



Universidad  
**Norbert Wiener**

Powered by **Arizona State University**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA ACADÉMICO DE TECNOLOGÍA MÉDICA EN**  
**LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**Trabajo Académico**

Relación entre exposición a pesticidas y recuento de reticulocitos  
micronucleados en sangre periférica: un estudio mediante la citometría  
espectral, Huancavelica 2025

**Para optar el Título de**  
Especialista en Hematología

**Presentado por:**

**Autora:** Areste Castro, Jheydy Shomara


**Código ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4795-232X>

**Asesor:** Dr. Rosales Rimache, Jaime Alonso

**Código ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1665-2332>

**Lima – Perú**

**2025**

 Universidad Norbert Wiener	<b>DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN</b>		
	<b>CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033</b>	<b>VERSIÓN: 01</b> REVISIÓN: 01	<b>FECHA: 08/11/2022</b>

Yo, Jheydy Shomara Areste Castro egresado de la Escuela de Posgrado de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo académico en el formato de proyecto de investigación “Relación entre exposición a pesticidas y recuento de reticulocitos micronucleados en sangre periférica: un estudio mediante la Citometría Espectral, Huancavelica 2025”. Asesorado por el docente: Jaime Rosales Limache DNI 41111704 ORCID <https://orcid.org/0000-0002-1665-2332> tiene un índice de similitud de (15) (quince) % con código oid:14912:463053244 verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....  
 Firma de autor  
 Jheydy Shomara Areste Castro  
 DNI: 70388077



.....  
 Firma  
 Jaime Rosales Limache  
 DNI: 41111704

Lima, 05 de marzo de 2025

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Formulación del problema.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Objetivos de la investigación .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Justificación de la investigación .....</b>	<b>6</b>
<i>1.4.1 Justificación teórica.....</i>	<i>6</i>
<i>1.4.2 Justificación metodológica .....</i>	<i>7</i>
<i>1.4.3 Justificación social .....</i>	<i>7</i>
<b>1.5 Limitaciones del estudio.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Delimitaciones de la investigación.....</b>	<b>8</b>
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Antecedentes .....</b>	<b>10</b>
<i>2.1.1 Internacionales .....</i>	<i>10</i>
<i>2.1.2 Nacionales .....</i>	<i>12</i>
<b>2.2 Bases teóricas .....</b>	<b>13</b>
<i>2.2.1 Hematopoyesis .....</i>	<i>13</i>
<i>2.2.2 Eritropoyesis:.....</i>	<i>14</i>
<i>2.2.3 Daño citogenético .....</i>	<i>17</i>
<i>2.2.4 Daño celular .....</i>	<i>18</i>
<i>2.2.5 Micronúcleos: .....</i>	<i>19</i>
<i>2.2.6 Enfermedades oncohematológicas .....</i>	<i>23</i>
<i>2.2.7 Citometría espectral .....</i>	<i>24</i>

2.2.8 Selección de panel celular .....	27
<b>2.3 Formulación de hipótesis .....</b>	<b>29</b>
2.3.1 hipótesis general .....	29
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Método de la investigación.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Enfoque de la investigación .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Tipo de la investigación .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Diseño de la investigación .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Población, muestra y muestreo.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5.1 Población .....</b>	<b>31</b>
3.5.2 Muestra .....	32
3.5.3 Muestreo .....	32
<b>3.6 Variables y operacionalización.....</b>	<b>32</b>
3.6.1 Definición conceptual de variables .....	32
3.6.2 Operacionalización de variables .....	34
<b>3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....</b>	<b>35</b>
3.7.1 Técnicas .....	35
3.7.2 Descripción de instrumentos .....	35
3.7.3 Validación.....	36
3.7.4 Confiabilidad .....	36
<b>3.8 Plan de procesamiento y análisis de datos.....</b>	<b>36</b>
<b>3.9 Aspectos éticos .....</b>	<b>37</b>

<b>CAPÍTULO IV: ASPECTOS ADMINISTRATIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Cronograma de actividades .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Presupuesto .....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO .....</b>	<b>48</b>
<b>I. INFORMACIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>II. DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO .....</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO 2: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....</b>	<b>51</b>

## CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

### 1.1 Planteamiento del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) evalúa que hasta el 2022 se presentaron 20 millones de nuevos casos de cáncer y cerca de 10 millones ocasionaron la muerte de las personas y en base al Observatorio Mundial del Cáncer del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC); el cáncer de Pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal y el cáncer de próstata fueron los tipos de cáncer con más frecuencia a nivel mundial (1).

La situación del cáncer en Perú según en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), constituye un importante problema de salud por la alta tasa de mortalidad y discapacidades. Hasta la fecha se observa un incremento de los casos nuevos de cáncer en el Perú, donde prima el cáncer de próstata, mama, colorrectal, de pulmón, entre otros (2). El cáncer de tipo ocupacional es aquel que se desencadena por la exposición inadecuada y/o prolongada a una o varias sustancias cancerígenas, sea físico, químico, biológico y/o ambientales durante el entorno laboral (3). El grado y la complejidad del daño celular está directamente relacionado con el nivel de exposición que tienen a estas sustancias cancerígenas.

El daño citogenético es una alteración al ácido desoxirribonucleico (ADN) provocada por diferentes agentes genotóxicos (4). El daño que ocasiona la exposición a los agentes citotóxicos podría transmitirse a las descendencias y ser posible factor cancerígeno (5). En lo habitual, posterior a una alteración o daño a la cadena del ADN, las enzimas que están encargadas de la reparación del ADN actúan de forma inmediata y repara el daño causado (6). A pesar de que las células tienen la útil capacidad de reparar el daño causado por los agentes genotóxicos, estos no son infalibles y pueden desestimar el control, y propagarse a las próximas células (7).

Los micronúcleos (MNs) son fracciones de cromosomas o cromosomas completos que de manera espontánea o mediante alguna afectación de agentes genotóxicos, quedan por fuera del núcleo, durante la etapa de división celular (6). La formación de los micronúcleos (MNs) es producto de la exposición a los residuos químicos, tanto en alimentos como en aguas;

desechos químicos, pesticidas, insecticidas, entre otros factores tanto físicos, químicos y biológicos (8). El aumento del número de micronúcleos se debe principalmente a defectos en las proteínas necesarias para la mitosis y sus diversos puntos de control, defectos genéticos en las enzimas que se encargan de reparar el ADN, exposición prolongada a sustancias o productos carcinógenos como las radiaciones ionizantes, agroquímicos, genotóxicas endógenas, entre otros (9).

Actualmente nos encontramos inmersos y expuestos a diferentes genotóxicos presentes en el medio ambiente y más aún en situaciones de exposición poco controlada o por desconocimiento del daño que podría ocasionar. El cáncer ocupacional se produce por una exposición descontrolada y prolongada a sustancias carcinogénicas que pueden ser físicas, químicas, biológicas, ambientales, entre otras (3). Es importante identificar el riesgo de la exposición de nuestra población de estudio a los diferentes genotóxicos por circunstancias ambientales o estilos de vida, ya que el 22% de la población peruana pertenece al grupo agropecuario, que sustenta su producción para el propio consumo o para abastecer la demanda nacional o internacional (10). Según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI) el sector informal en Perú aporta un poco más del 90% de la producción de actividades agropecuarias y pesca, resalta también que la informalidad laboral en el sector rural es más alta que la urbana, el departamento con más alta tasa de informalidad es Huancavelica, seguida de Ayacucho, Cajamarca, entre otros departamentos que se dedican exclusivamente a las actividades agropecuarias (11).

Se presenta la necesidad de innovar en pruebas que de manera eficiente, accesible, sensible, específica y rápida pueda determinar la correlación entre el tiempo de exposición y el riesgo a la salud de las sustancias genotóxicas (12). La prueba de micronúcleos en humanos es una herramienta muy importante y sencilla que ayuda a identificar el inicio y la progresión de enfermedades en las diferentes etapas de la vida (13). En el Perú existen pocos estudios relacionados a la detección de micronúcleos para identificar cualquier daño genético, peor aún con el uso de la Citometría espectral, por ello que en este trabajo busca evaluar la relación entre la identificación de reticulocitos micronucleados, daño citogenético y tiempo de exposición al agente citotóxico en agricultores de Huancavelica durante el año 2025.

## **1.2 Formulación del problema**

### **1.2.1 Problema general**

¿Cuál es la relación entre la exposición a pesticidas y recuento reticulocitos micronucleados en sangre periférica mediante el uso de la citometría espectral, Huancavelica 2025?

## **1.3 Objetivos de la investigación**

### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar la relación entre la exposición a pesticidas y recuento reticulocitos micronucleados en sangre periférica mediante el uso de la citometría espectral, Huancavelica 2025.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Identificar la relación entre la exposición a pesticidas y recuento reticulocitos micronucleados en sangre periférica mediante el uso de la citometría espectral
- Comparar el recuento de reticulocitos micronucleados en sangre periférica en agricultores en función al tiempo de exposición.

## **1.4 Justificación de la investigación**

### **1.4.1 Justificación teórica**

La agricultura es una de las actividades más importantes para solventar la economía y la seguridad alimentaria en las regiones como Huancavelica. Sin embargo, el uso indiscriminado, desinformado y descontrolado de pesticidas por los agricultores de la región viene generando preocupación sobre los impactos en la salud de los seres vivos y del medio ambiente. Estudios revisados demuestran que el uso de pesticidas tiene efectos adversos en la salud humana, conllevando a la generación del cáncer, enfermedades en el sistema nervioso o que afecten directamente al sistema reproductivo. Así como también, los pesticidas, importante producto utilizado en la agricultura, contamina el aire, el suelo y el agua y afecta directamente a la variedad biológica y la calidad del medio ambiente.

Sin embargo, a pesar del riesgo de la situación actual, no hay estudios, investigaciones o suficiente información acerca del uso de pesticidas y su impacto perjudicial en la salud a

nivel nacional y peor aún en regiones como Huancavelica, Ayacucho, Cajamarca y Cerro de Pasco, regiones olvidadas y marginadas por años por el gobierno central. Por ello, se considera de gran importancia la realización de este trabajo de investigación que aborde el tema y proporcione información para generar consciencia en la población sobre el efecto dañino que tienen estas sustancias.

Este trabajo tiene el objetivo de evaluar la relación entre la exposición a pesticidas y recuento reticulocitos micronucleados en sangre periférica mediante el uso de la citometría espectral en agricultores de la región Huancavelica durante el año 2025, con ello aportar en la generación de conocimientos de la aplicación de las nuevas tecnologías como lo es la citometría de flujo en la detección oportuna, eficaz, altamente sensible y específica de enfermedades con el cáncer. Los resultados del presente estudio serán de gran importancia en la salud pública, que puede tener implicancia en las disposiciones y decisiones prácticas en la gestión de la agricultura en Huancavelica y el Perú. Así mismo, siendo uno de los primeros estudios de esta magnitud, ser de estudio base para los próximos proyectos de investigación.

#### **1.4.2 Justificación metodológica**

La citometría de flujo (CF) es una técnica poco estudiada y conocida en el Perú, por ello mediante la elaboración de este estudio se permitirá conocer más la innovación y el alcance de esta técnica que permitirá desarrollo en muchas especialidades de la salud, no solo en la hematología que ya está grandemente estudiada en otros países, sino como también en Banco de Sangre, Microbiología y demás áreas que sigan buscando el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías eficientes.

#### **1.4.3 Justificación social**

El cáncer, una de las enfermedades más temidas a nivel mundial y las que más muertes produce en el mundo, sin embargo, este problema se incrementa por la falta de un diagnóstico oportuno, por la dificultad económica de la población. El desarrollo y la validación de nuevos biomarcadores que permitan el diagnóstico clínico anticipado del cáncer es una de las principales estrategias que actualmente se deben promover y desarrollar. Con ello, este proyecto busca desarrollar la detección inicial de las enfermedades oncológicas mediante la

aplicación de la citometría de flujo, como metodología accesible y altamente sensible en la detección de estas enfermedades, dando paso a un tratamiento oportuno y eficaz.

### **1.5 Limitaciones del estudio**

Las limitaciones presentadas durante la elaboración de este trabajo de investigación se detallan a continuación:

- Dificultad al acceso a la población, debido al desconocimiento y la existencia de mitos de la salud en la población.
- Restricciones en el tiempo y recursos debido a la lejanía de la zona de toma de muestra y área de proceso de estas.
- Poca cantidad de reticulocitos circulantes en sangre periférica de los participantes.
- Eliminación de los reticulocitos micronucleados durante su paso por el bazo.

### **1.6 Delimitaciones de la investigación**

El estudio tendrá una muestra poblacional de 377 personas, las muestras serán tomadas en abril y mayo del 2025 en aquellas personas que asistan al Hospital de Pampas Tayacaja y firmen el consentimiento informado que se les brindará previa explicación breve y detallada sobre su participación en el trabajo de investigación.

Las muestras biológicas serán trasladadas a Lima, al laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), aplicando las condiciones pre analíticas necesarias según la Norma técnica de salud sobre preparación, embalaje y documentación para el transporte seguro de sustancias infecciosas de MINSA (14). Y serán procesadas en el laboratorio utilizando el citómetro de flujo espectral Cytek® Northern Lights™ 3000 (15), el análisis de las muestras serán mediante el software SpectroFlo®, y la correlación de las variables mediante el uso estadístico del Coeficiente de Correlación de Pearson.

#### **1.6.1 Temporal**

El presente estudio será realizado entre mayo y agosto del año 2025, la toma de muestra y recopilación de los datos se realizará durante el mes de mayo, las demás actividades se pueden observar de manera esquematizada en el apartado de cronograma.

### **1.6.2 Espacial**

En el presente estudio se trabajará con las muestras de agricultores de la región Huancavelica, provincia Pampas-Tayacaja y el procesamiento, análisis de resultados y correlación de variables en el laboratorio de investigación de la UNMSM, Lima - Perú.

### **1.6.3 Recursos**

EL estudio de investigación será realizado compuesto por el investigador principal y 1 asistente de investigación. Se requerirá la colaboración de 400 participantes para el estudio. El procesamiento de las muestras se efectuará en el laboratorio de investigación de la Facultad de Tecnología Médica de la UNMSM, haciendo uso del citómetro de flujo espectral Cytex® Northern Lights™ 3000 y equipos necesarios. El presupuesto planteado para el estudio es de 23790.50 soles, que se financiará a través de obtención de financiación de Concytec – ProCiencia. El estudio será realizado durante los meses de mayo y agosto del 2025, con un cronograma establecido en base a las necesidades del estudio.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Antecedentes**

#### **2.1.1 Internacionales**

En el estudio de Smith-Roe S. et al Estados Unidos 2022, demuestra la posible hepatotoxicidad del cohosh negro (BC), que es usado como suplemento dietético usado por mujeres para mejorar los síntomas ginecológicos. Según informes de la División del Programa Nacional de Toxicología, se evaluó el efecto de BC en ratas, en los cuales se observó un incremento de eritrocitos micronucleados en sangre periférica. En base a estos resultados se realizó el estudio transversal piloto en donde hubo una comparación entre la frecuencia de micronúcleos y demás estudios en mujeres que usaron BC y las que no usaron BC. Se analizaron a 23 mujeres expuestas al BC y 28 sin exposición al BC. Los hallazgos observados no mostraron aumentos en las frecuencias de micronúcleos y no hubo anomalías hematológicas en mujeres que usaron el BC. Sin embargo, en este estudio se sugiere realizar estudios prospectivos con menos factores que pueden generar confusión en la utilización de los productos de BC y así aumentar la confianza de los resultados (16).

Yiyi Ch. et al, China - 2021, en su estudio emplea la citometría de flujo para desarrollar un nuevo protocolo novedosos y práctico para la determinación de micronúcleos en sangre de rata. En este estudio se usó el marcador CD71-fluoroscéina y DRAQ5 para la tinción de proteínas y ADN, respectivamente. Para validar el procedimiento se estudió en ratas macho Sprague-Dawley, que fueron administrados con sustancias químicas mutágenos: metanosulfato de etilo (EMS), ciclofosfamida (CP), colchicina (COL) y etil nitrosourea (ENU) y dos sustancias no genotóxicas: sodio sacarina y eugenol. Se obtiene muestras de sangre periférica antes y durante los 5 días después de cada dosis de administración del tratamiento, los cuales fueron analizados para la detección de micronúcleos de manera manual y mediante el uso de citometría de flujo. En este estudio la citometría de flujo demostró ser de alta sensibilidad para la detección de micronúcleos en la detección de todas las concentraciones de las sustancias mutagénicas. Los resultados que se obtuvieron demostraron que hay correlación en la frecuencia de micronúcleos y la proporción de eritrocitos inmaduros. Concluyendo así que el estudio realizado para la determinación de

MNS mediante la citometría de flujo, basado en la doble tinción CD71-FITC y DRAQ5, es de operación simple (17).

Mientras que Lina B. et al en el año 2018 en Bogotá Colombia, asumió el objetivo de estandarizar parámetros de la citometría de flujo para la selección y cuantificación de reticulocitos micronucleados (RET-MNs) en sangre periférica como medida de inestabilidad citogenética en población sana y población recién diagnosticados con gliomas de alto grado antes de su inicio de tratamiento. Los materiales usados fueron anticuerpos tipo CD71, CD61 y Yoduro de propidio, para lo cual mediante el uso del “*citómetro de flujo tipo FACS Canto II™*”, se encontró un incremento de 5.2 veces más en los pacientes con gliomas recién diagnosticados en comparación de la población control en relación a los niveles de reticulocitos micronucleados, llegando a la conclusión que el citómetro de flujo ofrece una gran utilidad en la determinación de las células RET-MN o RETCD71+, como indicador de inestabilidad cromosómica *in vivo* (18).

Arnoldo A. M. et al, Argentina - 2018, en su estudio demuestra la relación entre el ser humano y el felino doméstico por las diferentes condiciones que comparten, por lo que sería un buen indicador de monitoreo de los ambientes domesticos. El objetivo de este estudio fue aplicar el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de los gatos domésticos y realizar la evaluación mediante la coloración Giemsa y naranja de acridina (NA) fluorescente realizados de manera secuencial y así poder identificar cuál es el mejor método para la identificación de MNS. Se evaluó a 24 gatos domésticos con enfermedad y sin enfermedad alguna. En los resultados se mostraron que la frecuencia de micronúcleos detectadas con naranja de acridina fue de 2 a 10 veces mejor que las detectadas con Giemsa ( $p < 0.0001$ ), además se resaltó que la coloración con naranja de acridina permitió la identificación de MNs de menor tamaño en comparación al Giemsa. Además propone la utilización del gato doméstico para evidenciar posibles efectos genotóxicos del ambiente (19).

En el año 2011 Bowen D. et al. en Reino Unido, realizaron una evaluación de los micronúcleos en médula ósea y sangre periférica, mediante la citometría de flujo. Además, se realiza el ensayo cometa para evaluar la ruptura de las cadenas de ADN. Los materiales que se usaron fueron: sustancias químicas como acetilfluoreno, dimetiltrosamina, metanosulfonado, carbendazina, quinona, entre otros, cada uno administrados en dosis

variados. El estudio ha sido realizado en ratas macho adultas de las cepas Han-Wistar, que fueron evaluadas clínicamente de manera diaria. La obtención de los tejidos se realizó tres horas después de la administración de la dosis final, se extrajeron el hígado, estómago, MO y sangre periférica. El análisis de los micronúcleos de sangre periférica se realizó mediante la citometría de flujo de alta velocidad (FACSCanto II software versión 6.1.1), el ADN se tiñó con yoduro de propidio (IP) y el anticuerpo CD71-FITC para evaluar a los reticulocitos. Se analizaron al menos 20000 células y los resultados se analizaron mediante el análisis estadístico chi-cuadrado, la corrección de Bonferroni y la prueba de Terpstra-Jonckheere. Los resultados que se obtuvieron en la prueba de micronúcleos en sangre periférica, fueron: con un intervalo de confianza del 95%, mostraron que los animales que fueron intoxicados con quinona (MMC) un porcentaje de reticulocitos micronucleados, en comparación con las demás, concluyendo así que estos productos son genotóxicos y carcinogénicos que se puede evaluar mediante la observación de micronúcleos en reticulocitos, sin embargo, recomiendan que se haga una evaluación más profunda evaluando MN en MO y SP de manera conjunta (20).

### **2.1.2 Nacionales**

Quiñones M. et al, en el estudio realizado en Trujillo - 2022, evaluó los posibles efectos mutagénicos de la ranitidina sobre el material genético en eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC) en 4 grupos de ratas albinas de la cepa Holtzman por medio del test de micronúcleos. El grupo negativo fue tratado con suero fisiológicos y el control positivo con ciclofosfamida y dos grupos tratados con ranitidina. Posteriormente las ratas se sometieron a eutanasia y se prepararon material citológico teñidas con Giemsa al 5% por 30 minutos. Los resultados presentados mostraron un aumento en el tamaño y número de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos micronucleados de  $285 \pm 10$  de los grupos experimentales con una dosis de 4 mg/kg y el índice de genotoxicidad de la ranitidina fue tres veces mayor en los grupos experimentales en relación al control negativo. Concluyendo así que la ranitidina provoca un estímulo genotóxico de manera creciente con presencia incrementada de micronúcleos en EPC de las ratas Holtzman (21).

## 2.2 Bases teóricas

### 2.2.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis es proceso de producción y maduración de las células sanguíneas, como hematíes, leucocitos y plaquetas, que ocurre principalmente en la Médula Ósea (MO). Estas células poseen una vida media corta, motivo por el cual la MO se encarga del proceso de renovación constante de las células, acorde a la necesidad del organismo. Este proceso se da inicio desde que la célula madre pluripotencial, la cual es capaz de proliferar, replicar y diferenciarse de manera continua, mediante las respuestas a citoquinas o factores de crecimiento, se podrá diferenciar en la línea mieloide o linfoide sin perder la capacidad pluripotente. Mientras que la célula madre se diferencia en línea linfoide genera a las células pre B o pre T, la célula madre mieloide genera a una célula madre intermedia, CFU-EMM (unidad formadora de colonias-granulocito, eritrocito, monocito, megacariocito), la cual mediante a las respuestas a citoquinas o factores de crecimiento específicas se diferencian en el linaje eritroide, megacariocito, mieloide, eosinófilo, basófilo o monocítico (22).

La célula madre pluripotente mieloide da lugar a las unidades formadoras de colonias (CFU), actualmente se conocen las siguientes: CFU-E, para la línea eritroide; CFC-G, CFC-GM y CFC-M para la línea granulocítica-monocítica ; CFC-Eo, para la eosinofílica, CFC-Ba, para la línea basofílica; CFC-Meg para la megacariocítica. Entonces, para que permita el proceso efectivo de la hematopoyesis deben intervenir diferentes factores como la presencia del microambiente hematopoyético, células hematopoyéticas, factores de crecimiento y la matriz extracelular que constantemente interactúan para determinar la función celular (23). Dentro de los principales factores de crecimiento que participan en la diferenciación y proliferación celular encontramos a la eritropoyetina (EPO), la trombopoyetina (TPO), los factores estimulantes de colonias (FEC) y las interleucinas (IL) (22) (Figura 1).

# Hematopoyesis

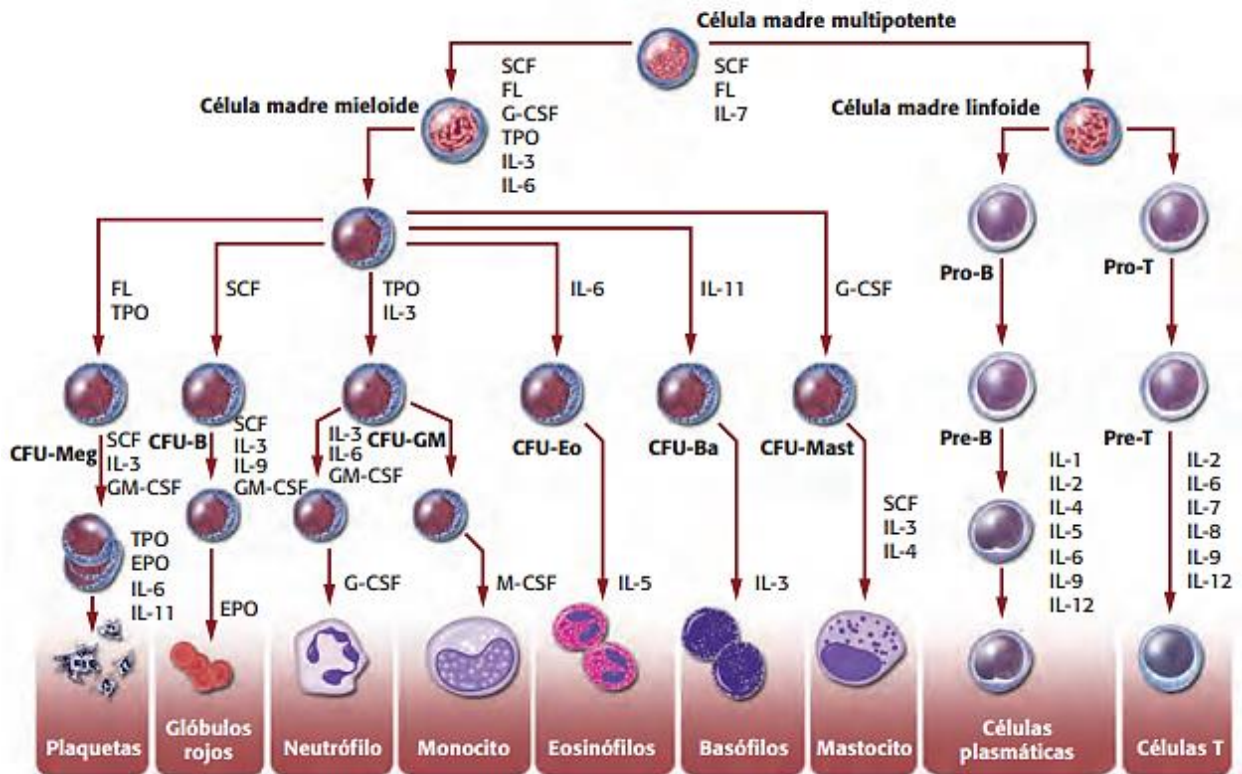


Figura 1: Esquema de la hematopoyesis y lugares de actuación de los factores de crecimiento más importantes. (Tomado de Moraleda J. 2017) (24).

## 2.2.2 Eritropoyesis:

La eritropoyesis es un proceso de formación y maduración de los hematíes, cuyo objetivo principal es mantener un número constante de eritrocitos en la sangre que aseguren las necesidades de oxígeno de los diferentes tejidos del cuerpo. La Eritropoyetina, es la principal hormona que regula la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides hasta su diferenciación en eritrocitos circulantes en la sangre periférica. Es producida principalmente en los riñones y en pequeña cantidad en el hígado. Tiene como función estimular la generación de colonias eritroides (BFU-E y CFU-E), mediante su acción en los progenitores eritroides de la MO, el bazo y el hígado fetal (23).

La primera célula progenitora alineada con la serie eritroide es la BFU-E (del inglés *burst forming unit-erythroid*), que da origen a la CFU-E (del inglés *colony forming unit-erythroid*). Las BFU-E, contienen en su membrana a los antígenos como el CD34, CD33, CD133 y

receptores para la IL-3 y el GM-CSF, mientras que la CFU-E expresa a los receptores para la EPO en gran cantidad, la transferrina (CD71) y la glicoforina A. La maduración de la Unidad formadora de colonias eritroide o CFU-E, genera al proeritroblasto el cual es el primer precursor que se puede reconocer a nivel morfológica. Los siguientes estadios en la maduración eritroides son el eritroblasto basófilo, eritroblasto policromatófilo, eritroblasto ortocromático, reticulocito para finalmente llegar a ser un hematíe o eritrocito. Durante el proceso de maduración de un proeritroblasto a un hematíe maduro, se producen 45 divisiones continuas, en las cuales el citoplasma va madurando a medida que expulsa el núcleo de la célula. Paralelamente a la maduración citoplasmática se la maduración nuclear, en el cual a medida que la maduración continúa, la cromatina, inicialmente dispersa e inmadura pueden contener nucleolos, madura, se condensa y se hace más basófila, hasta finalmente ser expulsado de la célula, formándose así al hematíe (24) (Figura 2).

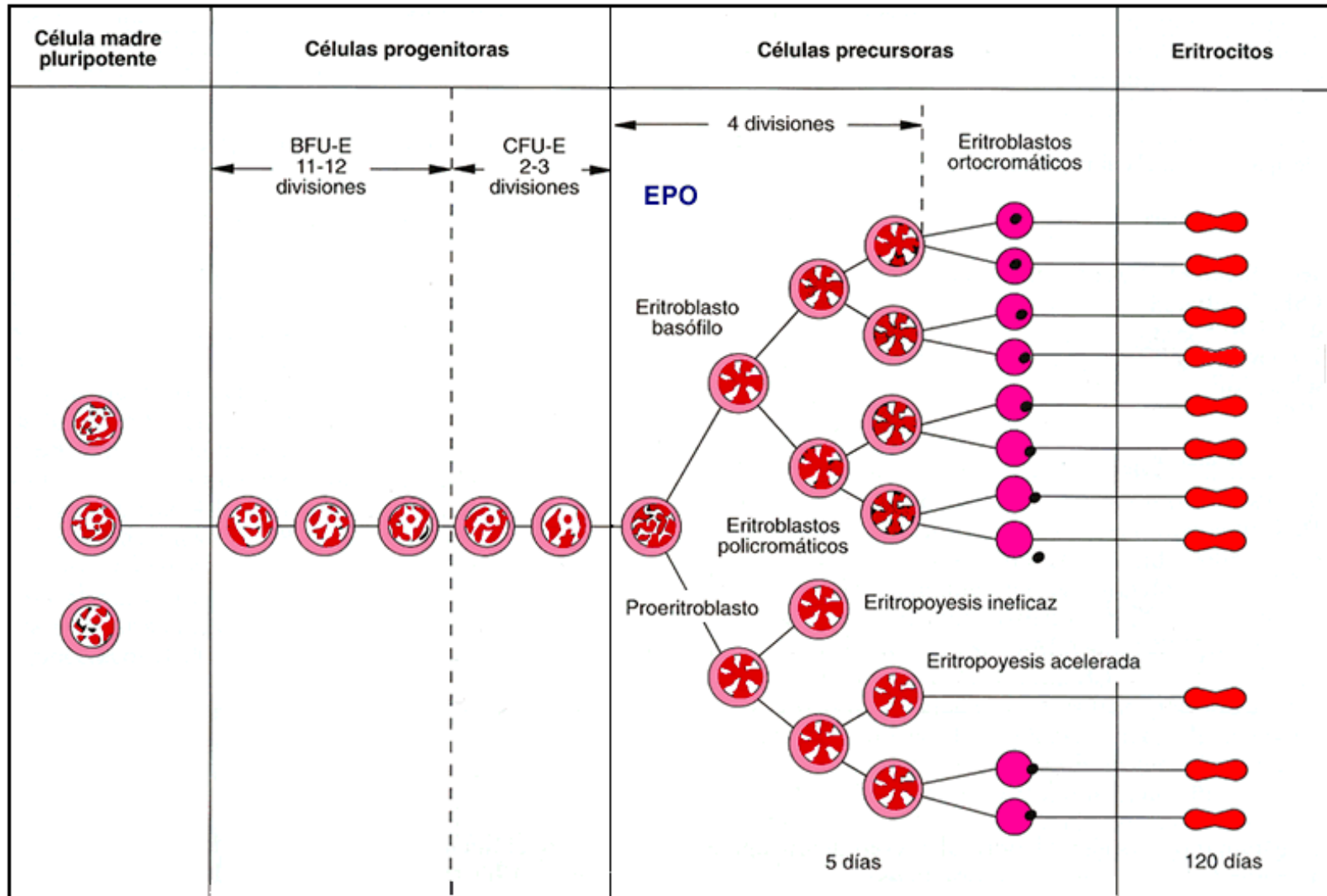


Figura 2: Esquema del proceso de la eritropoyesis. (Tomado de Gonzales A. 2016) (25).

### 2.2.3 Daño citogenético

Existen muchos factores que pueden influir de manera directa en la muerte celular, como son los físicos, químicos, biológicos y ambientales (12). Sin embargo, existe otros factores que no matan a las células pero si dañan su material genético, a estos se les denomina genotoxinas (12). Debido a la inestabilidad cromosómica causada los genotóxicos se originan fragmentos de cromosomas o cromosomas intactos no incluidos en la división celular, originando así a los denominados micronúcleos (13). Aunque actualmente haya diferentes maneras que de manera efectiva reparan el daño del ADN, pero a veces fallan, lo que causa la transferencia del material genético daño a las células de las siguientes generaciones (12). Las principales razones por las que se genera los denominados micronúcleos son por la falta de un centrómero funcional, falta de fragmentos de cromosomas, falta de cromosomas completos o presencia de algún defecto de una o varias proteínas que participan en el sistema mitótico. Como consecuencia a ello se genera una deficiente división celular porque o se logra segregar de manera completa o equivalente los cromosomas a cada célula hija (13). Actuales investigaciones demuestran que los cromosomas que quedan atrapados en micronúcleos pueden sufrir una alta tasa de fragmentación y se puede reorganizar de manera masiva; además, se señala que hay una posibilidad de que la formación de los micronúcleos no solo sea un biomarcador de daño citogenético sino también un mecanismo que puede generar una hipermutación en las células hijas (13).

Actualmente nos encontramos inmersos y expuestos a diferentes genotóxicos presentes en el medio ambiente y más aún en situaciones en las que nos exponemos a estos de manera poco controlada o a veces por desconocimiento del daño que podría ocasionar. Por ello la necesidad de pruebas que de manera eficiente, accesible, sensible, específica y de manera rápida pueda determinar el nivel de exposición y el riesgo a la salud que este podría traer (12).

Existen diferentes pruebas que ayudan a determinar la genotoxicidad in vivo o in vitro (12). Dentro de ellas la prueba de micronúcleos es la más popular y sencilla para determinar la genotoxicidad in vitro, así como también se encuentran dentro de los marcadores de daño del ADN y cromosómicos más estudiados (12, 13). Sin embargo, cabe resaltar que el concepto de micronúcleos abarca diferentes técnicas que se puede utilizar en situaciones específicas (12). Se han desarrollado, por ejemplo ensayos para medir micronúcleos en linfocitos,

glóbulos rojos de sangre periférica y de varios tipos de células epiteliales, tales como: bucales, nasales, uroteliales y cervicales (13).

Los ensayos de micronúcleos en humanos se han desarrollado con el propósito de investigar daños genotóxicos de los factores ambientales, estilos de vida, ocupacionales, situaciones adversas, observar la susceptibilidad genética al daño del material genético, para determinar el riesgo de envejecimiento acelerado y aquellas enfermedades afectadas por la inestabilidad genética como defectos del desarrollo e incluso el tan temido cáncer (13).

#### **2.2.4 Daño celular**

Las células están en constante amenaza debido a la existencia de los efectos citotóxicos y mutagénicos que afectan en gran medida al ADN. Estos agentes pueden ser formados dentro de las células o pueden ser exógenos. Los principales agentes exógenos que afectan a las células son por ejemplo la luz ultravioleta, la radiación ionizante, las sustancias químicas que están presentes en alimentos y/o transportados por el aire y el agua (26). Mientras que los agentes endógenos son las especies metilantes y las especies reactivas de oxígeno (ERO), que son producto de la respiración celular (27).

El primer cambio que se produce a nivel celular es la mutación producida por la interacción de la sustancia cancerígena con el ADN, conocida como iniciación. La promoción es la segunda etapa en donde se produce el cambio de las células en tumorales, éstas se multiplican en clones e invaden el organismo mediante la metástasis (3). Los efectos que se ocasionan van desde la mortalidad temprana, disminución en el éxito reproductivo, entre otros, ocasionando malestar en el bienestar físico, mental y social (5, 28).

Existen diversas respuestas celulares posterior al daño del ADN, los mecanismos de reparación del ADN, los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis, son los principales mecanismos en el que la célula reacciona frente a un daño celular que podría conllevar a diversas afecciones (26). Los mecanismos principales de reparación del ADN son la reparación por escisión de base, donde se corrige el daño del ADN causados por la oxidación, desaminación y/o alquilación. Se produce de manera diaria, mediante el cual la enzima ADN glicosilada detecta y elimina a una base de ADN anormales, se elimina el vacío y completando la base con el nucleótido complementario de la cadena, para finalmente una ligasa sella la rotura que quede (29). Este tipo de reparación es útil para que las células

mantengan su función e identidad genética. La reparación de roturas de doble cadena de ADN se da por 3 mecanismos principales, la unión de extremos no homólogos, la recombinación homóloga y la unión de extremos mediada por microhomología; la elección de la vía de reparación más adecuada está mediada por diversos factores que interactúan con la finalidad que se produzca la eliminación del daño al ADN. Las rupturas de la doble cadena de ADN y la no reparación de esta puede conllevar a la generación del cáncer (26, 29).

La reparación del ADN es un aspecto importante en el mantenimiento del material genético independientemente de si las células proliferan o no. La falta de finalización de la reparación celular antes de la replicación o segregación cromosómica conlleva a la fijación de mutaciones en el genoma o un daño del material genético irreparable. Con esto los mecanismos de punto de control generan un retraso en el ciclo celular en la fase G1, G2 o S, para que se elimine el daño al ADN. Además, de estas funciones inhibitorias del ciclo celular, muchos componentes de puntos de control tienen funciones en la activación de la reparación del ADN, el mantenimiento de los telómeros, el metabolismo de los nucleótidos o la inducción programada de la muerte celular. Uno de los principales puntos de control en las células de tipo eucariotas son el P53, que detiene al ciclo celular en la fase G1 para que se produzca la reparación del ADN (26).

### **2.2.5 Micronúcleos:**

Los micronúcleos son fracciones de cromosoma o cromosomas completos que de manera espontánea o por alguna afectación de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo, durante la etapa de división celular (6). La formación de los micronúcleos (MNs) es producto de la exposición a los residuos químicos, tanto en alimentos como en aguas; desechos químicos, pesticidas, insecticidas, entre otros factores tanto físicos, químicos y biológicos (8). El aumento del número de micronúcleos se debe principalmente a defectos en las proteínas necesarias para la mitosis y sus diversos puntos de control, defectos genéticos en las enzimas que se encargan de reparar el ADN, exposición prolongada a sustancias o productos carcinógenos como las radiaciones ionizantes, agroquímicos, genotóxicas endógenas, entre otros (9).

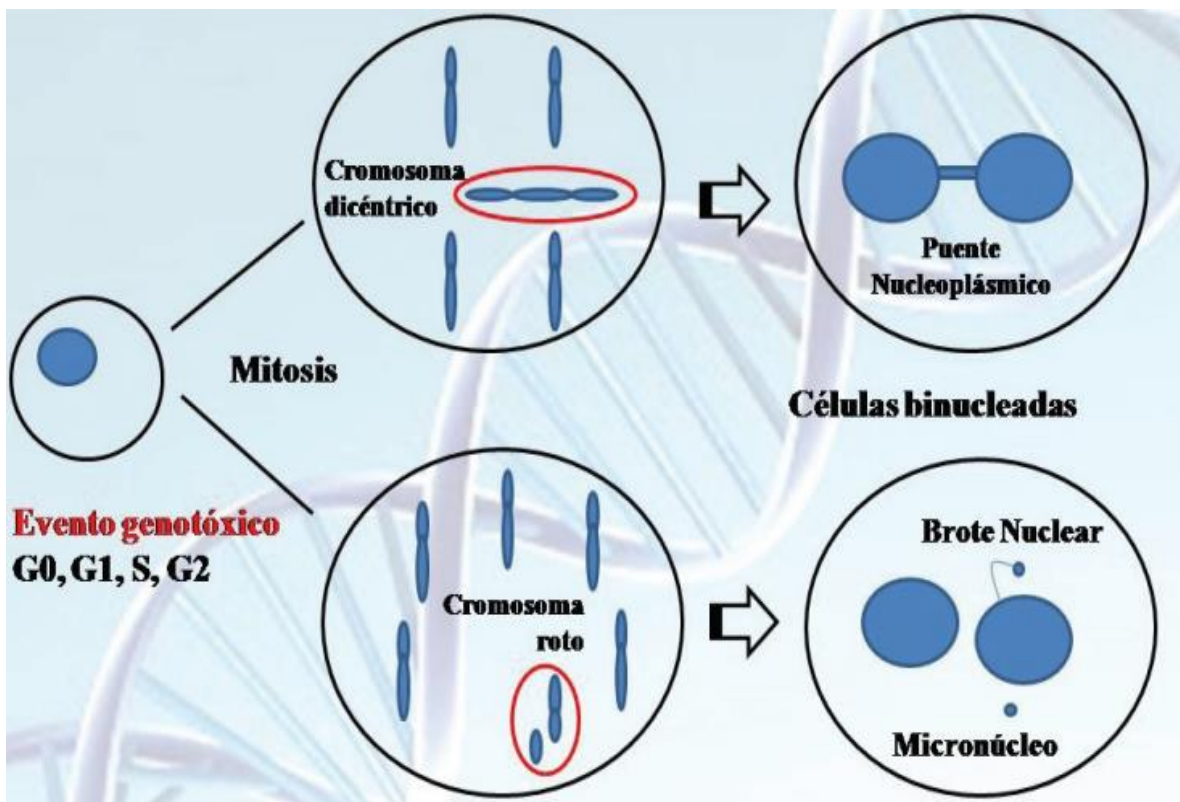


Figura 3: Diagrama de evento genotóxico: Micronúcleos, Puentes nucleoplásmicos y Brotes nucleares. Modificado de Fenech. 2016. 4. (30)

Los micronúcleos (MNs) son pequeños cuerpos de cromatina o restos nucleares cubiertos de membrana que se ubican por fuera del núcleo. Tradicionalmente sirven para evaluar el daño al ADN, debido a que su formación ocasiona pérdida de material genético en las células hijas, siendo partícipe de la formación y desarrollo del cáncer o son el inicio de patologías crónico-degenerativas, principalmente de las autoinmunes. Al ser independiente del núcleo, los MNs sufre modificaciones o alteraciones de la membrana, desincronización del ciclo celular y falla en la reparación del ADN. La membrana de los MNs es proclive a generar rupturas espontáneas y sin la eventual posibilidad de reparación, esto es lo que define el destino del MN y de la célula en la que se encuentre. La fragilidad de la membrana, la ruptura y la subsecuente liberación del DNA al citoplasma es inevitable, hecho importante en las respuestas inmunes aberrantes, muerte celular, senescencia, tumorigénesis y cromosomas aneuploides la que incluye tres fenómenos cromosómicos: cromoplexia (múltiples traslocaciones en varios cromosomas simultáneamente), cromotripsis (múltiples reordenamientos génicos) y cromosomas aneuploides (duplicación del material genético). Una vez formada el MN, en las mitosis

consecutivas, estos pueden permanecer en el citoplasma, ser expulsados o extruidos, ser incorporados en exosomas por la vía autofágica o reintegrarse al genoma del núcleo principal. En el caso de que la célula con MN no sobreviva, no hay problema; sin embargo, si sobrevive, puede continuar con diversos eventos, como persistir y frenar la mitosis, o morir prematuramente; ocasionar la extrusión, al igual que los núcleos eritrocitarios de mamíferos o la degradación; la degradación por medio de la fragmentación apoptótica o la autofagia mediada por enzimas lisosomales; liberación del ADN al medio citoplasmáticos el cual desencadena las vías de señalización para la inflamación, envejecimiento, envejecimiento y la muerte de la célula; por último, si continúa con la mitosis, podría generar la reincorporación del MN al material genético en donde el material quede inactivo, que la célula regule su apoptosis prematura, autofagia o senescencia o que el ADN del MN pase al proceso de la cromosogénesis con lo cual provoca la inestabilidad genómica y caos en el material genético, que inevitablemente conlleva a la malignización de la célula (31).

## Micronúcleos Características

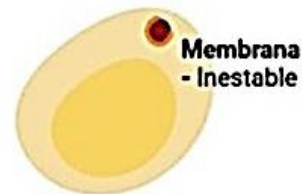
- 1/3 a 1/5 del núcleo
- Membrana
- Inestable, frágil y transporte limitado
- Cromatina mas compactación
- Condensación, replicación y reparación
- Asincrónica y errónea
- Proteosomas activos ausentes
- Cromosomas
- Distribución desigual
- Múltiples reordenamientos
- "Cromotripsis-cromoanagenesis"
- La transcripción
- Limitado a cromosomas enteros o DM
- Expresión génica
- Exclusivo de los MN con lámina

## Origen y Causas

### Origen

- Aneuploidógeno.- Daño al huso mitótico
- Clastógeno- Rompimiento de doble hebra
- Doble minutos- amplificación génica
- Puentes-Rearreglos
- Errores de reparación

### DNA citoplasmático Encendido de la cadena proinflamatoria



### Causas

- Ros
- Factores ambientales
- Contaminación antropogénica
- Drogas
- Patologías
- Estilos de vida

## Subsecuentes Divisiones Destino

### Extrucción

Como en eritrocitos de mamíferos

### Disolución /Enzimática

Apoptosis restringida al MN  
Autofagia-lisosomas

### Reincorporación

- Intacto  
- Cromotripsis-Anagenesis  
- Inestabilidad genómica

### Consecuencia

La célula sobrevive,  
pero con falta  
material genético

### Consecuencia

Célula sobrevive  
- Muerte prematura  
- Senescencia  
- Sin consecuencias  
- Caos genético

Figura 4: Micronúcleos: Origen, causas, destino y consecuencias. (Tomado de Torres O. y Arias L. 2023) (31).

La detección de micronúcleos usando la técnica de Citometría de flujo se basa en la marcación o identificación de la población interés y la cuantificación de los mismos de manera específica, siguiendo un protocolo estandarizado de fijación, marcación, incubación y adquisición celular en muestras de sangre periférica (SP) (18). La función del bazo en el cuerpo es de remover o eliminar de la circulación a los reticulocitos micronucleados, el cual podría ser un obstáculo en la detección de gran cantidad de reticulocitos y/o eritrocitos en la sangre periférica como un indicador confiable de daño citogenético, sin embargo, con el uso de la Citometría de Flujo, que es un método altamente sensible, específico y capaz de analizar miles de células por segundo, se pueden detectar de manera eficiente poblaciones micronucleados. La relación de la elevada frecuencia de los micronúcleos y el riesgo a desarrollar cáncer, no indica el sitio específico a desarrollar la enfermedad, sino que manifiestan la acumulación de daños genéticos causados por factores genotóxicos endógenos y exógenos, así como la diferencia en la respuesta individual frente a la vulnerabilidad a estos factores (18).

El estudio de micronúcleos mediante la citometría de flujo espectral es una técnica innovadora, rápida y eficaz que evalúa el daño citogenético en los eritrocitos con un excelente grado de eficiencia y sensibilidad sin ninguna técnica que se le compare.

### **2.2.6 Enfermedades oncohematológicas**

Citometría de Flujo: la citometría de flujo en la salud es una técnica diagnóstica directa en el estudio de las diferentes poblaciones celulares. Actualmente, una de las principales aplicaciones de esta técnica es la oncohematología, en el diagnóstico, pronóstico y control del inmunofenotipo de enfermedades como leucemias, linfomas, síndromes mielodisplásicos, entre otros; sin embargo, esta técnica tiene la posibilidad de desarrollo en otras áreas, generando diagnósticos oportunos y confiables debido a que es una de las técnicas más sensible, específicas y de análisis multiparamétrico, disponibles en la actualidad (32). La citometría de flujo se basa en 3 principios fundamentales, los cuales son la fluídica, óptica y electrónica, en las que una suspensión de células es introducida mediante el fluido envolvente hacia el punto de interrogación del equipo, donde incide la luz láser a las células marcadas, unión de los antígenos a los anticuerpos marcados con un fluorescente y estos emiten luz de determinadas longitudes de onda que son detectadas mediante fotomultiplicadores o fotodiodos de avalancha proporcionándose así la medición en los

detectores específicos para cada fluorocromo. La citometría de flujo puede estudiar diferentes partículas en suspensión, identificando parámetros intrínsecos, tamaño y complejidad de estas.

### **2.2.7 Citometría espectral**

La citometría de flujo, que en griego significa “medición de células” en flujo, es una técnica que facilita el análisis multiparamétrico de las células de manera precisa, cualitativo y cuantitativo de partículas o células suspendidas en un flujo que continúa a la zona de análisis del equipo “punto de interrogación”. Su avance continuo va de la mano con la gran variedad de producción de anticuerpos que tienen la posibilidad de unirse por enlace covalente a diferentes moléculas fluorescentes. La citometría de flujo cuenta con características resaltantes y necesarias para el análisis clínico y para la investigación, como lo es la capacidad de análisis a una gran cantidad de células por segundo, preciso y exacto. La citometría espectral es una técnica innovadora que forma parte del avance tecnológico, esta citometría a diferencia del convencional, recolecta información de todo el espectro de información del fluorocromo (33). A continuación, se muestra una esquematización completa de la citometría espectral.

(A) se muestra el diagrama óptico de un citómetro espectral en donde se muestra la disposición de los láseres, el punto de interrogación, los lentes, filtros y fotomultiplicadores que permiten la excitación, emisión y detección de la fluorescencia de las células marcadas con fluorocromos.

(B) Muestra las longitudes de onda que es capaz de detectar un citómetro espectral.

(C) Se muestra la cámara de detección del citómetro espectral, en donde se observa el flujo de la solución envolvente y muestra que pasan por la zona de detección para luego ser dirigida a la zona de desechos.

(D) espectros completos de fluorescencia excitadas por láser de 488 nm y láser de 405/638 nm, en donde se observa la intensidad de fluorescencia en el eje de las ordenadas y la longitud de onda en el eje de las ordenadas. La intensidad de fluorescencia está dada por los colores rojo (intenso), verde (medio) y azul (débil). La flecha roja refleja el filtro que enmascara la luz del láser 638 nm.

(E) *Filtro virtual de ficoeritrina (PE) aplicado a las perlas.*

(F) Se muestra la huella espectral de la muestra  $S(\lambda)$  y espectros de Fluoresceína (FITC) en verde, ficoeritrina (PE) en naranja y de color violeta el ruido de fondo de restos celulares. El rectángulo representa la máscara de filtro que obstruye el paso a láser de 638 nm.

(G) Espectro de células marcadas con anticuerpos adheridos a las fluorescencias FITC y PE, espectro de referencia individual de cada una de las fluorescencias que serán útiles en la descomposición espectral (gráfico de la izquierda). Visualización del density plot antes y después de la descomposición espectral o deconvolución, podemos observar la excelente separación de las poblaciones celulares posterior a la deconvolución para FITC (gráfico de la derecha).

(H) Se identifica a las células autofluorescentes en una muestra sin marcar. Así mismo, se muestran espectro de células no autofluorescentes (NON AF) y autofluorescentes (AF) (33).

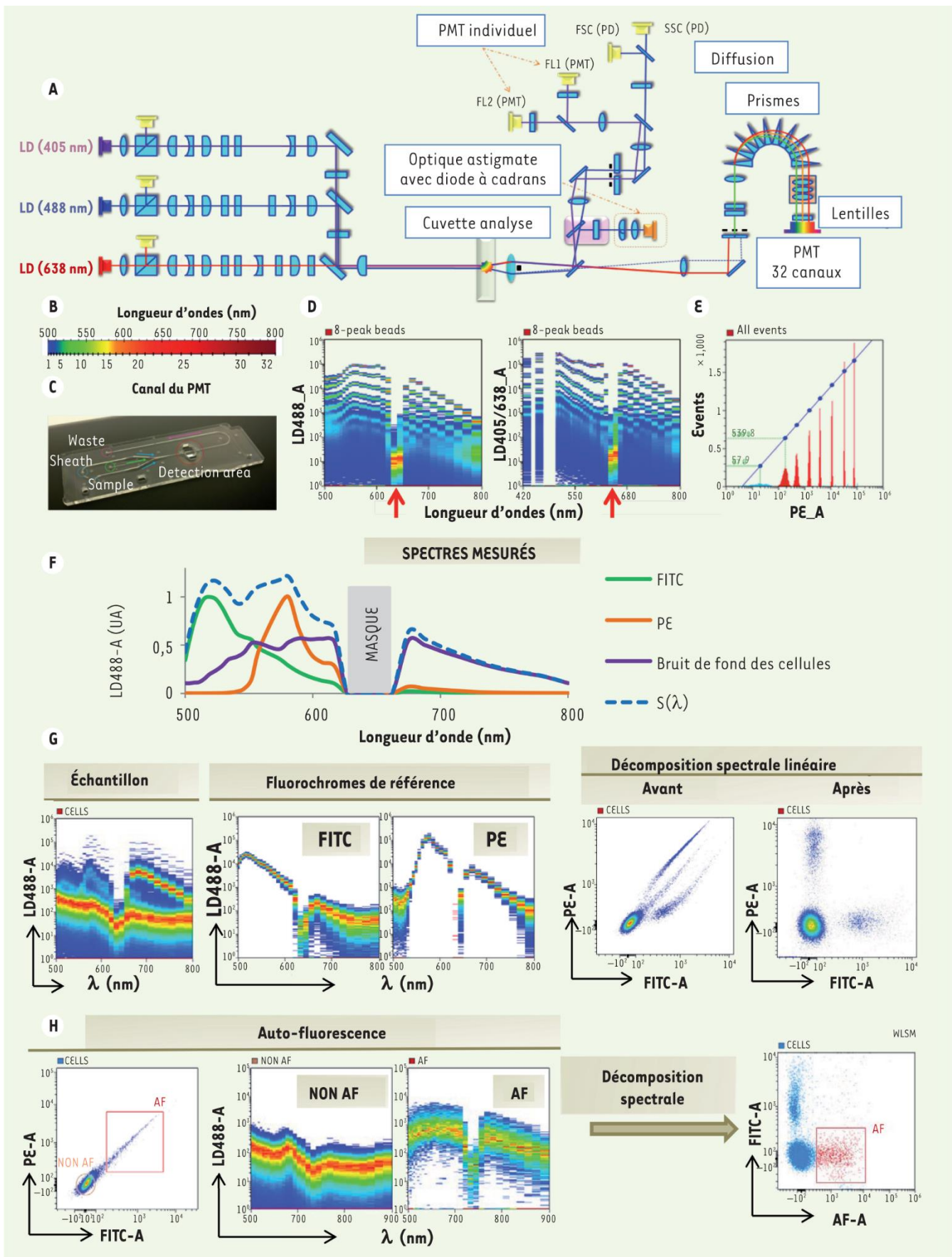


Figura 5: Citometría espectral. (Idziorek T et al. 2018) (33).

### **2.2.8 Selección de panel celular**

En el trabajo de investigación presentado, se hará uso del anticuerpo anti-CD71 en Fluoresceína (FITC) y el colorante DRAQ5 mediante el uso del citómetro de flujo espectral Cytex® Northern Lights™ 3000.

CD71: El antígeno CD71 es una glicoproteína de membrana tipo II, un receptor de la transferrina, que media la captación de hierro en la célula mediante el proceso de internalización y reciclaje. Se expresa en linfocitos T y B activados, macrófagos y eritroblastos. Su expresión aumenta en células proliferativas, está presente en progenitores eritroides en hígado fetal, sangre de cordón umbilical, reticulocitos y sangre periférica, se va perdiendo conforme la célula llega a ser eritrocito maduro (34).

DRAQ5: Colorante de uso en la citometría de flujo por su alta afinidad al ADN bicatenario, permeable a la membrana que permite el marcaje a células vivas o fijadas/muertas. Permite la distinción de células con núcleo y sin núcleo. Además, ayuda a evaluar el contenido del ADN nuclear para analizar ploidías y ciclo celular porque se une al ADN estequiométricamente. La longitud de onda que excita al DRAQ5 es de 488nm (35).

#### **Definición de términos**

Eritropoyetina (EPO): Hormona tipo glicoproteína, secretada principalmente por el riñón en adultos y en el hígado fetal, que actúa en las células madre eritroides de la MO, estimulando la proliferación y diferenciación (36)

Micronúcleos: Núcleos alterados producto de la telofase de la división celular (mitosis o meiosis) por cromosomas 'lentos' (retrasados) o fragmentos cromosómicos (derivados de cambios cromosómicos estructurales, espontáneos o inducidos experimentalmente) (36). La medición cuantitativa mediante la citometría espectral reflejará el daño citogenético que conduce a la generación de micronúcleos (micronúcleo con defecto citogenético) en células que estén expuestas a agentes genotóxicos o radiaciones ionizante.

Agente citotóxico: Sustancias tóxicas para las células que pueden estar implicadas en la inmunidad o pueden estar contenidas en venenos. se diferencian de los citostáticos por la intensidad del efecto. algunos de ellos se utilizan como antibióticos citotóxicos. El

mecanismo de acción de muchos de ellos es el de agentes alquilantes o moduladores de la mitosis (36).

**Biomarcadores:** Parámetros biológicos que pueden ser medidos y cuantificados (por ejemplo, concentración de hormonas específicas, presencia de sustancias biológicas, distribución fenotípica de un gen específico en una población, concentración de enzimas específicas) que sirven de marcadores para evaluaciones y fisiología relacionadas con la salud, como riesgo de desarrollar una enfermedad, diagnóstico de enfermedades, trastornos relacionados con el uso de sustancias, exposición ambiental y sus efectos, metabolismo, gravedad, desarrollo de linaje celular, estudios epidemiológicos, entre otros (36).

**CD:** por sus siglas en inglés “cluster of differentiation” son antígenos de diferenciación de las células. Los CD o grupo de diferenciación, se refiere a grupos de anticuerpos monoclonales que presentan una reactividad similar con ciertas subpoblaciones de antígenos de un linaje o etapa de diferenciación particular. Las subpoblaciones de antígenos también se conocen con la misma designación CD (36).

**Fluorocromos:** Sustancias de composición química que emiten luz después de la excitación luminosa. La longitud de onda de la luz emitida es generalmente mayor que la de la luz incidente. Los fluorocromos son sustancias que provocan fluorescencia en otras sustancias, es decir, tintes que se utilizan para marcar o diferenciar otros compuestos con etiquetas fluorescentes (36). El desarrollo de numerosas moléculas fluorescentes que tengan la capacidad de unirse por medio del enlace covalente a anticuerpos y estas a células de interés hace que la citometría de flujo sea una de las técnicas más interesante e innovadora en la actualidad.

**Sustancias organofostatados:** Los agentes químicos como los plaguicidas, insecticidas entre otros, que son de uso en las agriculturas, para el control de plagas y vectores y optimizar la calidad de los productos agropecuarios. Estas sustancias están consideradas como potenciales mutágenos, que pueden producir cambios en el ADN (37).

## **2.3 Formulación de hipótesis**

### **2.3.1 hipótesis general**

La exposición a plaguicidas se asocia de manera significativa con el incremento de reticulocitos micronucleados en agricultores de Huancavelica, evaluados mediante la citometría espectral.

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1 Método de la investigación**

La metodología aplicada en este trabajo es de tipo hipotético deductivo puesto que se formula una hipótesis y se busca verificar o refutar nuestra hipótesis de manera rigurosa y sistemática, deduciendo conclusiones que se basan en la observación y la medición de los datos, para que puedan ser generalizados en otras situaciones o poblaciones.

### **3.2 Enfoque de la investigación**

Este trabajo se desarrollará con un enfoque cuantitativo, debido a que se busca la obtención de datos objetivos y precisos, sin ser influenciadas por la subjetividad del investigador. Se recopilarán datos numéricos y cuantificables para analizar y comparar mediante el uso de métodos estadísticos, identificando patrones tendencias y relaciones de los datos. Dado el enfoque cuantitativo este trabajo nos permite generalizar los resultados, fomentando la objetividad y permitiendo la comparabilidad con otros estudios y/o resultados.

### **3.3 Tipo de la investigación**

El tipo de investigación que se realizará es el básico debido a que se busca avanzar generando nuevos conocimientos en la comprensión del problema, sin las influencias subjetivas, centrándose en la comprensión y explicación de los procesos, así mismo, se utilizará el método científico para recopilar y analizar los datos, para finalmente desarrollar teorías y principios que sean generalizables en diferentes contextos y situaciones.

### **3.4 Diseño de la investigación**

El diseño de investigación aplicable a este trabajo es de tipo no experimental de corte transversal analítico donde se analizará la relación entre variables en un momento determinado. En este trabajo no se manipulará la variable independiente, sino que se observará la relación con la variable dependiente, recopilando datos en un momento específico y analizar la relación entre las variables (38). El trabajo tendrá una muestra significativa de agricultores de la región Huancavelica, provincia Tayacaja que participarán en el presente estudio, y se determinará la relación existente entre el daño citogenético y el nivel de exposición a insecticidas, mediante el análisis por citometría de flujo, durante el 2025.

### 3.5 Población, muestra y muestreo

#### 3.5.1 Población

Huancavelica, “la tierra del mercurio”, es una región que se encuentra ubicada en la parte sur-central del Perú, limitando por el oeste con Lima e Ica, el este y sur con Ayacucho, y por el norte con Junín, tiene una superficie de 22 131.47 Km<sup>2</sup> y una población censada de 347 639 habitantes hasta el último censo nacional 2017 (39).

Huancavelica, como región de poco desarrollo económico, social y tecnológico en el país, la agricultura que se practica son principalmente independiente y para la subsistencia de la población. Su producción es principalmente en granos y tubérculos, como arveja, habas, quinua, cebada, maíz, papa, olluco, entre otros.

Huancavelica, como región de poco desarrollo económico, social y tecnológico en el país, la agricultura que se practica son principalmente independiente y para la subsistencia de la población. Su producción es principalmente en granos y tubérculos, como arveja, habas, tuna, cebada, maíz, papa, olluco, entre otros.

Según el último censo nacional del INEI 2007 (40) la población total en la región de Huancavelica es de 454 797 habitantes y de la provincia Tayacaja son de 104901 habitantes. Según el IV censo nacional agropecuario 2012 (10), el “*número de productores agropecuarios, según departamento, 2012*” en la región de Huancavelica son 74922 agropecuarios, de los cuales las “*Unidades agropecuarias que aplican pesticidas 2012, según departamento 2012*”, en Huancavelica son 72089, 26554 agricultores usan insecticidas químicos, 2878 usan insecticidas no químico o biológicos, 4307 usan herbicidas y 16971 usan fungicidas. Así mismo, la “*Unidades agropecuarias que aplican fertilizantes químicos, según departamento, 2012*”, informa que en Huancavelica hay 3193 unidades agropecuarias que utilizan fertilizantes químicos en gran cantidad y 30794 en poca cantidad. Además, el “*número de trabajadores en el sector agropecuario, según departamento, 2012*”, muestra a 1154 trabajadores, entre hombres y mujeres, que son permanentes y 298884 trabajadores, entre hombres y mujeres, que son eventuales. La densidad poblacional de la provincia de Tayacaja hasta el año 2017 son de 81403 habitantes de acuerdo con la base de datos del INEI y el número de unidades agropecuarias en la provincia de Tayacaja es de 18793, según el IV CENAGRO (41). En este estudio se trabajará con agricultores de la

región de Huancavelica, provincia Tayacaja, que acudan al Hospital de Pampas Tayacaja durante el periodo de 01/05/2025 al 31/05/2025.

### **3.5.2 Muestra**

Para la definición de la muestra en este estudio se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$n = (Z^2 \times p \times (1-p)) / B^2$$

Donde:

n = tamaño de la muestra

Z= valor que corresponde al nivel de confianza 1.96 al 95%.

p = Proporción esperada de la población

B = error máximo permitido (5%)

n=377 (42).

### **3.5.3 Muestreo**

Se aplica el muestreo de tipo no aleatorio simple por conveniencia, seleccionados bajo los criterios de inclusión y exclusión. Donde se seleccionará muestra de individuos de manera aleatoria, individuos dispuestos a participar en el estudio y que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión; asegurando así que cada individuo poseerá la misma probabilidad de ser seleccionado (38).

## **3.6 Variables y operacionalización**

### **3.6.1 Definición conceptual de variables**

Variable dependiente: Recuento de reticulocitos micronucleados: El recuento de reticulocitos micronucleados es una medida de gran importancia en la estimación del daño genético que se ocasiona por la exposición a pesticidas. El recuento de reticulocitos micronucleados se refiere al número de reticulocitos que presentan micronúcleos en la muestra de sangre periférica. El número de reticulocitos micronucleados será medido en la cantidad de células por microlitro, evaluado en 500000 de células adquiridas por el citómetro de flujo (18).

Variable independiente: Exposición a pesticidas: La exposición a plaguicidas es un factor importante en la evaluación del daño genético y diversos daños a la salud. Se refiere a la frecuencia y cantidad de exposición por parte de los agricultores a los pesticidas en su trabajo diario. Se ha evidenciado que la exposición a laboral a pesticidas en zonas urbanas o rurales ocasionan riesgos en la salud debido a que provocan intoxicaciones agudas, subagudas hasta crónicas, y los efectos van a depender de la forma de exposición, características del sujeto y las características de las pesticidas (43).

Variabes intervinientes: Tiempo de exposición: Se refiere al periodo de tiempo en el que un individuo o la población estén en contacto o expuestos al factor de riesgo o a las sustancias genotóxicas. El tiempo de exposición considerado se subdividirá en 5 grupos, en las cuales el grupo 1 (G1), estará conformado por aquellos agricultores que estén expuestos a sustancias genotóxicas entre 1 a 5 años, en el grupo 2 (G2), estarán aquellos que estén expuestos entre 5 a 10 años, en el grupo 3 (G3), aquellos que estén expuestos entre 10 a 15 años, en el grupo 4 (G4), aquellos que estén expuestos entre 15 a 20 años, y en el grupo 5 (G5), aquellos que tengan más de 20 años de exposición. Así mismo, en función a la frecuencia de exposición que se refleja en número de veces de uso de pesticida por semana (de 1 a 2 veces por semana, de 3 a 5 veces por semana y más de 5 veces a la semana) y en función al tiempo de exposición a pesticidas medidas en horas al día, menor a 2 horas, entre 3 a 5 horas y más de 5 horas al día. El método de medición a usar será la aplicación de cuestionarios a los agricultores participantes en donde se obtendrá información sobre el uso de pesticidas, el tiempo y frecuencia de exposición.

### 3.6.2 Operacionalización de variables

variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Tipo de variable	de Escala de medición
<b>Recuento de reticulocitos micronucleados</b>	Número de reticulocitos que presentan micronúcleos en la muestra de sangre periférica	Número de reticulocitos por cada 500000 células analizadas.	Cantidad de reticulocitos micronucleados	Porcentaje de reticulocitos con respecto al total de hematíes (% Ret)	Cuantitativo	Número de micronúcleos por cada 500000 células analizadas.
<b>Exposición a pesticidas</b>	Frecuencia y cantidad de exposición por parte de los agricultores a los pesticidas en su trabajo diario	Frecuencia y cantidad de exposiciones a los pesticidas en el trabajo diario	Cantidad de pesticidas utilizados.  Frecuencia del uso de pesticidas.	Número de pesticidas utilizados  Tiempo de exposición de pesticidas por semana	Cuantitativo  Continua	Número de pesticidas usados por hectárea de terreno  Baja, moderada y alta
<b>Tiempo de exposición</b>	Periodo en el cual un individuo o población se encuentre expuesta a sustancias genotóxicas	El tiempo de exposición será medido en función a la cantidad de años de exposición, según la ficha de recolección de datos.	Duración de la exposición	Tiempo de exposición	Cuantitativo	Años

*Fuente: Elaboración propia con apoyo del estudio: “ Las variables y su operacionalización ” (44).*

### **3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

#### **3.7.1 Técnicas**

En este trabajo se utilizará la Citometría de flujo para el análisis de las poblaciones celulares y medir la frecuencia de los micronúcleos. Se aplicará la ficha de recolección de datos con el fin de obtener la información sobre el tiempo de exposición y otros factores relevantes para el estudio, asegurando la confidencialidad de los datos de los participantes.

#### **3.7.2 Descripción de instrumentos**

La Citometría de Flujo Espectral es una técnica innovadora de gran utilidad debido a los beneficios que trae a comparación de la citometría convencional. En el análisis espectral, se realizará el proceso de marcaje de las muestras de los participantes, con el uso de los fluorocromos CD71 en APC y el marcador DRAQ5 para posterior reconstituir con PBS (solución salina tamponada con fosfato). En el análisis mediante el citómetro de flujo espectral se realiza el mantenimiento diario del equipo Cytek® Northern Lights™ 3000, para continuar con el procesamiento del control de calidad interno y la validación de los resultados, estos contienen a la ganancia, mediana de la intensidad de fluorescencia de las microesferas de CCI, el %rCV y un indicador de apto y no apto para cada uno de los canales de los detectores, estos resultados del CCI se da por aceptado cuando el estado de la misma sea apto. Así mismo, se consideran los criterios de aceptación del CCI según lo establecido por el fabricante, dispuesto en el manual del operador. Posterior a ello, se procesa los controles de referencia (muestras o microesferas con tinción única y sin teñir) que serán muy útiles para la deconvolución del equipo, necesarios para la separación de las poblaciones celulares. En la adquisición de las muestras, se configura al equipo de tal manera que llegue a adquirir 500000 eventos para finalmente obtener los resultados en cantidad de reticulocitos micronucleados por microlitro de muestra.

En la ficha de recolección de los datos se recolectará los datos del tiempo de exposición y otros datos relevantes como el tipo de exposición, nivel de exposición, edad y sexo para el estudio de forma ordenada y sistemática. Esta ficha en donde se recolectarán los datos está diseñada de tal manera que sea de fácil comprensión, consistente y precisa.

Se aplicará también un formulario de consentimiento informado a todos los participantes antes de la recolección de datos.

### **3.7.3 Validación**

El uso de la citometría de flujo en el análisis de reticulocitos micronucleados se ha venido desarrollando ya hace algunos años atrás en países como Estados Unidos, México, Chile, Colombia, Bolivia, entre otros, en los cuales hacen uso del citómetro de flujo como herramienta en el diagnóstico oportuno de algunas alteraciones citogenéticas.

La ficha de recolección ha sido elaborada en base a las necesidades de los datos en el estudio y ha sido revisada por 3 expertos en la materia que indica que este instrumento es válido para su uso previsto Anexo 3.

### **3.7.4 Confiabilidad**

Las muestras obtenidas para la investigación serán procesadas mediante el Citómetro de Flujo Cytex® Northern Lights™ 3000, posterior a la evaluación del mantenimiento diario, análisis del control de calidad interno y la deconvolución del equipo. Los datos serán analizados mediante el software SpectroFlo® propia del citómetro, para finalmente proceder con el análisis estadístico del Coeficiente de Correlación de Pearson.

## **3.8 Plan de procesamiento y análisis de datos**

El trabajo de investigación tiene un enfoque cuantitativo, por ello los resultados arrojados por el citómetro de flujo espectral Cytex® Northern Lights™ 3000 y las variables propuestas serán analizados mediante el modelo de regresión de Poisson con varianza robusta debido a que ayuda al análisis de datos por conteo (número de reticulocitos micronucleados en relación a la exposición a pesticidas en los agricultores de Huancavelica), la regresión de Poisson es un modelo estadístico que se utiliza para predecir la frecuencia de reticulocitos micronucleados en un determinado tiempo o espacio. Así mismo, la Varianza robusta es la técnica estadística que permitirá la estimación de la varianza de la cantidad de reticulocitos micronucleados y la exposición a pesticidas, de manera más precisa y la identificación de factores que influyen en la frecuencia de los reticulocitos micronucleados.

### **3.9 Aspectos éticos**

En este trabajo de investigación participaran seres humanos por los cuales se tomará en cuenta la “*Declaración de Helsinki para la investigación biomédica en seres humanos*” (45-47), en donde se prima el respeto a la autonomía de los participantes, el principio de justicia, no maleficencia y el principio de beneficencia. Además, se brindará una charla previa a la participación donde se les explicará la información necesaria del estudio, los objetivos y los beneficios y riesgos de la población, se aplicará el consentimiento informado (ANEXO 01), con el que se proporcionará la autorización en la ejecución del presente estudio. De igual manera el trabajo será revisado por el comité de ética de la Universidad Norbert Wiener.

## CAPÍTULO IV: ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

### 4.1 Cronograma de actividades

ACTIVIDADES	AÑO 2025																							
	Marzo				Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto			
	semanas																							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Presentación del proyecto de tesis al Posgrado – UNW			x																					
Revisión y aprobación del trabajo de investigación			x	x	x																			
Elaboración y entrega de carta de aprobación del Proyecto de Tesis							x	x																
Carta de presentación a la institución donde se realizará el análisis de las muestras										x														
Autorización por las autoridades del Hospital de Pampas Tayacaja										x														
Charla informativa											x													
Firma de consentimiento informado											x													
Toma de muestra primer grupo											x													



## 4.2 Presupuesto

DESCRIPCIÓN	Unidad	CANTIDAD	COSTO UNITARIO (S/.)	COSTO TOTAL (S/.)
<b>MATERIALES DE ESCRITORIO</b>				
Papel A-4	Millar	1	25	25
USB	Unidad	1	30	30
Archivadores	Unidad	5	15	75
Bolígrafos	Unidad	15	2	30
Fotocopias	Millar	1	0.3	0.3
Tinta de impresora	Unidad	3	70	210
<b>SUBTOTAL</b>				<b>370.3</b>
<b>SERVICIOS TERCEROS</b>				
Internet	Mensual	7	50	350
<b>SUBTOTAL</b>				<b>350</b>
<b>TRANSPORTE</b>				
Local	NA	200	10	2000
Nacional	NA	10	50	500
<b>SUBTOTAL</b>				<b>2500</b>
<b>ESTANCIA</b>				
Huancavelica-Tayacaja	Semanas	3	25	525
<b>SUBTOTAL</b>				<b>525</b>

<b>MATERIAL BÁSICO PARA TOMA DE MUESTRA</b>				
Equipo de bioseguridad	Unidad	10	10	100
TUBO EDTA K2, 13X75mm PACK x 100 PIEZAS	Paquetes	4	35	140
Algodón	Unidad	1	30	30
Guantes	Unidad	3	25	75
Contenedor de bioseguridad de cartón 5L	Unidad	5	6.5	32.5
Esparadrapo	Unidad	3	5	15
Ligadura o torniquete	Unidad	5	1	5
capuchón	Unidad	5	1	5
Alcohol medicinal 70°	Unidad	2	20	40
Aguja Vacutainer 21g	Caja	5	45	225
<b>SUBTOTAL</b>				<b>667.5</b>
<b>RECURSOS HUMANOS</b>				
Personal asistente de investigación	NA	1	1500	1500
Personal de laboratorio de investigación	NA	400	25	10000
<b>SUBTOTAL</b>				<b>11500</b>
<b>MATERIAL BÁSICO DE LABORATORIO</b>				
Tubos de ensayo en vidrio bolosilicato x 50 unidades	Paquetes	20	35	700

Pipeta automática 10-100 uL	Unidad	1	250	250
Pipeta automática 0.5-10 uL	Unidad	1	240	240
Pipeta automática 100-1000 uL	Unidad	1	240	240
punteras amarillas 10-200 ul	Unidad	3	13	39
punteras azules 100-1000 ul	Unidad	2	15	30
punteras azules 0.5 - 10 ul	Unidad	5	15	75
cinta parafilm	Unidad	1	10	10
phosphate buffered saline (PBS)	Unidad	5	150	750
anticuerpo CD71	Unidad	5	1820	9100
DRAQ5	Unidad	3	2000	6000
Agitador digital Vórtex	NA	Material proporcionado por el laboratorio de apoyo		
Centrífuga				
Citómetro de flujo				
Desionizador de agua				
<b>SUBTOTAL</b>				<b>17434</b>
<b>TOTAL</b>				<b>21846.8</b>

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios WHO, News2024 [Available from: <https://www.who.int/es/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>].
2. Ministerio de Salud (MINSA). PLAN NACIONAL DE CUIDADOS INTEGRALES DEL CÁNCER 2020-2024. 2024.
3. Departamento de promoción de la salud, prevención y control nacional del cáncer. DOCUMENTO TÉCNICO: MANUAL DE PREVENCIÓN DE CÁNCER OCUPACIONAL. 2018.
4. Mousavikia SN, Bahreyni Toossi MT, Khademi S, Soukhtanloo M, Azimian H. Evaluation of micronuclei and antioxidant status in hospital radiation workers occupationally exposed to low-dose ionizing radiation. BMC Health Serv Res. 2023;23(1).
5. Ruiz-Guzmán JA, Gómez-Corrales P, Cruz-Esquivel Á, Marrugo-Negrete JL. Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of children exposed to pesticides in agricultural areas of the department of Cordoba, Colombia. Mutation Research - Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis. 2017;824:25-31.
6. Cedano Díaz Antonio MGS, Escalera Valente Francisco, Salgado Moreno Socorro, Carrillo Díaz Fernando, Macías Coronel Humberto, Peña Parra Bladimir. LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE COMO BIOINDICADOR DE GENOTÓXICOS. ABANICO VETERINARIO. 2012.
7. International Commission on Radiological Protection (ICRP). Low-dose Extrapolation of Radiation-related Cancer Risk. 2005. Available from: <https://www.icrp.org/publication.asp?id=ICRP%20Publication%2099>
8. Wei W, Li J, Wu X, Zhang H. High-through cell micronucleus image detection method combining multi-attention mechanism and YOLOv5. Biomedical Signal Processing and Control. 2024;87:105496.
9. Colchado Carhuavilca Jorge R. LMD, Luza Montero Silvia, Medina Katia L., Calle Gonzales Rosario, Bardales Hidalgo Carmencita, Figueroa Mercado Carla. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS BUCALES. UNA REVISIÓN. OACTIVA UC. 2022;7:37-44.

10. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). RESULTADOS DEFINITIVOS IV Censo Nacional Agropecuario 2012. 2012.
11. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). Sector informal genera cerca de la quinta parte del Producto Bruto Interno peruano 2016 [Available from: <https://www.gob.pe/institucion/inei/noticias/535899-sector-informal-genera-cerca-de-la-quinta-parte-del-producto-bruto-interno-peruano>].
12. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(4).
13. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Holland N, Bonassi S, Kirsch-Volders M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. 2020;786.
14. Norma técnica de salud sobre preparación, embalaje y documentación para el transporte seguro de sustancias infecciosas, (2019).
15. Cytex. Cytex® Northern Lights™ Full Spectrum Flow Cytometry for All 2024 [Available from: <https://cytekbio.com/pages/northern-lights>].
16. Smith-Roe SL, Garantziotis S, Church RL, Bemis JC, Torous DK, Shepard KG, et al. A cross-sectional clinical study in women to investigate possible genotoxicity and hematological abnormalities related to the use of black cohosh botanical dietary supplements. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2022;63(8-9):389-99.
17. Chen Y, Huo J, Liu Y, Zeng Z, Zhu X, Chen X, et al. Development of a novel flow cytometry-based approach for reticulocytes micronucleus test in rat peripheral blood. *Journal of Applied Toxicology*. 2021;41(4):595-606.
18. Barrera LM, Ortiz LD, Grisales H, Rojas M, Camargo M. Citometría de flujo en reticulocitos de sangre periférica como indicador de inestabilidad cromosómica en pacientes con gliomas de alto grado. *Biomédica*. 2018;38(3):378-87.
19. Quero AAM, Muñoz I, Ferré DM, Gorla NBM. Frecuencia de micronúcleos en eritrocitos con coloración secuencial Giemsa-naranja de acridina en el gato doméstico( *Felis domesticus*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2018;29:800-7.
20. Bowen DE, Whitwell JH, Lillford L, Henderson D, Kidd D, Mc Garry S, et al. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test,

the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2011;722(1):7-19.

21. Quiñones Cerna ME, Rodríguez Castañeda JS, Amésquita Cardenas ML, Quiñones Cerna CE, Esparza Mantilla MR. Efecto genotóxico de ranitidina sobre el ADN de eritrocitos policromáticos de *Rattus norvegicus* cepa Holtzman. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 2022;15:42-5.

22. Carr JH, Rodak BF. Atlas de hematología clínica: Editorial Médica Panamericana; 2009.

23. J. Sans-Sabrafen CBR, J.L. Vives Corrons. HEMATOLOGÍA CLÍNICA. © MMVI Elsevier España. S.A.2007.

24. Jiménez JMM. PREGRADO de HEMATOLOGÍA. LUZÁN 5 SA, editor. Sociedad Española de Hematología y Hematoterapia 2017.

25. González Carfora A, Martínez M. Anemia Drepanocítica: drepanocítico homocigoto y heterocigoto. Reporte de dos casos 2017.

26. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular Responses to DNA Damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2001;41(Volume 41, 2001):367-401.

27. Imlay JA. Pathways of Oxidative Damage. *Annual Review of Microbiology*. 2003;57(Volume 57, 2003):395-418.

28. Ghazali AR, Abdullah MB, Hamid A, Ahmad A, Nagapan TS, Ishak IB, et al. Analisa Sitogenetik Sel Bukal Petani di Tanjung Karang dan Kelantan yang Terdedah Kepada Pestisid. *Malaysian Journal of Health Sciences / Jurnal Sains Kesihatan Malaysia*. 2018;16:1-8.

29. Harrison JC, Haber JE. Surviving the Breakup: The DNA Damage Checkpoint. *Annual Review of Genetics*. 2006;40(Volume 40, 2006):209-35.

30. Gambaro R, Seoane A, Padula G. Comparación in vitro de la frecuencia de micronúcleos provocada por dos formas de administración del tratamiento preventivo de la anemia ferropénica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. 2017;20:2.

31. Torres-Bugarin O, Arias-Ruiz LF. Micronúcleos: Actualización del papel en la inestabilidad genética, inflamación, envejecimiento y cáncer. Revisión panorámica. 2023. 2023;34(2).

32. Ramírez Orellana M. Citometría de flujo: qué puede aportar al diagnóstico hematológico en pediatría. *Anales de Pediatría Continuada*. 2012;10(5):282-5.
33. Idziorek T, Cazareth J, Blanc C, Jouy N, Bourdely P, Corneau A. Que la lumière soit. Et si ce n'était plus seulement vrai ! *Med Sci (Paris)*. 2018;34(5):439-47.
34. Sciences BCL. Antígeno CD71 [Available from: <https://www.beckman.es/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd71>].
35. Thermo Fisher SCIENTIFIC e. DRAQ5™ [Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/65-0880-96?SID=srch-srp-65-0880-96>].
36. Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS 2024 [updated 2024 Feb 08; cited 2024. Sao Paulo (SP): BIREME / OPS / OMS. 2024 [Available from: <https://decs.bvsalud.org/es/>].
37. Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 2007;23(4):185-200.
38. de la Luz M. METODOLOGÍA DELA INVESTIGACIÓN: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.
39. Huancavelica R-S. Gobierno Regional de Huancavelica. 2015.
40. PLAN ESTRATÉGICO REGIONAL DEL SECTOR AGRARIO DE HUANCAVELICA, (2008).
41. García J, Sánchez A, Durand D, Peña R. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Indicadores de Violencia Familiar y sexual [Internet] Lima. 2019.
42. Mateu E, Casal J. Tamaño de la muestra. *Rev Epidem Med Prev*. 2003;1(4):8-14.
43. DesCS/MeSH DeCdS. Exposición a pesticidas 2024 [Sao Paulo (SP): BIREME / OPS / OMS. 2024]. Available from: [https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=32531&filter=ths\\_termall&q=exposici%C3%B3n%20a%20pesticidas#Details](https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=32531&filter=ths_termall&q=exposici%C3%B3n%20a%20pesticidas#Details).
44. Coronel-Carvajal C. Las variables y su operacionalización. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2023;27.
45. Miranda-Novales MG, Villasís-Keever MÁ. El protocolo de investigación VIII. La ética de la investigación en seres humanos. *Revista Alergia México*. 2019;66(1):115-22.

46. Mundial AM. Declaración de Helsinki de la AMM. Principios éticos para las investigaciones médicas en participantes humanos. 2013.
47. Mundial AM. Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas con participantes humanos WMA2024 [Available from: <https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>].

## ANEXOS

### ANEXO 1: CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Título de proyecto de investigación** : “Citometría de flujo en la identificación de eritrocitos micronucleados para la evaluación de daño citogenético, Huancavelica 2025”.

**Investigadores** : Jheydy Shomara Areste Castro

**Institución(es)** : Universidad Privada Norbert Wiener (UPNW)

---

Estamos invitando a usted a participar en un estudio de investigación titulado: “Citometría de flujo en la identificación de eritrocitos micronucleados para la evaluación de daño citogenético, Huancavelica 2025” de fecha 01/04/2025 y versión 02. Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Privada Norbert Wiener (UPNW).

#### I. INFORMACIÓN

**Propósito del estudio:** El propósito de este estudio es evaluar la relación entre la identificación de eritrocitos micronucleados, daño citogenético y tiempo de exposición al agente citotóxico en agricultores de Huancavelica, 2025. Su ejecución permitirá mejorar los conocimientos sobre los efectos de las sustancias bioquímicas que se usan en la agricultura, así mismo, los resultados del estudio ayudarán a identificar la magnitud del daño que puede ocasionar los pesticidas y así se pueda prevenir en gran medida los riesgos y posibles daños a la salud.

**Duración del estudio (meses):** 6 meses

**Nº esperado de participantes:** 380 participantes

#### **Criterios de Inclusión y exclusión:**

- Participantes agricultores mayores de 18 años.
- Participantes con más de 1 año de experiencia en la agricultura con exposición a pesticidas.
- Agricultores de la región Huancavelica que asistan al Hospital de Pampas Tayacaja y reciban la sesión informativa.
- Agricultores que deseen participar en el estudio y firmen el consentimiento informado.

#### **Criterios de Inclusión y exclusión:**

- Participantes con enfermedades crónicas.
- Participantes en estado de gestación o lactancia.
- Participantes que pertenezcan a grupos vulnerables.

- Participantes que estén recibiendo algún tipo de tratamiento médico.
- Participantes que usen otro tipo de sustancia química distinta en su vida rutinaria.

**Procedimientos del estudio:** Si Usted decide participar en este estudio se le realizará los siguientes procesos:

- Recibir y comprender la sesión informativa sobre el trabajo de investigación presentada por la investigadora.
- Asistir puntualmente al establecimiento de toma de muestra sanguínea según la fecha y hora pactada en la sesión informativa.
- Seguir las indicaciones recomendadas por la investigadora posterior a la toma de muestra para minimizar los efectos de esta.

La sesión informativa puede demorar unos 10 minutos y donde habrá una interacción por parte del investigador con los participantes.

Los resultados se le entregarán a usted en forma individual y se almacenarán respetando la confidencialidad y su anonimato.

**Riesgos:**

Su participación en el estudio **no** presenta riesgos mayores en la salud. Solo en la toma de muestra al ser un procedimiento invasivo que puede ocasionar dolor ligero e incluso generar algún tipo de hematoma en la zona de punción, el cual será por un periodo corto de tiempo.

**Beneficios:**

Usted se beneficiará del presente proyecto de manera que podrá identificar de la magnitud del daño que puede ocasionar los pesticidas a la salud y así se pueda prevenir en gran medida los riesgos y posibles daños a futuro.

**Costos e incentivos:** Usted **no** pagará ningún costo monetario por su participación en la presente investigación. Así mismo, no recibirá ningún incentivo económico ni medicamentos a cambio de su participación.

**Confidencialidad:** Nosotros guardaremos la información recolectada con códigos para resguardar su identidad. Si los resultados de este estudio son publicados, no se mostrará ninguna información que permita su identificación. Los archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al equipo de estudio.

**Derechos del paciente:** La participación en el presente estudio es voluntaria. Si usted lo decide puede negarse a participar en el estudio o retirarse de éste en cualquier momento, sin que esto ocasione ninguna penalización o pérdida de los beneficios y derechos que tiene como individuo, como así tampoco modificaciones o restricciones al derecho a la atención médica.

**Preguntas/Contacto:** Puede comunicarse con el Investigador Principal Jheydy Shomara Areste Castro, teléfono: 960300071 y correo electrónico: [jheydy.arestel@gmail.com](mailto:jheydy.arestel@gmail.com).

Así mismo puede comunicarse con el Comité de Ética que validó el presente estudio, Contacto del Comité de Ética: Dra. Yenny M. Bellido Fuentes, presidenta del Comité de Ética de la Universidad Norbert Wiener, para la investigación de la Universidad Norbert Wiener, **Email:** comité.[etica@uwiener.edu.pe](mailto:etica@uwiener.edu.pe)

## II. DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

He leído la hoja de información del Formulario de Consentimiento Informado (FCI), y declaro haber recibido una explicación satisfactoria sobre los objetivos, procedimientos y finalidades del estudio. Se han respondido todas mis dudas y preguntas. Comprendo que mi decisión de participar es voluntaria y conozco mi derecho a retirar mi consentimiento en cualquier momento, sin que esto me perjudique de ninguna manera. Recibiré una copia firmada de este consentimiento.

---

Nombre **participante:**

DNI:

Fecha: (                    )

---

Nombre **investigador:**

DNI:

Fecha: (                    )

---

Nombre testigo o representante legal:

DNI:

Fecha: (                    )

***Nota:** La firma del testigo o representante legal es obligatoria solo cuando el participante tiene alguna discapacidad que le impida firmar o imprimir su huella, o en el caso de no saber leer y escribir.*

**ANEXO 2: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS																						
N° Participantes	DATOS DEMOGRÁFICOS						DATO DE ESTILO DE VIDA											Recuento de MNs (%)	OTROS DATOS			
	Nombres completos	Edad	Sexo	Estado civil	Nivel de educación	Ocupación	Cantidad de pesticidas utilizados	Frecuencia de uso de pesticidas			Tiempo de exposición a pesticidas (horas / semana)					Estado de salud actual			Correo electrónico	Teléfono	DNI	
								Baja	Modera	Alta	De 1 a 5	De 5 a 10	De 10 a 15	De 15 a 20	Mayor a 20	Buena	Regular					Mala



## ● 15% Overall Similarity

Top sources found in the following databases:

- 14% Internet database
- 4% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database
- 8% Submitted Works database

### TOP SOURCES

The sources with the highest number of matches within the submission. Overlapping sources will not be displayed.

1	<b>repositorio.uwiener.edu.pe</b> Internet	4%
2	<b>medigraphic.com</b> Internet	1%
3	<b>researchgate.net</b> Internet	<1%
4	<b>englishcurc.files.wordpress.com</b> Internet	<1%
5	<b>coursehero.com</b> Internet	<1%
6	<b>docplayer.es</b> Internet	<1%
7	<b>Lina Marcela Barrera, León Darío Ortiz, Hugo Grisales, Mauricio Rojas, ...</b> Crossref	<1%
8	<b>elsevier.es</b> Internet	<1%