 μM – 50.0 μM) durante 24 horas. Los valores representan el promedio \pm S.E.M. * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.
Fuente: elaboración propia.

El efecto neurotóxico del Pb en las células neuroblastomas SH-SY5Y puede deberse a la reducción de la actividad dopaminérgica y de la tirosina hidrolasa, ésta última responsable en la síntesis de dopamina.^{103,104}

El gráfico dado por el software GraphPad Prism 7.01 (**Fig. 18**), muestra que el modelo matemático (**Ecuación (1)**) se ajusta ($R^2 = 0.8876$) a los datos experimentales del efecto del plomo sobre las células SH-SY5Y. Una disminución de la viabilidad celular al 50% fue observada con 4.141 μM de Pb (IC_{50}), valor cercano al obtenido por otros estudios (5 μM).^{126,146,147}

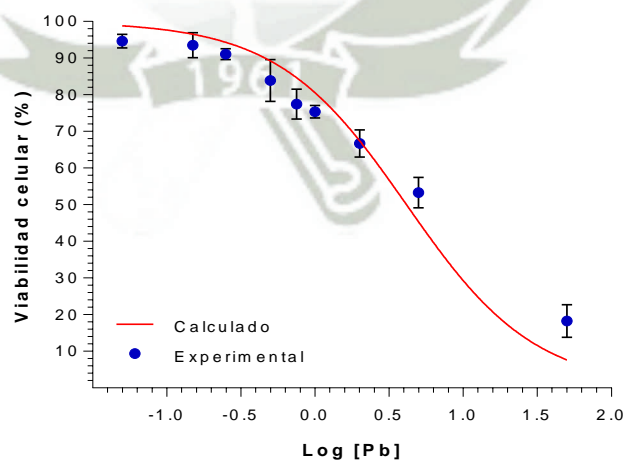


Fig. 18 Viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y vs. $Log[Pb]$. Para la determinación de IC_{50} , utilizando el software GraphPad Prism 7.01.
Fuente: elaboración propia.

3.3. Efecto de la combinación de manganeso y plomo, sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

El extenso uso de ambos metales en la industria, los cuales posteriormente son emanados al medio ambiente, dio origen al estudio de los efectos tóxicos con los cuales se demostró que pueden ser neurotóxicos en forma individual; sin embargo, comúnmente ambos metales son encontrados juntos, dándose la alta posibilidad de una co-exposición.

En el presente estudio se evaluó el efecto que produce la combinación de diferentes concentraciones de manganeso (0.05 μM – 50.0 μM) y de plomo (0.05 μM – 0.50 μM). Las concentraciones de Mn fueron tomadas debido a que abarcan niveles del metal inocuos y niveles que afectan la viabilidad celular de las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35, como se observa en las **Fig. 15** y **Fig. 25**. Las concentraciones de plomo fueron seleccionadas para evaluar un posible escenario en el que existe niveles bajos que incluso no presentan un efecto neurotóxico a las que se adicionará concentraciones de manganeso. Este escenario es probable en el medio atmosférico debido a que anteriormente se utilizaba el tetraetilo de plomo como aditivo de la gasolina que posteriormente se reemplazó por MMT.^{21,22,149}

La **Fig. 19** muestra el efecto neurotóxico de la combinación del Mn y Pb en las células neuroblastomas SH-SY5Y y se observa que la presencia de ambos metales reduce drásticamente el porcentaje de viabilidad celular, incluso en concentraciones inferiores en las que estos metales (de forma individual), no producen tal diferencia significativa comparada con el control. Entonces se deduce que existe un incremento de la neurotoxicidad en estas células cuando se exponen a estos metales de forma conjunta; este hallazgo fue demostrado también por Betharia y Maher, que evaluaron el efecto de ambos metales en ratas, observándose un incremento del déficit neuro-conductual luego de la exposición de ambos metales.⁵⁰

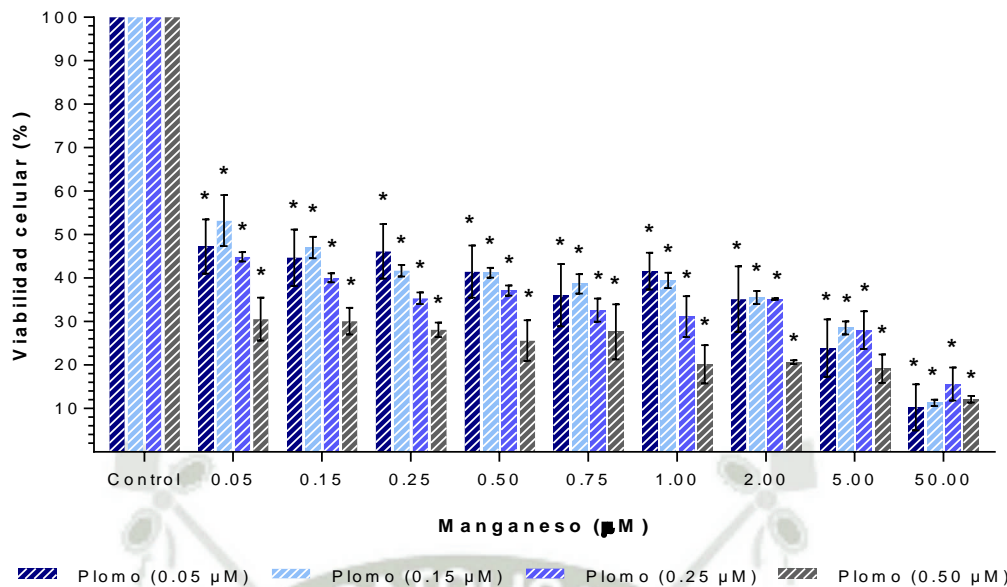


Fig. 19 Neurotoxicidad inducida por Mn y Pb en células neuroblastomas SH-SY5Y, luego de la exposición con diferentes concentraciones de $MnCl_2$ ($0.05 \mu M - 50.00 \mu M$) y $Pb(C_2H_3O_2)_2$ ($0.05 \mu M - 0.50 \mu M$), durante 24 horas. Los valores representan el promedio \pm S.E.M. * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.
Fuente: elaboración propia.

3.4. Análisis isoblográfico del efecto de la combinación de manganeso y plomo, sobre la viabilidad de células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

La Fig. 20 muestra la curva concentración–efecto del manganeso (\ominus), plomo (\boxplus) y la combinación de ambos metales (\triangle , en una proporción 1:1; siendo las concentraciones $0.05; 0.15; 0.25$ y $0.50 \mu M$) sobre las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y.

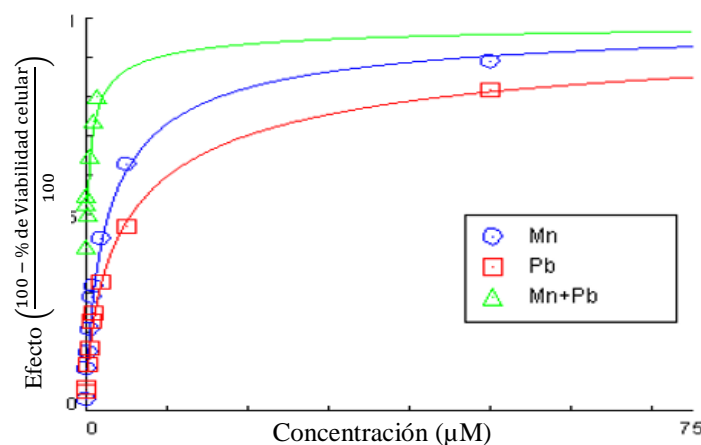


Fig. 20 Efecto tóxico en células neuroblastomas SH-SY5Y vs. Concentración del Mn, Pb y combinación de ambos, utilizando el software CompuSyn 1.0.
Fuente: elaboración propia.

Utilizando el software CompuSyn 1.0 se obtuvieron los isobogramas a IC_{30} , IC_{40} e IC_{50} , observados en la **Fig. 21**. La línea formada entre dos puntos (concentraciones de Mn y Pb, necesarios para producir la inhibición del crecimiento celular en un determinado porcentaje), corresponde a las concentraciones de ambos metales que presentan un efecto aditivo (sin interacción, $CI = 1$). Por otro lado, si el CI es menor a la unidad ($CI < 1$; debajo de la línea antes mencionada), ambos metales producirían un efecto sinérgico; por otro lado, si el CI es mayor a la unidad ($CI > 1$; encima de la línea), la combinación de los metales produciría un efecto antagónico.

En la **Fig. 21** se observa que los índices de combinación para ambos metales, en las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y, son menores a uno (se encuentran por debajo de su línea correspondiente). Por lo que el análisis isobolográfico permite afirmar que la combinación del Mn y Pb producen una neurotoxicidad de forma sinérgica sobre éstas células.

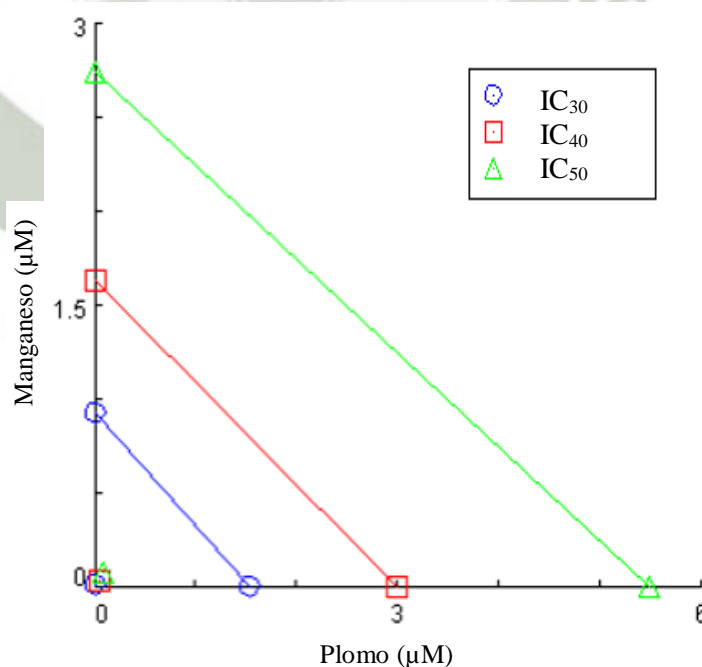


Fig. 21 Isoblograma que ilustra la interacción entre el Mn y el Pb en células neuroblastomas SH-SY5Y. Los valores de IC_{30} , IC_{40} e IC_{50} para el Pb y Mn están ubicados en la gráfica y conectan el eje “X” y “Y”, respectivamente.

Fuente: elaboración propia.

La **Tabla 6** muestra los valores de índices de combinación del efecto combinado del manganeso y plomo sobre las células SH-SY5Y en diferentes niveles de inhibición celular (IC₃₀, IC₄₀, IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀). Además, se puede observar que los valores están muy por debajo de la unidad y es la razón por lo que los puntos de CI que se observan en la **Fig. 21** se encuentran prácticamente juntos y cercanos al origen de los ejes.

Tabla 6 Valores de CI a diferentes niveles de inhibición de células SH-SY5Y, obtenido por el software CompuSyn 1.0.

Nivel de inhibición	Valor de CI
IC ₃₀	0.01327
IC ₄₀	0.02114
IC ₅₀	0.03247
IC ₇₅	0.10463
IC ₉₀	0.34086

Fuente: elaboración propia.

4. Efecto del manganeso y plomo sobre la viabilidad celular de neuroblastomas de ratas B-35

Al igual que con las células anteriores, la **Fig. 22** muestra el crecimiento normal de las células neuroblastomas de ratas B-35, en el cual se puede observar un crecimiento óptimo (células bien definidas, neuritas desarrolladas y gran número de células).



Fig. 22 Crecimiento de células neuroblastomas B-35. Observadas en microscopio invertido (40x).

Fuente: elaboración propia.

La presencia de Mn y Pb (individualmente), en el crecimiento de estas células provoca un efecto similar a las neuroblastomas SH-SY5Y; sin embargo, este efecto es aparentemente menos intenso, como se observa en la **Fig. 23**.

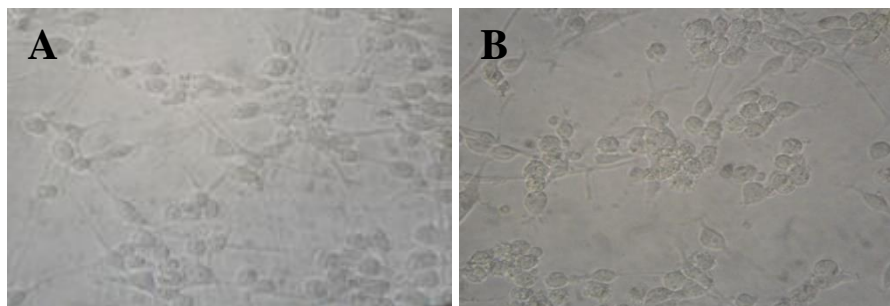


Fig. 23 Crecimiento de células neuroblastomas B-35, en presencia de $2 \mu\text{M}$ de Mn (A), y $4 \mu\text{M}$ de Pb (B). Observadas en microscopio invertido (40x).
Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, el efecto tóxico de la combinación del Mn y Pb sobre el crecimiento de las células neuroblastomas de ratas B-35 es mayor al efecto individual de cada metal y casi todas las células adoptan una forma redondeada con escaso desarrollo de neuritas (**Fig. 24**). Es preciso mencionar que no se reportaron estudios sobre el efecto de ambos metales, individualmente y en conjunto, utilizando estas células.



Fig. 24 Crecimiento de células neuroblastomas B-35, combinación de Mn ($2 \mu\text{M}$) y Pb ($4 \mu\text{M}$). Observadas en microscopio invertido (40x).
Fuente: elaboración propia.

Además, como se muestra en la **Tabla 7**, se realizó el conteo celular utilizando el cellometer[®] Auto T4, obteniendo resultados que corroboran las observaciones en el microscopio, y que posteriormente se confirmó, por medio de los ensayos de viabilidad celular por MTS, el efecto neurotóxico del manganeso y plomo sobre las células neuroblastomas B-35.

Tabla 7 *Conteo de células neuroblastomas B-35 viables en presencia de Mn y Pb, utilizando el cellometer® Auto T4.*

Crecimiento en presencia de:	Viabilidad celular (%)	Concentración de células en suspensión (células/mL)
Control	94.1	1.91×10^6
Mn (2 μ M)	46.4	1.47×10^5
Pb (4 μ M)	51.5	1.99×10^5
Mn (2 μ M) + Pb (4 μ M)	21.6	9.81×10^4

Fuente: elaboración propia.

4.1. Efecto del manganeso sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35

Al igual que con las otras células, diferentes concentraciones de manganeso (0.05 μ M - 50 μ M) se pusieron en contacto con las células neuroblastomas B-35 durante 24 horas. La **Fig. 25** muestra el efecto neurotóxico concentración-dependiente del Mn; además, realizando un ANOVA con post-hoc test de Dunnett, se observa que a partir de 0.25 μ M del metal existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

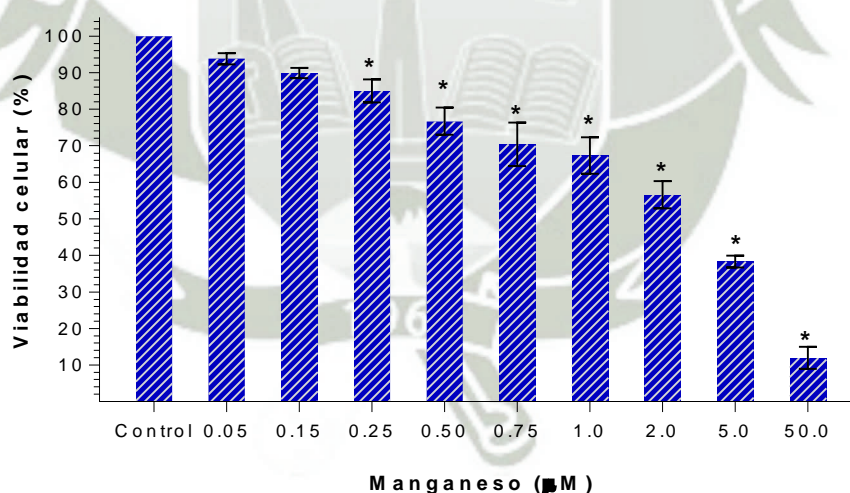


Fig. 25 *Neurotoxicidad inducida por Mn en células neuroblastomas B-35, luego de la exposición con diferentes concentraciones de MnCl₂ (0.05 μ M – 50.00 μ M) durante 24 horas. Los valores representan el promedio \pm S.E.M. * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.*
Fuente: elaboración propia.

El efecto neurotóxico del manganeso en las células neuroblastomas de ratas B-35, puede deberse a la disrupción de los niveles de diferentes sistemas de

neurotransmisiones,^{142,150} y entre los neurotransmisores más afectados que expresan las células neuroblastomas B-35, se encuentran el ácido γ -aminobutírico (GABA) y el ácido glutámico (Glu), como se ha descrito en el marco teórico (apartado 4.1.2).¹¹⁶

El gráfico construido por el software GraphPad Prism 7.01 (**Fig. 26**), muestra un adecuado ajuste ($R^2 = 0.9212$) de los datos experimentales del efecto neurotóxico sobre las células B-35 con el modelo matemático (**Ecuación (1)**). Por otro lado, utilizando el mismo software, se obtuvo un IC_{50} de $2.249 \mu M$ de Mn en las células mencionadas, no habiéndose encontrado reportes científicos que indiquen este parámetro del Mn para las células B-35.

Además como se sabe, el IC_{50} es un parámetro utilizado para comparar la potencia del efecto que producen los agentes tóxicos;^{151,152} se observa que el valor de IC_{50} de este metal sobre las células SH-SY5Y es $2.269 \mu M$, por lo que se podría deducir que la potencia del efecto tóxico producido por el manganeso en ambas células, es similar.

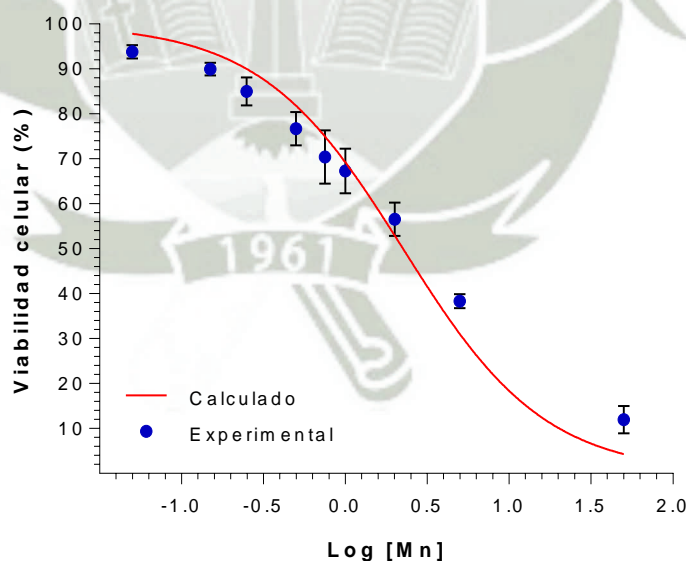


Fig. 26 Viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35 vs. $\text{Log}[\text{Mn}]$. Para la determinación de IC_{50} , utilizando el software GraphPad Prism 7.01.

Fuente: elaboración propia.

4.2. Efecto del plomo sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35

La neurotoxicidad inducida por plomo en las células neuroblastomas de ratas B-35, se evaluó exponiendo estas células a un rango de concentración del metal de $0.25 \mu\text{M}$ – $50 \mu\text{M}$, durante 24 horas. La **Fig. 27** muestra el porcentaje de viabilidad celular que produce las diferentes concentraciones de Pb. Además, realizando un ANOVA con post-hoc test de Dunnett, se observó que las viabilidades celulares a partir $0.50 \mu\text{M}$ de Pb son estadísticamente diferentes al control ($p < 0.05$). Por otro lado, observando las **Fig. 17** y **Fig. 27** se evidencia que la misma concentración de Pb ($0.50 \mu\text{M}$) da inicio al efecto neurotóxico del metal en ambas células.

El posible mecanismo de neurotoxicidad del Pb en las células neuroblastomas de ratas B-35 se debe a la alteración de los niveles de GABA y glutamato, debido a que afecta su síntesis y transporte.^{153,154}

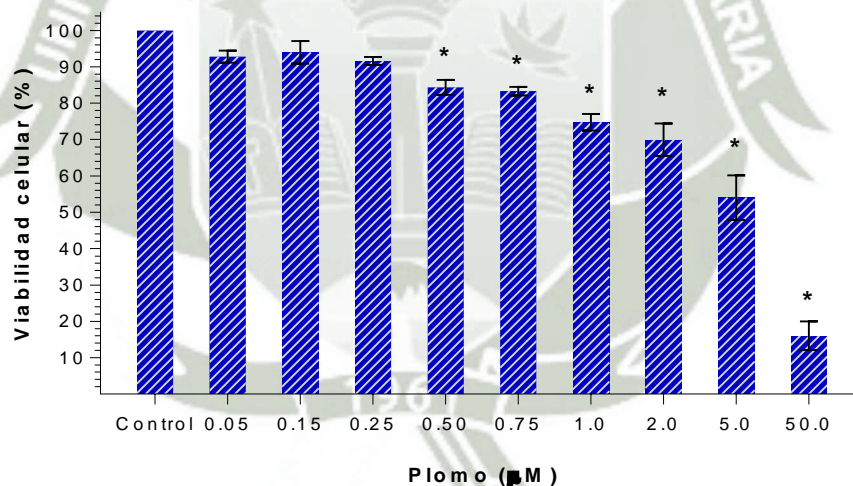


Fig. 27 Neurotoxicidad inducida por Pb en células neuroblastomas B-35, luego de la exposición con diferentes concentraciones de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ ($0.05 \mu\text{M}$ – $50 \mu\text{M}$) durante 24 horas. Los valores representan el promedio \pm S.E.M. * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.

Fuente: elaboración propia.

La **Fig. 28** muestra un adecuado ajuste ($R^2 = 0.9156$) de los datos experimentales del efecto tóxico del Pb en las células B-35 con el modelo

matemático calculado por el software GraphPad Prism 7.01. Además, el IC_{50} del metal en estas células es de $4.576 \mu M$, no habiéndose encontrado reportes que evalúan este parámetro.

Por otro lado, observando los valores de IC_{50} del Pb para SH-SY5Y y B-35 ($4.141 \mu M$ y $4.576 \mu M$, respectivamente), se puede deducir que el plomo es relativamente más tóxico en las células humanas que en las células de ratas, debido probablemente a que este metal afecta directamente a la dopamina e indirectamente al GABA.⁹¹

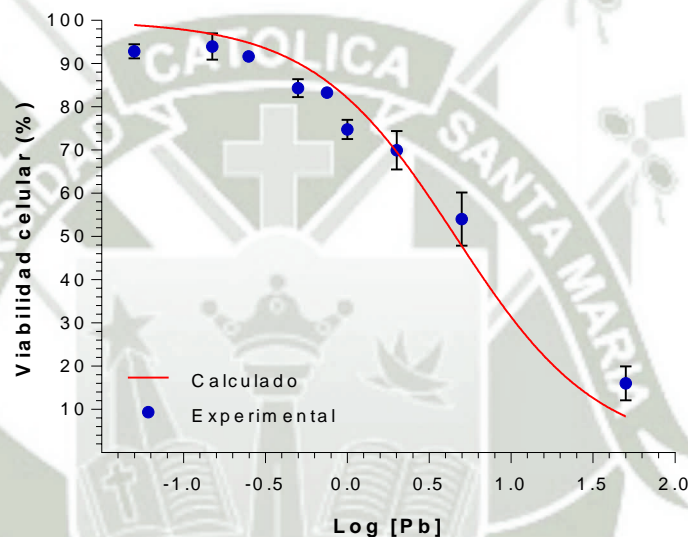


Fig. 28 Viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35 vs. $\text{Log}[\text{Pb}]$. Para la determinación de IC_{50} , utilizando el software GraphPad Prism 7.01.

Fuente: elaboración propia.

4.3. Efecto de la combinación de Manganeso y Plomo sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35

La **Fig. 29** muestra el efecto neurotóxico de la combinación del Mn y Pb en las células neuroblastomas B-35. Se observa que éstas células aparentemente presentan resistencia a la combinación de $0.05 \mu M$ de Mn con hasta $0.25 \mu M$ de Pb, y $0.15 \mu M$ de Mn con $0.05 \mu M$ de Pb; produciendo todas las demás combinaciones una disminución significativa de la viabilidad celular ($p < 0.05$). Además,

observando la **Fig. 19** se puede deducir que la combinación de estos metales afecta más a las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y que a las de ratas B-35.

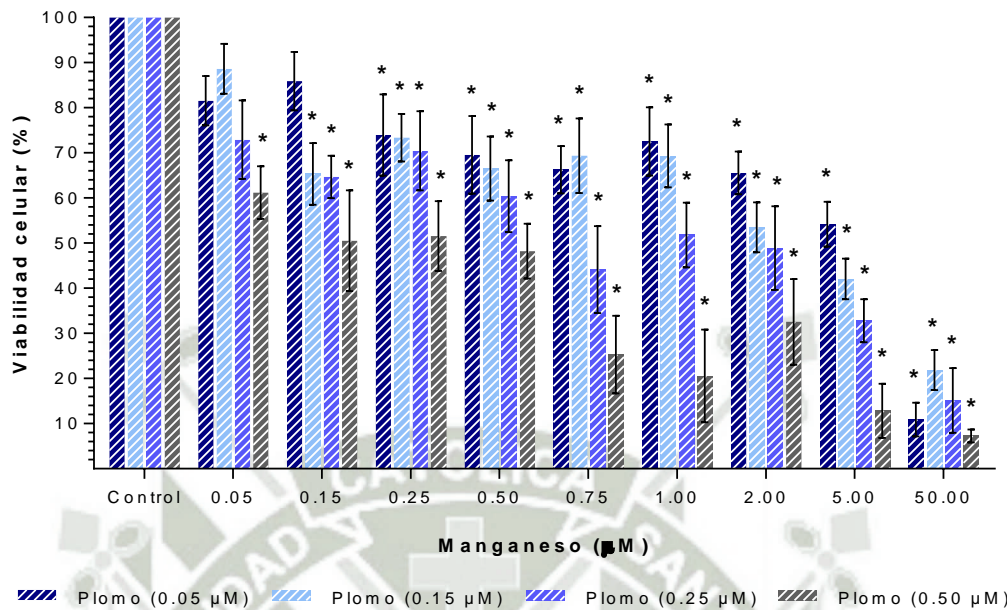


Fig. 29 Neurotoxicidad inducida por Mn y Pb en células neuroblastomas B-35, luego de la exposición con diferentes concentraciones de $MnCl_2$ ($0.05 \mu M - 50.00 \mu M$) y $Pb(C_2H_3O_2)_2$ ($0.05 \mu M - 0.50 \mu M$), durante 24 horas. Los valores representan el promedio \pm S.E.M. * ($p < 0.05$). ANOVA con post-hoc test de Dunnett.
Fuente: elaboración propia.

4.4. Análisis isoblográfico del efecto de la combinación de manganeso y plomo, sobre la viabilidad de células neuroblastomas de ratas B-35

La toxicidad individual de estos metales ha sido ampliamente investigada utilizando diferentes líneas celulares y organismos; sin embargo, el efecto de la combinación recién tomó mayor importancia en los últimos años, incrementándose estudios de este tipo.¹⁵⁵

La **Fig. 30** muestra la curva concentración–efecto del manganeso (\ominus), plomo (\oplus) y la combinación de ambos metales (\triangle , en una proporción 1:1; siendo las concentraciones $0.05; 0.15; 0.25$ y $0.50 \mu M$), sobre las células neuroblastomas de ratas B-35; de forma similar que con las otras células, el efecto se refiere al daño celular que producen el o los metales, expresado como fracción.

Se observa que el efecto de la combinación de los dos metales es mayor que el efecto de cada uno por separado. Además, observando las **Fig. 20** y **Fig. 30**, aparentemente se produce un mayor efecto de la combinación de ambos metales en las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y que en las de ratas B-35.

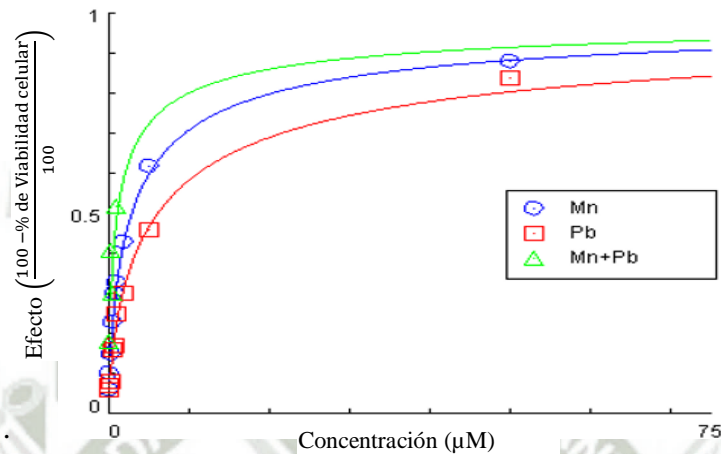


Fig. 30 Efecto tóxico en células neuroblastomas B-35 vs. Concentración del Mn, Pb y combinación de ambos, utilizando el software CompuSyn 1.0.
Fuente: elaboración propia.

Utilizando el software CompuSyn 1.0, se realizó el análisis isoblográfico para determinar si el efecto neurotóxico de la combinación del manganeso y plomo (sobre las células neuroblastomas de ratas B-35), es aditivo, sinérgico o antagónico.

La **Fig. 31** muestra que los índices de combinación para las IC₃₀, IC₄₀ e IC₅₀; se encuentran debajo de su respectiva línea; por lo que se deduce que la combinación de Mn y Pb produce un efecto neurotóxico sinérgico sobre las células B-35.

Además, estudios realizados en ratas que fueron expuestas a Mn y Pb, y poblaciones humanas que viven en zonas que presentan considerables concentraciones de ambos metales; reportaron que la combinación de estos metales produce un efecto sinérgico.^{13,50,156,157} Esta interacción podría deberse a que ambos metales alteran similares neurotransmisores; sin embargo, el mecanismo de esta interacción aún es materia de investigación, por lo que es necesario nuevos estudios para dilucidar el exacto mecanismo del daño sinérgico que producen estos metales.

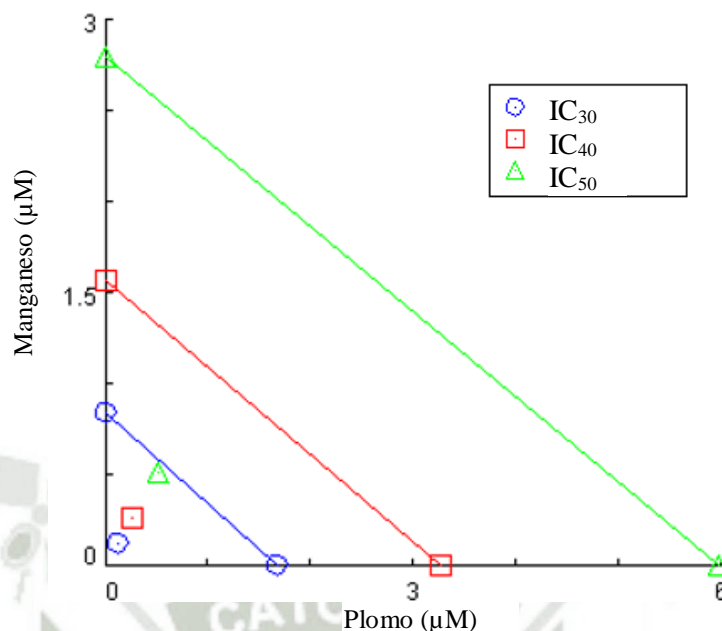


Fig. 31 Isobolograma que ilustra la interacción entre el Mn y el Pb en células neuroblastomas B-35. Los valores de IC₃₀, IC₄₀ e IC₅₀ para el Pb y Mn están ubicados en la gráfica y conectan el eje “X” y “Y”, respectivamente.

Fuente: elaboración propia.

La **Tabla 8** muestra los valores de índices de combinación del efecto combinado del Mn y Pb sobre las células B-35 en diferentes niveles de inhibición celular (IC₃₀, IC₄₀, IC₅₀, IC₇₅ e IC₉₀). Además, se puede observar que los valores están por debajo de la unidad, indicando el efecto sinérgico.

Tabla 8 Valores de CI a diferentes niveles de inhibición de células B-35, obtenido por el software CompuSyn 1.0.

Nivel de inhibición	Valor de CI
IC ₃₀	0.23110
IC ₄₀	0.25013
IC ₅₀	0.26903
IC ₇₅	0.32805
IC ₉₀	0.40059

Fuente: elaboración propia.

CONCLUSIONES

1. El manganeso produce una significativa disminución de la viabilidad celular ($p < 0.05$) dependiente de la concentración a partir de $0.15 \mu\text{M}$ y $0.25 \mu\text{M}$ en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35, respectivamente; además, un IC_{50} de $2.269 \mu\text{M}$ para las primeras y $2.249 \mu\text{M}$ para las otras células.
2. El plomo produce una significativa disminución de la viabilidad celular ($p < 0.05$) dependiente de la concentración a partir de $0.50 \mu\text{M}$ en ambas células; además, un IC_{50} de $4.141 \mu\text{M}$ y $4.576 \mu\text{M}$; en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35, respectivamente.
3. La combinación de manganeso y plomo (en una proporción 1:1; siendo las concentraciones 0.05 ; 0.15 ; 0.25 y $0.50 \mu\text{M}$), produce un daño sinérgico sobre las células neuroblastomas humanas SH-SY5Y y de ratas B-35.

SUGERENCIAS

1. Ampliar estudios para dilucidar el mecanismo de neurotoxicidad del manganeso y plomo.
2. Determinar el mecanismo de interacción por el que el manganeso y el plomo producen un daño sinérgico.
3. Realizar estudios con posibles agentes que contrarresten el efecto neurotóxico de estos metales.
4. Desarrollar estudios en otras células e incluso en animales de experimentación para determinar el efecto neurotóxico del manganeso y plomo, utilizando marcadores biológicos.
5. Desarrollar ensayos que evalúen el efecto neurotóxico de la interacción del manganeso, plomo y otros contaminantes medioambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Andrade, V.; Mateus, M. L.; Batoréu, M. C.; Aschner, M.; dos Santos, A. P. M. Urinary delta-ALA: A potential biomarker of exposure and neurotoxic effect in rats co-treated with a mixture of lead, arsenic and manganese. *Neurotoxicology* **2013**, 38, 33–41.
- (2) Alimba, C. G.; Dhillon, V.; Bakare, A. A.; Fenech, M. Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2016**, 798–799, 35–47.
- (3) ATSDR. Toxicological Profile for Lead. *U.S Public Heal. Serv. Agency Toxic Subst. Dis. Regist.* **2007**, No. August, 582.
- (4) ATSDR. Toxicological Profile for Manganese. *Public Health* **2000**, No. September, 504.
- (5) Abu Hasan, H.; Sheikh Abdullah, S. R.; Tan Kofli, N.; Yeoh, S. J. Interaction of environmental factors on simultaneous biosorption of lead and manganese ions by locally isolated *Bacillus cereus*. *J. Ind. Eng. Chem.* **2016**, 37, 295–305.
- (6) USEPA. Integrated Science Assessment for Lead. *Off. Res. Dev. Natl. Cent. Environ. Assess. – RTP Div.* **2013**, No. November.
- (7) Hepp, N. M.; Mindak, W. R.; Cheng, J. Determination of total lead in lipstick: Development and validation of a microwave-assisted digestion, inductively coupled plasma-mass spectrometric method. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2010**, 32, 233.
- (8) Martinez-Finley, E. J.; Chakraborty, S.; Fretham, S. J. B.; Aschner, M. Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals. *Metallomics* **2012**, 4 (7), 593.
- (9) Barbier, O.; Jacquillet, G.; Tauc, M.; Cougnon, M.; Poujeol, P. Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron - Physiol.* **2005**, 99 (4), 105–110.
- (10) Bowler, R. M.; Gysens, S.; Diamond, E.; Nakagawa, S.; Drezgic, M.; Roels, H. A. Manganese exposure: Neuropsychological and neurological symptoms and effects in welders. *Neurotoxicology* **2006**, 27 (3), 315–326.
- (11) Hu, H.; Shine, J.; Wright, R. O. The Challenge Posed to Children's Health by Mixtures of Toxic Waste: The Tar Creek Superfund Site as a Case-Study. *Pediatr. Clin. North Am.* **2007**, 54 (1), 155–175.
- (12) Cory-Slechta, D. A.; Weiss, B.; Cranmer, J. The environmental etiologies of neurobehavioral deficits and disorders: Weaving complex outcomes and risk modifiers into the equation. *Neurotoxicology* **2008**, 29 (5), 759–760.
- (13) Kim, Y.; Kim, B. N.; Hong, Y. C.; Shin, M. S.; Yoo, H. J.; Kim, J. W.; Bhang, S. Y.; Cho, S. C. Co-exposure to environmental lead and manganese affects the intelligence of school-aged children. *Neurotoxicology* **2009**, 30 (4), 564–571.
- (14) Menezes-Filho, J. A.; Bouchard, M.; Sarcinelli, P. D. N.; Moreira, J. C. Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review. *Rev. Panam. Salud Publica / Pan Am. J. Public Heal.* **2009**, 26 (6), 541–548.
- (15) Rodríguez-Barranco, M.; Lacasaña, M.; Aguilar-Garduño, C.; Alguacil, J.; Gil, F.; González-Alzaga, B.; Rojas-García, A. Association of arsenic,

- cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Total Environ.* **2013**, 454–455, 562–577.
- (16) Gerber, G. B.; Leonard, A.; Hantson, P. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, 42 (1), 25–34.
- (17) Erikson, K. M.; Thompson, K.; Aschner, J.; Aschner, M. Manganese neurotoxicity: A focus on the neonate. *Pharmacol. Ther.* **2007**, 113 (2), 369–377.
- (18) Aschner, M.; Guilarte, T. R.; Schneider, J. S.; Zheng, W. Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, 221 (2), 131–147.
- (19) WHO. Environmental health criteria Manganese.
- (20) Ljung, K.; Vahter, M. Time to re-evaluate the guideline value for manganese in drinking water? *Environ. Health Perspect.* **2007**, 115 (11), 1533–1538.
- (21) Brault, N.; Loranger, S.; Courchesne, F.; Kennedy, G.; Zayed, J. Bioaccumulation of manganese by plants: Influence of MMT as a gasoline additive. *Sci. Total Environ.* **1994**, 153 (1–2), 77–84.
- (22) Geivanidis, S.; Pistikopoulos, P.; Samaras, Z. Effect on exhaust emissions by the use of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) fuel additive and other lead replacement gasolines. *Sci. Total Environ.* **2003**, 305 (1–3), 129–141.
- (23) Batterman, S.; Su, F. C.; Jia, C.; Naidoo, R. N.; Robins, T.; Naik, I. Manganese and lead in children's blood and airborne particulate matter in Durban, South Africa. *Sci. Total Environ.* **2011**, 409 (6), 1058–1068.
- (24) Roos, J. W.; Lynam, D. R.; Smith, I. L.; Pfeifer, G. D.; Reynolds, J. G.; Corporation, E.; National, L. L. Characterization of combustion products from the fuel additive MMT. *Air Waste Manag. Assoc. Annu. Conf.* **2000**, 1–20.
- (25) Colmenares, C.; Deutsch, S.; Evans, C.; Nelson, A. J.; Terminello, L. J.; Reynolds, J. G.; Roos, J. W.; Smith, I. L. Analysis of manganese particulates from automotive decomposition of methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *Appl. Surf. Sci.* **1999**, 151 (3), 189–202.
- (26) DS. Reglamento para la comercialización de biocombustibles. *Decreto Supremo N° 021-2007-EM* **2007**.
- (27) Keen, C. L.; Bell, J. G.; Lönnerdal, B. The Effect of Age on Manganese Uptake and Retention from Milk and Infant Formulas in Rats. *J. Nutr.* **1986**, 116 (3), 395–402.
- (28) Dorman, D. C.; Struve, M. F.; Clewell, H. J.; Andersen, M. E. Application of pharmacokinetic data to the risk assessment of inhaled manganese. *Neurotoxicology* **2006**, 27 (5), 752–764.
- (29) Meco, G., Bonifati, V., Vanacore, N., & Fabrizio, E. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand. J. Work. Environ. Health* **1994**, 20 (4), 301–305.
- (30) Young, S. W., Bradley, B., Muller, H. H., & Rubin, D. L. Detection of hepatic malignancies using Mn-DPDP (manganese dipyridoxal diphosphate) hepatobiliary MRI contrast agent. *Magn. Reson. Imaging* **1990**, 8 (3), 267–276.
- (31) Aschner, M.; Aschner, J. L. Manganese neurotoxicity: Cellular effects and

- blood-brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1991**, *15* (3), 333–340.
- (32) Bernhard, D.; Rossmann, A.; Wick, G. Metals in cigarette smoke. *IUBMB Life* **2005**, *57* (12), 805–809.
- (33) Rossander-Hulten, L., Brune, M., Sandström, B., Lönnerdal, B., & Hallberg, L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1991**, *54* (1), 152–156.
- (34) Aschner, M.; Erikson, K. M.; Dorman, D. C. Manganese Dosimetry: Species Differences and Implications for Neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, *35* (1), 1–32.
- (35) Pleba, P. a; Pearson, K. H. Determination of Manganese in Whole Blood and Serum. **1979**, *25* (11), 1915–1918.
- (36) Tjälve, H., & Henriksson, J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology* **1998**, *20* (2–3), 181–195.
- (37) Tjälve, H.; Henriksson, J.; Tallkvist, J.; Larsson, B. S.; Lindquist, N. G. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. *Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *79* (6), 347–356.
- (38) Aschner, M.; Gannon, M. Manganese (Mn) transport across the rat blood-brain barrier: Saturable and transferrin-dependent transport mechanisms. *Brain Res. Bull.* **1994**, *33* (3), 345–349.
- (39) Milatovic, D.; Yin, Z.; Gupta, R. C.; Sidoryk, M.; Albrecht, J.; Aschner, J. L.; Aschner, M. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* **2007**, *98* (1), 198–205.
- (40) Flynn, M. R.; Susi, P. Neurological risks associated with manganese exposure from welding operations - A literature review. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2009**, *212* (5), 459–469.
- (41) Woolf, A.; Wright, R.; Amarasiriwardena, C.; Bellinger, D. A child with chronic manganese exposure from drinking water. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110* (6), 613–616.
- (42) 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.* **1989**, *46* (10), 1104–1106.
- (43) Crossgrove, J.; Zheng, W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed.* **2004**, *17* (8), 544–553.
- (44) Calne, D. B.; Chu, N. S.; Huang, C. C.; Lu, C. S.; Olanow, W. Manganese and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* **1994**, *44* (9), 1583–1586.
- (45) Cersosimo, M. G.; Koller, W. C. The diagnosis of manganese-induced parkinsonism. *Neurotoxicology* **2006**, *27* (3), 340–346.
- (46) Guilarte, T. R. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118* (8), 1071–1080.
- (47) Zheng, W.; Ren, S.; Graziano, J. H. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: A mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res.* **1998**, *799* (2), 334–342.
- (48) Zheng, W.; Zhao, Q. Iron overload following manganese exposure in cultured neuronal, but not neuroglial cells. *Brain Res.* **2001**, *897* (1–2), 175–179.
- (49) Lawrence, G. D., & Sawyer, D. T. The chemistry of biological manganese. *Coord. Chem. Rev.* **1978**, *27* (2), 173–193.

- (50) Betharia, S.; Maher, T. J. Neurobehavioral effects of lead and manganese individually and in combination in developmentally exposed rats. *Neurotoxicology* **2012**, *33* (5), 1117–1127.
- (51) Wedler, F. C.; Denman, R. B.; Roby, W. G. Glutamine synthetase from ovine brain is a manganese(II) enzyme. *Biochemistry* **1982**, *21* (25), 6389–6396.
- (52) Li, S.; Yan, T.; Yang, J.-Q.; Oberley, T. D.; Oberley, L. W. The Role of Cellular Glutathione Peroxidase Redox Regulation in the Suppression of Tumor Cell Growth by Manganese Superoxide Dismutase. *Cancer Res.* **2000**, *60* (14), 3927–3939.
- (53) Jang, B. C. Induction of COX-2 in human airway cells by manganese: Role of PI3K/PKB, p38 MAPK, PKCs, Src, and glutathione depletion. *Toxicol. Vitro.* **2009**, *23* (1), 120–126.
- (54) Ramesh, T.; Ghosh, D.; Gunasekar, P. G. Activation of early signaling transcription factor, NF- κ B following low-level manganese exposure. *Toxicol. Lett.* **2002**, *136* (2), 151–158.
- (55) EPA. Methods for derivation of inhalation reference concentrations and application of inhalation dosimetry. *United States Environ. Prot. Agency, Off. Res. Dev.* **1994**.
- (56) ACGIH. Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents - Biological Exposure Indices. *Am. Conf. Gov. Ind. Hyg.* **2001**.
- (57) World Health Organization, W. Air quality guidelines for Europe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **1996**, *3* (1), 23–23.
- (58) Environmental Protection Agency. 2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. *April*. 2012.
- (59) Graham, D. G. Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **1983**, *5* (1), 83–95.
- (60) Chandra, S. V.; Shukla, G. S. Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water. *J. Neurochem.* **1981**, *36* (2), 683–687.
- (61) Gwiazda, R.; Lucchini, R.; Smith, D. Adequacy and consistency of animal studies to evaluate the neurotoxicity of chronic low-level manganese exposure in humans. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **2007**, *70* (7), 594–605.
- (62) Chandra, S. V.; Malhotra, K. M.; Shukla, G. S. GABAergic neurochemistry in manganese exposed rats. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **1982**, *51* (5), 456–458.
- (63) Anderson, J. G.; Fordahl, S. C.; Cooney, P. T.; Weaver, T. L.; Colyer, C. L.; Erikson, K. M. Manganese exposure alters extracellular GABA, GABA receptor and transporter protein and mRNA levels in the developing rat brain. *Neurotoxicology* **2008**, *29* (6), 1044–1053.
- (64) Brouillet, E. P.; Shinobu, L.; McGarvey, U.; Hochberg, F.; Beal, M. F. Manganese injection into the rat striatum produces excitotoxic lesions by impairing energy metabolism. *Exp. Neurol.* **1993**, *120* (1), 89–94.
- (65) Zheng, W.; Jiang, Y. M.; Zhang, Y.; Jiang, W.; Wang, X.; Cowan, D. M. Chelation therapy of manganese intoxication with para-aminosalicylic acid (PAS) in Sprague-Dawley rats. *Neurotoxicology* **2009**, *30* (2), 240–248.
- (66) Marreilha dos Santos, A. P.; Lucas, R. L.; Andrade, V.; Mateus, M. L.; Milatovic, D.; Aschner, M.; Batoreu, M. C. Protective effects of ebselen (Ebs)

- and para-aminosalicylic acid (PAS) against manganese (Mn)-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, 258 (3), 394–402.
- (67) Stephenson, A. P.; Schneider, J. A.; Nelson, B. C.; Atha, D. H.; Jain, A.; Soliman, K. F. A.; Aschner, M.; Mazziro, E.; Renee Reams, R. Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: Attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. *Toxicol. Lett.* **2013**, 218 (3), 299–307.
- (68) WHO. Childhood Lead Poisoning. *World Heal. Organ.* **2010**.
- (69) Jorgensen, C. K. Oxidation numbers and oxidation states. *Springer Sci. Bus. Media* **2012**.
- (70) Needleman, H. L., Schell, A., Bellinger, D., Leviton, A., & Allred, E. N. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood: an 11-year follow-up report. *N. Engl. J. Med.* **1990**, 322 (2), 83–88.
- (71) Jacobs, D. E.; Clickner, R. P.; Zhou, J. Y.; Viet, S. M.; Marker, D. A.; Rogers, J. W.; Zeldin, D. C.; Broene, P.; Friedman, W. The prevalence of lead-based paint hazards in US housing. *Environ. Health Perspect.* **2002**, 110 (10), 599–606.
- (72) Jorhem, L.; Slorach, S. Lead, chromium, tin, iron and cadmium in foods in welded cans. *Food Addit. Contam.* **1987**, 4 (3), 309–316.
- (73) UNEP. Partnership for clean fuels and vehicles.
- (74) DS. Dispone eliminar del mercado la oferta de Gasolina 95 RON con plomo y reducir el límite máximo de contenido de plomo en la Gasolina 84 RON. *Decreto Supremo N° 019-98-MTC* **1998**.
- (75) Silbergeld, E. K. Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lampost. *FASEB J.* **1992**, 6, 3201–3206.
- (76) Silbergeld, E. K. Lead in bone: Implications for toxicology during pregnancy and lactation. *Environ. Health Perspect.* **1991**, 91, 63–70.
- (77) Schell, L. M.; Denham, M.; Stark, A. D.; Gomez, M.; Ravenscroft, J.; Parsons, P. J.; Aydermir, A.; Samelson, R. Maternal blood lead concentration, diet during pregnancy, and anthropometry predict neonatal blood lead in a socioeconomically disadvantaged population. *Environ. Health Perspect.* **2003**, 111 (2), 195–200.
- (78) Goyer, R. Toxic effects of metals. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. *C.D. Klaassen, Ed. McGraw-Hill* **1996**.
- (79) Bradman, A.; Eskenazi, B.; Sutton, P.; Athanasoulis, M.; Goldman, L. R. Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ. Health Perspect.* **2001**, 109 (10), 1079–1084.
- (80) I. Bannon, D.; Portnoy, M. E.; Olivi, L.; Lees, P. S. J.; Culotta, V. C.; Bressler, J. P. Uptake of lead and iron by divalent metal transporter 1 in yeast and mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 295 (4), 978–984.
- (81) Bannon, D. I.; Abounader, R.; Lees, P. S. J.; Bressler, J. P. Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *AJP Cell Physiol.* **2003**, 284 (1), C44–C50.
- (82) Markovac, J.; Goldstein, G. W. Picomolar concentrations of lead stimulate brain protein kinase C. *Nature* **1988**, 334 (7), 71–73.
- (83) Philip, A. T., Gerson, B. Lead poisoning--Part I. Incidence, etiology, and

- toxicokinetics. *Clin. Lab. Med.* **1994**, *14* (2), 423–444.
- (84) Rodrigues, A. L.; Rocha, J. B.; Mello, C. F.; Souza, D. O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol. Toxicol.* **1996**, *79* (3), 150–156.
- (85) Deane, R.; Bradbury, M. W. B. Transport of Lead-203 at the Blood Brain Barrier During Short Cerebrovascular Perfusion with Saline in the Rat. *J. Neurochem.* **1990**, *54* (3), 905–914.
- (86) Tomsig, J. L.; Suszkiw, J. B. Permeation of Pb²⁺ through calcium channels: fura-2 measurements of voltage- and dihydropyridine-sensitive Pb²⁺ entry in isolated bovine chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1069* (2), 197–200.
- (87) Kerper, L. E.; Hinkle, P. M. Cellular uptake of lead is activated by depletion of intracellular calcium stores. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (13), 8346–8352.
- (88) Nihei, M. K.; Desmond, N. L.; McGlothlan, J. L.; Kuhlmann, A. C.; Guilarte, T. R. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neuroscience* **2000**, *99* (2), 233–242.
- (89) Zheng, W., Perry, D. F., Nelson, D. L., Aposhian, H. V. Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals. *FASEB J.* **1991**, *5* (8), 2188–2193.
- (90) Bolanowska, W. Distribution and excretion of triethyllead in rats. *Br. J. Ind. Med.* **1968**, *25* (3), 203–208.
- (91) Lidsky, T. I.; Schneider, J. S. Lead neurotoxicity in children: Basic mechanisms and clinical correlates. *Brain* **2003**, *126* (1), 5–19.
- (92) White, R. F.; Diamond, R.; Proctor, S.; Morey, C.; Hu, H. Residual cognitive deficits 50 years after lead poisoning during childhood. *Br. J. Ind. Med.* **1993**, *50* (7), 613–622.
- (93) Godwin, H. A. The biological chemistry of lead. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (2), 223–227.
- (94) Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B. B.; Beeregowda, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* **2014**, *7* (2), 60–72.
- (95) Warren, M. J.; Cooper, J. B.; Wood, S. P.; Shoolingin-Jordan, P. M. Lead poisoning, haem synthesis and 5-aminolaevulinic acid dehydratase. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23* (6), 217–221.
- (96) Paschen, W. Role of calcium in neuronal cell injury: Which subcellular compartment is involved? *Brain Res. Bull.* **2000**, *53* (4), 409–413.
- (97) CDC. Standard Surveillance Definitions and Classifications. *Cent. Dis. Control Prev.* **2012**.
- (98) WHO. Preventing disease through healthy environments. *World Heal. Organ.* **2010**.
- (99) DS. Establecen valor anual de concentración de plomo. *Decreto Supremo N° 069-2003-PCM* **2003**.
- (100) Lasley, S. M.; Gilbert, M. E. Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level. *Toxicol. Sci.* **2002**, *66* (1), 139–147.
- (101) Lasley, S. M.; Gilbert, M. E. Lead inhibits the rat N-methyl-d-aspartate receptor channel by binding to a site distinct from the zinc allosteric site.

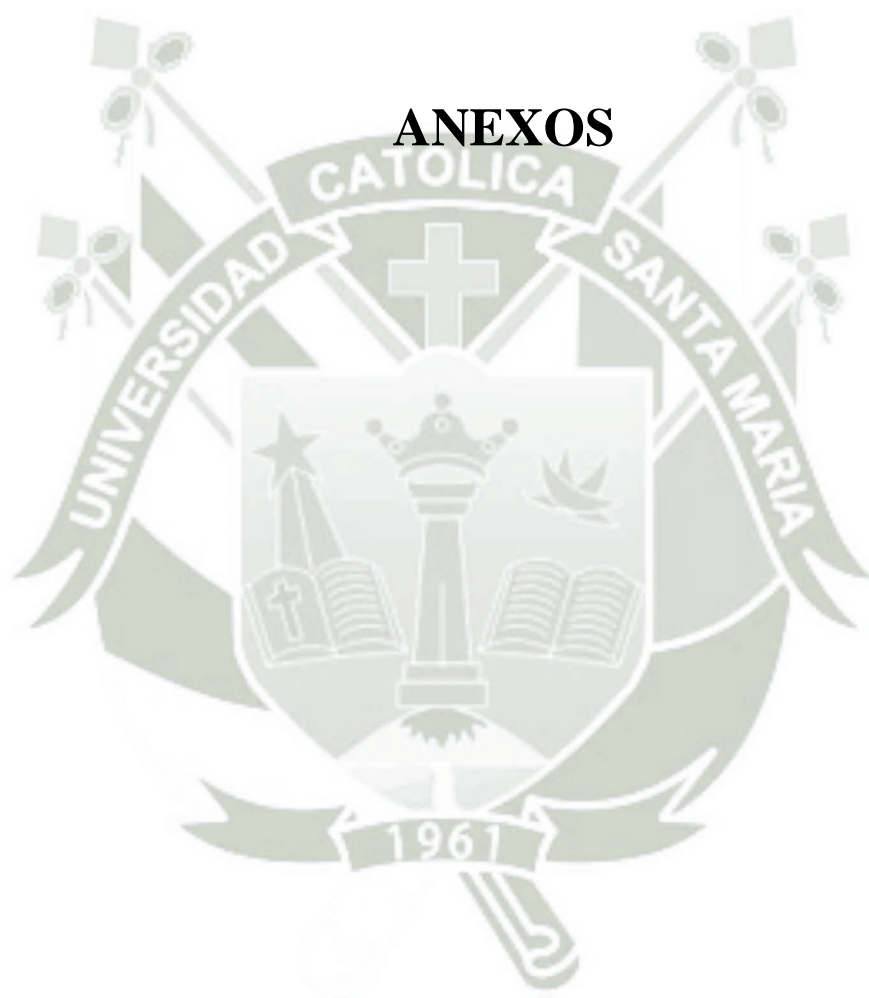
- Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, 159 (3), 224–233.
- (102) Bourjeily, N.; Suszkiw, J. B. Developmental cholinotoxicity of lead: Loss of septal cholinergic neurons and long-term changes in cholinergic innervation of the hippocampus in perinatally lead-exposed rats. *Brain Res.* **1997**, 771 (2), 319–328.
- (103) Sidhu, P.; Nehru, B. Relationship between lead-induced biochemical and behavioral changes with trace element concentrations in rat brain. *Biol. Trace Elem. Res.* **2003**, 92 (3), 245–256.
- (104) Devi, C. B.; Reddy, G. H.; Prasanthi, R. P. J.; Chetty, C. S.; Reddy, G. R. Developmental lead exposure alters mitochondrial monoamine oxidase and synaptosomal catecholamine levels in rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2005**, 23 (4), 375–381.
- (105) Gurer, H.; Ercal, N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29 (10), 927–945.
- (106) Silins, I.; Högberg, J. Combined toxic exposures and human health: Biomarkers of exposure and effect. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2011**, 8 (3), 629–647.
- (107) Li, G.; Zhang, L.; Lu, L.; Wu, P.; Zheng, W. Occupational exposure to welding fume among welders: alterations of manganese, iron, zinc, copper, and lead in body fluids and the oxidative stress status. *J. Occup. Environ. Med.* **2004**, 46 (3), 241–248.
- (108) Delves, H. T.; Clayton, B. E.; Bicknell, J. Concentration of trace metals in the blood of children. *Br. J. Prev. Soc. Med.* **1973**, 27 (2), 100–107.
- (109) Zielhuis, R. L.; Del Castillo, P.; Herber, R. F. M.; Wibowo, A. A. E. Levels of lead and other metals in human blood: Suggestive relationships, determining factors. *Environ. Health Perspect.* **1978**, 25 (1), 103–109.
- (110) Malhotra, K. M.; Murthy, R. C.; Srivastava, R. S.; Chandra, S. V. Concurrent exposure of lead and manganese to iron-deficient rats: Effect on lipid peroxidation and contents of some metals in the brain. *J. Appl. Toxicol.* **1984**, 4 (1), 22–25.
- (111) Hayat, M. A. *Neuroblastoma*; Springer, Ed.; 2012; Vol. 1.
- (112) Thiele, C. Neuroblastoma. *Hum. Cell Cult.* **1998**, 1, 21–53.
- (113) Shipley, M. M.; Mangold, C. A.; Szpara, M. L. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J. Vis. Exp.* **2016**, 108 (e53193), 1–11.
- (114) Xie, H. R.; Hu, L. S.; Li, G. Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J. (Engl)*. **2010**, 123 (8), 1086–1092.
- (115) Otey, C. a; Boukhelifa, M.; Maness, P. B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons. *Methods Cell Biol.* **2003**, 71, 287–304.
- (116) Schubert, D.; Heinemann, S.; Carlisle, W.; Tarikas, H.; Kimes, B.; Patrick, J.; Steinbach, J. H.; Culp, W.; Brandt, B. L. Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature* **1974**, 249 (5454), 224–227.
- (117) Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Current Protocols in Immunology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2001; Vol. Appendix 3, p Appendix 3B.
- (118) C.J., G.; S.J., H.; S., D.; N.J., M. Microculture tetrazolium assays: a

- comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J. Immunol. Methods* **1995**, *179* (1), 95–103.
- (119) Promega. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. *Tech. Bull.* **2005**.
- (120) Tallarida, R. J.; Stone, D. J.; Raffa, R. B. Efficient designs for studying synergistic drug combinations. *Life Sci.* **1997**, *61* (26), PL417-PL425.
- (121) Yco, L. P.; Geerts, D.; Mocz, G.; Koster, J.; Bachmann, A. S. Effect of sulfasalazine on human neuroblastoma: analysis of sepiapterin reductase (SPR) as a new therapeutic target. *BMC Cancer* **2015**, *15* (1), 477.
- (122) Smith, E. M.; Iftikar, F. I.; Higgins, S.; Irshad, A.; Jandoc, R.; Lee, M.; Wilson, J. Y. In vitro inhibition of cytochrome P450-mediated reactions by gemfibrozil, erythromycin, ciprofloxacin and fluoxetine in fish liver microsomes. *Aquat. Toxicol.* **2012**, *109*, 259–266.
- (123) Hirota, K.; Sikand, K. S.; Lambert, D. G. Interaction of ketamine with mu2 opioid receptors in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Anesth.* **1999**, *13* (2), 107–109.
- (124) Chou, T. C. Frequently asked questions in drug combinations and the mass-action law-based answers. *Synergy* **2014**, *1* (1), 3–21.
- (125) Hirst, R. A.; Lambert, D. G. Adenylyl cyclase in SH-SY5Y human neuroblastoma cells is regulated by intra- and extracellular calcium. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49* (11), 1633–1640.
- (126) Chetty, C. S.; Vemuri, M. C.; Campbell, K.; Suresh, C. Lead-induced cell death of human neuroblastoma cells involves GSH deprivation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2005**, *10* (3), 413–423.
- (127) Fedorova, T. N.; Kulikova, O. I.; Stvolinsky, S. L.; Orlova, V. S. The protective effect of (S)-trolox–carnosine on a human neuroblastoma SH-SY5Y cell culture under the impact of heavy metals. *Neurochem. J.* **2016**, *10* (1), 53–58.
- (128) Suarez, N.; Walum, E.; Eriksson, H. Cellular neurotoxicity of trivalent manganese bound to transferrin or pyrophosphate studied in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell cultures. *Toxicol. Vitro.* **1995**, *9* (5), 717–721.
- (129) Xu, X. H.; Li, G. L.; Wang, B. A.; Qin, Y.; Bai, S. R.; Rong, J.; Deng, T.; Li, Q. Diallyl trisulfide protects against oxygen glucose deprivation -induced apoptosis by scavenging free radicals via the PI3K/Akt -mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway in B35 neural cells. *Brain Res.* **2015**, *1614* (270), 38–50.
- (130) Kayhan, B.; Taşdemir, Ş.; Çoruk İlhan, P.; Görgün, C.; Şendemir Ürkmez, A.; Şengül, G. Graphene oxide has a neuroprotective effect against glutamate-induced excitotoxicity on B35 neuroblastoma cell line. *Anatomy* **2015**, *9* (3), 156–167.
- (131) Pusch, A.; Boeckenhoff, A.; Glaser, T.; Kaminski, T.; Kirfel, G.; Hans, M.; Steinfarz, B.; Swandulla, D.; Kubitscheck, U.; Gieselmann, V.; et al. CD44 and hyaluronan promote invasive growth of B35 neuroblastoma cells into the brain. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2010**, *1803* (2), 261–274.
- (132) Chong, W. S.; Hyun, C. L.; Park, M. K.; Park, J. M.; Song, H.-O.; Park, T.; Lim, Y. S.; Cho, C. K.; Kang, P. S.; Kwon, H. U. Midazolam protects B35 neuroblastoma cells through Akt-phosphorylation in reactive oxygen species derived cellular injury. *Korean J. Anesthesiol.* **2012**, *62* (2), 166.
- (133) Bautista, E.; Vergara, P.; Segovia, J. Iron-induced oxidative stress activates

- AKT and ERK1/2 and decreases Dyrk1B and PRMT1 in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2016**, *34*, 62–69.
- (134) Kim, J.-H.; Jeong, M. S.; Kim, D.-Y.; Her, S.; Wie, M.-B. Zinc oxide nanoparticles induce lipoxygenase-mediated apoptosis and necrosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem. Int.* **2015**, *90*, 1–11.
- (135) Heggland, I.; Kaur, P.; Syversen, T. Uptake and efflux of methylmercury in vitro: Comparison of transport mechanisms in C6, B35 and RBE4 cells. *Toxicol. Vitro.* **2009**, *23* (6), 1020–1027.
- (136) Rounbehler, R. J.; Li, W.; Hall, M. A.; Yang, C.; Fallahi, M.; Cleveland, J. L. Targeting Ornithine Decarboxylase Impairs Development of MYCN-Amplified Neuroblastoma. *Cancer Res.* **2009**, *69* (2), 547–553.
- (137) Polet, F.; Corbet, C.; Pinto, A.; Rubio, L. I.; Martherus, R.; Bol, V.; Drozak, X.; Grégoire, V.; Riant, O.; Feron, O. Reducing the serine availability complements the inhibition of the glutamine metabolism to block leukemia cell growth. *Oncotarget* **2015**, *5* (2), 3–5.
- (138) ThermoFisher. Best Practices for DNA Transfection <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cell-culture/transfection/transfection-support/transfection-tips-and-tricks.html> (accessed Jul 26, 2016).
- (139) Dewey, C. M.; Cenik, B.; Sephton, C. F.; Dries, D. R.; Mayer, P.; Good, S. K.; Johnson, B. A.; Herz, J.; Yu, G. TDP-43 is directed to stress granules by sorbitol, a novel physiological osmotic and oxidative stressor. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31* (5), 1098–1108.
- (140) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83* (11), 757–766.
- (141) Roth, J. A.; Li, Z.; Sridhar, S.; Khoshbouei, H. The effect of manganese on dopamine toxicity and dopamine transporter (DAT) in control and DAT transfected HEK cells. *Neurotoxicology* **2013**, *35* (1), 121–128.
- (142) Bouabid, S.; Tinakoua, A.; Lakhdar-Ghazal, N.; Benazzouz, A. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. *J. Neurochem.* **2016**, *136* (4), 677–691.
- (143) Florence, T. M.; Stauber, J. L. Manganese catalysis of dopamine oxidation. *Sci. Total Environ.* **1989**, *78*, 233–240.
- (144) Shi, X.; Dalal, N. S. The glutathionyl radical formation in the reaction between manganese and glutathione and its neurotoxic implications. *Med. Hypotheses* **1990**, *33* (2), 83–87.
- (145) Dukhande, V. V.; Malthankar-Phatak, G. H.; Hugus, J. J.; Daniels, C. K.; Lai, J. C. K. Manganese-induced neurotoxicity is differentially enhanced by glutathione depletion in astrocytoma and neuroblastoma cells. *Neurochem. Res.* **2006**, *31* (11), 1349–1357.
- (146) Suresh, C.; Johnson, J.; Mohan, R.; Chetty, C. S. Synergistic effects of amyloid peptides and lead on human neuroblastoma cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2012**, *17* (3), 408–421.
- (147) Suresh, C.; Dennis, A. O.; Heinz, J.; Vemuri, M. C.; Chetty, C. S. Melatonin protection against lead-induced changes in human neuroblastoma cell cultures.

- Int. J. Toxicol.* **2006**, 25 (6), 459–464.
- (148) Yang, X.; Wang, B.; Zeng, H.; Cai, C.; Hu, Q.; Cai, S.; Xu, L.; Meng, X.; Zou, F. Role of the mitochondrial Ca(2+) uniporter in Pb(2+)-induced oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Brain Res.* **2014**, 1575, 12–21.
- (149) Audrey, S.; Takser, L.; Andr??, M.; Martin, S.; Donna, M.; Genevi??ve, S. A.; Philippe, B.; Georgette, H.; Guy, H. A comparative study of manganese and lead levels in human umbilical cords and maternal blood from two urban centers exposed to different gasoline additives. *Sci. Total Environ.* **2002**, 290 (1–3), 157–164.
- (150) Quintanar, L. Manganese neurotoxicity: A bioinorganic chemist's perspective. *Inorganica Chim. Acta* **2008**, 361 (4), 875–884.
- (151) Tong, J.; Wang, Y.; Lu, Y. In vitro evaluation of inorganic and methyl mercury mediated cytotoxic effect on neural cells derived from different animal species. *J. Environ. Sci. (China)* **2015**, 41 (1i), 0–7.
- (152) Fallahi-Sichani, M.; Honarnejad, S.; Heiser, L. M.; Gray, J. W.; Sorger, P. K. Metrics other than potency reveal systematic variation in responses to cancer drugs. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9 (11), 708–714.
- (153) Struzyńska, L.; Sulkowski, G. Relationships between glutamine, glutamate, and GABA in nerve endings under Pb-toxicity conditions. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98 (6), 951–958.
- (154) Silbergeld, E. K.; Miller, L. P.; Kennedy, S.; Eng, N. Lead, GABA, and seizures: Effects of subencephalopathic lead exposure on seizure sensitivity and GABAergic function. *Environ. Res.* **1979**, 19 (2), 371–382.
- (155) Lin, X.; Gu, Y.; Zhou, Q.; Mao, G.; Zou, B.; Zhao, J. Combined toxicity of heavy metal mixtures in liver cells. *J. Appl. Toxicol.* **2016**, 36 (9), 1163–1172.
- (156) CHANDRA, S. V.; MURTHY, R. .; SAXENA, D. .; LAL, B. Effects of pre- and postnatal combined exposure to Pb and Mn on brain development in rats. *Ind. Health* **1983**, 21 (4), 273–279.
- (157) Claus Henn, B.; Schnaas, L.; Ettinger, A. S.; Schwartz, J.; Lamadrid-Figueroa, H.; Hernández-Avila, M.; Amarasiwardena, C.; Hu, H.; Bellinger, D. C.; Wright, R. O.; et al. Associations of Early Childhood Manganese and Lead Coexposure with Neurodevelopment. *Environ. Health Perspect.* **2011**, 120 (1), 126–131.

ANEXOS



Anexo 1

Efecto de Mn en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

1. Porcentajes de viabilidad celular

	Mn (μ M)									
	Control	0.05	0.15	0.25	0.50	0.75	1.00	2.00	5.00	50.00
	100.00	99.12	89.49	86.34	81.79	74.43	72.85	56.92	34.33	11.38
	100.00	95.02	85.38	80.55	73.66	65.39	63.86	56.74	39.36	13.02
	100.00	96.76	93.52	87.03	80.38	73.38	68.43	54.95	36.52	9.39
Promedio	100.00	96.97	89.46	84.64	78.61	71.07	68.38	56.20	36.73	11.26
σ	0.00	2.06	4.07	3.56	4.34	4.94	4.50	1.09	2.52	1.82
SEM	0.00	1.19	2.35	2.05	2.51	2.85	2.60	0.63	1.46	1.05

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	21121.77	2346.864	217.623	<0.001
Dentro Grupos	20	215.682	10.784		
Total	29	21337.45			

3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	88.737	33.095	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	63.263	23.594	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	43.797	16.334	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	31.62	11.793	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	28.933	10.791	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	21.39	7.977	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	15.36	5.729	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	10.537	3.93	0.006	Yes
Col 1 vs. Col 2	3.033	1.131	0.831	No

Anexo 2

Efecto de Mn en células neuroblastomas de ratas B-35

1. Porcentajes de viabilidad celular

	Mn (μ M)									
	Control	0.05	0.15	0.25	0.50	0.75	1.00	2.00	5.00	50.00
	100.00	91.03	87.29	81.61	71.07	59.70	57.53	49.22	39.07	12.04
	100.00	94.12	90.45	82.04	75.43	71.18	70.45	61.22	35.21	17.22
	100.00	96.28	92.07	91.26	83.71	80.31	74.00	59.33	40.61	6.69
Promedio	100.00	93.81	89.94	84.97	76.74	70.40	67.33	56.59	38.30	11.98
σ	0.00	2.64	2.43	5.45	6.42	10.33	8.67	6.45	2.78	5.27
SEM	0.00	1.52	1.40	3.15	3.71	5.96	5.01	3.73	1.61	3.04

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	20045.242	2227.249	64.952	<0.001
Dentro Grupos	20	685.819	34.291		
Total	29	20731.061			

3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	88.016	18.408	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	61.7	12.905	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	43.408	9.079	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	32.675	6.834	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	29.601	6.191	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	23.263	4.866	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	15.031	3.144	0.033	Yes
Col 1 vs. Col 3	10.063	2.105	0.245	No
Col 1 vs. Col 2	6.191	1.295	0.728	Do Not Test

Anexo 3

Efecto de Pb en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

1. Porcentajes de viabilidad celular

	Pb (μ M)									
	Control	0.05	0.15	0.25	0.50	0.75	1.00	2.00	5.00	50.00
	100.00	97.78	98.36	92.18	94.70	85.36	75.50	74.17	61.08	25.42
	100.00	95.04	95.28	92.97	75.12	75.38	72.32	63.74	52.13	19.17
	100.00	91.17	86.87	88.04	81.86	71.60	78.28	62.29	46.77	10.18
Promedio	100.00	94.66	93.51	91.06	83.89	77.45	75.37	66.74	53.33	18.26
σ	0.00	3.32	5.95	2.65	9.95	7.11	2.98	6.48	7.23	7.66
SEM	0.00	1.92	3.43	1.53	5.74	4.11	1.72	3.74	4.18	4.42

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	16360.19	1817.799	49.824	<0.001
Dentro Grupos	20	729.682	36.484		
Total	29	17089.871			

3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	81.743	16.575	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	46.673	9.464	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	33.264	6.745	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	24.633	4.995	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	22.553	4.573	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	16.106	3.266	0.026	Yes
Col 1 vs. Col 4	8.937	1.812	0.389	No
Col 1 vs. Col 3	6.494	1.317	0.713	Do Not Test
Col 1 vs. Col 2	5.337	1.082	0.859	Do Not Test

Anexo 4

Efecto de Pb en células neuroblastomas de ratas B-35

1. Porcentajes de viabilidad celular

	Mn (μ M)									
	Control	0.05	0.15	0.25	0.50	0.75	1.00	2.00	5.00	50.00
	100.00	90.00	87.81	91.24	80.42	85.63	75.00	71.35	62.40	19.79
	100.00	92.74	97.01	93.71	87.39	82.59	78.53	76.82	57.59	20.18
	100.00	95.74	97.10	89.98	85.24	81.70	70.72	61.63	42.07	8.18
Promedio	100.00	92.83	93.97	91.64	84.35	83.30	74.75	69.93	54.02	16.05
σ	0.00	2.87	5.34	1.90	3.57	2.06	3.91	7.69	10.63	6.82
SEM	0.00	1.66	3.08	1.10	2.06	1.19	2.26	4.44	6.13	3.94

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	16995.897	1888.433	64.851	<0.001
Dentro Grupos	20	582.39	29.12		
Total	29	17578.287			

3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	83.948	19.053	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	45.982	10.436	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	30.067	6.824	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	25.25	5.731	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	16.693	3.789	0.008	Yes
Col 1 vs. Col 5	15.65	3.552	0.014	Yes
Col 1 vs. Col 4	8.357	1.897	0.342	No
Col 1 vs. Col 3	7.173	1.628	0.501	Do Not Test
Col 1 vs. Col 2	6.027	1.368	0.678	Do Not Test

Anexo 5

Efecto de la combinación de Mn y Pb en células neuroblastomas humanas SH-SY5Y

1. Combinación de Mn con 0.05 μM de Pb

1.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.05 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	59.54	39.38	42.86	10.78	6.22
0.15	57.17	41.55	35.30	11.26	6.50
0.25	58.72	39.79	40.02	10.86	6.27
0.50	53.33	37.20	34.00	10.36	5.98
0.75	50.23	27.25	30.70	12.39	7.15
1.00	48.77	41.97	34.12	7.33	4.23
2.00	49.68	31.40	24.44	13.04	7.53
5.00	37.08	18.03	16.65	11.42	6.59
50.00	20.82	5.80	4.13	9.19	5.31

1.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	14486.977	1609.664	15.179	<0.001
Dentro Grupos	20	2120.886	106.044		
Total	29	16607.864			

1.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	89.748	10.674	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	76.081	9.049	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	64.827	7.71	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	63.94	7.605	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	58.487	6.956	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	58.381	6.943	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	55.325	6.58	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	53.821	6.401	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	52.74	6.273	<0.001	Yes

2. Combinación de Mn con 0.15 μM de Pb

2.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.15 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	42.88	53.70	63.17	10.15	5.86
0.15	42.13	49.58	49.46	4.26	2.46
0.25	39.46	44.09	41.58	2.32	1.34
0.50	38.99	42.63	42.10	1.97	1.14
0.75	38.56	42.59	34.89	3.85	2.22
1.00	35.93	41.70	40.75	3.09	1.79
2.00	34.57	38.47	33.55	2.60	1.50
5.00	26.16	28.20	31.27	2.57	1.48
50.00	11.41	9.96	12.55	1.30	0.75

2.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	14013.272	1557.03	91.656	<0.001
Dentro Grupos	20	339.754	16.988		
Total	29	14353.026			

2.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	88.692	26.355	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	71.458	21.234	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	64.472	19.158	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	61.321	18.222	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	60.538	17.989	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	58.762	17.461	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	58.293	17.322	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	52.943	15.732	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	46.751	13.892	<0.001	Yes

3. Combinación de Mn con 0.25 μM de Pb

3.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.25 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	42.86	45.48	46.40	1.84	1.06
0.15	40.03	38.31	41.86	1.78	1.03
0.25	38.02	34.11	33.94	2.30	1.33
0.50	38.98	37.42	34.96	2.03	1.17
0.75	31.30	28.83	37.76	4.61	2.66
1.00	32.82	22.30	38.24	8.11	4.68
2.00	34.83	35.12	35.59	0.38	0.22
5.00	30.34	19.68	34.14	7.50	4.33
50.00	12.44	23.19	11.20	6.59	3.80

3.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	13644.33	1516.037	74.785	<0.001
Dentro Grupos	20	405.439	20.272		
Total	29	14049.769			

3.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	84.391	22.956	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	71.949	19.572	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	68.878	18.736	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	67.371	18.326	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	64.82	17.632	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	64.641	17.584	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	62.881	17.105	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	59.935	16.303	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	55.083	14.984	<0.001	Yes

4. Combinación de Mn con 0.50 μM de Pb

4.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.50 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	32.91	21.05	37.75	8.60	4.96
0.15	36.13	25.89	28.26	5.36	3.09
0.25	30.16	24.78	29.35	2.90	1.67
0.50	31.64	28.83	16.47	8.07	4.66
0.75	40.01	19.30	23.58	10.93	6.31
1.00	28.95	16.28	15.21	7.64	4.41
2.00	20.84	21.29	19.85	0.73	0.42
5.00	25.74	16.04	15.73	5.69	3.28
50.00	10.59	12.79	13.00	1.34	0.77

4.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	16588.206	1843.134	47.416	<0.001
Dentro Grupos	20	777.439	38.872		
Total	29	17365.645			

4.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	87.873	17.262	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	80.828	15.878	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	79.849	15.686	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	79.339	15.585	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	74.354	14.606	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	72.368	14.216	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	71.904	14.125	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	69.906	13.732	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	69.429	13.639	<0.001	Yes

Anexo 6

Efecto de la combinación de Mn y Pb en células neuroblastomas de ratas B-35

1. Combinación de Mn con 0.05 μ M de Pb

1.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μ M)	Plomo (0.05 μ M)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	88.10	70.73	85.87	9.45	5.46
0.15	96.74	74.44	86.52	11.16	6.45
0.25	56.37	79.36	86.15	15.60	9.01
0.50	58.07	64.25	86.43	14.91	8.61
0.75	58.78	63.73	76.36	9.07	5.23
1.00	63.46	66.58	87.53	13.09	7.56
2.00	56.52	72.45	67.68	8.18	4.72
5.00	50.42	48.19	64.08	8.60	4.97
50.00	3.97	11.83	16.90	6.52	3.76

1.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	15138.248	1682.028	15.06	<0.001
Dentro Grupos	20	2233.754	111.688		
Total	29	17372.002			

1.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	89.102	10.326	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	45.769	5.304	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	34.45	3.992	0.005	Yes
Col 1 vs. Col 7	33.709	3.906	0.006	Yes
Col 1 vs. Col 6	30.417	3.525	0.015	Yes
Col 1 vs. Col 5	27.476	3.184	0.03	Yes
Col 1 vs. Col 4	26.039	3.018	0.043	Yes
Col 1 vs. Col 3	18.433	2.136	0.233	No
Col 1 vs. Col 2	14.1	1.634	0.497	Do Not Test

2. Combinación de Mn con 0.15 μM de Pb

2.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.15 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	88.73	98.14	79.05	9.55	5.51
0.15	77.70	64.19	54.11	11.83	6.83
0.25	76.85	80.29	62.97	9.17	5.29
0.50	77.82	68.42	53.43	12.30	7.10
0.75	85.70	63.67	58.79	14.33	8.28
1.00	78.42	73.89	55.61	12.08	6.97
2.00	54.06	62.75	43.70	9.53	5.50
5.00	48.24	44.58	33.35	7.76	4.48
50.00	18.67	16.31	30.67	7.70	4.45

2.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	13235.637	1470.626	14.302	<0.001
Dentro Grupos	20	2056.584	102.829		
Total	29	15292.221			

2.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	78.118	9.435	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	57.94	6.998	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	46.497	5.616	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	34.666	4.187	0.003	Yes
Col 1 vs. Col 6	33.444	4.039	0.005	Yes
Col 1 vs. Col 5	30.691	3.707	0.01	Yes
Col 1 vs. Col 4	30.613	3.697	0.01	Yes
Col 1 vs. Col 3	26.632	3.217	0.028	Yes
Col 1 vs. Col 2	11.359	1.372	0.675	No

3. Combinación de Mn con 0.25 μM de Pb

3.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.25 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	75.96	56.54	86.22	15.07	8.70
0.15	66.34	55.83	71.84	8.13	4.70
0.25	71.64	54.70	85.00	15.18	8.77
0.50	47.60	58.59	75.00	13.79	7.96
0.75	30.83	38.75	62.86	16.68	9.63
1.00	37.73	61.35	56.33	12.44	7.18
2.00	31.20	53.17	62.35	16.01	9.24
5.00	27.87	28.22	42.35	8.26	4.77
50.00	9.86	6.24	29.29	12.39	7.16

3.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	14824.663	1647.185	10.135	<0.001
Dentro Grupos	20	3250.538	162.527		
Total	29	18075.2			

3.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	84.871	8.153	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	67.188	6.455	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	55.855	5.366	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	51.096	4.909	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	48.198	4.63	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	39.605	3.805	0.008	Yes
Col 1 vs. Col 4	35.332	3.394	0.019	Yes
Col 1 vs. Col 3	29.552	2.839	0.062	No
Col 1 vs. Col 2	27.092	2.603	0.099	Do Not Test

4. Combinación de Mn con 0.50 μM de Pb

4.1. Porcentajes de viabilidad celular

Mn (μM)	Plomo (0.50 μM)			σ	SEM
Control	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05	72.85	56.25	54.52	10.12	5.84
0.15	72.28	35.17	44.18	19.36	11.18
0.25	60.26	58.26	36.18	13.36	7.72
0.50	47.97	58.90	37.86	10.52	6.08
0.75	41.44	22.25	12.14	14.88	8.59
1.00	41.06	8.90	11.83	17.78	10.27
2.00	47.02	35.91	14.68	16.43	9.49
5.00	24.79	6.78	6.88	10.37	5.99
50.00	4.73	9.75	7.37	2.51	1.45

4.2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	9	20432.64	2270.293	13.452	<0.001
Dentro Grupos	20	3375.462	168.773		
Total	29	23808.102			

4.3. Test de Dunnett

Comparación	Dif de promedios	q'	p	p<0.050
Col 1 vs. Col 10	92.717	8.741	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 9	87.185	8.219	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 8	79.403	7.486	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 7	74.724	7.045	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 6	67.462	6.36	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 5	51.76	4.88	<0.001	Yes
Col 1 vs. Col 4	49.458	4.663	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 3	48.43	4.566	0.001	Yes
Col 1 vs. Col 2	38.793	3.657	0.011	Yes