

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO NEUROTÓXICO OCASIONADO POR PLOMO Y MANGANESO INDIVIDUALMENTE Y EN COMBINACIÓN, A TRAVÉS DE UN MARCADOR DE LESIÓN (LDH) Y VIABILIDAD CELULAR EN NEUROBLASTOMA DE RATA (LÍNEA CELULAR B35).”

Tesis presentada por la Bachiller:
Rodríguez Márquez, Carmen Lucía
Para optar el Título Profesional de:
Químico Farmacéutico

Asesor:
Dr. Cárdenas García, Jaime

Arequipa - Perú

2019

I

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. **14044626**
N° Trámite en Fac. **1612-2014**
Fecha **29-10-2014**

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

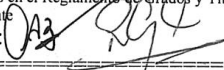
DE: **RODRIGUEZ MARQUEZ, Carmen Lucía**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO NEUROTOXICO OCASIONADO POR PLOMO Y MANGANESO INDIVIDUALMENTE Y EN COMBINACION A TRAVES DE UN MARCADOR DE LESION CELULAR, POR LA ENZIMA LDH Y LA VIABILIDAD, EN LINEAS CELULARES B35 NEUROBLASTOMA DE RATA"

DICTAMINADORES: 1) *Dr. Alberto Briceño Ortega* 2) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, sugerimos se cambie el título a: **"EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO NEUROTOXICO OCASIONADO POR PLOMO Y MANGANESO INDIVIDUALMENTE Y EN COMBINACION, A TRAVES DE UN MARCADOR DE LESION (LDH) Y VIABILIDAD CELULAR EN NEUROBLASTOMA DE RATA (LINEA CELULAR B35)"** después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha *15 Julio 2019*

ASESOR: *Dr. Jaime Cárdenas García*


DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesor en el presente Trabajo de Investigación, cumpro con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra **APTO** para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente
Firma  Fecha *15/7/19*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) *Dr. Alberto Briceño Ortega* 3) *Mgter. Maria Elena Guillén Núñez*
2) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar*

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente
Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha *18/7/19*

JURADOS: Presidente *DR. ALBERTO BRICEÑO ORTEGA*
Vocal *DRA. ROXANA GUTIERREZ ARANIBAR*
Secretario *MAG. MARIA ELENA GUILLEN NUÑEZ*

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

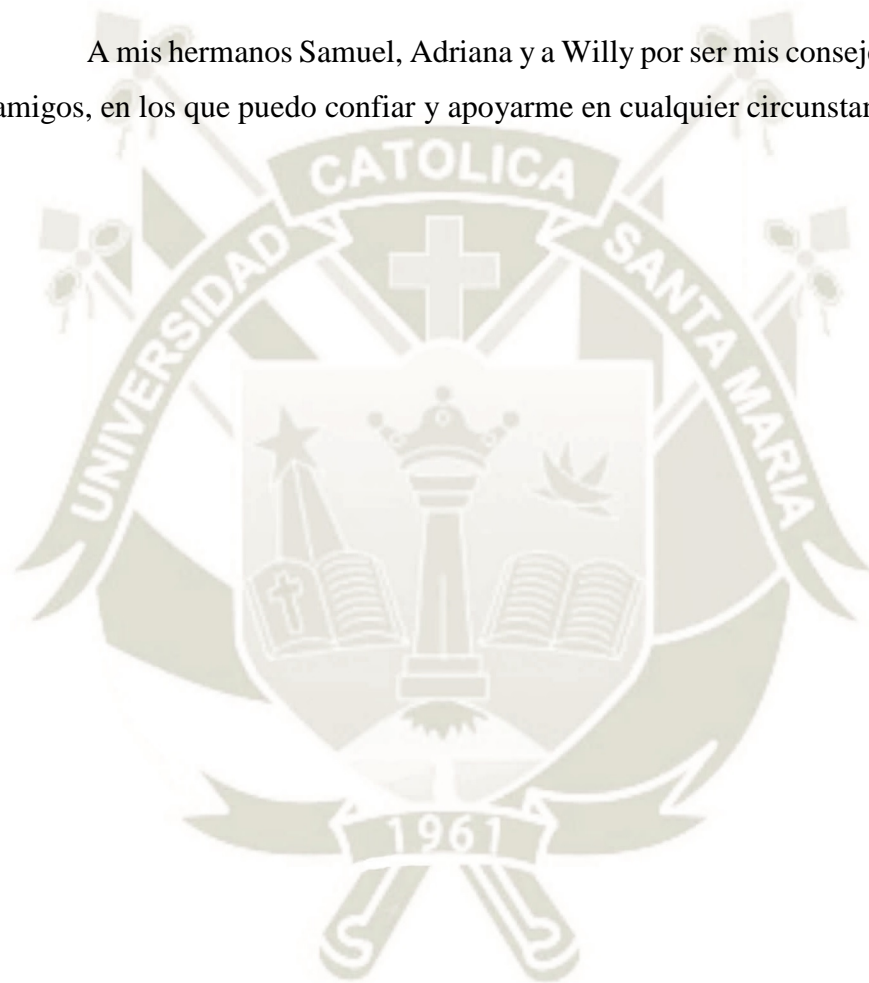
Fecha: *1/08/19* Hora: *13.00* Local: C- 402 (SUM)


DECANO

DEDICATORIA

A mis padres, Luis y Felicitas por haberme enseñado desde pequeña valores y a que en la vida hay que ser perseverante, a luchar por conseguir mis objetivos, por brindarme todo su amor, tiempo, apoyo en cada momento de mi vida.

A mis hermanos Samuel, Adriana y a Willy por ser mis consejeros, mis mejores amigos, en los que puedo confiar y apoyarme en cualquier circunstancia.



AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme la oportunidad de vivir y ser feliz, por darme la familia que tengo, por poner a todas aquellas personas tan especiales en mi camino que me han ayudado y apoyado siempre, por permitirme cumplir retos y protegerme día a día.

A la Universidad Católica Santa María, por albergarme durante toda mi carrera universitaria por realizar convenios y brindar grandes oportunidades a los estudiantes.

Al Dr. Jaime Cárdenas García por su asesoría y por compartir sus conocimientos conmigo y a todos mis docentes por sus enseñanzas, por su preocupación constante en la mejora del aprendizaje.

A la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, por recibirme y permitirme vivir una experiencia maravillosa, de igual manera al Dr. Alejandro Pino Figueroa por apoyarme con su conocimiento, tiempo y amistad de manera desinteresada

A mis padres por ser mi guía, apoyarme y estar presente en todos los momentos de mi vida, dándome y buscando siempre lo mejor para mí, todos mis logros se los debo a ellos y a su infinito amor.

A mis hermanos y a Willy por ser mis mejores amigos y compañeros de vida que Dios pudo darme, por comprenderme y motivarme constantemente para que cumpla mis sueños.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| ÍNDICE | IV |
| RESUMEN..... | X |
| ABSTRACT..... | XII |
| INTRODUCCIÓN | XIV |
| HIPÓTESIS..... | XVI |
| OBJETIVOS | XVII |
| CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO..... | 1 |
| 1. NEUROTOXICIDAD..... | 1 |
| 2. METALES PESADOS..... | 2 |
| 2.1 PLOMO | 2 |
| 2.1.1 GENERALIDADES DEL PLOMO..... | 3 |
| 2.1.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN..... | 3 |
| 2.1.1.2 EXPOSICIÓN AL PLOMO..... | 4 |
| 2.1.1.3 FUENTES DE EXPOSICIÓN | 5 |
| 2.1.2 EFECTOS SOBRE LA SALUD..... | 7 |
| 2.1.2.1 DIENTES | 7 |
| 2.1.2.2 EFECTOS EN EL TUBO DIGESTIVO | 7 |
| 2.1.2.3 EFECTOS NEUROMUSCULARES..... | 8 |
| 2.1.2.4 EFECTOS HEMATOLÓGICOS | 8 |
| 2.1.2.5 EFECTOS EN LA SALUD REPRODUCTIVA..... | 8 |
| 2.1.2.6 EFECTOS CARDIOVASCULARES | 9 |
| 2.1.2.7 EFECTOS RENALES..... | 9 |
| 2.1.3 TOXICOCINÉTICA | 11 |
| 2.1.4 TOXICODINAMIA..... | 12 |
| 2.1.5 DIAGNÓSTICO | 13 |
| 2.1.6 TRATAMIENTO..... | 13 |
| 2.1.6.1 CALCIOEDETATO SÓDICO..... | 14 |
| 2.1.6.2 DIMERCAPROL | 15 |
| 2.1.6.3 D-PENICILAMINA..... | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.1.6.4 SUCCÍMERO..... | 15 |
| 2.2 MANGANESO..... | 16 |
| 2.2.1 GENERALIDADES DEL MANGANESO..... | 17 |
| 2.2.1.1 FUENTES ALIMENTICIAS..... | 17 |
| 2.2.1.2 DEFICIENCIAS..... | 18 |
| 2.2.2 EFECTOS SOBRE LA SALUD..... | 18 |
| 2.2.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DE MN EN HUMANOS..... | 19 |
| 2.2.4 OTRAS FUENTES DE EXPOSICIÓN..... | 20 |
| 2.2.5 TOXICOCINÉTICA..... | 22 |
| 2.2.6 TOXICODINAMIA..... | 23 |
| 2.2.7 MECANISMO DE NEUROTOXICIDAD..... | 25 |
| 2.2.8 TRATAMIENTO..... | 27 |
| 3. EVALUACION DEL EFECTO NEUROTOXICO CELULAR..... | 28 |
| 4. CULTIVO CELULAR..... | 28 |
| 5. VIABILIDAD CELULAR..... | 30 |
| 5.1 ENSAYO MTS..... | 30 |
| 6. ENZIMA LDH..... | 31 |
| CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS..... | 32 |
| 1. MATERIALES..... | 32 |
| 1.1 MATERIAL BIOLÓGICO..... | 32 |
| 1.1.1 CÉLULAS B35..... | 32 |
| 1.2 EQUIPOS UTILIZADOS..... | 32 |
| 1.3 REACTIVOS..... | 33 |
| 1.4 LUGAR DE INVESTIGACIÓN..... | 33 |
| 2. METODOLOGÍA..... | 33 |
| 2.1 CULTIVO CELULAR..... | 33 |
| 2.2 CONTEO CELULAR..... | 34 |
| 2.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES..... | 35 |
| 2.3.1 SOLUCIONES DE PLOMO..... | 35 |
| 2.3.2 SOLUCIONES DE MANGANESO..... | 36 |

| | |
|--|----|
| 2.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR CON TRATAMIENTO PARA PLOMO Y PARA MANGANESO..... | 38 |
| 2.4.1 DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR PARA EL SINERGISMO | 39 |
| 2.5 DETERMINACIÓN DEL DAÑO CELULAR | 43 |
| 2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS | 44 |
| CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 45 |
| 1. VIABILIDAD CELULAR..... | 45 |
| 2. PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR EN LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA CON PLOMO..... | 46 |
| 3. PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA CON MANGANESO..... | 48 |
| 4. EVALUACIÓN DEL SINERGISMO ENTRE PLOMO y MANGANESO EN LA VIABILIDAD CELULAR..... | 51 |
| 5. DETERMINACIÓN DE LDH | 56 |
| CONCLUSIONES | 59 |
| SUGERENCIAS | 60 |
| BIBLIOGRAFÍA | 61 |
| ANEXOS | 67 |

ÍNDICE TABLAS

| | | |
|--------------|---|----|
| Tabla 1. 1 | Clasificación de efectos neurotóxicos..... | 1 |
| Tabla 2. 1. | Concentraciones de Plomo para el sinergismo | 41 |
| Tabla 2. 2. | Concentraciones de Manganeso para el sinergismo..... | 42 |
| Tabla 3. 1 | Porcentaje de viabilidad célula | 46 |
| Tabla 3. 2. | Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento de Plomo..... | 47 |
| Tabla 3. 3. | Promedio del porcentaje de la viabilidad de Neuroblastoma a diferentes concentraciones de Plomo | 47 |
| Tabla 3. 4. | Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento de Manganeso..... | 49 |
| Tabla 3. 5. | Promedio del porcentaje de la viabilidad de células B35 a diferentes concentraciones del Manganeso..... | 49 |
| Tabla 3. 6. | Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Plomo y Manganeso..... | 52 |
| Tabla 3. 7. | Promedio de los porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Plomo y Manganeso..... | 52 |
| Tabla 3. 8. | Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Manganeso y Plomo..... | 53 |
| Tabla 3. 9. | Promedio de los porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Manganeso y Plomo..... | 54 |
| Tabla 3. 10. | Absorbancias obtenidas en los tres ensayos de Citotoxicidad | 57 |
| Tabla 3. 11. | Promedio de las absorbancias para el ensayo de citotoxicidad | 57 |
| Tabla 3. 12. | Porcentajes de citotoxicidad en células Neuroblastoma de rata tratadas con Plomo y Manganeso..... | 58 |
| Tabla 3. 13. | Promedio del porcentaje de la determinación de citotoxicidad en células Neuroblastoma de rata tratadas con Plomo y Manganeso..... | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------|---|----|
| Figura 1. 1. | Estructura EDTA | 14 |
| Figura 1. 2. | Estructura Dimercaprol..... | 15 |
| Figura 1. 3. | Estructura D-penicilamina | 15 |
| Figura 1. 4. | Estructura Succímero | 16 |
| Figura 1. 5. | Estructura del MMT..... | 21 |
| Figura 1. 6. | Estructura de L-DOPA..... | 27 |
| Figura 1. 7. | Estructura del MTS y su reducción a formazán | 30 |
| Figura 1. 8. | Esquema de la enzima LDH en la producción de formazán | 31 |
| Figura 3. 1. | Células B35 con medio enriquecido DMEM, sin tratamiento. | 45 |
| Figura 3. 2. | Significancia del efecto de Plomo a diferentes concentraciones en células Neuroblastoma de rata B35..... | 48 |
| Figura 3. 3. | Significancia del efecto del Manganeso a diferentes concentraciones en células Neuroblastoma de rata B35..... | 50 |
| Figura 3. 4. | Células B35 con 10 μ M de nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$ | 50 |
| Figura 3. 5. | Células B35 con 10 μ M de nitrato de manganeso $Mn(NO_3)_2$ | 51 |
| Figura 3. 6. | Significancia del efecto de la combinación de 10 μ M de Pb^{+2} con concentraciones desde 0.5 hasta 10 μ M de Mn^{+2} en células Neuroblastoma de rata. | 53 |
| Figura 3. 7. | Significancia del efecto de la combinación de 10 μ M de Mn^{+2} con concentraciones desde 0.5 hasta 10 μ M de Pb^{+2} en células Neuroblastoma de rata. | 54 |
| Figura 3. 8. | Células B35 con ambos tratamientos a 48 horas de incubación..... | 55 |
| Figura 3. 9. | Células B35 con ambos tratamientos a 72 horas de incubación..... | 55 |
| Figura 3. 10. | Células B35 con ambos tratamientos a 120 horas de incubación..... | 56 |
| Figura 3. 11. | Promedio de las absorbancias para el ensayo de citotoxicidad, utilizando la combinación de concentraciones 0.5 μ M de Mn con 0.5 μ M de Pb; 2 μ M de Mn con 2 μ M de Pb; 4 μ M de Mn con 4 μ M de Pb; 6 μ M de Mn con 6 μ M de Pb; 8 μ M de Mn con 8 μ M de Pb y 10 μ M de Mn con 10 μ M en células Neuroblastoma de rata..... | 57 |

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **BHE** : Barrera hematoencefálica
- **BLL** : Blood lead level
- **CPSC** : Consumer Product Safety Commission
- **DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMT1** : Divalent metal transporter
- **EPA** : Environmental Protection Agency
- **FBS** : Fetal bovine serum
- **FDA** : Food and Drug Administration
- **LDH** : Lactato deshidrogenasa
- **MMT** : Tricarbonil Metilciclopentadienil Manganeso
- **MTS** : [3-(4,5-dimetil-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
- **NADH** : Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- **NAS** : National Academy of Sciences
- **PD** : Parkinson diseases
- **PET** : Positrón emission tomography
- **PSB** : Phosphate buffered saline
- **RM** : Resonancia Magnética
- **RPMI** : Roswell Park Memorial Institute Medium
- **SPECT** : Single photon emission computed tomography
- **Tf** : Transferrina

RESUMEN

La neurotoxicidad describe los cambios neurológicos ocasionados por la exposición a agentes tóxicos, lo que puede resultar en cambios cognitivos, desórdenes de la memoria, cambios de humor o hasta el comienzo de perturbaciones psiquiátricas.

Entre los agentes tóxicos más comunes tenemos a: los metales pesados, órgano fosfatos, neurotoxinas animales y de bacterias

El propósito de este estudio fue evaluar los efectos neurotóxicos del plomo y manganeso, individualmente mediante la viabilidad en células de neuroblastoma de rata, línea celular B-35, además de determinar si existe sinergismo entre ambos metales y corroborar el daño celular, mediante la medición de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH).

Para determinar la citotoxicidad, se utilizó la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH), enzima citosólica, presente en diversas células, como las neuronas, por lo tanto, al existir un daño en la membrana plasmática se libera LDH en el cultivo celular, lo que resulta en la formación de formazán, que es directamente proporcional a la citotoxicidad.

En el presente trabajo de investigación, todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Para la prueba de viabilidad, las células B-35 se cultivaron en el medio DMEM en placas de 96 pocillos, que reposaron en la incubadora a 37°C y condiciones de 5% CO₂ durante 3 días para su óptimo crecimiento; luego se trataron con concentraciones de 100µM, 75µM, 50µM, 25µM, 10µM, 5µM, 2.5µM, y 1µM de Pb(NO₃)₂ (Nitrato de Plomo). En otras placas, se replicó el mismo procedimiento, con la diferencia que a éstas células se les aplicó Mn(NO₃)₂ (Nitrato de Manganeso) a concentraciones 100µM, 75µM, 50µM, 25µM, 10µM, 5µM, 2.5µM, y 1µM.

Posteriormente, se llevaron las células a la incubadora, para mantenerlas a 37°C y 5% CO₂, por un periodo de 69 horas, al completar el tiempo, las células fueron llevadas a una cámara de bioseguridad, en donde, se les adicionó 10µl de MTS, con el fin de determinar la actividad metabólica celular. Por último se realizaron las respectivas lecturas, en el lector de microplacas.

Para la determinación de sinergismo, se procedió de la misma manera que en la prueba de viabilidad, se cultivaron las células B35 en el medio DMEM, luego fueron llevadas a la incubadora, por 3 días, la diferencia estuvo en el tratamiento, el cual consistió en la combinación de ambos metales Pb(NO₃)₂ y Mn(NO₃)₂, a concentraciones de 0.5µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM y 10µM. Luego se adicionó los 10µl de MTS y se realizaron las lecturas correspondientes.

Se determinó que el plomo a las 72 horas, a partir de una concentración de 5µM, mientras que el Mn a partir de una concentración de 10µM disminuyen significativamente la viabilidad, aumentando el daño celular y en el caso de la combinación de ambos metales, en sus respectivas concentraciones, se evidenció un efecto sinérgico positivo, el cual disminuye aún más la viabilidad celular, lo que causa la reducción del crecimiento de los axones neuronales, probablemente afectando la señalización y transmisión eléctrica entre neuronas.

Palabras clave:

Toxicidad de Plomo, toxicidad de Manganeso, sinergismo de Plomo, sinergismo de Manganeso, determinación de citotoxicidad.

ABSTRACT

Neurotoxicity describes neurological changes caused by exposure to toxic agents, which can result in cognitive changes, memory disorders, mood swings or until psychiatric disorders.

The most common toxic agents are: heavy metals, organophosphates, bacteria and animal's neurotoxins.

The purpose of this study was to assess the neurotoxic effects of lead and manganese individually by measuring the enzyme Lactate Dehydrogenase (LDH) and viability in rat neuroblastoma cells, B-35 cell line, then to determine if there is synergism between both metals.

For the viability test, the B-35 cells were cultured in the DMEM medium in 96-well plates, which were placed in the incubator at 37⁰C and 5% CO₂ conditions for 3 days for optimal growth; then they were treated with concentrations of 100μM, 75μM, 50μM, 250μM, 100μM, 50μM, 2.5μM, and 10μM of Pb(NO₃)₂. In other plates, the same procedure was repeated, with the difference that Mn(NO₃)₂ was applied to these cells at concentrations of 100μM, 75μM, 50μM, 250μM, 100μM, 50μM, 2.5μM, and 10μM.

Therefore, the cells were taken to the incubator, to maintain them at 37°C and 5% CO₂, for a period of 69 hours, at the end of time, the cells were taken to a biosafety chamber, where they were added 10µl of MTS, in order to determine the cellular metabolic activity. Finally, the respective readings were made in the microplate reader.

For the determination of synergism, we proceeded in the same way as in the viability test, the B35 cells were cultured in the DMEM medium, then they were taken to the incubator, for 3 days, the difference was in the treatment, which consisted in the combination of both metals Pb(NO₃)₂ and Mn(NO₃)₂, at concentrations of 0.5µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM and 10µM. Then the 10µl of MTS was added and the corresponding readings were made.

It was determined that the lead at 72 hours, from a concentration of 5µM, while the Mn from a concentration of 10µM significantly decrease the viability, increasing the cell damage, causing the reduction of the growth of the neuronal axons, that could affect signaling and electrical transmission between neurons.

Keywords:

Lead toxicity, Manganese toxicity, Lead synergism, Manganese synergism, determination of cytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

El incremento notable de las concentraciones de estos metales es preocupante, ya que se ve afectado el bienestar y salud de la población, pudiendo ocasionar distintos desórdenes a nivel del cerebro, como: encefalopatías, neuropatía periférica, dificultades de aprendizaje, etc.^{1,2}

Para poder comprender mejor el término neurotoxicidad es muy importante conocer la definición de tóxico o veneno.

Tóxico es aquel elemento que debido a sus propiedades físicas o químicas al ingresar a nuestro organismo, ya sea por ingestión, inhalación, absorción o inyectado, provoca alteraciones funcionales o la muerte.¹

La neurotoxicidad es la toxicidad que se ocasiona a nivel de los cambios neurofisiológicos en el SNC, lo cual puede resultar en cambios cognitivos, desórdenes de la memoria, cambios de humor, etc. Los agentes neurotóxicos más comunes son: los metales pesados, drogas, organofosfatos, neurotoxinas animales y de bacterias.²

En el presente trabajo de investigación se hace referencia a la toxicidad neurológica causada por dos metales pesados: el plomo y el manganeso.

La exposición de estos metales es un problema para la salud de las personas, ya que sus efectos son de larga duración y pueden ser irreversibles, es por esta razón que se han considerado de gran preocupación con el transcurrir de los años. La exposición a estos tóxicos, puede variar de acuerdo al tiempo de exposición, así podemos encontrar la exposición aguda y la crónica.^{2,3}

La exposición aguda frecuentemente involucra náuseas, dolor de cabeza, cambios cognitivos y emocionales, sin embargo la exposición a metales pesados es mayormente encontrada en entornos de lugares de trabajo industrial, donde la exposición crónica, prolongada es más probable.³

El Manganeseo (Mn) tiene muchas funciones fisiológicas en el cuerpo humano, pero elevados niveles de Mn pueden resultar en síndromes neurológicos, similares a la enfermedad de Parkinson y en la niñez afectar el desarrollo neurológico.⁴

Por otra parte el plomo no tiene funciones fisiológicas conocidas, por lo tanto sus efectos son perjudiciales para nuestra salud y una exposición crónica causa neurodegeneración y las manifestaciones psiquiátricas prevalecen, como incremento de la depresión, ansiedad, irritabilidad y síntomas que incluyen fatiga, disminución del funcionamiento cognitivo y de la velocidad de procesar información.⁴

Ambos metales pueden tener efectos neurológicos diferentes, afectando diferentes zonas y modos de acción del cerebro, pero en lo que si se parecen es que ambos interrumpen la transmisión sináptica.⁵

HIPÓTESIS

Se sabe que el Plomo y Manganeseo son metales pesados que individualmente y a diferentes concentraciones son nocivos para la salud, es posible conocer sus efectos neurotóxicos midiendo la viabilidad y el daño celular mediante la liberación de LDH y determinar si existe un efecto sinérgico entre ambos metales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar los efectos neurotóxicos que pueden ocasionar el plomo y manganeso, individualmente y en combinación, evaluando el daño celular y la viabilidad, en la línea celular B-35 de neuroblastoma de rata con el fin de determinar una respuesta dependiente de la dosis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Corroborar la neurotoxicidad que ocasionan el plomo y el manganeso mediante el ensayo de viabilidad, de la línea celular B-35 de neuroblastoma de rata.
2. Determinar la existencia de un efecto sinérgico entre ambos metales pesados.
3. Evaluar el daño celular, mediante marcadores como la enzima LDH.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. NEUROTOXICIDAD

Es la toxicidad causada a nivel neurológico, alterando funciones o estructuras nerviosas y puede ser ocasionada por diversos componentes. Neurotoxicidad es un término usado para describir cambios neurofisiológicos originados por la exposición a agentes tóxicos. Los agentes tóxicos más comunes incluyen:

- Metales pesados
- Drogas
- Organofosforados, entre otros.⁶

Los efectos neurotóxicos dependen del tipo de tóxico, dosis, rutas de exposición y especie afectada con la que interacciona, donde en la siguiente tabla se resume esta.⁷

Tabla 1. 1 CLASIFICACIÓN DE EFECTOS NEUROTÓXICOS

| EFECTOS | AFECTAN |
|--|---|
| Neuropatías (sensoriales o motoras) | el cuerpo celular o neuronal |
| Axonopatías (proximales o distales, centrales o periféricas) | Los axones |
| Sinaptopatías (pre sinápticas o postsinápticas) | Proceso de sinapsis |
| Mielinopatías | Vaina de mielina que recubre los axones |
| Miopatías | Inervación del paquete muscular |

Fuente: Relación de efectos neurotóxicos según su localización. Gutiérrez Aranibar R. toxicología y química legal. UCSM. Arequipa-Perú.2012.

2. METALES PESADOS

Los metales pesados son aquellos que poseen un peso específico alto (5 veces más a comparación del peso específico del agua 1 a 4⁰C).

Hoy en día las aplicaciones de los metales pesados son diversas en nuestra vida cotidiana, como por ejemplo en la fabricación de pesticidas, aleaciones, baterías, tinturas para textiles etc. Podemos encontrar metales pesados tóxicos para nuestra salud y otros que son esenciales pero en cantidades muy pequeñas. En cuanto a los tóxicos, los más conocidos son el arsénico, cadmio, hierro, mercurio y el plomo. Mientras que dentro de los esenciales podemos mencionar al hierro, cobre, manganeso y el zinc.⁷

Los metales pesados tóxicos interfieren en la función de cationes esenciales, inhiben la acción de enzimas y generan estrés oxidativo, por consiguiente esta forma de intoxicación se caracteriza por signos y síntomas en diversos órganos. Al surgir la intoxicación es necesario recurrir a moléculas quelantes, para ligarse al metal y facilitar su excreción.⁸

2.1 PLOMO

El plomo es un elemento químico, considerado un metal pesado, flexible y maleable. La exposición al plomo es una de las exposiciones más comunes, que puede significar un declive neuropsicológico y funcional. Este metal se encuentra ampliamente distribuido en el entorno, de modo natural, pero sobretodo como consecuencia de su uso industrial en la minería, fundición, refinación, fabricación de baterías, etc.⁵

Años atrás no se tenía un control de su uso, pero debido al conocimiento de los peligros que puede causar, poco a poco se ha logrado disminuir su uso, consiguiendo que las concentraciones sanguíneas en seres humanos sea menor, aunque sigue teniendo una amplia aplicación comercial. Por este motivo es que en la actualidad, se ha evidenciado una gran preocupación por los efectos de la exposición a cantidades pequeñas de plomo, que podrían tener efectos adversos neurocognitivos, en la tensión

arterial, mientras que síntomas avanzados son la anemia, cólicos intestinales, náuseas y vómitos, enfermedad renal, impotencia sexual, delirio, esterilidad, daños al feto, hipertensión arterial, estreñimiento agudo, afectación de los nervios, enfermedad ósea, problemas de cáncer y muerte.⁹

A la exposición al plomo se le pueden atribuir diversos efectos adversos en la función del sistema nervioso como:

- Hipertensión
- Disminución de la función renal
- Disminución de la función tiroidea
- Deficiencia de la vitamina D
- En mujeres embarazadas, partos prematuros

El efecto neurológico más severo causado por la intoxicación por plomo es la encefalopatía plúmbica, como respuesta a dosis muy altas de plomo, se caracteriza por irritabilidad, dolores de cabeza, disminución de la atención, pérdida de memoria, temblores y alucinaciones, que pueden empeorar y llegar a parálisis, convulsiones, delirio, estado de coma y la muerte. En los niños, esta encefalopatía plúmbica, se desarrolla, con dosis más bajas que los adultos.⁴

2.1.1 GENERALIDADES DEL PLOMO

2.1.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN

La presencia de plomo en el cuerpo, afecta notoriamente la salud de la población mundial, causando daño a todo nuestro organismo, una de los sistemas más afectados es el Sistema Nervioso, a través de dos efectos:

- Efectos morfológicos y los farmacológicos.
- Los efectos morfológicos son aquellos que alteran el desarrollo del Sistema Nervioso, particularmente influye: interfiriendo con la sinapsis, formación, diferenciación prematura de células gliales.

- Los efectos farmacológicos resultan de la acción del plomo como agente farmacológico en el SNC.
- El plomo sustituye al Ca y en menor medida al Zinc, además se comporta como un segundo mensajero intracelular, alterando la distribución de calcio en los compartimientos dentro de la célula.
- Se une a la proteína reguladora Calmodulina, mejor que el propio calcio.
- El plomo también interfiere con la liberación de Neurotransmisores, desorganizando la función Gabaérgica, Dopaminérgica y Colinérgica.
- Activa a la proteína C Quinasa, enzima dependiente de calcio y es muy importante en procesos intracelulares.
- Inhibe a la bomba de Na-K-ATPasa, aumentando el calcio intracelular, esto trae como consecuencias, problemas en la neurotransmisión y en el tono vascular, lo que explicaría la hipertensión y la neurotoxicidad.^{4, 5, 10}

2.1.1.2 EXPOSICIÓN AL PLOMO

En la actualidad existe una constante preocupación con respecto a la exposición al Pb y su efecto adverso sobre la función neurológica, por lo que la prohibición del plomo en la gasolina, resultó en la reducción significativa de este metal pesado en niveles sanguíneos (BLL), consiguiendo así una reducción de $3\mu\text{g dL}^{-1}$.¹⁰ Aunque todavía pueden ser fuentes de exposición al Pb la gasolina que se utiliza en las fundiciones, aviones de motor de pistón, etc.¹¹

Otra fuente de Pb se encuentra en la pintura, la cual podría causar déficits neurológicos cuando son ingeridos especialmente por los niños, ya que son más susceptibles. En EE.UU. y Europa el Pb fue retirado de la pintura hace muchos años, sin embargo, no se ha eliminado la amenaza de contaminación con Pb en viviendas, muchos hogares todavía contienen pintura con plomo, especialmente las construcciones urbanas antiguas. Esto podría ser ocasionado porque cuando la pintura se descascara, puede desintegrarse fácilmente en las superficies de fricción para formar polvo de Pb.¹³

Este polvo también puede formarse a partir de la combustión de combustibles con plomo, entonces las emisiones de combustible con plomo pueden tener como consecuencia una dispersión masiva de polvo de Pb en el medio ambiente, especialmente a lo largo de carreteras. Las partículas finas de Pb son aproximadamente de 2-10 μ m, no se degradan y siguen siendo una fuente importante de exposición para la humanidad.^{10, 11}

El agua potable puede ser otra fuente de exposición al plomo, ya que por la lixiviación de plomo de las tuberías, que se encuentren con accesorios obsoletos ó soldaduras, aumentan considerablemente las concentraciones de este metal. La importancia de la lixiviación de Pb en el agua potable también ha tomado más importancia en los últimos años, debido a que se comprobó que los niveles en sangre de este metal, en niños incrementó notoriamente por su presencia en las tuberías de agua potable. El nivel actual de Pb en agua se ha fijado en 15 ppb por parte de la Agencia de Protección del Medio ambiente EE.UU. (EPA).¹¹ En nuestro país la exposición al plomo en el agua potable sigue siendo desconocida en nuestros sistemas de agua, ya que el agua no está sujeta a regularización, aunque gracias al éxito de las intervenciones ambientales por disminuir su uso en la mayoría de países, la exposición al Pb ha disminuido considerablemente. La evidencia más reciente indica que los BLL en la niñez se encuentran entre valores de 1.9 a 3 μ g dL⁻¹, mientras que el porcentaje de niños con plomo en sangre elevados (por encima de 10 μ gL⁻¹) se ha reducido a 1.4%.¹³

Sin embargo, mientras que los niveles de plomo sanguíneo promedio han disminuido en muchos países, todavía hay poblaciones en alto riesgo de concentraciones elevadas, sobre todo en las comunidades de menor estatus socioeconómico.¹³

2.1.1.3 FUENTES DE EXPOSICIÓN

Actualmente la exposición al plomo involucra fuentes como la minería, en este caso los trabajadores son los que se encuentran expuestos a concentraciones más altas de este metal causándoles efectos perjudiciales, debido a que se generan humos y polvo que contienen óxido de plomo y se depositan en el entorno. También se reportó

intoxicación por el uso de combustible, el tetraetilo de plomo se usó como aditivo del combustible, con la finalidad de mejorar la eficiencia del motor, sin embargo se redujo la utilización de plomo en el combustible por sus efectos tóxicos en los seres humanos.^{4, 11}

Otras fuentes de exposición ambiental al plomo que causaron gran impacto fueron el agua potable y la pintura, en especial aquella que se utilizó en edificios antiguos, ya que al desprenderse contaminaban aire y suelo, este tipo de contaminación afectaba más a los niños debido a que ellos podían ingerir fragmentos de pintura por su ligero sabor dulce.¹²

En 1955 la American Standards Association especificó que las pinturas de juguetes, muebles y de los interiores de las viviendas debían contener menos del 1% de plomo y en 1978 la Consumer Product Safety Commission (CPSC), prohibió la utilización de pintura que contuviera más de 0.6% de plomo tanto en interiores como en exteriores de los inmuebles.¹¹

Los alimentos y bebidas enlatadas o en tetrapack, pueden ser perjudiciales si poseen un recubrimiento interno inadecuado debido a que disuelven el plomo, contaminando lo que vamos a consumir y provocando una intoxicación. Otras fuentes son la fabricación de baterías, proyectiles, aleaciones metálicas, soldaduras, vidrios, plásticos, cerámicas y juguetes de plomo.⁴

La exposición ambiental a este metal ha disminuido en los últimos 30 años, como consecuencia de la eliminación del plomo como aditivo en la gasolina y menor contacto con pinturas con plomo.¹¹

La pobre nutrición, es un factor importante que incrementa el riesgo de efectos tóxicos del plomo, como son la deficiencia de calcio, hierro y zinc. La deficiencia de calcio, incrementa la retención del plomo y la severidad de sus efectos tóxicos, el bajo consumo de hierro en la dieta, tiene efectos similares y es quizá más importante en niños, debido a que en ésta etapa es más frecuente su deficiencia, mientras que la deficiencia de zinc, hace que incremente la absorción del plomo y a su vez incrementa la excreción de zinc.¹²

Los niños con concentraciones de plomo en sangre mayores a $10\mu\text{g}/100\text{ ml}$ están en peligro de mostrar discapacidades en su crecimiento.⁵ En el caso de los adultos con concentraciones de plomo en sangre de 30 a $75\mu\text{g}/100\text{ ml}$ presentan alteraciones hematológicas, neuromusculares, renales, en el tubo digestivo, en el sistema nervioso central, entre otros. La encefalopatía saturnina suele surgir cuando las concentraciones del metal, son mayores de $100\mu\text{g}/100\text{ ml}$.¹²

2.1.2 EFECTOS SOBRE LA SALUD

Entre los signos y síntomas del saturnismo o plumbismo más notorios como el tono cenizo de la tez y palidez de los labios; aspecto de envejecimiento prematuro y la línea saturnina en el borde gingival.⁶

2.1.2.1 DIENTES

El plomo reacciona con iones de azufre liberados por acción microbiana ocasionando depósitos de color negro, grisáceo o azul muy oscuro de sulfuro de plomo en el borde de las encías, comúnmente llamado Ribete de Burton, antiguamente era muy común, pero en la actualidad es un signo relativamente raro.¹⁰

2.1.2.2 EFECTOS EN EL TUBO DIGESTIVO

Los efectos relacionados a la intoxicación por plomo empiezan con la contracción espasmódica del músculo liso de la pared intestinal, produciendo así síntomas importantes como anorexia, molestias musculares, malestar generalizado, cefalea, el estreñimiento suele ser un signo temprano, sobretodo en adultos, aunque a veces hay diarrea.⁹

En los comienzos del síndrome suele haber un gusto metálico persistente y al avanzar la intoxicación pueden intensificarse la anorexia y el estreñimiento. El signo más común del síndrome abdominal avanzado es el espasmo intestinal, que ocasiona dolor abdominal intenso, también llamado cólico saturnino. Los músculos del abdomen se vuelven rígidos y dolorosos, lo que se intensifica en la región del ombligo.⁸

2.1.2.3 EFECTOS NEUROMUSCULARES

También conocidos como síndrome neuromuscular o parálisis saturnina. La debilidad muscular y la fatiga aparecen mucho antes de una parálisis real y pueden ser los únicos síntomas.¹³

Los grupos musculares afectados suelen ser los más activos como los extensores del antebrazo, carpo y dedos de las manos además de los de la muñeca y de los pies.¹²

2.1.2.4 EFECTOS HEMATOLÓGICOS

El plomo afecta directamente al sistema hematopoyético mediante dos factores: acortamiento de la vida útil de los eritrocitos circulantes al aumentar la fragilidad de las membranas celulares y también por la inhibición de la síntesis de hemo, el plomo inhibe la formación de la síntesis de la hemoglobina en varios puntos, a través de enzimas clave implicadas en el proceso. . La consecuencia de estos dos procesos conduce a la anemia.^{15, 16}

La anemia causada por envenenamiento por plomo puede ser de dos tipos: anemia hemolítica, que se asocia con exposición aguda a niveles altos de plomo y anemia franca, que se produce solo cuando el nivel de plomo en la sangre está significativamente elevado durante períodos prolongados.¹⁷

2.1.2.5 EFECTOS EN LA SALUD REPRODUCTIVA

El plomo causa una serie de efectos adversos en el sistema reproductivo tanto en hombres como en mujeres. Los efectos comunes que se observan en los hombres incluyen: disminución de la libido, espermatogénesis anormal (disminución de la motilidad y el número), daño cromosómico, infertilidad, función anormal de la próstata y cambios en la testosterona sérica. Las mujeres, por otro lado, son más susceptibles a la infertilidad, el aborto espontáneo, la preeclampsia, la hipertensión del embarazo y el parto prematuro.¹⁸

Además, durante el período de gestación, también se ha informado sobre la influencia directa del plomo en las etapas de desarrollo del feto.¹⁹

2.1.2.6 EFECTOS CARDIOVASCULARES

Tanto la intoxicación aguda como crónica causan daño cardíaco y vascular con consecuencias potencialmente letales, que incluyen hipertensión y enfermedad cardiovascular.²³

Este metal puede aumentar la tensión arterial en personas susceptibles, esto puede ser debido a la interacción del metal con el calcio, que media la contracción del músculo liso vascular.²²

Otros trastornos importantes incluyen la enfermedad coronaria isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad vascular periférica.²¹

También el plomo induce anemia que puede ser normocítica o microcítica hipocrómica, esto debido a que el metal interfiere en la síntesis de hemo, al bloquear la incorporación de hierro a la protoporfirina IX y al inhibir la función de las enzimas en la vía de biosíntesis del hemo, como son la deshidratasa del ácido aminolevulínico y la ferroquelatasa. Además el plomo intensifica la fragilidad de la membrana eritrocítica, disminuyendo así la supervivencia de los glóbulos rojos.^{20, 15}

2.1.2.7 EFECTOS RENALES

Son menos notables que los del SNC y el sistema digestivo. La toxicidad renal se presenta en dos formas:

La nefropatía aguda se caracteriza funcionalmente por un mecanismo de transporte tubular alterado y morfológicamente por la aparición de cambios degenerativos en el epitelio tubular, lo que puede ser reversible. Esta nefropatía no causa la aparición de proteínas en la orina, pero puede dar lugar a una excreción anormal de glucosa, fosfatos y aminoácidos, una combinación conocida como Síndrome de Fanconi, enfermedad del riñón, por alteración en los túbulos renales proximales, además el plomo puede alterar la excreción de ácido úrico, lo que podría traer consigo crisis recurrentes de artritis gotosa.²⁴

- La nefropatía crónica, por otro lado, es mucho más grave y puede llevar a cambios funcionales y morfológicos irreversibles. Se caracteriza por cambios glomerulares

lo que produce una degradación renal, hipertensión, hiperuricemia y nefrosclerosis.²⁵

Además se pueden observar otros efectos:

- Existe una relación entre la concentración de plomo en sangre y la presión arterial, lo que puede deberse a cambios sutiles en el metabolismo del calcio o en la función renal.
- El plomo también interfiere en el metabolismo de la vitamina D.
- No se ha definido la carcinogenicidad del plomo en seres humanos, aunque se ha sugerido y se han publicado algunos casos de adenocarcinoma renal en trabajadores de la industria del plomo.^{26, 27}

1.1.1. INTOXICACIÓN AGUDA

La intoxicación aguda por el plomo es poco frecuente, se caracteriza por ser una exposición intensa de corta duración, en donde los niveles de plomo alcanzan niveles entre 100 y 120 $\mu\text{g}/\text{dl}$.²⁵ Los efectos locales que se pueden observar son astringencia, sed y gusto metálico en la boca, más adelante puede aparecer náuseas, dolor abdominal, vómito, dolor muscular, fatiga, dolor de cabeza, convulsiones y coma.¹⁸

También puede aparecer una crisis hemolítica aguda, que causa anemia y hemoglobinuria intensa, el plomo daña los riñones pudiendo ocasionar oliguria y cambios en la orina.¹⁶

1.1.2. INTOXICACIÓN CRÓNICA

También conocida como plumbismo o saturnismo, se caracteriza por ser una exposición repetida de bajo nivel durante un periodo prolongado. Los signos y síntomas del saturnismo afecta a nivel gastrointestinal, neuromuscular, renal, de la sangre y del sistema nervioso central, pudiendo aparecer encefalopatías, letargo, delirio, convulsiones y coma.²¹

2.1.3 TOXICOCINÉTICA

Las principales rutas de exposición al plomo son inhalación e ingestión. La inhalación es una ruta de absorción mucho más eficiente que la ingestión, al hacer una comparación de la absorción por estas dos vías, se obtiene una relación de 10 a 1 haciendo referencia al pulmón comparado con el tracto gastrointestinal.²⁸

El plomo puede ser absorbido en forma de partículas, mediante inhalación, estas partículas pueden llegar a un diámetro de $2,5\mu\text{m}$, las cuales se depositan en las vías respiratorias superiores y pueden ser despejadas por vía mucociliar, aunque posteriormente podrían ser ingeridas.²⁷

La absorción por el tubo digestivo en adultos puede ser del 10 al 15%, mientras que en niños de corta edad pueden alcanzar hasta un 50 % aproximadamente. La mayor absorción del plomo, puede ser debido a factores como: el bajo contenido de calcio en los alimentos, deficiencia de hierro.²⁷

Partículas menores a $1\mu\text{m}$ penetran los alveolos y son absorbidas por fagocitosis.²⁸

El plomo ingresa al torrente sanguíneo, se une a los glóbulos rojos en un 99% mientras que el 1% restante se queda en el plasma, más adelante se distribuye a lo largo de los tejidos blandos del cuerpo, como: medula ósea, cerebro, riñones, hígado, músculos y gónadas. Posteriormente se deposita en dientes, cabello y huesos, aproximadamente un 95%, la vida media de este depósito de plomo en sangre y tejidos blandos es de 1 a 2 meses, por otro lado en el esqueleto es de 20 a 30 años aproximadamente.²⁹

Aproximadamente 70% del plomo eliminado es por la orina, en menor porcentaje por la bilis, heces, sudor y leche materna.²⁷

La absorción de Pb^{+2} desde el intestino, es mediada por difusión pasiva y facilitada, aunque la difusión pasiva tiene un menor rol en la absorción. Estudios de la absorción intestinal del plomo han responsabilizado a transportador(es) como la causa directa del transporte del Pb^{+2} .²⁸

2.1.4 TOXICODINAMIA

Los efectos tóxicos causados por el plomo ocasionan daños en diversos órganos, aparatos y sistemas, además de la inhibición de la función enzimática, interferencia con la acción de cationes esenciales como calcio, hierro y zinc. Generación de agresión oxidativa.²⁹

La exposición al plomo ha recibido una especial atención debido a su capacidad de causar efectos tóxicos como déficits conductuales y cognitivos, siendo más propensos los niños expuestos. Estudios indican que la mayoría de la pérdida del coeficiente intelectual de niños expuestos al plomo se produce durante los primeros $10\mu\text{g dl}^{-1}$ de exposición.³⁰

Además la exposición a este metal también puede ocasionar daños en diversos órganos, aparatos y sistemas, así como la inhibición de la función enzimática, interferencia con la acción de cationes esenciales como calcio, hierro y zinc. Generación de agresión oxidativa. Debido a estos efectos, se han producido iniciativas globales para reducir el uso de Pb, pero a pesar de estos esfuerzos exposición Pb sigue siendo un problema generalizado.²⁸

Concentraciones en sangre iguales o menores a $5\text{ ug}/100\text{ ml}$ pueden originar deficiencia cognitiva en niños pequeños expuestos a este metal. La respuesta entre la concentración de plomo y la función cognitiva de los niños no es lineal, es decir que desde $1\text{ug}/100\text{ ml}$ hasta $10\text{ug}/100\text{ml}$ originan daño.²⁰

Los adultos son menos sensibles a los efectos del plomo en el sistema nervioso central el gran problema es cuando la exposición ocurre por periodos largos de tiempo, en donde concentraciones de $10\text{ug}/100\text{ml}$ a $30\text{ug}/100\text{ml}$ afecta la función neurocognitiva, apareciendo síntomas como: irritabilidad, fatiga, anorexia, alteraciones del sueño, trastornos de la coordinación visual motora y lentificación del tiempo de reacción, cefalea, también se pueden observar temblores.³⁰

La encefalopatía por plomo suele aparecer con concentraciones sanguíneas mayores a $100\text{ug}/100\text{ml}$, por un periodo de tiempo prolongado, meses, años.⁵

2.1.5 DIAGNÓSTICO

Si no existe evidencia de alguna exposición de plomo anormal, se pasa por alto el diagnóstico de intoxicación por plomo, en el caso del ribete de Burton se debe tener cuidado de no confundir una pigmentación semejante que puede ocurrir por absorción de mercurio, bismuto, plata, talio o hierro.

Los signos y síntomas son muy parecidos a los de otras enfermedades, como: Padecimientos degenerativos que pueden semejar a los signos de encefalopatías. Trastornos abdominales, en donde la exploración física no sería de mucha ayuda, que pueden semejar a cólicos por este metal pesado.³

Por lo que al haber una sospecha clínica debe confirmarse determinando la concentración de plomo en sangre y protoporfirina en eritrocitos.

El plomo a concentraciones bajas disminuye la síntesis de hemo en varios pasos enzimáticos, lo que conduce a la formación de sustratos claves para el diagnóstico, como son: δ -ALA, coproporfirina (que se miden en orina) y protoporfirina de zinc (ésta se mide en los glóbulos rojos como protoporfirina eritrocítica).¹⁵

2.1.6 TRATAMIENTO

El tratamiento inicial para la intoxicación por plomo en su fase aguda consiste en medidas de sostén. Es importante conservar el equilibrio hidroelectrolítico.

Las convulsiones se tratan con diazepam o fenilhidantoína. El edema cerebral se trata con manitol y dexametasona o hiperventilación controlada.³⁰

Antes de la administración de quelantes es conveniente medir la concentración de plomo en sangre.

El tratamiento de quelantes está indicado en pacientes sintomáticos o en aquellos cuyas concentraciones de plomo en sangre exceden de 50 a 60 μ g/100 ml (2.5 μ M). se utilizan cuatro quelantes:

- Calcioedetato sódico
- Dimercaprol
- D-penicilamina
- Succimero

Por lo general el calcioedetato sódico y el dimercaprol, se utilizan en combinación contra la encefalopatía saturnina.

2.1.6.1 CALCIOEDETATO SÓDICO

La administración de este compuesto se inicia con una dosis de 30 a 50mg/kg/día, en dos fracciones, seguida de aplicación intramuscular profunda o goteo intravenoso lento durante un periodo de cinco días consecutivos. La primera dosis de calcioedetato sódico debe diferirse unas cuatro horas después de haber aplicado la primera de dimercaprol. Cada ciclo de tratamiento con el edetato no debe rebasar la dosis total de 500 mg/kg. Es importante medir el gasto urinario, debido a que el compuesto quelante-plomo es neurotóxico. El tratamiento con calcioedetato sódico alivia los síntomas a muy corto plazo, los cólicos pueden desaparecer al mínimo de dos horas; la parestesia y el temblor cesan después de cuatro a cinco días; la coproporfirinuria, líneas saturninas en encías tienden a disminuir en cuestión de cuatro a nueve días.²²

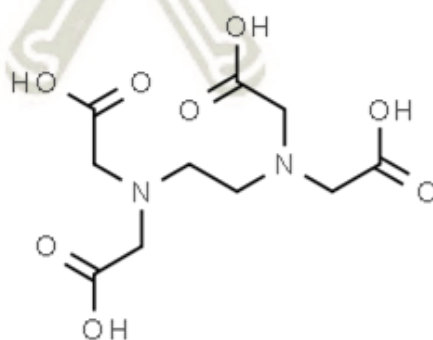


Figura 1. 1. Estructura EDTA

2.1.6.2 DIMERCAPROL

Este producto se aplica por vía intramuscular en una dosis de 4mg/kg , cada 4 horas, durante 48 horas, para seguir con la administración cada 6 horas por otras 48 horas y por último, cada 6 a 12 horas durante siete días más. La combinación de dimercaprol y el calcioedetato sódico es más eficaz que uno u otro producto solo.²⁴

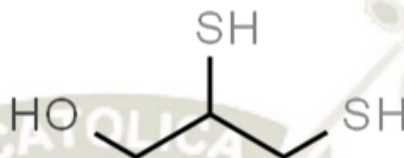


Figura 1. 2. Estructura Dimercaprol

2.1.6.3 D-PENICILAMINA

A diferencia del calcioedetato sódico y el dimercaprol, la penicilamina es eficaz por vía oral, su aplicación puede ser en dosis de 250 mg cuatro veces al día durante cinco días. En la administración crónica, la dosis no debe exceder de 40mg/kg/día.²¹

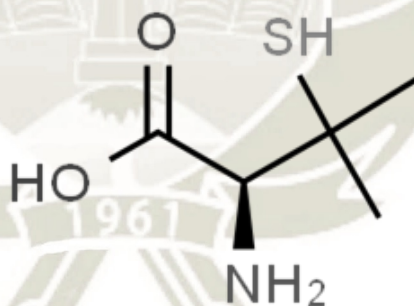


Figura 1. 3. Estructura D-penicilamina

2.1.6.4 SUCCÍMERO

Es el primer quelante de plomo que es activo por vía oral; puede administrarse con inocuidad a niños y muestra un perfil de eficacia superior al de la D-penicilamina. Por lo general se da cada 8 horas (10mg/kg) durante cinco días y luego cada 12 horas por dos semanas más.²² En cualquier tratamiento de quelación, dos semanas después de completar el tratamiento hay que medir de nuevo la concentración de plomo en

sangre. Se puede indicar un ciclo de terapia adicional si las concentraciones de plomo muestran rebote, aumentan después de haber disminuido.²¹

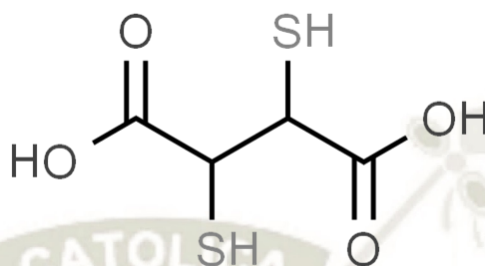


Figura 1. 4. Estructura Succímero

2.2 MANGANESO

El manganeso es un mineral esencial traza necesario en mínimas cantidades para cumplir roles importantes en la fisiología humana como el crecimiento, desarrollo y función de los seres humanos, pero en concentraciones elevadas puede ser potencialmente tóxico.³¹

Podemos encontrar este metal en el aire, agua, suelo y en la mayoría de los alimentos, además, se utiliza en una gran variedad de productos como fuegos artificiales, baterías secas, fertilizantes, pinturas, cosméticos y aditivos en la gasolina. La principal forma de exposición al Mn es por consumo de alimentos como cereales, legumbres y frutos secos o suplementos nutricionales. Se sabe que los factores de riesgo ocupacional se incrementan en los trabajadores de fundiciones de acero o soldadores, quienes pueden presentar altos niveles de Mn en sangre. Se ha reportado que la neurotoxicidad producida por el Mn se asocia con alteraciones motoras y cognitivas conocidas como manganismo, las cuales son parecidas a los signos clínicos y síntomas a los de la enfermedad de Parkinson (DP).³¹

Cuando la persona no cumple con la ración diaria recomendada, se pueden presentar problemas en su salud, por otro lado, la ingesta demasiado alta, también producirá diversos problemas.³²

La deficiencia de manganeso en animales, provoca distintos signos que incluyen retraso del crecimiento, deterioro de la función reproductiva y alteración del metabolismo de lípidos y carbohidratos, mientras que en seres humanos, la demostración del síndrome de deficiencia de manganeso es menos evidente, ejemplo un niño bajo nutrición parenteral total (NPT) a largo plazo sin manganeso sufrió de desmineralización ósea y retraso del crecimiento, los que fueron corregidos por la suplementación con manganeso.³³

2.2.1 GENERALIDADES DEL MANGANESO

2.2.1.1 FUENTES ALIMENTICIAS

Este metal es fundamental para mantener la homeostasis, y lo encontramos en muchos alimentos. Las mejores fuentes de Manganeso son el té, los vegetales con hojas, como las espinacas, repollo, brócoli, col rizada, lechuga romana, granos enteros, que incluyen la semilla de soya, arroz, alimentos ricos en ácido fólico, como los frijoles, semillas. Las frambuesas y la palta también son ricas fuentes de manganeso.³¹

Otros alimentos que contienen este mineral son: la yema de huevo, los plátanos, avena, legumbres, ajo, zanahorias, aceite de oliva, ostras, frutos secos como: almendras, maníes o cacahuets, nueces. Entre las especias se destacan la canela, jengibre, pimienta negra entre otros.³¹

Después de ser absorbido en el cuerpo humano el manganeso será transportado a través de la sangre al hígado, los riñones, el páncreas y las glándulas endocrinas.³³

Los alimentos altos en ácido oxálico como el repollo, la espinaca, y los camotes, pueden inhibir levemente la absorción de manganeso. Aunque los tés son ricas fuentes de manganeso, los taninos también presentes en el té pueden reducir moderadamente la absorción de manganeso.³⁴

Concentraciones elevadas de manganeso en el torrente sanguíneo puede ocasionar Neurotoxicidad y también existe un alto riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson, Manganismo.³²

2.2.1.2 DEFICIENCIAS

Como se sabe el Manganeso es un elemento esencial para la salud de los humanos y la falta de éste es sumamente rara, ya que muchos de los alimentos mencionados contienen este mineral, su deficiencia puede causar lo siguiente:

Aumento de peso, intolerancia a la glucosa, coágulos de sangre, problemas en la piel, defectos de nacimiento, cambios en el color del pelo y desórdenes neurológicos.³²

2.2.2 EFECTOS SOBRE LA SALUD

La ingesta adecuada de Mn recomendada por la National Academy of Sciences (NAS) no debe sobrepasar los siguientes valores:

- 2.3 mg por día para hombres adultos
- 1.8 mg por día para mujeres adultas
- 0.3 mg/L (agua potable)
- < 0.05 mg/L (agua embotellada)

Los efectos del manganeso mayormente ocurren en el tracto respiratorio y el cerebro. Los síntomas por envenenamiento con Manganeso son alucinaciones, olvidos y daños en los nervios.³³ El Manganeso puede llegar a causar síntomas parecidos a los del parkinson, embolia de los pulmones y bronquitis. Cuando los hombres se exponen al manganeso por un largo periodo de tiempo el daño puede llegar a ser importante, originando esquizofrenia, depresión, debilidad de músculos, dolor de cabeza e insomnio.³²

2.2.3 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DE MANGANESO EN HUMANOS

En la exposición a Mn, los efectos adversos se producen principalmente debido a que sus altas concentraciones van a ocasionar un déficit en el sistema dopaminérgico, afectando así al sistema motor que forma parte del sistema nervioso central, por lo que se producen alteraciones con la coordinación del movimiento. La exposición a altos niveles de Mn puede resultar en manganismo, una enfermedad extra-piramidal neurológica caracterizada por rigidez, una expresión similar a una máscara, temblor, bradicinesia, lentitud de los movimientos voluntarios asociada a disminución de los movimientos automáticos (como el braceo al caminar).³⁵

El daño a las células de los ganglios basales puede causar problemas con la capacidad para controlar el habla, el movimiento y la postura. Esta combinación de síntomas se conoce como parkinsonismo.³⁶

Una persona con disfunción de los ganglios basales puede tener dificultad para iniciar, suspender o sostener el movimiento, dependiendo del área afectada, también puede haber problemas con la memoria y otros procesos de pensamiento. En general, los síntomas varían y pueden incluir:

- Cambios en el movimiento, tales como movimientos involuntarios o lentos.
- Aumento del tono muscular.
- Rigidez y espasmos musculares.
- Temblor.
- Movimientos repetitivos.
- Lenguaje y gritos incontrolables.
- Dificultad para caminar.

En general, trastornos de la marcha, la memoria, disfunción cognitiva, que pueden ser parciales o totales de una o varias funciones cognitivas. Las funciones cognitivas con las funciones intelectuales nos permiten organizarnos, razonar y

controlar nuestros actos voluntarios. Incluyen el lenguaje, el reconocimiento visual y las funciones ejecutivas. Una disfunción cognitiva puede ser provocada por una enfermedad neurológica como la enfermedad de Alzheimer ó la enfermedad de Parkinson. Los síntomas del manganismo son sorprendentemente similares a la de la enfermedad de Parkinson (PD). Sin embargo por lo general el manganismo se presenta con marcadas diferencias en comparación a PD, como la insensibilidad a la administración de levodopa (L-DOPA), La dopamina es un neurotransmisor liberado en forma de impulsos nerviosos o mensajes por los nervios a través de un espacio muy pequeño llamado sinapsis, entonces la disminución de dopamina puede traer problemas del comportamiento , atención, memoria, movilidad, estado de ánimo, sueño etc. La deficiencia extrema de dopamina, como en el caso de la enfermedad de Parkinson, causa una disminución permanente y degenerativa de las habilidades motoras, incluyendo la rigidez muscular y temblores.^{37, 38}

Aunque la mayoría de los estudios de neurotoxicidad causada por el Mn se refiere a los casos en adultos, existen cada vez más pruebas que demuestran que el Mn puede tener efectos neurotóxicos en el desarrollo de los niños. Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que los niños que beben agua de los pozos con niveles elevados de Mn presentan tanto déficits cognitivos y conductuales. Los escolares mostraron una disminución del índice de inteligencia con el aumento en la exposición al Mn de las aguas. mostrando un comportamiento más hiperactivo, agresivo, y déficit en la atención en los colegios. En concreto la exposición tanto alta como baja de Mn puede influenciar negativamente en el desarrollo neurológico del niño.³⁴

2.2.4 OTRAS FUENTES DE EXPOSICIÓN

La exposición al manganeso puede también ocurrir a través de la contaminación del agua potable, de agentes utilizados comúnmente en la agricultura, conocidos como fungicidas, además de la contaminación en el aire debido al combustible tricarbonil metilciclopentadienil de manganeso (MMT) utilizado.³³

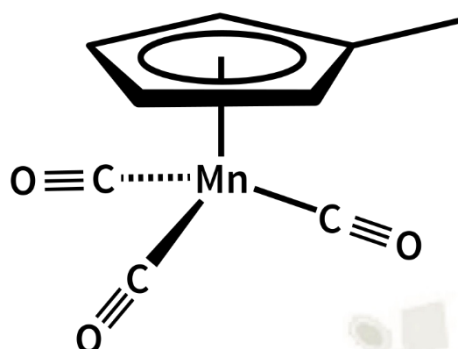


Figura 1. 5. Estructura del MMT

El MMT es un aditivo antidetonante utilizado en la gasolina, la mayor preocupación era los efectos adversos en la salud por inhalación de los gases emitidos. Luego de un estudio realizado en Montreal, se determinó que los niveles de Manganese en el aire eran muy similares tanto en la ciudad como en áreas rurales, donde no se utilizaba MMT.^{40, 41}

Otras fuentes de exposición son plantas de ferroaleaciones y las instalaciones de acero. Estas instalaciones emiten aire contaminado y pueden aumentar la exposición del Mn tanto en los trabajadores como en las poblaciones cercanas.⁴²

El agua potable contaminada tiene valores de Manganese desde 1 a 100 $\mu\text{g/litro}$.⁴³ La Agencia de Protección Ambiental (APA) de los EE.UU. recomienda 0.05 mg (50 $\mu\text{g/litro}$) como la máxima concentración de manganese permitida en el agua potable.⁴⁴

La principal causa de toxicidad por Mn es debido a la exposición a este metal pesado en el aire, por lo tanto las personas relacionadas al mayor riesgo de toxicidad de Mn son los mineros, los soldadores, fundidores y los trabajadores de las plantas de ferroaleaciones están en mayor riesgo de toxicidad por Mn.³¹

El Mn transportado en el aire se absorbe fácilmente en el pulmón. Al igual que con Pb, la absorción pulmonar de Mn es mucho mayor que la absorción gastrointestinal y la absorción pulmonar de Mn probable ocurre a través de canales de Ca^{+2} . El Mn

que se inhala a través de la nariz puede acceder al bulbo olfatorio, que puede ser una ruta directa al cerebro, antes de que pueda ser metabolizado en el hígado.⁴⁵

El manganeso cruza la barrera hematoencefálica (BHE) por difusión facilitada o cruza las membranas celulares usando DMT1, como en el caso del metabolismo del hierro, en el que introduce hierro a los eritrocitos, así mismo también se encarga del transporte de otros metales como zinc, cobre y cobalto.^{46, 47}

Mn también podría atravesar el plexo coroideo en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y por lo tanto tener acceso a los tejidos del cerebro. Una vez a través de la BHE, Mn se encuentra predominantemente como Mn-citrato y se acumula en el interior de las neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, probablemente a través de mecanismos dependientes DMT1.⁴⁸

Existen varias vías de importación de este metal al cerebro, mientras que la única vía de salida es la difusión, por lo que el manganeso tiene el potencial de ser retenido en el cerebro durante un período prolongado.⁴⁹

2.2.5 TOXICOCINÉTICA

El transporte del Mn por nuestro organismo podría ser gracias al transportador de metal divalente (DMT1).

DMT1 se encuentra en elevados niveles en la zona del duodeno, el aumento de éste transportador es mediado principalmente por el hierro, es decir al haber una deficiencia de hierro la expresión de DMT1 aumentará y cumplirá un rol importante, ya que aumentará la absorción de manganeso a través del intestino, para luego acumularse en el cerebro.^{48, 50}

Según estudios realizados, se llegó a la conclusión que en personas expuestas al manganeso, se acumuló más este metal en la zona del globo pálido que en otras estructuras cerebrales.⁵¹

Las concentraciones de Mn en sangre normalmente de 4 a 15 $\mu\text{g} / \text{L}^{-1}$.⁵³ En hombres y mujeres sanos el Mn se une casi en su totalidad a los componentes celulares:

- en los glóbulos rojos 66%

- en los glóbulos blancos 23%
- en plaquetas 7%
- en plasma 4%

El manganeso en plasma puede representar un prometedor biomarcador de exposición por inhalación en los soldadores, debido a que se encuentra fácilmente disponible en sangre y se transporta hacia la barrera hematoencefálica.⁵²

Un valor óptimo que se puede considerar como aire respirable de Mn en plasma es de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.⁵⁴

Su principal vía de eliminación es por excreción biliar, heces y en menor proporción por la orina, leche materna⁵⁵ y sudor, se sabe que una fracción de Mn se reabsorbe en el intestino, se establece un bucle enterohepático.⁵⁶

2.2.6 TOXICODINAMIA

Como se sabe, el manganeso (Mn) es un elemento traza esencial que se requiere para el crecimiento normal, el desarrollo y la homeostasis celular.³¹

Mn es importante en la formación de hueso, metabolismo de grasas y carbohidratos, regulación de azúcar en la sangre, y la absorción de calcio, tanto en seres humanos como en animales.^{33,57}

Funciona como un cofactor requerido por varias enzimas necesarias para la función celular neuronal y glial, así como enzimas implicadas en la síntesis de neurotransmisores y el metabolismo.⁵⁸

Aunque es poco frecuente la deficiencia de Mn, puede ocasionar defectos de nacimiento, problemas de fertilidad, malformación de huesos, debilidad y mayor susceptibilidad a convulsiones.⁵⁸

Por otro lado su exposición excesiva puede ocasionar problemas de neurotoxicidad, respuestas inflamatorias del pulmón y daño de la función sexual, problemas en el desarrollo de la inteligencia, memoria y comportamiento.⁵⁹

Antiguamente se utilizaba el tetraetilo de plomo, pero al observar el incremento de la contaminación causada por este metal, por lo que hace más de dos décadas se viene utilizando Tricarbonil metilciclopentadienil de manganeso ha sido añadido a la gasolina con el mismo propósito, aumentar su octanaje.⁶⁰

Las propiedades químicas versátiles de Mn han permitido su industrial el uso en la fabricación de vidrio y cerámica, adhesivos, soldadura, pintar, aditivos de gasolina antidetonantes (manganeso metilciclopentadienil tricarbonilo (MMT), y muchos otros.^{60, 61}

Las principales formas de exposición del Mn son por ingestión en la dieta, absorción cutánea e inhalación.³⁵

A pesar de su rol esencial en múltiples funciones metabólicas, la exposición excesiva al Mn puede acumularse en el cerebro y ha sido asociada con disfunción del sistema basal de ganglios, que causa un severo desorden neurológico similar a PD.⁶³

La exposición a altos niveles de Mn causa una enfermedad clínica que se caracteriza por síntomas extrapiramidales se asemeja a la enfermedad de Parkinson idiopática (IPD), incluyendo la anorexia, apatía, dolor muscular y articular. Poco después de la aparición de estos síntomas, los pacientes también presentan pérdida de memoria, comportamiento compulsivo, deficiencia visual, ilusiones, delirios y desorientación, lo cual es conocido como la locura mangánica.³²

Además también ha sido asociada con el deterioro en la homeostasis del hierro, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, la inducción de la agregación de proteínas y alteración de las condiciones homeostáticas de otros metales divalentes que comparten similares sistemas transportadores con Mn. Aunque la relación entre el incremento de niveles de Mn y sus efectos destructivos en la neuroquímica de neurotransmisores ha sido debatida.²

2.2.7 MECANISMO DE NEUROTOXICIDAD

El manganeso puede afectar a la función del hígado. Por otra parte, más de 95% de manganeso es eliminado por excreción biliar, cualquier daño hepático existente puede ralentizar este proceso, aumentando su concentración en el plasma sanguíneo.

El mecanismo neurotóxico exacto de manganeso es incierto, pero hay indicios que señalan que podrían interactuar con el hierro, zinc, aluminio y cobre. En base a una serie de estudios, el metabolismo del hierro alterado podría ocultar la acción neurotóxica de manganeso.³⁵

El transporte de Manganeso al cerebro es a través de la transferrina (Tf). Mn se une fuertemente Tf, formando un complejo Mn-Tf.

Los complejos Mn-Tf, en el plasma sanguíneo, se unen a receptores de transferrina y posteriormente atraviesan la Barrera hematoencefálica, por difusión facilitada, se cree que puede ser transportado por DMT1 para cruzar las membranas celulares, como la pared intestinal y la barrera hematoencefálica.^{36, 53}

Una vez que cruza la barrera hematoencefálica, por endocitosis a las células endoteliales microvasculares cerebrales el Mn se va a encontrar predominantemente como Mn-citrato y se acumula en el interior de las neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.⁵³

Existen varias vías de importación, mientras que en el cerebro el flujo de salida del Mn es probablemente mediado por difusión, por lo que el Mn tiene el potencial de ser retenido en el cerebro durante un periodo prolongado.³⁵

El Mn se acumula en las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. El Mn intracelular se acumula dentro de las mitocondria, donde se interrumpe la síntesis del ATP. Mientras que el transportador de Ca^{+2} secuestra al Mn en la mitocondria, lo que resulta en una rápida acumulación de Mn.³⁴

La interrupción de la síntesis de ATP lleva a la disminución de los niveles de ATP intracelulares y aumento de estrés oxidativo, que pueden contribuir con la toxicidad celular.³⁶

La toxicidad por exposición al Mn resulta debido a la disminución de los niveles de grupos tiol e hidroxilo libres en proteínas celulares antioxidantes.³⁴

El aumento de las especies oxidantes puede resultar en la degeneración dendrítica y citotoxicidad en sistemas de cultivo.⁴¹

La sensibilidad al Mn del sistema dopaminérgico es un área activa de investigación. Los estudios demuestran déficits específicos en el sistema dopaminérgico causada por la exposición a este metal. Por el contrario, los sistemas glutamatérgicos y Gabaérgicos del cerebro permanecen relativamente no afectados por su exposición.⁴³

Los estudios en roedores se encuentran limitados por el hecho de que los roedores son menos sensibles a Mn en comparación con los humanos y los primates. Los roedores no acumulan Mn en las mismas regiones cerebrales como los primates y humanos.⁴

Por las razones descritas anteriormente, los primates siguen siendo el modelo animal más relevante para la investigación por intoxicación a causa del Manganese en humanos.

La exposición a Manganese resultó en un marcado deterioro de la dopamina, evidenciando posibles déficits presinápticos en el sistema nigroestriatal, lo que puede explicar la dificultad de sujetos que padezcan parkinsonismo y además estén expuestos al Manganese el tratamiento con L-DOPA sería ineficaz en el alivio de los trastornos del movimiento asociados con la toxicidad de Mn.³²

Los efectos de Manganese en el comportamiento y las capacidades cognitivas en los niños pueden estar relacionados con efectos sobre el sistema dopaminérgico durante el desarrollo. En roedores, la exposición a Mn durante el desarrollo postnatal temprano dió lugar a anomalías de comportamiento, como hiperactividad, así como problemas de rendimiento en las pruebas cognitivas.⁵²

La exposición de Mn en los organismos en desarrollo puede tener cambios duraderos en el cerebro; en estudios realizados se evidenció que ratas expuestas a Mn

sólo durante el período de pre-destete demostraron un aumento en la activación de astrocitos en la edad adulta, a pesar de que los niveles de Mn en la sangre y el cerebro disminuyeron.⁵⁶ Estos hallazgos, pueden resultar en déficit en el comportamiento y cognición a larga duración.⁵²

2.2.8 TRATAMIENTO

El primer paso del tratamiento es cortar la fuente de exposición al metal, luego se opta por un tratamiento de quelación con EDTA que aumenta la excreción de manganeso en la orina y disminuye la concentración en sangre, mejorando solo los espasmos musculares y los movimientos repetitivos, el inconveniente sería que no habrá mejora en los demás síntomas clínicos y con el transcurrir del tiempo empeoraría la condición de los mismos pacientes.⁵²

La insensibilidad a la L-DOPA es generalmente considerado una diferencia clave entre el manganismo y PD. La dopamina no puede administrarse directamente ya que no puede pasar la BHE, por este motivo se utilizan una serie de fármacos que favorecen la producción de esta sustancia o retrasan su deterioro y que se administran en función de la gravedad de los síntomas. Así, en las primeras etapas, cuando los síntomas son leves, se utilizan los fármacos menos potentes, como los anticolinérgicos; mientras que para los casos severos y avanzados se utiliza la levodopa, que es el fármaco más potente hasta el momento para el tratamiento de esta enfermedad, en el caso de algunos pacientes con manganismo que respondieron positivamente a la terapia con L-DOPA se debe especificar que los casos que respondían a L-DOPA pueden haber tenido también su etiología PD y que los efectos de Mn son secundarios o agravados por los de PD.³⁹

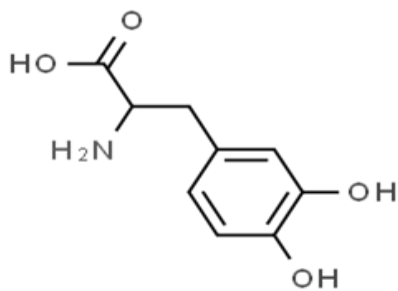


Figura 1. 6. Estructura de L-DOPA

Otra alternativa podría ser la administración de suplementos de hierro ó también el uso del ácido paraaminosalicílico, un fármaco aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) utilizado para el tratamiento de tuberculosis que en estudios recientes ha demostrado gran eficacia en el tratamiento de intoxicación severa por Mn.⁵³

Los efectos de Manganese están mediados por la neurotoxicidad inducida que genera el Mn en el globus pallidus y otras estructuras de los ganglios basales del cerebro humano.⁵⁶

Las características químicas de Mn^{+2} , brindan una gran ventaja para las técnicas de medición no invasivos, como son las técnicas de imagen dentro de las cuales podemos mencionar a la resonancia magnética (RM), lo cual ha permitido determinar la distribución de Mn en seres humanos, gracias a su acumulación en los ganglios basales. Se ha demostrado la eficacia para la detección de manganese por la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) y la tomografía por emisión de positrones (PET).^{56, 57}

Sin embargo, los resultados de los estudios sobre personas intoxicadas con Mn, deben ser interpretados con cuidado debido a varios factores de confusión, como el PD, que puede influir en los resultados.³⁴

3. EVALUACION DEL EFECTO NEUROTOXICO CELULAR

La evaluación del efecto neurotóxico celular se fundamenta en el cultivo in vitro: técnica de reproducción celular, que necesita de condiciones adecuadas para su desarrollo y multiplicación en poco tiempo, se fundamenta en el concepto de la potencialidad celular.²

4. CULTIVO CELULAR

El cultivo celular consiste en el cultivo de células a partir de líneas celulares establecidas. Esta técnica presenta una serie de ventajas para el estudio de la función celular, como controlar las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas (pH, temperatura,

presión osmótica, el CO₂ y fisiológicas como composición del medio de cultivo en nutrientes).⁷

Este tipo de cultivo es una de las principales herramientas utilizada en biología celular y molecular, proporcionando excelentes sistemas de modelo para el estudio de la fisiología normal y la bioquímica de las células, como estudios metabólicos, el envejecimiento, los efectos de fármacos y compuestos tóxicos sobre las células, mutagénesis y la carcinogénesis, detección de drogas y la fabricación a gran escala de compuestos biológicos como las vacunas.⁹

Existen varios tipos de cultivo dentro de los cuales el que se utilizó es el cultivo clonal, en el que añade una cantidad pequeña de células a un frasco de cultivo, después se asientan y se fijan a la superficie del fondo, en donde se encuentran a una cierta distancia de separación, en este caso la proliferación de células genera colonias individuales, cuyos miembros se derivan de la misma célula original.¹⁰

El cultivo primario se refiere a la etapa del cultivo después de que las células se aíslan a partir del tejido y proliferan en las condiciones adecuadas hasta que consumen todo el sustrato posible. En esta etapa, las células tienen que ser subcultivadas, lo que comúnmente llamamos pasaje de las células, transfiriéndolos a un nuevo recipiente con medio de cultivo fresco para proporcionar más espacio para el crecimiento continuo. Después de la primera subcultura, el cultivo primario se conoce como una línea celular ó subclone.⁹

Condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular, pero el entorno artificial en el cual las células se cultivan invariablemente consiste en un recipiente adecuado que contiene un sustrato o medio que suministra los nutrientes esenciales (aminoácidos, carbohidratos, vitaminas, minerales), factores de crecimiento, hormonas, y gases (O₂, CO₂), y regula la fisicoquímica medio ambiente (pH, presión osmótica, temperatura).¹²

5. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular es una técnica muy utilizada cuando se trabaja con cultivos in vitro, esta técnica nos permite el conteo de células vivas, metabólicamente activas, en un periodo de tiempo, después de haberlas sometido a un tratamiento, se considera una viabilidad óptima a partir del 90%.

5.1 ENSAYO MTS

Es un ensayo colorimétrico que nos ayuda a la medición de la viabilidad, es decir el conteo de células, se necesita de la mezcla de dos componentes: 4-[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], mayormente conocido por sus siglas en inglés “MTS” y el etosulfato de fenazina “PES”. Este reactivo, CellTiter 96® AQueous One, en combinación es estable y en contacto con las células vivas, permite que el MTS se reduzca, es así como forma un producto cromogénico llamado “formazán”, el cual tiene un máximo de absorbancia a 490-500nm en solución salina tamponada con fosfato.

Su mecanismo es mediante la enzima NAD(P)H ésta oxidoreductasa, reduce el colorante de tetrazolio MTS que es de color amarillo a un color púrpura, característico del formazán, el cual evidencia la presencia de células vivas. Los ensayos con MTS se realizan generalmente en la oscuridad ya que el reactivo MTS es sensible a la luz.

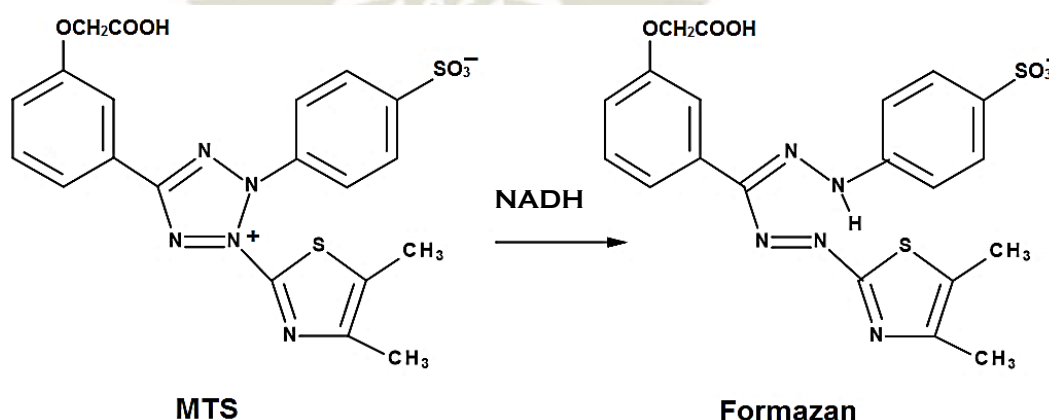


Figura 1. 7. Estructura del MTS y su reducción a formazán

6. ENZIMA LDH

La Lactato deshidrogenasa LDH, es una enzima citosólica presente en diferentes tipos de células. El método colorimétrico es aquel que nos permite cuantificar la citotoxicidad celular. El daño en la membrana libera LDH en el medio de cultivo celular

LDH extracelular se puede cuantificar mediante una reacción enzimática acoplada en la que LDH cataliza la conversión de lactato a piruvato a través de la reducción de NAD a NADH. Luego la diaforasa, utiliza NADH para reducir una sal de tetrazolio (INT) obteniendo como producto formazán de color rojo que se puede medir a 490 nm. El nivel de formación de formazan es directamente proporcional a la cantidad de LDH liberada en el medio, que es indicativa de la citotoxicidad.¹⁴

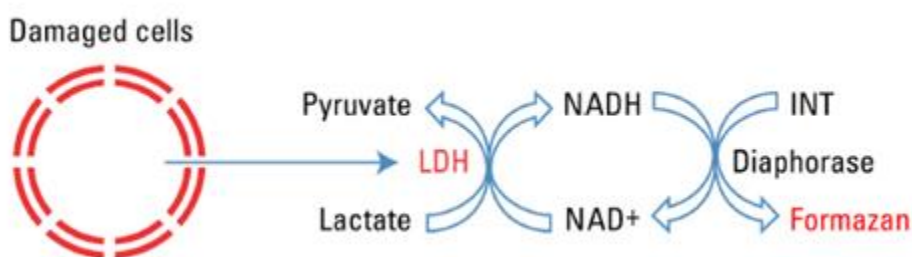


Figura 1. 8. Esquema de la enzima LDH en la producción de formazán.⁶⁷

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1 CÉLULAS B35

Las células B35 de neuroblastoma de rata se obtuvieron de una cámara de nitrógeno líquido (VWR® CryoPro® Rack Systems, BR Series Promotion Packages), que se encontraba a una temperatura aproximada de -190°C , en los laboratorios de investigación de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University, Boston, USA. Posteriormente en adecuadas condiciones se procedió a hacer los pasajes celulares, para el crecimiento y multiplicación de dichas células, con el fin de utilizarlas en la presente investigación.

1.2 EQUIPOS UTILIZADOS

Cabina de bioseguridad, clase II, tipo A2, ESCO®, Tanque criogénico de nitrógeno líquido en fase de vapor. BioCane™ (VWR® CryoPro® Rack Systems, BR Series Promotion Packages), Cámaras de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2), Refrigeradora de -80°C , REVCO, Refrigeradora de -20°C , Thermo Scientific, Incubadora de CO_2 con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO_2 Incubators, Models 5.3A and 8.5A), Centrifugador, Clay Adams™ DYNAC® III Centrifuge, Model 420104, Equipo de Baño María de perlas metálicas Fisher Lab Armor®, Bead Bath™ Model 74300-706), Equipo de ultrasonido VWR® Symphony™, Cellometer® Auto T4 (contador automático de células) Nexcelom Bioscience®, Equipo Synergy HT (lector multimodal de microplacas) Bio-Tek® Synergy™ microplates), Microscopio invertido CKX31 OLYMPUS®

1.3 REACTIVOS

Medio Eagle Dulbecco Modificado (4.5g/L glucosa; L-glutamina y piruvato de sodio), Cellgro[®], Suero bovino fetal al 10%, Cellgro[®]

Solución de penicilina-estreptomina (10 000 unidades/ml penicilina y 10 000 µg/ml estreptomina) HyClone[®], Solución tripsina-EDTA al 0.25%. ATCC[®], Fosfato Buffer Salino (PBS), Solución azul de tripán. Sigma Aldrich[®], MTS (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin), Nitrato de plomo. Pb(NO₃)₂ Sigma Aldrich, Nitrato de manganeso. Mn(NO₃)₂

Sigma Aldrich, Substrate mix. Thermo Scientific, Assay buffer. Thermo Scientific, Lysis buffer. Thermo Scientific, Stop solution. Thermo Scientific, LDH Positive control. Thermo Scientific.

1.4 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Post-Grado del MCPHS, Boston, USA.

2. METODOLOGÍA

2.1 CULTIVO CELULAR

El primer paso consistió en la preparación de dos medios, el medio enriquecido y el medio blanco, la diferencia entre ambos medios es que el medio enriquecido contiene suero bovino fetal (FBS).

Para la preparación del medio enriquecido se utilizó un frasco de 500 ml de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM), al cual se le retiró 55 ml del mismo medio y luego se le adicionó 50 ml de FBS, llegando a una concentración del 10% y posteriormente se adicionó 5 ml de solución antibiótica, Penicilina-Estreptomina, con la finalidad de que el medio se mantenga estéril y completar el volumen inicial de 500 ml.

El medio blanco se preparó con otro frasco de DMEM, al cual sólo se le quitó 5 ml del mismo medio para adicionarle 5 ml de solución antibiótica, Penicilina-Estreptomicina,

Estos medios fueron conservados en un refrigerador a temperatura de 4°C, por lo que al momento de utilizarse debían pasar por un baño térmico de perlas metálicas Fisher Lab Armor® a una temperatura de 37°C.

Las células utilizadas, fueron de neuroblastoma de rata B35, las que se encontraban crio-preservadas en un tanque de nitrógeno líquido en fase de vapor BioCane™ (VWR® CryoPro® Rack Systems BR Series Promotion Packages) a una temperatura de -190°C, por lo que fue necesario llevar estas células a un baño de 37°C, por un tiempo aproximado de dos horas, para poder extraer 1 ml, el que se colocó en un frasco estéril y al que se le adicionó 13 ml de medio DMEM enriquecido con 10% de FBS, luego el frasco fue llevado a la incubadora de CO₂ con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3A and 8.5A), a 37°C con 5% de CO₂ por un periodo de 72h.

Pasadas las 72 horas, se llevó el frasco a la cabina de bioseguridad (Esco®, Class II Type A2) para descartar el medio de cultivo, quedando las células adheridas a la pared inferior del frasco, el cual fue lavado con 1 ml de tripsina, después se agregó 3 ml de tripsina para despegar las células adheridas al frasco, luego se llevó a la incubadora por 15 minutos, moviendo suavemente el frasco cada 5 minutos, seguidamente se le agrega 6 ml de medio blanco para evitar que la tripsina siga actuando, luego se llevó todo el contenido a la centrifuga Clay Adams™ DYNAC® III Centrifuge, Model 420104 y se procedió a centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm, después se eliminó el sobrenadante y se llevó para resuspender el pellet con 5 ml del medio DMEM enriquecido con FBS y es así como se continuó haciendo el pasaje celular.

2.2 CONTEO CELULAR

Para el conteo celular se necesitó mezclar en un tubo eppendorf 30µl de azul de tripán y 30µl de la resuspensión de células previamente realizada, la mezcla se realizó con mucho cuidado de no formar burbujas, porque esto sólo afectaría su lectura.

Luego se procedió a colocar la mezcla en una cámara de recuento celular por duplicado y seguidamente en el Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter, obteniendo resultados en células vivas/ml.

2.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La solución Stock de Plomo se preparó a una concentración de 0.01M y a partir de ésta se realizaron las diluciones correspondientes para obtener soluciones de 1000µM, 750µM, 500µM, 250µM, 100µM, 50µM, 25µM y 10µM respectivamente, las cuales fueron guardadas a 4°C. Para la preparación de la solución Stock de Manganeseo se procedió de la misma manera que con el Plomo.

2.3.1 SOLUCIONES DE PLOMO

Se prepararon a partir de Pb(NO₃)₂ Sigma Aldrich con un grado de pureza del 99.99%, se pesó 0.152g de Pb(NO₃)₂ y se diluyó en 46 ml de agua nano pura.

$$\frac{331.2\text{g}}{1\text{ mol}} \left(\frac{1\text{ mol}}{1\text{L}} \right) 0.5\text{L} = 0.165\text{g Pb(NO}_3)_2$$

$$\begin{array}{l} 0.165\text{g} \text{ ——— } 0.5\text{L} \\ 0.152\text{g} \text{ ——— } x\text{L} \\ x = 0.46\text{ L} \end{array}$$

$$0.152\text{g en } 46\text{ml} \iff 0.01\text{M Pb}$$

$$0.01\text{M} = 10\,000\ \mu\text{M}$$

$$45\text{ ml H}_2\text{O} + 5\text{ ml solución } 0.01\text{M} = 50\text{ ml} \iff 0.001\text{M} = 1000\ \mu\text{M Pb}$$

Se prepararon 5 ml para cada concentración de plomo, diluyendo cada una con agua ultrapura y se obtuvieron las siguientes concentracones 1000 µM, 750 µM, 500 µM, 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM y 10 µM.

- 1000 µM Pb = 5000µl 0.001M Pb + 0 µl H₂O
- 750 µM Pb = 3750µl 0.001M Pb + 1250 µl H₂O
- 500 µM Pb = 2500µl 0.001M Pb + 2500 µl H₂O
- 250 µM Pb = 1250µl 0.001M Pb + 3750 µl H₂O

- 100 μM Pb = 500 μl 0.001M Pb + 4500 μl H₂O
- 50 μM Pb = 250 μl 0.001M Pb + 4750 μl H₂O
- 25 μM Pb = 125 μl 0.001M Pb + 4875 μl H₂O
- 10 μM Pb = 50 μl 0.001M Pb + 4950 μl H₂O

Para el experimento de Plomo se utilizó 20 μl del tratamiento, Nitrato de Plomo de una solución 1000 μM , para un nuevo volumen de 200 μl . obteniendo una concentración de 100 μM , 75 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM y 1 μM de Plomo.

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 200\mu\text{L} \times C &= 20\mu\text{L} \times 1000\mu\text{M} \\ C &= 100 \mu\text{M} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 200\mu\text{L} \times C &= 20\mu\text{L} \times 750\mu\text{M} \\ C &= 75 \mu\text{M} \end{aligned}$$

2.3.2 SOLUCIONES DE MANGANESO

Se prepararon a partir de Mn(NO₃)₂ Sigma Aldrich con un grado de pureza del 99.99%, se pesó 0.8845g de Mn(NO₃)₂ y se diluyó en 49 ml de agua nano pura.

$$\frac{178.9\text{g}}{1 \text{ mol}} \left(\frac{1 \text{ mol}}{1\text{L}} \right) 0.5\text{L} = 0.089\text{g Mn(NO}_3)_2$$

$$0.089\text{g} \text{ ——— } 0.5\text{L}$$

$$0.088\text{g} \text{ ——— } x \text{ L}$$

$$x = 0.49 \text{ L}$$

$$0.088\text{g en } 49\text{ml} \iff 0.01\text{M Mn}$$

$$0.01\text{M} = 10\,000 \mu\text{M}$$

$$45 \text{ ml H}_2\text{O} + 5 \text{ ml solución } 0.01\text{M} = 50 \text{ ml} \iff 0.001\text{M} = 1000\mu\text{M Mn}$$

Se prepararon 5 ml para cada concentración de manganeso, diluyendo cada una con agua ultrapura y se obtuvieron las siguientes concentracones 1000 μM , 750 μM , 500 μM , 250 μM , 100 μM , 50 μM , 25 μM y 10 μM .

- $1000 \mu\text{M Mn} = 5000\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 0 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $750 \mu\text{M Mn} = 3750\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 1250 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $500 \mu\text{M Mn} = 2500\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 2500 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $250 \mu\text{M Mn} = 1250\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 3750 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $100 \mu\text{M Mn} = 500\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4500 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $50 \mu\text{M Mn} = 250\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4750 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $25 \mu\text{M Mn} = 125\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4875 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $10 \mu\text{M Mn} = 50\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4950 \mu\text{l H}_2\text{O}$

Para el experimento de Manganeseo también se utilizó 20 μl de Nitrato de Manganeseo de una solución 1000 μM , para un nuevo volumen de 200 μl . obteniendo así concentraciones de 100 μM , 75 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 2.5 μM y 1 μM de manganeseo.

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 200\mu\text{L} \times C &= 20\mu\text{L} \times 1000\mu\text{M} \\ C &= 100 \mu\text{M} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_1 \times C_1 &= V_2 \times C_2 \\ 200\mu\text{L} \times C &= 20\mu\text{L} \times 750\mu\text{M} \\ C &= 75 \mu\text{M} \end{aligned}$$

El experimento constó de tres partes:

1. Evaluación de la viabilidad celular con $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
2. Evaluación de la viabilidad celular con $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$
3. Evaluación de sinergismo entre Pb y Mn

2.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR CON TRATAMIENTO PARA PLOMO Y PARA MANGANESO

El procedimiento para realizar el ensayo de viabilidad con tratamiento de plomo y de manganeso, es general para ambos. Se utilizaron placas de 96 pozos, de los cuales se utilizó la cantidad necesaria para el ensayo; la capacidad de cada pozo fue de 200 μ l, se trabajó con una cantidad total de 10 000 células por pozo.

La primera columna de la placa representó al blanco, la segunda representó al control y a partir de la tercera columna, a los experimentos de 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M y 100 μ M de Plomo y Manganeso respectivamente.

Para la columna del blanco, solo se agrega 200 μ l de medio blanco de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 1% de solución antibiótica, penicilina-estreptomicina. Para la columna del control se agregó 10 000 células por pozo con la cantidad necesaria de medio enriquecido de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 10% de FBS y 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina). Para las columnas restantes también se utilizó 10 000 células por pozo y se llevó a la incubadora a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂. Para una placa fue Nitrato de plomo y para la otra Nitrato de Manganeso.

Transcurridas las 48 horas, se llevó las placas a la cabina de bioseguridad y se procedió a retirar el medio y agregar 180 μ l de un nuevo medio, con la finalidad de reponer los nutrientes consumidos por las células, luego se agregó el tratamiento, con el objetivo de completar el volumen a 200 μ l por pozo, fueron 20 μ l de las diferentes concentraciones de Plomo (1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M y 100 μ M) y de igual manera para la placa de Mn. Posteriormente las placas fueron llevadas a la incubadora de CO₂ con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3A and 8.5A), a 37°C con 5% de CO₂ por un periodo de 72h, luego se llevaron a la cabina de bioseguridad, donde se retiró el medio y se agregó 190 μ l de medio enriquecido junto con 10 μ l de MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin). Posteriormente se llevó a la incubadora por 3h, luego se realizó la respectiva lectura de la placa a una longitud

de onda de 490 nm, en el Equipo Synergy HT (lector multimodal de microplacas) Bio-Tek® Synergy™ microplates).

2.4.1 DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR PARA EL SINERGISMO

En el procedimiento para realizar el ensayo de viabilidad para determinar si hay sinergismo entre plomo y de manganeso, se utilizaron placas de 96 pozos, de 200µl cada uno, con un total de 10 000 células por pozo.

La primera columna de la placa representó al blanco, la segunda representó al control y a partir de la tercera columna de una de las placas se colocó como tratamiento 10µl de Pb⁺² en todos los pozos y las concentraciones de Manganeso se incrementaron desde 0.5µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM y 10µM.

Para la otra placa se mantuvo fija la concentración de 10µM de manganeso y las concentraciones de plomo fueron desde 0.5 hasta 10µM.

Para la columna del blanco, solo se agrega 200µl de medio blanco de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 1% de solución antibiótica, penicilina-estreptomicina. Para la columna del control se agregó 10 000 células por pozo con la cantidad necesaria de medio enriquecido de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 10% de FBS y 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina). Se llevó a la incubadora a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂.

Transcurridas las 48 horas, se llevaron las placas a la cabina de bioseguridad, se retiró el medio y se agregó 180 µl de un nuevo medio, con la finalidad de reponer los nutrientes consumidos por las células, luego se agregó el tratamiento, como fue explicado previamente, obteniendo un volumen de 200µl por pozo. Posterior a ello, las placas fueron llevadas a la incubadora de CO₂ con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3A and 8.5A), a 37°C con 5% de CO₂ por un periodo de 72h, luego se llevaron a la cabina de bioseguridad, donde se retiró el medio y se agregó 190 µl de medio enriquecido junto con 10 µl de MTS

(CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin). Posteriormente se llevó a la incubadora por 3h, luego se realizó la respectiva lectura de la placa a una longitud de onda de 490 nm, en el Equipo Synergy HT (lector multimodal de microplacas) Bio-Tek® Synergy™ microplates).

Se trabajó a partir de una solución Stock de concentración 200µM de Plomo. Se prepararon 5 ml para cada concentración de Pb ⁺², diluyendo cada una con agua ultrapura y se obtuvieron las siguientes concentraciones 200 µM, 160 µM, 120 µM, 80 µM, 40 µM y 10 µM.

$$\begin{aligned} 250\mu\text{M} & \text{---} 1250\mu\text{L } 0.001\text{M Pb} \\ 200\mu\text{M} & \text{---} x \mu\text{L} \\ x & = 1000\mu\text{L } 0.001\text{M Pb} \end{aligned}$$

Diluciones de Plomo para el Sinergismo

- 200 µM Pb = 1000µl 0.01M Pb + 4000 µl H₂O
- 160 µM Pb = 800µl 0.01M Pb + 4200 µl H₂O
- 120 µM Pb = 600µl 0.01M Pb + 4400 µl H₂O
- 80 µM Pb = 400µl 0.01M Pb + 4600 µl H₂O
- 40 µM Pb = 200µl 0.01M Pb + 4800 µl H₂O
- 10 µM Pb = 50µl 0.01M Pb + 4950 µl H₂O

De igual forma se trabajó a partir de una solución Stock de concentración de 200µM de Manganeso, Se prepararon 5 ml para cada concentración de Mn ⁺², diluyendo cada una con agua ultrapura y se obtuvieron las siguientes concentraciones 200 µM, 160 µM, 120 µM, 80 µM, 40 µM y 10 µM.

Diluciones de Manganeso para el Sinergismo

- 200 µM Mn = 1000µl 0.001M Mn + 4000 µl H₂O

- $160 \mu\text{M Mn} = 800\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4200 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $120 \mu\text{M Mn} = 600\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4400 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $80 \mu\text{M Mn} = 400\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4600 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $40 \mu\text{M Mn} = 200\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4800 \mu\text{l H}_2\text{O}$
- $10 \mu\text{M Mn} = 50\mu\text{l } 0.001\text{M Mn} + 4950 \mu\text{l H}_2\text{O}$

Se utilizaron 10 μl de Nitrato de Plomo y 10 μl de Nitrato de Manganeso de las soluciones anteriores, 200 μM , 160 μM , 120 μM , 80 μM , 40 μM Y 10 μM para un volumen total de 200 μL , por lo se obtienen concentraciones de 10 μM , 8 μM , 6 μM , 4 μM , 2 μM y 0.5 μM de Plomo y también de Manganeso.

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$200\mu\text{L} \times C = 10\mu\text{L} \times 200\mu\text{M}$$

$$C = 10 \mu\text{M Pb}$$

Para la evaluación de sinergismo se realizaron dos experimentos:

1. En este procedimiento se mantuvo fija la concentración de plomo (10 μM), mientras que la concentración de manganeso se incrementó desde 0.5 μM hasta 10 μM , como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. 1. Concentraciones de Plomo para el sinergismo

| 10μM Pb con diferentes de Mn |
|---|
| 10 μM Pb + 10 μM Mn |
| 10 μM Pb + 8 μM Mn |
| 10 μM Pb + 6 μM Mn |
| 10 μM Pb + 4 μM Mn |
| 10 μM Pb + 2 μM Mn |
| 10 μM Pb + 0.5 μM Mn |
| 10 μM Pb + H ₂ O |

Fuente: Elaboración Propia

2. En este procedimiento se mantuvo fija la concentración de manganeso ($10\mu\text{M}$), mientras que la concentración de plomo se incrementó desde $0.5\mu\text{M}$ hasta $10\mu\text{M}$, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. 2. Concentraciones de Manganeso para el sinergismo

| $10\mu\text{M Mn}$ con diferentes de Pb |
|---|
| $10\mu\text{M Mn} + 10\mu\text{M Pb}$ |
| $10\mu\text{M Mn} + 8\mu\text{M Pb}$ |
| $10\mu\text{M Mn} + 6\mu\text{M Pb}$ |
| $10\mu\text{M Mn} + 4\mu\text{M Pb}$ |
| $10\mu\text{M Mn} + 2\mu\text{M Pb}$ |
| $10\mu\text{M Mn} + 0.5\mu\text{M Pb}$ |
| $10\mu\text{M Mn} + \text{H}_2\text{O}$ |

Fuente: Elaboración Propia

Luego para la primera columna que representa al blanco, solo se agrega $200\mu\text{l}$ de medio blanco de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 1% de solución antibiótica, penicilina-estreptomicina. Para la columna del control se agregó 10 000 células por pozo con la cantidad necesaria de medio enriquecido de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con 10% de FBS y 1% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina). Al igual que en los experimentos anteriores las columnas restantes contenían 10 000 células por pozo y se llevó a la incubadora a 37°C a una atmósfera de 5% CO_2 . La diferencia fue que en cada pozo se adicionaron $10\mu\text{l}$ de Nitrato de plomo y $10\mu\text{l}$ de Nitrato de Manganeso para comprobar la existencia de sinergismo entre ambos metales.

Pasadas las 48 horas se eliminó todo el contenido de los pozos y se agregó un nuevo medio, para reponer los nutrientes consumidos por las células, $200\mu\text{l}$ en el caso del control y $180\mu\text{l}$ para los demás experimentos, a los que luego se les adicionó el tratamiento, $10\mu\text{l}$ de Nitrato de Plomo y $10\mu\text{l}$ de Nitrato de Manganeso, en las diferentes concentraciones: $10\mu\text{M}$, $8\mu\text{M}$, $6\mu\text{M}$, $4\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$ y $0.5\mu\text{M}$). Posteriormente fue llevada a la incubadora de CO_2 con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-

Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3A and 8.5A), a 37°C, a una atmósfera de 5% de CO₂ por un periodo de 72h, luego se llevó las placas a la cabina de bioseguridad, donde se retiró el medio y se agregó 190 µl de medio enriquecido junto con 10 µl de MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin). Posteriormente se llevó a la incubadora por 3h, luego se realizó la respectiva lectura de la placa a una longitud de onda de 490 nm, en el Equipo Synergy HT (lector multimodal de microplacas) Bio-Tek® Synergy™ microplates).

2.5 DETERMINACIÓN DEL DAÑO CELULAR

Una de las maneras de determinar el daño celular es mediante la evaluación de la enzima LDH. Para este experimento se utilizó el kit Thermo Fisher Scientific Inc. De acuerdo al punto 6 (pág. 31) y a la figura 1.8, la presencia de LDH, incrementa la cantidad de NADH, que a su vez reducirá el azul de tetrazolio a formazán, es decir a mayor cantidad de formazán mayor cantidad de LDH.

Se trabajó de la siguiente manera: con un grupo control negativo, el cual contuvo 10 000 células/pocillo con 10 µL de agua ultrapura; un grupo control positivo con solo 10 000 células/pocillo y el grupo a tratar con: 5µL de Nitrato de Manganeso y 5µL de Nitrato de Plomo, en sus respectivas concentraciones 0.5µM de Mn con 0.5µM de Pb; 2µM de Mn con 2µM de Pb; 4µM de Mn con 4µM de Pb; 6µM de Mn con 6µM de Pb; 8µM de Mn con 8µM de Pb y 10µM de Mn con 10µM de Pb y se completó a un volumen de 100uL con el medio RPMI 1640 enriquecido.

Luego se llevó a la incubadora de CO₂ con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3A and 8.5A), a 37°C con 5% de CO₂, 95 % aire, por un periodo de 24 horas. Posteriormente, se agregó 100 µL del Buffer de lisis del kit de LDH Cytotoxicity Assay al grupo control positivo y se llevó nuevamente a la incubadora por 45 minutos bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se transfirió 50 µL de cada pocillo a otra microplaca. Luego se añadió 50 µL del reactivo de Mixtura del kit de LDH Cytotoxicity Assay y 50 µL del reactivo de solución stop del kit de LDH Cytotoxicity Assay a todos los grupos. Por último se llevó al equipo Synergy HT (lector multimodal de microplacas) Bio-Tek® Synergy™ microplates),

para su correspondiente lectura en un rango de longitud de onda de 490 nm a 680 nm y obtener sus correspondientes absorbancias.

Para hallar el porcentaje de citotoxicidad se aplicó la siguiente fórmula

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Células con tratamiento LDH} - \text{Control negativo LDH}}{\text{Control positivo LDH} - \text{Control negativo LDH}} \times 100$$

2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los resultados fueron expresados como media \pm SEM, además de las pruebas de significancia como la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples, a una $p < 0.05$, para esto se utilizó el software estadístico SigmaPlot 12.5.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. VIABILIDAD CELULAR

En la Fig. 3.1. se puede observar el crecimiento normal en condiciones óptimas, a 72 horas de incubación, de células de neuroblastoma de rata, en el que se utilizó necesariamente el medio enriquecido DMEM a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

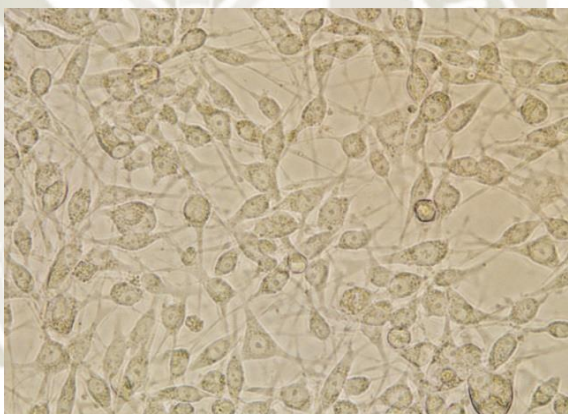


Figura 3. 1. Células B35 con medio enriquecido DMEM, sin tratamiento.

En la Tabla 3.1 se muestran los datos del conteo celular brindados por el Cellometer[®] Auto T4 (contador automático de células) Nexcelom Bioscience[®], antes de someter a las células a algún tratamiento.

Tabla 3. 1 Porcentaje de viabilidad célula

| Células Neuroblastoma de rata | |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Células/mL | % Viabilidad celular |
| 2.92 x 10 ⁶ | 96 |
| 6.34 x 10 ⁶ | 97 |
| 4.12 x 10 ⁶ | 92 |
| 6.32 x 10 ⁶ | 95 |
| 3.99 x 10 ⁶ | 94 |
| 4.76 x 10 ⁶ | 97 |
| 6.87 x 10 ⁶ | 95 |
| 7.11 x 10 ⁶ | 97 |
| 6.28 x 10 ⁶ | 97 |
| 6.53 x 10 ⁶ | 97 |
| Promedio | 96 |
| Desviación Estándar | 2 |

Fuente: Elaboración Propia

Como se puede observar, se obtuvieron porcentajes parejos, evidenciando resultados mayores al 90% de viabilidad celular.

2. PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR EN LAS CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA CON PLOMO

Como se puede observar en el Anexo 1, por repetición de ensayo de las células con tratamiento de plomo, se hizo un triplicado por cada grupo: grupo blanco, grupo control, grupo 1µM, grupo 2.5µM, grupo 5µM, grupo 10µM, grupo 25µM, grupo 50µM, grupo 75µM y grupo 100µM. Se sacó un promedio a las absorbancias del blanco 0.27; este valor del blanco fue sustraído a cada una de las absorbancias del control y las demás concentraciones. \bar{x} Blanco = 0.37 \bar{x} Control (C) = 0.89

$$\text{Control} - \bar{x} \text{ Blanco} = 0.89 - 0.37 = 0.52$$

$$\text{Control} - \bar{x} \text{ Blanco} = 0.89 - 0.37 = 0.52 \quad \bar{x} = 0.52$$

$$\text{Control} - \bar{x} \text{ Blanco} = 0.88 - 0.37 = 0.51$$

En En el caso de 1µM, tenemos absorbancias de 0.80; 0.79 y 0.79; a las que se les sustrae el promedio del Blanco, el nuevo valor fue llevado a una relación porcentual, donde el promedio del control fue tomado como el 100%.

Absorbancias a 1µM

$$0.86 - 0.37 = 0.49$$

$$0.86 - 0.37 = 0.49$$

$$0.85 - 0.37 = 0.48$$

$$0.52 \text{ — } 100\%$$

$$0.49 \text{ — } x\%$$

$$x = 94.23\%$$

Posterior a ello se obtuvo un nuevo cuadro, de solo valores porcentuales, de las 3 repeticiones (Tabla 3.2) con su respectiva desviación estándar y el % de error entre los datos. De este último cuadro, se tomó el promedio de porcentajes en relación a cada una de las concentraciones usadas para realizar los gráficos requeridos (Figura 3.2). Finalmente se obtuvo un promedio final (Tabla 3.3).

Tabla 3. 2. Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento de Plomo

| Pb | Control | 1µM | 2.5µM | 5µM | 10µM | 25µM | 50µM | 75µM | 100µM |
|----------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Trial 1 | 100 | 94.20 | 91.04 | 83.37 | 76.60 | 60.35 | 28.82 | 14.96 | 10.90 |
| Trial 2 | 100 | 94.42 | 91.12 | 82.11 | 77.79 | 60.20 | 28.57 | 15.43 | 10.74 |
| Trial 3 | 100 | 93.93 | 91.10 | 83.23 | 77.29 | 60.08 | 29.14 | 15.57 | 11.62 |
| \bar{x} | 100 | 94.18 | 91.09 | 82.90 | 77.23 | 60.21 | 28.84 | 15.32 | 11.09 |
| Desv. | 0.02 | 0.39 | 0.24 | 0.69 | 0.33 | 0.32 | 0.25 | 0.39 | 0.14 |
| SEM% | 0.01 | 0.22 | 0.14 | 0.40 | 0.19 | 0.18 | 0.16 | 0.22 | 0.08 |

Fuente: Elaboración Propia

En resumen se obtuvo el promedio de las viabilidades con tratamiento de plomo, lo cual se gráfica en la tabla 3.3.

Tabla 3. 3. Promedio del porcentaje de la viabilidad de Neuroblastoma a diferentes concentraciones de Plomo

| Control | 1 µM | 2.5µM | 5 µM | 10µM | 25µM | 50µM | 75µM | 100µM |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| 100 % | 94.18% | 91.09% | 82.90% | 77.23% | 59.51% | 31.47% | 21.98% | 15..05% |

Fuente: Elaboración Propia

Al tener un ANOVA (Anexo 1) utilizando el Software Sigma Plot 12.5 y al efectuar un Test de Tukey, que permite evaluar la semejanza o diferencia a un nivel de confianza de 95%, entre los diferentes grupos experimentales, se observa que a partir del grupo con una concentración mayor a 5 μM de Plomo ya existe una diferencia significativa respecto al grupo Control y concentraciones de Pb^{+2} menores.

Esto quiere decir que Pb^{+2} ocasiona disminución de la viabilidad celular, en células Neuroblastoma de rata, a partir de 5 μM .

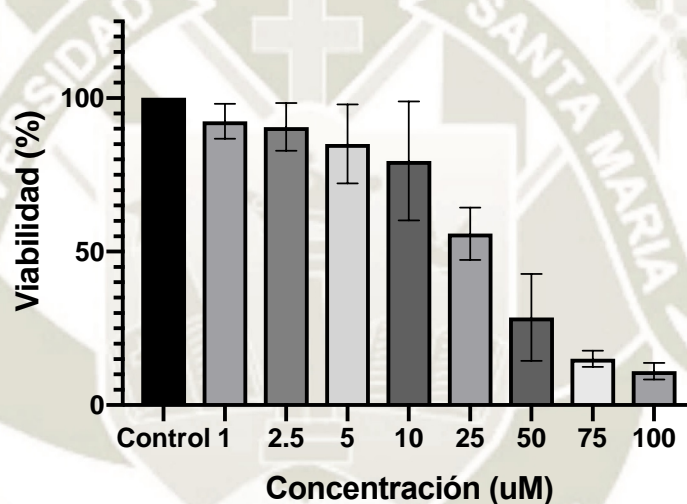


Figura 3. 2. Significancia del efecto de Plomo a diferentes concentraciones en células Neuroblastoma de rata B35

3. PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA CON MANGANESO

En este experimento se trabajó de la misma manera que con plomo, en la determinación del porcentaje de viabilidad celular en células de neuroblastoma de rata, en donde, en los ensayos con tratamiento de manganeso, se obtuvieron 3 absorbancias de cada grupo, ver Anexo 2, así tenemos grupo blanco, grupo control, grupo 1 μM , grupo 2.5 μM , grupo 5 μM , grupo 10 μM , grupo 25 μM , grupo 50 μM , grupo 75 μM y grupo 100 μM ., se sacó un promedio a las absorbancias del blanco, el nuevo valor del

blanco fue restado a cada una de las absorbancias del control y concentraciones. Este procedimiento se realizó por triplicado, cada uno de ellos fue llevado a una relación porcentual, donde el promedio del control fue tomado como el 100%. Posterior a ello se obtuvo un nuevo cuadro, de solo valores porcentuales, de las 3 repeticiones (Tabla 3.4) con su respectiva desviación estándar y el % de error entre los datos. De este último cuadro, se tomó el promedio de porcentajes en relación a cada una de las concentraciones usadas para realizar los gráficos requeridos (Figura 3.3). Finalmente se obtuvo un promedio final (Tabla 3.5).

Tabla 3. 4. Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento de Manganeso

| Mn | Control | 1µM | 2.5µM | 5µM | 10µM | 25µM | 50µM | 75µM | 100µM |
|----------------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Trial 1 | 100 | 104.39 | 95.11 | 91.23 | 81.75 | 58.85 | 31.60 | 21.77 | 15.07 |
| Trial 2 | 100 | 105.75 | 95.35 | 90.14 | 81.41 | 59.91 | 31.19 | 22.43 | 14.61 |
| Trial 3 | 100 | 104.62 | 95.50 | 90.26 | 81.46 | 59.77 | 31.64 | 21.74 | 15.42 |
| \bar{x} | 100 | 104.92 | 95.32 | 90.54 | 81.54 | 59.51 | 31.47 | 21.98 | 15.05 |
| Desv. | 0.02 | 0.49 | 0.02 | 0.66 | 0.53 | 0.67 | 0.58 | 0.49 | 0.65 |
| SEM% | 0.01 | 0.36 | 0.28 | 0.43 | 0.32 | 0.36 | 0.31 | 0.25 | 0.33 |

Fuente: Elaboración Propia.

Se obtuvo el promedio de las viabilidades con tratamiento de Manganeso, lo cual se gráfica en la tabla 3.5.

Tabla 3. 5. Promedio del porcentaje de la viabilidad de células B35 a diferentes concentraciones del Manganeso

| Control | 1 µM | 2.5µM | 5µM | 10µM | 25µM | 50µM | 75µM | 100µM |
|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 100% | 104.92% | 95.32% | 90.54% | 81.54% | 59.51% | 31.47% | 21.98% | 15.1% |

Fuente: Elaboración Propia.

Se realizó un ANOVA (Anexo 2) utilizando el Software Sigma Plot 12.5 y al efectuar un Test de Tukey, que permite evaluar la semejanza o diferencia a un nivel de confianza de 95%, entre los diferentes grupos experimentales, se observó que a partir del grupo con una concentración mayor a 10 µM de Manganeso se evidencia una diferencia significativa respecto al grupo Control y concentraciones de Mn⁺² mayores.

Esto quiere decir que Mn^{+2} ocasiona disminución de la viabilidad celular, en células Neuroblastoma de rata, a partir de $10 \mu M$, como se puede observar en la siguiente figura.

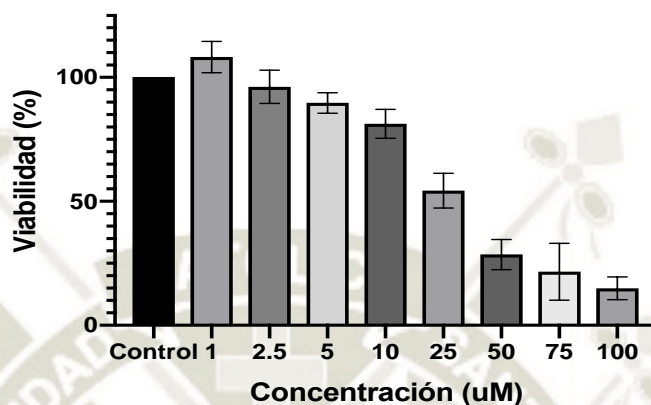


Figura 3. 3. Significancia del efecto del Manganese a diferentes concentraciones en células Neuroblastoma de rata B35

La Figura 3.4. muestra las células tratadas con concentraciones de $10 \mu M$ nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$ por un periodo de 72 horas transcurridas en la incubadora de CO_2 con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO_2 Incubators, Models 5.3A and 8.5A), a $37^\circ C$ con 5% de CO_2 . En la imagen se puede evidenciar claramente una disminución en el número de células vivas, en comparación con la Figura 3.1. donde se observa un crecimiento normal de las células, en condiciones óptimas.



Figura 3. 4. Células B35 con $10 \mu M$ de nitrato de plomo $Pb(NO_3)_2$

En la **Figura 3.5.** la diferencia fue el tratamiento, se utilizó 10 μM de nitrato de manganeso $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que las que fueron tratadas con el nitrato de plomo, como se muestra en la Figura 3.4.

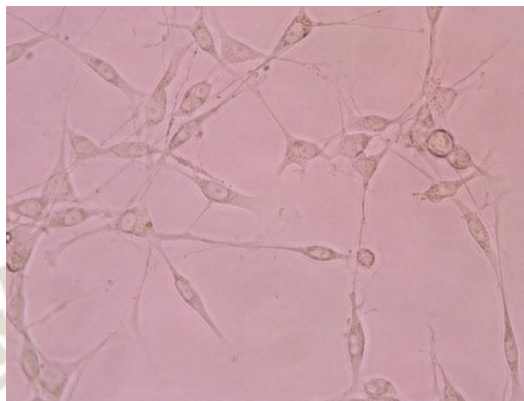


Figura 3. 5. Células B35 con 10 μM de nitrato de manganeso $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$

4. EVALUACIÓN DEL SINERGISMO ENTRE PLOMO y MANGANESO EN LA VIABILIDAD CELULAR

Para este procedimiento se mantuvo fija la concentración de plomo (10 μM), mientras que la concentración de manganeso se incrementó desde 0.5 μM hasta 10 μM , como se muestra en la tabla 2.1.

En el caso de manganeso también se mantuvo una concentración de 10 μM , mientras las concentraciones de plomo aumentaron desde 0.5 μM hasta 10 μM , ver tabla 2.2.

Este experimento se trabajó como se describe en el capítulo 2 punto 2.4.1. Al realizar las lecturas, se obtuvieron 3 absorbancias de cada grupo, ver Anexo 8 y Anexo 14, así tenemos grupo blanco, grupo control, grupo 0.5 μM , grupo 2 μM , grupo 4 μM , grupo 6 μM , grupo 8 μM , y grupo 10 μM . Los cálculos se realizaron como en todos los procedimientos anteriores, se obtuvo un promedio a las absorbancias del blanco, el nuevo valor del blanco fue restado a cada una de las absorbancias del control y concentraciones. Este procedimiento se realizó por triplicado, cada uno de ellos fue llevado a una relación porcentual, donde el promedio del control fue tomado como el 100%. Posterior a ello se obtuvo un nuevo cuadro, de solo valores porcentuales, de las

3 repeticiones (Tabla 3.6) con su respectiva desviación estándar y el % de error entre los datos. De este último cuadro, se tomó el promedio de porcentajes en relación a cada una de las concentraciones usadas para realizar el gráfico requeridos (Figura 3.6). Finalmente se obtuvo un promedio final (Tabla 3.7).

Los datos de la tabla 3.6 muestran que al combinar 10µM Pb⁺² con concentraciones de 0.5µM, 2µM, 4µM, 6µM, 8µM y 10µM de Mn⁺² la viabilidad celular decrece notablemente existiendo diferencia significativa de todas las concentraciones versus el control (Anexo 8), comparando los valores con la tabla 3.3 en donde en el caso de la concentración 10µM de Pb⁺² se obtiene una viabilidad de 77% y en este caso, al combinar 10µM de Pb⁺² con 10µM de Mn⁺² se obtiene una viabilidad de 55%.

Tabla 3. 6. Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Plomo y Manganeso

| 10µM Pb | Control | H ₂ O | 0.5 µM | 2 µM | 4 µM | 6 µM | 8 µM | 10 µM |
|-------------------|---------|------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pb trial 1 | 100 | 77.13 | 81.56 | 74.36 | 72.84 | 71.24 | 69.27 | 55.96 |
| Pb trial 2 | 100 | 77.84 | 81.21 | 73.98 | 72.30 | 71.19 | 68.97 | 54.30 |
| Pb trial 3 | 100 | 76.89 | 81.56 | 75.38 | 72.60 | 71.56 | 68.88 | 54.19 |
| Promedio | 100 | 77.18 | 81.44 | 74.00 | 72.68 | 71.49 | 69.93 | 54.56 |
| Desv. | 0.02 | 1.97 | 0.97 | 0.20 | 0.37 | 0.33 | 1.00 | 0.35 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.99 | 0.49 | 0.10 | 0.18 | 0.17 | 0.50 | 0.17 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 3. 7. Promedio de los porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Plomo y Manganeso

| CONTROL | H ₂ O | 0.5 µM | 2 µM | 4 µM | 6 µM | 8 µM | 10 µM |
|---------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 100 | 77.18% | 81.44% | 74.00% | 72.68% | 71.49% | 69.93% | 54.56% |

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 3.6 se ilustra que al combinar 10µM de Pb⁺² con concentraciones desde 0.5 hasta 10µM de Mn⁺² se observa que a una concentración de 0.5 µM Mn⁺² la viabilidad celular aumenta en células Neuroblastoma de rata, obteniendo un porcentaje

de 81%, mientras que la concentración de 0.5 μM de Pb^{+2} disminuye la viabilidad a un 76% como se puede ver en la tabla 3.9.

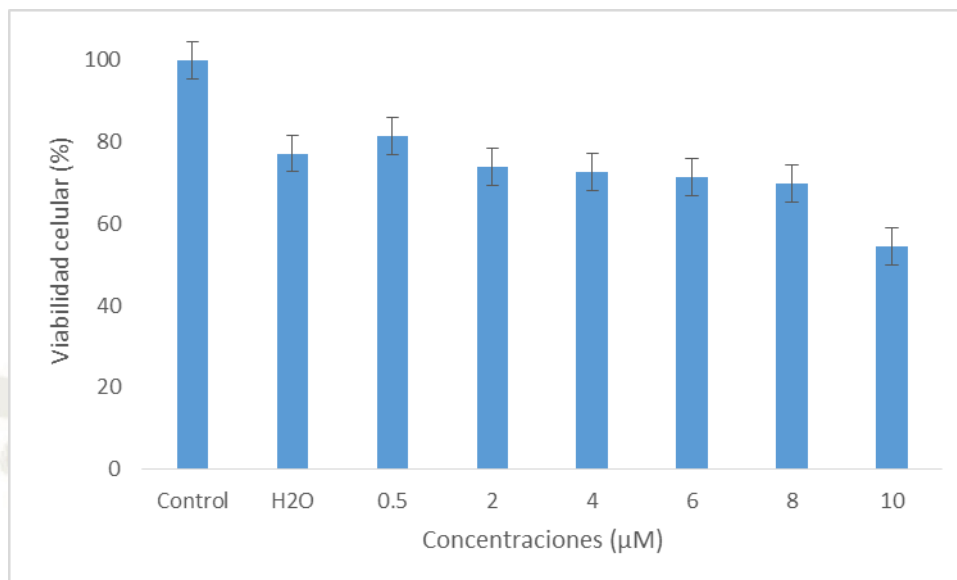


Figura 3. 6. Significancia del efecto de la combinación de 10 μM de Pb^{+2} con concentraciones desde 0.5 hasta 10 μM de Mn^{+2} en células Neuroblastoma de rata.

Los datos de la tabla 3.8 muestran que al combinar 10 μM Mn^{+2} con concentraciones de 0.5 μM , 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM y 10 μM de Pb^{+2} la viabilidad celular decrece notablemente existiendo diferencia significativa de todas las concentraciones versus el control (Anexo 14), comparando los valores con la tabla 3.5 en donde en el caso de la concentración 10 μM de Mn^{+2} se obtiene una viabilidad de 82% y en este caso, al combinar 10 μM de Mn^{+2} con 10 μM de Pb^{+2} se obtiene una viabilidad de 54.17%.

Tabla 3. 8. Porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Manganeso Y Plomo

| 10 μM Pb | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|---------------------|---------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Mn trial | 100 | 84.70 | 76.93 | 74.23 | 73.27 | 72.31 | 70.25 | 54.17 |
| Mn trial | 100 | 86.14 | 75.93 | 74.25 | 73.20 | 72.19 | 71.39 | 55.36 |
| Mn trial | 100 | 84.66 | 75.95 | 73.74 | 72.86 | 71.70 | 70.49 | 55.56 |
| Promedio | 100 | 85.16 | 76.27 | 74.07 | 73.11 | 72.07 | 70.71 | 55.03 |
| Desv. | 0.01 | 0.22 | 0.18 | 0.12 | 0.10 | 0.13 | 0.17 | 0.11 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.11 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.10 | 0.06 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 3. 9. Promedio de los porcentajes de viabilidad en células con tratamiento para el sinergismo de Manganeso y Plomo

| CONTROL | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|---------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 100 | 85.16% | 76.27% | 74.07% | 73.11% | 72.07% | 70.71% | 55.03% |

Fuente: Elaboración Propia

En la figura 3.7 se ilustra que al combinar 10μM de Mn⁺² con concentraciones desde 0.5 hasta 10μM de Pb⁺² la viabilidad celular disminuye en todos los casos, en células Neuroblastoma de rata, corroborado por un ANOVA (Anexo 14).

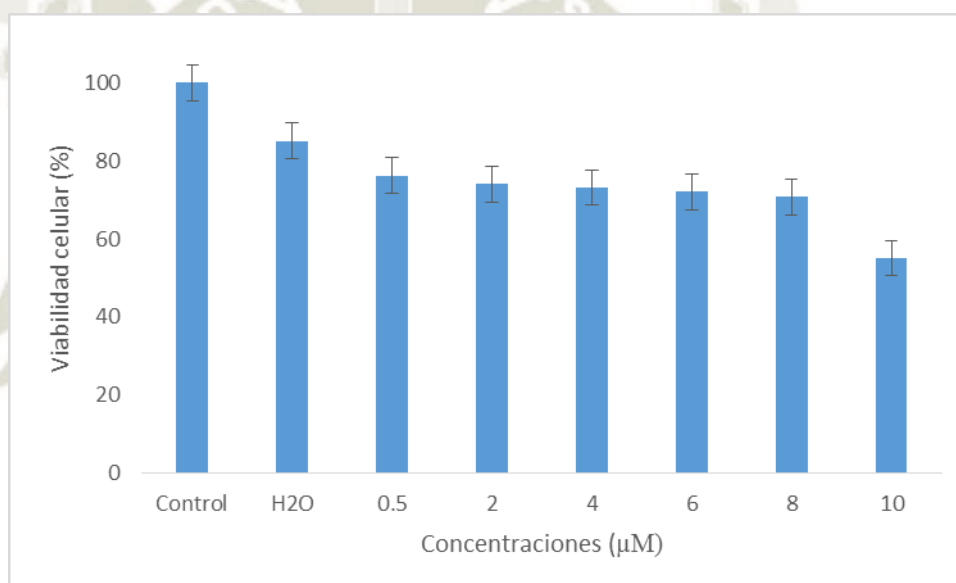


Figura 3. 7. Significancia del efecto de la combinación de 10μM de Mn⁺² con concentraciones desde 0.5 hasta 10μM de Pb⁺² en células Neuroblastoma de rata.

En investigaciones realizadas anteriormente, en ratas, que fueron expuestas a Manganeso y Plomo, y poblaciones humanas que viven en zonas que presentan elevadas concentraciones de dichos metales; se evidenció que la combinación de Pb y Mn produce un efecto sinérgico positivo en la disminución de la viabilidad celular. Aunque todavía no se conoce el mecanismo de acción de la interacción entre estos metales.⁷¹⁻⁷³

Tanto en la figura 3.8, 3.9 y 3.10, las células se trataron con concentraciones de $10 \mu\text{M}$ nitrato de plomo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ y $10 \mu\text{M}$ nitrato de manganeso $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$, por un periodo de 48, 72 y 120 horas respectivamente, en la incubadora de CO_2 con chaqueta de agua VWR® Symphony™ Air-Jacketed CO_2 Incubators, Models 5.3A and 8.5A, 37°C a una atmósfera de 5% de CO_2 ,

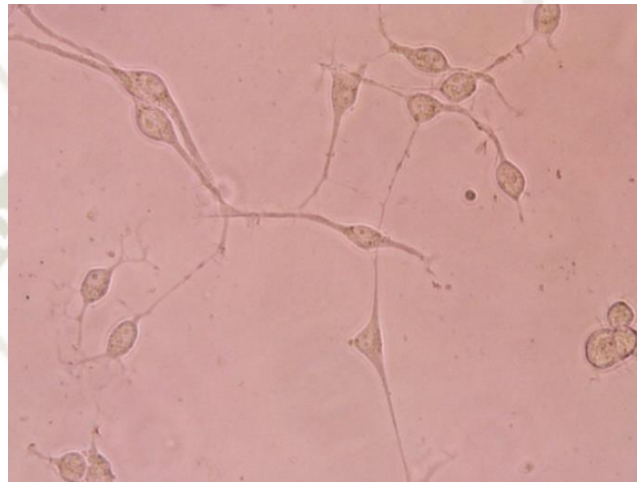


Figura 3. 8. Células B35 con ambos tratamientos a 48 horas de incubación

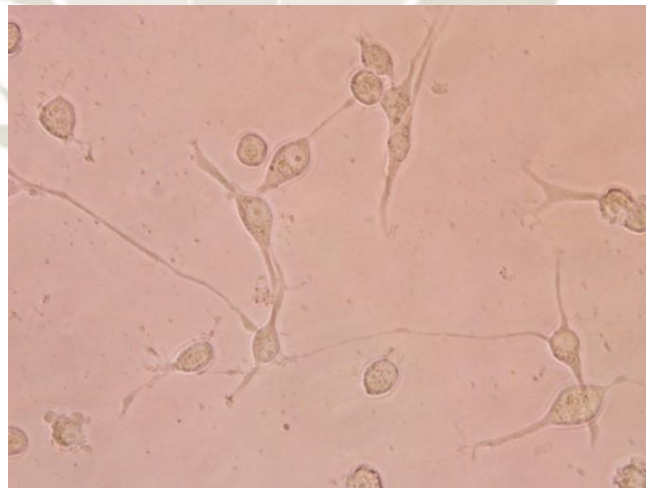


Figura 3. 9. Células B35 con ambos tratamientos a 72 horas de incubación



Figura 3. 10. Células B35 con ambos tratamientos a 120 horas de incubación

Se puede observar una disminución en el número de células y también a medida que pasan las horas, una disminución en la longitud de sus axones, lo cual podría evidenciar así un efecto neurotóxico mayor que tan solo con la presencia de plomo y manganeso por separado.

Estudios realizados en ratas que fueron expuestas a Manganeso y Plomo, en poblaciones humanas que representan una alta exposición a dichos metales, reportaron que la combinación de estos metales produce un efecto sinérgico.^{71,72,73,74} Esta interacción podría deberse a que ambos metales alteran similares neurotransmisores; sin embargo, el mecanismo de esta interacción aún se encuentra en investigación.

5. DETERMINACIÓN DE LDH

En la Tabla 3.10 se muestra los resultados Anexo 15. Se utilizó el kit de LDH Thermo Fisher, aplicando el tratamiento en las células, como se explica en el capítulo 2.5. Las concentraciones que se utilizaron fueron 0.5 μ M de Mn con 0.5 μ M de Pb; 2 μ M de Mn con 2 μ M de Pb; 4 μ M de Mn con 4 μ M de Pb; 6 μ M de Mn con 6 μ M de Pb; 8 μ M de Mn con 8 μ M de Pb y 10 μ M de Mn con 10 μ M de Pb. Al igual que los anteriores ensayos, este también se realizó por triplicado.

Tabla 3. 10. Absorbancias obtenidas en los tres ensayos de Citotoxicidad

| C(-) | C(+) | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|------|------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 0.68 | 2.3 | 0.79 | 0.94 | 0.99 | 1.06 | 1.09 | 1.42 |
| 0.71 | 2.25 | 0.8 | 0.93 | 0.99 | 1.05 | 1.08 | 1.40 |
| 0.62 | 2.3 | 0.72 | 0.87 | 0.92 | 1.00 | 1.03 | 1.39 |

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 3. 11. Promedio de las absorbancias para el ensayo de citotoxicidad

| C(-) | C(+) | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|------|------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 0.67 | 2.28 | 0.77 | 0.91 | 0.97 | 1.04 | 1.07 | 1.40 |

Fuente: Elaboración Propia

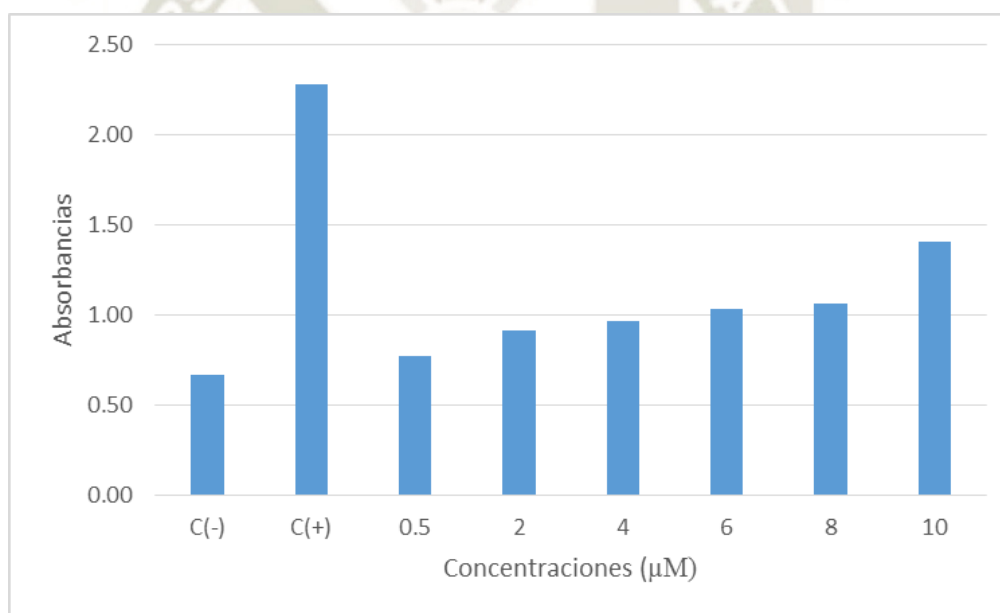


Figura 3. 11. Promedio de las absorbancias para el ensayo de citotoxicidad, utilizando la combinación de concentraciones 0.5 μM de Mn con 0.5 μM de Pb; 2 μM de Mn con 2 μM de Pb; 4 μM de Mn con 4 μM de Pb; 6 μM de Mn con 6 μM de Pb; 8 μM de Mn con 8 μM de Pb y 10 μM de Mn con 10 μM en células Neuroblastoma de rata.

Para la obtención de datos porcentuales de citotoxicidad, se utilizó la fórmula del protocolo del kit. Pág 44.

Tabla 3. 12. Porcentajes de citotoxicidad en células Neuroblastoma de rata tratadas con Plomo y Manganeso.

| | CONTROL(+) | 0.5 µM | 2 µM | 4 µM | 6 µM | 8 µM | 10 µM |
|-----------------------|-------------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Porcentaje (%) | 100 | 6.17 | 15.43 | 18.51 | 22.83 | 24.69 | 45.06 |
| | 100 | 5.84 | 14.93 | 18.18 | 22.07 | 24.02 | 44.80 |
| | 100 | 5.95 | 14.88 | 17.85 | 22.61 | 24.40 | 44.04 |
| Promedio | 100 | 5.98 | 15.08 | 18.18 | 22.50 | 24.37 | 44.63 |
| Desv. | 0.02 | 0.47 | 0.09 | 0.22 | 0.53 | 0.09 | 0.39 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.24 | 0.05 | 0.11 | 0.27 | 0.04 | 0.19 |

Fuente: Elaboración Propia

Se puede observar que combinando 10µM de Mn con 10µM de Pb se obtiene una citotoxicidad de 44.63%; al combinar 8µM de Mn con 8µM de Pb un 24.37%; al combinar 6µM de Mn con 6µM de Pb un 22.50%; al combinar 4µM de Mn con 4µM de Pb un 18.18%; al combinar 2µM de Mn con 2µM de Pb un 15.08% y al combinar 0.5µM de Mn con 0.5µM de Pb un 5.98%.

En la tabla 3.13. se puede observar el promedio de los porcentajes de citotoxicidad con el tratamiento previamente adicionado

Tabla 3. 13. Promedio del porcentaje de la determinación de citotoxicidad en células Neuroblastoma de rata tratadas con Plomo y Manganeso.

| CONTROL | 0.5 µM Pb-Mn | 2 µM Pb-Mn | 4 µM Pb-Mn | 6 µM Pb-Mn | 8 µM Pb-Mn | 10 µM Pb-Mn |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 100 | 5.98% | 15.08% | 18.18% | 22.50% | 24.37% | 44.63% |

Fuente: Elaboración Propia

Este resultado, contrasta con el resultado del sinergismo, demostrando la efectividad de la combinación entre el Manganeso y Plomo y a la vez evidenciando el daño celular originado por ambos metales, se puede observar que una concentración de 10µM de Plomo con 10µM de Manganeso evidencia 44.63% de citotoxicidad, mientras que en la Tabla 3.7 se muestra que al combinar estas mismas concentraciones obtenemos una viabilidad de 54.56%. Por lo que se puede decir que al evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad, ambos metales son considerados neurotóxicos individualmente y en combinación, en células de neuroblastoma de rata.

CONCLUSIONES

1. El Pb^{+2} en concentraciones mayores a $5 \mu M$, muestra disminución significativa ($p < 0.05$) de viabilidad celular en neuroblastoma de rata respecto a un grupo control, mientras que el Mn^{+2} existe una disminución significativa de la viabilidad a concentraciones mayores de $10 \mu M$.
2. A concentraciones fijas de Pb^{+2} ($10 \mu M$) con concentraciones crecientes de (de 0.5 a $10 \mu M$) de Mn^{+2} se evidencia que a partir de $2 \mu M$ hay disminución de viabilidad celular, en el caso de concentraciones fijas de Mn^{+2} ($10 \mu M$) y concentraciones crecientes de (de 0.5 a $10 \mu M$) de Pb^{+2} , se evidencia que la disminución de la viabilidad celular fue a partir de $0.5 \mu M$.
3. Al realizar el ensayo de citotoxicidad se pudo observar una mayor liberación de LDH, corroborando así daño en la membrana celular, pudiendo ser perjudicial para nuestra salud la presencia de estos metales en combinación.

SUGERENCIAS

1. Realizar más estudios para conocer mejor el daño neurotóxico ocasionado por el sinergismo de plomo y manganeso.
2. Desarrollar estudios con estos metales en otras líneas celulares para comparar sus efectos.
3. Extender los estudios con otros metales pesados altamente contaminantes en nuestro país.
4. Analizar un plan de reemplazo o disminución de estos metales pesados, por otros que no causen daños a nuestra salud.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cordoba D. Toxicología. Cuarta ed. Bogota. 2000.
2. Katzung, B. Farmacología básica y clínica. Décima edición. Editorial El Manual Moderno. México. 2005.
3. Mason L; Harp J; Han D. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity 2007.
4. April P. Neal; Tomas R. Guilarte. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. 2012.
5. Lisa H Mason; Jordan P; Dong Y. Pb. Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. 2014.
6. Bressler J, Kim KA, Chakraborti T, Goldstein G. Mecanismos moleculares de la neurotoxicidad del plomo. *Neurochem.* 1999; 24 : 595-600.
7. Gutiérrez Aranibar R. toxicología y química legal. UCSM. Arequipa-Perú. 2012.
8. Gutiérrez Aranibar R. protocolo para el manejo de intoxicaciones agudas y crónicas causadas por metales pesados e insecticidas. UCSM. Arequipa-Perú. 2012.
9. Comité consultivo para la prevención de la intoxicación por plomo en la infancia (ACCLPP). CDC. 2012.
10. Caban-Holt A, Mattingly M, Cooper G, Schmitt FA. Neurodegenerative memory disorders: a potential role of environmental toxins. *Neurologic Clinics.* 2005;23(2):485–521.
11. 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.
12. Mahaffey KR. Factores que modifican la susceptibilidad a la toxicidad del plomo. En: Mahaffey MR, editor. *Plomo dietético y ambiental: efectos en la salud humana.* Nueva York, NY, EE. UU : Elsevier; 1985.
13. Comité consultivo para la prevención de la intoxicación por plomo en la infancia (ACCLPP). CDC. 2012.
14. Coloma Dongo F. Biotecnología vegetal: cultivo in vitro de tejidos vegetales. Arequipa- Perú. 2013.

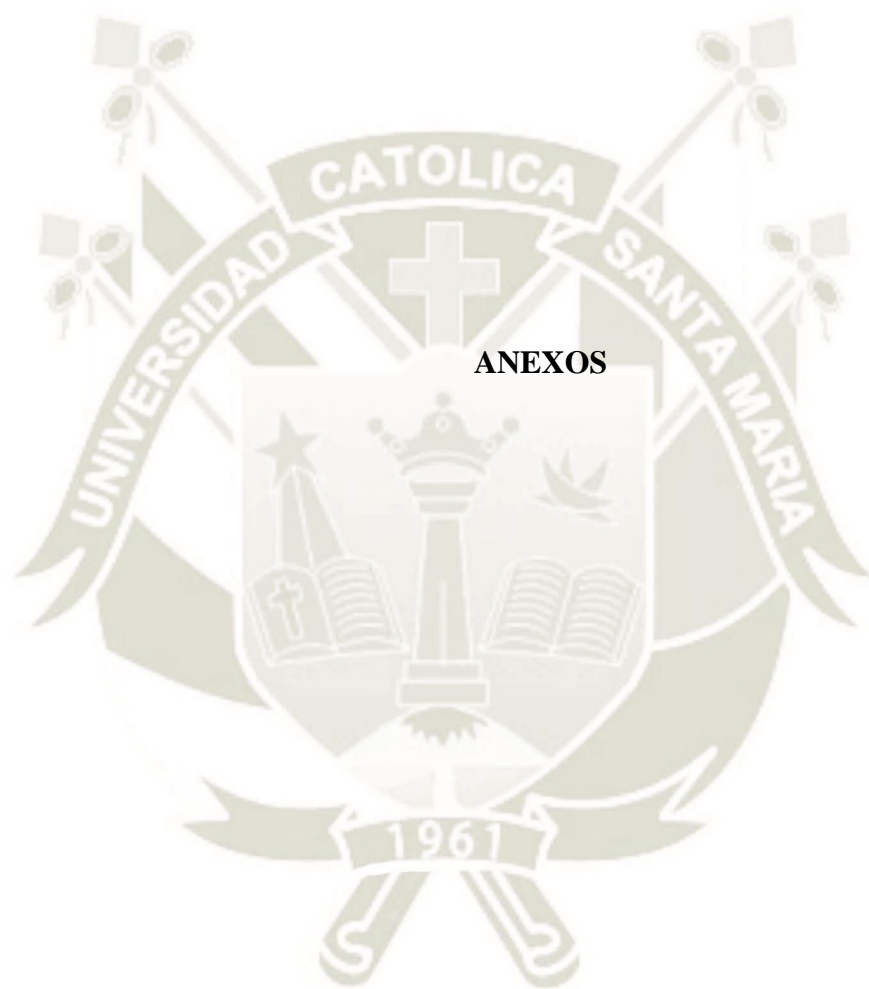
15. Cornelis R. Manual de especiación elemental II: especies en el medio ambiente, alimentos, medicina y salud ocupacional. Wiley; 2005.
16. Guidotti TL, Ragain L. Proteger a los niños de la exposición tóxica: tres estrategias. *Pediatr Clin North Am.*2007; 54 : 227-235.
17. Vij AG. Efectos hemopoyéticos, hemostáticos y mutagénicos del plomo y posible prevención por parte del zinc y la vitamina C. *Al Ameen J Med Sci.* 2009; 2 : 27-36.
18. Flora SJS. Aspectos estructurales, químicos y biológicos de los antioxidantes para estrategias contra la exposición a metales y metaloides. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2 : 191-206.
19. Saleh HA, El-Aziz GA, El-Fark MM, El-Gohary M. Efecto de la exposición materna al plomo en la osificación craneofacial en fetos de rata y el papel de la terapia antioxidante. *Anat Histol Embryol.* 2009; 38 : 392-399.
20. Piomelli S. envenenamiento por plomo en la infancia. *Pediatr Clin North Am.* 2002; 49 : 1285-1304
21. Ahamed M, Siddiqui MKJ. Bajo nivel de exposición al plomo y estrés oxidativo: opiniones actuales. *Clin Chim Acta.* 2007; 383 : 57-64.
22. Jangid AP, John PJ, Yadav D, Mishra S, Sharma P. Impacto de la exposición crónica al plomo en marcadores biológicos seleccionados.
23. Navas-Acien A, Guallar E, Silbergeld EK, Rothenberg SJ. Exposición al plomo y enfermedad cardiovascular: una revisión sistemática. *Environ Health Perspect.* 2007; 115 : 472-482.
24. Grant LD. Tóxicos ambientales. John Wiley & Sons, Inc .; 2008. Plomo y compuestos; pp. 757-809.
25. Rastogi SK. Efectos renales de la exposición al plomo ambiental y ocupacional. *Indian J Occup Environ Med.* 2008; 12 : 103-106.
26. Garza A, Vega R, Soto E. Mecanismos celulares de neurotoxicidad del plomo. *Med Sci Monit.* 2006; 12 : RA57-65.
27. Bellinger DC, Needleman HL, Eden AN, et al. Deterioro intelectual y niveles de plomo en la sangre. *The New England Journal of Medicine* . 2003; 349 (5): 500-502.

28. Jones RL, Homa DM, Meyer PA, y col. Tendencias en los niveles de plomo en sangre y análisis de plomo en sangre en niños de EE. UU. De entre 1 y 5 años, 2009.
29. Bellinger DC, Needleman HL, Eden AN, et al. Deterioro intelectual y niveles de plomo en la sangre. *The New England Journal of Medicine* . 2003
30. Lanphear BP, Hornung R, Khoury J, y col. Bajo nivel de exposición ambiental al plomo y función intelectual de los niños: un análisis internacional combinado. *Perspectivas de salud ambiental* . 2005
31. Keen CL, Ensunsa JL, Watson MH, et al. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology*. 1999;20(2-3):213-223.
32. Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology*. 1999;20(2-3):227-238.
33. Norose N, Terai M, Norose K. Deficiencia de manganeso en un niño con síndrome de intestino muy corto que recibe nutrición parenteral a largo plazo. *J Trace Elem Exp Med*. 2000.
34. Kies C. Bioavailability of manganese. In: Klimis-Tavantzis DL, ed. *Manganese in health and disease*. Boca Raton: CRC Press, Inc; 1994:39-58.
35. Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology*. 1999;20(2-3):227-238.
36. Aschner M, Aschner JL. Manganese neurotoxicity: cellular effects and blood-brain barrier transport. *Neurosci Biobehav Rev*. 1991;15(3):333-340.
37. Aschner M. Manganese: brain transport and emerging research needs. *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 3:429-432.
38. Dobson AW, Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1012:115-128.
39. Zayed J, Thibault C, Gareau L, Kennedy G. Airborne manganese particulates and methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) at selected outdoor sites in Montreal. *Neurotoxicology*. 1999;20(2-3):151-157.
40. Decreto Supremo N° 024-2011-EM, Lima , Perú, 13 de mayo del 2011.
41. Keen CL, Zidenberg-Cherr S. Manganese toxicity in humans and experimental animals. In: Klimis-Tavantzis DL, ed. *Manganese in health and disease*. Boca Raton: CRC Press, Inc; 1994:193-205.

42. EPA Office of Water. Current Drinking Water Standards. Environmental Protection Agency 2008.
43. Davis JM. Methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl: health risk uncertainties and research directions. *Environ Health Perspect.* 1998;106 Suppl 1:191-201.
44. Forrellat Barrios, Mariela; Gautier du Défaix Gómez, Hortensia; Fernández Delgado, Norma. Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2000;16(3):149-60 (La Habana, Cuba). 2000
45. Forbes J, Gros P (2003) Iron, manganese, and cobalt transport expressed at the plasma membrane. *Blood* 102: 1884-1892
46. Sikk K, Haldre S, Aquilonius SM, Taba P. Manganese-induced Parkinsonism due to ephedrone abuse. *Parkinsons Dis.* 2011;2011:86-90.
47. Garcia, S. J., Gellein, K., Syversen, T., & Aschner, M. (2007). Iron deficient and manganese supplemented diets alter metals and transporters in the developing rat brain. *Toxicological Sciences*, 95, 205–214.
48. Dydak U, Jiang YM, Long LL, et al. In vivo measurement of brain GABA concentrations by magnetic resonance spectroscopy in smelters occupationally exposed to manganese. *Environ Health Perspect.* 2011;119(2):219-24.
49. Klaassen CD. Biliary excretion of metals. *Drug Metab Rev.* 1976;5(2):165-96.
50. Stastny D, Vogel RS, Picciano MF. Manganese intake and serum manganese intake of human milk-fed and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr.* 1984; 39:872-8.
51. Omokhodion FO, Howard JM. Trace elements in the sweat of acclimatized persons. *Clin Chim Acta.* 1994;231(1):23-8.
52. Jiang YM, Mo XA, Du FQ, et al. Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: a case of 17-year follow-up study. *J Occup Environ Med.* 2006;48(6):644-9
53. Tuschl K, Mills PB, Clayton PT. Manganese and the brain. *Int Rev Neurobiol.* 2013;110:277-312
54. Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed.* 2004;17(8):544-53.
55. Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 11 ava. ed. Mexico. 2007.

56. Gorojod R; Alaimo A; Miglietta E; Villarreal A; Ramos A; Kotler M. Manganese induces mitochondrial dynamics impairment and apoptotic cell death: A study in human glial cells. ELSEVIER. 2013.
57. Goyer Robert A. Results of Lead Research: Prenatal Exposure and Neurological Consequences. Natonal Institute of Environmental Health Sciences, Research USA. 1996.
58. Invitrogen, GIBCO®, Cell Culture Basics Handbook.
59. Karp G. Biología celular y molecular conceptos y experimentos 6ta ed. Mexico. 2011.
60. Michalke B; Fernsebner K. New insights into manganese toxicity and speciation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2013.
61. 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).
62. 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.
63. 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.
64. Bautista, E.; Vergara, P.; Segovia, J. Iron-induced oxidative stress activates 75 AKT and ERK1/2 and decreases Dyrk1B and PRMT1 in neuroblastoma SHSY5Y cells. J. Trace Elem. Med. Biol. 2016, 34, 62–69.
65. 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.
66. WHO. Childhood Lead Poisoning. World Heal. Organ. 2010
67. Thermo Fisher Scientific Inc. LDH Cytotoxicity Assay. 2014
68. 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.

69. 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.
70. 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.
71. Chandra, S. V; Murthy, R. .; Saxena, D. .; LAL, B. Effects of preand postnatal combined exposure to Pb and Mn on brain development in rats. *Ind. Health* 1983, 21 (4), 273–279.
72. Claus Henn, B.; Schnaas, L.; Ettinger, A. S.; Schwartz, J.; Lamadrid-Figueroa, H.; Hernández-Avila, M.; Amarasiriwardena, 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.



ANEXO 1
EFFECTO DEL Pb²⁺, Pb (NO₃)₂ EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Lectura de Absorbancias – Trial 1

| | Blanco | Control | 1 μM | 2.5 μM | 5 μM | 10 μM | 25 μM | 50 μM | 75μM | 100 μM |
|-----------------------|---------------|----------------|-------------|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|---------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.37 | 0.89 | 0.86 | 0.85 | 0.80 | 0.78 | 0.69 | 0.51 | 0.45 | 0.43 |
| | 0.37 | 0.89 | 0.86 | 0.84 | 0.81 | 0.75 | 0.68 | 0.52 | 0.45 | 0.42 |
| | 0.36 | 0.88 | 0.85 | 0.84 | 0.80 | 0.77 | 0.68 | 0.52 | 0.45 | 0.43 |
| Promedio | 0.37 | 0.89 | 0.86 | 0.84 | 0.80 | 0.77 | 0.68 | 0.52 | 0.45 | 0.43 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.05 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.09 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| SEM (%) | 1 | 3 | 1 | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Lectura de Absorbancias – Trial 2

| | Blanco | Control | 1 μM | 2.5 μM | 5 μM | 10 μM | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100μM |
|-----------------------|---------------|----------------|-------------|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| REPETICIÓN 1 | 0.28 | 0.83 | 0.80 | 0.78 | 0.72 | 0.70 | 0.61 | 0.43 | 0.35 | 0.34 |
| | 0.26 | 0.82 | 0.79 | 0.78 | 0.73 | 0.70 | 0.60 | 0.43 | 0.36 | 0.33 |
| | 0.26 | 0.83 | 0.79 | 0.78 | 0.73 | 0.71 | 0.61 | 0.43 | 0.36 | 0.33 |
| Promedio | 0.27 | 0.83 | 0.79 | 0.78 | 0.73 | 0.70 | 0.61 | 0.43 | 0.36 | 0.33 |
| Desv. Estandar | 0.02 | 0.05 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.00 | 0.02 |
| SEM (%) | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Lectura de absorbancias – Trial 3

| | Blanco | Control | 1 μM | 2.5 μM | 5 μM | 10 μM | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |
|-----------------------|--------|---------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| REPETICIÓN 3 | 0.32 | 0.83 | 0.78 | 0.76 | 0.70 | 0.65 | 0.50 | 0.24 | 0.12 | 0.10 |
| | 0.33 | 0.84 | 0.79 | 0.76 | 0.70 | 0.64 | 0.51 | 0.24 | 0.13 | 0.10 |
| | 0.33 | 0.83 | 0.78 | 0.75 | 0.70 | 0.64 | 0.50 | 0.25 | 0.13 | 0.09 |
| Promedio | 0.33 | 0.84 | 0.78 | 0.76 | 0.70 | 0.65 | 0.50 | 0.24 | 0.13 | 0.10 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| SEM (%) | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Pb | Control | 1 μM | 2.5 μM | 5 μM | 10 μM | 25 μM | 50 μM | 75 μM | 100 μM |
|-----------------------|---------|-----------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 94.20 | 91.04 | 83.38 | 76.60 | 60.35 | 28.82 | 14.96 | 10.90 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 94.18 | 91.12 | 82.11 | 77.79 | 60.20 | 28.57 | 15.43 | 10.74 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 93.93 | 91.10 | 83.23 | 77.29 | 60.08 | 29.14 | 15.57 | 11.62 |
| Promedio | 100 | 94.10 | 91.09 | 82.90 | 77.23 | 60.21 | 28.84 | 15.32 | 11.09 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.14 | 0.39 | 0.69 | 0.31 | 0.33 | 0.25 | 0.24 | 0.39 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.08 | 0.22 | 0.40 | 0.18 | 0.19 | 0.16 | 0.14 | 0.22 |

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

| Group Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|------------|---|---------|---------|---------|-------|
| Control | 3 | 0 | 100.000 | 0.001 | 0.001 |
| 100µM | 3 | 0 | 14.576 | 0.144 | 0.087 |
| 75 µM | 3 | 0 | 28.772 | 0.397 | 0.228 |
| 50 µM | 3 | 0 | 60.401 | 0.668 | 0.403 |
| 25 µM | 3 | 0 | 56.371 | 0.313 | 0.182 |
| 10 µM | 3 | 0 | 76.514 | 0.332 | 0.194 |
| 5 µM | 3 | 0 | 82.566 | 0.454 | 0.163 |
| 2.5 µM | 3 | 0 | 91.050 | 0.238 | 0.143 |
| 1 µM | 3 | 0 | 94.110 | 0.393 | 0.223 |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

| Comparison | Diff of Means | q | P<0.050 |
|-------------------|---------------|--------|---------|
| Control vs. 100µM | 43.271 | 10.225 | Yes |
| Control vs. 75µM | 31.326 | 7.402 | Yes |
| Control vs. 50µM | 22.319 | 5.274 | Yes |
| Control vs. 25µM | 19.119 | 3.100 | Yes |
| Control vs. 10µM | 15.491 | 1.770 | Yes |
| Control vs. 5µM | 13.366 | 3.631 | Yes |
| Control vs. 2.5µM | 11.630 | 3.149 | No |
| Control vs. 1µM | 10.641 | 10.076 | No |

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

ANEXO 2
EFFECTO DEL Mn ⁺², Mn (NO₃)₂ EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Lectura de Absorbancias – Trial 1

| | Blanco | Control | 100µM | 75µM | 50µM | 25µM | 10µM | 5µM | 2.5µM | 1µM |
|-----------------------|---------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 0.41 | 1.25 | 0.53 | 0.59 | 0.67 | 0.90 | 1.10 | 1.18 | 1.22 | 1.29 |
| | 0.40 | 1.26 | 0.53 | 0.59 | 0.68 | 0.91 | 1.11 | 1.18 | 1.21 | 1.30 |
| | 0.40 | 1.25 | 0.54 | 0.58 | 0.67 | 0.90 | 1.10 | 1.17 | 1.21 | 1.29 |
| Promedio | 0.40 | 1.25 | 0.53 | 0.59 | 0.67 | 0.90 | 1.10 | 1.18 | 1.21 | 1.29 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.06 | 0.06 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.03 |
| SEM (%) | 1 | 3 | 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Lectura de Absorbancias – Trial 2

| | Blanco | Control | 100µM | 75µM | 50µM | 25µM | 10µM | 5µM | 2.5µM | 1µM |
|-----------------------|---------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.49 | 1.47 | 0.63 | 0.70 | 0.79 | 1.08 | 1.30 | 1.38 | 1.43 | 1.53 |
| | 0.49 | 1.49 | 0.63 | 0.70 | 0.78 | 1.08 | 1.29 | 1.38 | 1.42 | 1.54 |
| | 0.46 | 1.47 | 0.62 | 0.71 | 0.80 | 1.07 | 1.29 | 1.38 | 1.43 | 1.53 |
| Promedio | 0.48 | 1.48 | 0.63 | 0.70 | 0.79 | 1.08 | 1.29 | 1.38 | 1.43 | 1.53 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.14 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| SEM (%) | 2 | 2 | 1 | 2 | 5 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Lectura de Absorbancias – Trial 3

| | Blanco | Control | 100µM | 75µM | 50µM | 25µM | 10µM | 5µM | 2.5µM | 1µM |
|-----------------------|--------|---------|-------|------|------|------|------|------|-------|------|
| REPETICIÓN 3 | 0.47 | 1.31 | 0.61 | 0.65 | 0.74 | 0.98 | 1.15 | 1.22 | 1.26 | 1.34 |
| | 0.48 | 1.30 | 0.61 | 0.66 | 0.74 | 0.97 | 1.15 | 1.21 | 1.27 | 1.34 |
| | 0.48 | 1.29 | 0.60 | 0.66 | 0.73 | 0.98 | 1.14 | 1.22 | 1.26 | 1.33 |
| Promedio | 0.48 | 1.30 | 0.61 | 0.66 | 0.74 | 0.98 | 1.15 | 1.22 | 1.26 | 1.34 |
| Desv. Estándar | 0.01 | 0.15 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.05 |
| SEM (%) | 0 | 5 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 4 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | Control | 100 µM | 75 µM | 50 µM | 25 µM | 10 µM | 5 µM | 2.5 µM | 1 µM |
|-----------------------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
| Mn Trial1-72h | 100 | 104.39 | 95.11 | 91.23 | 81.75 | 58.85 | 31.60 | 21.77 | 15.07 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 105.75 | 95.35 | 90.14 | 81.41 | 59.91 | 31.19 | 22.43 | 14.61 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 104.62 | 95.50 | 90.26 | 81.46 | 59.77 | 31.64 | 21.74 | 15.42 |
| Promedio | 100 | 104.92 | 95.32 | 90.54 | 81.54 | 59.51 | 31.47 | 21.98 | 15.05 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.49 | 0.02 | 0.66 | 0.53 | 0.67 | 0.58 | 0.49 | 0.65 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.36 | 0.28 | 0.43 | 0.32 | 0.36 | 0.31 | 0.25 | 0.33 |

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

| Group Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|------------|---|---------|---------|---------|-------|
| Control | 3 | 0 | 100.002 | 0.000 | 0.001 |
| 100µM | 3 | 0 | 15.052 | 0.656 | 0.337 |
| 75µM | 3 | 0 | 21.980 | 0.497 | 0.250 |
| 50µM | 3 | 0 | 31.475 | 0.586 | 0.319 |
| 25µM | 3 | 0 | 59.513 | 0.672 | 0.364 |
| 10µM | 3 | 0 | 81.541 | 0.538 | 0.325 |
| 5µM | 3 | 0 | 90.540 | 0.667 | 0.438 |
| 2.5µM | 3 | 0 | 95.321 | 0.029 | 0.284 |
| 1µM | 3 | 0 | 104.92 | 0.495 | 0.367 |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.994

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

| Comparison | Diff of Means | q | P<0.050 |
|-------------------|---------------|-------|---------|
| Control vs. 100µM | 37.808 | 8.559 | Yes |
| Control vs. 75µM | 35.030 | 7.930 | Yes |
| Control vs. 50µM | 31.090 | 7.038 | Yes |
| Control vs. 25µM | 28.475 | 6.446 | Yes |
| Control vs. 10µM | 22.627 | 5.123 | Yes |
| Control vs. 5µM | 18.778 | 3.798 | No |
| Control vs. 2.5µM | 16.469 | 3.728 | No |
| Control vs. 1µM | 12.339 | 2.831 | No |

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

ANEXO 3

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 0.5 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 1 | 1.10 | 0.79 | 0.85 | 0.87 | 0.88 | 0.90 | 1.02 | 0.92 |
| | 1.12 | 0.79 | 0.84 | 0.87 | 0.89 | 0.90 | 1.04 | 0.93 |
| | 1.09 | 0.79 | 0.85 | 0.88 | 0.88 | 0.89 | 0.98 | 0.93 |
| Promedio | 1.11 | 0.79 | 0.85 | 0.90 | 0.88 | 0.90 | 1.01 | 0.93 |
| Desv. Estándar | 0.07 | 0.02 | 0.02 | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.06 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.02 | 0.03 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 0.5 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 2 | 1.09 | 0.77 | 0.81 | 0.81 | 0.83 | 0.84 | 0.99 | 0.87 |
| | 1.09 | 0.76 | 0.80 | 0.82 | 0.83 | 0.85 | 0.99 | 0.86 |
| | 1.08 | 0.77 | 0.80 | 0.81 | 0.83 | 0.84 | 0.98 | 0.87 |
| Promedio | 1.09 | 0.77 | 0.80 | 0.81 | 0.83 | 0.84 | 0.99 | 0.87 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.00 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 0.5 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 0.99 | 0.75 | 0.80 | 0.80 | 0.82 | 0.83 | 0.98 | 0.84 |
| | 1.03 | 0.76 | 0.79 | 0.81 | 0.82 | 0.83 | 0.99 | 0.86 |
| | 0.97 | 0.76 | 0.80 | 0.81 | 0.82 | 0.82 | 0.98 | 0.85 |
| Promedio | 0.99 | 0.76 | 0.80 | 0.81 | 0.82 | 0.83 | 0.98 | 0.85 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio porcentajes de viabilidad celular

| Pb | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 76.47 | 81.36 | 82.99 | 85.29 | 86.42 | 94.32 | 88.73 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 76.13 | 81.13 | 83.12 | 85.33 | 85.70 | 94.58 | 87.32 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 76.51 | 81.89 | 83.71 | 84.10 | 86.59 | 94.57 | 88.81 |
| Promedio | 100 | 76.37 | 81.46 | 83.61 | 85.24 | 86.24 | 94.16 | 88.55 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.21 | 0.39 | 0.44 | 0.12 | 0.58 | 0.52 | 0.32 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.10 | 0.19 | 0.22 | 0.06 | 0.29 | 0.26 | 0.16 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 4

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 2 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 1

| REPETICIÓN 1 | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| | 0.99 | 0.75 | 0.81 | 0.83 | 0.85 | 0.88 | 0.91 | 0.89 |
| | 1.03 | 0.74 | 0.81 | 0.82 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.89 |
| | 1.01 | 0.74 | 0.81 | 0.83 | 0.86 | 0.87 | 0.91 | 0.89 |
| Promedio | 0.99 | 0.74 | 0.81 | 0.83 | 0.85 | 0.87 | 0.91 | 0.89 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 2 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 2 | 0.98 | 0.76 | 0.83 | 0.85 | 0.88 | 0.91 | 0.93 | 0.92 |
| | 1.07 | 0.78 | 0.82 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.94 | 0.92 |
| | 0.98 | 0.78 | 0.82 | 0.85 | 0.86 | 0.90 | 0.94 | 0.92 |
| Promedio | 1.01 | 0.77 | 0.82 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.94 | 0.92 |
| Desv. Estándar | 0.05 | 0.01 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.00 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.00 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 2 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.15 | 0.77 | 0.85 | 0.88 | 0.92 | 0.92 | 0.96 | 0.94 |
| | 1.15 | 0.78 | 0.84 | 0.89 | 0.91 | 0.92 | 0.97 | 0.93 |
| | 1.14 | 0.77 | 0.85 | 0.89 | 0.91 | 0.93 | 0.97 | 0.93 |
| Promedio | 1.15 | 0.77 | 0.85 | 0.89 | 0.91 | 0.92 | 0.97 | 0.93 |
| Desv. Estándar | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Pb | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 74.65 | 80.15 | 81.09 | 83.55 | 85.73 | 89.15 | 86.65 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 74.64 | 79.52 | 80.63 | 82.65 | 86.39 | 89.10 | 86.48 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 73..83 | 79.41 | 80.85 | 82.83 | 85.29 | 88.45 | 85.43 |
| Promedio | 100 | 74.69 | 79.43 | 81.49 | 82.68 | 85.66 | 89.36 | 86.58 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.12 | 0.35 | 0.75 | 0.14 | 0.36 | 0.49 | 0.62 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.06 | 0.18 | 0.38 | 0.07 | 0.18 | 0.24 | 0.31 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 5

EFECTO DE LA COMBINACIÓN Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 4 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 0.95 | 0.72 | 0.75 | 0.76 | 0.76 | 0.75 | 0.81 | 0.78 |
| | 0.97 | 0.73 | 0.77 | 0.79 | 0.80 | 0.79 | 0.86 | 0.83 |
| | 0.94 | 0.70 | 0.73 | 0.74 | 0.74 | 0.78 | 0.81 | 0.78 |
| Promedio | 0.95 | 0.71 | 0.75 | 0.76 | 0.77 | 0.77 | 0.82 | 0.80 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 4 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.87 | 0.66 | 0.72 | 0.75 | 0.77 | 0.79 | 0.88 | 0.81 |
| | 0.87 | 0.68 | 0.72 | 0.75 | 0.76 | 0.81 | 0.89 | 0.82 |
| | 0.88 | 0.67 | 0.72 | 0.74 | 0.77 | 0.79 | 0.87 | 0.82 |
| Promedio | 0.87 | 0.67 | 0.72 | 0.75 | 0.77 | 0.80 | 0.88 | 0.82 |
| Desv. Estándar | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.06 | 0.07 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.04 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 4 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.09 | 0.67 | 0.73 | 0.76 | 0.78 | 0.81 | 0.89 | 0.85 |
| | 1.14 | 0.64 | 0.74 | 0.76 | 0.79 | 0.82 | 0.89 | 0.85 |
| | 1.04 | 0.66 | 0.73 | 0.76 | 0.78 | 0.81 | 0.90 | 0.84 |
| Promedio | 1.09 | 0.66 | 0.73 | 0.76 | 0.79 | 0.81 | 0.90 | 0.85 |
| Desv. Estándar | 0.05 | 0.03 | 0.05 | 0.02 | 0.04 | 0.02 | 0.03 | 0.02 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Pb | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 73.79 | 78.32 | 80.94 | 82.31 | 85.05 | 86.61 | 85.17 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 72.54 | 78.44 | 80.12 | 82.43 | 84.14 | 87.06 | 85.22 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 73.51 | 78.14 | 80.94 | 82.51 | 84.59 | 87.26 | 86.18 |
| Promedio | 100 | 73.69 | 78.33 | 81.49 | 82.48 | 84.10 | 87.56 | 85.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 1.13 | 0.15 | 0.53 | 0.02 | 0.29 | 0.28 | 0.79 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.56 | 0.08 | 0.27 | 0.01 | 0.14 | 0.14 | 0.39 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 6

EFECTO DE LA COMBINACIÓN Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 6 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 1.08 | 0.69 | 0.72 | 0.78 | 0.79 | 0.82 | 0.94 | 0.88 |
| | 1.09 | 0.68 | 0.73 | 0.77 | 0.79 | 0.82 | 0.93 | 0.87 |
| | 1.08 | 0.68 | 0.73 | 0.77 | 0.78 | 0.82 | 0.94 | 0.87 |
| Promedio | 1.08 | 0.68 | 0.73 | 0.77 | 0.79 | 0.82 | 0.94 | 0.87 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 6 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 1.15 | 0.66 | 0.76 | 0.84 | 0.85 | 0.88 | 1.01 | 0.91 |
| | 1.16 | 0.65 | 0.74 | 0.86 | 0.87 | 0.87 | 0.99 | 0.92 |
| | 1.15 | 0.65 | 0.74 | 0.86 | 0.86 | 0.88 | 1.02 | 0.92 |
| Promedio | 1.15 | 0.65 | 0.75 | 0.85 | 0.86 | 0.88 | 1.01 | 0.92 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.05 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 6 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.42 | 0.75 | 0.89 | 0.95 | 0.97 | 0.98 | 1.18 | 1.05 |
| | 1.36 | 0.76 | 0.88 | 0.95 | 0.97 | 1.01 | 1.15 | 1.07 |
| | 1.35 | 0.75 | 0.89 | 0.94 | 0.96 | 0.99 | 1.17 | 1.04 |
| Promedio | 1.38 | 0.75 | 0.89 | 0.95 | 0.97 | 1.00 | 1.17 | 1.05 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.04 | 0.04 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Pb | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 73.65 | 78.15 | 79.01 | 80.55 | 81.71 | 86.15 | 82.65 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 72.66 | 77.52 | 78.63 | 80.65 | 82.39 | 86.71 | 83.48 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 74.83 | 77.71 | 78.85 | 79.83 | 81.92 | 86.45 | 83.43 |
| Promedio | 100 | 73.69 | 77.93 | 78.79 | 80.68 | 82.20 | 86.56 | 83.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.12 | 0.35 | 0.75 | 0.14 | 0.36 | 0.49 | 0.62 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.06 | 0.18 | 0.38 | 0.07 | 0.18 | 0.24 | 0.31 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 7

EFECTO DE LA COMBINACIÓN Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 8 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 1.07 | 0.69 | 0.74 | 0.81 | 0.84 | 0.86 | 0.97 | 0.90 |
| | 1.10 | 0.70 | 0.76 | 0.82 | 0.84 | 0.85 | 0.98 | 0.89 |
| | 1.07 | 0.71 | 0.72 | 0.82 | 0.84 | 0.86 | 0.98 | 0.88 |
| Promedio | 1.08 | 0.70 | 0.74 | 0.82 | 0.84 | 0.86 | 0.98 | 0.89 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.05 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.00 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 8 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 1.12 | 0.71 | 0.81 | 0.79 | 0.81 | 0.81 | 0.94 | 0.87 |
| | 1.16 | 0.71 | 0.76 | 0.78 | 0.78 | 0.81 | 0.93 | 0.87 |
| | 1.12 | 0.71 | 0.79 | 0.81 | 0.82 | 0.81 | 0.94 | 0.86 |
| Promedio | 1.13 | 0.71 | 0.78 | 0.79 | 0.80 | 0.81 | 0.94 | 0.87 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 8 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.24 | 0.76 | 0.93 | 0.94 | 0.95 | 0.98 | 1.22 | 1.00 |
| | 1.29 | 0.74 | 0.93 | 0.95 | 0.98 | 1.00 | 1.20 | 1.03 |
| | 1.30 | 0.72 | 0.93 | 0.95 | 0.97 | 0.96 | 1.21 | 1.07 |
| Promedio | 1.27 | 0.74 | 0.93 | 0.95 | 0.97 | 0.98 | 1.21 | 1.03 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.03 | 0.04 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Pb | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 69.13 | 76.58 | 77.33 | 78.13 | 80.67 | 84.38 | 82.96 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 70.21 | 76.40 | 77.16 | 79.00 | 80.42 | 84.26 | 82.26 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 69.56 | 75.69 | 77.69 | 77.28 | 79.92 | 85.06 | 81.82 |
| Promedio | 100 | 69.49 | 76.73 | 77.49 | 78.68 | 80.00 | 84.26 | 82.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.23 | 0.47 | 0.27 | 0.86 | 0.39 | 0.35 | 0.94 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.11 | 0.24 | 0.14 | 0.43 | 0.20 | 0.17 | 0.47 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 8

EFECTO DE LA COMBINACIÓN Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 10 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 1

| | Blanco | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|--------|---------|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 0.29 | 1.20 | 1.01 | 1.03 | 0.96 | 0.95 | 0.93 | 0.91 | 0.80 |
| | 0.29 | 1.24 | 0.99 | 1.03 | 0.97 | 0.96 | 0.94 | 0.92 | 0.81 |
| | 0.27 | 1.18 | 0.98 | 1.04 | 0.97 | 0.95 | 0.94 | 0.93 | 0.78 |
| Promedio | 0.29 | 1.20 | 0.99 | 1.03 | 0.97 | 0.95 | 0.94 | 0.92 | 0.80 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.08 | 0.05 | 0.02 | 0.08 | 0.03 | 0.02 | 0.04 | 0.04 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 10 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 2

| | Blanco | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|--------|---------|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.32 | 0.88 | 0.80 | 0.82 | 0.78 | 0.77 | 0.76 | 0.74 | 0.65 |
| | 0.30 | 0.99 | 0.81 | 0.83 | 0.78 | 0.77 | 0.76 | 0.76 | 0.66 |
| | 0.32 | 0.96 | 0.80 | 0.83 | 0.78 | 0.76 | 0.77 | 0.75 | 0.66 |
| Promedio | 0.31 | 0.94 | 0.80 | 0.83 | 0.78 | 0.77 | 0.76 | 0.75 | 0.66 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 10 μM Plomo con diferentes concentraciones de Manganeso – Trial 3

| | Blanco | Control | H₂O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|---------------|----------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| REPETICIÓN 3 | 0.31 | 1.36 | 0.87 | 1.03 | 1.06 | 1.08 | 1.11 | 1.17 | 1.12 |
| | 0.30 | 1.35 | 0.88 | 1.04 | 1.06 | 1.07 | 1.10 | 1.17 | 1.12 |
| | 0.31 | 1.37 | 0.88 | 1.04 | 1.07 | 1.07 | 1.10 | 1.17 | 1.11 |
| Promedio | 0.31 | 1.36 | 0.88 | 1.03 | 1.06 | 1.07 | 1.10 | 1.17 | 1.12 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Pb | Control | H₂O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Pb trial 1-72h | 100 | 77.13 | 81.56 | 74.36 | 72.84 | 71.24 | 69.27 | 55.96 |
| Pb trial 2-72h | 100 | 77.84 | 81.21 | 73.98 | 72.30 | 71.19 | 68.97 | 54.30 |
| Pb trial 3-72h | 100 | 76.89 | 81.56 | 75.38 | 72.60 | 71.56 | 68.88 | 54.19 |
| Promedio | 100 | 77.18 | 81.44 | 74.00 | 72.68 | 71.49 | 69.93 | 54.56 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 1.97 | 0.97 | 0.20 | 0.37 | 0.33 | 1.00 | 0.35 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.99 | 0.49 | 0.10 | 0.18 | 0.17 | 0.50 | 0.17 |

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

| Group Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|-------------------------------------|----|---------|---------|---------|-------|
| Control | 3 | 0 | 100.000 | 0.001 | 0.001 |
| a) 10 μ M Pb+10 μ M Mn | 3 | 0 | 54.569 | 1.976 | 0.994 |
| b) 10 μ M Pb+ 8 μ M Mn | 3 | 0 | 69.933 | 0.973 | 0.496 |
| c) 10 μ M Pb+ 6 μ M Mn | 3 | 0 | 71.499 | 0.208 | 0.102 |
| d) 10 μ M Pb+ 4 μ M Mn | 3 | 0 | 72.684 | 0.372 | 0.188 |
| e) 10 μ M Pb+ 2 μ M Mn | 3 | 0 | 74.015 | 0.337 | 0.177 |
| f) 10 μ M Pb+0.5 μ M Mn | 30 | 81.569 | 1.003 | 0.502 | |
| g) 10 μ M Pb + H ₂ O | 3 | 0 | 77.186 | 0.353 | 0.170 |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with $\alpha = 0.050$: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

| Comparison | Diff of Means | q | P<0.050 |
|---------------|---------------|--------|---------|
| Control vs. a | 41.101 | 11.763 | Yes |
| Control vs. b | 33.657 | 9.632 | Yes |
| Control vs. c | 27.971 | 8.005 | Yes |
| Control vs. d | 24.006 | 6.870 | Yes |
| Control vs. e | 23.621 | 6.760 | Yes |
| Control vs. f | 14.815 | 4.240 | Yes |
| Control vs. g | 12.084 | 3.458 | Yes |

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

ANEXO 9

EFECTO DE LA COMBINACIÓN Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 0.5 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 1 | 1.32 | 0.98 | 0.98 | 1.09 | 1.01 | 1.17 | 1.29 | 1.35 |
| | 1.33 | 0.98 | 1.02 | 1.11 | 1.19 | 1.18 | 1.29 | 1.35 |
| | 1.36 | 0.97 | 1.03 | 1.13 | 1.20 | 1.19 | 1.28 | 1.38 |
| Promedio | 1.34 | 0.98 | 1.01 | 1.11 | 1.13 | 1.18 | 1.29 | 1.36 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.00 | 0.03 | 0.02 | 0.11 | 0.01 | 0.00 | 0.02 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.05 | 0.01 | 0.00 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 0.5 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 2 | 1.01 | 0.76 | 0.80 | 0.84 | 0.86 | 0.89 | 0.97 | 1.04 |
| | 1.03 | 0.78 | 0.84 | 0.86 | 0.87 | 0.88 | 0.96 | 1.07 |
| | 1.01 | 0.79 | 0.84 | 0.84 | 0.87 | 0.90 | 0.96 | 1.05 |
| Promedio | 1.00 | 0.78 | 0.83 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.97 | 1.06 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.05 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 0.5 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.32 | 0.99 | 1.10 | 1.10 | 1.16 | 1.20 | 1.27 | 1.34 |
| | 1.33 | 0.99 | 1.01 | 1.12 | 1.17 | 1.22 | 1.28 | 1.36 |
| | 1.33 | 0.97 | 1.01 | 1.16 | 1.18 | 1.14 | 1.29 | 1.37 |
| Promedio | 1.37 | 0.98 | 1.04 | 1.13 | 1.17 | 1.19 | 1.32 | 1.36 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.05 | 0.06 | 0.03 | 0.04 | 0.04 | 0.05 | 0.05 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Mn trial 1-72h | 100 | 84.05 | 88.14 | 90.75 | 92.56 | 95.94 | 95.68 | 103.95 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 84.57 | 87.79 | 89.91 | 92.64 | 94.85 | 95.28 | 104.45 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 85.05 | 87.14 | 90.52 | 92.56 | 93.94 | 96.86 | 104.95 |
| Promedio | 100 | 84.69 | 87.93 | 90.49 | 92.68 | 94.30 | 96.56 | 104.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.88 | 3.26 | 0.24 | 0.05 | 0.53 | 0.35 | 0.29 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.44 | 1.63 | 0.12 | 0.02 | 0.26 | 0.17 | 0.14 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 10
EFFECTO DE LA COMBINACIÓN Mn⁺², Mn (NO₃)₂ y Pb⁺², Pb (NO₃)₂ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 2 µM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 1

| | CONTROL | 10 µM | 8 µM | 6 µM | 4 µM | 2 µM | 0.5 µM | H2O |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 1.15 | 0.82 | 0.86 | 0.89 | 0.91 | 0.93 | 1.00 | 1.09 |
| | 1.11 | 0.85 | 0.85 | 0.88 | 0.91 | 0.93 | 1.00 | 1.09 |
| | 1.17 | 0.84 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.92 | 1.01 | 1.08 |
| Promedio | 1.15 | 0.84 | 0.86 | 0.89 | 0.91 | 0.93 | 1.01 | 1.09 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.00 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 2 µM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | CONTROL | 10 µM | 8 µM | 6 µM | 4 µM | 2 µM | 0.5 µM | H2O |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 1.13 | 0.77 | 0.78 | 0.81 | 0.85 | 0.85 | 0.98 | 1.04 |
| | 1.10 | 0.77 | 0.79 | 0.82 | 0.84 | 0.87 | 0.94 | 1.03 |
| | 1.14 | 0.76 | 0.81 | 0.84 | 0.83 | 0.87 | 0.87 | 1.04 |
| Promedio | 1.12 | 0.77 | 0.80 | 0.83 | 0.85 | 0.86 | 0.94 | 1.04 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.06 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | 0.03 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 2 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.26 | 0.86 | 0.91 | 0.97 | 0.97 | 1.00 | 1.04 | 1.12 |
| | 1.25 | 0.87 | 0.92 | 0.95 | 0.98 | 0.96 | 1.06 | 1.14 |
| | 1.23 | 0.85 | 0.94 | 0.94 | 0.97 | 0.98 | 1.06 | 1.17 |
| Promedio | 1.25 | 0.85 | 0.93 | 0.96 | 0.98 | 0.99 | 1.09 | 1.15 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.04 | 0.04 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Mn trial 1-72h | 100 | 74.51 | 79.58 | 82.78 | 84.57 | 84.36 | 86.71 | 94.62 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 73.57 | 79.72 | 81.29 | 84.51 | 85.88 | 86.39 | 94.74 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 74.73 | 80.05 | 82.08 | 83.23 | 85.18 | 85.14 | 94.58 |
| Promedio | 100 | 74.69 | 80.93 | 82.49 | 84.68 | 85.00 | 86.56 | 94.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.56 | 0.24 | 0.26 | 0.18 | 0.24 | 0.38 | 0.08 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.28 | 0.12 | 0.13 | 0.09 | 0.12 | 0.19 | 0.04 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 11

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN Mn²⁺, Mn (NO₃)₂ y Pb²⁺, Pb (NO₃)₂ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 4 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 1.08 | 0.81 | 0.86 | 0.88 | 0.90 | 0.92 | 0.98 | 1.02 |
| | 1.10 | 0.81 | 0.87 | 0.87 | 0.91 | 0.93 | 0.99 | 1.02 |
| | 1.10 | 0.82 | 0.87 | 0.90 | 0.91 | 0.91 | 0.97 | 1.00 |
| Promedio | 1.09 | 0.81 | 0.87 | 0.89 | 0.91 | 0.92 | 0.98 | 1.01 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.10 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.04 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.05 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 4 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.99 | 0.73 | 0.76 | 0.77 | 0.79 | 0.81 | 0.88 | 0.93 |
| | 0.98 | 0.72 | 0.76 | 0.78 | 0.78 | 0.80 | 0.90 | 0.92 |
| | 0.97 | 0.72 | 0.77 | 0.80 | 0.79 | 0.80 | 0.89 | 0.93 |
| Promedio | 0.98 | 0.72 | 0.76 | 0.78 | 0.79 | 0.80 | 0.87 | 0.93 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.03 | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.04 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.00 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 4 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-------------------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.14 | 0.82 | 0.87 | 0.99 | 0.91 | 0.93 | 1.03 | 1.10 |
| | 1.15 | 0.82 | 0.86 | 0.87 | 0.89 | 0.91 | 1.05 | 1.10 |
| | 1.13 | 0.81 | 0.88 | 0.99 | 0.91 | 0.93 | 0.97 | 1.11 |
| Promedio | 1.14 | 0.82 | 0.87 | 0.89 | 0.90 | 0.92 | 1.02 | 1.10 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.04 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Mn trial 1-72h | 100 | 72.99 | 78.11 | 79.43 | 81.87 | 82.95 | 85.08 | 92.25 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 72.53 | 79.15 | 79.02 | 82.27 | 83.25 | 85.48 | 91.94 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 72.52 | 78.13 | 80.72 | 82.17 | 82.96 | 84.98 | 92.37 |
| Promedio | 100 | 72.69 | 78.93 | 80.49 | 82.68 | 83.00 | 85.56 | 92.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.27 | 0.58 | 0.70 | 0.95 | 0.51 | 1.27 | 0.37 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.13 | 0.29 | 0.35 | 0.47 | 0.25 | 0.63 | 0.18 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 12

EFECTO DE LA COMBINACIÓN Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 6 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 1 | 1.16 | 0.78 | 0.82 | 0.85 | 0.88 | 0.88 | 0.96 | 1.04 |
| | 1.14 | 0.78 | 0.83 | 0.85 | 0.87 | 0.88 | 0.96 | 1.04 |
| | 1.14 | 0.77 | 0.83 | 0.86 | 0.87 | 0.90 | 0.97 | 1.03 |
| Promedio | 1.15 | 0.78 | 0.83 | 0.85 | 0.87 | 0.89 | 0.96 | 1.04 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.05 | 0.02 | 0.02 | 0.06 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.03 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 6 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 2 | 1.15 | 0.79 | 0.83 | 0.85 | 0.84 | 0.86 | 0.94 | 1.01 |
| | 1.16 | 0.77 | 0.81 | 0.86 | 0.88 | 0.87 | 0.94 | 1.02 |
| | 1.16 | 0.75 | 0.80 | 0.85 | 0.85 | 0.87 | 0.93 | 1.02 |
| Promedio | 1.16 | 0.77 | 0.82 | 0.85 | 0.86 | 0.87 | 0.94 | 1.02 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.04 | 0.03 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 6 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 3

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| REPETICIÓN 3 | 1.13 | 0.80 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.92 | 1.01 | 1.07 |
| | 1.18 | 0.80 | 0.85 | 0.89 | 0.90 | 0.91 | 0.98 | 1.09 |
| | 1.10 | 0.82 | 0.84 | 0.85 | 0.91 | 0.91 | 0.98 | 1.09 |
| Promedio | 1.14 | 0.80 | 0.85 | 0.87 | 0.90 | 0.91 | 0.99 | 1.08 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.04 | 0.08 | 0.02 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.04 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Mn trial 1-72h | 100 | 70.83 | 76.62 | 77.93 | 79.52 | 80.83 | 83.69 | 90.52 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 70.53 | 77.15 | 78.02 | 80.27 | 81.25 | 83.48 | 91.94 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 71.27 | 77.03 | 78.79 | 80.39 | 81.66 | 84.79 | 90.55 |
| Promedio | 100 | 71.49 | 77.93 | 78.49 | 80.68 | 81.00 | 83.56 | 90.18 |
| Desv. Estándar | 0.01 | 1.18 | 1.09 | 1.12 | 0.88 | 0.71 | 1.86 | 2.54 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.59 | 0.55 | 0.56 | 0.44 | 0.36 | 0.93 | 1.27 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 13

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN Mn^{+2} , $Mn (NO_3)_2$ y Pb^{+2} , $Pb (NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 8 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 1

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 1 | 1.12 | 0.80 | 0.84 | 0.86 | 0.89 | 0.91 | 1.00 | 1.07 |
| | 1.15 | 0.79 | 0.83 | 0.85 | 0.87 | 0.92 | 0.98 | 1.08 |
| | 1.16 | 0.79 | 0.84 | 0.86 | 0.89 | 0.92 | 0.99 | 1.09 |
| Promedio | 1.14 | 0.79 | 0.84 | 0.86 | 0.88 | 0.92 | 0.99 | 1.08 |
| Desv. Estándar | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.00 | 0.07 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.03 | 0.00 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 8 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|------|
| REPETICIÓN 2 | 1.18 | 0.8 | 0.87 | 0.88 | 0.92 | 0.94 | 0.99 | 1.08 |
| | 1.19 | 0.84 | 0.86 | 0.88 | 0.92 | 0.94 | 0.99 | 1.05 |
| | 1.14 | 0.83 | 0.87 | 0.89 | 0.91 | 0.95 | 0.97 | 1.06 |
| Promedio | 1.17 | 0.82 | 0.87 | 0.89 | 0.92 | 0.95 | 0.98 | 1.06 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.03 | 0.03 | 0.06 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.00 | 0.02 | 0.01 | 0.03 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 8 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|------|
| REPETICIÓN 3 | 1.19 | 0.83 | 0.89 | 0.92 | 0.93 | 0.94 | 0.99 | 1.11 |
| | 1.19 | 0.83 | 0.88 | 0.92 | 0.93 | 0.95 | 0.99 | 1.11 |
| | 1.14 | 0.82 | 0.88 | 0.91 | 0.92 | 0.95 | 0.98 | 1.10 |
| Promedio | 1.18 | 0.83 | 0.88 | 0.92 | 0.93 | 0.95 | 0.99 | 1.11 |
| Desv. Estándar | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.03 | 0.04 | 0.03 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | CONTROL | 10 μM | 8 μM | 6 μM | 4 μM | 2 μM | 0.5 μM | H2O |
|-----------------------|---------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------|
| Mn trial 1-72h | 100 | 68.64 | 76.14 | 76.82 | 77.59 | 78.75 | 81.56 | 86.63 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 69.39 | 76.16 | 77.07 | 78.25 | 79.59 | 80.69 | 87.05 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 69.25 | 76.19 | 76.67 | 78.39 | 78.64 | 81.45 | 87.34 |
| Promedio | 100 | 69.49 | 76.93 | 77.49 | 78.68 | 79.24 | 81.56 | 87.18 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.58 | 0.03 | 0.44 | 0.17 | 0.64 | 0.47 | 0.36 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.29 | 0.01 | 0.22 | 0.09 | 0.32 | 0.24 | 0.18 |

Fuente: Elaboración Propia

ANEXO 14

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN Mn^{+2} , $Mn(NO_3)_2$ y Pb^{+2} , $Pb(NO_3)_2$ y EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA DE RATA B35

1. Absorbancias de 10 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 1

| | Blanco | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-------------------------|--------|---------|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| REPETICIÓN 1 | 0.28 | 1.23 | 1.08 | 1.00 | 0.99 | 0.97 | 0.96 | 0.95 | 0.80 |
| | 0.29 | 1.22 | 1.08 | 0.99 | 0.98 | 0.97 | 0.96 | 0.95 | 0.79 |
| | 0.28 | 1.22 | 1.08 | 1.02 | 0.98 | 0.98 | 0.97 | 0.94 | 0.80 |
| Promedio | 0.28 | 1.22 | 1.08 | 1.01 | 0.98 | 0.97 | 0.96 | 0.95 | 0.79 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.13 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.09 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.08 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.05 |

Fuente: Elaboración Propia

2. Absorbancias de 10 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 2

| | Blanco | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-------------------------|--------|---------|------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.32 | 1.14 | 1.03 | 0.94 | 0.93 | 0.92 | 0.91 | 0.91 | 0.77 |
| | 0.30 | 1.14 | 1.02 | 0.95 | 0.93 | 0.92 | 0.91 | 0.90 | 0.77 |
| | 0.32 | 1.14 | 1.02 | 0.94 | 0.92 | 0.92 | 0.90 | 0.90 | 0.76 |
| Promedio | 0.31 | 1.14 | 1.02 | 0.94 | 0.93 | 0.92 | 0.91 | 0.90 | 0.77 |
| Desv. Estándar | 0.11 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.04 | 0.01 | 0.07 | 0.02 | 0.04 |
| SEM (%) | 0.06 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.01 | 0.02 |

Fuente: Elaboración Propia

3. Absorbancias de 10 μM Manganeso con diferentes concentraciones de Plomo – Trial 3

| | Blanco | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|--------|---------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| REPETICIÓN 3 | 0.29 | 1.09 | 0.96 | 0.90 | 0.88 | 0.87 | 0.87 | 0.86 | 0.74 |
| | 0.29 | 1.10 | 0.97 | 0.90 | 0.88 | 0.88 | 0.87 | 0.86 | 0.74 |
| | 0.29 | 1.09 | 0.97 | 0.89 | 0.87 | 0.88 | 0.86 | 0.85 | 0.74 |
| Promedio | 0.29 | 1.09 | 0.97 | 0.90 | 0.88 | 0.88 | 0.87 | 0.86 | 0.74 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.02 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.03 | 0.02 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. Promedio de porcentajes de viabilidad celular

| Mn | Control | H ₂ O | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|---------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Mn trial 1-72h | 100 | 84.70 | 76.93 | 74.23 | 73.27 | 72.31 | 70.25 | 54.17 |
| Mn trial 2-72h | 100 | 86.14 | 75.93 | 74.25 | 73.20 | 72.19 | 71.39 | 55.36 |
| Mn trial 3-72h | 100 | 84.66 | 75.95 | 73.74 | 72.86 | 71.70 | 70.49 | 55.56 |
| Promedio | 100 | 85.16 | 76.27 | 74.07 | 73.11 | 72.07 | 70.71 | 55.03 |
| Desv. Estándar | 0.01 | 0.22 | 0.18 | 0.12 | 0.10 | 0.13 | 0.17 | 0.11 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.11 | 0.09 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.10 | 0.06 |

Fuente: Elaboración Propia

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

| Group Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|-------------------------------------|---|---------|---------|---------|-------|
| Control | 3 | 0 | 100.000 | 0.003 | 0.001 |
| a) 10 μ M Mn+10 μ M Pb | 3 | 0 | 55.745 | 0.694 | 0.340 |
| b) 10 μ M Mn+ 8 μ M Pb | 3 | 0 | 71.936 | 0.582 | 0.296 |
| c) 10 μ M Mn+ 6 μ M Pb | 3 | 0 | 72.494 | 0.378 | 0.193 |
| d) 10 μ M Mn+ 4 μ M Pb | 3 | 0 | 73.689 | 0.400 | 0.200 |
| e) 10 μ M Mn+ 2 μ M Pb | 3 | 0 | 74.016 | 0.397 | 0.206 |
| f) 10 μ M Mn+0.5 μ M Pb | 3 | 0 | 75.564 | 0.733 | 0.367 |
| g) 10 μ M Mn + H ₂ O | 3 | 0 | 84.189 | 0.405 | 0.208 |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

| Comparison | Diff of Means | q | P<0.050 |
|---------------|---------------|--------|---------|
| Control vs. a | 45.295 | 10.466 | Yes |
| Control vs. b | 38.374 | 8.867 | Yes |
| Control vs. c | 36.466 | 8.426 | Yes |
| Control vs. d | 27.826 | 6.429 | Yes |
| Control vs. e | 25.161 | 5.814 | Yes |
| Control vs. f | 16.884 | 3.208 | Yes |
| Control vs. g | 10.131 | 1.417 | Yes |

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

ANEXO 15
MEDICIÓN DEL DAÑO CELULAR

1. absorbancias de lactato deshidrogenasa con concentraciones de Pb⁺², Pb(NO₃)₂ y Mn⁺², Mn(NO₃)₂ – Trial 1

| | C(-) | C(+) | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| REPETICIÓN 1 | 0.69 | 2.30 | 0.79 | 0.94 | 0.99 | 1.06 | 1.09 | 1.42 |
| | 0.69 | 2.30 | 0.79 | 0.94 | 0.98 | 1.06 | 1.08 | 1.42 |
| | 0.68 | 2.29 | 0.78 | 0.94 | 0.99 | 1.07 | 1.09 | 1.42 |
| Promedio | 0.68 | 2.30 | 0.79 | 0.94 | 0.99 | 1.06 | 1.09 | 1.42 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.02 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

2. absorbancias de lactato deshidrogenasa con concentraciones de Pb⁺², Pb(NO₃)₂ y Mn⁺², Mn(NO₃)₂ – Trial 2

| | C(-) | C(+) | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| REPETICIÓN 2 | 0.71 | 2.25 | 0.80 | 0.94 | 0.99 | 1.05 | 1.08 | 1.40 |
| | 0.71 | 2.25 | 0.81 | 0.94 | 0.98 | 1.04 | 1.08 | 1.40 |
| | 0.71 | 2.25 | 0.81 | 0.93 | 0.99 | 1.05 | 1.08 | 1.41 |
| Promedio | 0.71 | 2.25 | 0.80 | 0.93 | 0.99 | 1.05 | 1.08 | 1.40 |
| Desv. Estándar | 0.01 | 0.01 | 0.06 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.05 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.03 | 0.02 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.03 |

Fuente: Elaboración Propia

3. absorbancias de lactato deshidrogenasa con concentraciones de Pb⁺², Pb(NO₃)₂ y Mn⁺²,Mn(NO₃)₂ – Trial 3

| | C(-) | C(+) | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|------|------|--------|------|------|------|------|-------|
| REPETICIÓN 3 | 0.62 | 2.30 | 0.72 | 0.87 | 0.92 | 1.00 | 1.03 | 1.40 |
| | 0.62 | 2.32 | 0.72 | 0.87 | 0.91 | 1.01 | 1.03 | 1.39 |
| | 0.61 | 2.30 | 0.73 | 0.87 | 0.92 | 1.00 | 1.02 | 1.39 |
| Promedio | 0.62 | 2.30 | 0.72 | 0.87 | 0.92 | 1.00 | 1.03 | 1.39 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.01 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

Fuente: Elaboración Propia

4. promedio de porcentajes de daño celular con concentraciones de Pb⁺², Pb(NO₃)₂ y Mn⁺²,Mn(NO₃)₂

| | CONTROL(+) | 0.5 μM | 2 μM | 4 μM | 6 μM | 8 μM | 10 μM |
|-----------------------|------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PORCENTAJE (%) | 100 | 6.17 | 15.43 | 18.51 | 22.83 | 24.69 | 45.06 |
| | 100 | 5.84 | 14.93 | 18.18 | 22.07 | 24.02 | 44.80 |
| | 100 | 5.95 | 14.88 | 17.85 | 22.61 | 24.40 | 44.04 |
| Promedio | 100 | 5.98 | 15.08 | 18.18 | 22.50 | 24.37 | 44.63 |
| Desv. Estándar | 0.02 | 0.47 | 0.09 | 0.22 | 0.53 | 0.09 | 0.39 |
| SEM (%) | 0.01 | 0.24 | 0.05 | 0.11 | 0.27 | 0.04 | 0.19 |

Fuente: Elaboración Propia.

ANALISIS DE VARIANZA DE UNA VIA EMITIDO POR SIGMA PLOT 12.5

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook1

| Group Name | N | Missing | Mean | Std Dev | SEM |
|----------------------|---|---------|---------|---------|-------|
| Control (+) | 3 | 0 | 100.000 | 0.002 | 0.011 |
| Control (-) | 3 | 0 | 0.671 | 0.003 | 0.010 |
| a) 10µM Mn+10µM Pb | 3 | 0 | 44.635 | 0.472 | 0.240 |
| b) 8µM Mn+ 8µM Pb | 3 | 0 | 24.376 | 0.092 | 0.056 |
| c) 6µM Mn+ 6µM Pb | 3 | 0 | 22.504 | 0.538 | 0.273 |
| d) 4µM Mn+ 4µM Pb | 3 | 0 | 18.189 | 0.220 | 0.110 |
| e) 2µM Mn+ 2µM Pb | 3 | 0 | 15.086 | 0.097 | 0.046 |
| f) 0.5µM Mn+0.5µM Pb | 3 | 0 | 5.984 | 0.393 | 0.197 |

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.001$).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

| Comparison | Diff of Means | q | P<0.050 |
|-------------------|---------------|--------|---------|
| Control (+) vs. a | 45.295 | 10.466 | Yes |
| Control (+) vs. b | 38.374 | 8.867 | Yes |
| Control (+) vs. c | 36.466 | 8.426 | Yes |
| Control (+) vs. d | 27.826 | 7.429 | Yes |
| Control (+) vs. e | 25.161 | 6.814 | Yes |
| Control (+) vs. f | 16.884 | 5.208 | Yes |
| Control (-) vs. a | 58.396 | 13.466 | Yes |
| Control (-) vs. b | 56.334 | 12.867 | Yes |
| Control (-) vs. c | 47.365 | 11.426 | Yes |
| Control (-) vs. d | 44.871 | 10.429 | Yes |
| Control (-) vs. e | 32.601 | 9.814 | Yes |
| Control (-) vs. f | 30.822 | 9.208 | Yes |

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.