



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

**CITOTOXICIDAD INDUCIDA IN VITRO POR
CONCENTRACIONES EQUIVALENTES A NIVELES DE
EXPOSICIÓN OCUPACIONAL POR ACETATO DE PLOMO
EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFÉRICA HUMANA**

AUTORA:

ERAZO HUAMÁN TATIANA

TESIS:

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADA TECNÓLOGO MÉDICO**

ASESOR:

Mg. TM JAIME ALONSO ROSALES RIMACHE

Ica - Perú

2017



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

HOJA DE APROBACIÓN

**CITOTOXICIDAD INDUCIDA IN VITRO POR
CONCENTRACIONES EQUIVALENTES A NIVELES DE
EXPOSICIÓN OCUPACIONAL POR ACETATO DE PLOMO
EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE
PERIFÉRICA HUMANA**

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de licenciada en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Particular Alas Peruanas

PRESIDENTE: Mg. Morón Valenzuela Julia Cecilia

MIEMBRO: Lic. TM. Arones Hernández Alfredo Melquiades.....

SECRETARIO: Lic. TM. Calle Quispe José Luis

Ica - Perú

2017

Se dedica este trabajo a Dios, ya gracias a él he logrado concluir mi carrera, además de manera especial a mis padres y hermanos quienes son el principal cimiento en la construcción de mi vida profesional, así mismo a mi esposo y mi amado hijo quienes son la inspiración de superación en todos los ámbitos de mi vida, además de mi abuela por inculcar los valores en mi persona.

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta tesis a mi asesor, el Lic Jaime Rosales por su orientación en el ámbito de la investigación.

Al Hospital de la Solidaridad de Ica por la autorización para ejecutar esta tesis en sus instalaciones.

Erazo, T. 2017. Citotoxicidad inducida in vitro por concentraciones equivalentes a niveles de exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares de sangre periférica humana / Tatiana Erazo Huamán. 71 páginas.

Nombre del tutor: Mg. T.M. Jaime Alonso Rosales Rimache

“Disertación académica en licenciatura en Tecnología Médica – Universidad Alas Peruanas 2017”

RESUMEN

Objetivos. Evaluar la citotoxicidad inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional de acetato de plomo en células mononucleares de sangre periférica humana. **Materiales y métodos.** experimental, prospectivo, analítico, de corte longitudinal. Se obtuvieron muestras de sangre aleatoriamente para extraer células mononucleares de sangre periférica por gradiente de densidad con ficoll hipaque. Las PBMC fueron expuestas a concentraciones crecientes de acetato de plomo (grupo experimental: 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 [límite de exposición ocupacional equivalente a 40 µg/dL], 1.8 y 2.1 µM) y suero fisiológico (grupo control), para valorar la viabilidad celular a las 2, 12, 24, 48 y 72 horas, por fluorescencia reactiva a una combinación de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio, de tal modo que se estime como complemento a la citotoxicidad. **Resultados.** Los resultados de citotoxicidad mostraron que la exposición creciente a acetato de plomo en las PBMC tienen un comportamiento lineal creciente con niveles de correlación altos ($R > 0.9$), y esta se pronuncia mucho a las 72 horas. Además, se observó que a partir de concentraciones de acetato de plomo de 0.0375 µM, equivalente a 1 µg/dL de plomo en sangre, generaron disminución significativa ($p < 0.05$) de la viabilidad celular. Evaluando la concentración de plomo por exposición ambiental (niños: hasta 10 µg/dL y adultos: hasta 20 µg/dL), la citotoxicidad continuó descendiendo significativamente, siendo mucho mayor la diferencia pasada las 24 horas de exposición. Las PBMC que fueron expuestas a concentraciones de acetato de plomo 1.2 µM a más (límite de exposición ocupacional: > 40 µg/dL de plomo en sangre), se observó el mayor nivel de citotoxicidad, evidenciándose diferencias significativas a partir de las 2 horas del tratamiento. **Conclusiones.** El tratamiento con concentraciones equivalentes a niveles de exposición por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana induce citotoxicidad celular.

Palabras clave: *Citotoxicidad, in vitro, exposición, acetato de plomo, células mononucleares de sangre periférica*

ABSTRACT

Objectives. To assess in vitro induced cytotoxicity at concentrations equivalent to occupational lead acetate exposure in human peripheral blood mononuclear cells. **Materials and methods.** Experimental, prospective, analytical, longitudinal cut. Blood samples were randomly collected to extract peripheral blood mononuclear cells by density gradient with ficoll hyphaque. PBMC were exposed to increasing concentrations of lead acetate (experimental group: 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2 [occupational exposure limit equivalent to 40 µg/dL], 1.8 and 2.1 µM) and serum (Control group), to assess cell viability at 2, 12, 24, 48 and 72 hours, by reactive fluorescence to a combination of fluorescein diacetate and ethidium bromide, in such a way as to be considered as complement to cytotoxicity. **Results.** The cytotoxicity results showed that increased exposure to lead acetate in PBMCs has a growing linear behavior with high correlation levels ($R > 0.9$), and this is pronounced much at 72 hours. In addition, it was observed that from lead acetate concentrations of 0.0375 µM, equivalent to 1 µg/dL lead in blood, they produced a significant decrease ($p < 0.05$) in cell viability. Evaluating the lead concentration by environmental exposure (children: up to 10 µg/dL and adults: up to 20 µg/dL), cytotoxicity continued to decline significantly, with the difference being much greater after 24 hours of exposure. PBMC that were exposed to concentrations of lead acetate 1.2 µM or more (occupational exposure limit: > 40 µg/dL lead in blood), showed the highest level of cytotoxicity, showing significant differences from 2 hours of treatment. **Conclusions.** Treatment with concentrations equivalent to exposure levels of lead acetate in mononuclear cells in human peripheral blood induces cellular cytotoxicity.

Key words: Cytotoxicity, in vitro, exposure, lead acetate, peripheral blood mononuclear cells

TABLA DE CONTENIDOS

Portada	
Hoja de aprobación	
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Epígrafe	iii
Resumen	iv
Abstract	v
Tabla de contenidos	vi
Listado de tablas	viii
Listado de gráficos	ix
Abreviaturas	xi
INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1. Descripción de la situación problemática	13
1.2. Formulación del problema de investigación	14
1.3. Objetivos	14
1.4. Justificación e importancia	15
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	16
2.1. Antecedentes de la investigación	16
2.2. Bases teóricas	20
2.3. Bases legales	28
2.4. Definición de términos básicos	30
CAPITULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	33
3.1. Hipótesis general	33
3.2. Hipótesis específicas	33
3.3. Variables	34
CAPITULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	35
4.1. Tipo y diseño de la investigación	35
4.2. Nivel de la investigación	36
4.3. Método	36
4.4. Población y muestra de la investigación	36

4.5. Técnicas para el procesamiento y análisis de los datos	38
4.6. Consideraciones éticas	41
CAPÍTULO V: ANÁLISIS Y RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	42
5.1. Resultados	42
5.2. Discusión de resultados	57
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS DE INFORMACIÓN	61
ANEXOS	
Anexo N° 01: Operacionalización de variables	67
Anexo N° 02: Matriz de consistencia	68
Anexo N° 03: Obtención de PBMC por gradiente de densidad	69
Anexo N° 04: Determinación de citotoxicidad celular con FDA-BrEt	70
Anexo N° 05: Licencia para ejecución de Tesis	71

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Evaluación de la distribución normal de la viabilidad celular de datos	46
Tabla 2. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 0.01875 μM de acetato de plomo	47
Tabla 3. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 0.0375 μM de acetato de plomo	48
Tabla 4. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 0.075 μM de acetato de plomo	49
Tabla 5. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 0.15 μM de acetato de plomo	50
Tabla 6. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 0.3 μM de acetato de plomo	51
Tabla 7. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 0.6 μM de acetato de plomo	52
Tabla 8. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 1.2 μM de acetato de plomo	53
Tabla 9. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 1.8 μM de acetato de plomo	54
Tabla 10. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a 2.1 μM de acetato de plomo	55

LISTADO DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Viabilidad celular basal en concentraciones crecientes de acetato de plomo	43
Gráfico 2. Viabilidad celular a las 2 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo	43
Gráfico 3. Viabilidad celular a las 12 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo	44
Gráfico 4. Viabilidad celular a las 24 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo	44
Gráfico 5. Viabilidad celular a las 48 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo	45
Gráfico 6. Viabilidad celular a las 72 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo	45
Gráfico 7. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 0.01875 μM de acetato de plomo	47
Gráfico 8. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 0.0375 μM de acetato de plomo	48
Gráfico 9. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 0.075 μM de acetato de plomo	49
Gráfico 10. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 0.15 μM de acetato de plomo	50
Gráfico 11. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 0.3 μM de acetato de plomo	51
Gráfico 12. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 0.6 μM de acetato de plomo	52
Gráfico 13. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 1.2 μM de acetato de plomo	53

Gráfico 14. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 1.8 μ M de acetato de plomo	54
Gráfico 15. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a 2.1 μ M de acetato de plomo	55
Gráfico 16. Comparación global de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento	56

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ❖ **IARC:** Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer
- ❖ **Pb:** Plomo
- ❖ **ATSDR:** Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
- ❖ **ADN:** Ácido desoxiribonucleico
- ❖ **µg/dL:** Microgramos por decilitro
- ❖ **µM:** Micromolar
- ❖ **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- ❖ **FDA-BrEth:** Diacetato de fluoresceína con bromuro de etidio
- ❖ **PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica

INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal pesado tóxico que puede afectar la salud en personas expuestas a actividades mineras debido al aire contaminado que emiten los hornos de fundición. Además, la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC) lo clasifico dentro del grupo 2B, posible carcinógeno humano y carcinógeno en animales (1). Las intoxicaciones crónicas generan principalmente desórdenes hematológicos, renales, gastrointestinales y neurológicos, pudiendo causar la muerte en casos agudos (2). Las manifestaciones neurológicas por plomo han sido especialmente estudiadas dado que afectan a la memoria, coordinación visomotora, equilibrio y el coeficiente intelectual, siendo corroborado por diversas pruebas neurológicas (3). Diversos autores además sugieren que los niños y madres embarazadas pueden captar plomo del ambiente de manera más eficiente que los adultos (4). Ello estaría asociado a un bajo rendimiento académico, alteración en el comportamiento y retraso mental, sin embargo faltan estudios que determinen su relación directa (5).

No obstante, las manifestaciones clínicas derivadas de la exposición al plomo son parte de un efecto acumulativo del metal en el organismo, en el cual se genera diversas reacciones que conllevan a generar daño en sistemas celulares y tisulares (6).

La gran mayoría de los efectos moleculares, celulares y tisulares generados por el plomo se debe a la capacidad que tiene el plomo para inducir estrés oxidativo con la formación de radicales libres que alteran estructuras orgánicas tales como proteínas y lípidos, y en esta última es importante señalar la generación de lipoperoxidación de membranas celulares las cuales estarán asociados a muerte celular (7), que puede evidenciarse por diversos métodos para evaluar una característica denominada citotoxicidad celular, objetivo principal de la presente investigación.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La contaminación por plomo en diversos departamentos del Perú ha generado un fuerte impacto en el ambiente y la población. Diversas industrias, sobre todo del sector de minería a gran escala, generan actividades extractivas de plomo las cuales han sido vinculadas a altas concentraciones de plomo en el aire y a los efectos en la salud de las personas (8). Diversos estudios han evaluado la exposición de plomo en sangre de niños y madres gestantes de La Oroya, los cuales reportaron que más del 50% de la población tenía niveles por encima de 10 µg/dL. (9-11).

El plomo por sus características de catión divalente resulta una molécula altamente reactiva bioquímicamente, es decir, puede involucrarse en diversos procesos celulares y alterar la homeostasis celular, debido a que no es un ion esencial (7). Por esto, la mayoría de los mecanismos asociados a la toxicidad del plomo están involucrados en procesos donde participan otros iones divalentes que si son esenciales para el funcionamiento celular, tales como el calcio (12).

Los efectos adversos del plomo sobre la salud y su potencial carcinogénico han sido planteados por diversos grupos de trabajo de manera controversial (13-16), por lo que los efectos citotóxicos del metal ocasionados por la exposición equiparable a la de personas expuestas ocupacionalmente es el tema central del presente trabajo utilizando un modelo celular in vitro.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema principal

- ✓ ¿El tratamiento con concentraciones equivalentes a niveles de exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana inducirá citotoxicidad celular?

1.2.2. Problemas secundarios

- ✓ ¿Cuál es el nivel de citotoxicidad celular inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana?
- ✓ ¿Cuál es la concentración de acetato de plomo que induce menor y mayor citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana?
- ✓ ¿Cuál es la cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana según tiempo?

1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar la citotoxicidad inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional de acetato de plomo en células mononucleares de sangre periférica humana

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar los niveles de citotoxicidad celular inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional de acetato de plomo en células mononucleares de sangre periférica humana
- ✓ Determinar la concentración de acetato de plomo que induce menor y mayor citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana
- ✓ Evaluar la cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana según tiempo

1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Los efectos moleculares y mecanismos involucrados en el daño celular son muy variables según lo reportado en la literatura (ver antecedentes de estudio), por lo que evaluar la citotoxicidad en un modelo un vitro permite evidenciar no solo el efecto generado por el plomo en un sistema celular determinado, sino evaluar los niveles y/o concentraciones que generan un daño significativo en una escala de tiempo. Los ensayos de citotoxicidad inducida por un xenobiótico permitirán posteriormente tener un modelo experimental básico sobre el cual puedan aplicarse nuevas alternativas farmacológicas (búsqueda de nuevos principios activos de plantas autóctonas por ejemplo, u otros) que reviertan el daño inducido por el acetato de plomo.

CAPÍTULO II

MARCO TEÒRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Yedjou et al (US, 2016) determinaron los mecanismos in vitro de nitrato de plomo [Pb(NO₃)₂] para inducir daño en el ADN, apoptosis y detención del ciclo celular en células de leucemia humana (HL-60). Células HL-60 fueron tratadas con diferentes concentraciones de Pb(NO₃)₂ durante 24 h. Las células vivas y necróticas se midieron mediante el ensayo de idiotipo de propidio (PI). La apoptosis celular se midió mediante la citometría de flujo y escisión de ADN. El análisis del ciclo celular se evaluó mediante la citometría de flujo. El resultado del PI demostró un aumento significativo ($p < 0,05$) de la muerte celular necrótica en células tratadas con Pb(NO₃)₂, indicativo de ruptura de membrana por Pb(NO₃)₂ en comparación con el testigo. Los datos generados a partir del ensayo del cometa indicaron un aumento dependiente de la concentración en el daño del ADN, mostrando un aumento significativo ($p < 0,05$) en la longitud de cola del cometa y porcentajes de escisión del ADN. Los datos generados por la citometría de flujo indicaron que la exposición a Pb(NO₃)₂ significativamente ($p < 0,05$) aumentó la proporción de células positivas a caspasa-3 (células apoptóticas) en comparación con el control. La evaluación de citometría de flujo también

indicó la detención del ciclo celular causada por la exposición a $Pb(NO_3)_2$ en el punto de control G0 / G1. El resultado del ensayo de escalado de ADN mostró la presencia de frotis de ADN en el gel de agarosa con poca presencia de fragmentos de ADN en las células tratadas en comparación con el testigo. En resumen, $Pb(NO_3)_2$ inhibe la proliferación de células HL-60 no solo induciendo daños en el ADN y detención del ciclo celular en el punto de control G0 / G1, sino también desencadenando la apoptosis mediante la activación de caspasa-3 y fragmentación del ADN nucleosomal acompañada de necrosis secundaria (17).

Haouas et al (US, 2014) evaluaron los efectos histopatológicos y citotóxicos de la exposición al plomo en hígado de ratas. Se emplearon ratas Wistar macho adultas las cuales fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos. El primero fue expuesto a 2 g de acetato de plomo en agua destilada durante 35 días, mientras que el segundo sirvió como grupo de control y se le dio agua destilada. El daño estructural en el hígado fue investigado por estudio histológico y complementado por ensayo bioquímico con niveles de enzimas hepáticas. La fragmentación del ADN en las células somáticas se determinó a través del ensayo TUNEL. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto un aumento en los niveles de enzimas hepáticas de las ratas tratadas en comparación con los controles. El estudio histológico mostró que el plomo puede inducir varias alteraciones tales como la hipertrofia de los hepatocitos, el espacio portal y dilatación de la vena central, vacuolización e infiltración linfocítica. El ensayo TUNEL reveló una importante fragmentación del ADN en las ratas expuestas a plomo. Se concluye que el acetato de plomo puede ser considerado como un fuerte agente hepatotóxico y genotóxico (18).

Shakoori et al (Pakistan, 2013) estudiaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de arsénico y cadmio en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AMSCs). Las células fueron expuestas a 1,10 g/mL y 10-100 ug/mL de concentración de arsénico y plomo, respectivamente, y fueron evaluadas a las 6, 12, 24 y 48 h. Los efectos citotóxicos se midieron mediante ensayo de captación de rojo neutro,

mientras que los efectos genotóxicos por el ensayo cometa. El crecimiento de las células disminuyó al aumentar la concentración y la duración de la exposición al arsénico. Incluso la morfología de las células cambió; se convirtieron con dosis de 10 ug/mL de arsénico. El crecimiento celular se redujo también después de la exposición al plomo, a pesar de que resultó ser menos tóxico cuando las células fueron expuestas durante más tiempo. La morfología celular se mantuvo sin cambios. Se observó daño del ADN las células tratadas con ambos metales. En comparación con las células expuestas a plomo, se observaron núcleos intactos las células control. El presente estudio demuestra claramente que arsénico y plomo tiene efectos citotóxicos y genotóxicos en AMSCs, aunque el arsénico en comparación con el plomo tiene efectos más deletéreos sobre las AMSCs (19).

Egiebor et al (US, 2013) evaluaron la cinética de la toxicidad de cuatro metales pesados conocidos por causar problemas severos de salud y ambientales - cadmio (Cd), mercurio (Hg) plomo (Pb) arsénico (As) - y la mezcla de los cuatro metales MCF7, en presencia y ausencia del antioxidante glutatión (GSH). El estudio se realizó mediante la detección electrónica de células en tiempo real (RT-CES). RT-CES monitorea en tiempo real los cambios de impedancia eléctrica en la interfaz de electrodo / medio de cultivo debido al número de células adheridas, que se utiliza como índice de viabilidad celular. Las células se sembraron durante 24 h antes de la exposición a los metales ya sus mezclas. Los resultados mostraron que en presencia y ausencia de glutatión celular, el arsénico fue el más citotóxico de los cinco tratamientos, induciendo la muerte celular después de 5 horas de exposición. El plomo fue el menos citotóxico en ambos escenarios. En presencia de GSH celular, la tendencia citotóxica fue As> Cd> MIX> Hg> Pb, mientras que en ausencia de GSH, la tendencia citotóxica fue As> Hg> MIX> Cd> Pb. Los hallazgos de este estudio indican la importancia de la toxicidad mediada por glutatión de los metales examinados -particularmente para el mercurio- y pueden ser clínicamente relevantes para trastornos tales como trastornos del espectro autista en los que la disminución de la

capacidad de desintoxicación basada en glutathione se asocia con una mayor intoxicación por mercurio (20).

Nandi et al (India, 2010) examinaron el efecto del cadmio y el plomo sobre la viabilidad del ovocito de búfalo y el desarrollo in vitro. Los ovocitos fueron aspirados de ovarios de búfalos sacrificados. Sólo se seleccionaron oocitos viables y metabólicamente activos con más de tres capas de células cúmulos y un ooplasma homogéneo. Se estudiaron los efectos de nueve concentraciones (0, 0.005, 0.05, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5, y 10 microg / mL) de cadmio o plomo en la viabilidad del ovocito de búfalo, anomalías morfológicas, maduración y desarrollo embrionario in vitro. Se encontró que el cadmio y el plomo tienen un efecto dependiente de la dosis sobre la viabilidad, las anomalías morfológicas, la maduración, la escisión y el rendimiento de mórula / blastocisto, y la eclosión de blastocistos. Se observó una disminución significativa en la viabilidad de los ovocitos a 1,0 mg / ml de cadmio o plomo en comparación con el grupo control. Las dosis de cadmio y plomo que causan 100% de muerte de ovocitos (cultivo de 1 día) fueron de 18 y 32 microg / mL, respectivamente. Cadmio y plomo a 1,0 y 2,5 microg / mL, respectivamente, causó una reducción significativa de la maduración de los ovocitos en comparación con las concentraciones más bajas. No se produjo escisión o mórulas / blastocistos cuando los oocitos / embriones se cultivaron en medios que contenían 2,5 y 5,0 mg / ml de cadmio o plomo, respectivamente. De forma similar, no se produjeron mórulas / blastocistos a partir de embriones escindidos cultivados en medios que contenían 2,5 y 5,0 microg / ml de cadmio y plomo, respectivamente. El bloqueo del desarrollo, la degeneración y las divisiones asincrónicas fueron mayores en los embriones expuestos al cadmio que en los expuestos al plomo. En conclusión, el cadmio y el plomo disminuyeron la viabilidad y el desarrollo de los ovocitos de búfalo, pero a una concentración mayor que la estimada en los fluidos corporales y el medio ambiente. Se encontró que el cadmio era más ovotóxico que el plomo (21).

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Características físico químicas del plomo

El plomo es un metal clasificado en la familia IVA de la tabla periódica con un número atómico de 82 y un peso molecular de 207.19 g/mol trabaja con dos estados de oxidación 2+ y 4+ siendo el primero el más estable ya que en solución se comporta como catión divalente. Es un metal azul grisáceo cuando se obtiene en forma pura, aunque se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza formando gran variedad de compuestos orgánicos, inorgánicos y aleaciones. El hombre lo ha utilizado en diversas actividades desde la antigüedad. Se sabe que los egipcios y los hebreos ya lo usaban y los fenicios ya lo extraían en España desde 2000 años a. de C. También se cree que contribuyó en gran medida a la caída del imperio romano ya que se sabe que estos utilizaban indiscriminadamente el mineral en la fabricación de vasijas, utensilios para cocina y tuberías, trayendo con esto una epidemia de intoxicación por plomo que se veía reflejada en el gran número de nacimientos de niños con deformaciones, daño cerebral e incluso mortinatos. Al correr de los años, los compuestos de plomo fueron ganando cada vez más usos en la industria, hasta nuestros días en los que se utiliza en cantidades gigantescas (22).

Debido a su abundancia y a sus propiedades químicas y físicas el plomo es utilizado en infinidad de procesos e industrias. Las aleaciones de plomo son utilizadas en la fabricación y reciclamiento de acumuladores, en soldaduras y como recubrimiento en algunos conductores. Los compuestos inorgánicos de plomo por su parte son utilizados en pigmentos, en el vidriado de la cerámica y en la fabricación de vidrio, municiones y algunos plásticos. Mientras que los compuestos orgánicos de plomo como el tetrametil y el tetraetil de plomo fueron ampliamente utilizados como antidetonantes en las gasolinas. Además de esto, existen nuevos usos de los compuestos de plomo entre los que destacan; protección contra radiaciones ionizantes, en computadoras, televisores y equipo médico de resonancia magnética nuclear, soldaduras para equipos de cómputo, cerámicas para tecnología de ultrasonido y lentes

de alta precisión para láseres y fibras ópticas. Existen otros compuestos de plomo que no necesariamente son utilizados en la industria, pero que representan una fuente importante de este mismo, por ejemplo; las bebidas alcohólicas y el humo del cigarro representan una fuente potencial de exposición al plomo (23).

2.2.2. Toxicología del plomo

Para entender los efectos del plomo en el organismo es necesario saber; cual es la vía de exposición, de qué manera se distribuye y como es que se elimina del cuerpo, es decir, que es lo que sucede dentro del organismo posterior a la exposición a plomo. Es importante recordar que la vía de exposición es variada al igual que los compuestos y las fuentes de la misma, por lo que, debemos mencionar que las dos vías de exposición más importantes son la ingestión e inhalación ya que la absorción por la piel es mínima (24).

Absorción. Depende en gran medida de la vía por la cual el plomo ingresó al organismo ya que la tasa de absorción es diferente y esta a su vez depende del tamaño de partícula y la solubilidad del compuesto al que se estuvo expuesto. Además, es necesario considerar la edad en la persona expuesta ya que se ha reportado que los niños tienen una mayor absorción que los adultos del plomo (25), aunado a que la exposición vía inhalatoria es la más representativa (ver figura 1), ya que la tasa de absorción en los pulmones es más elevada en comparación con otras vías de exposición (24).

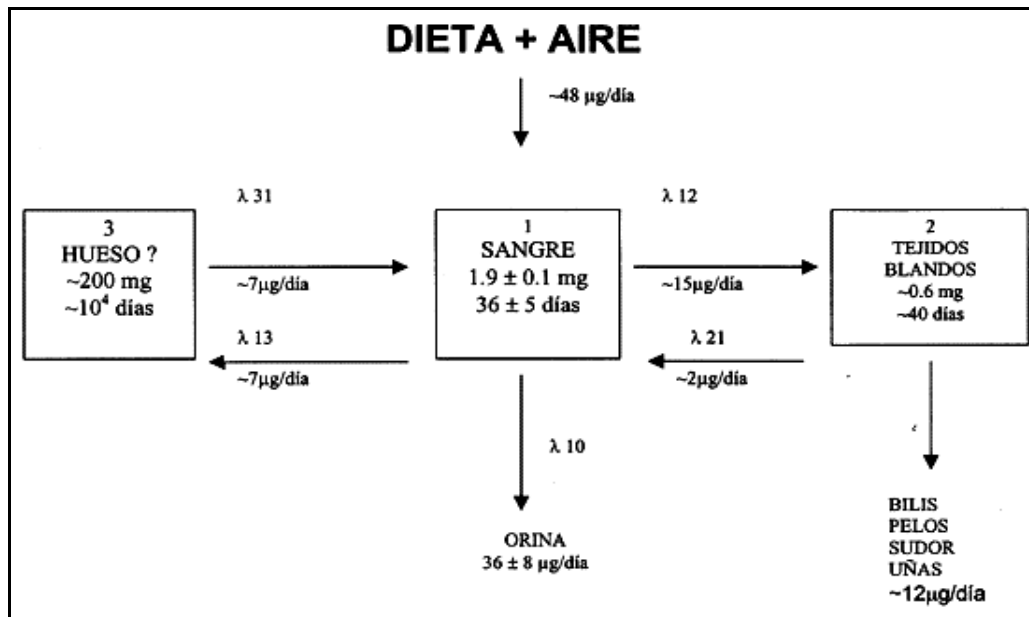


Figura 1. Metabolismo del plomo (Fuente: Rabinowitz et. al., 1976)

Distribución. El plomo una vez que ingresa al organismo es distribuido a través del torrente sanguíneo donde se ha visto que se une a proteínas del plasma y rápidamente se equilibra entre los fluidos extracelulares y el plasma para después ser transferido a los eritrocitos en los cuales se integra en la membrana celular, hemoglobina y otros componentes eritrocitarios. Posterior a esta integración en sangre se puede observar una alta afinidad del plomo por órganos constituidos principalmente por tejido blando como el hígado y el riñón en los cuales se alcanzan altas concentraciones de plomo por acumulación del mismo (24).

También se ha observado que el plomo tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica lo cual provoca una acumulación en el tejido nervioso, en menor magnitud que en el hígado y el riñón (24). En órganos de tejido blando, es en el riñón en el cual se encuentra la mayor concentración de plomo seguido por hígado, corazón y cerebro (26).

Es de especial relevancia el hecho de que el plomo se acumule en una alta proporción en hueso ya que el 90% del plomo corporal se encuentra en este por largos periodos de tiempo (24). Por lo que el modelo de distribución que adopta el plomo se reduce a tres compartimentos; el

primero, el de transporte a corto plazo (sangre), el segundo, el de almacenaje intermedio (tejidos blandos) y el tercero de almacenaje a largo plazo (hueso), (27) lo cual se muestra en la figura 2. Por ultimo solo queda mencionar que el tiempo de vida media del plomo en sangre es aproximadamente de 30 días mientras que en hueso es de 17 años, siendo 9 μg almacenados diariamente en promedio en individuos no expuestos ocupacionalmente (24).

Excreción. El plomo es excretado a través de la orina y las heces. Este proceso se lleva a cabo en el riñón por filtración glomerular y secreción tubular. Se ha observado un equilibrio entre los niveles del metal en sangre y orina, es decir, cuando se observa una alta concentración de plomo en sangre la concentración en orina también aumenta. La excreción en heces se ha visto que es reducida, ya que es aproximadamente la mitad que en orina. El plomo también puede excretarse por medio de sudor, uñas, pelo y leche materna (24).

2.2.3. Procesos moleculares involucrados en el daño celular

Debido al hecho de que el plomo representa un problema serio de contaminación debido en gran parte a la variedad de fuentes donde se genera, resulta evidente que la mayoría de los seres vivos estamos expuestos constantemente a él, susceptibles a sus efectos tóxicos (24).

La intoxicación aguda por plomo se caracteriza por la presencia de cólico, dolor de cabeza, calambres, debilidad muscular, depresión, coma y la muerte (28).

En lo que se refiere a la intoxicación crónica, se ha observado que el plomo se deposita con facilidad en la mayoría de los tejidos del organismo y que por lo mismo puede causar daño en estos, por lo tanto el daño será observado a diferentes niveles y con diversos síntomas dependiendo de la dosis, la edad y el tiempo de exposición. Esta intoxicación crónica es considerada generalmente como un síndrome neuromuscular, incluyendo parálisis de los nervios motores periféricos,

aunque los efectos de esta intoxicación en otros sistemas son bien conocidos (28). Los efectos tóxicos sistémicos reportados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Efectos tóxicos del plomo

Sistema afectado	Efecto
Nervioso	Epilepsia, retraso mental, neuropatías ópticas, ceguera, decremento del CI
Hematológico	Anemias, incremento de reticulocitos, basofilia difusa, deficiencia de hierro.
Renal	Daño al riñón que puede ser agudo (reversible) o crónico (irreversible).
Cardiovascular	Hipertensión
Inmunológico	Disminución de anticuerpos IgA, IgG, IgM y C3 del complemento, así como disminución en el porcentaje de TCD4 e incremento de TCD8.
Reproductor	Oligospermia, volumen de esperma, alteraciones en la movilidad y estructura de los espermatozoides.

A medida que se han descrito los efectos del plomo en los distintos sistemas del organismo, también se han estudiado sus efectos dependientes de la concentración en niños y en adultos los cuales podemos ver en la figura 2.

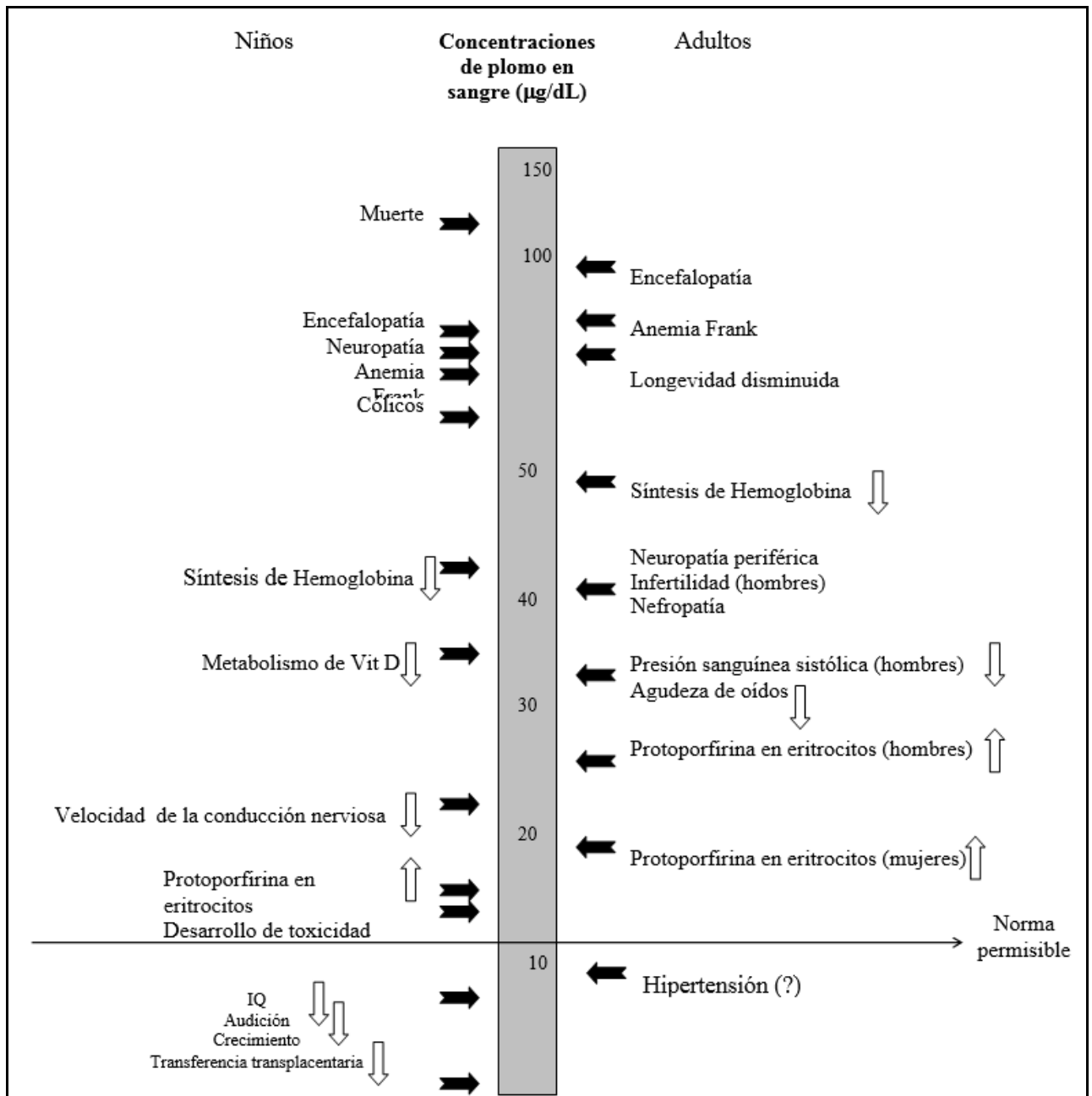


Figura 2. Toxicidad asociada al Plomo y su relación con niveles de Pb en sangre, en niños y adultos. La línea representa la concentración permisible en sangre como norma. (Fuente: García-García, 2005 y ATDSR, 2007).

Genotoxicidad

La exposición a plomo ha demostrado dañar el DNA, por lo que se considera genotóxico (28). Existen varias maneras de evaluar este hecho y algunas de ellas han sido utilizadas para evidenciar este efecto producido por el plomo. Pueden existir dos formas por las cuales el plomo

cause este daño genotóxico; de manera directa, en la cual la interacción del plomo con el ADN genera daño en éste (28), y de manera indirecta, a través de mecanismos de acción desencadenados por el metal tales como, la generación de estrés oxidativo, alteración de los mecanismos de reparación, entre otros, que sean los causantes directos del daño producido en el ADN. En la tabla 2 se muestra a manera de resumen las pruebas cortas, (short test), en las cuales se ha demostrado el efecto genotóxico del plomo (28).

Tabla 2. Pruebas de genotoxicidad positivas para plomo.

Infidelidad de la síntesis de DNA in vitro
Daño en el DNA de células de mamífero
Aberraciones cromosómicas en células de mamífero
Intercambio de cromátides hermanas en células de mamífero
Mutaciones en TK o HGPRT en células de mamífero
Transformación morfológica
Aumento de transformación viral
Letales dominantes y letales recesivos ligados al sexo en <i>Drosophila</i>
Anormalidades en espermias en mamíferos en pruebas in vivo
Mutaciones o aberraciones cromosómicas en plantas grandes

Fuente: Johnson, 1998

Carcinogenicidad

Los compuestos inorgánicos de plomo están catalogados por la IARC (1) en el grupo 2B, es decir, como posibles carcinógenos para humanos; mientras que los compuestos orgánicos de plomo son catalogados dentro del grupo 3, es decir, no clasificables como carcinógenos para humanos. Los cánceres asociados con la exposición a plomo son; pulmón, estomago, hígado y vejiga (29).

En los estudios realizados en animales se ha obtenido suficiente evidencia para catalogar a los compuestos de plomo como carcinógenos

en animales. A partir de estos trabajos, se considera que la exposición a altas concentraciones de acetato de plomo y de fosfato de plomo son carcinogénicas para roedores y el cáncer que con mayor frecuencia se presenta es el cáncer de riñón (1).

Si bien, la capacidad transformante del plomo en animales es una realidad al igual que su asociación con algunos cánceres humanos, los mecanismos de acción mediante los cuales se generan estos efectos son propuestas basadas principalmente en estudios *in vitro* (30)

2.2.4. Mecanismos de acción del plomo

El plomo por sus características de catión divalente resulta una molécula altamente reactiva bioquímicamente, es decir, puede involucrarse en diversos procesos celulares y alterar la homeostasis celular, debido a que no es un ion esencial (7). Por esto, la mayoría de los mecanismos asociados a la toxicidad del plomo están involucrados en procesos donde participan otros iones divalentes que si son esenciales para el funcionamiento celular, tales como el calcio (28).

En la figura 3 se esquematizan los mecanismos de acción que explican la toxicidad del plomo.

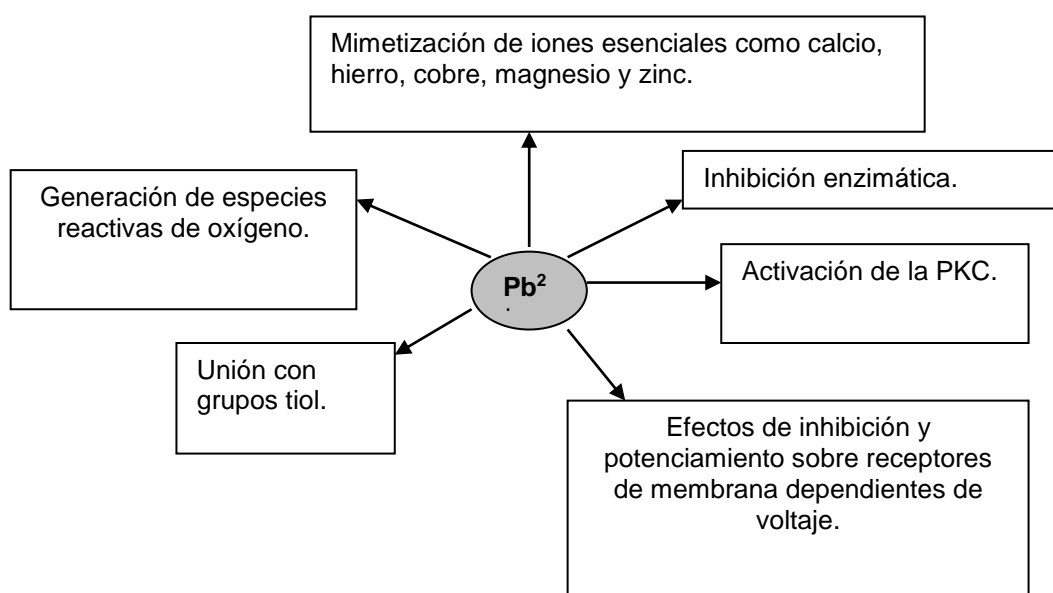


Figura 3. Mecanismos de acción del plomo (Fuente: Johnson, 1998).

2.3. BASES LEGALES

2.3.1. Normativa internacional

ISO 9001:2015. Es la base del sistema de gestión de la calidad ya que es una norma internacional y que se centra en todos los elementos de administración de calidad con los que una empresa debe contar para tener un sistema efectivo que le permita administrar y mejorar la calidad de sus productos o servicios (31).

ISO 15189. Es una norma internacional desarrollada por ISO (International Organization for Standardization) para el laboratorio de análisis clínicos que quiere especificar los requisitos generales para su competencia técnica. Bajo esta norma los laboratorios clínicos pueden acreditarse (32).

ISO 17025. Es una normativa internacional desarrollada por ISO (International Organization for Standardization) en la que se establecen los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración. Se trata de una norma de Calidad que tiene base en la serie de normas ISO 9000, aunque introduce una serie de requisitos técnicos imprescindibles para lograr la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración (33).

BPL. Es un conjunto de reglas, de procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) Organization for Economic Cooperation and Development (OCDE), o la Food and Drug Administration (FDA), etc.), que se consideran de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en determinados tipos de investigaciones o estudio (34).

2.3.2. Normativa en Perú

Ley N° 26842, Ley General de Salud. Norma sobre el cual se rige todo el sistema nacional de salud en Perú. Es de aplicación y alcance para instituciones estatales y privadas (35).

NTS N° 0021- MINSA/DGSP V.01. Este documento busca contribuir a la mejora de la organización de los servicios de salud estableciendo claramente las categorías de establecimientos necesarios para cada nivel de atención. Esta norma técnica se aprobó con Resolución Ministerial N° 769-2004/MINSA, Norma Técnica de Categorías de Establecimientos del Sector Salud (36).

NTP-ISO 15189:2004. Esta norma fue aprobada con Resolución N° 0071-2004/CTR-INDECOPI y especifica los requisitos relativos a la calidad y la competencia de los laboratorios clínicos y además para uso de los laboratorios clínicos en el desarrollo de sus sistemas de gestión de la calidad y la evaluación de sus propias competencias, y para uso por los organismos de acreditación en la confirmación o reconocimiento de la competencia de los laboratorios clínicos (37).

NTS N° 050–MINSA/DGSP-V02. Norma Técnica de Salud para la Acreditación de Establecimientos de Salud y Servicios Médicos de Apoyo. Esta norma fue aprobada con N° 777-2007/MINSA y busca contribuir a garantizar a los usuarios y al sistema de salud que los establecimientos de salud o servicios médicos de apoyo, según su nivel de complejidad, cuenten con capacidades para brindar prestaciones de calidad sobre la base del cumplimiento de estándares nacionales previamente definidos (38).

NTS N° 072-MINSA/DGSP-V.01. Norma que busca establecer los criterios para la organización y el funcionamiento de la UPS de Patología Clínica, que permita una adecuada gestión en la misma. También permite (i) regular las condiciones de infraestructura, equipamiento y recursos humanos para brindar el servicio de Patología Clínica, (ii) establecer los criterios referidos a gestión, organización y prestación de servicios de la UPS de Patología Clínica con énfasis en la calidad, seguridad y oportunidad y (iii) asegurar el flujo adecuado de los recursos

destinados a la atención de los pacientes en la UPS de Patología Clínica, así como promover el uso racional de los mismos (39).

NTS N° 111-MINSA/DGE-V01. Documento técnico que tiene el objetivo de establecer los lineamientos para la implementación de la vigilancia epidemiológica en salud pública de factores de riesgo por exposición por metales pesados y metaloides en la población de Perú (40)

Guía de práctica clínica (RM N° 511-2007/MINSA). Documento técnico creado para establecer acciones concretas en el manejo de pacientes con intoxicación por plomo (41)

2.4. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Acetato de plomo. Es un compuesto químico cristalino de color blanco con un sabor ligeramente dulce. Se obtiene tratando litargirio (óxido de plomo (II) o PbO) con ácido acético. Al igual que otros compuestos plúmbeos, es una sustancia muy tóxica. El acetato de plomo es soluble en agua y glicerina. Con agua, forma el trihidrato, $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$, una sustancia cristalina monoclinica eflorescente de color blanco o incoloro.

BPL. Siglas en castellano que indican Buenas Prácticas de Laboratorio y es un conjunto de directrices que deben cumplirse en cada actividad desarrollada dentro del laboratorio clínico.

Bromuro de etidio. Es un agente intercalante usado comúnmente como aclarador de ácidos nucleicos. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN. Este efecto es debido al aumento de la hidrofobia del medio, y no a la rigidificación del anillo bencénico, no estando éste entre pares de bases del ADN. Como el bromuro de etidio se intercala en el ADN, esta sustancia tiene un

poderoso efecto mutágeno y, posiblemente puede ser cancerígeno o teratógeno.

Células mononucleares de sangre periférica. Son células sanguíneas caracterizadas por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos y forman parte fundamental del sistema inmune.

Citotoxicidad. Es la cualidad de ser tóxico a células y se evalúa mediante el cociente de células muertas sobre el total de células contadas.

CLIA. Siglas en inglés que indican Clinical Laboratory Improvement Amendments, el cual es una institución que señala los requerimientos que deben cumplir los laboratorios clínicos en Estados Unidos, y se utiliza como referencia en muchos laboratorios a nivel mundial.

Diacetato de fluoresceína. Es un fluorocromo que emite una fluorescencia verde cuando es excitado por luz a una longitud de onda de 495 nm, en respuesta al metabolismo de hidrólisis por enzimas citoplasmáticas.

EDTA. Es el ácido etilendiaminotetraacético, la cual es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con un metal que tenga una estructura de coordinación octaédrica. Es utilizada como agente anticoagulante de la sangre, quelando al calcio en sangre para evitar la activación de la cascada de coagulación.

In vitro. Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un tubo de ensayo, o generalmente en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

ISO. Siglas que proviene de los términos en inglés "International Organization for Standardization", institución dedicada a la creación de estándares internacionales compuestos por diversas organizaciones nacionales de estandarización.

Plomo. Elemento químico de número atómico 82, masa atómica 207,19 y símbolo Pb; es un metal sólido de color gris azulado, blando, maleable, dúctil, de elevada densidad y mal conductor de la electricidad; se encuentra principalmente en la galena, de donde se extrae; se usa en la fabricación de baterías, en el revestimiento de cables eléctricos, en las tuberías, balas de armas de fuego, tanques y aparatos de rayos X, como protector de materiales radiactivos, en pinturas, tintes y barnices, entre otros productos.

Precisión. Es el grado de dispersión de un conjunto de datos con respecto a un valor central.

Variabilidad. Es una cualidad que permite valorar el grado de tendencia de un conjunto de variables.

Venipunción. Es la extracción de sangre de una vena, generalmente tomada por un profesional y/o técnico de la salud.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. Hipótesis general

- ✓ El tratamiento con concentraciones equivalentes a niveles de exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana induce citotoxicidad celular

3.1.2. Hipótesis específicas

- ✓ El nivel de citotoxicidad celular inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana es variable en cada tratamiento probado.
- ✓ La concentración de acetato de plomo que induce menor y mayor citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana sigue un patrón dosis-dependiente.
- ✓ La cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana incrementa positivamente según tiempo.

3.2. VARIABLES DE ESTUDIO

Dependiente

- Citotoxicidad celular

Independiente

- Tratamiento con acetato de plomo
- Tiempo

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

De acuerdo al estudio planteado y a la identificación de las variables, para cada una de éstas se han determinado sus indicadores. **Ver Anexo 01.**

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

4.1.1. Tipo de investigación

- Según la manipulación de la variable

Estudio experimental: Implica que hubo manipulación de la variable independiente. El tratamiento de las células mononucleares en sangre periférica fue realizado con acetato de plomo que fueron de menor a mayor concentración, para evaluar el efecto producido sobre la viabilidad celular, expresado como citotoxicidad celular, a fin de valorar dosis-respuesta en un modelo celular in vitro.

- Según la fuente de toma de datos

Prospectivo: La fuente de recolección de datos se realizó durante el mes de marzo del año 2017. Esto implicó la obtención de muestras de sangre para su análisis respectivo con generación de resultados de forma progresiva sin la necesidad de recolectar datos históricos.

- Según el número de mediciones

Longitudinal: La citotoxicidad fue medida más de una vez en función al tiempo de incubación con el acetato de plomo, para evaluar el efecto citotóxico en cada tratamiento realizado.

- Según el número de variables a analizar

Analítica: Los datos generados de las mediciones basales y finales fueron analizados mediante pruebas estadísticas para estimar si existen diferencias significativas entre ellas, en relación al tratamiento realizado con el acetato de plomo.

4.1.2. Diseño: Modalidad cuantitativa

Se diseñó un estudio experimental, prospectivo, analítico, de corte longitudinal.

4.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

Experimental: Ya que se plantean hipótesis que, para poder ser contrastadas, requieren de un experimento con poblaciones de condiciones o características uniformes, con grupo experimental y grupo control, entendiéndose necesario, una prueba basal antes de aplicar el cambio (o la causa principal, variable independiente), y otras prueba de monitoreo y final para comprobar el cambio prospectivo.

4.3. MÉTODO

El presente trabajo de investigación es de carácter experimental que sigue un método de causalidad (Causa-efecto; o dosis-respuesta).

4.4. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN

4.4.1. Población

Estuvo constituida por todas las muestras de sangre colectadas para el análisis de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica.

Criterio de Inclusión

- Muestras de sangre de individuos (de 18 años de edad a más, de ambos sexos).

- Muestras de sangre colectadas en tubos tapa lila de 4 mL.
- Muestras de sangre de individuos que tengan orden médica para el hemograma completo automatizado
- Muestras de sangre obtenidas según procedimientos establecidos en el Laboratorio II del Hospital de la Solidaridad del Distrito de Ica.

Criterio de Exclusión

- Muestras de sangre obtenidas en tubos que no tengan sistema de extracción al vacío y anticoagulante distinto al EDTA
- Muestras de sangre de pacientes con enfermedades oncohematológicas
- Recuento de células mononucleares en sangre periférica menor a 5000 cel/uL
- Muestras de sangre hemolizadas o no tengan el volumen adecuado según el tubo de extracción empleado

4.4.2. Técnica de muestreo

Determinación del tamaño de la muestra

La muestra fue obtenida de modo no probabilístico, puesto que se trabajó con células mononucleares de sangre periférica sometidas a tratamiento en diferentes dosis con acetato de plomo para evaluar la respuesta evidenciada en diferentes tiempos en relación a la citotoxicidad inducida in vitro.

Elección de los miembros de la muestra

La selección de las muestras de sangre fue según el cumplimiento de los criterios de elegibilidad requeridas para los ensayos.

Tratamientos con acetato de plomo

Se preparó una solución madre de acetato de plomo para obtener concentraciones equivalentes al rango de exposición ocupacional a plomo en Perú (40), además de concentraciones menores y mayores a estas. El nivel permisible de exposición ocupacional a plomo no debe exceder los 40 $\mu\text{g/dL}$ en sangre; por lo tanto se considerará tratamientos

que estén en el rango de 0.5-80 $\mu\text{g/dL}$, siguiendo el siguiente esquema en dos grupos de trabajo:

Grupo control: Células mononucleares en sangre periférica tratadas con suero fisiológico.

Grupo experimental: Células mononucleares en sangre periférica tratadas con acetato de plomo en las siguientes concentraciones:

Matriz	Equivalencia de concentraciones de acetato de plomo								
En sangre ($\mu\text{g/dL}$)	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	60.0	80.0
En solución (μM)	0.01875	0.0375	0.075	0.15	0.3	0.6	1.2	1.8	2.1

Diseño experimental

- ✓ Exposición de 5000 células mononucleares de sangre periférica (contadas en hemocitómetro) obtenidas por gradientes de ficoll-hipaque sometidas al tratamiento descrito anteriormente. Los tratamientos deben ser realizados por triplicado para cada concentración y tiempo de exposición (2, 12, 24, 48 y 72 horas), en incubación a 37°C.
- ✓ Las células tratadas deben ser evaluadas con la técnica para estudio de citotoxicidad celular en microscopía de fluorescencia.

4.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

4.5.1. Técnicas

Fichaje: Es una técnica auxiliar en investigación científica; consiste en registrar los datos que se van obteniendo en los instrumentos a través del uso de fichas, las cuales, debidamente elaboradas y ordenadas contienen la mayor parte de la información que se recopila en una investigación.

Observación: Es una técnica que consiste en observar atentamente el fenómeno, hecho o caso, tomar información y registrarla para su posterior

análisis. La observación es un elemento fundamental de todo proceso investigativo; en ella se apoya el investigador para obtener el mayor número de datos. Gran parte del acervo de conocimientos que constituye la ciencia ha sido lograda mediante la observación.

4.5.2. Instrumentos

Toma de muestras biológicas: La toma de muestra de sangre se realizó por venipunción en el antebrazo utilizando sistema de extracción al vacío en tubos de 4 mL con anticoagulante EDTA K3. El procedimiento para la extracción se realizó según las recomendaciones establecidas en el manual de procedimientos de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (33).

Obtención de PBMC por gradiente de densidad: Consiste en la separación de los componentes de la sangre periférica con el uso un agente coloidal de densidad cercana a 1.077 g/mL y a la centrifugación. Este proceso permitió la formación de capas que contienen diferentes tipos de células en base a su densidad. La capa inferior contiene a los hematíes y por encima una interfase de linfocitos y monocitos (PBMC) entre el plasma y el agente coloidal. Los PBMC se recuperaron de la interfase y se sometieron a pasos de lavado cortos con una solución isotónica para eliminar restos de plaquetas, hematíes y plasma. Ver anexo 03

Determinación de la citotoxicidad celular con FDA-BrEth: Este método determinó la viabilidad celular mediante la acción enzimática sobre el diacetato de fluoresceína (agente no fluorescente) para convertirse en fluoresceína (agente fluorescente) y la preservación de la integridad de la membrana celular mediante la exclusión de bromuro de etidio. Por lo tanto, las células viables tuvieron una coloración verde y las células no viables tendrán una coloración naranja correspondiente a la fluoresceína y al Bromuro de Etidio respectivamente. La revisión se realizó con un microscopio de fluorescencia. Ver anexo 04

4.5.3. Procedimientos para la recolección de los datos

a. Técnicas para el procesamiento

Las técnicas para el procesamiento de datos comprendieron las siguientes etapas:

Obtención de datos

Posterior a los tratamientos y estudio de citotoxicidad celular, se obtuvieron los registros manuales de cada experimento realizado, así como las fotografías de cada ensayo ejecutado.

Clasificación de datos

Los datos obtenidos fueron categorizados de acuerdo al cálculo de percentiles, pero también se mantuvieron en su condición de variables numéricas porque bajo esa característica es que se realizó el análisis estadístico empleando las pruebas de contraste de hipótesis a fin de estimar si existen diferencias significativas entre los resultados basales y finales debido a los distintos tratamientos con acetato de plomo.

Codificación

La asignación de códigos o valores a los resultados obtenidos fueron realizadas solo durante el análisis estadístico y el empleo del paquete estadístico STATA versión 14. Los resultados fueron ingresados tal cual se obtuvieron de la aplicación de los instrumentos.

Tabulación de datos

La información fue ingresada en el paquete estadístico STATA versión 14, en columna las variables y en filas los casos con el propósito de consolidar y totalizar en cifras a los resultados obtenidos, y generar información a través de los valores representativos y de estas el conocimiento para facilitar su posterior análisis e interpretación.

4.5.4. Criterios de validez y confiabilidad de los instrumentos

Para asegurar la confiabilidad de los resultados y no se genere sesgo debido a factores pre-analíticos se procesaron las muestras de sangre

inmediatamente después de la extracción de sangre por punción venosa. La separación por gradientes de densidad fueron realizados en una cabina de seguridad biológica para evitar contaminación de la muestra, y la tinción con el bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína fueron realizados en cámara oscura. Además, cada medición es realizada por triplicado esperando un coeficiente de variación menor al 15%.

4.5.5. Técnicas de análisis e interpretación de datos

Considerando que cada resultado generado fue producto de 3 réplicas consecutivas, se calculó la media aritmética y desviación estándar; así como el coeficiente de variación (<5%); pero solo como medidas de control de calidad interno. Posteriormente se evaluó la normalidad de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, considerando una probabilidad menor a 0.05 para ser aceptado como distribución normal, y en función a sus resultados, se empleó estadística paramétrica. Cada resultado obtenido de un tratamiento a una concentración de plomo distinto, fue comparado de forma pareada con los resultados del control, para el cual se utilizó la prueba T, tomando como diferencia significativa un valor de probabilidad menor a 0.05. Finalmente, se empleó gráficas tales como líneas, barras y caja-bigotes para representar la cinética de citotoxicidad en función al tiempo y en diferentes tratamientos realizados con el acetato de plomo.

4.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio no tuvo como unidad de análisis a las personas, sino a sus resultados derivados del estudio de citotoxicidad, información que fue obtenida en el laboratorio, en el cual la investigadora se comprometió al correcto manejo y tratamiento de datos de un modo confidencial, y garantizando el anonimato de los resultados; además de respetar los principios bioéticos de confidencialidad, beneficencia, no maleficencia, equidad y justicia.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS Y RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

5.1. RESULTADOS

El presente estudio de tesis tuvo por objetivo evaluar la citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (a través del estudio de la viabilidad celular) inducida por la exposición a acetato de plomo en un modelo experimental básico. Sin embargo, para tener un panorama general del estudio, se evaluó el comportamiento de la viabilidad celular en función a las distintas concentraciones de acetato de plomo que fueron sometidas las células mononucleares de sangre periférica obtenidas por gradientes de ficoll-hipaque.

En el Grafico 1, se evidencia que existe una disminución progresiva de la viabilidad celular, conforme aumenta la concentración de acetato de plomo en cada tratamiento. Considerando que la citotoxicidad celular es el complemento de la viabilidad celular, se puede señalar que la citotoxicidad celular presenta una relación directamente proporcional al aumento de la concentración de acetato de plomo, con un nivel de correlación alta ($R=0.9037$).

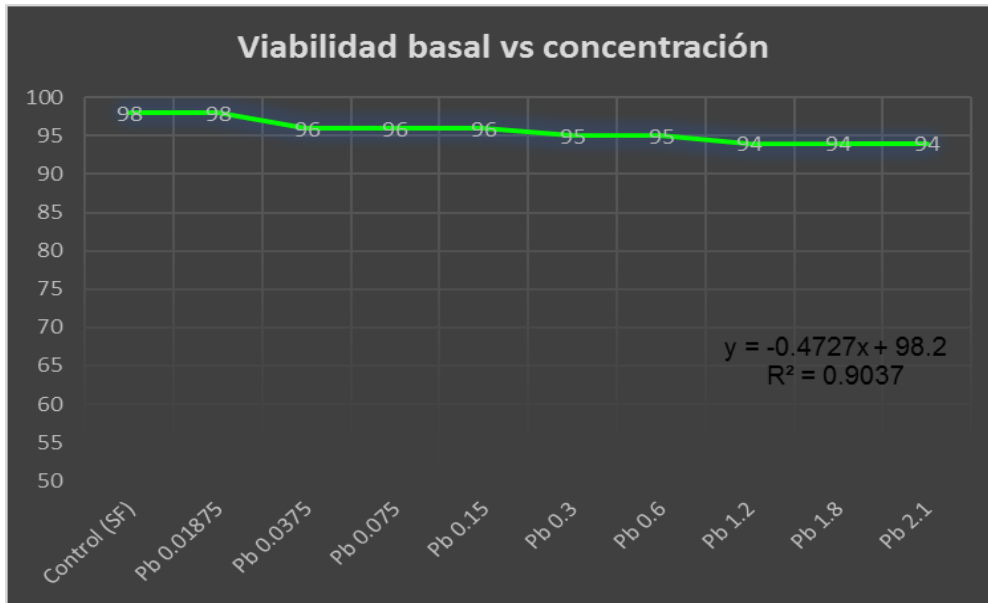


Gráfico 1. Viabilidad celular basal en concentraciones crecientes de acetato de plomo

En el Gráfico 2, se evidencia también una relación directa proporcional muy alta ($R=0.9751$) entre la citotoxicidad celular a las 2 horas post tratamiento y el incremento de la concentración del acetato de plomo, llegando casi a ser lineal perfecta.

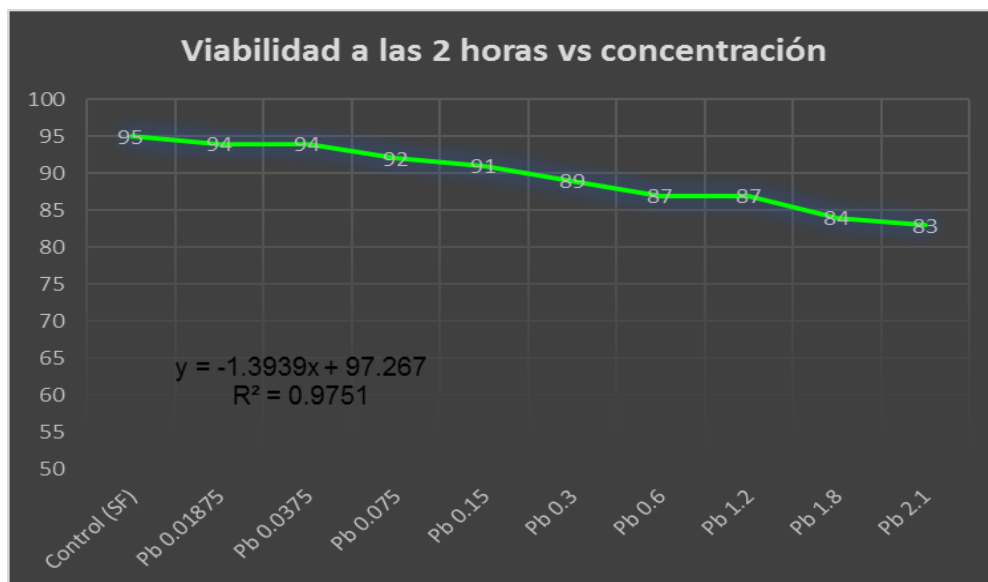


Gráfico 2. Viabilidad celular a las 2 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo

En el Gráfico 3, se evidencia relación directa proporcional alta ($R=0.9396$) entre la citotoxicidad celular a las 12 horas post tratamiento y el incremento de la concentración del acetato de plomo.

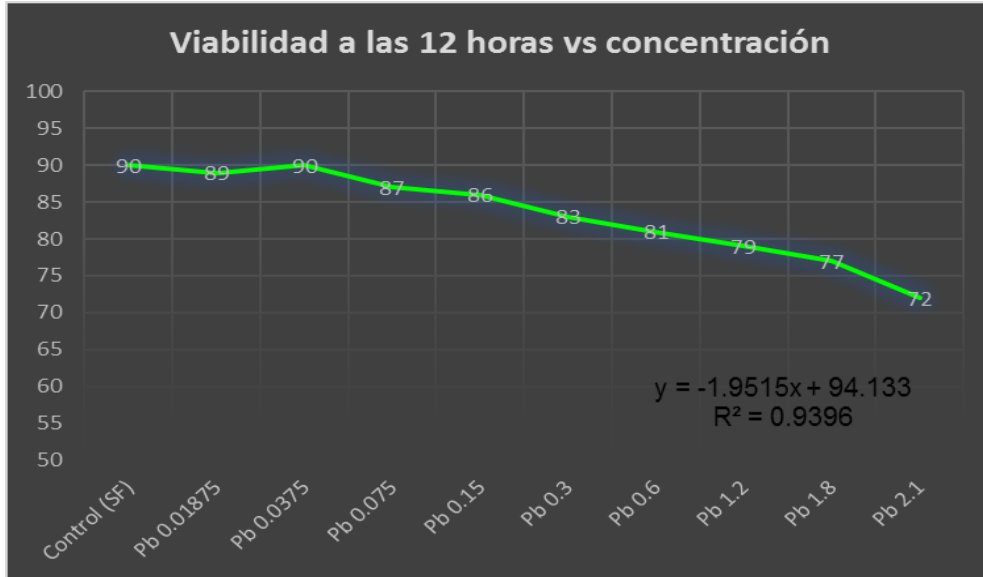


Gráfico 3. Viabilidad celular a las 12 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo

En el Gráfico 4, se evidencia relación directa proporcional alta ($R=0.9026$) entre la citotoxicidad celular a las 24 horas post tratamiento y el incremento de la concentración del acetato de plomo.

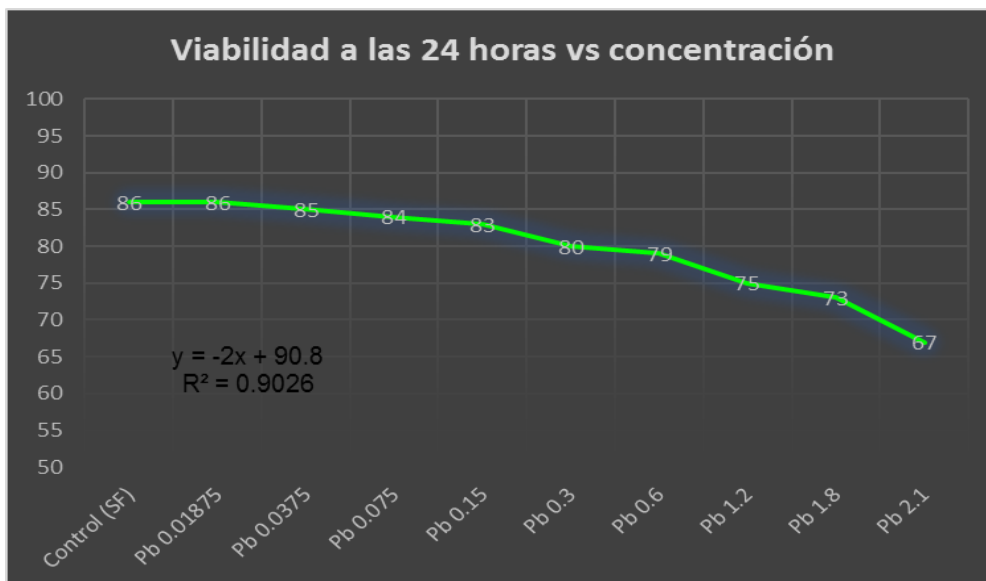


Gráfico 4. Viabilidad celular a las 24 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo

En el Gráfico 5, se evidencia relación directa proporcional alta ($R=0.8848$) entre la citotoxicidad celular a las 48 horas post tratamiento y el incremento de la concentración del acetato de plomo.

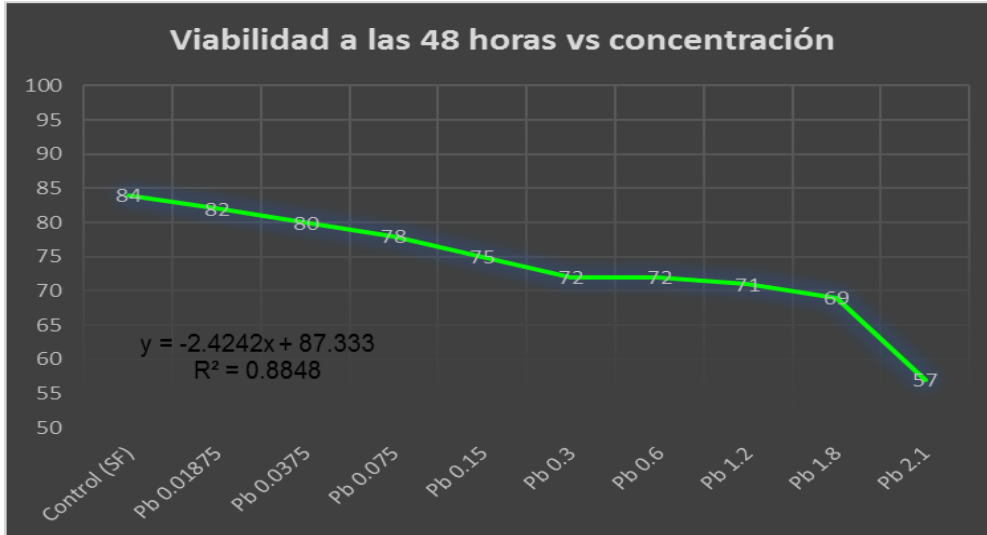


Gráfico 5. Viabilidad celular a las 48 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo

En el Gráfico 6, se evidencia relación directa proporcional muy alta ($R=0.9758$) entre la citotoxicidad celular a las 72 horas post tratamiento y el incremento de la concentración del acetato de plomo, siendo la relación lineal más alta de las evaluadas.

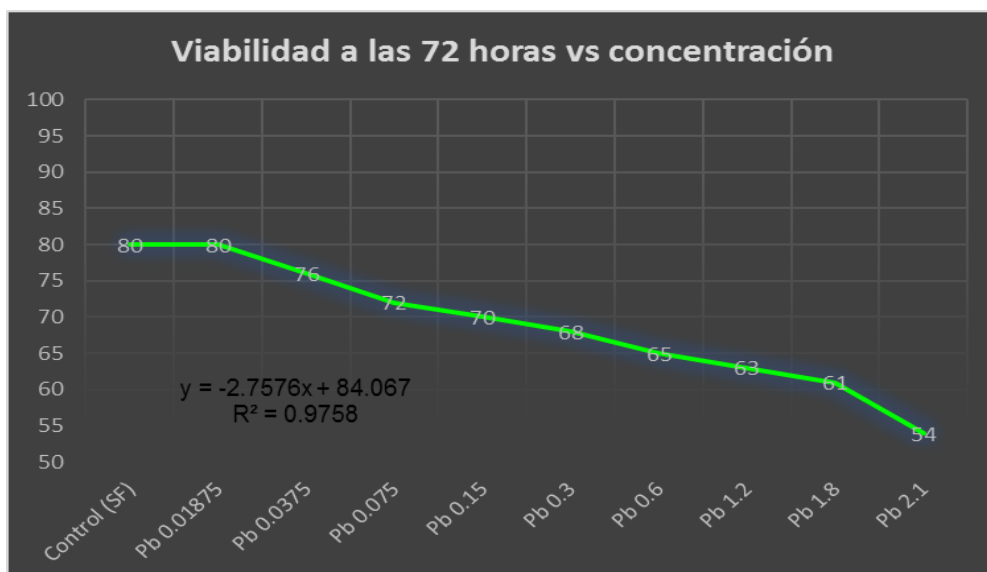


Gráfico 6. Viabilidad celular a las 72 horas en concentraciones crecientes de acetato de plomo

Los datos de viabilidad celular obtenidos en cada tiempo de evaluación fueron sometidos a un análisis de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, el cual evidencia que la distribución resultó normal para cada una de las concentraciones de acetato de plomo evaluadas a tiempo diferentes, considerando que el valor de la probabilidad no fue menor a 0.05.

Tabla 1. Evaluación de la distribución normal de la viabilidad celular

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Basal	10	0.95810	0.646	-0.719	0.76406
2 horas	10	0.92097	1.218	0.345	0.36515
12 horas	10	0.93759	0.962	-0.066	0.52650
24 horas	10	0.89125	1.676	0.934	0.17518
48 horas	10	0.93132	1.058	0.098	0.46104
72 horas	10	0.97087	0.449	-1.275	0.89881

Considerando que los datos presentaron distribución normal, se aplicó pruebas paramétricas para estimar diferencias significativas entre la viabilidad obtenida de un tratamiento a una concentración determinada de acetato de plomo, en comparación con resultados de viabilidad de células control; o sea no expuestas a acetato de plomo y tratadas con suero fisiológico.

La aplicación de la prueba T, requirió el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad (igualdad de varianzas), el cual fue estimada para la viabilidad control y en cada grupo tratamiento con acetato de plomo, hallándose valores de probabilidad menores a 0.05, cumpliendo con dicho supuesto.

En la Tabla 2, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad no presentan diferencias significativas ($p=0.1019$) entre el grupo control y el grupo tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $0.01785 \mu\text{M}$. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 7.

Tabla 2. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $0.01785 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control p~001875	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
	6	88.16667	2.833333	6.940221	80.88335	95.44998
diff	6	.6666667	.3333333	.8164966	-.1901939	1.523527

mean(diff) = mean(control - pb_001875) t = 2.0000
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5

Ha: mean(diff) < 0
 Pr(T < t) = 0.9490

Ha: mean(diff) != 0
 Pr(|T| > |t|) = 0.1019

Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T > t) = 0.0510

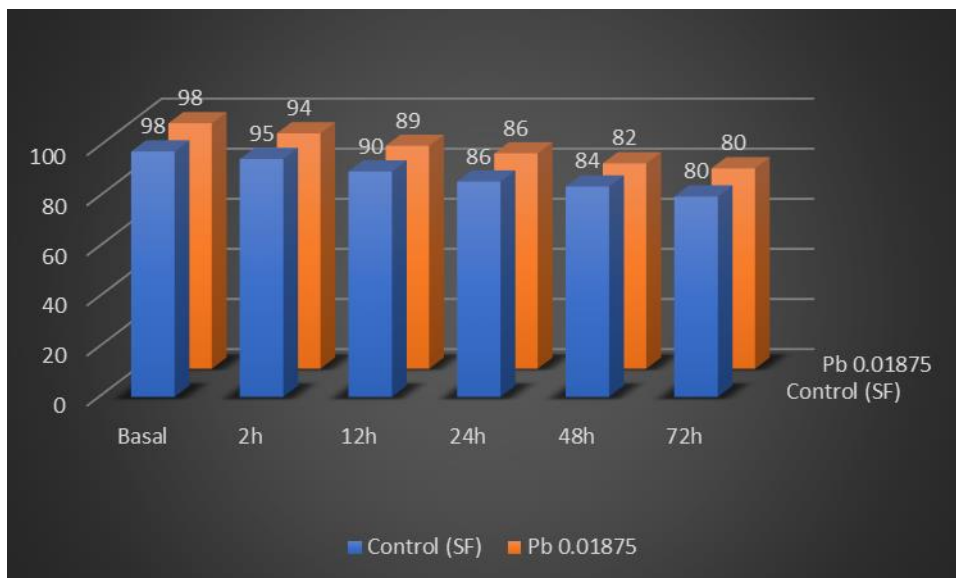


Gráfico 7. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $0.01785 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 3, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $0.0375 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 8.

Tabla 3. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $0.0375 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_00375	6	86.83333	3.229207	7.909909	78.53239	95.13427
diff	6	2	.6831301	1.67332	.2439583	3.756042

mean(diff) = mean(control - pb_00375) t = 2.9277
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5
 Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.9836 Pr(|T| > |t|) = 0.0327 Pr(T > t) = 0.0164

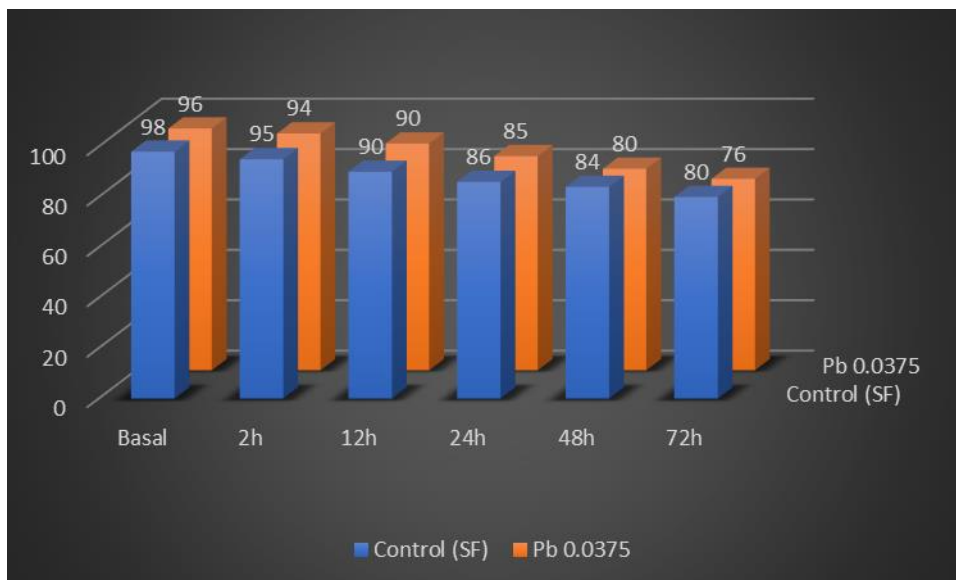


Gráfico 8. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $0.0375 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 4, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $0.075 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 9.

Tabla 4. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $0.075 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_0075	6	84.83333	3.618625	8.863784	75.53136	94.1353
diff	6	4	1	2.44949	1.429418	6.570582

mean(diff) = mean(control - pb_0075) t = 4.0000
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5
 Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.9948 Pr(|T| > |t|) = 0.0103 Pr(T > t) = 0.0052

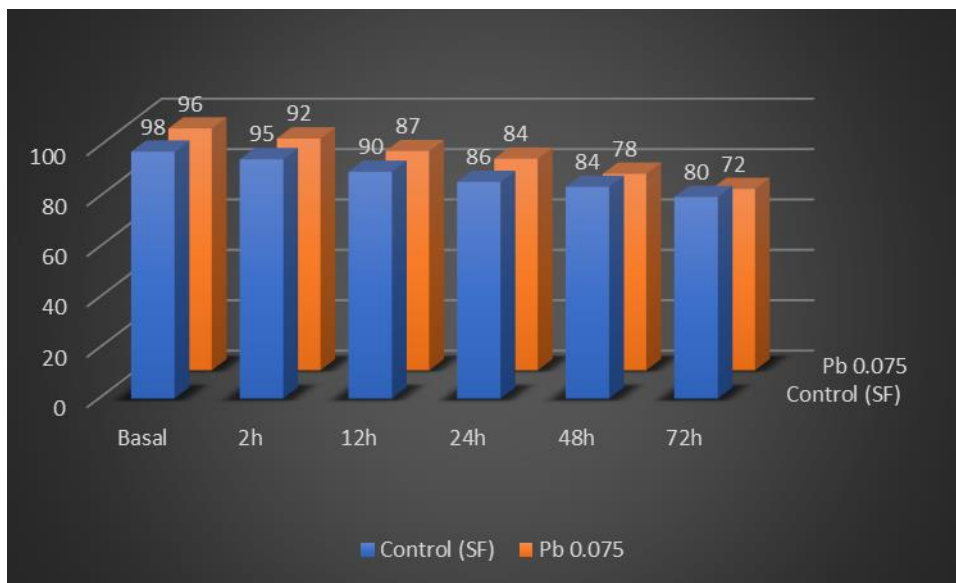


Gráfico 9. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $0.075 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 5, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de

medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $0.15 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 10.

Tabla 5. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $0.15 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_015	6	83.5	3.972824	9.731393	73.28753	93.71247
diff	6	5.333333	1.358103	3.32666	1.842218	8.824449

mean(diff) = mean(control - pb_015) t = 3.9270
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5

Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.9944 Pr(|T| > |t|) = 0.0111 Pr(T > t) = 0.0056

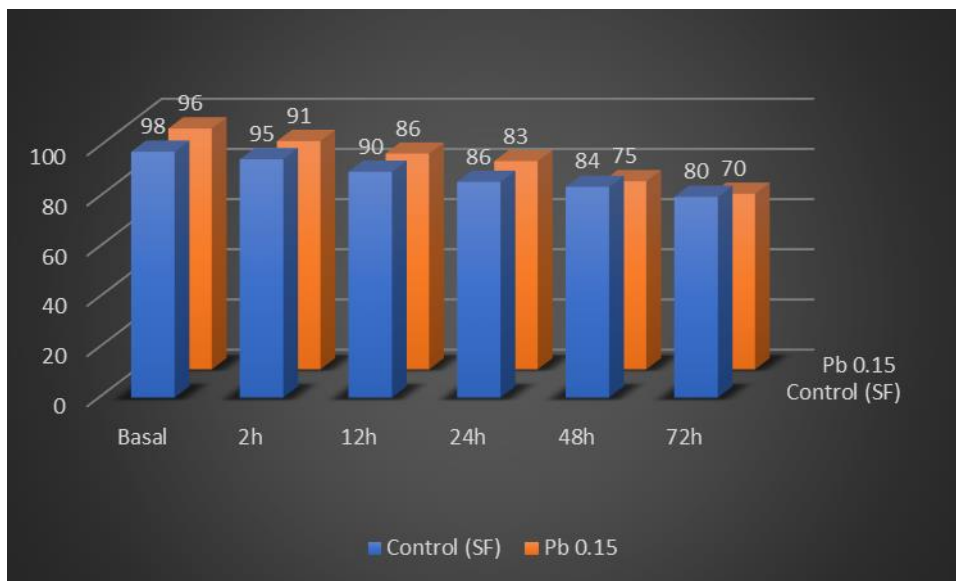


Gráfico 10. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $0.15 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 6, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $0.3 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 11.

Tabla 6. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $0.3 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_03	6	81.16667	4.142597	10.14725	70.51778	91.81555
diff	6	7.666667	1.47573	3.614784	3.873183	11.46015

mean(diff) = mean(control - pb_03) t = 5.1952
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5

Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.9983 Pr(|T| > |t|) = 0.0035 Pr(T > t) = 0.0017

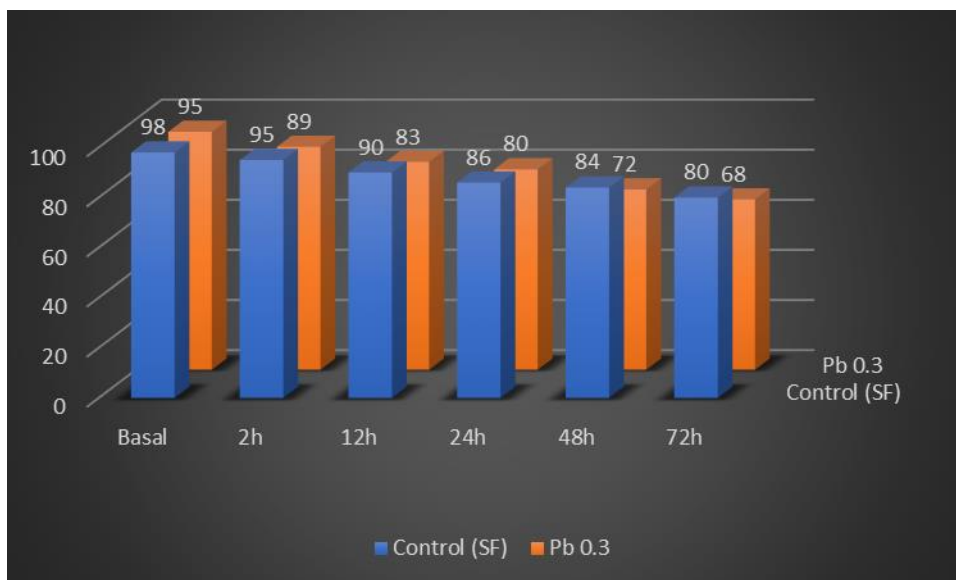


Gráfico 11. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $0.3 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 7, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $0.6 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 12.

Tabla 7. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $0.6 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_06	6	79.83333	4.339099	10.62858	68.67932	90.98734
diff	6	9	1.693123	4.147288	4.647688	13.35231

mean(diff) = mean(control - pb_06) t = 5.3156
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5

Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.9984 Pr(|T| > |t|) = 0.0032 Pr(T > t) = 0.0016

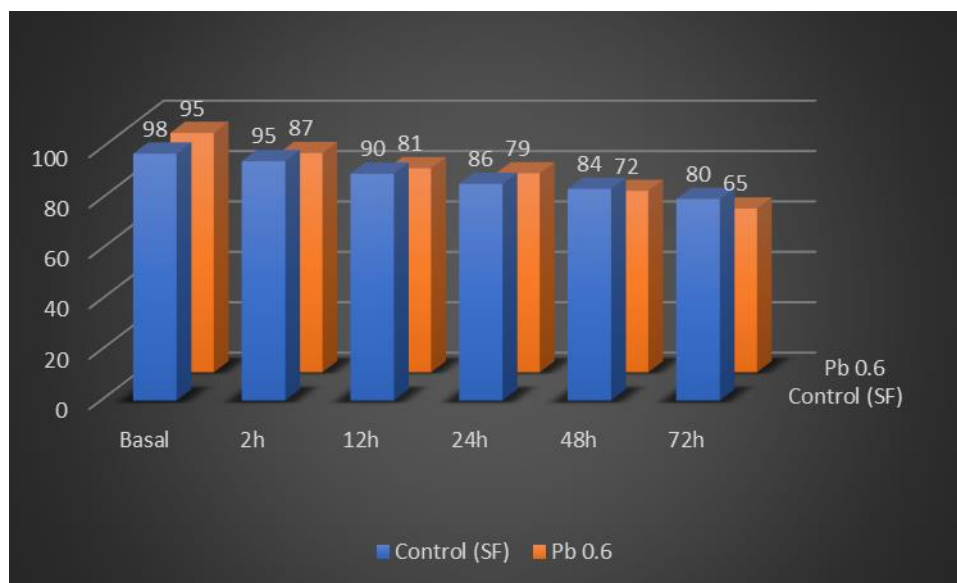


Gráfico 12. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $0.6 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 8, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $1.2 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 13.

Tabla 8. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $1.2 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_12	6	78.16667	4.549115	11.14301	66.4728	89.86054
diff	6	10.66667	1.801234	4.412105	6.036447	15.29689

mean(diff) = mean(control - pb_12) t = 5.9219
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5
 Ha: mean(diff) < 0 Ha: mean(diff) != 0 Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T < t) = 0.9990 Pr(|T| > |t|) = 0.0020 Pr(T > t) = 0.0010

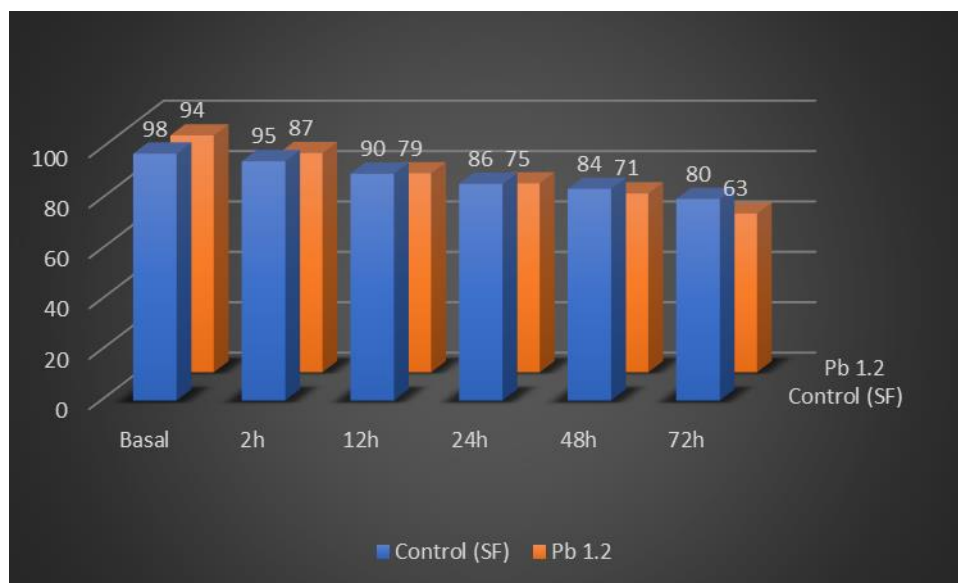


Gráfico 13. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $1.2 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 8, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $1.8 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 14.

Tabla 9. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $1.8 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_18	6	76.33333	4.730516	11.58735	64.17316	88.49351
diff	6	12.5	2.028957	4.969909	7.2844	17.7156

mean(diff) = mean(control - pb_18) t = 6.1608
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5

Ha: mean(diff) < 0
 Pr(T < t) = 0.9992

Ha: mean(diff) != 0
 Pr(|T| > |t|) = 0.0016

Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T > t) = 0.0008

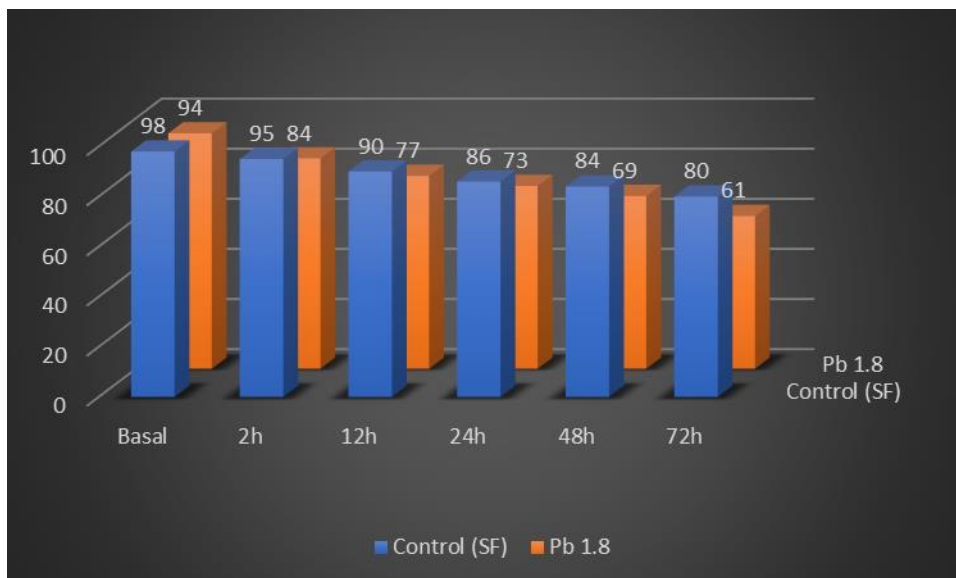


Gráfico 14. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $1.8 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

En la Tabla 10, se muestra los resultados de la prueba T para comparación de medias pareadas según los tiempos de evaluación. Hay evidencia que las medias de viabilidad presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el control y el tratamiento con acetato de plomo a una concentración de $2.1 \mu\text{M}$, con un nivel de confianza de 95%. La cinética de la viabilidad se observa en el Gráfico 13.

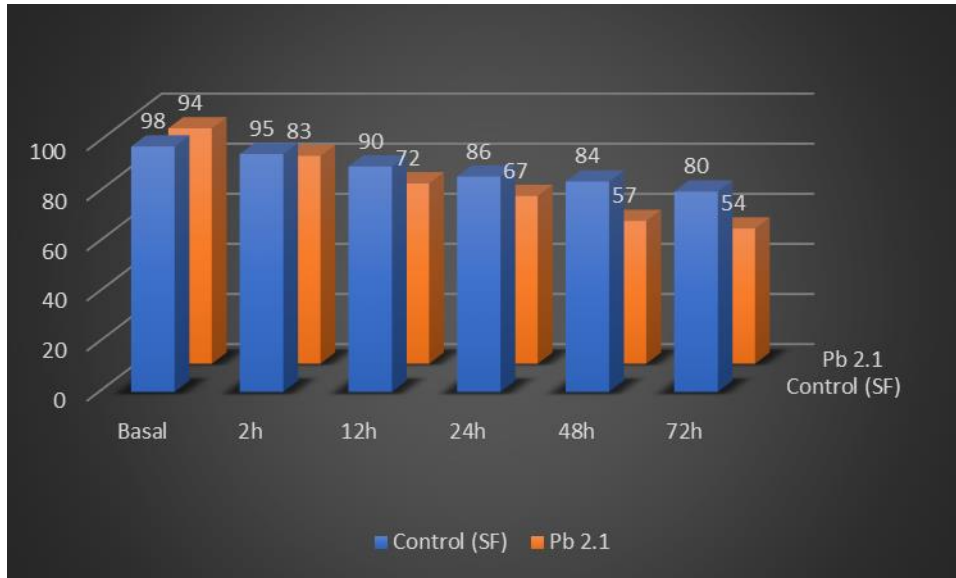


Gráfico 15. Comparación de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento a $2.1 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Tabla 10. Comparación de medias de la viabilidad control y tratamiento a $2.1 \mu\text{M}$ de acetato de plomo

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
control	6	88.83333	2.785877	6.823977	81.67201	95.99466
pb_21	6	71.16667	6.257884	15.32862	55.08026	87.25307
diff	6	17.66667	3.546516	8.687155	8.550056	26.78328

mean(diff) = mean(control - pb_21) t = 4.9814
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 5

Ha: mean(diff) < 0
 Pr(T < t) = 0.9979

Ha: mean(diff) != 0
 Pr(|T| > |t|) = 0.0042

Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T > t) = 0.0021

En el Gráfico 16, se muestra el comportamiento de la viabilidad celular en cada grupo de estudio (control y experimental), para tener un esquema global con respecto a su valor central y dispersión (mediana y rango intercuartílico).

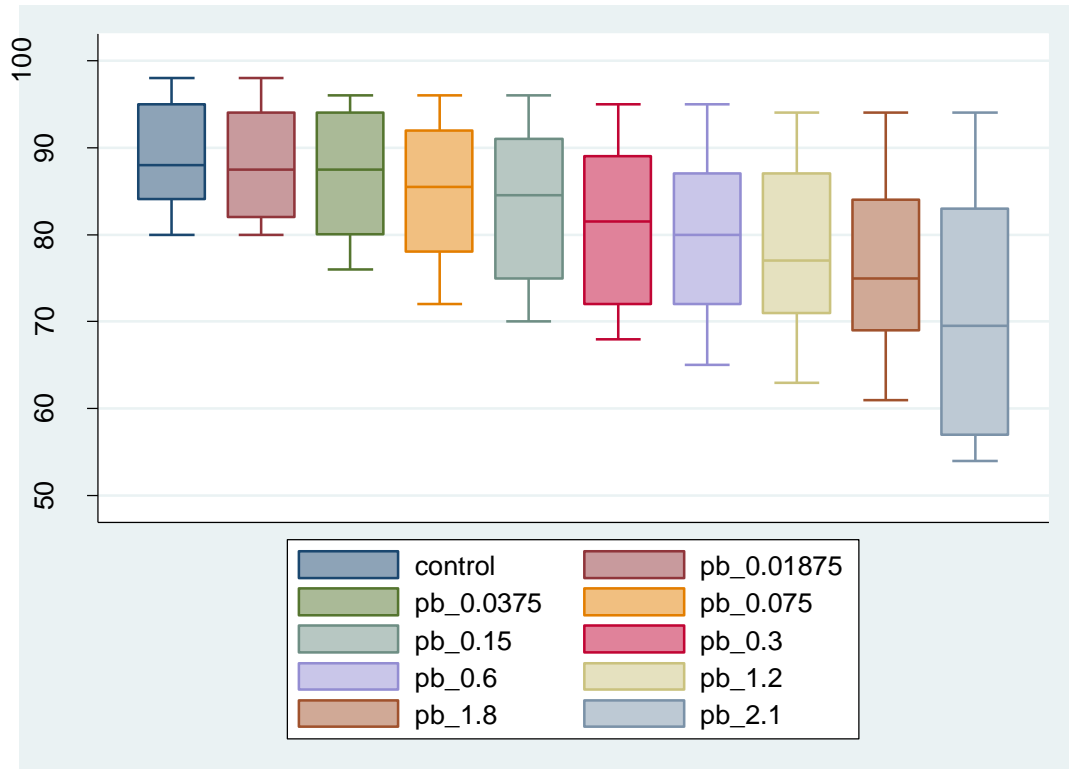


Gráfico 16. Comparación global de la viabilidad celular en grupo control y tratamiento

5.2. DISCUSIÓN

La capacidad del plomo para generar citotoxicidad ha sido documentada ampliamente, sobre todo a través de mecanismos relacionados a estrés oxidativo (42-44). En base a ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar si la exposición a concentraciones equimolares a las determinadas en trabajadores ocupacionalmente expuestos producía citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica obtenidas por gradientes de ficoll hipaque.

Los resultados muestran que a una concentración de acetato de plomo 0.0375 μM equivalente a 1.0 $\mu\text{g/dL}$. ya se presenta citotoxicidad significativa con respecto al grupo control. Esto podría explicarse, debido a que las células linfocitarias (mononucleares) no tienen la misma capacidad de generar una respuesta frente a la exposición del plomo, metal que ha sido relacionado fuertemente a daño mediado por estrés oxidativo (básicamente por la producción de especies reactivas de oxígeno); a diferencia de otros tejidos como el hepático (45), donde se ha evidenciado que la capacidad antioxidante (actividad glutatión y superóxido dismutasa, principalmente) ha reducido la citotoxicidad celular, incluso a concentraciones de acetato de plomo hasta 5 $\mu\text{g/dL}$. Evaluando la concentración de plomo por exposición ambiental a plomo (niños: hasta 10 $\mu\text{g/dL}$ y adultos: hasta 20 $\mu\text{g/dL}$), la citotoxicidad continuó descendiendo significativamente, siendo mucho mayor la diferencia pasada las 24 horas de exposición. En el caso de las células que fueron expuestas a acetato de plomo a 1.2 $\mu\text{g/dL}$ a más concentraciones (límite de exposición ocupacional: > 40 $\mu\text{g/dL}$ de plomo en sangre), se observó el mayor nivel de citotoxicidad celular, evidenciándose diferencias significativas a partir de las 2 horas del tratamiento.

Estos resultados sugieren que en este modelo celular, se presenta un metabolismo bajo, ya que posiblemente las especies reactivas de oxígeno se generan por exposiciones de larga duración, lo cual no permite que se desencadenen procesos celulares que contrarresten la permanencia de dichas especies reactivas, y en parte podría deberse a la ausencia de actividad de algunos antioxidantes endógenos (45). Los efectos celulares ocasionados por

las especies reactivas de oxígeno son numerosos, sin embargo, sus blancos moleculares son los lípidos, proteínas y ADN (45).

Si bien los resultados obtenidos en esta tesis de investigación no evidencian la producción de especies reactivas de oxígeno, sea el mecanismo de acción por el cual el plomo cause daño citotóxico a concentraciones equivalentes a las de personas expuestas ambiental y ocupacionalmente, la importancia de estos resultados radica en el planteamiento de interrogantes enfocados a esclarecer los posibles mecanismos de acción por los cuales el plomo causa efectos adversos sobre la salud e incluso su carcinogenicidad en este sector de la población. Los resultados en células mononucleares de sangre periférica humana con baja actividad metabólica, sugieren que una exposición crónica es necesaria para observar daño genotóxico, el cual muy probablemente sea debido a la generación de especies reactivas de oxígeno y el abatimiento de la defensa antioxidante estableciendo un estrés oxidativo, tal como se ha propuesto por algunos autores (44, 45). Sin embargo, nuestros datos no pueden descartar que existan otras explicaciones para la generación de este daño como pueden ser; la interacción directa del metal con el ADN o con proteínas asociadas a este o la inhibición de la reparación del ADN (46) también descrita como mecanismos de carcinogenicidad del plomo o incluso la posibilidad de buscar otros mecanismos de acción observados a estas concentraciones, que no hayan sido descritos antes en los estudios realizados a concentraciones altas.

CONCLUSIONES

- ✓ El tratamiento con concentraciones equivalentes a niveles de exposición por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana induce citotoxicidad celular, y por ende disminución de la viabilidad celular.
- ✓ El nivel de citotoxicidad celular inducido in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana es variable en cada tratamiento probado, presentándose mayor citotoxicidad a concentraciones elevadas de plomo
- ✓ La citotoxicidad inducida por el acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana sigue un patrón dosis-dependiente, con un alto nivel de correlación estadística.
- ✓ La cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana incrementa positivamente según tiempo, con cambios significativos.

RECOMENDACIONES

Puesto que la tesis de investigación fue de carácter experimental y de ciencias básicas, la cual buscó asociación causal, se señalan algunas recomendaciones a tener en cuenta por otros investigadores para mejorar futuras investigaciones en relación a la línea de toxicología molecular, siendo estas las siguientes:

- ✓ Estimar el estrés oxidativo a través de la cuantificación de especies reactivas de oxígeno; así como los efectos producidos tales como lipoperoxidación de membranas, genotoxicidad y aductos de proteínas.
- ✓ Estimar la capacidad antioxidante a través de la cuantificación de la actividad catalasa, superóxido dismutasa y concentración de glutatión.
- ✓ Evaluar otras líneas celulares que presenten un elevado metabolismo, tales como el tejido hepático o renal; en el cual se espera una menor citotoxicidad debido a su respuesta antioxidante.

REFERENCIAS BIBLOGRÁFICAS

1. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. VOLUME 87: Inorganic and Organic Lead Compounds. Lyon, France 2006. Disponible en: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/mono87.pdf>
2. Carpenter DO. Effects of metals on the nervous system of human and animals. *Int J Occup Med Environ Health*. 2001;14(3):209-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11764847>
3. Fewtrell L, Kaufmann R, Prüss-Üstün A. Lead: assessing the environmental burden of disease at national and local level. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO Environmental Burden of Disease Series, No. 2). Disponible en: http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/en/leadebd2.pdf
4. Liu Y, McDermott S, Lawson A, Aelion CM. The relationship between mental retardation and developmental delays in children and the levels of arsenic, mercury and lead in soil samples taken near their mother's residence during pregnancy. *Int J Hyg Environ Health*. 2010 Mar;213(2):116-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045663>
5. Nevin R. Trends in preschool lead exposure, mental retardation, and scholastic achievement: association or causation? *Environ Res*. 2009 Apr;109(3):301-10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167707>
6. Gunnar F. Nordberg, Bruce A. Fowler, Monica Nordberg and Lard Friberg. Handbook on the toxicology of metals. Third Edition, Elsevier. 2011. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780123694133>
7. Maria E. Ariza, Gautam N. Bijur, Marshall V. Williams. Environmental Metal Pollutants, Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity: Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity. Springer Science & Business Media, Dec 6, 2012 - 189 pp. Disponible en: <http://www.springer.com/gp/book/9780792384489>
8. B. Fraser. "La Oroya's legacy of lead," *Environmental Science and Technology*, vol. 43, no. 15, pp. 5555–5557, 2009. Disponible en: <http://www.pubpdf.com/pub/19731644/La-Oroyas-legacy-of-lead>

9. Castro-Bedriñana J, Chirinos-Peinado D, Ríos-Ríos E. Lead levels in pregnant women and newborns in la Oroya City, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2013 Jul; 30(3):393-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100812>
10. Guillen-Mendoza, D; Escate-Lazo, F; Rivera-Abbiati, F; Guillen-Pinto, D. Plomo en sangre de cordón umbilical de neonatos nacidos en un hospital del norte de Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2013, vol.30, n.2, pp. 224-228. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36328562010>
11. Ramírez AV, Paucar JC, Medina JM. Blood lead in the inhabitants of 4 Peruvian localities. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 1997 May;1(5):344-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377649>
12. Leonard, S., Harris, G.K. and Shi, X. Metal induce oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*. 2004;37(12):1921-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15544913>
13. Klein, C.B., Frenkel, K. and Costa, M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 1991;4(6):592-604. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx00024a001>
14. Goering, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*. Summer-Fall. 1993;14(2-3):45-60. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8247411>
15. Bouton, C.M. and Pevsner, J. Effects of lead on gene expression. *Neurotoxicology*. 2000;21(6):1045-55. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11233751>
16. Silbergeld, E.K. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutation Research*. 2003;533:121-33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643416>
17. Yedjou CG, Tchounwou HM, Tchounwou PB. DNA Damage, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis Induction Caused by Lead in Human Leukemia Cells. Mielke HW, ed. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016;13(1):56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730447/>

18. Haouas Z, Sallem A, Zidi I, Hichri H, Mzali I, et al. Hepatotoxic Effects of Lead Acetate in Rats: Histopathological and Cytotoxic Studies. *J Cytol Histol.* 2014;5:256. Disponible: doi:10.4172/2157-7099.1000256
19. Shakoori A, Ahmad A. Cytotoxic and Genotoxic effects of Arsenic and Lead on Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells (AMSCs). *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine.* 2013;9(2):29-36. Disponible en: <http://www.pubstemcell.com/monthly/uploads/009020300007.pdf>
20. Egiebor E, Tulu A, Abou-Zeid N, Aighewi IT, Ishaque A. The Kinetic Signature of Toxicity of Four Heavy Metals and Their Mixtures on MCF7 Breast Cancer Cell Line †. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2013;10(10):5209-5220. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3822392/>
21. Nandi S, Gupta PS, Selvaraju S, Roy SC, Ravindra JP. Effects of exposure to heavy metals on viability, maturation, fertilization, and embryonic development of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2010 Jan;58(1):194-204. doi: 10.1007/s00244-009-9342-7. Epub 2009 May 28. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475365>
22. Hernberg S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med.* 2000;38(3):244-54. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940962>
23. Strömberg U, A Schütz, S Skerfving. Substantial decrease of blood lead in Swedish children, 1978-94, associated with petrol lead. *Occup Environ Med.* 1995;52:764-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1128358/>
24. Flegal AR, Smith DR. Measurements of environmental lead contamination and human exposure. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1995;143:1-45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501865>
25. Diaz-Barriga F, Bates A, Calderon J, Lugo A, Galvao L, Lara I, et al. The El Paso smelter 20 years later: residual impact on Mexican children. *Environ Res.* 1997;74:11-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9339209>
26. Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. *Environmental Health Perspectives.* 1993;100:177-187. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519587/>

27. Rubio-Andrade M, Valdés-Pérezgasga F, Alonso J, Rosado JL, Cebrián ME, García-Vargas GG. Follow-up study on lead exposure in children living in a smelter community in northern Mexico. Environmental Health. 2011;10:66. doi:10.1186/1476-069X-10-66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3152872/>
28. Johnson FM. The genetic effects of environmental lead. Mutat Res. 1998 Apr;410(2):123-40. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9637233>
29. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile Information, Toxicological profile: Lead 2007. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
30. Silbergeld EK. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. Mutat Res. 2003 Dec 10;533(1-2):121-33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643416>
31. International Organization for Standardization. ISO 9001:2015: Quality management systems - Requirements. Geneva Switzerland. 2015. Disponible en: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=62085
32. International Organization for Standardization. ISO 15189:2012. Medical laboratories - Requirements for quality and competence. 2012. Disponible en: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=56115
33. International Organization for Standardization. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2005. Disponible en: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=39883
34. World Health Organization. Good Clinical Laboratory Practice (GCLP). 2008. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/gclp-web.pdf>
35. Ministerio de Salud. Ley N° 26842: Ley General de Salud. 1997. Disponible en: ftp://ftp.minsa.gob.pe/intranet/leyes/L-26842_LGS.pdf

36. Ministerio de Salud. Norma Técnica de Salud N° 021-MINSA/DGSP versión 1.0. 2011. Disponible en: ftp://ftp2.minsa.gob.pe/normaslegales/2012/RM546_2011_MINSA.pdf
37. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI). Norma Técnica Peruana ISO 15189:2004. Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.
38. Ministerio de Salud. Norma Técnica Peruana N° 050-MINSA/DGSP- versión 02. 2007. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/dgsp/000_normaacreditacion.pdf
39. Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. Dirección de Servicios de Salud. Norma técnica de salud de la unidad productora de servicios de patología clínica. NTS N° 072-MINSA/DGSP-versión 01. 2009. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/1457.pdf>
40. Ministerio de Salud. Norma Técnica Peruana N° 111-MINSA/DGE- versión 01. Vigilancia epidemiológica en salud pública de factores de riesgo por exposición e intoxicación por metales pesados y metaloides. 2015. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/normas/2015/RM006-2015-MINSA.pdf>
41. Ministerio de Salud. Guía de práctica clínica para el manejo de pacientes con intoxicación por plomo - versión 01 (aprobado con R.M. 511-2007/MINSA). 2007. Disponible en: <https://www.minsa.gob.pe/dgsp/documentos/Guias/RM511-2007%20Intox%20Plomo.pdf>
42. M Hermes-Lima , B Pereira , E J Bechara. Are Free Radicals Involved in Lead Poisoning?. *Xenobiotica* 21 (8), 1085-1090. 8 1991. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/1776279/>
43. Klein CB, Frenkel K, Costa M (1991). The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* 4: 592–604.
44. Maria E. Ariza Gautam N. Bijur Marshall V. Williams. *Environmental Metal Pollutants, Reactive Oxygen Intermediaries and Genotoxicity : Molecular Approaches to Determine Mechanisms of Toxicity*. Springer Science & Business Media. 2012
45. Gurer H, Ercal N. Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;29(10):927–945. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11084283>

46. Hartwig A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett.* 1998 Dec 28;102-103:235-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022259>

ANEXOS

ANEXO 01: OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	VALOR FINAL	ESCALA	TECN. E INSTRUM.
Citotoxicidad celular	Recuento de células vivas y muertas por fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína	Recuento de células no viables / 200 células	% citotoxicidad celular (Complemento del % viabilidad celular)	Numérica de razón	Microscopía de fluorescencia
Tratamiento con acetato de plomo	Tratamiento in vitro sobre células mononucleares de sangre periférica	Concentración de acetato de plomo en solución acuosa	0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 1.8 y 2.1 μM		
Tiempo	Periodo en el cual se exponen las células al tratamiento aplicado	Horas de incubación a 37°C de cada células tratadas	2, 12, 24, 48 y 72 horas		

ANEXO 02: MATRÍZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: “CITOTOXICIDAD INDUCIDA IN VITRO POR CONCENTRACIONES EQUIVALENTES A NIVELES DE EXPOSICIÓN OCUPACIONAL POR ACETATO DE PLOMO EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA”

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	INSTRUMENTOS
<p>General: ¿El tratamiento con concentraciones equivalentes a niveles de exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana inducirá citotoxicidad celular?</p> <p>Específico: ¿Cuál es el nivel de citotoxicidad celular inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana?</p> <p>¿Cuál es la concentración de acetato de plomo que induce menor y mayor citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana?</p> <p>¿Cuál es la cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana según tiempo?</p>	<p>General: Evaluar la citotoxicidad inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional de acetato de plomo en células mononucleares de sangre periférica humana</p> <p>Específico: Determinar los niveles de citotoxicidad celular inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional de acetato de plomo en células mononucleares de sangre periférica humana</p> <p>Determinar la concentración de acetato de plomo que induce menor y mayor citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana</p> <p>Evaluar la cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana según tiempo</p>	<p>General: El tratamiento con concentraciones equivalentes a niveles de exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana induce citotoxicidad celular</p> <p>Específico: El nivel de citotoxicidad celular inducida in vitro por concentraciones equivalentes a la exposición ocupacional por acetato de plomo en células mononucleares en sangre periférica humana es variable en cada tratamiento probado.</p> <p>La concentración de acetato de plomo que induce menor y mayor citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana sigue un patrón dosis-dependiente.</p> <p>La cinética de citotoxicidad en células mononucleares en sangre periférica humana incrementa positivamente según tiempo.</p>	<p>Citotoxicidad celular</p> <p>Tratamiento con acetato de plomo</p> <p>Tiempo</p>	<p>Determinación de la citotoxicidad celular con FDA/BrEt</p> <p>Microscopía de fluorescencia</p>

ANEXO 03: OBTENCIÓN DE PBMC POR GRADIENTE DE DENSIDAD

1. Agregar 3mL de Histopaque (densidad 1.077 g/mL) en un tubo de 15mL.
2. Agregar en zona 3 mL de sangre con heparina.
3. Centrifugar a 400g por 30 minutos a 4°C.
4. Luego del período de centrifugación se formará una banda de PBMCs en el tubo.
5. Extraer 500uL de la banda de PBMCs con una micropipeta de 1000uL.
6. Verter la suspensión celular sobre otro tubo y agregar sobre él 500uL de buffer fosfato salino (PBS).
7. Centrifugar a 500g por 15 minutos a 4°C.
8. Luego de la centrifugación, eliminar el sobrenadante con cuidado.
9. Resuspender las células (pellet) en 5-10mL con PBS
10. Centrifugar a 500g por 15 minutos a 4°C.
11. Resuspender las células (pellet) en 500 uL de PBS

ANEXO 04: DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD CELULAR CON FDA-BrEt

1. Preparar una solución stock de diacetato de fluoresceína en acetona a una concentración de 5 mg/mL. Conservar a 4°C protegido de la luz.
2. Preparar una solución de Bromuro de etidio en PBS 1X a una concentración de 0.2 mg/mL. Almacenar a temperatura ambiente protegida de la luz. Para un volumen final de 10 mL se requiere 200uL de BrEth.
3. Mezclar 30uL de FDA a 5 mg/mL, 200uL de bromuro de etidio a 0.2 mg/mL y completar a 5 mL con PBS 1X para obtener la solución de FDA/BrEth.
4. Resuspender 25 μ L de la suspensión celular con 25 μ L de la solución de la solución de FDA/BrEth.
5. La viabilidad/citotoxicidad es observada luego de 5 minutos después del tratamiento.
6. Las células viables se visualizan de color verde fluorescente, mientras que los núcleos teñidos de color naranja son indicativos de muerte celular.
7. Se contabilizan 200 células por individuo / tratamiento / concentración y se establece el porcentaje de citotoxicidad celular.

Nota: Las láminas y laminillas utilizadas se eliminarán en un recipiente especial de descarte de Bromuro de etidio.

Informe del resultado: Se realizará un conteo de al menos 200 células y se determinará la citotoxicidad en base al porcentaje.

Interpretación del resultado: Nótese las células viables se observan en verde por la acción enzimática de fluoresceína a partir del diacetato de fluoresceína (FDA) y las células no viables se muestran en rojo por el ingreso del BrEth a través de las membranas dañadas (Imagen 01).

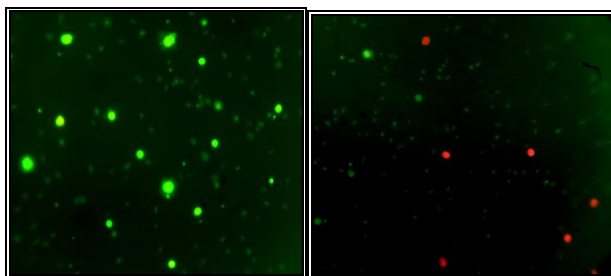


Imagen 01. Imagen obtenida a 400X de aumento. Nótese las células viables se observan en verde por la acción enzimática de fluoresceína a partir del diacetato de fluoresceína (FDA) y las células no viables se muestran en rojo por el ingreso del BrEth a través de las membranas dañadas.

ANEXO N° 05: LICENCIA PARA EJECUCIÓN DE TESIS



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

CARTA N° 060 FMHyCS-EPTM/UAP-FI/17

Ica, 07 de Junio del 2017

Señor:

Lic. Johanna Gómez Valencia
ADMINISTRADORA
Hospital de Solidaridad-ICA.

PRESENTE.-

Asunto: Solicito permiso para realizar Ejecución de Plan de Tesis.

Tengo a bien dirigirme a usted por medio de la presente para saludarle, en representación de la Universidad "ALAS PERUANAS", y a la vez solicitarle a su digno despacho, licencia para realizar la ejecución de plan de tesis titulada: "CITOTOXICIDAD INDUCIDA IN VITRO POR CONCENTRACIONES EQUIVALENTES A NIVELES DE EXPOSICIÓN OCUPACIONAL POR ACETATO DE PLOMO EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA"

Dirigido a los Pacientes atendidos en el Servicio de Laboratorio Clínico.


Dichas prácticas estarán dirigida por el Bachiller **ERAZO HUAMAN TATIANA MILAGROS**, quien está a ejecutando su Plan de Tesis.

Los días de ejecución será en el mes de Junio del presente.

Sin otro particular que deba de informar a Ud. me despido, agradeciendo la atención prestada a la presente

Atentamente


UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS
FILIAL - ICA
Lic. Jorge Luis Ormeño Jhong
COORDINADOR ACADÉMICO
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA


MUNICIPALIDAD METROPOLITANA DE LIMA
SISTEMA METROPOLITANO DE LA SOLIDARIDAD
SICOLICA
.....
Lic. Johanna Anabel Gomez Valencia
ADMINISTRADORA