

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Evaluación genotóxica de una población escolar
expuesta a altos niveles de plomo, en la provincia
constitucional del Callao**

TESIS

para optar al título profesional de Bióloga con Mención en Biología Celular
y Genética

AUTORA

Mirian Antonia Pariona Canchiz

ASESORAS

Margarita Velásquez Reinoso

Bertha Gallardo Jugo

Lima – Perú

2010

Dedico este trabajo a mi familia:

A mis padres: Antonia y Roberto.

A mis hermanos: Rocio, Andrea y Roberto Pedro.

Agradecimientos

La realización de un proyecto de Investigación es un arduo trabajo, que requiere mucho tiempo y esfuerzo, no sólo por quien lo realiza sino por la gente de su entorno. Es por eso que quiero hacer un especial agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante estos años.

A mi familia, por ellos que estoy aquí; a mi madre por su constante apoyo, fuerza y preocupación, a mi padre por su esfuerzo y entusiasmo en cada paso que realizo, a mis hermanos que comprendieron qué significa *Ser Biólogo*, gracias por apoyarme todo este tiempo.

Mi agradecimiento especialmente a mis asesoras: A la Blga. Margarita Velásquez quien fue la primera en ver el potencial del proyecto, a la Dra. Bertha Gallardo porque confió en el proyecto y me ayudó para que se ejecutara; de igual manera a todo el personal del Servicio de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño.

A mi amiga Blga. Eva María Ruiz por su ayuda, compañía y entusiasmo en las visitas a Puerto Nuevo, quien junto a la Tec. Med. Isabel Saavedra me ayudó en la ejecución de la parte experimental del proyecto; a la señora Carmen por sus rezos y bendiciones, así como también a Jorge Uriarte porque me estimuló a luchar y perseguir mis sueños.

A Leopoldo Navarro Cavero trabajador de la I.E.N. “Maria Reiche” N° 5045 del A.A.H.H. Puerto Nuevo – Callao, quien nos facilitó la entrada al A.A.H.H. Puerto Nuevo y nos ayudó en la obtención de los participantes para la investigación.

Al ingeniero Barrientos por su apoyo en la parte estadística de este trabajo. A la profesora Magister Martha Valdivia Cuya por la donación de un reactivo empleado en la técnica.

Al IV Fondo Concursable del Instituto Nacional de Salud del Niño por el financiamiento para llevar a cabo este proyecto.

CONTENIDO

	Página
Contenido	VII
Abreviaturas	IX
Lista de Figuras	X
Lista de Tablas	XII
Lista de Anexos	XIII
Resumen	XV
	Abstract XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 El Plomo – Descripción General.....	7
2.1.1 El Plomo y el Medio Ambiente.....	8
2.1.2 ¿Cómo nos contaminamos del Plomo?.....	8
2.2 Metabolismo del Plomo.....	9
2.2.1 Efectos del Plomo en la Salud.....	11
2.3 Toxicología.....	14
2.3.1 Toxicidad.....	15
2.3.2 Toxicología Genética.....	16
2.4 Genotoxicidad.....	17
2.4.1 Biomarcadores de Genotoxicidad.....	18
2.4.2 Ensayo de Genotoxicidad <i>in vitro</i>	19
2.4.2.1 Ensayo de Micronúcleos.....	20
3. MATERIALES.....	24
3.1 Material Biológico.....	25
3.1.1 Población de Estudio.....	25

3.2 Material de laboratorio.....	26
3.2.1 Material en general.....	26
3.2.2 Reactivos	27
3.2.3 Equipos.....	28
4. METODOLOGÍA.....	29
4.1 Tipo de Estudio y Diseño de la Investigación.....	30
4.2 Selección de Individuos.....	30
4.3 Formulario de Datos.....	30
4.4 Obtención de la muestra.....	31
4.5 Dosaje de Plomo.....	32
4.6 Ensayo de Micronúcleos con Bloqueo de Citocinesis.....	32
4.6.1 Siembra de la muestra.....	32
4.6.2 Cosecha de la muestra en 72 horas.....	32
4.6.3 Lectura de la muestra.....	33
4.6.4 Criterios de selección y lectura de los micronúcleos.....	34
4.7 Análisis Estadístico	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSIÓN.....	49
7. CONCLUSIONES.....	55
8. RECOMENDACIONES.....	57
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	59
10. ANEXOS.....	69

ABREVIATURAS

AC	: Anomalías Cromosómicas.
DNA	: Ácido Desoxiribonucleico.
ATSDR	: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CBMN	: Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.
Cyt.-B	: Citocalasina - B
EPA	: Environmental Protection Agency
HPA	: Health Protection Agency
IACR	: International Agency for Research on Cancer
MN	: Micronúcleo
NIEHS	: National Institute of Environmental Health Sciences
OMS	: Organización Mundial de la Salud
Pb	: Plomo
ROS	: Reactive Oxygen Species
UNICEF	: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
WHO	: World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura N° 1: Esquema de las reacciones catalizadas por las enzimas y sus repercusiones a nivel molecular y celular.	18
Figura N° 2: Origen de los micronúcleos. Pérdida de un cromosoma o de un fragmento acéntrico durante la anafase celular.....	21
Figura N° 3: Esquematización de la función de la citocalasina -B en la citocinesis.....	23
Figura N° 4: Porcentaje de niños evaluados según el sexo.....	37
Figura N° 5: Diferencia del número de niños en ambos grupos según la variable sexo.....	38
Figura N° 6: Dosaje de los niveles de plomo en sangre en ambos grupos.....	40
Figura N° 7: Porcentaje de micronúcleos en ambos grupos.....	41
Figura N° 8: Correlación significativa moderada entre el nivel de plomo y el porcentaje de micronúcleos en el grupo control.....	42
Figura N° 9: Correlación no significativa entre el nivel de plomo y el porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo.....	43

Figura Nº 10: Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con la edad en la población total.....	44
Figura Nº 11: Correlacion significativa muy baja entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo control.....	44
Figura Nº 12: Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con la edad en el grupo control.....	45
Figura Nº 13: Correlación significativa baja entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo de riesgo (n =40).....	45
Figura Nº 14: Correlación significativa moderada entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo de riesgo (n = 38).....	46
Figura Nº 15: Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con la edad en el grupo de riesgo.....	46
Figura Nº 16: Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con el sexo en la población total.....	47
Figura Nº 17: Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con el sexo en el grupo control.....	48
Figura Nº 18: Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con el sexo en el grupo de riesgo.....	48

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla Nº 1: Análisis de resultados según la variable sexo en ambos grupos.....	37
Tabla Nº 2: Análisis de resultados según las variables edad, peso y talla en ambos grupos.....	38
Tabla Nº 3: Dosaje de los niveles de plomo en sangre.....	39
Tabla Nº 4: Porcentaje de los niveles de plomo en sangre.....	40
Tabla Nº 5: Porcentaje de micronúcleos.....	41

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo N°1 : Consentimiento informado.....	70
Anexo N°2 : Hoja de Datos.....	80
Anexo N°3 : Determinación de las diferencias de los promedios de los niveles de plomo en sangre y del porcentaje de micronúcleos en ambos grupos de estudio.....	82
Anexo N°4 : Correlación entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre y el porcentaje de micronúcleos en la población total.....	83
Anexo N°5 : Determinación de la correlación entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre y el porcentaje de micronúcleos en el grupo control.....	84
Anexo N°6 : Determinación de la correlación entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre y el porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo.....	85
Anexo N°7 : Determinación de la correlación entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en la población total.....	86

Anexo N°8 : Determinación de la correlación entre el porcentaje de micronúcleos
y la edad en el grupo control.....87

Anexo N°9 : Determinación de la correlación entre el porcentaje de micronúcleos
y la edad en el grupo de riesgo.....88

RESUMEN

El plomo es un metal tóxico empleado en diversos procesos industriales, sin embargo, debido a su persistencia en el medio ambiente afecta seriamente la salud humana. Nuestro país no es ajeno a esta contaminación, la Provincia Constitucional del Callao es una de las zonas más contaminadas donde los niños son los principales afectados. Siendo el plomo un agente genotóxico es importante realizar ensayos de genotoxicidad a la población afectada para determinar el daño que ejerce éste en el organismo.

Este trabajo relaciona el efecto genotóxico del plomo mediante la presencia de micronúcleos en niños de poblaciones escolares expuestas y no expuestas a este metal. Se realizó un estudio transversal comparativo en 80 niños con edades comprendidas entre 6 a 13 años; 40 niños residentes en el A.A.H.H. Puerto Nuevo-Callao (grupo de riesgo) y 40 niños del distrito Magdalena del Mar (grupo control). Se determinó el daño genotóxico mediante la técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis y dosaje de plomo en sangre mediante la técnica de absorción atómica-horno de grafito.

Los datos fueron analizados mediante las pruebas no paramétricas de Spearman y de Umann Whitney, utilizando el programa estadístico SPSS 15. Obteniéndose en la población total un nivel de plomo de 5.24 ± 3.00 ug/dL; en el grupo de riesgo 6.90 ± 2.55 ug/dL y en el grupo control 3.57 ± 2.48 ug/dL. El porcentaje de micronúcleos en la población total fue 8.34 ± 6.00 ‰; en el grupo de riesgo 12.33 ± 5.53 ‰ y en el grupo control 4.35 ± 3.16 ‰.

La relación del nivel de plomo con micronúcleos en la población total fue $r = 0.658$; en el grupo de riesgo $r = -0.068$ y en el grupo control $r = 0.763$.

La relación de porcentaje de micronúcleos con la edad en la población total fue $r = 0.255$; en el grupo de riesgo $r = 0.669$ y en el grupo control $r = 0.154$.

El análisis estadístico determinó que existe una correlación significativa directa entre el tiempo de exposición con el porcentaje de micronúcleos, encontrándose que existe un efecto genotóxico en la población de riesgo evidenciado por un aumento significativo en el porcentaje de micronúcleos. Del mismo modo, los niveles de plomo son significativamente mayores en la población de riesgo que en la de control.

Por otro lado el efecto genotóxico hallado en la población de riesgo no es considerado evidencia para un daño degenerativo mayor como el cáncer. Se recomienda continuar un seguimiento de dosaje de plomo y análisis de micronúcleos en el grupo de riesgo a fin de evaluar existencia de daño en el transcurso del tiempo.

Palabras claves: plomo, niños, dosaje de plomo en sangre, porcentaje de micronúcleos, efecto genotóxico.

ABSTRACT

The lead is a toxic metal used in many industrial processes, however, due to its persistence in the environment affects human health seriously. Our country is not beyond to this pollution, Callao Constitutional Province is one of the most polluted cities where children are the most affected. Being the lead a genotoxic agent, it is important to realize genotoxicity tests to the affected population to determine the damage caused by this agent in the organism.

This work joined the lead's genotoxic effect through micronucleus presence in children of school population exposed and not exposed to this metal. A comparative cross-sectional study was made in 80 children aged 6 to 13 years; 40 resident children in the A.A.H.H Puerto Nuevo – Callao considered group at risk and 40 children residing in Magdalena considered group control. The genetic damage was determined by the micronucleus technique with cytokinesis block in peripheral blood, the lead levels in blood were blood test using the Atomic Absorption Graphite Furnace technique.

Data were analyzed using Spearman and Umann Whitney non parametric tests with the help of the statistical package SPSS 15; obtaining blood lead level in the total population, it was 5.24 ± 3.00 ug/dL; in the group at risk 6.90 ± 2.55 ug/dL and the control group 3.57 ± 2.48 ug/dL micronucleus percentage in the total population was 8.34 ± 6.00 ‰; in the group at risk 12.33 ± 5.53 ‰ and the control group 4.35 ± 3.16 ‰.

The relationship between micronucleus and lead levels in the total population was $r = 0.658$; in the group at risk $r = -0.068$ and the control group $r = 0.763$. The relationship between micronucleus percentage and the total population age was $r = 0.255$; in the group at risk $r = 0.699$ and the control group $r = 0.154$.

Statistical analysis determined there is a significant direct correlation between exposure times to the micronucleus percentage, found that there is a genotoxic effect on the population at risk evidenced by a significant increase in the micronucleus percentage. Similarly, lead levels are significantly higher in the population at risk than in the control.

On the other hand the genotoxic effect found in the population at risk is not considered an evidence for further as cancer degenerate damage. It's recommendable to follow a lead dosage and micronucleus analysis in the group at risk in order to assess damage existence in the course of time.

Keywords: lead, children, lead levels in blood, micronucleus percentage, genotoxic effect.

1. INTRODUCCIÓN

El plomo es un metal indestructible, persiste en el medio ambiente y puede movilizarse de un lugar a otro (UNICEF, 2000; ATSDR, 2005), es un contaminante ambiental, su nivel permisible máximo es de 10ug/dL según la Organización Mundial de la Salud “OMS” (WHO, 2001).

Las personas están expuestas al plomo a través del aire que respiran (trabajos relacionados con la manufactura, reciclaje y vehículos motorizados con gasolina con plomo), el agua que beben e incluso en la comida que ingieren (NIEHS, 2005; ATSDR, 2005). La intoxicación por el plomo afecta a varios sistemas del cuerpo incluyendo el sistema reproductor y nervioso (HPA, 2006; ATSDR, 2005). En las madres gestantes el plomo atraviesa la barrera placentaria, afecta el desarrollo del cerebro del feto sobre todo a nivel neuroconductual, ocasiona nacimientos prematuros y recién nacidos con bajo peso, el mismo que puede prolongarse más allá de la infancia (HPA, 2006; UNICEF, 2000). El plomo se acumula en los tejidos blandos y en los huesos (ATSDR, 2005), interviene en el metabolismo del calcio y de la vitamina D; el plomo compite con el calcio y el hierro, por ello se observa hipocalcemia y anemia, siendo los niños los más vulnerables (HPA, 2006; UNICEF, 2000).

Los niños son más sensibles a la contaminación por plomo, debido a su edad, hábitos de alimentación y juego (pueden ingerir alimentos, tierra y hasta pintura contaminada, chupar o morder lápices de colores y juguetes, o absorberlos por vía cutánea); sus altos niveles causan daños irreversibles, afectando principalmente el sistema nervioso (problemas de aprendizaje, comportamiento), y su crecimiento (talla inferior al promedio) (UNICEF, 2000; ATSDR, 2005, HPA, 2006).

El plomo es considerado como un agente genotóxico (Vaglenov A. *et al.*, 2001), que puede causar aberraciones y roturas cromosómicas, o errores durante la reparación y posterior división celular del DNA, debido a la inhibición de la síntesis y reparación del

DNA, daño oxidativo interacción con proteínas de unión al DNA y proteínas supresoras de tumores (inestabilidad cromosómica) (ATSDR, 2005). Los pocos estudios que relacionan el efecto genotóxico del plomo con riesgo de cáncer son contradictorios (Moore M. *et al.*, 1979; Jemal A. *et al.*, 2002; Gidlow D., 2004; Van Wijngaarden B. *et al.*, 2006) por ello la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) lo consideran como probable cancerígeno humano, siendo importante la detección de la inestabilidad cromosómica en personas con altos niveles de plomo en sangre para proporcionar mayor información sobre el daño cromosómico.

La técnica adecuada para evaluar la inestabilidad cromosómica inducida por agentes genotóxicos (plomo) es el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) (Fenech M. *et al.*, 1999; Zalacain M. *et al.*, 2005). Se basa en la utilización de un agente químico “citocalasina-B” capaz de impedir la citocinesis (no división del citoplasma) permitiendo la división nuclear, proporcionando a las células un aspecto de binucleadas monodividas, donde se pueden observar indirectamente alteraciones del tipo estructural “efecto clastogénico” o alteraciones numéricas “efecto aneugénico” (Vaglenov A. *et al.*, 2001; Zalacain M. *et al.*, 2005).

Mediante esta técnica el daño cromosómico, ha sido determinado tanto en adultos (Vaglenow A. *et al.*, 2001) como en niños (Neri M. *et al.*, 2006a; Neri M. *et al.*, 2006b; se ha comprobado la relación directa que existe entre los niveles de plomo y la presencia de micronúcleos, indicando su riesgo genético (Vaglenov A. *et al.*, 2001). Existen estudios que evidencian una relación entre la frecuencia de micronúcleos y el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer, sobre todo a nivel urogenital (Bonassi S. *et al.*, 2007).

En la actualidad, a nivel mundial, existen niveles altos de contaminación por plomo, mercurio y tabaco en niños (Neri M. *et al.*, 2006a). El Perú, cuarto exportador mundial de plomo, es uno de los países más contaminados por este metal, siendo las Provincias de la Oroya y la Constitucional del Callao las más afectadas (Vega J. *et al.*, 2003, 2005).

En la Provincia Constitucional del Callao, las localidades de Puerto Nuevo, San Juan Bosco, Santa Marina Norte, Chacaritas, Barrio Obrero, Barrio Fiscal, Barrio Frigorífico y Ciudadela Chalaca, presentan durante años contaminación por plomo con índices que superan de 6 a 7 veces los límites máximos permisibles, encontrándose 1430 niños intoxicados (Alfaro A., 2002). La fuente de contaminación de esta población es originada básicamente por el transporte y depósitos de concentrados de plomo en el muelle Nº 5 de la empresa nacional de puertos ENAPU, lugar donde continúan almacenando y acarreado mineral de plomo, siendo su exportación anual de 216,700 toneladas métricas (Dirección General de Minería del Ministerio de Energía y Minas).

Los últimos muestreos tomados por DISA Callao indican que los niveles más altos de intoxicación se encuentran en el centro poblado de Puerto Nuevo, el cual tiene una extensión de 4.9 hectáreas y cuenta con mil lotes de viviendas en su gran mayoría construidas de madera y cartón. En la Institución Educativa Maria Reiche (Av. Contralmirante Mora - Puerto Nuevo) es donde se encuentran los niños más afectados (Alfaro A., 2002).

Es así que en este estudio se empleó la técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis para evaluar el nivel genotóxico del plomo en niños de una población escolar de una zona expuesta a la contaminación por este metal. Se determinó los niveles de plomo en sangre periférica así como la inestabilidad cromosómica (efecto genotóxico) en niños de una zona expuesta y no expuesta a la contaminación por el

plomo. La detección de micronúcleos es necesaria por su riesgo de manifestar problemas degenerativos sobre todo a nivel urogenitales (Bonassi S. *et al.*, 2007) y así sugerir se tomen acciones como parte de un plan estratégico de prevención, manejo y tratamiento oportuno en los niños afectados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 El Plomo – Descripción General

El plomo (Pb) es un metal pesado, se encuentra de forma natural en la corteza terrestre; mediante procesos naturales se esparce por el medio ambiente en cantidades muy pequeñas; por causa de las actividades humanas, el plomo pasa al medio ambiente en 300 veces más que por procesos naturales (HPA, 2006). El plomo se acumula en el medio ambiente, persiste en él (no es biodegradable), es indestructible, tóxico para la salud y puede moverse de un lugar a otro (ATSDR, 2005), su nivel permisible máximo es de 10ug/d. según la Organización Mundial de la Salud “OMS” (WHO, 2001).

El plomo, sin duda es el contaminante ambiental y ocupacional más conocido y más ampliamente estudiado, aparece desde la antigua Roma, hace 5000 años, donde empezó la industria del plomo, y es probable que la contaminación se iniciara desde entonces (Gidlow D., 2004). La contaminación no estaba limitada a los trabajadores del plomo, también se extendió a la población en general; debido a la utilización de utensilios, cerámica, cosméticos elaborados a base de plomo y también porque la contaminación se extendía por el aire, suelo y agua. Es decir, en paralelo al desarrollo de la industria, la contaminación y toxicidad por el plomo también fue aumentando. En la Revolución Industrial se incrementó sustancialmente la exposición por plomo y por ende ya se podía observar los efectos adversos de la contaminación, especialmente en las mujeres embarazadas y en los recién nacidos (Gidlow D., 2004).

En vista de la larga historia de la contaminación del plomo, podemos pensar que la contaminación por este metal está controlada y que quedó en el pasado. Desafortunadamente no es el caso, la contaminación del plomo generalmente está bien controlada en la mayoría de las industrias. Sin embargo, en muchos países o casi todos, incluido el Perú, aún, existe esta problemática; debido a que el plomo es empleado en cientos de productos como aditivos de: gasolina, baterías, soldaduras,

tuberías, pinturas, cerámicas (ATSDR, 2005; NIEHS, 2005); por lo que cada país ejecuta acciones correctivas y/o educativas de los peligros de este contaminante.

2.1.1 El plomo y el Medio Ambiente.

El plomo esta de forma natural en el medio ambiente, sin embargo, los altos niveles de plomo hallados son por la actividad humana, los mismos que se han incrementado en más de mil veces en los tres últimos siglos (WHO, 2001; HPA, 2006). El mayor incremento ocurrió entre los años 1950 y 2000, como consecuencia del uso de gasolina con plomo; actualmente está prohibido el uso de gasolina con plomo (HPA, 2006). El incremento de plomo en el medio ambiente se facilita también por la explotación minera y de otros metales, así como el aumento de fábricas que procesan plomo o componentes del plomo (WHO, 2007); el Perú, cuarto exportador mundial de plomo, se ha convertido en uno de los países más contaminados por este metal (Instituto Blacksmith, 2007).

El plomo es liberado al aire durante la combustión del carbono y aceite. Una vez en la atmósfera, las partículas de plomo pueden viajar grandes distancias contaminando suelos, ríos, lagos y lagunas (NIEHS, 2005; HPA, 2006).

2.1.2 ¿Cómo nos contaminamos de plomo?

Los seres humanos están en contacto con el plomo a través del aire, el polvo, el agua y los alimentos (UNICEF, 2000; ATSDR, 2005; NIEHS, 2005; HPA, 2006). Personas que viven cerca a las zonas de riesgo están en contacto con cantidades excesivas de plomo y de otros químicos que contienen plomo.

La mayor ingesta de plomo es debido al plomo atmosférico que se forma por la combustión de la gasolina con plomo, aunque ya fue prohibida, en muchos países se continúa empleando (HPA, 2006). De igual modo el plomo depositado en las paredes y en las tuberías son un constante contaminante, especialmente para los niños (NIEHS, 2005; ATSDR, 2005).

La contaminación de plomo en los niños es mayor debido a su edad, hábitos de alimentación y juego; pueden ingerir alimentos, tierra y hasta pintura contaminada, chupar o morder lápices de colores y juguetes, hechos a base de pintura con plomo y absorberlos por vía cutánea (NIEHS, 2005; ATSDR, 2005).

2.2 Metabolismo del Plomo

El plomo es un metal que no presenta beneficio biológico al ser humano, sin embargo la Organización Mundial de la Salud indica un nivel máximo permisible de 10 ug/dL. La absorción del plomo depende del estado físico y químico del metal, así mismo como por la edad, estado fisiológico, estado nutricional y factores genéticos del individuo (UNICEF, 2000; HPA, 2006).

En general las personas se pueden intoxicar mediante la ingesta y la inhalación. La absorción del plomo mediante la inhalación involucra el depósito de partículas de plomo en el tracto respiratorio y de ahí pasan al sistema circulatorio. En adultos sin exposición ocupacional y en niños, la absorción del plomo es por el tracto digestivo y se debe básicamente al ingreso del plomo por la comida, bebidas o la tierra; ha sido estimado que los niños de 2 a 3 años ingieren aproximadamente 100 mg de tierra por día, y la absorción depende si los niveles de calcio, hierro, fósforo o zinc son bajos, asimismo, si existe niveles altos de grasa en la dieta la absorción puede ser mayor (HPA, 2006).

La ruta de distribución del plomo parece ser similar en niños y adultos; aunque en los adultos el mayor almacenamiento es en los huesos. El plomo es transportado inicialmente por los glóbulos rojos unidos a las proteínas del plasma, luego el plomo absorbido es distribuido por la sangre hacia los huesos y tejidos blandos; la vida media del plomo en sangre, tejidos blandos y huesos es de 36 días, 40 días y 27 años respectivamente, por ello es que el plomo está presente mayormente en los huesos (ATSDR, 2005; HPA, 2006).

El plomo interfiere con el metabolismo del calcio y de la vitamina D, el plomo compite con el calcio y el hierro, originando hipocalcemia y anemia, siendo los niños los más vulnerables; los niños absorben hasta un 50 % del plomo que penetra en su cuerpo, en comparación con el nivel de absorción de plomo en los adultos, que oscila entre el 10% y el 15%, es decir los niños absorben dosis tres veces superiores a la de los adultos (HPA, 2006).

En exposición crónica, el plomo se deposita en forma de fosfato de plomo insoluble en los huesos de rápido crecimiento (huesos largos), lo cual puede ser observado en las radiografías, conocido como las "líneas de plomo".

El plomo se acumula en los huesos a lo largo de la vida, pero al mismo tiempo, es movilizado hacia la sangre. Esta movilización se observa en las madres gestantes y es preocupante, debido a que el plomo puede atravesar fácilmente la barrera placentaria y acumularse en los huesos del feto, siendo su concentración en el cordón umbilical de 85 – 90% de la concentración en sangre materna, ocasionando un riesgo para el feto, causando partos prematuros, bajo peso en recién nacidos e incluso abortos (UNICEF, 2000; HPA, 2006).

2.2.1 Efectos del Plomo en la Salud

El plomo es tóxico para la salud (UNICEF, 2000; WHO, 2001; ATSDR, 2005; NIEHS, 2005; HPA, 2006; WHO, 2007). La concentración del plomo en sangre es empleado para determinar el grado de toxicidad o de exposición a este metal y los posibles daños que puede ocasionar.

Conociendo que el nivel máximo permisible por la OMS es de 10ug/dL, existen estudios que manifiestan efectos adversos a la salud en niveles menores a éste (HPA, 2006), asimismo existen estudios que demuestran el daño a la salud con dosis más altas. Los niños pequeños, por encontrarse en desarrollo, presentan los efectos más críticos de la toxicidad del plomo, ya que ellos están expuesto a la intoxicación desde su desarrollo pre natal; lo cual les puede causar daños irreversibles principalmente neurológicos e incluso la muerte.

Dentro de los efectos en la salud producidos por la exposición al plomo, se tienen:

Efecto hematológico: Produce anemia, debido a que reduce la producción de hemoglobina, y disminuye la vida media de los eritrocitos. La reducción de la síntesis de hemoglobina ocurre tanto en niños como en adultos (ATSRD, 2005; HPA, 2006).

Efecto neurológico: La exposición crónica del plomo ocasiona fatiga, disturbios al dormir, dolor de cabeza, irritabilidad, tartamudeo y convulsiones. También puede producir debilidad muscular, ataxia, mareos y parálisis, asimismo, la habilidad visual, el tacto fino y la noción del tiempo se pueden ver alterados, presentando cuadros de ansiedad, alterando el humor y la habilidad cognitiva.

La neurotoxicidad del plomo se observa tanto en adultos (Araki S. *et al.*, 2000; Stewart W. *et al.*, 2007) como en niños. En niños la neurotoxicidad está en relación con la dosis de envenenamiento (Bellinger D., 2007), otros estudios demuestran que la neurotoxicidad tiene asociación con el comportamiento, el grado de ansiedad y los niveles intelectuales (Vega J. *et al.*, 2005), muchos otros manifiestan la relación inversa entre el plomo y el coeficiente intelectual que se manifiestan desde niveles bajos de plomo (5.6 ug/dL), y que un incremento en la concentración de plomo de 10 a 20 ug/dL en sangre está asociado con un déficit de 2 puntos en el coeficiente intelectual (HPA, 2006; NIEHS, 2005).

Efecto renal: Puede ocasionar nefropatías en estados tempranos de contaminación, especialmente en niños. La nefropatía se caracteriza por la citomegalia en las células del epitelio del túbulo proximal y se manifiesta como aminoaciduria, hipofosfatemia y glucosuria. Cambios morfológicos como la formación de cuerpos de inclusión nuclear, cambios mitocondriales y disfunción de los túbulos proximales. Así mismo, nefritis intersticial ha sido reportada en concentraciones de plomo mayores a 40 µg/dL. La nefropatía crónica se manifiesta por un elevado envenenamiento por plomo que puede conllevar a la muerte (HPA, 2006).

Efecto cardiovascular: Según la Agencia de protección de la Salud, existen estudios epidemiológicos que manifiestan una débil asociación entre el plomo y la presión sanguínea; siendo la elevación sanguínea mayor en adultos que en jóvenes. También se ha reportado que una exposición ocupacional crónica de plomo (>30 ug/dL), causa una elevación de la presión sistólica (HPA, 2006); aunque otros estudios no encontraron diferencias significativas (Gidlow D., 2004). Asimismo, algunos estudios manifiestan que la presión diastólica no es afectada por el plomo, pero otros muestran un incremento de la presión diastólica en trabajadores con niveles de plomo mayores a 50ug/dL (HPA, 2006).

Efecto gastrointestinal: Se manifiesta síntomas gastrointestinales dolores abdominales, diarreas, vómitos y anorexia que es común observarlo tanto en niños como en adultos (ATSDR, 2005; HPA, 2006).

Efecto hepático: El daño hepático se manifiesta debido que el plomo altera la función de la enzima hepática citocromo P450 (HPA, 2006).

Efecto reproductivo: Exposición crónica del plomo causa efectos adversos en el sistema reproductivo femenino y masculino. La exposición ocupacional del plomo en mujeres antes o durante el embarazo está asociada con abortos espontáneos, muerte fetal, nacimientos prematuros, y recién nacidos de bajo peso (Andrews K. *et al.*, 1994; Bellinger D., 1994; Apostoli P. *et al.*, 2000; Landrigan P. *et al.*, 2000; UNICEF, 2000; ATSDR, 2005).

La exposición ocupacional del plomo en varones puede reducir la libido, disminución del volumen seminal y de la cantidad de espermatozoides; incremento de la morfología anormal y disminución de la movilidad de los espermatozoides (Lerda D., 1992; HPA, 2006).

Efectos en el DNA: El daño ocasionado por el plomo no se limita a evidencias externas, sino puede interaccionar con el material genético, dañándolo, lo cual puede ocasionar una serie de efectos mencionados anteriormente (Silbergeld E. *et al.*, 2000; Gidlow D., 2004). La identificación de estos cambios es clave para evitar daños mayores y para tomar acciones preventivas que nos permitan un mejor control. Existen estudios que han evaluado el efecto del plomo sobre el DNA en linfocitos de individuos expuestos ambiental u ocupacionalmente, realizándose estudios *in vitro* empleando células de mamíferos o microorganismos. Aunque las aberraciones cromosómicas y el intercambio de cromátides hermanas no son muy claras, existe un estudio donde

manifiestan la presencia del daño (Vaglenov A. *et al.*, 2001). Asimismo, existen estudios donde se demuestra el incremento de la mortalidad estándar causada por el cáncer en individuos que trabajan en fábricas de plomo (Gustavsson P. *et al.*, 2000; Steenland K. *et al.*, 2000; Wijngaarden E. *et al.*, 2006), de la misma manera se hallan estudios donde no se observa ningún incremento por la causa del plomo (Jemal A. *et al.*, 2002).

Igualmente, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha estudiado la relación del daño en el DNA con la exposición de plomo y analizó el mecanismo del plomo como potencial cancerígeno. Comprobó que existe poca evidencia que el plomo actúe directamente con el DNA; el efecto en el DNA del plomo esta mediado por la modulación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y por la interacción con proteínas, incluyendo las proteínas de reparación del DNA, lo cual puede resultar en mutación, proliferación celular, cambios en la expresión del gen, todo lo cual contribuye a indicar que la exposición crónica es cancerígena. La investigación concluye que el plomo inorgánico o componentes del plomo son probables cancerígenos humanos y está ubicado en el GRUPO 2B (Landrigan P. *et al.*, 2000; Silbergeld E. *et al.*, 2000; Steenland K., 2000 *et al.*; Vaglenov A. *et al.*, 2001; Gidlow D., 2004).

2.3 Toxicología

En párrafos anteriores se ha explicado que el plomo es un metal tóxico, las personas que pueden estar más afectadas son aquellas que están en contacto directo con él, incluyendo quienes trabajan con objetos que contengan algún componente de éste.

Sin embargo el plomo no sólo adquiere relevancia laboral ya que esta esparcido indiscriminadamente y ampliamente por el medio ambiente, pudiéndolo encontrar en

nuestros hogares, incluso en nuestros alimentos y bebidas (UNICEF, 2000; ATSDR, 2005; NIEHS, 2005; HPA, 2006; WHO, 2007), ocasionando efectos perjudiciales sobre la salud y el medio ambiente.

Cómo controlar estos riesgos, evaluar el peligro y determinar el daño son aspectos que corresponden a la toxicología. Es la finalidad de la toxicología el identificar y evaluar los problemas y, sobre la base de los estudios científicos, prevenir el o los daños y desarrollar estrategias para contrarrestar los efectos tóxicos (Pastor S., 2002c).

La toxicología realiza estudios cualitativos y cuantitativos de los efectos negativos de los agentes químicos, físicos, y biológicos, observados como consecuencia de las alteraciones funcionales y estructurales de los distintos órganos y sistemas de los seres vivos (Pastor S., 2002c).

2.3.1 Toxicidad

Se entiende por toxicidad la capacidad de un compuesto para ocasionar daños mediante efectos biológicos adversos, al alcanzar un punto susceptible del organismo. La posibilidad que un compuesto o contaminante presente una acción tóxica es considerada un riesgo, es decir, la probabilidad de que pueda ocasionar efectos indeseables como resultado de su exposición (Pastor S., 2002c).

Toxicidad se refiere a los efectos adversos que pueden aparecer por la interacción con el contaminante, mientras que el riesgo es la probabilidad que se produzca una interacción efectiva entre el contaminante y la persona. Así, que la unión de la toxicidad y el riesgo depende de circunstancias particulares en función de los aspectos biológicos y las propiedades fisicoquímicas del contaminante implicado.

Asimismo, la toxicidad está relacionada con el compuesto, interacción con otros compuestos, la concentración del compuesto (dosis), el tiempo de exposición, ruta de exposición, factores genéticos, sexo y/o factores endocrinos, estado fisiológico, nutrición, entre otros (Pastor S., 2002c; Chávez M., 2007).

2.3.2 Toxicología genética

Existe un gran número de compuestos, capaces de interactuar con el DNA, directa o indirectamente, provocando cambios y/o alterando la información contenida en el material genético, lo cual puede contribuir a un aumento de enfermedades de etiología genética (Chávez M., 2007).

Debido a la continua exposición de una gran cantidad de agentes que dañan el material genético, los organismos han desarrollado mecanismos de reparación de las lesiones producidas por estos en el DNA.

La toxicología genética, es la disciplina encargada de evaluar los efectos de las exposiciones con riesgo genético; tiene como objetivo el estudio de la forma en la cual los agentes químicos o físicos afectan al complejo proceso de la herencia. Se encarga de detectar los agentes capaces de actuar directa o indirectamente con el DNA o sobre moléculas asociadas (proteínas de unión, reparación del DNA o en la segregación cromosómica) (Pastor S., 2002c; Chávez M., 2007).

Los agentes químicos o físicos, considerados como potencialmente genotóxicos son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células (mutación somática) (Pastor S., 2002); estos cambios pueden causar la muerte celular o inducir alteraciones transmisibles a la siguiente generación celular, como un aumento en las

anomalías cromosómicas, y un incremento de la incidencia de cáncer (Bonassi S. *et al.*, 2007), o a la descendencia (mutación germinal) (Pastor S., 2002c).

La capacidad intrínseca de los agentes químicos, basada en el potencial de estos (como es el caso del plomo) para unirse con puntos nucleofílicos de macromoléculas tales como enzimas, proteínas y DNA (Figura N°1), es considerado un riesgo genético producido por agentes genotóxicos.

Esta capacidad genotóxica que se manifiesta en el material genético de las células e incluye efectos directos e indirectos sobre el DNA, entre los cuales se puede mencionar la inducción de mutaciones (genéticas, cromosómicas y genómicas) (Silbergeld E. *et al.*, 2000) que a nivel molecular son similares a los acontecimientos que se sabe están implicados en la carcinogénesis, es considerada genotoxicidad del compuesto.

2.4 Genotoxicidad

La genotoxicidad de un compuesto se basa en el estudio de su capacidad de manifestar cambios en el material genético; si ocurre en la línea somática puede derivar en cáncer y en células germinales puede afectar tanto a los individuos expuestos como a su descendencia (Chávez M., 2007).

En la actualidad, un elevado número de contaminantes están liberados en el medio ambiente, los cuales no han sido evaluados para determinar su riesgo genético en los seres vivos, incluido el hombre; este riesgo es considerado como la posibilidad de aparición de efectos adversos ocasionado por estos.

Afortunadamente, contamos con herramientas útiles para medir la genotoxicidad de los compuestos, lo cual es importante para monitorizar la actividad genotóxica de estos.

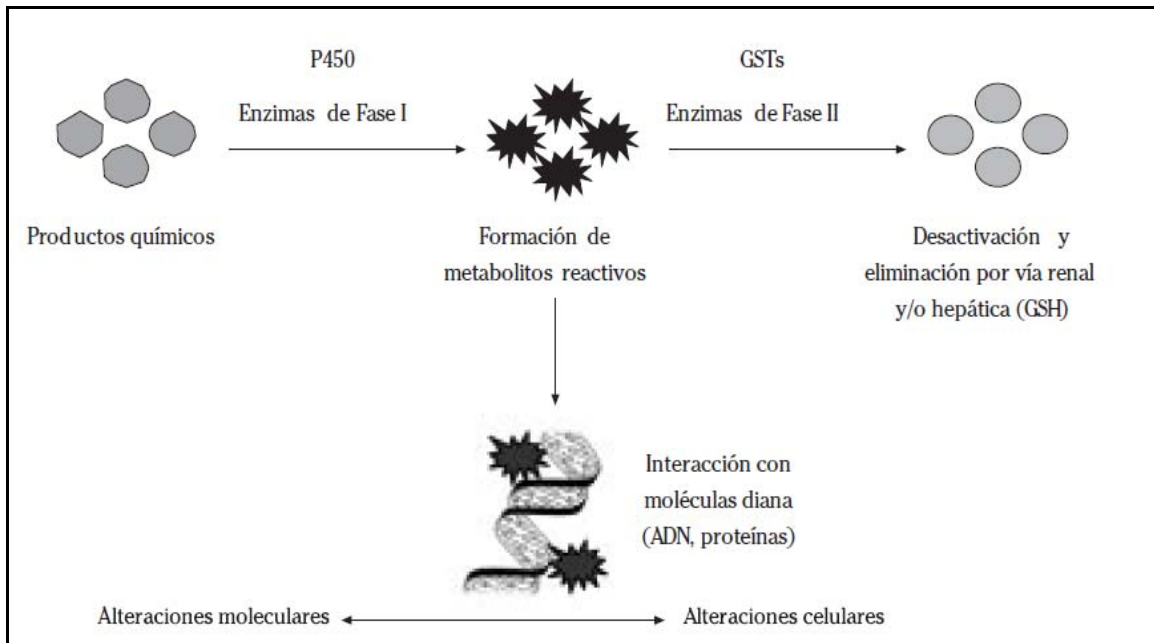


Figura N°1: Esquema de las reacciones catalizadas por las enzimas y sus repercusiones a nivel molecular y celular. (Fuente: Zalacain M. *et al.*, 2005)

2.4.1 Biomarcadores de Genotoxicidad

Los biomarcadores miden el daño genético procesado por el organismo, ocasionado por un agente medioambiental, ya sea químico o físico. Debido a que si existe daño genético (alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas), éste se puede visualizar mediante técnicas citogenéticas o moleculares, ya que las lesiones del DNA pueden permanecer en las células, y al ser permanentes, reflejan daño correspondiente a exposiciones pasadas, por lo que son útiles para detectar daño acumulativo (Neri M. *et al.*, 2006).

Las técnicas citogenéticas más utilizadas para detectar cambios cromosómicos (estructurales o numéricos), para evaluar el riesgo genético de determinadas poblaciones expuestas a contaminantes, son la técnica de análisis de anomalía cromosómica (AC), intercambio de cromátides hermanas y de micronúcleos (MN) (Silbergeld E. *et al.*, 2000, Asanami S. *et al.*, 2001; Neri M. *et al.*, 2006).

Asimismo es importante localizar y cuantificar las alteraciones cromosómicas, ya que pueden ser muy útiles para descubrir efectos tempranos de daño genotóxico que pueden culminar más adelante en una enfermedad grave.

2.4.2 Ensayos de Genotoxicidad – Ensayos *in vitro*

Los efectos genotóxicos se evalúan mediante los denominados ensayos de genotoxicidad, que se pueden utilizar tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los ensayos que miden la mutación génica son los que detectan la sustitución, adición o supresión de nucleótidos en un gen. Los ensayos que miden la mutación cromosómica son los que detectan roturas o reordenaciones cromosómicas en las que intervienen uno o varios cromosomas. Los ensayos que miden la mutación genómica son los que detectan cambios en el número de cromosomas, fenómeno que se denomina aneuploidía. Entre las lesiones cromosómicas identificables al microscopio se encuentran las aberraciones cromosómicas, los intercambios entre cromátides hermanas y los micronúcleos que pueden derivarse de fragmentos de cromosomas acéntricos o de la falta de cromosomas completos (Norpha H. *et al.*, 2003).

Los ensayos de genotoxicidad *in vitro* se utilizan en la actualidad porque son económicos, fáciles de realizar y han demostrado que detectan el efecto carcinogénico en roedores y en células humanas (Bonassi S. *et al.*, 2007; Kamboj M. *et al.*, 2007),

por lo cual se consideran una evidencia confiable de las principales alteraciones ocurridas en el material genético de las células eucariotas (Fenech M., 2000).

2.4.2.1 Ensayo de Micronúcleos

El ensayo de micronúcleos (MN) *in vitro*, es una técnica validada (Corvi R. *et al.*, 2008), empleada universalmente (Bonassi S. *et al.*, 2001); y ha sido desarrollada como una prueba sólida de genotoxicidad frecuentemente utilizada en un gran número de evaluaciones a poblaciones expuestas ocupacionalmente a metales (Vaglenov A. *et al.*, 2001; Schöder H. *et al.*, 2003; Raisuddin S. *et al.*, 2004), a hidrocarburos (Patlolla B. *et al.*, 2005), a pesticidas (Lucero L. *et al.*, 2000; Pastor S. *et al.*, 2001a; Pastor S. *et al.*, 2001b; Pastor S. *et al.*, 2002a; Pastor S. *et al.*, 2002b; Pastor S. *et al.*, 2003; Ciccheti R. *et al.*, 2003; Zuñiga L. *et al.*, 2007). Así como la determinación del daño genotóxico ocasionado por enfermedades como el cáncer o por tratamientos diversos (Gandhi G. *et al.*, 2003; Milosevic O., 2003; Yesilada E. *et al.*, 2006; Holland N. *et al.*, 2006; Grujiciv D. *et al.*, 2008; Witczak M. *et al.*, 2008; Franco L. *et al.*, 2008) y predicciones de posible cáncer (Bonassi S. *et al.*, 2007; Nersesyan A., 2007).

Presenta una serie de ventajas como ser una técnica rápida, sencilla y económica (Fenech M., 1993; Fenech M. *et al.*, 1999; Fenech M., 2000; Zalacain M. *et al.*, 2005, Neri M. *et al.*, 2006), poder trabajar con diferentes tipos celulares como en células epiteliales (Fenech M. *et al.*, 2007; Holland N. *et al.*, 2008) y en linfocitos (Channarayappa J. *et al.*, 1990; Fenech M., 1993; Fenech M., 2000; Zalacain M. *et al.*, 2005) y permite conocer la existencia del daño ocurrido anteriormente (Fenech M., 1993; Fenech M. *et al.*, 1999; Fenech M., 2000; Zalacain M. *et al.*, 2005, Neri M. *et al.*, 2006a, Neri M. *et al.*, 2006b).

Actualmente esta prueba se emplea en la evaluación de los efectos genotóxicos de exposiciones ambientales y laborales a mutágenos.

Los micronúcleos se presentan como pequeñas masas de cromatina dentro de la célula que son distintos del núcleo principal. Se producen durante la transición de la metafase-anafase de la mitosis en la división celular, mediante la rotura cromosómica (clastogenicidad) o la pérdida de cromosomas completos (aneuploidía).

Las roturas cromosómicas originan fragmentos cromosómicos acéntricos, que al no disponer de centrómero no se incluirán en los núcleos hijos durante la división celular. Durante la telofase, se forma la membrana nuclear alrededor de los cromosomas no separados y de los fragmentos acéntricos, con lo cual asumen la morfología de los núcleos en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal dentro de la célula (Channarayappa J. et al., 1990, Fenech M., 1993; Fenech M. et al., 1999; Fenech, M., 2000; Fenech M. et al., 2003; Norppa H. et al., 2003; Zalacain M. et al., 2005) (Figura N° 2).

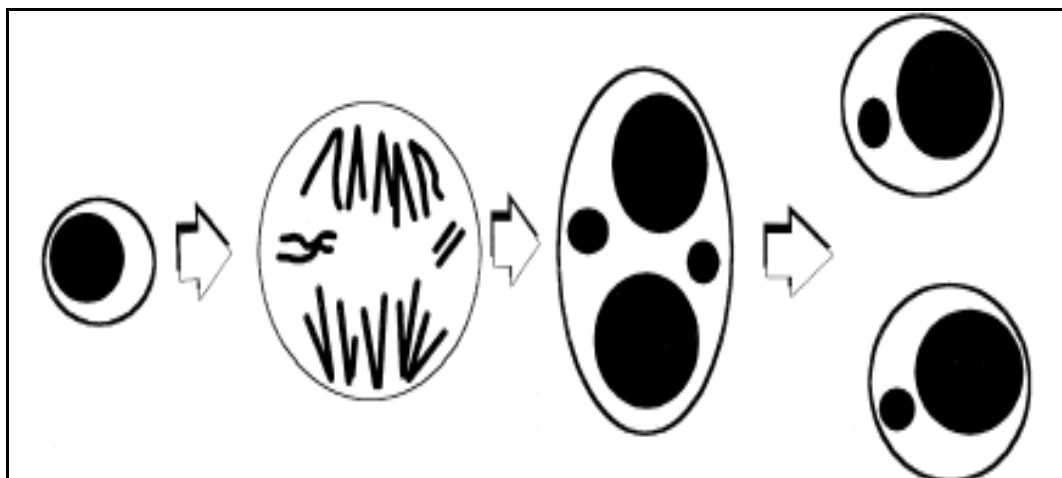


Figura N°2: Origen de los micronúcleos. Pérdida de un cromosoma o de un fragmento acéntrico durante la anafase celular. (Fuente: Fenech M. et al., 1999)

Es importante destacar que para visualizar a los micronúcleos es necesario que ocurra una división celular después del daño (Fenech M., 2000) y que los micronúcleos pueden ser consecuencia tanto de agentes clastogénicos como aneugénicos.

Adicionalmente, esta técnica presenta la ventaja de la facilidad al contar los micronúcleos en comparación con el minucioso trabajo de observación que se realiza en el recuento de las aberraciones cromosómicas. Estudios recientes indican, que los agentes genotóxicos inducen, en la medula ósea de ratones vivos, aberraciones cromosómicas evidenciados como micronúcleos, por lo que sus efectos se pueden evaluar de manera indistinta con los dos ensayos. Actualmente es habitual utilizar el recuento de los micronúcleos como un indicador de la capacidad que tiene un agente (como por ejemplo el plomo) para inducir mutaciones cromosómicas (Fenech M., 2000; Zalacain M. *et al.*, 2005).

Este ensayo sólo puede usarse eficientemente o cuantitativamente en poblaciones de células eucariotas en las cuales se pueda distinguir con facilidad cada división celular, por lo cual, no es conveniente en poblaciones celulares con cinéticas de división descontroladas o desconocidas. Para disminuir esta limitación, se desarrolló el ensayo de micronúcleos con la adición de citocalasina – B (cyt-B), en donde las células que han completado una división nuclear son bloqueadas para evitar el proceso de citocinesis y como consecuencia, las células son fácilmente identificables por su apariencia binucleada.

La cyt-B es una sustancia inhibidora de la polimerización de la proteína actina, extraída de *Helminthosporium dematioideum*, requerida para la inhibición de la formación de los microfilamentos que constriñen el citoplasma entre los núcleos hijos durante la citocinesis, por lo cual el uso de esta sustancia permite la acumulación de todas las células en división en el estado binucleado, sin considerar su grado de

sincronía ni la proporción de las células en división (Fenech M. *et al.*, 2000) (Figura N° 3).

Así, los micronúcleos son contados en las células binucleadas, lo cual posibilita la comparación confiable del daño cromosómico entre diferentes poblaciones celulares con cinéticas de división distintas.

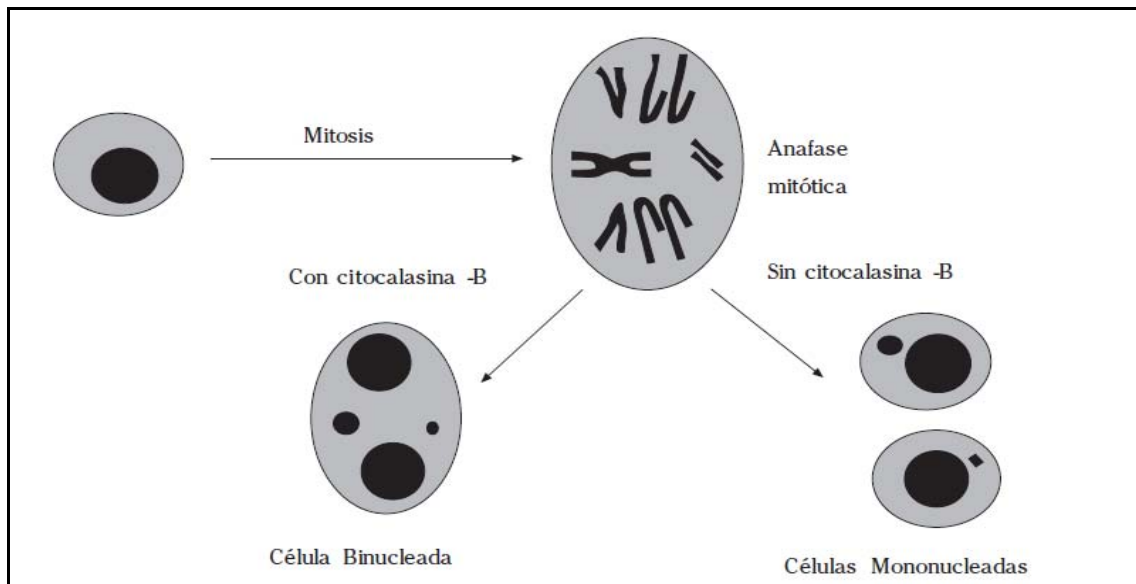


Figura N°3: Esquematación de la función de la citocalasina-B en la citocinesis.

(Fuente: Zalacain M. *et al.*, 2005)

3. MATERIALES

3.1 Material Biológico

3.1.1. Población de Estudio

Se evaluaron 80 niños, entre expuestos y no expuestos a la contaminación de plomo:

- La población de niños expuestos está constituida por 40 niños en edad escolar de 6 a 13 años, residentes en el Asentamiento Humano Puerto Nuevo – Callao.
- La población de niños no expuestos está constituida por 40 niños en edad escolar de 6 a 13 años, residentes en una zona no expuesta a este contaminante (no vivir en el Callao ni en zonas mineras).

Criterios de inclusión para niños expuestos al plomo

- Niños entre 6 – 13 años que residen en el AA. HH. Puerto Nuevo – Provincia Constitucional del Callao.
- Consentimiento informado y firmado por el padre o apoderado del niño. (Anexo N° 1)
- No haber recibido transfusiones de sangre en los últimos 3 meses previo a la prueba.

Criterios de exclusión para niños expuestos al plomo

- Niños de 6 – 13 años no residentes en el AA. HH. Puerto Nuevo, ni en la Provincia Constitucional del Callao.
- Niños entre 6 – 13 años residentes en el AA. HH. Puerto Nuevo – Provincia Constitucional del Callao, cuyos padres o apoderados no firmaron el consentimiento informado.
- Haber recibido transfusiones de sangre en los últimos 3 meses previo a la prueba.

Criterios de inclusión para los niños no expuesto al plomo

- Niños de 6 a 13 años residentes en zonas no consideradas de riesgo (no vivir en el Callao ni en zonas mineras).
- Consentimiento informado y firmado por el padre o apoderado del niño. (Anexo N° 1)
- No haber recibido transfusiones de sangre en los últimos 3 meses previo a la prueba.

Criterios de exclusión para los niños no expuesto al plomo

- Niños de 6 a 13 años residentes en zonas consideradas de riesgo (vivir en el Callao o en zonas mineras).
- Niños de 6 a 13 años residentes en zonas no consideradas de riesgo (no vivir en el Callao o en zonas mineras), cuyos padres o apoderado no firmaron el consentimiento informado
- Haber recibido transfusiones de sangre en los últimos 3 meses previo a la prueba.

3.2 Material de Laboratorio

3.2.1 Material en general

Agujas de 21 x1`

Algodón 1 Kg

Balones de 500 ml

Cajas para guardas láminas

Depósito de bioseguridad

Esparadrapo grande

Frascos transparentes de tapa rosca de 50, 100 y 250 ml

Gradillas
Guantes estériles
Jeringas de 10 ml
Jeringas de 5 ml
Jeringas de tuberculina 1 ml
Koplin
Láminas porta objeto
Lápiz diamante
Matraz de 100, 250 y 500 ml
Pipetas de transferencia
Probetas 100, 250, 500 ml
Taponos de jebe
Tubos cónicos estériles
Viales 10 ml
Viales de 20 ml

3.2.2 Reactivos

Aceite de inmersión - Merck
Acido acético (glacial) 100 % anhidro - Merck
Alcohol de 96°
Anticoagulante: Hepasolv 1000 - Bharat Biotech
Buffer fosfato salino Dulbecco's sin calcio, sin magnesio - Biological Industries
Citocalacina- B de Drechslera dematioidea - Sigma
Colorante Giemsa - Thomas Baker
Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma
Fitohemaglutinina liofolizada - Biological Industries
Glicerol A.R. - Qualikems Laboratory reagent

KCl en cristales - Merck

Nutriente Mixture F10 Ham com L-Glutamina - Sigma

Metanol absoluto - Merck

Suero de bovino fetal certificado - Gibco

3.2.3 Equipos

Autoclave - Castle

Balanza analítica - Boeco

Cabina de flujo laminar - Streamlime

Centrifuga x 32 tubos - Boeco

Congeladora de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Bosch

Horno de esterilización / Drying oven - Hirayama

Incubadora de CO_2 - Revco

Microscopio con luz incorporada - Nikon Eclipse E400

Refrigeradora - Mabe

4. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de estudio y diseño de la investigación

El presente estudio fue del tipo transversal comparativo, donde se evaluó a dos poblaciones de niños, una población que vive en una zona considerada de riesgo por la contaminación por plomo, otra población que no reside en la zona de riesgo. Se analizó los niveles de plomo en sangre con la frecuencia de micronúcleos.

4.2 Selección de individuos

Se realizaron reuniones informativas con los padres o apoderados de los niños pertenecientes a una zona de riesgo (grupo de riesgo) y de una zona no considerada de riesgo (grupo control). A todos los padres se les proporcionó el consentimiento informado para que lo revisen y analicen, en caso de alguna duda se comunicaron con los encargados del estudio. A los padres que aceptaron participar en el estudio se les indicó el día de la próxima visita, donde se realizó la toma de muestra de sus niños.

Es importante indicar, que el consentimiento informado (Anexo N° 1) fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de salud del Niño.

4.3 Formulario de datos

Una vez obtenido el consentimiento informado, se realizó el registro y llenado de la hoja de datos (Anexo N° 2), se le otorgó un código con el cual se va identificar al participante en la toma de muestra, quedando toda la información registrada de los niños protegida y guardada en lugar seguro con total confidencialidad, protegiendo así, los derechos y la seguridad de las personas que voluntariamente participaron en este trabajo.

En la mencionada hoja se registró datos personales y familiares que son necesarios para la evaluación, como las medidas de peso y talla.

4.4 Obtención de la muestra

La toma de muestra se realizó en un área previamente adecuada para este fin, por personal encargado para dicha acción, con los materiales adecuados para la realización de la misma. Se trabajó en total asepsia para evitar la contaminación de la muestra.

Se extrajo 5 mL de sangre periférica por punción en el antebrazo, la realización de dicha acción se hizo siguiendo las normas de bioseguridad. Se colocó 3 ml de sangre en un tubo sellado al vacío que contiene EDTA (vacutainer), muestra que se empleó para el dosaje de plomo; los 2 ml restantes fueron mantenidos en una jeringa descartable con 0.01 ml de anticoagulante (heparina sódica) para realizar la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis. Ambas muestras se rotularon con el código correspondiente.

Las muestras para el dosaje del plomo fueron trasladadas, en un recipiente con bolsas de gel pack, herméticamente cerrado a fin de mantener una temperatura de 8°C, hasta llegar al laboratorio clínico ROE.

Las muestras para realizar la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis fueron mantenidas en las mismas condiciones, hasta arribar al laboratorio del Servicio de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño.

4.5 Dosaje de plomo

El dosaje de plomo se realizó por la técnica de Absorción Atómica – Horno de grafito, en el laboratorio ROE, que cuenta con certificado de control de calidad externo del Institut National de Santé Publique en Québec (Canadá).

4.6 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis

La técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis se realizó en el Laboratorio del Servicio de Genética del INSN.

El protocolo utilizado fue según Fenech M., 2000, el mismo que fue estandarizado en el laboratorio con modificaciones en el tratamiento hipotónico.

4.6.1 Siembra de la muestra (cabina de flujo laminar)

1. 1.0 mL de sangre total de cada paciente se colocó en un tubo cónico de vidrio, el que previamente contenía 3.5 mL de medio Ham-F10, 0.5 mL de suero bovino fetal, 0.3 mL de fitohemaglutinina. Cada tubo fue rotulado con el código del participante.
2. Los tubos fueron colocados en una estufa a 37 °C y 5 % de CO₂.
3. A las 44 horas de la siembra se añadió a la muestra 650uL de citocalacina B en solución con DMSO, para lograr una concentración final de 6 ug/mL.

4.6.2 Cosecha de la muestra a las 72 horas

1. Se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos.
2. Se descartó el sobrenadante,

3. Se sometió a un sutil choque hipotónico al agregar 6 mL de PBS helado (2°C a 8°C) y 50 uL de KCl 0.075 M helado (2°C a 8°C), se homogenizó fuertemente e inmediatamente se agregó 3 mL de carnoy fresco (ácido acético: metanol; 1:3) helado a -20°C. Lo cual nos favoreció la turgencia de los citoplasmas y la visualización de las células bien delimitadas.
4. Se centrifugó a 800 rpm por 10 minutos.
5. Se retiró el sobrenadante.
6. Se realizó tres lavados sucesivos con una solución fresca de ácido acético: metanol (1:3) helado (2°C a 8 °C).
7. Luego se procedió con el goteo de la muestra en las láminas portaobjetos, previamente lavadas.
8. Se espero que se sequen las láminas.
9. Se coloreó las láminas con Giemsa 10% con tampón fosfato (pH 6.8) durante 30 minutos.
10. Al secado de las láminas, se guardaron en la refrigeradora hasta su lectura.

4.6.3 Lectura de la muestra

1. La observación de las células se realizó en el microscopio óptico de luz, trabajando con el objetivo de 100X.
2. Fueron analizadas 1000 células binucleadas que cumplen los criterios de selección y de lectura según Fenech (Fenech M., 2000; Fenech M. *et al.*, 2003).
3. Se procedió a sacar el porcentaje.

4.6.4 Criterios de selección y lectura de los micronúcleos

Los micronúcleos son morfológicamente idénticos pero más pequeños que los núcleos, y deben presentar las siguientes características (Fenech M., 2000; Fenech M. *et al.*, 2003):

- El MN en linfocitos humanos usualmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio del núcleo principal.
- Los MNs son no-refráciles y pueden ser distinguidos fácilmente de los artefactos, como residuos de tinción.
- Los MNs no deben estar enlazados o conectados a los núcleos principales.
- Los MNs pueden tocar pero no solapar los núcleos principales la membrana del MN debe ser claramente distinguible.
- Los MNs usualmente tienen la misma intensidad de tinción como el núcleo principal pero ocasionalmente pueden ser más intensos.

Criterios para seleccionar las células binucleadas a incluir en un ensayo de micronúcleos son: (Fenech M., 2000; Fenech M. *et al.*, 2003):

- Los dos núcleos en una célula binucleada deben tener intactas las membranas nucleares y estar situados dentro de la membrana citoplasmática.
- Los dos núcleos en la célula binucleada deben ser aproximadamente iguales en el tamaño e intensidad de tinción.
- Los dos núcleos dentro de la célula binucleada pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico, el cual no debe ser más ancho que 1/4 del diámetro nuclear.

- Los dos núcleos principales en la célula binucleada pueden tocarse pero idealmente no solaparse entre ellos. Una célula con dos núcleos solapados puede ser contada sólo si las membranas nucleares de cada núcleo son claramente distinguibles.
- La membrana citoplasmática de una célula binucleada debe estar intacta y claramente distinguible de las membranas citoplasmáticas de las células adyacentes.

4.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15. Para determinar las correlaciones de las variables se empleó la prueba no paramétrica de Spearman. Para la comparación de medias se empleó la prueba no paramétrica de Umann Whitney.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis de las variables en ambos grupos

En la tabla N° 1 se observan los resultados obtenidos del análisis de la variable sexo. En ella se observa que el total de niños evaluados fue 80, de los cuales 40 pertenecen al grupo control y 40 al grupo de riesgo.

Tabla N° 1. Análisis de resultados según la variable sexo en ambos grupos.

	Femenino		Masculino		Total de niños evaluados
	Evaluados	Porcentaje	Evaluados	Porcentaje	
Control	28	70%	12	30%	40
Riesgo	20	50%	20	50%	40
Población total	48	60%	32	40%	80

En la Figura N° 4 se muestra los resultados del porcentaje de niños evaluados según el sexo, donde 48 fueron niñas (60 %) y 32 niños (40 %).

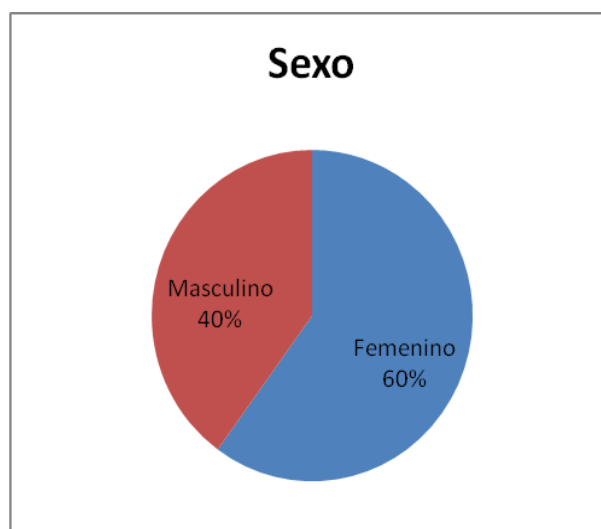


Figura N° 4. Porcentaje de niños evaluados según sexo.

En la Figura N° 5 se presentan las diferencias obtenidas según la variable sexo en ambos grupos. Observándose que el grupo control se encuentra mayor número de niñas (28 niñas).

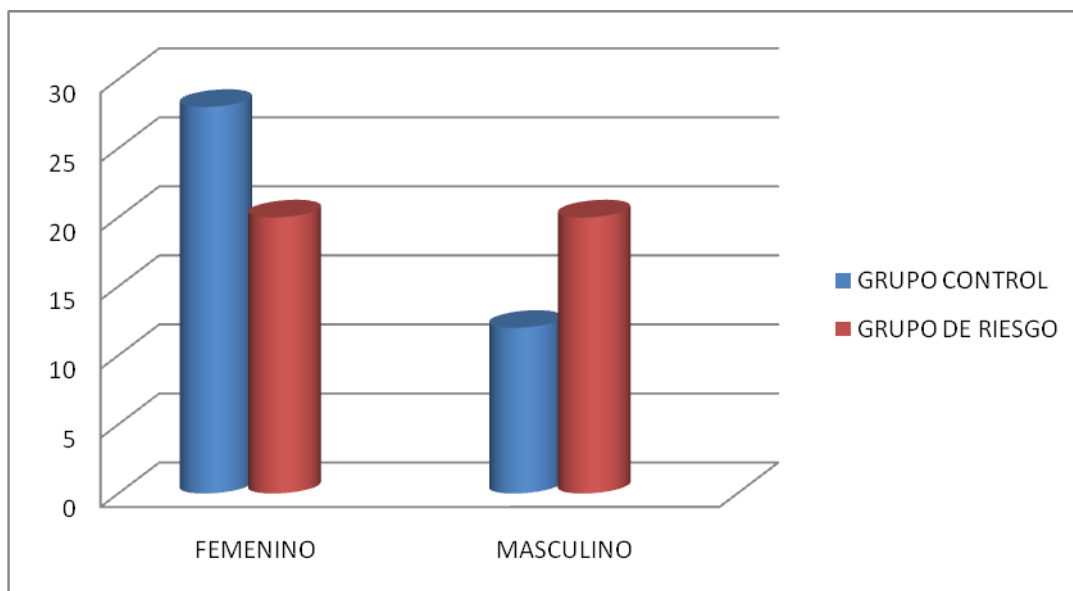


Figura N° 5 Diferencia del número de niños en ambos grupos según la variable sexo.

En la tabla N° 2 se muestran los resultados referentes a las variables: edad, talla y peso del grupo control y del grupo de riesgo.

Tabla N° 2. Análisis de resultados según las variables edad, peso y talla en ambos grupos.

	Edad (Años)			Peso (Kg)			Talla (cm)		
	Min.	Max.	Media	Min.	Max.	Media	Min.	Max.	Media
Control	6	13	9.25 ± 2.18	19	52	32.80 ± 10.62	107	152	129.55 ± 11.98
Riesgo	6	13	9.10 ± 2.45	16	62	31.36 ± 11.54	100	155	129.95 ± 14.83
Población total	6	13	9.18 ± 2.30	16	62	31.80 ± 11.11	100	155	129.53 ± 13.39

Se trabajó con niños de edades comprendidas entre 6 y 13 años de edad, siendo la media de 9.18 años (DE \pm 2.30) en la población total; comparando la media entre el grupo control (9.25 años \pm 2.18) y el grupo de riesgo (9.10 años \pm 2.45), igualmente no se observó diferencia. Entre el peso de los niños del grupo control (32.8 Kg. \pm 10.62) y del grupo de riesgo (31.36 Kg. \pm 11.52) no se observó diferencia, asimismo según la variable talla, no existe diferencia entre la media del grupo control (129.55 cm. \pm 11.98) y el grupo de riesgo (129.95 cm. \pm 14.83).

5.2 Niveles de plomo en sangre:

En la tabla N° 3 se muestra el dosaje de los niveles de plomo en sangre, siendo el promedio en la población total de 5.22 ug/dL (DE \pm 3.00), el grupo de riesgo presentó una media de 6.90 ug/dL (DE \pm 2.55), mientras que el grupo control 3.57 ug/dL (DE \pm 2.48).

Tabla N° 3 Dosaje de los niveles de plomo en sangre

	Dosaje (ug/dL)		
	Mínimo	Máximo	Media
Grupo Control	1	10.1	3.57 \pm 2.48
Grupo Riesgo	1.1	11.8	6.90 \pm 1.55
Población Total	1	11.8	5.22 \pm 3.00

En la figura N° 6 se presenta el dosaje de los niveles de plomo en sangre en ambos grupos, observándose claramente un incremento de los niveles de plomo en el grupo de riesgo.

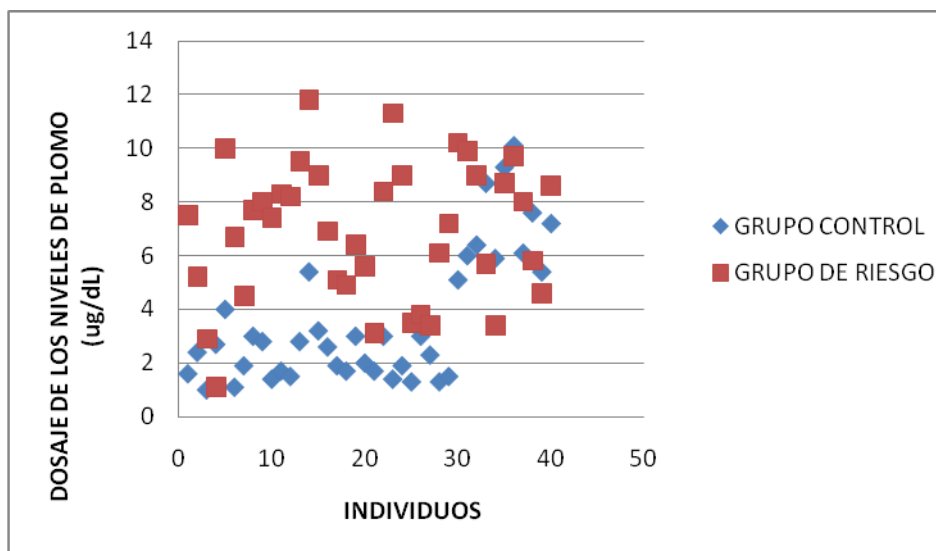


Figura N° 6. Dosaje de los niveles de plomo en sangre en ambos grupos.

Asimismo, la prueba no paramétrica de Umann Whitney, nos indica que existen diferencias significativas en el promedio del dosaje de los niveles de plomo en sangre entre los grupos control y de riesgo ($p = 0.000$) (Anexo N° 3).

Por otro lado, hallamos que sólo el 5% de la población total en estudio presenta niveles de plomo en sangre mayores a los niveles permisibles ($> 10 \text{ ug/dL}$), donde en el grupo control el 2.5 % (un niño) y en el grupo de riesgo el 7.5 % (tres niños) superan el límite máximo permisible de 10 ug/dL (Tabla N° 4).

Tabla N° 4 Porcentaje de los niveles de plomo en sangre

	Nivel permisible – hasta 10 ug/dL		Nivel Tóxico – mayor a 10 ug/dL	
	Evaluados	Porcentaje	Evaluados	Porcentaje
Grupo Control	39	97.50%	1	2.50%
Grupo de Riesgo	37	92.50%	3	7.50%
Población Total	76	95%	4	5%

5.3 Porcentaje de micronúcleos (‰)

En la tabla N° 5, se presenta el porcentaje de micronúcleos obtenidos, observándose en la población total una media de 8.34 ‰ (DE \pm 6.00); en el grupo de riesgo 12.33 ‰ (DE \pm 5.53), mientras que el grupo control 4.35 ‰ (DE \pm 3.16).

Tabla N° 5 Porcentaje de micronúcleos

	Micronúcleos (‰)		
	Mínimo	Máximo	Media
Grupo Control	0	15	4.35 \pm 3.16
Grupo Riesgo	3	30	12.33 \pm 5.53
Población Total	0	30	8.34 \pm 6.00

En la Figura N° 7 se evidencia el incremento del porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo.

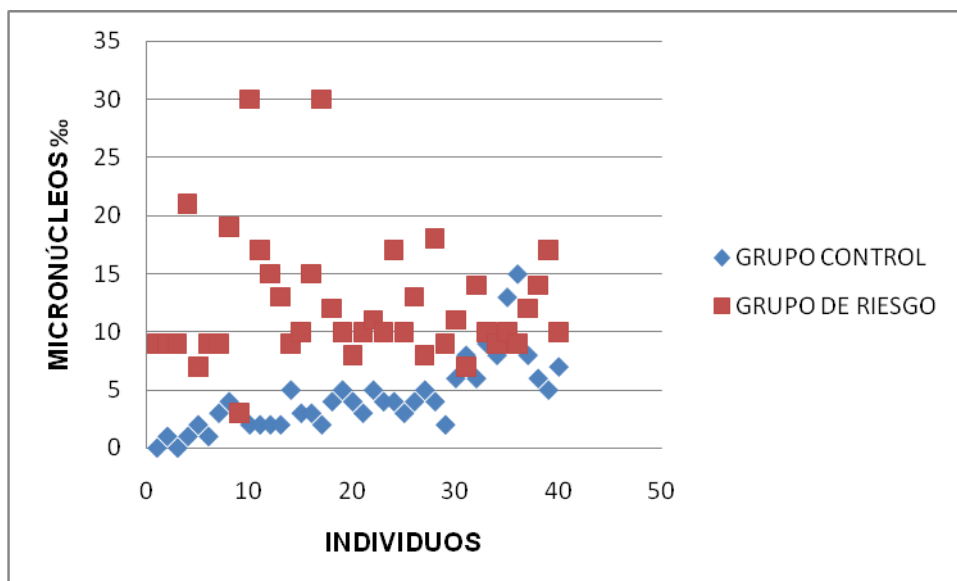


Figura N° 7. Porcentaje de micronúcleos en ambos grupos.

En el grupo de riesgo no existe una correlación significativa entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre con el porcentaje de micronúcleos ($r = -0.068$, $p = 0.675$, $n = 40$) (Figura N° 9; Anexo N°6).

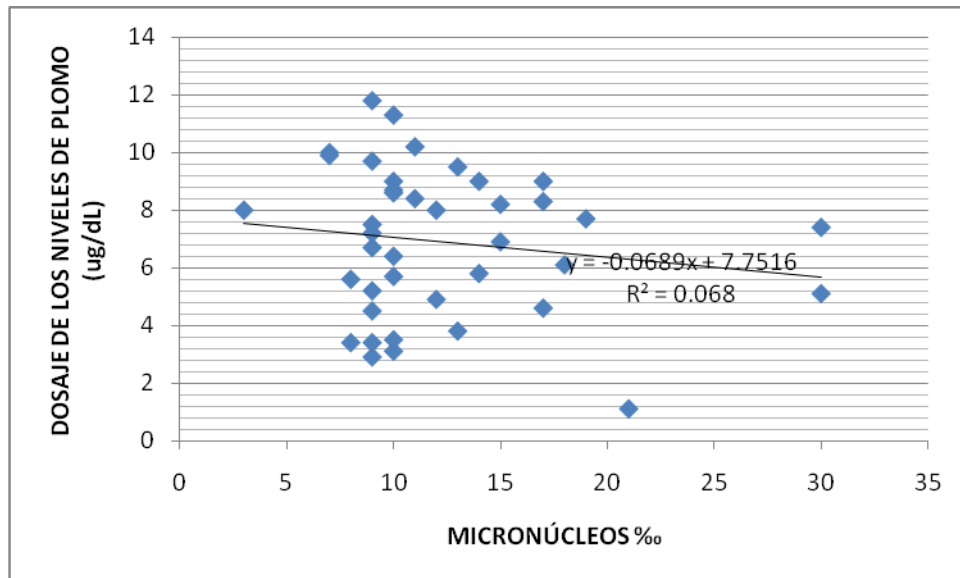


Figura N° 9. Correlación no significativa entre el nivel de plomo y el porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo. Coeficiente de correlación -0.068

5.5 Relación edad porcentaje de micronúcleos

En la población total, la prueba no paramétrica Spearman, mostró que existe correlación significativa baja (Fajardo A. *et al.*, 1991) entre la edad y el porcentaje de micronúcleos ($r = 0.255$, $p = 0.022$, $n = 80$) (Anexo N° 7), por lo que se observa en el diagrama de cajas un ligero aumento del porcentaje de micronúcleos en relación a la edad (Figura N° 10).

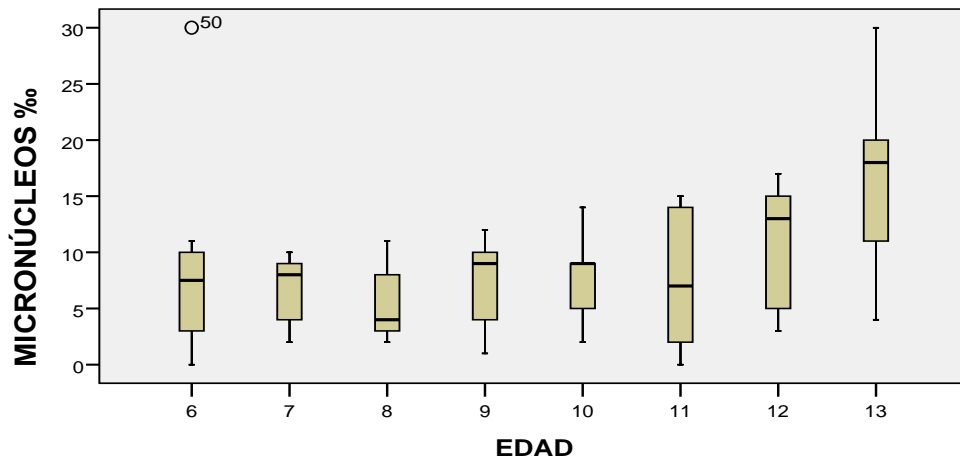


Figura N° 10 . Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con la edad en la población total. Se observa un ligero aumento del porcentaje de micronúcleos con la edad.

En la figura N° 11 se muestra que el grupo control presenta una correlación significativa muy baja (Fajardo A. *et al.*, 1991) entre la edad y el porcentaje de micronúcleos ($r = 0.154$, $p = 0.342$, $n = 40$) (Anexo N° 8), es así que en el diagrama de cajas no se evidencia una relación directa entre el porcentaje de micronúcleos y la edad (Figura N° 12).

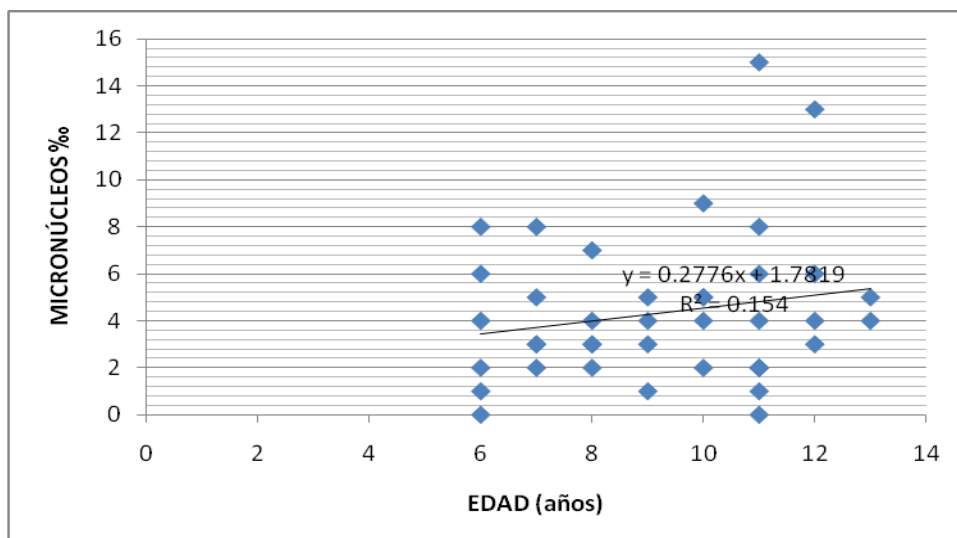


Figura N° 11. Correlación significativa muy baja entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo control. Coeficiente de correlación 0.154, $n = 40$

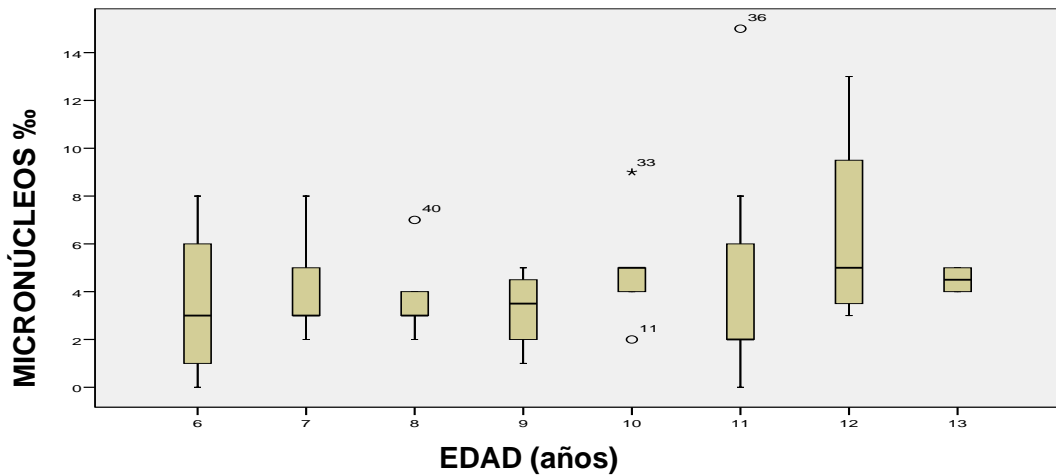


Figura N° 12 . Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con la edad en el grupo control. No se observa una relación precisa entre el porcentaje de micronúcleos y la edad

El grupo de riesgo presentó una correlación significativa baja (Fajardo A. *et al.*, 1991) entre la edad y el porcentaje de micronúcleos ($r = 0.309$, $n = 40$) (Figura N° 13); en este análisis se evidenció que dos muestras presentaban valores muy diferentes (elevados) al resto razón por la cual disminuía la significancia de la correlación.

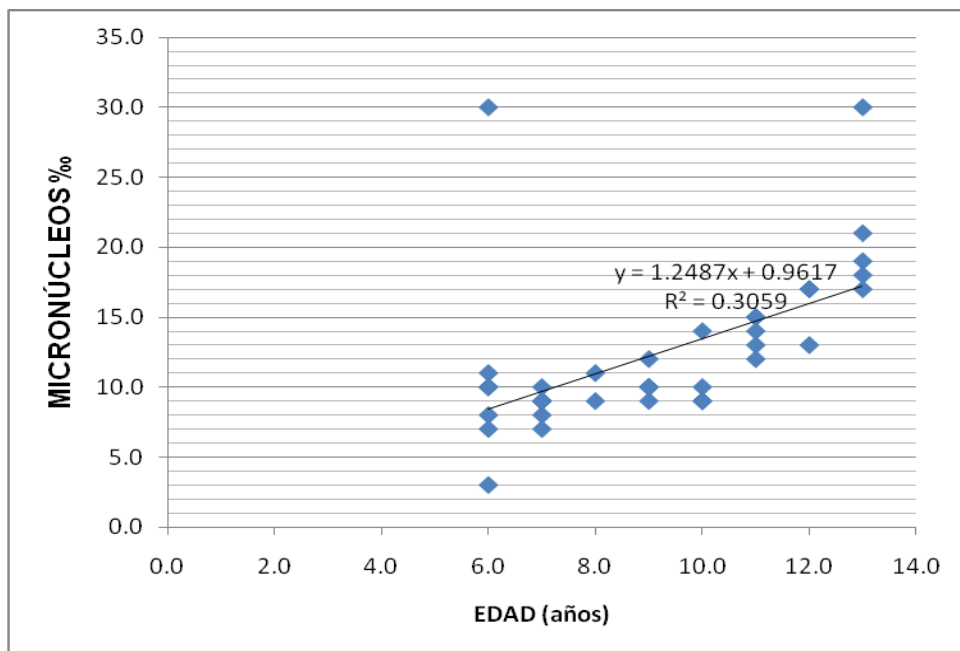


Figura N° 13 . Correlación significativa baja entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo de riesgo. Coeficiente de correlación 0.306, $n = 40$.

En la figura N° 14, se observa el grupo de riesgo (n = 38) que presenta una correlación significativa moderada ($r = 0.669$, $p = 0.000$) (Anexo N° 9). Asimismo, en el diagrama de cajas se observa una relación directa entre la edad y el porcentaje de micronúcleos (Figura N° 15).

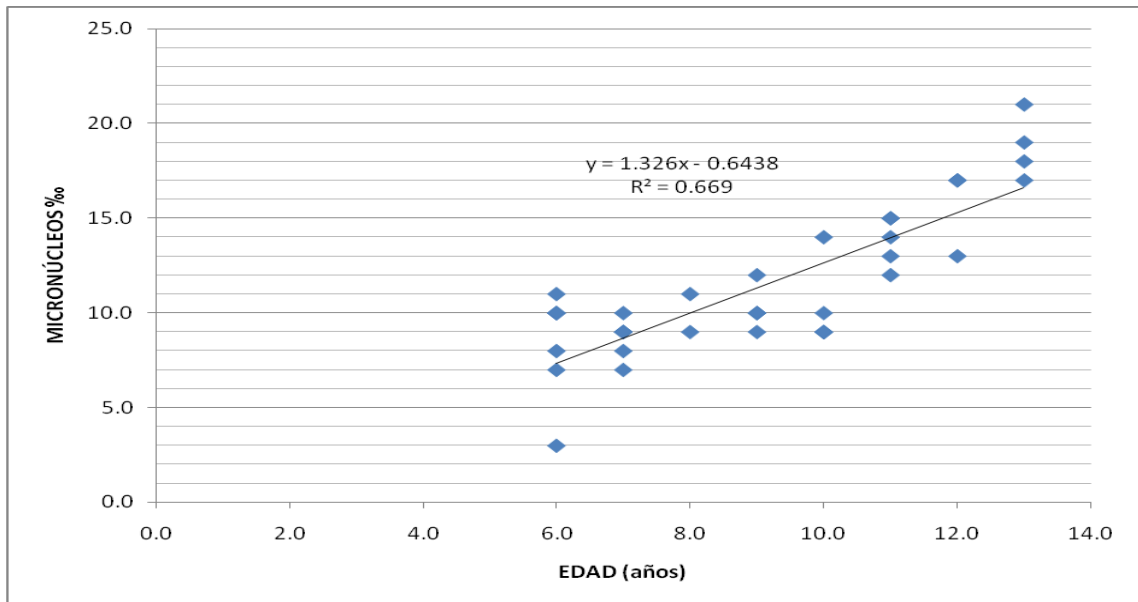


Figura N° 14 . Correlación significativa moderada entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo de riesgo. Coeficiente de correlación 0.688, n = 38

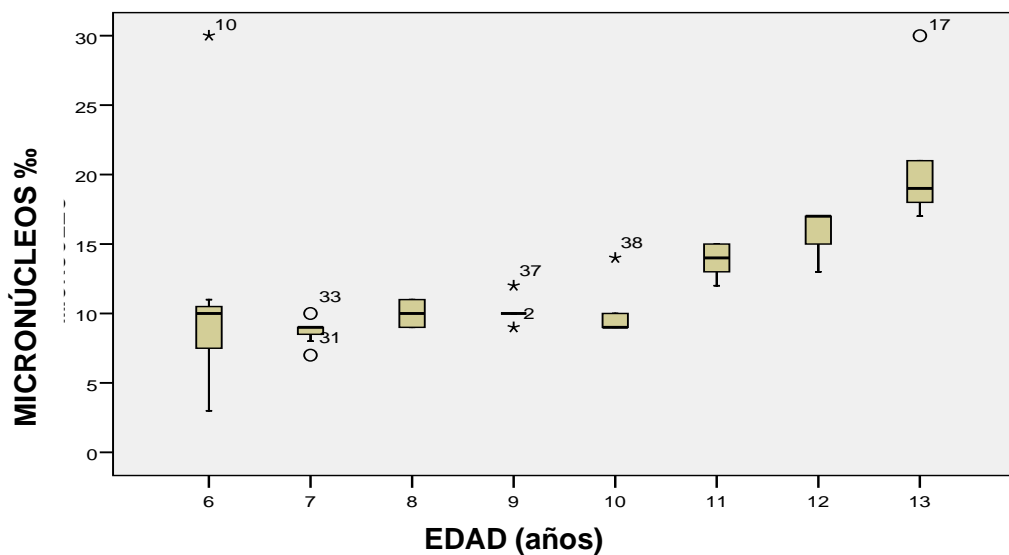


Figura N° 15 . Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con la edad en el grupo de riesgo. A medida que aumenta la edad el porcentaje de micronúcleos se incrementa.

5.6 Relación de otras variables

Analizando el porcentaje de micronúcleos con la variable sexo se tiene que en la población total el número de micronúcleos es similar en ambos sexos, encontrándose en el femenino una media de 7.77 ‰ (DE \pm 6.21) y en el masculino 9.19 ‰ (DE \pm 5.67) (Figura N° 16).

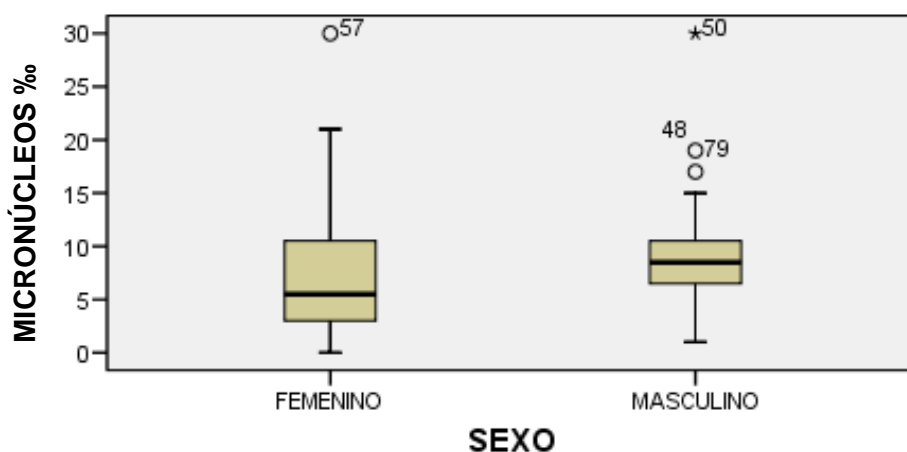


Figura N° 16 . Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con el sexo en la población total.

En la figura N° 17, se observa que el grupo control presenta un mayor número de micronúcleos en el sexo masculino; siendo la media en el sexo femenino 3.82 ‰ (DE \pm 2.93) y en el masculino 5.58 ‰ (DE \pm 3.45). De igual modo, en el grupo de riesgo la cantidad de micronúcleos es similar para ambos sexos, observándose un ligero incremento del porcentaje de micronúcleos en el sexo femenino siendo la media 13.33 ‰ (DE \pm 5.30) y en el masculino 11.35 ‰ (DE \pm 5.83) (Figura N° 18).

No se observa una correlación entre las variables edad y sexo de los niños con el dosaje de los niveles de plomo.

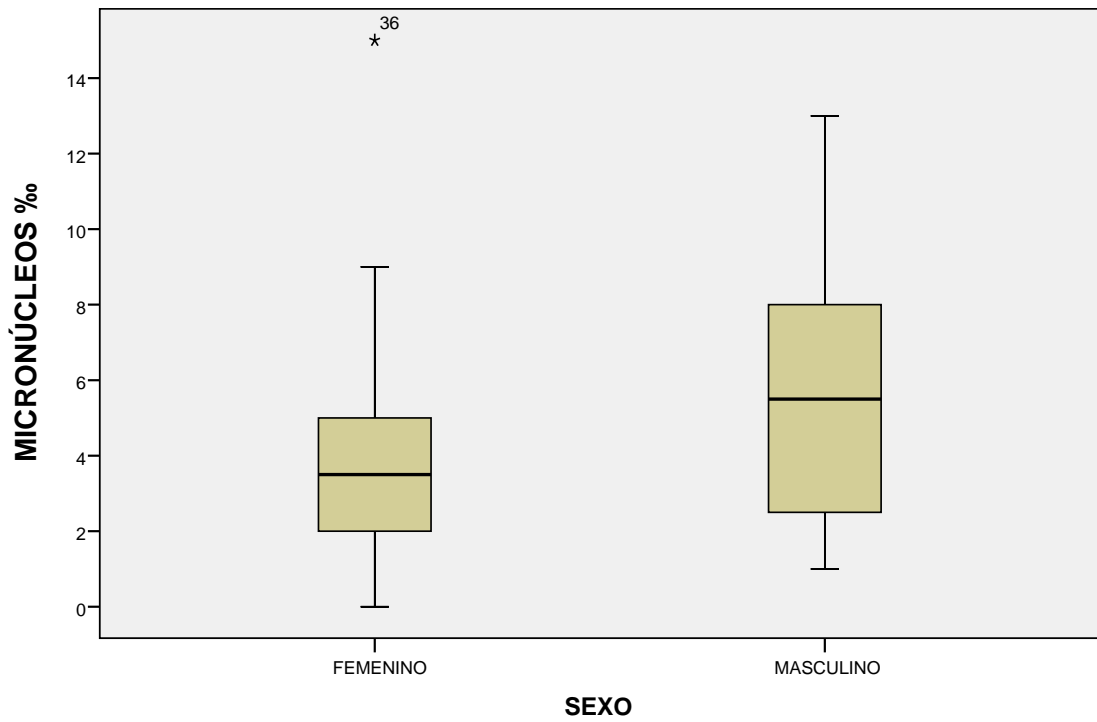


Figura N° 17 . Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con el sexo en el grupo control.

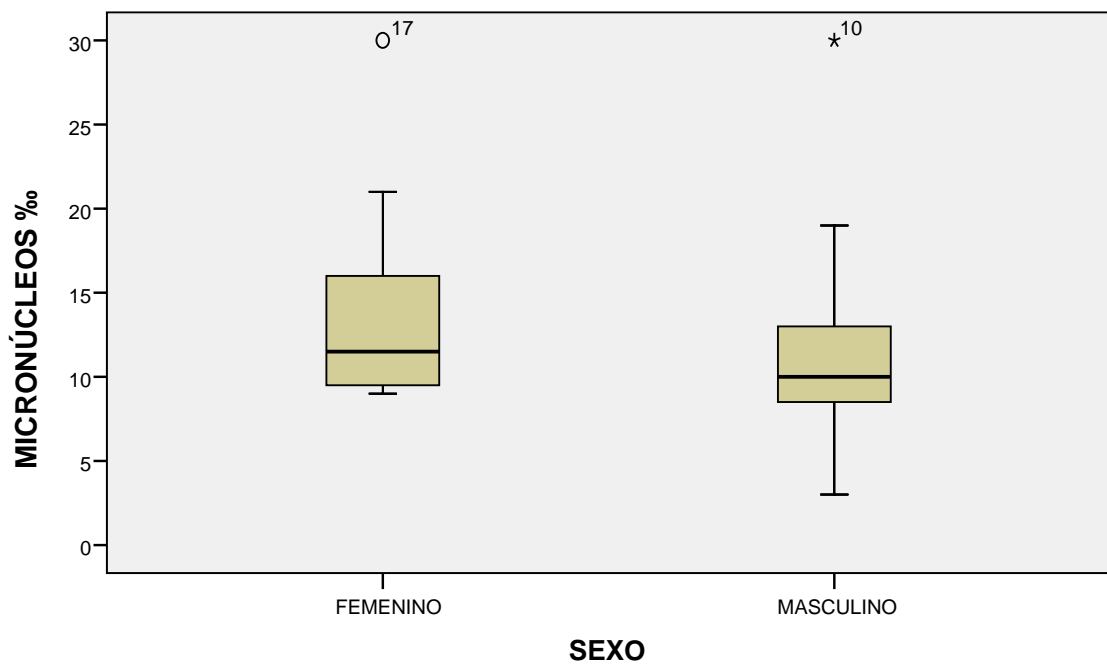


Figura N° 18 . Diagrama de cajas, relacionando el porcentaje de micronúcleos con el sexo en el grupo de riesgo.

6. DISCUSIÓN

Tamaño muestral

Este estudio es de tipo transversal comparativo, la obtención del tamaño muestral no fue aleatoria, debido que se debía cumplir con los criterios de inclusión y exclusión para cada población.

Análisis de las variables en ambos grupos

Por ser la obtención de los participantes no aleatoria se observa un mayor número de niñas que participaron en el estudio (60%) que de niños (40%) (Figura N°4), este incremento se debió básicamente a la participación mayoritaria de niñas en el grupo control 70%, ya que en el grupo de riesgo la participación tanto de niñas y de niños fue equitativa (Tabla N° 1 – Figura N°5).

En ambos grupos se trabajó con niños de edades comprendidas entre 6 a 13 años, no se observó diferencia de edades entre el grupo control y el grupo de riesgo. Del mismo modo no se observó diferencia significativa entre el peso y las tallas de los niños del grupo control y del grupo de riesgo (Tabla N° 2); lo cual difiere de lo esperado (grupo de riesgo con menor peso y talla del promedio), debido a su estado de intoxicación y hábitos alimenticios, esta similitud en el peso y talla de los niños puede deberse a que se están tomando medidas correctivas en la población escolar brindándoles una mejor alimentación a los menores

Niveles de plomo en sangre:

Encontramos que existe diferencias en el promedio del dosaje de los niveles de plomo en sangre entre los grupos control y de riesgo ($p = 0.000$) (Anexo N°3). Encontrándose

mayores valores en el grupo de riesgo (6.90 ± 1.55 ug/dL) frente al grupo control (3.57 ± 2.48 ug/dL) (Tabla N° 3-Figura N° 6).

Asimismo, los niveles de plomo en sangre de los niños, se encuentran en promedio (5.24 ± 3.00 ug/dL) dentro del límite permisible hasta de 10ug de plomo por decilitro de sangre. Sin embargo, se halló que un niño (2.5 %) del grupo control los niveles de plomo en sangre supera el nivel máximo permisible (Tabla N°4), lo cual se puede deber a la contaminación ambiental y/o por la utilización de este metal en diversos productos de fácil acceso para el menor.

Por otro lado en el grupo de riesgo el 92.5 % de niños no superan el nivel máximo permisible de 10 ug/dL (Tabla N°4), resultado que difiere de trabajos previos realizados con la misma población donde si superan los niveles de máximo permisible (Vega J. *et al.*, 2003; 2005). Nuestros resultados pueden ser evidencia que los niveles de contaminación por plomo deben haber disminuido por las acciones preventivas que se han ido realizando: limpieza de calles mediante jornadas de limpieza, programas de alimentación a los niños que se encuentran matriculados en los colegios que pertenecen a la zona de contaminación de plomo, donde la I.E.N. María Reiche N° 5045 pertenece.

Porcentaje de micronúcleos (‰)

Se pudo evidenciar que en la población total en estudio existe un daño genotóxico en los linfocitos de sangre periférica, sin embargo el porcentaje de micronúcleos hallado fue menor a los obtenidos en poblaciones adultas (Vaglenov A., *et al.*, 2001). Este resultado nos indica que mediante esta técnica podemos determinar el daño acumulado a través del tiempo, razón por la que en los adultos es mayor que en los niños.

Asimismo, encontramos que existe diferencias en el promedio de porcentaje de micronúcleos en el grupo control ($4.35 \pm 3.16 \text{ ‰}$) y de riesgo ($12.33 \pm 5.53 \text{ ‰}$) ($p = 0.000$) (Tabla N° 5; Figura N° 7; Anexo N°3), lo cual determina que en el grupo de riesgo el daño genotóxico “*Efecto genotóxico*” fue superior, esto se debe básicamente por vivir en zona de contaminación por plomo, donde las condiciones precarias de las viviendas, higiene y alimentación son factores condicionantes.

Relación del dosaje de los niveles de plomo en sangre con el porcentaje de micronúcleos

Se obtuvo esta relación para la determinación del efecto genotóxico del plomo en linfocitos de sangre periférica.

Se halló que existe una correlación significativa moderada (Fajardo A. *et al.*, 1991) entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre con el porcentaje de micronúcleos en la población total ($r = 0.658$, $p = 0.000$, $n = 80$) (Anexo N° 4); debido a que básicamente el grupo control tiene una correlación significativa moderada ($r = 0.763$, $p = 0.000$) (Anexo N° 5- Figura N° 8), en cambio el grupo de riesgo no presenta correlación ($r = 0.-068$, $p = 0.675$) (Anexo N° 6- Figura N° 9). Este hallazgo podría deberse a que la acumulación del plomo en la población de riesgo sea mayor en huesos que en sangre (ATSDR, 2005; HPA, 2006).

Relación edad - porcentaje de micronúcleos

Debido a que todos los niños del grupo de riesgo de este estudio, viven desde su nacimiento en la zona afectada e incluso sus generaciones previas son oriundas de allí, y con el fin de determinar que el efecto genotóxico está en relación directa con el

tiempo de permanencia en la zona de contaminación por plomo “tiempo de exposición”, se comparó la edad con el porcentaje de micronúcleos.

En estos resultados previos se muestra que el grupo de riesgo presenta mayor porcentaje de micronúcleos evidenciando un daño genotóxico, sin embargo no se halló correlación significativa entre los micronúcleos con los niveles de plomo.

Relacionando el porcentaje de micronúcleos y la edad en la población total se halló que existe una correlación significativa baja (Fajardo A. *et al.*, 1991) ($r = 0.255$, $p = 0.022$) (Anexo N° 7), observándose un ligero aumento del porcentaje de micronúcleos de acuerdo a la edad (Figura N° 10); esta significancia se debe a que el grupo control presenta una correlación significativa muy baja entre el porcentaje de micronúcleos y la edad ($r = 0.154$, $p = 0.342$) (Anexo N° 8- Figura N° 11).

Sin embargo el grupo de riesgo presenta una correlación significativa moderada ($r = 0.669$, $p = 0.000$, $n = 38$) (Anexo N° 9- Figura N° 14), observándose un incremento en el porcentaje de micronúcleos en relación a la edad (Figura N° 15); así mismo es importante indicar que para obtener esta correlación fue necesario excluir dos muestras para el análisis estadístico, por presentar elevado número de micronúcleos los cuales difieren notoriamente con el resto del grupo. Se asume que este resultado se debe a que los padres trabajan en soldadura y mecánica, oficios considerados como factores que podrían incrementar el daño genotóxico.

Relación de otras variables

No se observa correlaciones significativas entre el porcentaje de micronúcleos y otras variables (sexo, talla, peso) como sí se observan en poblaciones adultas (Zalacain *et al.*, 2005).

Implicancia de los resultados

Comparando nuestros resultados del dosaje de plomo en sangre con trabajos previos en la zona de riesgo (Vega J. *et al.* 2003, 2005), observamos que difieren ya que hayamos que el 92.5 % de los niños del grupo de riesgo sus niveles de plomo en sangre no sobrepasan el nivel máximo permisible, sin embargo si se ha hallado un mayor nivel de plomo en sangre comparado con el grupo control (Tabla N° 3).

De igual modo obtuvimos que sí existe un efecto genotóxico ocasionado por el plomo; evidenciado con el aumento del porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo contrastado con el grupo control (Tabla N° 5), y que además este daño no está relacionado directamente con los niveles de plomo sino con el tiempo de exposición a este contaminante (Figura N° 14). Estos resultados son un importante antecedente del daño genotóxico ocasionado por el plomo en niños de nuestro país.

Finalmente, en el transcurso del tiempo, el riesgo carcinogénico del plomo ha sido investigado tanto en animales como en humanos, desafortunadamente esos estudios cuentan con algunas deficiencias y sobre todo no existe una evidencia concluyente para asociar la exposición de plomo con el incremento de la incidencia de cáncer. Sin embargo sabemos que el plomo interfiere con las proteínas de unión al ADN y puede ocasionar inestabilidad genética (ATSDR, 2005), y que ésta se manifiesta con un mayor porcentaje de micronúcleos el mismo que está relacionado con el riesgo de cáncer (Bonassi S. *et al.*, 2007). Según Bonassi el porcentaje de micronúcleos para tener riesgo de cáncer debe ser superior a 20 ‰ (dato obtenido en promedio); los porcentajes hallados en este estudio son menores, sin embargo es importante monitorear este daño genotóxico ocasionado en el transcurso del tiempo, para tomar medidas preventivas y/o acciones correctivas.

7. CONCLUSIONES

1. Los niveles de plomo son significativamente mayores en el grupo de riesgo comparado con el grupo control.
2. Existe un efecto genotóxico en el grupo de riesgo evidenciado por un aumento significativo en el porcentaje de micronúcleos.
3. Existe una correlación significativa directa entre el tiempo de exposición (edad) con el porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo.
4. En la población analizada el promedio de micronúcleos (12.33 ± 5.53), no es considerado como riesgo de cáncer.

8. RECOMENDACIONES

1. Monitorizar el grupo de riesgo; a través del dosaje de plomo y análisis de micronúcleos, para medir el daño genotóxico en el transcurso del tiempo.
2. Evaluar la correlación de los niveles de calcificación del hueso (densitometria) en la población de riesgo con el porcentaje de micronúcleos.
3. Evaluar el efecto genotóxico con otras pruebas adicionales como el intercambio de cromátides hermanas y el ensayo cometa para determinar el daño y la inestabilidad genética en la población.

9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARO, Arturo. Contaminación por plomo en el Callao. ONG Vida. [en línea]. 2002, folleto. [Citado 20-06-2007] p. 1-4. Disponible en <
- ANDREWS, K.; SAVITS, D. & HERTZ-PICCIOTTO, I. Prenatal lead exposure in relation to gestational age and birth weight: A review of epidemiologic studies. *American Journal of Industrial Medicine*. 1994, vol. 26, p. 13-32.
- APOSTOLI, P.; BELLINI, A.; PORRU, S. & BISANTI, L. The effect of lead on male fertility: A time to pregnancy (TTP) study. *American Journal of Industrial Medicine*. 2000, vol. 38, p. 310-315.
- ARAKI, S.; SATO, H.; YOKOYAMA, K. & MURATA, K. Subclinical neurophysiological effects of lead: A review on peripheral, central, and autonomic nervous system effects in lead workers. *American Journal of Industrial Medicine*. 2000, vol. 37, p. 193-204.
- BELLINGER, David. Lead neurotoxicity in children: Decomposing the variability in dose-effect relationships. *American Journal of Industrial Medicine*. 2007, vol. 50, p. 720-728.
- BELLINGER, David. Teratogen update: Lead. *Teratology*. 1994, vol. 50, p. 367-373.
- BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.; ZIJNO, A.; NORPPA, H. & FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*. 2007, vol. 28, nº 3, p. 625-631.
- BONASSI, S.; FENECH, M.; LANDO, C.; LIN, Y.; CEPPI, M.; CHANG, W.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.;

BIGATTI, M.; BOLOGNESI, M.; JIA, C.; DI GIORGIO, M.; FERGUSON, F.; FUCIC, A.; GARCIA, O.; HRELIA, P.; KRISHNAJA, A.; LEE, T.; MIGLIORE, L.; MIKHALEVICH, L.; MIRKOVA, E.; MOSESSO, P.; MULLER, W.; ODAGIRI, Y.; SCARFÒ, M.; SZABOVA, M.; VOROBTSOVA, I.; VRAL, A. & ZIJNO, A. Human Micronucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block, micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2001, vol. 37, p. 31-45.

- Blood lead levels in children. WHO “World Health Organization” Office for Europe, Copenhagen, Denmark. [en línea]. 2007, fact sheet Nº 4.5. [Citado 17-01-2008] p. 1-4. Disponible en http://194.255.1.161/Document/EHI/ENHIS_Factsheet_4_5.pdf
- CHANNARAPAYAPPA, J.; NATH J. & ONG T. Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1990, vol. 10, p. 273-279.
- CHAVÉZ DELGADO, Magaly. “Aplicación de técnicas de citogenética molecular para la detección de aneuploidía y clastogenicidad en células humanas expuestas a arsénico”. Tesis, Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología, Barcelona, 2007.
- CICCHETTI, Rosadele & ARGENTIN Gabriella. The role of oxidative stress in the in vitro induction of micronuclei by pesticides in mouse lung fibroblasts. *Mutagenesis*. 2003, vol. 18, nº 2, p. 127-132.
- CORVI, R.; ALBERTINI, S.; HARTUNG, T.; HOFFMANN, S.; MAURICI, D.; PFUHLER, S.; BENTHEM, J. & VANPARYS, P. ECVAM Retrospective validation of in Vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*. 2008, vol. 23, nº 4, p. 271–283.

- FAJARDO, Álvaro. Consistencia y validez de una medición en la investigación clínica pediátrica. Boletín Medico Hospital Infantil de Mexico. 1991, vol. 48, nº 5, p. 7-11.
- FENECH, M.; CHANG, W.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S. & ZEIGER. The Human Micronucleus Project—Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutation Research. 2003, vol. 534, p. 65-75.
- FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research. 2000, vol. 455, p. 81-95.
- FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.; ZEIGER, E. & BONASSI, S. The Human Micronucleus Project: An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutation Research. 1999, vol. 428, p. 271-283.
- FENECH, Michael. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutation Research. 1993, vol. 255, p. 35-49.
- FRANCO, L.; DIAS, F.; GREGGI, L. & CANDIDO, E. Prevalence of micronuclei in exfoliated uterine cervical cells from patients with risk factors for cervical cancer. Sao Paulo Medical Journal. 2008, vol. 126, nº 6, p. 323-328.
- GANDHI, G.; SHARMA, P.; KAUR, A. & BADARUDDOZA. The micronucleus test in urothelial cells and uterine smears of cervix cancer patients: A comparison. International Journal Human Genetics. 2003, vol. 3, nº 2, p. 121-126.
- GIDLOW, D. A. Lead toxicity. Occupational Medicine. 2004, vol. 54, p. 76-81.
- GRUJICIC, D.; MILOSEVIC, O.; ARSENIJEVIC, S. & MARINKOVIC, D. Treatment of pregnant women with a betamimetic and verapamil increases the

micronuclei frequency in umbilical cord blood lymphocytes. *Tohoku Journal Experimental Medicine*. 2008, vol. 215, p. 363-371.

- GUSTAVSSON, P.; JAKOBSSON, R.; NYBERG, F.; PERSHAGEN, G.; JARUP, L. & SCHEELE, P. Occupational exposure and lung cancer risk: a population based case referent study in Sweden. *American Journal of Epidemiology*. 2006, vol. 152, nº 1, p. 32-40.
- HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S. & FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*. 2008, doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.007.
- HOLLAND, N.; HARMATZ, P.; GOLDEN, D.; HUBBARD, A.; WU, Y.; BAE, J.; CHEN, C.; HUEN, K. & HEYMAN, M. Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease. *Pediatric Research*. 2007, vol. 61, nº 2, p. 1-6.
- JEMAL, A.; GRAUBARD, B.; DEVESA, S. & FLEGA, K. The Association of Blood Lead Level and Cancer Mortality among Whites in the United States. *Environmental Health Perspectives*. 2002, vol. 110, nº 4, p. 325-329.
- KAMBOJ, Mala & MAHAJAN, Sumita. Micronucleus – an upcoming market of genotoxic damage. *Clinic Oral Investigation*. 2007, vol. 11, p. 121-126.
- LANDRIGAN, P.; BOFFETA, P. & APOSTOLI, P. The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: A critical review. *American Journal of Industrial Medicine*. 2000, vol. 38, p. 231-243.
- Lead. HPA “Health Protection Agency”. [en línea]. 2006, compendium of chemical hazards. [Citado 13-03-2009] p. 1-28. Disponible en <http://194.74.226.162/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947319565>

- Lead and your health. NIEHS “National Institute of Environmental Health Sciences”. [en línea]. 2005, fact sheet. [Citado 17-02-2008] p.1-2. Disponible en <<http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/lead/docs/lead.pdf>>
- Lead and lead compounds. ATSDR “Agency for Toxic Substances and Disease Registry”. [en línea]. 2005, fact sheet. [Citado 12-08-2007] p:1-12. Disponible en <<http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts13.pdf>>
- Lead. WHO “World Health Organization” Office for Europe, Copenhagen, Denmark. [en línea]. 2001, chapter 6.7, [Citado 15-03-2009] p.1-17. Disponible en <http://www.euro.who.int/document/aig/6_7lead.pdf>
- LERDA, Daniel. Study of sperm characteristics in persons occupationally exposed lead. American Journal of Industrial Medicine. 1992, vol. 22, p. 567-571.
- LUCERO, L.; PASTOR, S.; SUAREZ, S.; DURBÁN, R.; GÓMEZ, C.; PARRÓN, T.; CREUS, A. & MARCOS, R. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: Micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. Mutation Research. 2000, vol. 464, p. 255-262.
- MILOSEVIC, O.; GRUJICIC, D.; MARINKOVIC, D.; ARSENIJEVIC, S. & BANKOVIC, S. Effect of various doses of gestogens on micronuclei frequency in human peripheral blood lymphocytes of pregnant women. Human Reproduction. 2003, vol. 18, nº 2: 433-436.
- NERI, M.; BONASSI, S.; KNUDSEN, L.; SRAM, R.; UGOLINI, D. & MERLO, D. Children’s exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage I. Overview and critical issues. Mutation Research. 2006a, vol. 612, p. 1-13.
- NERI, M.; UGOLINI, D.; BONASSI, S.; FUCIC, A.; HOLLAND, N.; KNUDSEN, L.; CEPPI, M.; BOCCHINI, V. & MERLO, D. Children’s exposure to environmental

pollutants and biomarkers of genetic damage II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutation Research*. 2006b, vol. 612, p.14-39.

- NERSESYAN, Armen. Possible role of the Micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: A minireview. *Citology and Genetics*. 2007, vol. 41, nº 5, p. 317-318.
- NORPPA, Hannu. & C.M.FALCK Ghita. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*. 2003, vol, 18, nº 3, p. 221-233.
- PASTOR, S.; CREUS, A.; PARRÓN, T.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; SIFFEL, C.; PIPERAKIS, S. & MARCOS, R. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: Results of a Hungarian population study the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2003, vol. 18, nº 3, p. 249-258.
- PASTOR, S.; CREUS, A.; XAMENA, N.; SIFFEL, C. & MARCOS, R. Occupational exposure to pesticides and cytogenetic damage: Results of a Hungarian population study the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2002a, vol. 40, p. 101-109.
- PASTOR, S.; LUCERO, L.; GUTIÉRREZ, S.; DURBÁN, R.; GÓMEZ, C.; PARRÓN, T.; CREUS, A. & MARCOS, R. A follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*. 2002b, vol. 17, nº 1, p. 79-82.
- PASTOR BENITO, Susana. “Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos”. Asesores: Dr. Amadeu Creus Capdevila, Dr. Ricard Marcos Dauder. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Ciencias, Departamento de Genética y Microbiología, Barcelona, 2002c.

- PASTOR, S.; GUTIÉRREZ, S.; CREUS, A.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A. & MARCOS, R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutation Research*. 2001a, vol. 495, p. 147-156.
- PASTOR, S.; GUTIÉRREZ, S.; CREUS, A.; XAMENA, N.; PIPERAKIS, S. & MARCOS, R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2001b, vol. 16, nº 6, p. 539-545.
- PATLOLLA, B.; PATLOLLA, A. & TCHOUNWOU, P. Cytogenetic effects of 1,1-Dichloroethane in mice bone marrow cells. *International Journal of Environmental*. 2005, vol. 2, nº 1, p. 101-106.
- Pollutant: lead. Blacksmith Institute. [en línea]. 2008. [Citado 28-10-2008]. Disponible <<http://www.blacksmithinstitute.org/projects/pollutants/lead>>
- RAISUDDIN, Sheikh; JHA, Awadhesh. Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single-cell gel electrophoresis and cytokinesis block micronucleus assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2004, vol. 44, p. 83-89.
- Saturnismo Infantil “Información para promover los intereses de la infancia y adoptar medidas”. UNICEF “Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia”/ PNUMA “Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente”. [en línea]. 2000, folleto. [Citado 17-04-2009] p. 1-23. Disponible en <http://www.chem.unep.ch/irptc/publications/leadpoison/lead_spn.pdf>
- SCHRÖDER, H.; HEIMERS, A.; FRENTZEL, R.; SCHOTT, A. & HOFFMANN, W. Chromosome aberration analysis in peripheral lymphocytes of Gulf War and Balkans War veterans. *Nuclear Technology Publishing*. 2003, vol. 103, nº 3, p. 211-219.

- SILBERGELD, E.; WAALKES, M &, RICE, J. Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action. American Journal of Industrial Medicine, 2000, vol. 38, p. 316-323.
- STEENLAND, Kyle & BOFFETTA, Paolo. Lead and cancer in humans: where are we now? American Journal of Industrial Medicine. 2000, vol. 38, p. 295-299.
- STEWART, Walter & SCHWARTZ, Brian. Effects of lead on the adult brain: A 15 year exploration. American Journal of Industrial Medicine. 2007, vol. 50, p. 729-739.
- VAGLENOV, A.; CREUS, A.; LALTCHEV, S.; PETKOVA, V.; PAVLOVA, S. & MARCOS, R. Occupational Exposure to Lead and Induction of Genetic Damage. Environmental Health Perspectives. 2001, vol. 109, p. 295-298.
- VEGA, J.; DE COLL, J.; KATEKARU, D.; LERMO, J.; ESCOBAR, J.; DÍAZ, M.; BERROCAL, V.; GÓMEZ, J.; DÍAZ, G.; ARROYO, A. & CASTRO, J. Intoxicación plúmbica crónica y alteraciones del crecimiento y desarrollo cognitivo-emocional en niños. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2003, vol. 64, p. 94-100.
- VEGA, J.; DE COLL, J.; LERMO, J.; ESCOBAR, J.; DÍAZ, M. & CASTRO, J. Niveles intelectuales y ansiedad en niños con intoxicación plúmbica crónica. Colegio “María Reiche” Callao-Perú, 2002. Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2005, vol. 66, p. 142-147.
- WIJNGAARDEN, Edwin & DOSEMECI, Mustafa. Brain cancer mortality and potential occupational exposure to lead: Findings from the National Longitudinal Mortality Study, 1979–1989. International Journal of Cancer. 2006, vol. 119, p. 1136-1144.
- WITCZAK, M.; FERENC, T.; LOPACZYNSKA, D.; NOWAKOWSKA, D.; KOCISZEWSKA, I. & WILCZYNSKI, J. The effect of antiepileptic drugs

administered in pregnancy on micronucleus frequency in cord blood lymphocytes. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health. 2008, vol. 21, nº 1, p. 67-71.

- YESILADA, E.; SABIN, I.; OSCAN, H.; HALIL, I.; YOLOGLU, S. & TASKAPAN, C. Increased micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes in women with polycystic ovary syndrome. European Journal of Endrology. 2006, vol. 154, p. 563-568.
- ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L. & PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Anales Sist. Sanitaria Navarra. 2005, vol. 28, nº 2, p. 227-232.
- ZUÑIGA, L.; GARBIÑE, C. & DUK, M. Estudio citogenético y reproductivo en mujeres temporeras expuestas a pesticidas de la VIII region de Chile. Theoria. 2007, vol. 16, nº 1, p. 77-87.

11. ANEXOS

ANEXO N° 1

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Identificación del estudio

Titulo del estudio:

Evaluación genotóxica de una población escolar expuesta a altos niveles de plomo, en la Provincia Constitucional del Callao

Instituciones:

Laboratorio de Genética del Instituto Nacional de Salud del Niño - INSN

Laboratorio de Genética Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM

Investigadores:

Mirian Antonia Pariona Canchiz: Bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, encargada de la información, registro, extracción y procesamiento de las muestras. Instituto Nacional de Salud del Niño.

Bertha Gallardo Jugo: Medico Jefe del Servicio de Genética del Instituto Especializado de Salud del Niño.

Margarita Velásquez Reinoso: Bióloga, profesora asociada de la Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Identificación del padre o apoderado del donante

Instituto Especializado de Salud del Niño

Av. Brasil 600 Breña

Lima – Perú

INTRODUCCIÓN

Se solicita la participación de su menor hijo en una investigación en la cual se pretende demostrar que altos niveles de plomo en la sangre presentan mayor frecuencia de alteraciones cromosómicas (micronúcleos), la cual se relacionará empleando la técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis. Esta técnica es la adecuada para evaluar alteraciones cromosómicas inducidas por agentes genotóxicos como el plomo.

Antes que decida participar es importante que tenga conocimiento de por qué se está haciendo la investigación y qué implicancias tendrá. Sírvase tomar el tiempo necesario para leer cuidadosamente lo que viene a continuación.

La siguiente información podrá discutirla con sus amigos, parientes y su médico personal (médico general o médico de atención primaria). Si tiene usted alguna duda o si desea más información consúltenos.

Después de leer este formulario de consentimiento informado, si usted desea que su menor hijo participe en este estudio se le pedirá que lo firme. Su firma demostrará que usted da su consentimiento (permiso) para que su menor hijo/a participe en este estudio. A usted se le dará una copia del formulario del consentimiento firmada y fechada para que lo conserve.

Este estudio se hace con el apoyo del Instituto Especializado de Salud del Niño.

PROPÓSITO

Nos proponemos demostrar que los altos niveles de plomos en la sangre (mayores a 10ug/ dl) en los niños, ocasiona daños a nivel genético (inestabilidad cromosómica) mediante la técnica de micronúcleos, que detecta indirectamente alteraciones del tipo estructural en los cromosomas.

Es importante la detección de micronúcleos en los niños que presentan niveles altos de plomo en la sangre debido a su riesgo de sufrir enfermedades degenerativas como el cáncer, a fin de realizar un monitoreo que permita tomar acciones de prevención, evaluación y oportuno tratamiento.

DESCRIPCIÓN

Niveles altos de plomo en la sangre

El plomo es un metal indestructible, en el medio ambiente éste persiste y puede movilizarse de un lugar a otro, es un contaminante ambiental, su nivel permisible máximo es de 10ug/dl según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Los niños son más sensibles a la contaminación, debido a su edad, hábitos de alimentación y juego (pueden ingerir alimentos, tierra y hasta pintura contaminada, chupar o morder lápices de colores y juguetes, y absorberlos por vía cutánea). En los niños los niveles altos de plomo en la sangre pueden causar daños irreversibles, afectan principalmente el sistema nervioso (problemas de aprendizaje, comportamiento), y su crecimiento (obtener talla inferior al promedio).

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) también consideran a este metal como probable o posible cancerígeno humano. Por todo ello es importante la detección de la inestabilidad cromosómica en personas con altos niveles de intoxicación por el plomo, por ser un agente genotóxico.

Diagnostico

La inestabilidad cromosómica puede ser detectada por la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis durante la división celular, esta técnica es considerada como un ensayo práctico, universalmente validado y accesible tecnológicamente.

PROCEDIMIENTO

Los niños que podrán participar en este estudio son los niños de 6 a 13 años de edad que estén cursando estudios primarios, en un colegio perteneciente a la zona afectada con mayor contaminación por plomo y otro en una zona que no presente alta contaminación por este metal, sin diferencia de sexo, raza, religión ni estatus socioeconómico.

Los familiares de los alumnos serán informados sobre el trabajo de investigación, se les pedirá su incorporación al proyecto. En caso de aceptar se solicitará la firma del consentimiento informado y se procederá al registro de datos que se identificará por un número(es decir es codificado) que serán guardados en un lugar seguro.

Luego se procederá a la toma de la muestra, ayudados por una jeringa y aguja hipodérmica descartable que contenga un anticoagulante y un tubo al vacío con EDTA, se extraerá 5 mL de sangre por punción del antebrazo, la cual se empleará para la

evaluación del nivel de plomo que presente cada niño y para realizar la técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN).

La lectura de los resultados será examinada en microscopio de luz. El resultado se dará a los padres o representante legal manteniendo la confidencialidad y privacidad.

A los niños con frecuencias altas de micronúcleos se les realizará un monitoreo post análisis en el Instituto Especializado de Salud del Niño con ecografías renal, testicular y/o pélvica y examen de orina para descartar procesos degenerativos, debido que las frecuencias altas de micronúcleos se asocian con problemas degenerativos urogenitales.

DURACIÓN

El presente estudio tendrá una duración de 12 meses.

PARTICIPANTES

Número de sujetos:

- El estudio involucra a 80 niños, 40 que residan en el Asentamiento Humano Puerto Nuevo – Callao (zona afectada) y 40 que no residan en el Asentamiento Humano Puerto Nuevo – Callao (zona no afectada).

RIESGO/ INCONVENIENTES

La toma de muestra se realizará con todas las normas éticas estándares y protocolos de bioseguridad, para evitar complicaciones como hematomas, contaminación.

BENEFICIOS

En el Perú no existen estudios realizados donde se demuestre que el plomo ocasione daño a nivel genético. La realización de este trabajo nos permite conocer la intensidad del daño que ocasiona los niveles de plomo en la sangre. La detección de las altas frecuencias de micronúcleos en los niños permitirá tomar acciones de prevención, evaluación y oportuno tratamiento.

GASTOS/ COSTOS

No le costará, ni se realizará ningún pago por las pruebas del estudio.

CONTACTOS

Si en cualquier momento antes, durante o después del estudio tiene preguntas o dudas al respecto usted puede consultar con las personas que realizaron las reuniones informativas y la toma de muestra.

Investigador Principal: Mirian Antonia Pariona Canchiz:

Coinvestigadores Bertha Gallardo Jugo, Margarita Velásquez Reinoso

Si tiene alguna pregunta referente a sus derechos como sujeto en un estudio de investigación, debe comunicarse con el presidente del comité de ética del Instituto Nacional de Salud del Niño.

No firme este formulario de consentimiento a no ser que haya tenido la oportunidad de hacer las preguntas y haya recibido las respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y DERECHOS DEL SUJETO A TERMINAR LA PARTICIPACIÓN

Su participación en este estudio es voluntaria. Si usted decide participar se le brinda esta información para que la tenga y se le pedirá que firme este consentimiento informado. Usted puede negarse a participar en este estudio, o una vez en el estudio puede decidir interrumpir su participación en cualquier momento. Usted le informara al responsable del estudio si decide hacerlo. Su decisión de no participar en el estudio o que interrumpa su participación no le afectara en ninguna circunstancia.

Comuníquese con el responsable si decide interrumpir su participación en el estudio. Si decide interrumpir su participación antes de completar el estudio, cualquier información y los datos recogidos antes de su retiro del estudio serán usados.

CONFIDENCIALIDAD Y PRIVACIDAD DE LOS DATOS

El mantenimiento de la confidencialidad es importante para las instituciones participantes. La información personal (por ejemplo genero, edad, diagnostico) y otra información se indicaran por número (es decir: será codificado), su nombre no aparecerá en ninguna de las publicaciones o reportes producidos por este estudio. Esta información estará guardada en un lugar seguro. El comité de ética puede utilizar los registros para revisar la información obtenida y monitorizar el estudio.

Usted puede tomar la decisión de no firmar esta autorización (consentimiento informado), o puede cancelar esta autorización por escrito en cualquier momento. Sin embargo, solo podrá participar en el estudio si usted autoriza el uso y la liberación de la información que se describió anteriormente. Si usted decide no firmar este formulario de autorización/ consentimiento, usted no será enrolado en el estudio. Si

usted firma esta autorización y decide posteriormente revocarla, usted será retirado del estudio en ese momento. La información recogida hasta ese momento será utilizada como datos del estudio, si se considera científicamente apropiado.

NOTIFICACIÓN DE NUEVA INFORMACIÓN

Si durante el curso de este proyecto se dispone de nueva información sobre el estudio (diagnostico, seguimiento, etc) se le proporcionará la nueva información que pudiera afectar su disposición para permanecer en el estudio.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Confirmando que he leído y comprendido la información obtenida en este consentimiento informado. Confirmando que también he tenido la oportunidad de hacer preguntas y he recibido respuestas a mi satisfacción. Conozco bastante al respecto, el propósito, procedimientos, riesgos y beneficios de este estudio de investigación para decidir que mi menor hijo participe en él. Deseo participar en este estudio. Comprendo que mi participación es voluntaria. Comprendo que no he renunciado a ninguno de mis derechos al consentir en este estudio.

Comprendo que he recibido una copia firmada y fechada de este consentimiento para mis archivos.

Autorizo la liberación de los registros médicos a los realizadores del estudio de investigación.

Nombre del apoderado: _____

DNI: _____

Nombre _____ del _____ menor:

Firma del apoderado: _____ Fecha.: ____/____/____

Nombre del testigo: _____

DNI: _____

Firma del testigo: _____ Fecha.: ____/____/____

Nombre de la persona que aplica el consentimiento:

DNI: _____

Firma de la persona que aplica el consentimiento: _____

Fecha.: ____/____/____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Atestigo que yo, o mi representante, discutimos este estudio con la persona arriba mencionada. Esta persona tuvo suficiente tiempo para considerar esta información, tuvo la oportunidad para hacer las preguntas y consintió voluntariamente en participar en este estudio.

Nombre:

Firma : _____ fecha.: ____/____/____

ANEXO Nº 2

FICHA DE DATOS

FECHA:/...../.....

Datos personales y familiares

1.-Nombre del menor:

2.-Fecha de nacimiento ___/___/___

3.-Sexo:

 F M

4.-Edad: ___ años

5.-Dirección:

6.-Reside en el AAHH Puerto Nuevo:

 SI NO

7.- ¿Cuánto tiempo está viviendo en dicha localidad? : _____

8.- Si no reside en AAHH Puerto Nuevo. En que localidad está viviendo? :

9.-Teléfono: _____

10.-Talla (cm): _____ 12.-Percentil NCHS: _____

11.-Peso (Kg): _____ 13.-Percentil NCHS: _____

14.-Nombre del padre:

15.-Edad: ___ años

16.-Dirección:

17.-Reside en el AAHH Puerto Nuevo:

 SI NO

18.-Teléfono: _____

19.-Nombre de la madre:

20.-Edad: ____ años

21.-Dirección:

22.-Reside en el AAHH Puerto Nuevo:

23.-Teléfono: _____

ANEXO N° 3

Prueba no paramétrica Umann Whitney

Determinación de las diferencias de los promedios de los niveles de plomo en sangre y del porcentaje de micronúcleos en ambos grupos de estudio

Rangos

GRUPO		N	Rango promedio	Suma de rangos
DOSAJE DE PLOMO (ug/dL)	CONTROL	40	27,40	1096,00
	RIESGO	40	53,60	2144,00
	TOTAL	80		
MICRONÚCLEOS ‰	CONTROL	40	22,99	919,50
	RIESGO	40	58,01	2320,50
	TOTAL	80		

Estadísticos de contraste ^a

	Dosaje de Plomo (ug/dL)	Micronúcleos ‰
U de Mann Whitney	276,000	99,500
W de Wilcoxon	1,096,000	919,500
Z	-5,043	-6,760
Sig. asintót. (bilateral)	,000	,000

^a Variable de agrupación: GRUPO

ANEXO N° 4

Prueba de Correlación no paramétrica de Spearman

Determinación de la correlación entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre y el porcentaje de micronúcleos en la población total.

			Dosaje de plomo (ug/dL)	Micronúcleos %
Rho de Spearman	DOSAJE DE PLOMO (ug/dL)	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)	1,000	,658**
		N	80	80
	MICRONÚCLEOS %	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)	,658**	1,000
		N	80	80

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

ANEXO N° 5

Prueba de Correlación no paramétrica de Spearman

Determinación de la correlación entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre y el porcentaje de micronúcleos en el grupo control.

			Dosaje de plomo (ug/dL)	Micronúcleos %
Rho de Spearman	DOSAJE DE PLOMO (ug/dL)	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)	1,000	,763**
		N	40	40
	MICRONÚCLEOS %	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral)	,763**	1,000
		N	40	40

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

ANEXO N° 6

Prueba de Correlación no paramétrica de Spearman

Determinación de la correlación entre el dosaje de los niveles de plomo en sangre y el porcentaje de micronúcleos en el grupo de riesgo.

			Dosaje de plomo (ug/dL)	Micronúcleos ‰
Rho de Spearman	DOSAJE DE PLOMO (ug/dL)	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	1,000 40	-,068 40 ,675
	MICRONÚCLEOS ‰	Coefficiente de correlación Sig. (bilateral) N	-,068 40 ,675	1,000 40

ANEXO N° 7

Prueba de Correlación no paramétrica de Spearman

Determinación de la correlación entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en la población total.

			Micronúcleos %	Edad (Años)
Rho de Spearman	MICRONÚCLEOS %	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral)	1,000	,255*
		N	80	80
	EDAD (Años)	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral)	,255* ,022	1,000
		N	80	80

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral)

ANEXO N° 8

Prueba de Correlación no paramétrica de Spearman

Determinación de la correlación entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo control.

			Micronúcleos %	Edad (Años)
Rho de Spearman	MICRONÚCLEOS %	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral)	1,000	,154 ,342
		N	40	40
	EDAD (Años)	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral)	,154 ,342	1,000
		N	40	40

ANEXO N° 9

Prueba de Correlación no paramétrica de Spearman

Determinación de la correlación entre el porcentaje de micronúcleos y la edad en el grupo de riesgo.

			Micronúcleos %	Edad (Años)
Rho de Spearman	MICRONÚCLEOS %	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral) N	1,000 38	,669** ,000 38
	EDAD (Años)	Coeficiente de correlación Sig. (bilateral) N	,699** ,000 38	1,000 38

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)