



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLINICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD EN CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA
EVALUADAS EN EL HOSPITAL AUGUSTO HERNÁNDEZ
MENDOZA DEL DISTRITO DE ICA**

AUTOR: LUIGI HENDRIK GUTIÉRREZ CRISÓSTOMO

Tesis preparada en la Universidad Alas Peruanas como requisito para la obtención del título de licenciado en Tecnología Médica

Tutor: Mg. Jaime Rosales Rimache

Lima, Perú

2017

Gutiérrez, L. 2017. Comparación de dos técnicas para la cuantificación de la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica evaluadas en el Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del distrito de Ica / Luigi Hendrik Gutiérrez Crisóstomo. 71 páginas.

Nombre del tutor: Mg. Jaime Rosales Rimache

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

HOJA DE APROBACIÓN

Dedicado a mi mamá, papá y hermano.

Agradezco a todas y cada una de las personas que me brindaron su apoyo en lograr realizar este proyecto de investigación.

RESUMEN

Objetivos. Comparar dos técnicas para la cuantificación de la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica evaluadas en el Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del Distrito de Ica. **Materiales y métodos.** Se diseñó un estudio descriptivo, transversal y comparativo, donde se colectaron 30 muestras de sangre en tubos con EDTA K3 (de individuos saludables seleccionados por muestreo probabilístico), las cuales se utilizaron para extraer células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por gradiente de concentración con Ficoll-Hipaque, y que sirvieron para determinar la viabilidad celular por el método de exclusión de azul de tripano (Tryp-blue) y fluorescencia con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA-BrEt). **Resultados.** La viabilidad promedio obtenida por el método Tryp-blue y FDA-BrEt fueron de 91.1 ± 1.6 y 94.6 ± 1.4 , respectivamente, evidenciando diferencia significativa ($p < 0.001$, t-student, prueba de dos colas). También, se encontró una correlación baja entre los resultados obtenidos por ambos métodos (r de Pearson=0.350). A la categorización según nivel de viabilidad aceptable por cada método, se observó que el método FDA-BrEt y Tryp-blue presentaron porcentajes de viabilidad aceptable de 90.0 y 60.0%, respectivamente, aunque sin diferencia significativa entre ellas ($p = 0.804$, chi cuadrado, prueba de dos colas); además presentaron una tasa de acuerdo global de 58.0% corregida por el azar. **Conclusiones.** Los resultados de viabilidad en PBMC obtenida por los métodos de Tryp-blue y FDA-BrEt son diferentes, siendo además esta última más sensible para identificar células viables.

Palabras clave: Viabilidad celular, PBMC, azul de tripano, diacetato de fluoresceína, bromuro de etidio

ABSTRACT

Objectives. To compare two techniques for the quantification of viability in peripheral blood mononuclear cells evaluated at the Augusto Hernández Mendoza Hospital of the Ica District. **Materials and methods.** A descriptive, cross-sectional, and comparative study was designed in which 30 blood samples were collected in K3 EDTA tubes (from healthy individuals selected by probabilistic sampling), which were used to extract peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by concentration gradient (Tryp-blue) and fluorescence with fluorescein diacetate and ethidium bromide (FDA-BrEt) were used to determine cell viability. **Results.** The mean viability obtained by the Tryp-blue and FDA-BrEt method were 91.1 ± 1.6 and 94.6 ± 1.4 , respectively, showing a significant difference ($p < 0.001$, t-student, two-tailed test). Also, a low correlation was found between the results obtained by both methods (Pearson's $r = 0.350$). To the categorization according to acceptable viability level for each method, it was observed that the FDA-BrEt and Tryp-blue method had acceptable viability percentages of 90.0 and 60.0%, respectively, but without significant difference between them ($p = 0.804$, chi square, Two-tailed test); Also presented a global agreement rate of 58.0% corrected by chance. **Conclusions.** The viability results in PBMC obtained by the Tryp-blue and FDA-BrEt methods are different, the latter being more sensitive to identify viable cells.

Key words: *Cell viability, PBMC, trypan blue, fluorescein diacetate, ethidium bromide*

TABLA DE CONTENIDOS	Pág.
Portada	1
Epígrafe	2
Hoja de aprobación	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos	5
Resumen	6
Abstract	7
Tabla de contenidos	8
Listado de tablas	10
Listado de gráficos	11
Abreviaturas	12
Introducción	13
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO	14
1.1. Descripción de la realidad problemática	15
1.2. Formulación del problema	15
1.3. Objetivo de la investigación	16
1.4. Hipótesis de la investigación	16
1.5. Variables de estudio	16
1.6. Justificación e importancia de la investigación	16
1.7. Diseño de la investigación	17
1.8. Población y muestra de la investigación	18
1.9. Procedimientos y técnicas	20
1.10. Técnicas para el procesamiento y análisis de los datos	24
1.11. Ética de la investigación	25
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	27
2.1. Antecedentes de la investigación	27
2.2. Bases teóricas	31
2.3. Bases legales	38
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	41
3.1. Resultados	41
3.2. Discusión de resultados	51

3.3. Conclusiones	53
3.4. Recomendaciones	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	
Anexo N° 1: Matriz de consistencia	61
Anexo N° 2: Ficha de recolección de datos	63
Anexo N° 3: Figuras	64
Anexo N° 4: Galería fotográfica	65
GLOSARIO	70

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Estadísticos descriptivos de la viabilidad celular obtenida por el método de azul de tripano y fluorescencia	37
Tabla 2. Análisis de normalidad de datos con la prueba de Shapiro-Wilk	38
Tabla 3. Comparación de medianas según a prueba no paramétrica de Wilcoxon	38
Tabla 4. Comparación de medianas según a prueba no paramétrica de signos	39
Tabla 5. Comparación de medianas según a prueba no paramétrica de Wilcoxon	40
Tabla 6. Evaluación univariada, bivariada y multivariada de la normalidad de datos	40
Tabla 7. Análisis de correlación de Pearson para ambos métodos de viabilidad celular	41
Tabla 8. Evaluación de proporciones de aceptabilidad de la viabilidad celular según el método FDA-BrEt	41
Tabla 9. Evaluación de proporciones de aceptabilidad de la viabilidad celular según el método de azul tripano	42
Tabla 10. Comparación de proporciones entre ambos métodos de estudio de viabilidad celular	43
Tabla 11. Análisis de concordancia entre los resultados de ambos métodos de estudio de la viabilidad celular	43

LISTADO DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Histograma con curva normal de viabilidad celular con azul de tripano	37
Gráfico 2. Histograma con curva normal de viabilidad celular con FDA/BrEt	38
Grafico 3. Comparación de distribuciones de viabilidad celular en ambos métodos	38
Grafico 4. Dispersión de la viabilidad celular en ambos métodos	39

LISTADO DE ABREVIATURAS

- ❖ **ATP:** Adenosina trifosfato
- ❖ **EDTA K3:** Ácido etildiaminotetraacético tripotásico
- ❖ **FDA-BrEt:** Diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio
- ❖ **PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica
- ❖ **PBS:** Buffer salino fosfato
- ❖ **Tryp-blue:** Azul de tripano

INTRODUCCIÓN

La viabilidad celular es una característica fundamental que se requiere valorar previo a la ejecución de muchos ensayos de investigación. Su medición desempeña un papel fundamental en todas las formas de cultivo celular. Por ejemplo, una de las aplicaciones experimentales más utilizadas es la evaluación de la proliferación y citotoxicidad celular por diversos agentes en un cultivo in vivo o in vitro, y del cual se determina el porcentaje de viabilidad para conocer si el tratamiento asignado genera los resultados esperados (1).

Los ensayos para determinar la viabilidad celular son muy variados en función al costo, metodologías, calidad, y otros factores. Los métodos de ensayo que permiten valorar la viabilidad celular incluyen el uso de diferentes clases de reactivos colorimétricos tales como el azul tetrazolio y la resazurina en los cuales se busca su reducción in vitro. También se utiliza la generación de sustratos de proteasa con señal fluorescente, ensayos de luminiscencia para cuantificar ATP, y las tecnologías basadas en el uso de la citometría de flujo (2).

No obstante, es relevante señalar que la mayoría de los ensayos mencionados son costosos y en muchos casos dependen de la presencia de equipos de alta tecnología como espectrofotómetros, lectores de placas con módulos de fluorescencia o luminiscencia, etc.; situación que genera limitaciones en la implementación de las metodologías en los laboratorios de investigación celular. Por tal razón, los ensayos que tienen mayor acogida son los que valoran la viabilidad celular microscópicamente mediante la incorporación de ciertos compuestos como colorantes o fluorocromos, tal es el caso del azul de tripano y la solución de bromuro de etidio con diacetato de fluoresceína.

Por lo tanto, la presente investigación comparó los dos métodos para determinar cuál de ellos presentó mejor rendimiento al evaluar la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

1.1. Descripción de la realidad problemática

La situación ideal en los laboratorios de investigación celular debería ser trabajar con métodos cuantitativos para determinar la viabilidad celular; sin embargo, la escasez de recursos económicos para la adquisición de kits, equipos e infraestructura hace que sea limitado su uso. Por lo tanto, el método más empleado en la valoración de la viabilidad celular es la exclusión del azul de tripano; sin embargo esta técnica presenta algunas limitaciones en la interpretación final de los resultados considerando que el colorante empleado ingresa en aquellas células que tienen daño a nivel de membrana generando una tinción azul celular y de ese modo se reconoce que está muerta; pero existen células que podrían presentar diferentes tipos de daño en membrana y estar vivas, pero que con la técnica de exclusión del azul tripano se contarían como muertas (3). Por lo tanto, se generaría un sesgo en la lectura final de la viabilidad y eso podría asociarse a errores de grueso calibre en los diseños experimentales a nivel celular (4), sobre todo en aquellos que busquen evaluar citotoxicidad celular.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema General

- ✓ ¿Existen diferencias significativas entre los resultados de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica mediante el empleo de la técnica del azul tripano y fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína?

1.2.2. Problemas Específicos

- ✓ ¿Cuál es la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano?
- ✓ ¿Cuál es la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína?
- ✓ ¿Cuál es la variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano?
- ✓ ¿Cuál es la variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína?

1.3. Objetivo de la investigación

1.3.1. Objetivo general

- ✓ Comparar dos técnicas para la cuantificación de la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica evaluadas en el Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del Distrito de Ica

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Cuantificar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano
- ✓ Cuantificar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína
- ✓ Determinar variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano
- ✓ Determinar la variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína

1.4. Hipótesis de la investigación

1.4.1. Hipótesis general

- ✓ Existen diferencias significativas entre los resultados de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica mediante el empleo de la técnica del azul tripano y fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína

1.4.2. Hipótesis específicas

- ✓ El porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano es menor que la obtenida por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína
- ✓ La variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína es menor que la obtenida por la técnica del azul tripano

1.5. Variables de estudio

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	VALOR FINAL	ESCALA	TECN. E INSTRUM.
Viabilidad en PBMC	Viabilidad celular por exclusión de azul tripano	Recuento de células viables / 200 células	% Viabilidad celular	Numérica de razón	Microscopía de luz visible
	Viabilidad celular por fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína	Recuento de células viables / 200 células	% Viabilidad celular	Numérica de razón	Microscopía de fluorescencia

1.6. Justificación e importancia de la investigación

La implementación de técnicas que sean sencillas, económicas y de alto rendimiento en la evaluación de la viabilidad celular resulta crucial en los laboratorios de investigación celular. La investigación planteada busca comparar uno de los métodos más empleados para valorar la viabilidad celular, la exclusión del azul tripano, con una técnica que teóricamente

debe presentar mejor rendimiento, la inclusión de diacetato de fluoresceína y exclusión del bromuro de etidio. De ser así, se tendría una técnica con mejor sensibilidad y especificidad, y esto aportaría de sobremanera a las investigaciones que buscan valorar la citotoxicidad celular, una característica que se encuentra asociada al uso de fármacos, evaluación de nuevos principios activos, exposición a xenobióticos, agentes de riesgo físico, microorganismos, entre otros. Por lo tanto, la comparación de las dos técnicas mencionadas resulta trascendental para el desarrollo futuro de protocolos dentro del ámbito de la investigación celular básica.

1.7. Diseño de la investigación

1.7.1. Tipo de investigación

- **Según la manipulación de la variable**

Estudio observacional: Implica que no hubo manipulación de las variables de estudio. Solo se evaluará el comportamiento de la variable principal de estudio en función de sus indicadores las cuales serán comparadas para evidenciar si existen diferencias significativas entre ambas.

- **Según la fuente de toma de datos**

Prospectivo: La fuente de recolección de datos se llevó a cabo durante el mes de junio del año 2017. Esto implicó la obtención de muestras de sangre y PBMC respectivamente para la determinación de la viabilidad respectiva con generación de resultados de forma progresiva sin la necesidad de recolectar datos históricos.

- **Según el número de mediciones**

Transversal: Las variables fueron medidas en una sola ocasión, posterior a la aplicación de las dos técnicas de viabilidad celular.

- **Según el número de variables a analizar**

Analítica: Los datos generados de las mediciones de viabilidad por ambas técnicas fueron analizados mediante pruebas estadísticas inferenciales para estimar si existieron diferencias significativas entre ellas,

1.7.2. Nivel de Investigación

Relacional: Ya que se buscó establecer la diferencia probabilística entre resultados generados por dos técnicas que evalúa la misma condición: viabilidad celular.

Diseño:

Se diseñó un estudio descriptivo de tipo de transversal

Método

El presente trabajo de investigación es de carácter analítico que sigue un método comparativo, ya que permitió conocer la totalidad de los hechos y fenómenos de la realidad estableciendo sus semejanzas y diferencias en forma comparativa, de tal modo que permitió lógicamente aceptar o rechazar las hipótesis planteadas.

1.8. Población y muestra de la investigación

1.8.1. Población

Estuvo constituido por todas las muestras de sangre colectadas para la obtención de células mononucleares de sangre periférica en el laboratorio clínico del Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del Distrito de Ica.

Criterio de Inclusión:

- Muestras de sangre de individuos (indistinto la edad y sexo).
- Muestras de sangre colectadas en tubos con sistema de extracción al vacío de 4 mL y anticoagulante EDTA K3

- Muestras de sangre obtenidas según procedimientos establecidos en el laboratorio clínico del Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del Distrito de Ica.

Criterio de Exclusión:

- Muestras de sangre obtenidas en tubos que no tengan sistema de extracción al vacío
- Muestras de sangre de individuos con enfermedades oncohematológicas.
- Muestras de sangre de pacientes que estén recibiendo tratamiento quimioterápico

1.8.2. Muestra

Determinación del tamaño de la muestra

El muestreo fue probabilístico considerando la comparación de dos muestras emparejadas en función a la media. Se utilizó el programa para análisis epidemiológico de datos EPIDAT versión 4.1, asumiendo los siguientes parámetros para el cálculo del tamaño de muestra:

Población 1:	10,000
Población 2:	1,000
Coefficiente de correlación:	0,700
Diferencia de medias a detectar:	5,000
Nivel de confianza:	95,0%

Potencia (%)	Muestra
80,0	30

Elección de los miembros de la muestra

Las selecciones de las muestras de sangre fueron según el cumplimiento de los criterios de elegibilidad y condiciones pre-analíticas requeridas para la ejecución de las dos técnicas de viabilidad celular.

1.9. Procedimientos y técnicas

1.9.1. Técnicas

El Fichaje: Es una técnica auxiliar en investigación científica; consistió 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.

La Observación: Es una técnica que consistió 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.

1.9.2. 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 (38).

Obtención de PBMC por gradiente de densidad: Consistió 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 sometieron a pasos de lavado cortos con una solución isotónica para eliminar restos de plaquetas, hematíes y plasma. El procedimiento para obtener PBMC fue del siguiente modo:

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

Determinación de la viabilidad con Trypan Blue: Este método determinó la viabilidad celular mediante la coloración azul que toman las células no viables luego del tratamiento con trypan Blue debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular. Por lo tanto, las células viables fueron incoloras y las células no viables tuvieron una coloración azul a través del microscopio de luz visible. Se utilizó la cámara de Neubauer para realizar el montaje lo cual permitió que se determine el recuento celular al mismo tiempo que la viabilidad utilizando un microscopio binocular con luz visible. El procedimiento para la ejecución del ensayo fue llevado a cabo del siguiente modo:

- Preparar la solución de trabajo de Trypan Blue al 0.04%, para lo cual se diluirá la solución comercial de Trypan Blue (0.4%) por un factor de dilución de 10 con PBS 1X. Almacenar la solución de trabajo de Trypan Blue a 4°C.
- Resuspender 10uL de la suspensión celular con 90 μ L de la solución de la solución de trabajo de Trypan Blue en un microtubo de 0.6 mL.
- Agregar 10 uL de la mezcla a la cámara de Neubauer y evaluar al microscopio de luz visible.

- La viabilidad es observada luego de 5 minutos después del tratamiento.
- Las células no viables se visualizan de color azul, mientras que las células sin coloración se observan incoloras.
- Se contabilizan todas las células contenidas en los 4 cuadrantes de los extremos de la cámara de Neubauer, correspondiente a leucocitos a la vez que se realiza el recuento celular.

Nota: La cámara de Neubauer se limpió inmediatamente luego de su uso, para lo cual se debió exponer la corriente de agua de caño y luego se limpiará con papel lente y alcohol isopropílico. Se mantuvo boca abajo sobre papel lente hasta que haya secado completamente. No restregar.

Determinación de la viabilidad 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 tuvieron una coloración naranja correspondiente a la fluoresceína y al Bromuro de Etidio respectivamente. La revisión se realizó con un microscopio de fluorescencia. La viabilidad se determinó del siguiente modo:

- 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.
- 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.
- 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.
- Resuspender 25 µL de la suspensión celular con 25 µL de la solución de la solución de FDA/BrEth.
- La viabilidad es observada luego de 5 minutos después del tratamiento.

- Las células viables se visualizan de color verde fluorescente, mientras que los núcleos teñidos de color naranja son indicativos de muerte celular.
- Se contabilizan 200 células por individuo / tratamiento / concentración y se establece el porcentaje de viabilidad celular.

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

Informe del resultado: Se realizó un conteo de al menos 200 células y se determinará la viabilidad en base al porcentaje. Para ser aplicado al ensayo cometa se requiere contar con una viabilidad de no menor del 90%.

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).

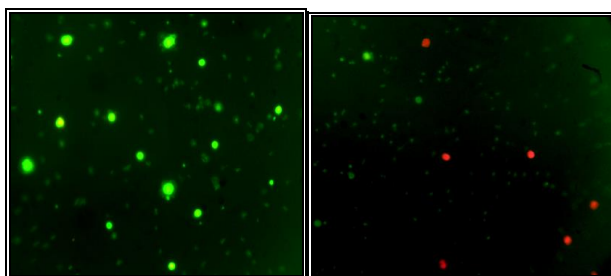


Imagen 01. Imagen obtenida a 400X de aumento. Nótese las células viables se observan en verde por la acción enzimática de fluoresceína a partir del diacetato de fluoresceína (FDA) y las células no viables se muestran en rojo por el ingreso del BrEth a través de las membranas dañadas.

1.10.1. Técnicas para el procesamiento

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

Obtención de datos

Los datos de la viabilidad celular fueron expresados en porcentaje para ambas técnicas y se ingresarán a un formulario para el registro inequívoco de los mismos (Ver Anexo 05). Además, se realizó toma fotográfica de los campos microscópicos para ambas técnicas a fin de tener imágenes que respalden los hallazgos a generar.

Clasificación de datos

Los datos obtenidos de las técnicas de viabilidad celular no fueron categorizados, se mantuvieron en su condición de numéricos 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 de ambas técnicas.

Codificación

No fue necesaria la asignación de códigos o valores a los resultados obtenidos, puesto que están no fueron categorizadas. Los resultados numéricos fueron ingresados tal cual se obtuvieron del recuento y evaluación microscópica (en luz visible y fluorescencia)

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.

1.10.2. 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 fue realizada en una cabina de seguridad biológica para evitar contaminación de la muestra, y la tinción con el azul tripano y el bromuro de etidio con el diacetato de fluoresceína fueron realizados en paralelo a fin de evitar diferencias debido al tiempo de procesamiento, se trabajó por triplicado obteniendo lecturas con coeficiente de variación menores al 10%, además que el fluorocromo fue probado con líneas celulares Neuro2a en el cual se obtuvo viabilidad superior al 98% , del mismo modo para el azul de tripano.

1.10.3. Técnicas de análisis e interpretación de datos

Los resultados a evaluar fueron de características cuantitativas; por lo tanto, se representaron mediante el uso de medidas de tendencia central tales como la moda, mediana y media aritmética; así como la desviación estándar y el coeficiente de variación, coeficiente de asimetría y curtosis para determinar el grado de dispersión en cada técnica aplicada con un intervalo de confianza del 95% (o también percentil 2.5 y 97.5, representado como rango). Para representar su distribución se utilizó los gráficos de histogramas. Para establecer si existen diferencias significativas entre los resultados generados por ambas técnicas, se utilizó una prueba estadística de contraste de hipótesis, dependiendo de si los datos siguen o no distribución normal, la cual será evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk a un nivel de confianza del 95%. Si la distribución de datos es normal, se empleó la prueba del t-student; y si no se empleó la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney; en ambos casos tomando como diferencia significativa un valor $p < 0.05$. Finalmente, para ver el nivel de relación entre los resultados de ambas técnicas se utilizó el coeficiente de Pearson o Spearman, nuevamente dependiente de la normalidad o no de los datos.

1.11. Ética de la investigación

El presente estudio no tuvo como unidad de análisis a las personas, sino a sus resultados derivados de la aplicación de dos técnicas para valorar

la viabilidad en PBMC, información que fue obtenida en el laboratorio clínico del Hospital IV Augusto Hernández Mendoza del Distrito de Ica, en el cual el investigador se compromete 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.

CAPITULO II

MARCO TEÒRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Boncler et al (Polonia, 2014) evaluaron el método PrestoBlue (PB), el cual es un nuevo, simple y extremadamente rápido ensayo in vivo para controlar la viabilidad celular y la citotoxicidad, en comparación con el método clásico MTT. Usaron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en presencia de extractos vegetales seleccionados. Se compararon los efectos antiproliferativos de dos extractos de plantas medicinales: extracto de cáscara de nuez y extracto de lúpulo gastado. La reducción de colorantes por células endoteliales se determinó colorimétricamente (MTT y PB) y fluorométricamente (PB). A concentraciones más altas, todos los compuestos ensayados causaron una pérdida significativa de viabilidad celular. Independientemente del compuesto de la planta, el ensayo de PB, cuando se midió colorimétricamente, produjo mayores valores de EC_{50} en comparación con otros modos de medición, sin embargo, las diferencias significativas en los valores de EC_{50} entre los ensayos se revelaron sólo para el extracto de lúpulo gastado. Por el contrario, los valores de EC_{50} para cada compuesto de planta obtenido en MTT (ensayo colorimétrico) y PB (ensayo fluorométrico) eran similares. Según los valores de EC_{50} , la citotoxicidad de los compuestos vegetales se clasificó como sigue: extracto de salto gastado > resveratrol > extracto de cáscara de nuez. Además, el ensayo de MTT mostró una variabilidad entre ensayos global más baja y una mayor relación señal/ruido en comparación con el ensayo de PB. En conclusión, se recomendó el ensayo fluorométrico PrestoBlue para la evaluación de la citotoxicidad en células HUVEC (4).

Kwolek-Mirek et al (Polonia, 2014) *evaluaron 5 métodos disponibles para estimar tanto la viabilidad como la vitalidad en células de levadura de Saccharomyces cerevisiae (tipo salvaje y mutante Δ sod1) en las que se evalúan los efectos de oxidantes seleccionados que causan estrés oxidativo (5).*

Li et al (China, 2013) compararon la capacidad de determinación de cuatro ensayos de citotoxicidad in vitro para toxicidad aguda de extractos de partículas de escape de diesel (DEP). La viabilidad celular de las células 16HBE cultivadas fueron medidas por los ensayos MTT, rojo neutro, LDH y la determinación del contenido total de proteínas después de 12, 24 y 48h de estar expuestos a extractos de DEP a diferentes concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80 y 160 microg / ml. Para medir la citotoxicidad aguda, el ensayo MTT fue más sensible que los otros tres métodos después de 12 horas de exposición. La sensibilidad tanto del ensayo de MTT como del rojo neutro aumentó a medida que se prolongaba el tiempo de exposición. La viabilidad celular en cada dosis disminuyó significativamente después de ser expuesta a extractos de DEP durante 24 horas en comparación con el grupo de control ($P < 0,05$). Cuando se usó el ensayo de LDH, la viabilidad celular se redujo después de 24 horas de exposición a extractos de DEP, pero no cambió más con el tiempo. Sólo se observaron las viabilidades celulares de los grupos expuestos a las dosis altas de los extractos de DEP con reducción significativa mediante el ensayo de proteína después de la exposición de 12 h y 24 h respectivamente. Las viabilidades celulares medidas por el mismo método en todas las dosificaciones disminuyeron después de una exposición de 48 horas. Los resultados de los cuatro ensayos de citotoxicidad mostraron diferencias en el presente estudio. El ensayo de MTT y el ensayo de rojo neutro son más sensibles a la detección del efecto adverso a las células 16HBE hechas por los extractos de DEP en comparación con el ensayo de LDH y el ensayo de proteínas (6).

Mueller et al (Alemania, 2004) compararon 3 ensayos ampliamente utilizados (MTT, ATP y Calceína) por análisis de componentes

principales. El estudio incluyó 4 diferentes citostáticos (cisplatino, docetaxel, doxorubicina, vinblastina) y 3 diferentes líneas celulares de cáncer humano (MCF-7, A2780, resistente a la doxorubicina A2780adr). El noventa y tres por ciento de la varianza total de todas las variables incluidas en el análisis del componente principal (resultante de 3 líneas celulares y 3 ensayos) podría explicarse por un componente principal. Las cargas de los factores fueron > 0.937 excepto para la variable MTT-A2780adr, que fue 0.872. Estos resultados indican la similitud de los 3 ensayos. Un segundo análisis de componente principal incluyó datos de la literatura y mostró concordancia con los datos de este estudio y la literatura. El ensayo MTT se mejoró adicionalmente como ensayo de capacidad de cribado de alto rendimiento. El ensayo de ATP es capaz de detectar los efectos de los citostáticos ya después de 1 h de incubación. La determinación de factores de resistencia permitió diferenciar los citostáticos en sustratos P-gp o no-P-gp. En conclusión, este estudio proporciona ensayos mejorados de viabilidad celular basada en el lector de microplacas y establece una base estadísticamente sólida para una futura comparación de los datos obtenidos en diferentes laboratorios por cualquiera de los 3 ensayos (7).

Russel et al (Escocia, 1995) compararon dos ensayos de viabilidad utilizando Daudi y CCRF-CEM líneas celulares en un rango de 1500-100.000 células / pocillo de una microplaca. El ensayo de ATP fue capaz de detectar el límite inferior de 1563 células / pocillo con valores de luminiscencia de al menos 100 x lecturas de fondo, mientras que el ensayo MTT no pudo detectar menos de 25.000 células / pocillo por encima de las lecturas de fondo. El ensayo de ATP también mostró una mejor reproducibilidad y sensibilidad cuando las células se cultivaron en placas de microtitulación durante varios días y es particularmente útil para la medición de viabilidad con números de células bajos (8).

Altman et al (Maryland, 1993) compararon el ensayo de exclusión de azul de tripano con un ensayo similar usando una tinción fluorométrica con diacetato de fluoresceína y yoduro de propidio, ambas para valorar la

viabilidad celular. Se midieron las densidades de células viables y no viables, y la viabilidad del cultivo se calculó tanto durante el ciclo de crecimiento regular del hibridoma murino y en respuesta a la aplicación de concentraciones milimolares de de hidroperóxido de terc-butilo o hierro ferroso. Durante la primera fase de crecimiento rápido de células de hibridoma, no se encontraron diferencias significativas en el ensayo de la densidad de células viables. A medida que pasaba el tiempo de cultivo, el ensayo de exclusión de azul de tripano aumentó significativamente la viabilidad celular, produciendo una estimación errónea de la viabilidad general del cultivo. Debido a la mejor capacidad en la identificación de células no viables, teñidas y su consiguiente aumento de la precisión en la estimación de la viabilidad del cultivo, el ensayo fluorométrico se consideró una mejor opción para la evaluación de la viabilidad celular comparada a la exclusión del azul de tripano (9).

Jones y Senft (Ohio, 1985) evaluaron la tinción del diacetato de fluoresceína simultánea (FDA) y el yoduro de propidio (PI) usados para determinar la viabilidad celular en suspensión. Se prepararon células en láminas secadas al aire para realizar una estimación precisa de la viabilidad de las células en suspensión que volvieron a evaluarse una semana después. Las células viables presentaron fluorescencia verde brillante, mientras que las células no viables de color rojo brillante. Además, cuando la tinción de FDA-PI se compara con la exclusión de azul de tripano, se encuentra que es más consistente durante períodos prolongados de exposición a los tintes. Por lo tanto, la doble tinción con FDA-PI es un método rápido, conveniente y fiable para determinar la viabilidad celular (10).

Bank (Carolina del Sur, 1987) evaluó la viabilidad de células de islotes aislados de páncreas mediante una técnica fluorométrica rápida. El ensayo distingue entre células viables y no viables por el uso simultáneo de la inclusión de la naranja de acridina y exclusión de yoduro de propidio. Cuando se ve por microscopía de fluorescencia, las células viables presentan fluorescencia verde, mientras que las células no viables

fluorescencia de color rojo brillante. Aunque el yoduro de propidio y la naranja de acridina miden la integridad de la membrana, los resultados de este ensayo se correlacionan con otras medidas de viabilidad celular. En comparación con la exclusión del azul de tripano, este ensayo es más fácil de leer, más estable, y tiene un menor número de artefactos de tinción. El ensayo permite la rápida estimación de la viabilidad de la población de células de los islotes antes de los experimentos que requieren mucho tiempo. Este ensayo se puede usar también con islotes intactos. Los islotes teñidos se pueden dividir en tres grupos distintos: islotes verde fluorescentes contienen insulina, islotes rojos fluorescentes contienen poca o nada de insulina y la tercera clase de islotes que contienen algunas células no viables con fluorescencia roja, verde y amarillo. El color amarillo se debe a la superposición de las células fluorescentes rojas y verdes (11).

Bank (Carolina del Sur, 1988) evaluó un método simple, rápido para la estimación de la viabilidad de los islotes de Langerhans con colorantes fluorescentes. Se utilizaron concentraciones bajas de naranja de acridina y yoduro de propidio (AO / PI) para visualizar las células de los islotes vivos y muertos al mismo tiempo (12).

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Ensayos de viabilidad celular (13-21)

Los ensayos que permiten evaluar la viabilidad celular son muy variados y se clasifican según: (i) evaluación de la integridad de la membrana, las cuales pueden ser de inclusión y exclusión de colorantes, también existen (ii) ensayos funcionales, (iii) con pruebas de fluorescencia, (iv) ensayos morfológicos y (v) microscopía electrónica. A continuación, se detallan cada uno de ellos:

a. Ensayos que evalúan la integridad de membrana

- Basado en colorantes o sustancias fluorescentes

Exclusión del azul de tripano: La prueba de exclusión del colorante se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Se basa en el principio que células vivas poseen

membranas celulares intactas que excluyen ciertos colorantes, como el azul de tripano, eosina, o de propidio, mientras que las células muertas no lo hacen. En esta prueba, la suspensión de células se mezcla simplemente con el colorante y luego se examina visualmente para determinar si las células absorben o excluyen el colorante, de tal modo que la célula viable tendrá un citoplasma claro; mientras que la célula no viable tendrá un citoplasma azul (3).

Exclusión de la eosina: Junto a la nigrosina, la OMS ha recomendado su uso de manera única o combinada, para la determinación de la viabilidad de células espermáticas como parte del estudio del espermatograma (22).

Exclusión del rojo de congo: Es una sal sódica de 3,3' - ([1,1'-bifenil] - 4,4'-diilo) bis (4-aminonaftaleno-1-sulfónico) (fórmula: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, peso molecular: 696,66 g/mol). Es un colorante diazo secundario; además de ser soluble en agua, dando una solución coloidal de color rojo; su solubilidad es mejor en disolventes orgánicos tales como etanol. Tiene una fuerte afinidad a las fibras de celulosa, aunque aparentemente mediante uniones no covalentes. Sin embargo, el uso de rojo Congo también se extendió a valorar la viabilidad celular sobre todo en organismos protozoarios (23).

Exclusión de la eritrosina B: También conocido como Red 3, es un compuesto de órgano yodado, en concreto un derivado de una fluorona. Su uso se ha masificado principalmente en la coloración de alimentos. Es la sal disódica de 2,4,5,7-tetrayodofluoresceína con una absorbancia máxima de 530 nm en una solución acuosa, la que se utiliza para tinciones vitales, la cual está sujeta a fotodegradación y además es la que presenta mayor inocuidad a su manipulación (24).

Exclusión del yoduro de propidio: Es un agente de intercalación y una molécula fluorescente con una masa molecular de 668,4 Da que se puede utilizar para teñir células. Cuando se une a los ácidos

nucleicos, el máximo de excitación de fluorescencia es 535 nm y el máximo de emisión es 617 nm. El yoduro de propidio se usa como agente de marcaje en técnicas de citometría de flujo, para evaluar la viabilidad celular o contenido de ADN en el análisis del ciclo celular, y microscopía de fluorescencia para visualizar el núcleo y otras organelas que contienen ADN. Se puede utilizar para diferenciar las células necróticas, apoptóticas y la normal. El yoduro de propidio es el colorante más utilizado para evaluar cuantitativamente el contenido de ADN por técnicas de fluorimétricas (25).

Exclusión del bromuro de etidio: Es un agente intercalante usado comúnmente como fluorescente (colorante de ácidos nucleicos) en laboratorios de biología molecular para técnicas tales como electroforesis en gel de agarosa y los estudios de viabilidad celular unidas a otros agentes fluorescentes. Cuando se expone a la luz ultravioleta, genera una fluorescencia anaranjada, la cual se intensifica casi 20 veces después de su unión al ADN. El bromuro de etidio puede ser un mutágeno, aunque esto depende del organismo expuesto y las circunstancias de la exposición (26).

Inclusión del diacetato de fluoresceína: Es el sustrato de un grupo de enzimas esterases de actividad intracelular que las hidroliza generando un compuesto de fluorescencia verde. Es un compuesto permeable a las membranas celulares y por esa razón se utiliza como un colorante para estudiar la viabilidad celular (26).

Inclusión de la calceína: Es un colorante permeable a las membranas celulares y es usada para determinar la viabilidad de células eucariotas, ya que su producto metabolizado por esterases citoplasmáticas generan un compuesto con fluorescencia rojo naranja (27).

Las combinaciones de sustancias que se excluyen de la membrana celular y otras que se incluyen a la célula permiten determinar con mejor rendimiento la viabilidad celular. Una de las combinaciones más

empleadas es el bromuro de etidio con el diacetato de fluoresceína. Otra combinación muy utilizada es la de yoduro de propidio con la naranja de acridina. En ambos casos pueden utilizarse en ensayos manuales para su revisión en microscopía de fluorescencia, o incluso en ensayos automatizados como en los analizadores de citometría de flujo.

- Basado en tinciones catiónicas

Ensayo de reducción del tetrazolio: Una variedad de compuestos de tetrazolio se han utilizado para detectar células viables. Los compuestos más utilizados son: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se dividen en dos categorías básicas: 1) MTT que está cargada positivamente y penetra fácilmente en las células eucariotas viables y 2) aquellos que, como MTS, XTT y WST-1 que están cargados negativamente y no penetra fácilmente en las células. La clase de los últimos (MTS, XTT, WST-1) se usan típicamente con un aceptor de electrones que intermedio puede transferir electrones de la membrana plasmática o citoplasma de facilitar la reducción del tetrazolio en el producto formazán coloreado (2).

Ensayo de reducción de la resazurina: La resazurina es un indicador redox permeable que se puede utilizar para evaluar el número de células viables con protocolos similares a los que utiliza los compuestos de tetrazolio (13). La resazurina se puede disolver en tampones fisiológicos (resultando en una solución de color azul intenso) y añadir directamente a las células en cultivo en un formato homogéneo. Las células viables con metabolismo activo pueden reducir la resazurina a resorufin, producto que es de color rosa y fluorescente (Ver Figura 01).

- Basado en la determinación de liberación de moléculas

Actividad proteasa: La medición de la actividad proteasa es conservada. Dentro de las células in vivo se ha demostrado puede servir como un marcador de la viabilidad celular. El sustrato

fluorogénico permeable (glicilfenilalanil-aminofluorocumarina; GF-AFC) ha sido recientemente desarrollado para detectar selectivamente la actividad de la proteasa que está presente solo en las células viables (14). El sustrato GF-AFC puede penetrar en las células vivas, donde la actividad enzimática aminopeptidasa citoplásmica elimina los ácidos y aminoácidos glicina y fenilalanina para liberar aminofluorocumarina (AFC) y generar una señal proporcional fluorescente al número de células viables (Ver Figura 02).

Tan pronto como las células mueren, esta actividad proteasa desaparece rápidamente, Por lo tanto, esta actividad de la proteasa es un marcador selectivo de células viables.

b. Ensayos funcionales

- Medición del ATP: El ATP ha sido ampliamente aceptado como un marcador válido de células viables. Cuando las células pierden la integridad de membrana, pierden la capacidad de sintetizar ATP y las ATPasas endógenas agotan rápidamente cualquier ATP restante desde el citoplasma. A pesar que la luciferasa ha sido utilizada para medir el ATP durante décadas, los últimos avances en el diseño del ensayo se han traducido en una sola adición de reactivos homogéneos resultados protocolo que den una señal luminiscente que brille por horas (15).

c. Ensayos de fluorescencia

- Biosensores de fluorescencia: Miden la dinámica molecular de macromoléculas, metabolitos e iones en células vivas con una gran resolución temporal y espacial. Los biosensores son proteínas marcadas mediante fluorescencia que miden reacciones químicas específicas. Cuando el biosensor se encuentra dentro de una célula viva, el componente proteico del biosensor puede activarse. Una vez activada la proteína del biosensor, la molécula fluorescente unida a este componente proteico del biosensor traduce los cambios

ambientales en señales fluorescentes en la proximidad del lugar. Estas señales fluorescentes son detectadas por un sistema con una enorme resolución temporal y espacial. Como la activación proteica es reversible, estos biosensores pueden ser reutilizados por la célula (16).

d. Ensayos morfológicos

- Basados en la observación microscópica: Se basan en que algunos de los cambios morfológicos que ocurren en la superficie celular o en el citoesqueleto pueden estar relacionados con la viabilidad celular (17, 18). Cambios de volumen irreversibles pueden indicar la muerte celular. Si éste disminuye, puede indicar la pérdida de proteínas o iones intracelulares, o debido a una alteración de la permeabilidad para el sodio o el potasio (19). Estos cambios son difíciles de medir, por lo que otros ensayos de evaluación de integridad de la membrana como los ensayos funcionales nos pueden aportar mayor información.

e. Microscopía electrónica analítica

- Microanálisis por energía dispersa de rayos X: La concentración intracelular de esos iones se correlaciona bastante bien con el estado vital celular y es un excelente marcador de la fisiología celular y de la viabilidad celular (20). El microanálisis por energía dispersiva de rayos X asociada a la microscopía electrónica supone una potente herramienta para cuantificar los elementos de una muestra, al mismo tiempo que se consigue determinar la concentración de los mismos y la ultraestructura de las células (21).

2.2.2. Usos de la viabilidad celular en investigación

La elección de una técnica para valorar la viabilidad celular o citotoxicidad, teniendo tantas opciones diferentes disponibles, puede ser una tarea difícil. Escoger el mejor formato de ensayo para satisfacer necesidades particulares requiere una comprensión de lo que cada ensayo permite medir, de cómo la medición se correlaciona con la viabilidad celular, y de las limitaciones de cada ensayo (28).

La medición de la viabilidad celular desempeña un papel fundamental en todas las formas de cultivo celular. A veces es el objetivo principal del experimento, tal como se presenta en los ensayos de toxicidad. Alternativamente, la viabilidad celular se puede utilizar para correlacionarse con el comportamiento celular al número de células (proliferación celular), proporcionando una imagen más precisa de, por ejemplo, la actividad de distintos fármacos, nuevos principios activos, xenobióticos, entre otros compuestos (1).

Considerando las aplicaciones que tienen los ensayos de viabilidad celular, se podrían agrupar en las siguientes líneas de investigación a las cuales da soporte:

- a. Estudios de la capacidad metabólica celular
- b. Ensayos de citotoxicidad celular
- c. Ensayos de detección apoptótica celular

2.3. BASES LEGALES

2.3.1. Normativa internacional

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. Dentro de esta norma se desarrollan los procesos para ejecución de ensayos normalizados como las tinciones vitales para

distintos tipos celulares, siendo la más aplicada la viabilidad espermática (29).

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. Dentro de esta normativa se desarrollan los ensayos no normalizados, que requieren de un proceso de validación y estimación de incertidumbre; además de considerar ensayos cualitativos y cuantitativos (30).

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, incluidos los procedimientos para determinación de viabilidad celular con fines de diagnóstico in vitro o de investigación y desarrollo (31).

2.3.2. Normativa nacional

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 (32)

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 (33).

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 (34).

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 (35).

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 (36).

2.3.3. Normativa regional en Ica

R.M. N° 454-2009/MINSA. Esta normativa aprueba la resolución de procedimientos administrativos a cargo de las direcciones regionales de salud. Bajo esta norma, los establecimientos de salud, incluido los laboratorios pueden registrarse a través del Registro Nacional de Establecimientos de Salud (RENAES) (37).

CAPÍTULO III

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Resultados

El presente estudio de investigación tuvo por objetivo comparar los resultados de viabilidad celular obtenidos por los métodos de exclusión de azul tripano (Tryp-blue) y fluorescencia con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA-BrEt). En la tabla 1 se muestra el análisis de medidas de tendencia central y dispersión para los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Se aprecia que la viabilidad celular promedio por FDA-BrEt fue mayor a la obtenida por Tryp-blue, incluso con una menor dispersión de sus resultados, aunque con un rango intercuartil similar igual, a pesar que se observa sus valores mínimos y máximos diferentes.

Por otra parte, analizando la distribución de los datos obtenidos por ambos métodos, se aprecia que los coeficientes de asimetría (skewness) se aproximan a cero, mientras que la curtosis no está tan próximos a tres, razón por la cual es incierto definir si los datos siguen distribución normal.

Tabla 1. Estadísticos descriptivos de la viabilidad celular obtenida por el método de azul de tripano y fluorescencia

stats	FDA_Br~y	Trypan~y
N	30	30
mean	94.56667	91.13333
sd	1.406471	1.591645
p50	95	91
iqr	2	2
min	92	88
max	97	94
skewness	-.2518924	.1960748
kurtosis	2.285125	2.30186

Fuente: Hospital IV Augusto Hernández Mendoza de Ica, junio 2017

Adicionalmente, se analizaron las distribuciones de los datos obtenidos por ambos métodos, utilizando gráficos de histogramas (ver gráficos 1 y 2), donde se aprecia que los datos obtenidos por Tryp-blue tienen una ligera tendencia a la izquierda (cola a la izquierda), la cual podría presumir que se trate de una distribución no normal.

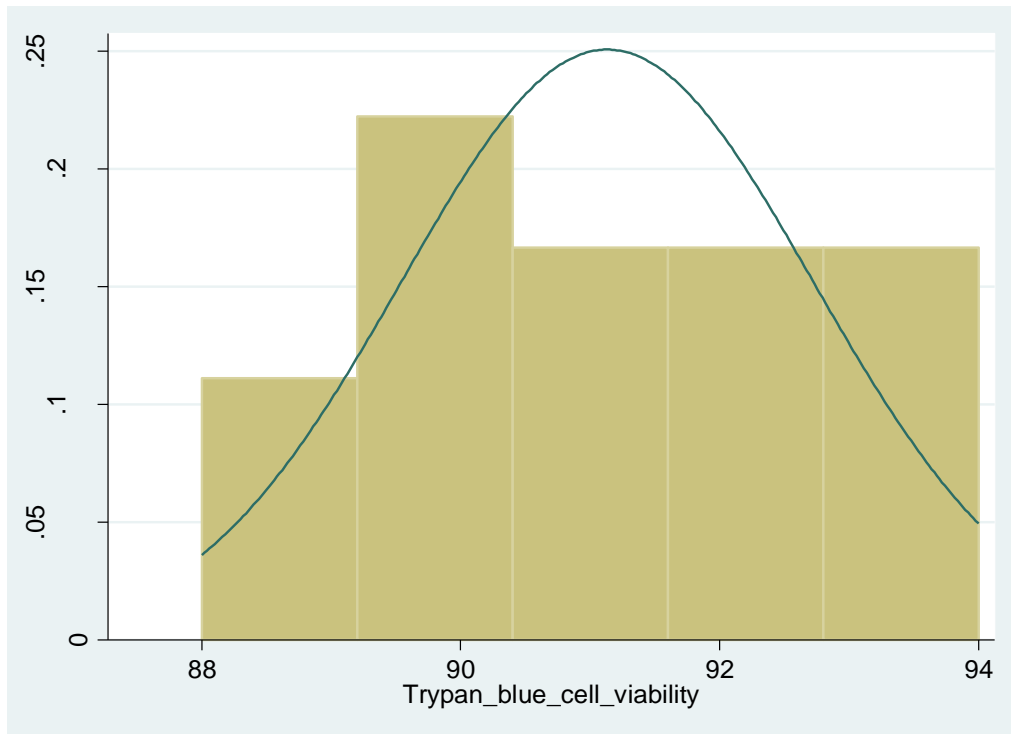


Gráfico 1. Histograma con curva normal de viabilidad celular con azul de tripano

En el caso de los datos obtenidos por FDA-BrEt, se aprecia una curva en forma de campana, el cual se asemeja más a una distribución normal.

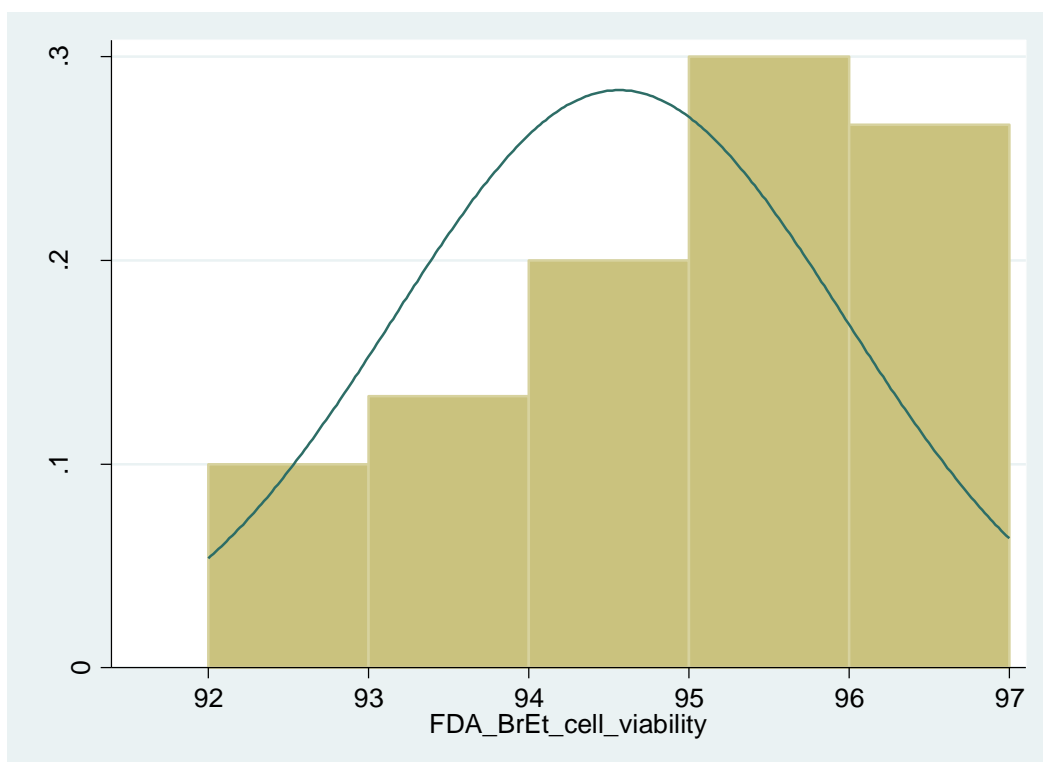


Gráfico 2. Histograma con curva normal de viabilidad celular con FDA/BrEt

Para corroborar si los datos tuvieron distribución normal, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (ver tabla 2), teniendo en cuenta que cuando los datos no tienen distribución normal, el valor p es menor a 0.05. En nuestro caso, los valores p no fueron menor a 0.05, por ende si confirma que los datos de ambas técnicas siguen distribución normal.

Tabla 2. Análisis de normalidad de datos con la prueba de Shapiro-Wilk

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
FDA_BrEt_c~y	30	0.98820	0.375	-2.028	0.97871
Trypan_blu~y	30	0.99036	0.307	-2.445	0.99276

Fuente: Hospital IV Augusto Hernández Mendoza de Ica, junio 2017

Este análisis preliminar fue importante para saber si la prueba de contraste de hipótesis (para comparación de medias) debían ser paramétricas (prueba t, chi cuadrado) o no paramétricas (prueba de signos, Wilcoxon y Mann

Whitney). Sin embargo, dado el número de muestras analizadas, también se realizará el análisis no paramétrico de los datos, para ser más estrictos al momento de concluir en función a los resultados.

La comparación de los resultados obtenidos por ambos métodos fue evaluada por la prueba t, previo cumplimiento de los supuestos de independencia de mediciones, normalidad (evaluada por la prueba de shapiro-wilk) y homocedasticidad (igualdad de varianzas), que al análisis mediante la prueba F, se obtuvo un valor $p = 0.5096$ (bilateral), el cual corrobora que las varianzas son iguales para ambos métodos. En la tabla 3 se muestra el análisis pareado con la prueba t, para evaluar los promedios obtenidos por las dos técnicas de viabilidad celular, evidenciándose que existen diferencias significativas entre ellas ($p < 0.001$, por ende el promedio de viabilidad celular obtenido por el método FDA-BrEt no es igual al promedio obtenido por Tryp-blue).

Tabla 3. Comparación de medianas según a prueba no paramétrica de Wilcoxon

Paired t test

Variable	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
FDA_Br~y	30	94.56667	.2567853	1.406471	94.04148	95.09185
Trypan~y	30	91.13333	.2905933	1.591645	90.539	91.72766
diff	30	3.433333	.3132453	1.715715	2.792675	4.073992

mean(diff) = mean(FDA_BrEt_cell_~y - Trypan_blue_ce~y) t = 10.9605
 Ho: mean(diff) = 0 degrees of freedom = 29

Ha: mean(diff) < 0
 Pr(T < t) = 1.0000

Ha: mean(diff) != 0
 Pr(|T| > |t|) = 0.0000

Ha: mean(diff) > 0
 Pr(T > t) = 0.0000

Fuente: Hospital IV Augusto Hernández Mendoza de Ica, junio 2017

En el gráfico 3 se comparan los resultados de viabilidad celular obtenidos por ambos métodos, y lo más visible es la no sobre posición de los rangos intercuartílicos (percentil 25 y 75) en ambos métodos, lo que se evidenció

previamente con el análisis del valor p, el cual fue mostró una diferencia altamente significativa.

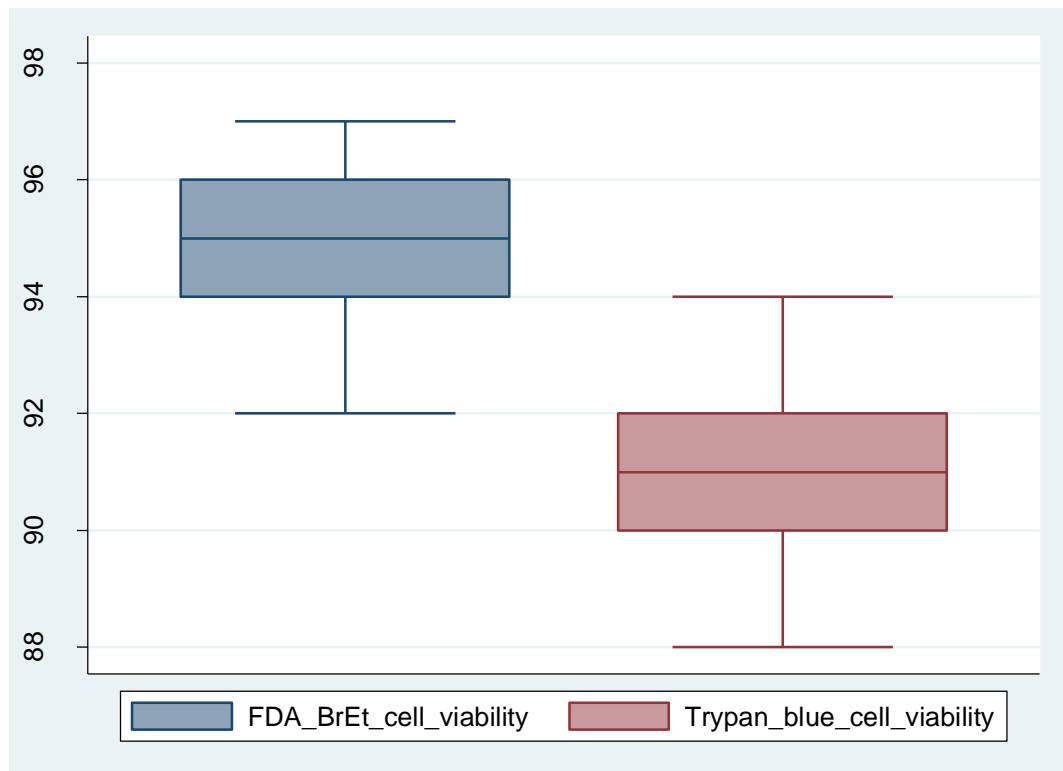


Grafico 3. Comparación de distribuciones de viabilidad celular en ambos métodos

Como se señaló anteriormente, para ser aún más conservador con el análisis de contraste de hipótesis, se aplicó dos pruebas no paramétricas para evaluar la igualdad de medianas de los resultados obtenidos por las dos técnicas de viabilidad celular. Cabe mencionar que este análisis adicional se realiza no como una exploración estadística de las hipótesis, sino como medida alternativa por la muestra que corresponde a 30 observaciones, siendo esta cantidad una que usualmente debería seguir una distribución normal de los datos, basado en la teoría del límite central.

En la tabla 4 se muestra los resultados correspondientes a la prueba no paramétrica de signos, la cual evalúa la calificación de resultados positivos y negativos (los cuales fueron definidos como tal en función a un punto de corte representado por el valor de la mediana) de la viabilidad celular obtenida por

ambas técnicas, y se observa que los resultados entre ambas técnicas presentan diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

Tabla 4. Comparación de medianas según a prueba no paramétrica de signos

Sign test

sign	observed	expected
positive	29	14.5
negative	0	14.5
zero	1	1
all	30	30

One-sided tests:

Ho: median of FDA_BrEt~y - Trypan_blue_cell_viability = 0 vs.

Ha: median of FDA_BrEt~y - Trypan_blue_cell_viability > 0

Pr(#positive >= 29) =

Binomial(n = 29, x >= 29, p = 0.5) = 0.0000

Ho: median of FDA_BrEt~y - Trypan_blue_cell_viability = 0 vs.

Ha: median of FDA_BrEt~y - Trypan_blue_cell_viability < 0

Pr(#negative >= 0) =

Binomial(n = 29, x >= 0, p = 0.5) = 1.0000

Two-sided test:

Ho: median of FDA_BrEt~y - Trypan_blue_cell_viability = 0 vs.

Ha: median of FDA_BrEt~y - Trypan_blue_cell_viability != 0

Pr(#positive >= 29 or #negative >= 29) =

min(1, 2*Binomial(n = 29, x >= 29, p = 0.5)) = 0.0000

Además, también se evaluó los rangos obtenidos por cada técnica mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon, la cual evidencia que hubo diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) entre los resultados de viabilidad generado por ambas técnicas de tinción. Ver tabla 5

Tabla 5. Comparación de medianas según a prueba no paramétrica de Wilcoxon

Wilcoxon signed-rank test

sign	obs	sum ranks	expected
positive	29	464	232
negative	0	0	232
zero	1	1	1
all	30	465	465

unadjusted variance 2363.75
adjustment for ties -19.63
adjustment for zeros -0.25

adjusted variance 2343.88

Ho: FDA_BrEt_cell_viability = Trypan_blue_cell_viability

$z = 4.792$
Prob > |z| = 0.0000

En el gráfico 3, se aprecia la dispersión de los resultados de viabilidad celular obtenidos por ambas técnicas, observándose además una línea que representa la correlación directa y positiva entre ambas.

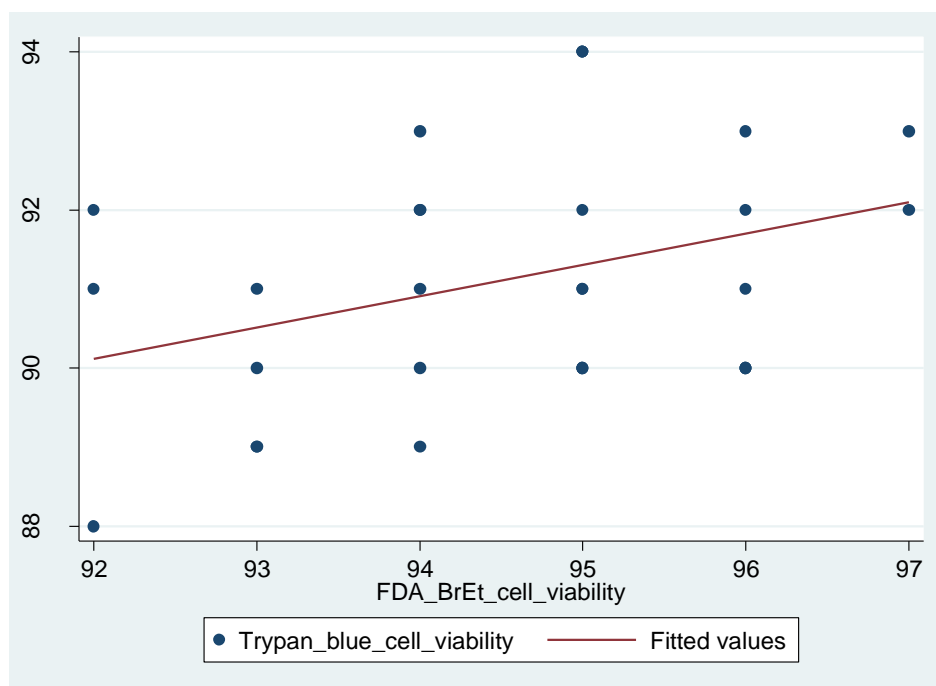


Grafico 4. Dispersión de la viabilidad celular en ambos métodos

Para estimar exactamente el nivel de correlación entre los resultados de viabilidad celular obtenidos por ambas técnicas, se procedió a calcular la

correlación de Pearson, previo análisis del cumplimiento de sus supuestos; en este caso, presencia de distribución normal univariada, bivariada y multivariada, la cual fue evaluada en la tabla 6, que evidencia que existe distribución normal, considerando que el p valor no fue menor a 0.05.

Tabla 6. Evaluación univariada, bivariada y multivariada de la normalidad de datos

Test for univariate normality

Variable	Pr(Skewness)	Pr(Kurtosis)	joint	
			adj chi2(2)	Prob>chi2
Trypan_blu~y	0.6095	0.4658	0.84	0.6582
FDA_BrEt_c~y	0.5130	0.4419	1.09	0.5811

Doornik-Hansen test for bivariate normality

Pair of variables	chi2	df	Prob>chi2
Trypan_blu~y FDA_BrEt_c~y	2.38	4	0.6658

Test for multivariate normality

Doornik-Hansen $\chi^2(4) = 2.383$ Prob>chi2 = 0.6658

En la tabla 7 se muestra el análisis de correlación de Pearson que evidencia un valor de $r=0.350$, el cual representa un nivel de relación lineal directa positiva baja entre los resultados de viabilidad celular obtenida por ambas técnicas.

Tabla 7. Análisis de correlación de Pearson para ambos métodos de viabilidad celular

	Trypan~y	FDA_Br~y
Trypan_blu~y	1.0000	
FDA_BrEt_c~y	0.3502	1.0000
	0.0578	

Adicionalmente al análisis del recuento de viabilidad celular obtenida por ambas técnicas como variables numéricas, se realizó una categorización de las mismas tomando como referencia el nivel de aceptabilidad para la viabilidad por Tryp-blue (viabilidad aceptable $\geq 92\%$) y FDA-BrEt (viabilidad aceptable $\geq 95\%$), de tal forma que se obtuvieron variables dicotómicas.

En la tabla 8 se observa que la mayoría de los recuentos obtenidos por el método FDA-BrEt presentan viabilidad aceptable, considerando que fueron muestras frescas de sangre obtenidas por gradiente de densidad con ficoll hipaque.

Tabla 8. Evaluación de proporciones de aceptabilidad de la viabilidad celular según el método FDA-BrEt

FDA_BrEt_Cat	Freq.	Percent	Cum.
No aceptable	3	10.00	10.00
Aceptable	27	90.00	100.00
Total	30	100.00	

En la tabla 9 se observa que solo un poco más de la mitad de los recuentos obtenidos por el método de Tryp-blue presentaron viabilidad aceptable, habiéndose trabajado en forma paralela al ensayo en fluorescencia, a fin de evitar variabilidad por el tiempo de espera al análisis.

Tabla 9. Evaluación de proporciones de aceptabilidad de la viabilidad celular según el método de azul tripano

Trypan_blue_Cat	Freq.	Percent	Cum.
No aceptable	12	40.00	40.00
Aceptable	18	60.00	100.00
Total	30	100.00	

En la tabla 10 se muestran los resultados de la comparación de las dos técnicas tomando como referencia el nivel de viabilidad aceptable para cada técnica, usando la prueba del chi cuadrado, el cual evidencia que las proporciones obtenidas por cada técnica es independiente de la otra ($p>0.05$).

Tabla 10. Comparación de proporciones entre ambos métodos de estudio de viabilidad celular

FDA_BrEt_Cat	Trypan_blue_Cat		Total
	No acepta	Aceptable	
No aceptable	1	2	3
Aceptable	11	16	27
Total	12	18	30

Pearson chi2(1) = 0.0617 Pr = 0.804

Finalmente, se realizó el análisis de concordancia a través del estadístico kappa, el cual fue corregido por el azar, y se observa un nivel de acuerdo esperado entre ambas pruebas del 58%. Ver tabla 11

Tabla 11. Análisis de concordancia entre los resultados de ambos métodos de estudio de la viabilidad celular

Agreement	Expected Agreement	Kappa	Std. Err.	Z	Prob>Z
56.67%	58.00%	-0.0317	0.1278	-0.25	0.5981

3.2. Discusión

La viabilidad celular quizá sea la característica más importante que se evalúa en los cultivos celulares *in vitro* y ampliamente utilizado en diseños experimentales de laboratorios de ciencias básicas. Por tal razón, es que el uso de técnicas que permitan su determinación de forma rápida y confiable resulta importante. En razón a ello, es que la técnica de exclusión Tryp-blue es una de las más utilizadas en los laboratorios de cultivo celular para determinación de viabilidad celular; sin embargo, numerosas publicaciones han demostrado sus limitaciones para evaluar otras características como morfología celular, distribución celular y en el fondo presenta menor capacidad de reconocer células que realmente están vivas (incremento de falsos negativos), teniendo en cuenta que las células pueden presentar daño a nivel de membrana celular (principalmente lipoperoxidación de membranas debido al estrés oxidativo y generación de especies reactivas de oxígeno), y ser permeables para el ingreso del azul de tripano y por lo tanto, se contabilizada como célula muerta, y a esto se suma la toxicidad generada por el mismo colorante, razón por el cual la técnica no debe extenderse más de 15 minutos entre muestra y colorante (39). Nuestros resultados confirman lo reportado en la literatura al apreciar que casi el 50% de los resultados tuvieron viabilidad no aceptable, considerando que las muestras fueron procesadas inmediatamente, utilizando células mononucleares de sangre periférica mediante el método de gradientes de concentración con ficoll hipaque.

Por otra parte, la mezcla de fluorocromos FDA-BrEt penetra rápidamente en la membrana plasmática celular y se metaboliza vía esterasas para formar fluoresceína, compuesto que emite fluorescencia de color verde (con una excitación máxima a una longitud de onda de 494 nm) y que representa viabilidad celular. También es importante señalar que para la obtención de resultados óptimos, el uso de FDA-BrEt debe realizarse en condiciones de oscuridad debido a la extrema sensibilidad del FDA (40). Tales características se respetaron en nuestros ensayos, incluso se trabajó por triplicado para evitar tener resultados desviados, y se utilizó el valor promedio para el análisis de contraste de hipótesis.

La exclusión de azul de tripano o de fluorocromos como el bromuro de etidio se utilizan a menudo como indicadores de la integridad de la membrana de las células vivas, ya que los colorantes pueden cruzar la membrana celular comprometida y teñir organelas celulares o estructuras en células muertas. Por tal razón, es que se aplican otros marcadores de viabilidad, usualmente un evento bioquímico que ocurre sólo en células vivas. Las sales de tetrazolio, preferentemente, se convierten en un producto de formazano mediante mitocondrias activas, que pueden ser medidas por lectura colorimétrica (41-43). De forma similar, la resazurina no fluorescente, por ejemplo, alamarBlue, puede ser convertida en resorufina fluorescente por mitocondrias activas, que entonces medirse por fluorescencia (44, 45). El ATP celular también se utiliza como marcador celular para la viabilidad (46-48). Sin embargo, por ser técnicas altamente sensibles y con muchos interferentes en la lectura final, es que no son muy utilizadas en los ensayos experimentales que implican cultivo celular.

A pesar que nuestros hallazgos evidencian una clara superioridad del ensayo FDA-BrEt sobre el azul de tripano, hay que señalar que la viabilidad celular puede variar en cada ensayo, más aun considerando que ambos están basados a la exclusión del colorante, y en muchas ocasiones, la integridad de la membrana puede recuperarse en células dañadas y volverse completamente viable. Por otra parte, también es conveniente mencionar que debido a que la absorción de colorante se evalúa subjetivamente, pequeñas cantidades de absorción de colorantes indicativas de lesión celular pueden pasar desapercibidas (3). Sin embargo, también es importante señalar que la lectura en microscopía fluorescencia está sujeta a interferencias, en que el diacetato de fluoresceína puede convertirse en fluoresceína por actividad de esterasa residual en células no viables. Del mismo modo, además de los ácidos nucleicos, el bromuro de etidio puede unirse a proteínas y glicosaminoglicanos en la membrana plasmática de células viables (9). No obstante, la preparación conjunta de ambos fluorocromos en una misma solución disminuye dicho efecto que se generó individualmente. Una ventaja a resaltar con la técnica en fluorescencia, está relacionado a la alta intensidad fluorescente de cada color tiende a enmascarar cualquier

fluorescencia opuesta causada por artefactos, eliminando de este modo cualquier ambigüedad en la identificación de células teñidas. Dado que el microscopio de fluorescencia utilizado en este estudio permitió la conmutación rápida entre múltiples filtros dicróicos, el estado fluorescente de cualquier célula podría ser confirmado inmediatamente por la visualización con un filtro alternativo. Por lo tanto, la identificación inequívoca del estado fluorescente y la precisión resultante en la estimación de la viabilidad del cultivo hicieron que el ensayo fluorométrico fuera más adecuado tanto para el uso rutinario en el cultivo celular como para la evaluación exacta de la citotoxicidad del compuesto.

Finalmente, podemos decir que nuestro ensayo constituye un aporte importante en la evaluación de la viabilidad celular, al utilizar un ensayo en fluorescencia, el cual es considerado en los procedimientos de citometría de flujo, pero que sin embargo en nuestro caso, puede tener aplicaciones manuales, y de una forma rápida, eficiente y versátil, con capacidad para aplicarse a cualquier línea celular que esté desarrollándose en un modelo *in vitro*.

3.3. Conclusiones

- Existen diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los resultados de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica mediante el empleo de la técnica del azul tripano y fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína
- La viabilidad celular promedio obtenida por la técnica en fluorescencia con el diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio es mayor en comparación que la técnica con azul de tripano, por ende es una técnica más precisa.
- La variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína es menor que la obtenida por la técnica del azul tripano
- Los resultados de viabilidad celular obtenida por la técnica en fluorescencia con el diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio tiene una baja relación lineal directa con la técnica con azul de tripano.

- El porcentaje de acuerdo corregido por el azar de los resultados de viabilidad celular obtenida por la técnica en fluorescencia con el diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio y la técnica con azul de tripano es de 58%.

3.4. Recomendaciones

- Evaluar la viabilidad celular obtenida por FDA-BrEt en modelos celulares distintos a las células mononucleares en sangre periférica y que sean cultivadas in vitro y además puedan ser sometidas a un agente citotóxico para verificar dosis-respuesta.
- Validar la técnica FDA-BrEt en un modelo experimental que permita evaluar parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, negativo, resultados falsos positivos y negativos.

REFERENCIAS BIBLOGRÀFICAS

1. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;740:1-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21468961>
2. Terry L Riss, PhD, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor. *Cell Viability Assays. Assay Guidance Manual.* Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
3. Strober, W. 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology.* 21:3B:A.3B.1–A.3B.2. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.ima03bs21/full>
4. Boncler M, Róźalski M, Krajewska U, Podsędek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 2014;69(1):9-16. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871913003006>
5. Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research.* 2014;14(7):1068-79. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/1567-1364.12202>
6. Li X, Niu Y, Jia Q, Zhang Z, Duan H, Wang X, et al. [Comparison of four cytotoxicity assays for determining the acute toxicity of diesel exhaust particulate extracts]. *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research.* 2013;42(2):221-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23654097>
7. Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of biomolecular screening.* 2004;9(6):506-15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452337>
8. Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM, Cree IA. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence.* 1995;10(1):29-34. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bio.1170100105/abstract>

9. Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 1993;9(6):671-4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7764357>
10. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(1):77-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578146>
11. Bank HL. Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia.* 1987;30(10):812-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3322907>
12. Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988 Apr;24(4):266-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3284875>
13. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* 2005;11:127-52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216776>
14. Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem* 2007;366:197–206. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512890>
15. Frank Fan and Keith V. Wood. Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY and Drug Development Technologies.* 2007;5(1):127-36. Disponible en: <https://www.urmc.rochester.edu/MediaLibraries/URMCMedia/hts/documents/luciferase.pdf>
16. Giuliano KA, Taylor DL. Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 1998 Mar;16(3):135-40. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779997011669>
17. Emilson LB, Dougherty KA, Cockett AT, Urry RL. Simultaneous determination of human sperm morphology and viability: simple office technique. *Urology* 1978; 11(5):488–491. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/79262>

18. Debbage P. Distinctive structural and cytoskeletal properties of the long-surviving neurons in cell cultures of embryonic spinal cord. *Neuroscience* 1985; 14(1):207–224. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4038789>
19. Allen JC. Sodium and potassium content and viability of mouse mammary gland tissue and acini. *J Dairy Sci* 1988; 71(3):633–642. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3372813>
20. Fernández-Segura E, Cañizarez FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X- ray microanalysis. *Experimental cell Research* 1999b; 253:454-62. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482799946578>
21. Roomans GM, Von Euler A. X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int* 1996; 20(2):103-109. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1065699596900141>
22. Dougherty KA, Emilson LB, Cockett AT, Urry RL. A comparison of subjective measurements of human sperm motility and viability with two live-dead staining techniques. *Fertil Steril*. 1975;26: 700-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/50237>
23. Fernando M Penha, Marianne Pons, Elaine Fiod Costa, Eduardo B. Rodrigues, Mauricio Maia, Maria E Marin-Castaño, and Michel Eid Farah. Effect of vital dyes on retinal pigmented epithelial cell viability and apoptosis: implications for chromovitrectomy. *Ophthalmologica*. 2013; 230(0 2): 41-50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022718>
24. Krause AW, Carley WW, Webb WW. Fluorescent erythrosin B is preferable to trypan blue as a vital exclusion dye for mammalian cells in monolayer culture. *J Histochem Cytochem*. 1984;32(10):1084-90. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6090533>
25. Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*. 2000 Jun;40(6):693-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864990>
26. Miyamoto M, Morimoto Y, Nozawa Y, Balamurugan AN, Xu B, Inoue K. Establishment of fluorescein diacetate and ethidium bromide (FDAEB) assay for quality assessment of isolated islets. *Cell Transplant*. 2000 Sep-Oct;9(5):681-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11144965>

27. Bratosin D, Mitrofan L, Palii C, Estaquier J, Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A*. 2005 Jul;66(1):78-84. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15915509>
28. PROMEGA. *Protocols & Applications Guide: Cell viability*. 2011. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/>
29. 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
30. 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
31. World Health Organization. *Good Clinical Laboratory Practice (GCLP)*. 2008. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/gclp-web.pdf>
32. Ministerio de Salud. Ley N° 26842: Ley General de Salud. 1997. Disponible en: ftp://ftp.minsa.gob.pe/intranet/leyes/L-26842_LGS.pdf
33. 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
34. 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*.
35. 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
36. 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>

37. Ministerio de Salud. Resolución Ministerial N° 454-2009/MINSA. Relación de Procedimientos Administrativos a cargo de las Direcciones Regionales de Salud. 2009
38. Instituto Nacional de Salud 2003. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. Lima, Perú. Disponible en: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/37.pdf
39. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures. (Doyle, A., Griffiths, J.B., and Newell, D.G., Ed.). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, England. 1995. Disponible en: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471982555.html>
40. Haughland RP. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 1996. Molecular Probes Inc, Eugene Oregon, 6th edition.
41. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65,55-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
42. Scudiero, D.A. et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 1988;48,4827-33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3409223>
43. Berridge, M.V., Herst, P.M. & Tan, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005;11,127-52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216776>
44. Nociari, M.M., Shalev, A., Benias, P. & Russo, C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. J Immunol Methods. 1998;213,157-67. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9692848>
45. De Fries, R. & Mitsuhashi, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. J Clin Lab Anal. 1995;9,89-95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7714668>
46. Petty, R.D., Sutherland, L.A., Hunter, E.M. & Cree, I.A. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. J Biolumin

- Chemilumin. 1995;10,29-34. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762413>
47. Koop, A. & Cobbold, P.H. Continuous bioluminescent monitoring of cytoplasmic ATP in single isolated rat hepatocytes during metabolic poisoning. *Biochem J.* 1993;295(1),165-70. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8216212>
48. Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. & Fletcher, J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1993;160,81-8. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002217599390011U>

ANEXO 1: MATRÍZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EVALUADAS EN EL HOSPITAL IV AGUSTO HERNÁNDEZ MENDOZA DEL DISTRITO DE ICA

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	INSTRUMENTOS	METODOLOGÍA
<p>General: ¿Existen diferencias significativas entre los resultados de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica mediante el empleo de la técnica del azul tripano y fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína?</p> <p>Específico: ¿Cuál es la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano? ¿Cuál es la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de</p>	<p>General: Comparar dos técnicas para la cuantificación de la viabilidad en células mononucleares de sangre periférica evaluadas en el Hospital Augusto Hernández Mendoza del Distrito de Ica</p> <p>Específico: Cuantificar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano Cuantificar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con</p>	<p>General: Existen diferencias significativas entre los resultados de viabilidad en células mononucleares de sangre periférica mediante el empleo de la técnica del azul tripano y fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína</p> <p>Específico: El porcentaje de viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano es menor que la obtenida por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína La variabilidad de la viabilidad de</p>	<p>Viabilidad celular en PBMC</p>	<p>Viabilidad celular por exclusión de azul tripano en microscopía de luz visible</p> <p>Viabilidad celular por fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína en microscopía de fluorescencia</p>	<p>Diseño de estudio: Descriptivo de tipo transversal</p> <p>Población: Todas las muestras de sangre colectadas para la obtención de PBMC en el laboratorio clínico del hospital Augusto Hernández Mendoza de Ica</p> <p>Muestra: 30 muestras de</p>

<p>fluoresceína?</p> <p>¿Cuál es la variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano?</p> <p>¿Cuál es la variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína?</p>	<p>bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína</p> <p>Determinar variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica del azul tripano</p> <p>Determinar la variabilidad de la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína</p>	<p>células mononucleares de sangre periférica por la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio y diacetato de fluoresceína es menor que la obtenida por la técnica del azul tripano</p>			<p>sangre, calculada por muestreo probabilístico a un nivel de confianza del 95%</p>
--	---	--	--	--	--

ANEXO 2: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código de muestra	Fecha de la prueba	Hora de la prueba	Viabilidad en PBMC	
			Azul tripano	BrEt / FDA
			%	%
M-01				
M-02				
M-03				
M-04				
M-05				
M-06				
M-07				
M-08				
M-09				
M-10				
M-11				
M-12				
M-13				
M-14				
M-15				
M-16				
M-17				
M-18				
M-19				
M-20				
M-21				
M-22				
M-23				
M-24				
M-25				
M-26				
M-27				
M-28				
M-29				
M-30				

ANEXO 3: FIGURAS

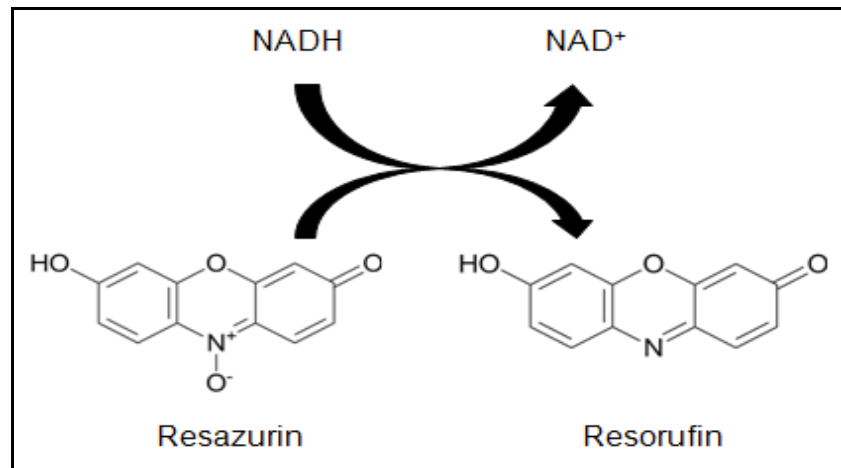


Figura 01. Reducción de la resazurina a resorufina el cual presenta fluorescencia rosa típico en las células viables.

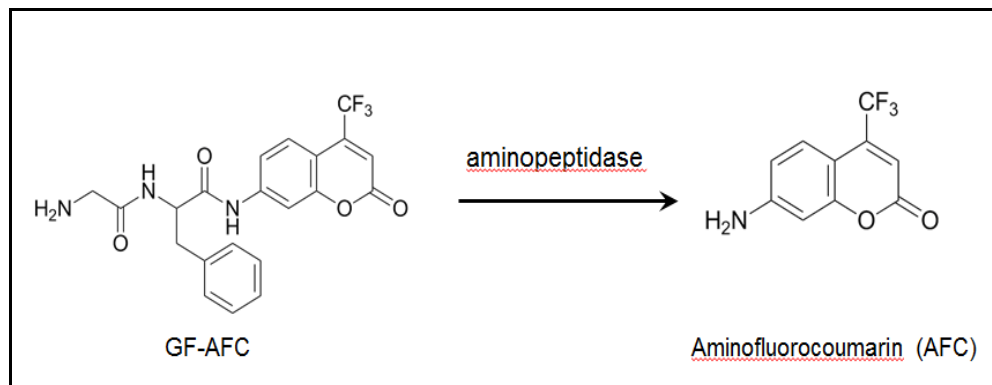
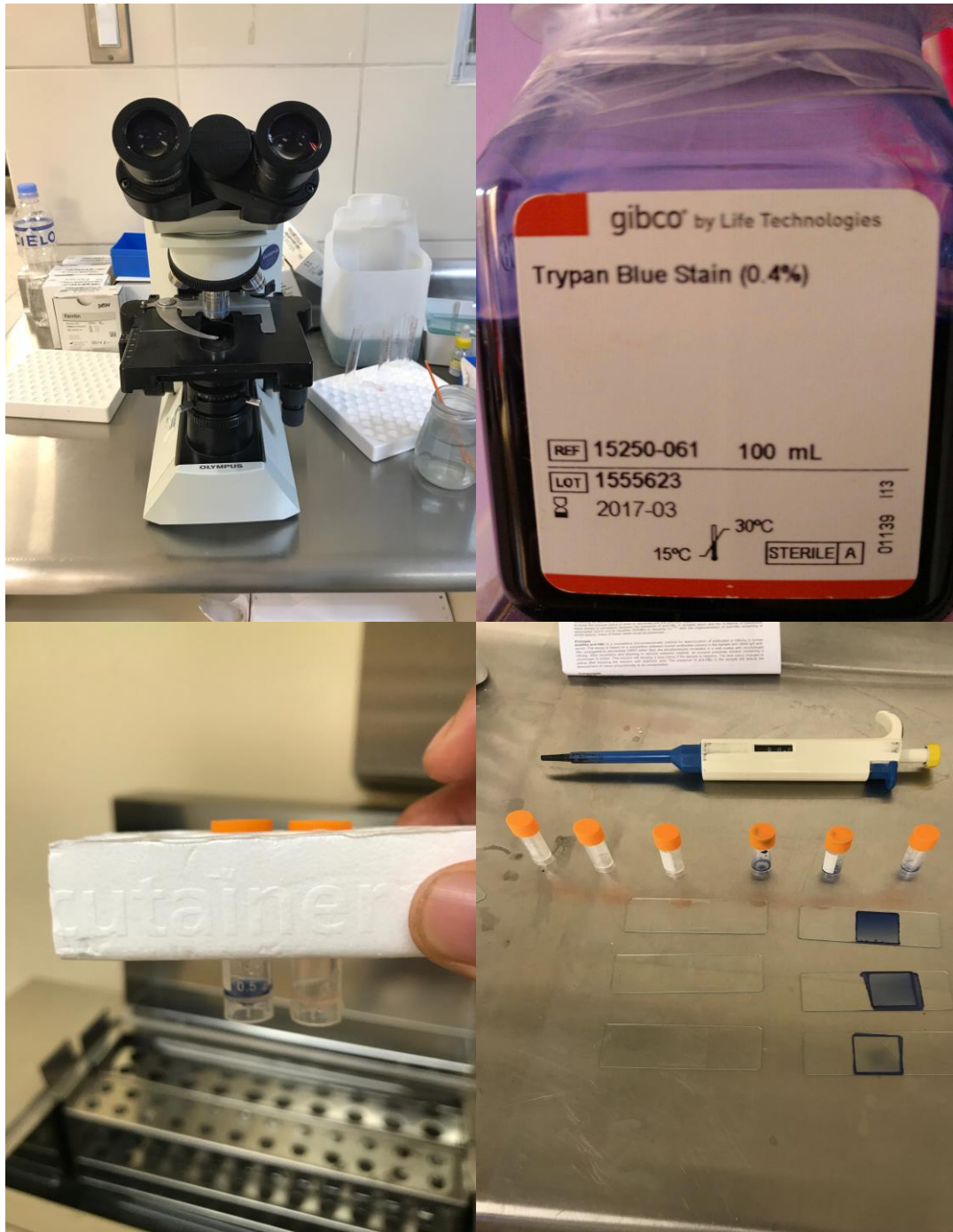


Figura 02. Conversión del sustrato GF-AFC a AFC por la actividad enzimática de la aminopeptidasa

ANEXO 4: GALERÍA FOTOGRÁFICA



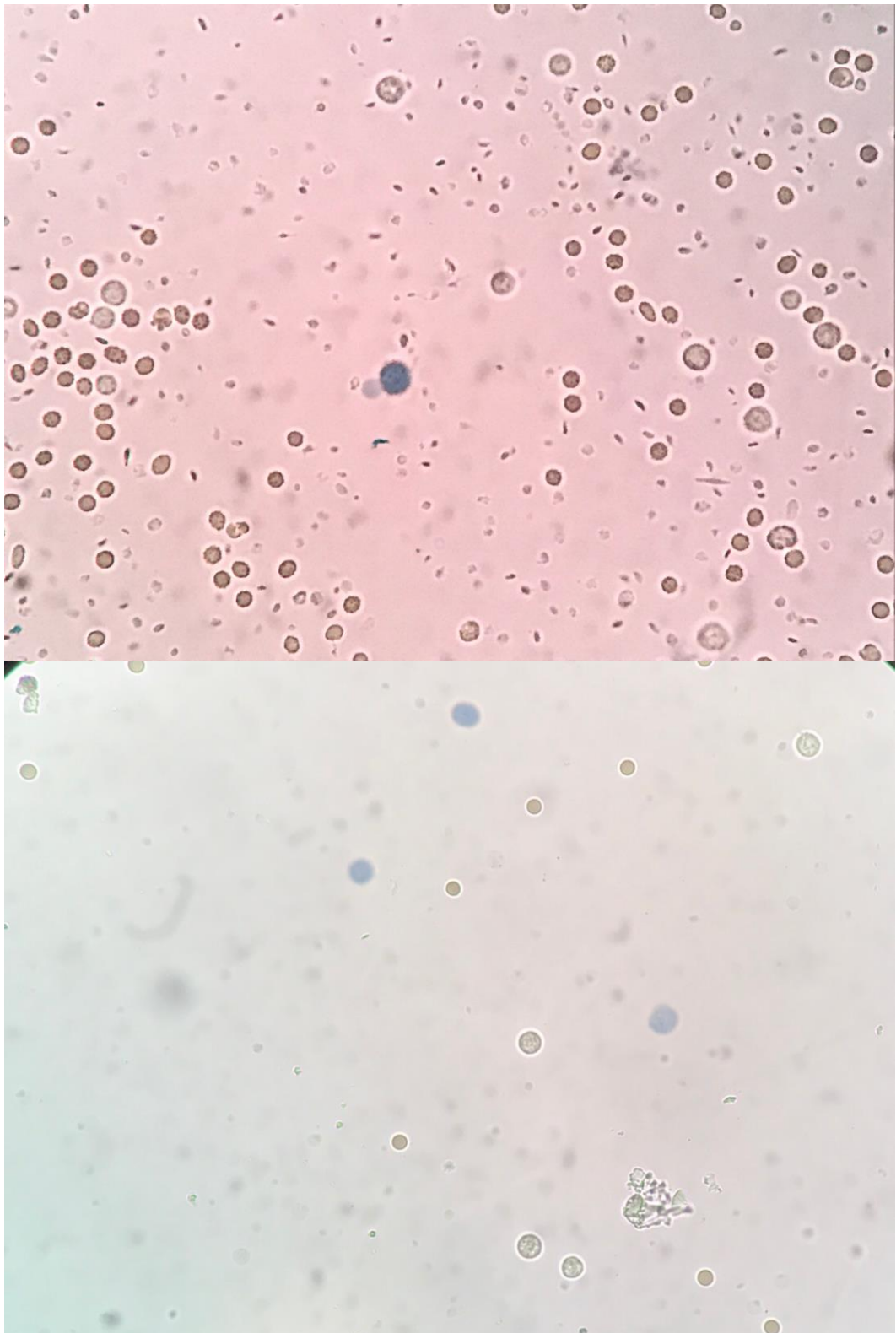
Fotografía 1. Tubos de sangre con EDTA (a), Solución de Ficoll-hipaque (2), centrifuga para separación por gradientes (3) y obtención de PBMC (4)



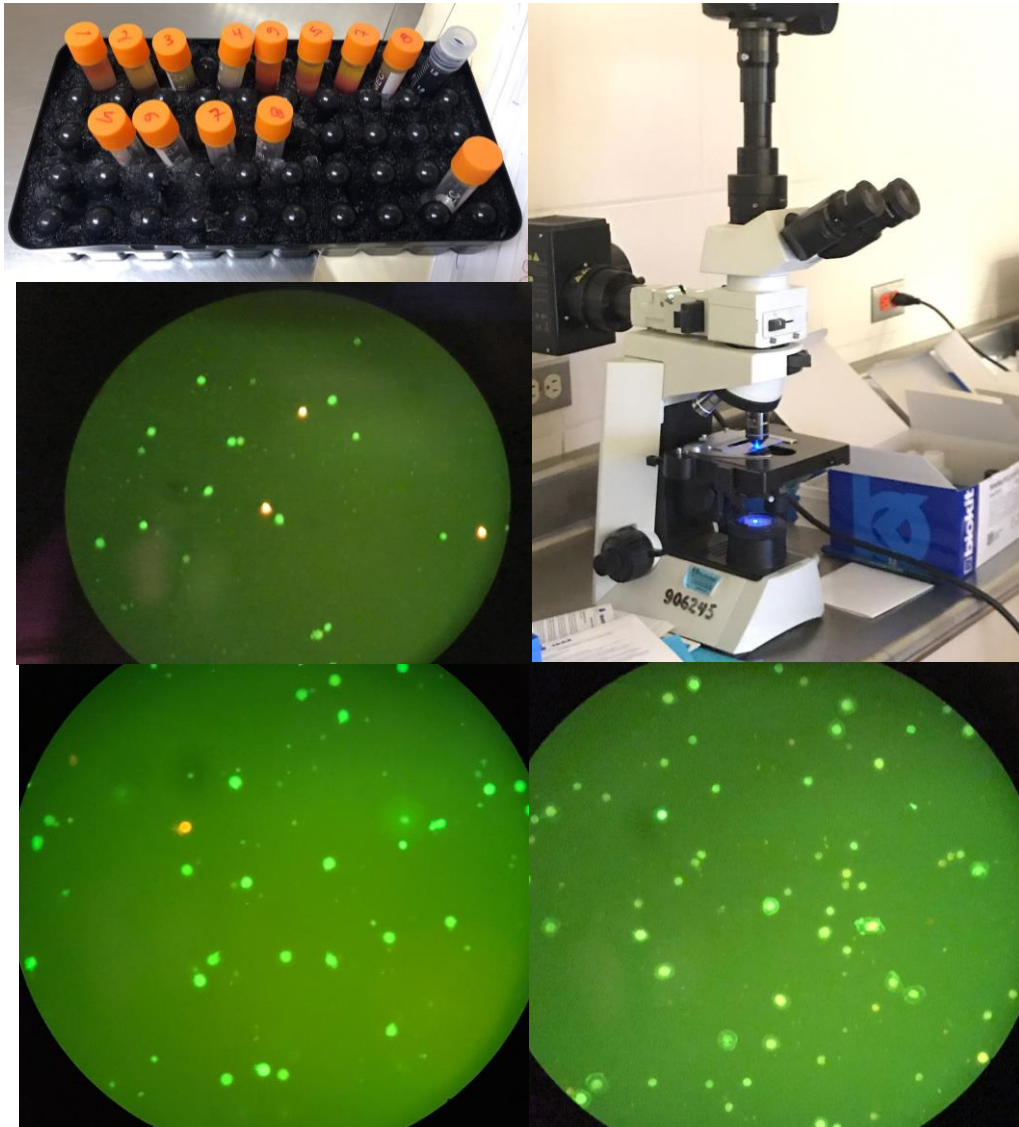
Fotografía 2. Microscopio binocular con luz visible (1), Colorante supravital azul de tripano (2), Incubación de PBMC con azul de tripano (3) y láminas preparadas con azul de tripano para su posterior revisión microscópica (4)



Fotografía 3. Preparados para el estudio de la viabilidad en PBMC por el método de exclusión del azul de tripano



Fotografía 4. Viabilidad en PBMC por el método de exclusión del azul de tripano (Aumento: 40X)



Fotografía 5. Viabilidad en PBMC por el método de FDA/BrEt en microscopía de epifluorescencia (Aumento: 40X)

GLOSARIO

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.

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.

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.

Fluorescencia. Es la propiedad que tienen algunas sustancias de reflejar luz con mayor longitud de onda que la recibida, cuando están expuestas a ciertos rayos del espectro.

Fluorocromo. Es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda (es decir, con menor energía). La cantidad de energía emitida y su longitud de onda dependen tanto del propio fluorocromo como de su ambiente químico.

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.

PBMC. Proviene de los términos en inglés: peripheral blood mononuclear cell, son células sanguíneas caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos. Estas células sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente para combatir las infecciones.

Viabilidad celular. Es la cualidad que tienen las células compatibles con la vida.