

131
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis genotóxico de Radón 222 en
Drosophila melanogaster mediante la prueba
de Mutación y Recombinación
Somática.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A:

ABEL MARTINEZ OCAMPO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ciudad Universitaria, D.F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

Agradecimientos.....	0
Introducción.....	1
Capítulo 1.Generalidades de la radiación.....	4
Capítulo 2.El radón y su impacto en la salud pública.....	12
Capítulo 3.Ensayos biológicos con radón.....	18
Capítulo 4.El sistema <i>Drosophila</i> como organismo de bioensayo.....	24
Material y método.....	29
1.Monitoreo de radón.....	29
Los DTNES y el monitoreo de radón.....	29
El grabado químico.....	31
Sistemas y técnicas de conteo.....	32
2.Evaluación mediante el ensayo SMART-ala del radón.....	34
Análisis estadístico del sistema SMART-ala.....	37
Resultados.....	39
Monitoreo de radón.....	39
Valoración de radón mediante SMART-ala en <i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	39
Discusión	45
Monitoreo radiológico.....	45
Respuesta obtenida por el ensayo SMART-ala para el Rn..	47
Perspectivas del bioensayo SMART-ala en <i>Drosophila</i> , como un sistema de prueba integral de daño genético.....	51
Conclusiones	54
Tablas y figuras.....	55
Bibliografía.....	96

INTRODUCCION

CANCER Y SALUD PUBLICA.

Durante los últimos 150 años se ha experimentado una progresiva eliminación de las enfermedades infecciosas, cuya incidencia se consideraba, como la principal causa de muerte en los grandes núcleos de población humana, esto, entre otros factores, ha ocasionado una vertiginosa explosión demográfica debido a que la mayoría de los recién nacidos llega a la edad reproductiva. En los países industrializados la esperanza de vida ha pasado de los 30 a los 70 años, particularmente, en nuestro país, la esperanza de vida del mexicano es de 60 años. Por otro lado, este fenómeno ha hecho destacar el incremento en la incidencia de cierto tipo de enfermedades peculiares de la vejez, como son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (PUIS, 1985).

En la figura 0.1, se representa la distribución de las edades de muertes ocurridas en un intervalo de 12, 000 mil años antes del presente. En este gráfico, se observa que entre los años 10, 000 A.C. y 1850 D.C., hubo un cambio en la edad mortuoria extraordinariamente reducido, el cambio realmente significativo se ha establecido en los últimos 140 años de la historia del hombre. Al margen de la **mortalidad infantil**, las muertes solían abarcar a casi todos los grupos de edad; sin embargo, en el año de 1972, más del 8% de todas las muertes afectaban a las personas de más de 60 años. En otras palabras, la muerte en los grandes centros urbanos ha sido relegada a los ancianos (Dumond, 1985).

En las sociedades occidentales, el 1% de la población muere cada año. Aproximadamente la mitad de estas muertes es debida a enfermedades vasculares, siendo la segunda mayor causa de muerte, el cáncer. Los dos tipos de enfermedades están asociados con el envejecimiento (V.S. U. S., 1968).

Los cánceres pueden surgir en cualquier parte del cuerpo, aunque algunos sitios son afectados más frecuentemente que otros. Cada cáncer procede de una sola célula (proceso monoclonal), que en un momento determinado, traspasa sus límites territoriales y es capaz de formar una nueva línea celular que se reproduce sin límite (Fialkow, 1974).

Cuando estas células se multiplican sin algunos de los límites normales, pero sin sobrepasar su terreno histológico, es decir, no invaden tejidos vecinos, forman **tumores benignos**, por ejemplo, los lunares cutáneos; si las células transformadas han adquirido la

habilidad de diseminarse hasta lugares distantes, como por ejemplo los tejidos vecinos o regiones alejadas a las que llegan por medio de la circulación sanguínea, entonces se les denomina **tumores malignos**, en síntesis, la proliferación sin control es uno de los aspectos de letalidad en el estado canceroso y el otro, igualmente importante, es la tendencia del grupo de células malignas o transformadas a separarse del sitio de proliferación primaria (metástasis), siendo este último, el factor letal que impide detener al cáncer a través de la cirugía local (V.S. U. S., 1972).

La mayoría de los cánceres malignos del hombre pueden caracterizarse en tres grupos: primero, están los **sarcomas**, que se desarrollan en múltiples tejidos de sostén del cuerpo; el segundo es un grupo muy heterogéneo de cánceres que incluye a los diferentes tipos de **leucemias** y se originan en las células productoras de leucocitos y el sistema inmune; por último, están los **carcinomas**, que se originan en los estratos celulares o epitelios que recubren la superficie del organismo (por ejemplo, la piel, el tracto respiratorio y digestivo) y revisten múltiples glándulas del cuerpo (mama, páncreas, tiroides). De hecho, de estas tres clases, los carcinomas son numéricamente los más importantes, por poseer un contacto más íntimo con los diversos factores del medio ambiente, (Fialkow, 1974).

En total se reconocen unas doscientas variedades de cáncer, siendo la mayoría de ellos muy raros (afortunadamente) (Albert, 1977). La tabla 0.1, muestra las principales variedades de cáncer, con respecto al número de muertes que causa en los EEUU cada año, (V.S. U. S., 1968). Casi la mitad de todas las muertes son debidas al cáncer de mama, intestino grueso y **pulmón**. Este último es la **única variedad de cáncer que causa más pérdidas de vida laboral que el homicidio y el suicidio, y que además, su incidencia tiende a aumentar con el tiempo**, ver fig.0.2.(Burban, 1971).

A juzgar por la epidemiología del cáncer en el hombre, parece claro que dos son los factores más importantes en su incidencia: el incremento en el periodo de vida media en el hombre y la gran variedad de nuevos factores químicos, biológicos y físicos de nuestro medio ambiente (por ejemplo, los fármacos, los virus y **las radiaciones ionizantes**), que varían de un lugar a otro y de una generación a otra (Cairns, 1981).

Asimismo, por ejemplo, al evaluar la actividad mutagénica de los agentes carcinogénicos, la gran mayoría han resultado ser también mutagénicos, tanto en estudios epidemiológicos como en ensayos animales (Ames, 1973). Es por ello, que se considera actualmente a las pruebas de mutagénesis como la primera etapa en la evaluación del potencial carcinogénico de un agente ambiental.

Existen bioensayos animales que poseen una alta correlación de respuesta con el humano, estas pruebas pueden dividirse artificialmente en: pruebas *in vitro* y pruebas *in vivo*, sin embargo, es importante tomar en cuenta que los análisis *in vitro* se concentran en células que proliferan en un cultivo, en contraposición a las células que crecen en un tumor *in vivo*; aunque las propiedades de las células se pueden estudiar con más facilidad en cultivos celulares, el sistema es sumamente artificial y se debe ser muy cuidadoso si se quiere correlacionar el comportamiento de las células en estas condiciones tan diferentes (Karp, 1987).

Al respecto, en el presente trabajo de tesis, se valoró la respuesta de un bioensayo genético en *Drosophila melanogaster*, el bioensayo SMART-ala, para un factor físico ambiental, el gas radón ^{222}Rn (Rn^{222}), que ha probado ser un agente inductor de carcinogénesis pulmonar. El bioensayo SMART-ala, es una prueba que se realiza *in vivo*, y que proporciona un índice alto de correlación mutagénesis-carcinogénesis, y que a su vez, puede generar elementos de juicio que permitan con el tiempo establecer los niveles aceptables de exposición a este gas en los interiores habitados por el hombre, ya que por ser un agente ambiental contenido en la corteza terrestre, no se puede limitar del todo su exposición.

En los capítulos siguientes, se presenta una breve descripción bibliográfica acerca de las generalidades de la radiación ionizante, de los efectos biológicos del Rn, particularmente de los ensayos biológicos animales realizados para este gas, y finalmente la justificación del sistema *Drosophila*, como organismo de prueba para evaluar a este agente físico ambiental.

CAPITULO 1:

GENERALIDADES DE LA RADIACION.

Si se analizan con detenimiento los procesos biológicos de un organismo, se observa que existen múltiples fenómenos físicos involucrados, por ejemplo: problemas de dinámica de fluidos en la circulación sanguínea, fenómenos eléctricos en los estímulos nerviosos, elasticidad en la dilatación pulmonar y otros.

Las primeras relaciones entre la Biología y la Física, se establecieron cuando la primera trascendió su etapa descriptiva; y fue entonces cuando los biólogos de ese tiempo estructuraron corrientes como el funcionalismo, el mecanicismo, que intentaban dar respuesta a la gran incógnita que aún tiene vigencia: *¿cómo se organizan y funcionan los procesos vitales de un organismo?*

Los notables experimentos realizados por J.R. Mayer, en los que analizaba la cantidad de calor que recibe y cede un organismo, establecieron las conexiones preliminares entre estas dos ciencias; gracias a ello la Física se vió enriquecida por la Biología, al estudiar los principios básicos de la conservación energética en sistemas abiertos. Por lo tanto, fue la concepción del término "energía", la clave que vinculó a ambas ciencias.

Existen formas realmente complicadas de abordar un tema de energética, una de las más complejas, (y que queda al margen de la presente revisión), intenta definir la esencia de la energía. Quizá sea esta la razón por la cual la definición más breve y comúnmente utilizada, afirma que la energía es todo aquello capaz de producir o realizar un trabajo. Por lo tanto, referirse a la energía indirectamente por sus efectos e interacción con la materia, es menos complejo que intentar definirla por sí misma.

De entre los múltiples tipos de energía que se manifiestan en los seres vivos, la **energía radiactiva**, juega un papel muy importante; ya que ahora, no sólo la exposición a fuentes naturales como los rayos cósmicos, la radiación ultravioleta o las emisiones de radionúclidos minerales inciden sobre los organismos, sino que además, se han incrementado las fuentes artificiales de este tipo de energía, sobre todo en el presente siglo, debido fundamentalmente, al belicismo, accidentes en plantas nucleoelectricas, exámenes de diagnóstico médico, radioterapia, etc.

Sin embargo, para considerar cualquier tipo de interacción entre la energía y la materia, es necesario, remitir un principio básico de la Física, establecido por De Broglie a mediados de los años veinte, en el que se afirma: "... la radiación se comporta en ocasiones

como una partícula y otras como una onda". Toda radiación tiene esta característica básica, que es una manifestación de la dualidad onda-partícula de la materia ...", (Martin, 1972).

En términos generales, existen dos tipos básicos de radiación, que se diferencian por su interacción con la materia; estos son la radiación que produce una ionización despreciable y la radiación altamente ionizante. La luz visible, los rayos ultravioleta e infrarrojos son ejemplos de radiación "no ionizante"; mientras que la radiación ionizante es toda aquella capaz de producir ionización, es decir, es aquella radiación con suficiente energía (> 10 electrón volts, eV) para expulsar de las órbitas periféricas a los electrones de los átomos donde incide la radiación; dentro de este intervalo de energía se incluye a los rayos X, los rayos gamma y las partículas de alta velocidad, emitidas a través del decaimiento radiactivo, como es el caso de la radiación alfa, beta y los fragmentos de fisión¹ (Price, 1971)

Como se explicará más adelante, es de especial interés para el presente trabajo definir a la **radiación alfa**, la cual está constituida por núcleos de helio, que son partículas con masa (aprox. 4 uma), con carga positiva que pueden tener energías relativamente grandes del orden de 10 megaelectrón voltios; y que al incidir sobre la materia interaccionan mediante fuerzas columbianas con los electrones de los átomos blanco, sacándolos de sus orbitales, por lo que, estas radiaciones tienen alta capacidad de ionización directa sobre la materia, a la vez que poseen una baja penetración.

Al interactuar con la materia, la radiación alfa genera iones positivos y electrones libres, este fenómeno se denomina **ionización primaria**, es decir que al viajar esta radiación cierta distancia o alcance dentro de un medio, va generando a su paso pares iónicos (iones positivos y electrones libres) hasta que su energía cinética es prácticamente cero y se frena, entonces, este núcleo de helio captura dos electrones libres y vuelve a su estado basal (Price, 1971).

Sin embargo en términos generales, una de las características especiales de la radiación ionizante, y que comúnmente no comparte con la radiación no ionizante, es que no son fácilmente perceptibles,

¹ La desintegración radioactiva transforma un núcleo inestable en una configuración más estable de menor energía. Desde hace tiempo se conocen cuatro formas de desintegración radiactiva, que respectivamente dan lugar a la emisión de radiación : alfa (núcleos de helio), beta (electrones, positrones, neutrinos y antineutrinos), gamma (fotones) y fragmentos de fisión (nuclidos hijos provenientes del desdoblamiento de un núcleo más grande con su respectiva emisión de neutrones), siendo todas partículas o cuantos con energía relativamente grande.

por lo tanto, se recurre a detectores de radiación, que son dispositivos o instrumentos especiales que por su particular sensibilidad dan cuenta del origen de una fuente y su actividad ². En forma general, estos detectores se pueden clasificar en dos grupos, los de registro permanente y los de señal instantánea; así, las emulsiones fotográficas, los dosímetros termoluminiscentes, los dosímetros químicos y los Detectores de Trazas Nucleares en Estado Sólido (DTNES) ³, son ejemplos que ilustran a los detectores de registro permanente, mientras que, los detectores de ionización por gas y los de centelleo son algunos ejemplos para los detectores de señal instantánea, que indican la presencia de la radiación mediante una señal selectiva, que puede traducirse en un sonido, en el avance de una escala digital o en la lectura de una carátula, (existen, incluso monitores comerciales que detectan la actividad del gas radón) (Morgan, et.al. 1967).

La instrumentación asociada a la detección de la radiación ionizante es reciente, sin embargo, este tipo de radiación ha acompañado al ser humano y a toda forma de vida existente en nuestro planeta desde su génesis, por ejemplo, las múltiples teorías esbozadas para la "evolución química" en nuestro planeta se basan en las hipótesis establecidas por Oparin y Haldane, cuyos planteamientos proponen que "... la acumulación de materia orgánica en la superficie terrestre sufrió una transformación que originó moléculas orgánicas más complejas y culminó con la formación de los seres vivos". Diferentes fuentes de energía han sido propuestas como contribuyentes a las síntesis orgánicas durante la evolución química: el calor de los volcanes, las descargas eléctricas, la energía sónica generada por ondas en los océanos u ondas de choque producidas por

² La actividad radiactiva, se define como el número de átomos que se desintegran en una muestra de material radiactivo en un intervalo de tiempo dado; una alta actividad indicará una alta velocidad de desintegración. Comúnmente la actividad se expresa en Curies (Ci), $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10}$ desintegraciones por segundo), o su equivalencia en Bequerels (Bq); la actividad específica de una muestra radiactiva se expresa en Bq / unidad de masa de radionúclido respectivo, y si este es un gas, (p.ej. radón), esta actividad específica será indicada en Bq /unidad de volumen.

³ Los detectores por trazas en estado sólido son vidrios o plásticos en donde queda latente la huella dejada por la radiación, y que al recibir un ataque químico, ésta aparece y puede distinguirse como una perforación al microscopio de campo claro.

el paso de un meteoro y la radiación proveniente de elementos radiactivos ⁴(Negrón, 1986).

En algunas de las fuentes radiactivas propuestas, realmente es difícil evaluar la magnitud con la cual contribuyeron a las síntesis orgánicas, pero en la actualidad, el panorama de la interacción de las fuentes naturales radiactivas en los seres vivos es más claro.

Básicamente, pueden distinguirse tres fuentes naturales de radiación ionizante importantes: los rayos cósmicos, constituidos por partículas de alta energía y radiación electromagnética; Los radioisótopos contenidos en los alimentos que ingerimos, principalmente debido a los isótopos K^{40} , C^{14} ⁽⁵⁾; y finalmente, los isótopos inestables que se encuentran entre los materiales que forman la corteza terrestre, con una vida media de millones de años y que continúan hoy en día, decayendo y emitiendo radiación en forma espontánea; en este caso, la mayor contribución a la radiación proviene de un isótopo del radón (Rn) (fig.1.1) (Espinosa, 1990).

Por lo tanto, sigue siendo importante analizar la interacción que este tipo de radiación tiene con los seres vivos, ya que los puede afectar en diferentes formas y niveles, y por lo tanto, se justificó el estudio de este tipo de interacciones en una rama de la biofísica, la radiobiología, cuyo desarrollo se inició inmediatamente después del descubrimiento de los rayos "X" por Roetgen en 1885. Desafortunadamente no se pudo apreciar, en forma inmediata, los efectos lesivos que originó la difusión amplísima del uso de este tipo de energía, que incluso se llegó a utilizar para el tratamiento del reumatismo ⁶(Díaz, 1990).

⁴ Actualmente, se está revalorando el papel que la radiación ionizante tuvo en la Tierra primitiva algunas de las fuentes propuestas en este sentido son: la actividad de radionúclidos, como el K^{40} , Th^{232} , U^{235} , U^{238} , U^{244} , el viento solar, los rayos cósmicos, los reactores nucleares naturales (donde se producen las mismas radiaciones y radionúclidos que en los reactores artificiales actuales), y elementos superpesados con un número atómico entre 116 y 124.

⁵ El potasio 40, es un radionúclido singular, que no pertenece a alguna de las tres familias madres de decaimiento, y que se genera por la contaminación de núcleos pesados; asimismo, los rayos cósmicos al incidir sobre el nitrógeno atmosférico producen el carbono 14, que se encuentran en toda la materia orgánica.

⁶ El uso indiscriminado de las radiaciones para fines terapéuticos, el aislamiento por primera vez de elementos radiactivos y la utilización de técnicas de marcaje que se traducían en exposiciones necesarias para los individuos involucrados, dió lugar a que a principios de siglo, se erigiera un monumento en Hamburgo a la memoria de quienes habían fallecido como consecuencia de los efectos de las radiaciones ionizantes.

En 1903, los biólogos franceses, Bergonie y Tribordeau, formularon la siguiente ley: "...la respuesta celular a las radiaciones está en función directa de su grado de anaplasia y en función indirecta de su grado de diferenciación...", en otras palabras, las células menos diferenciadas y con mayor actividad reproductiva, como las del tejido hematopoyético, son más radiosensibles que las células de tejidos bien diferenciados, como las células nerviosas o las del tejido renal (Díaz, 1990).

Posteriormente, en los años treinta, se observó que los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes se manifestaban en función de la energía absorbida por un tejido y/o del número de ionizaciones que se presentan por unidad de longitud. También a nivel celular, se aceptó que el mayor grado de radiosensibilidad para generar un daño cromosómico, es la fase G2 del ciclo celular, (UNCSEAR, 1977).

Con base en estos hechos, se entiende que existe una relación directa entre la cantidad de ADN nuclear y la radiosensibilidad celular.

Actualmente, se sabe que el efecto de la radiación se va a presentar tanto a nivel de la membrana ⁷(Stark,1991), como en la cromatina nuclear ⁸, sin embargo, en esta última región es donde se han encontrado alteraciones hereditarias no letales que pueden establecer genealogías de células alteradas a partir de la célula diana afectada (Alper, 1979). Cuando se produce una alteración sobre la cromatina nuclear, y esta ocurre durante una división mitótica, la célula no tendrá el tiempo necesario para reparar el daño antes de que se produzca la división, entonces, las células hijas recibirán las alteraciones cromosómicas producidas (Wüergler, 1980).

Por otro lado, se ha demostrado el efecto del oxígeno en relación al daño cromosómico; Lararget y Gray, expresaron la relación estrecha que existe entre este gas y las alteraciones cromosómicas observadas. Gray dejó establecido que existe un paralelismo entre el número de pares iónicos producidos por unidad de longitud y la concentración de H₂O; así como la producción de H₂O₂ y la frecuencia de aberraciones cromosómicas. Esto es claro para concentraciones

⁷ Se ha observado que los sistemas de transporte de la membrana, pueden ser afectados por la radiación de dos maneras: la inactivación directa por radicales libres (p.ej. canal de gramí-cidina) o mediante la lipoperoxidación (en la que se está estudiando el índice de dosis-efecto inverso), y cuyos productos se especula interactúan con el ADN, contribuyendo a los procesos mutagénicos y carcinogénicos.

⁸ La radiación cambia la estructura, la síntesis y la función de los ácidos nucleicos así como las proteínas involucradas con la ADN-polimerasa llegando a bloquear por completo la síntesis.

bajas de O_2 , pero cuando esta concentración rebasa el 20%, se registra un ligero incremento en las aberraciones cromosómicas, a pesar de que la producción de H_2O_2 siga en aumento. Wolf demostró por su parte, que el rompimiento cromosómico es dependiente de la concentración de O_2 , pero también estableció que el periodo para reunión cromosómica a su vez depende de la cantidad de O_2 celular, (Alper, 1979; Díaz, 1990; Martin, 1972).

Por último, se han encontrado diferencias entre las radiaciones ionizantes para generar lesiones en el ADN (roturas en la cadena); las formas menos energéticas de radiación, como los rayos "X" y los rayos gamma, producen roturas en sólo una de las cadenas del ADN, mientras que, las formas más energéticas de radiación (por ejemplo, los neutrones) normalmente rompen ambas cadenas de la molécula y, por consiguiente, la interacción con un sólo neutrón, por ejemplo, puede provocar una mutación, y así, la tasa de mutación se incrementa en proporción directa a la dosis. Esta distinción fue "demostrada claramente" por las bombas atómicas lanzadas sobre Japón en 1945. La bomba soltada en Nagasaki, produjo esencialmente rayos "X", y en esta ciudad la subsecuente incidencia de leucemia parece haber sido proporcional al cuadrado de la dosis; en Hiroshima, donde la bomba produjo gran flujo de neutrones, la leucemia fue directamente proporcional a la dosis (ver fig. 1.2) (Rosi, H.; Kellerer, M. 1974).

Todo lo anterior, establece que no sólo la inactivación de las moléculas biológicas, se incrementa **directamente** en forma exponencial con respecto a la dosis absorbida, y que el daño se produce por la interacción de la radiación ionizante con moléculas en particular, como establece la teoría del "blanco" ⁹, con sus correspondientes restricciones acerca de los efectos de las dosis bajas y cuyas hipótesis cerca del umbral de respuesta **p** cáncer están representadas en la fig. 1.3, (Murkhejee, et.al., 1991), sino que además, las moléculas biológicas en solución son afectadas **indirectamente**, por los radicales libres que se forman fundamentalmente cuando la radiación interactúa con el agua, (Stark,

⁹ Según esta teoría, la probabilidad de interacción con la radiación aumenta a medida que aumenta el tamaño de las moléculas, por lo que los ácidos nucleicos son los más afectados por ser las moléculas más grandes que existen en la célula, sin embargo, con respecto a las radiaciones de "bajo" nivel (menos de 0.2 Gray), la información disponible no confirma el riesgo de cáncer derivado de su exposición. A pesar de ello, la hipótesis biológica es conservadora y se basa en una relación lineal de dosis- respuesta, que supone que toda exposición a la radiación, por pequeña que sea la dosis, podría en principio, producir determinados efectos sobre la salud, no considerando los sistemas de reparación celular.

1991). Hasta la fecha, no se conoce ningún agente altamente ionizante que, en particular, produzca exclusivamente un tipo de alteración al genotipo celular (Alper, 1979).

A nivel genético, además de las aberraciones cromosómicas, existen otro tipo de eventos genéticos señalados como efectos de la radiación. Las deleciones terminales, son ejemplos de mutaciones puntuales que pueden ser inducidas por la radiación; en cuanto a las mutaciones cromosómicas, es común encontrar duplicaciones, deficiencias (terminales e intercalares), translocaciones, inversiones (paracéntricas y pericéntricas), y anillos (Sankaranarayanan, 1975).

Además, las deficiencias, duplicaciones, inversiones y traslocaciones, provocan rupturas cromosómicas que pueden inducir *intercambios entre cromátidas hermanas mitóticas*, y que por parámetros como la persistencia celular biocompatible y la radiosensibilidad restringida a la fase S del ciclo celular, se puede distinguir de una aberración cromosómica (Godenough, 1981).

Por último, las mutaciones letales dominantes y la recombinación mitótica (recombinación recíproca entre dos cromosomas homólogos), son eventos que también pueden ser inducidos por la radiación ionizante; al respecto, este último tiene como consecuencia genética la homocigosis de un gen, (Wüergler, et. al.1986).

Para explicar la posible correlación genética entre esta **recombinogénesis y la carcinogénesis**, es preciso entender, que uno de los rasgos más característicos de las células cancerosas estriba en que responden de manera anormal a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales, y continúan dividiéndose de una forma relativamente incontrolada, hasta que matan al individuo.

A pesar de que los mecanismos moleculares reales que intervienen en este proceso continúan siendo desconocidos, parece ser que la respuesta está en comprender los mecanismos de control en la división celular; la diferencia fundamental entre las células normales y tumorales se ha explicado de diversas formas, una de ellas involucra a las reordenaciones cromosómicas heredables, por ejemplo la **recombinación mitótica**. Prácticamente todas las células tumorales humanas tienen varias anomalías cromosómicas, incluidas traslocaciones, supresiones y duplicaciones, la mayoría parecen ser fortuitas, pero en algunos casos se encuentra de manera reproducible un cambio cromosómico específico en un tipo particular de tumor, por ejemplo, las células cancerosas de leucemia mielogénica crónica presentan una translocación entre los extremos distales de los cromosomas 9 y 22, análogamente, las células

"linfoma de Burkitt", que afecta a los niños africanos, presentan una traslocación específica entre los cromosomas 8 y 14, (Alberts, et.al.1985).

Se ha postulado que estos cambios cromosómicos reproducibles, trasladan un gen que codifica una proteína reguladora, acercándola a otro gen que se expresa muy frecuentemente, de forma que la proteína reguladora se sintetiza en cantidades anormalmente elevadas. Esta hiperproducción podría estar generada por cambios en la estructura cromatínica del gen traslocado y al parecer podría desempeñar un papel importante en el sentido de permitir a la célula en particular (de la que surgirá el tumor), escapar de sus controles normales de crecimiento y proliferar(Alberts, et.al.1985). Finalmente en la figura (1.4) se esboza un diagrama hipotético de los procesos que involucran a la carcinogénesis.

CAPITULO 2.

EL RADON Y SU IMPACTO EN LA SALUD PUBLICA.

De los isótopos de radón (Rn) existentes en la naturaleza, el Rn ²²² es el más importante debido a que se encuentra en mayor o menor grado en todo tipo de ambientes. Este isótopo es un gas radiactivo, incoloro e inodoro que está presente en suelo aire y agua. Se produce fundamentalmente, por la desintegración del radio 226 (Ra ²²⁶), y decae por emisión de partículas alfa en un isótopo del polonio (Po ²¹⁸) que, por nueva desintegración a través de isótopos del plomo, el bismuto y el polonio, termina su serie de decaimiento con un isótopo estable del plomo (Pb ²⁰⁶). En la tabla 2.1 se proporcionan otros datos físicos del radón, como son: periodo de desintegración, energías e intensidades de radiación, etc. (Lederer, et al,1978; Weast, et al,1968).

El radón es un gas noble, químicamente inerte (el octeto de su capa de valencia está completo), y se encuentra englobado en un 90% o más en casi todos los materiales rocosos, que contienen fundamentalmente su precursor, el Ra ²²⁶. Inclusive, existen ciertas zonas en el mundo, la región del granito en Francia o ciertas localidades de Brasil, donde el contenido natural de radón presente en el ambiente es hasta seis veces el valor promedio mundial, que corresponde a unos cuantos bequerels por metro cúbico (Bq/m³) (O'Riordan, 1980).

El efecto perjudicial del radón se conoce desde el siglo XVI, cuando en ciertos mineros de Europa Central se observaba una afección respiratoria a la que se le dió el nombre de "Schneebergkrankheit" ("Enfermedad de mina en Montaña de Nieve") (UNSCEAR,1977).

Sin embargo, fue hasta inicios de los años cincuenta del presente siglo, que se observó un incremento en la incidencia de cáncer pulmonar en la población minera del uranio en Europa y E.E.U.U., hecho que promovió estudios epidemiológicos en humanos y en sistemas experimentales cuyos resultados identificaron una relación entre las exposiciones agudas y crónicas al gas radón y el incremento en la incidencia de cáncer pulmonar (Nazaroff, et al,1988).

Ya en la década de los ochentas, fue cuando se identificó al radón como un problema de salud pública, puesto que monitoreos realizados en Suiza, Canadá y E.E.U.U. demostraron que muchos de los niveles encontrados en casas habitación y otros interiores eran similares a los hallados en las minas de uranio donde se registraba una alta contaminación por el gas radón y su progeñie (UNSCEAR, 1988).

Inclusive, en 1988, el gobierno de los EEUU promulgó un decreto abatiendo el nivel aceptable de radón en interiores, de 150 Bq/m^3 a 15 Bq/m^3 , a pesar de todas las consecuencias que esta determinación ocasiona, tanto en el campo de la radioprotección, física médica, arquitectura, diseño, construcción e ingeniería, como en la economía y política de vivienda poblacional (Espinosa, 1990a).

Por lo tanto, el problema fundamental actualmente, es determinar los niveles aceptables de radón en espacios cerrados, entendiendlo que cualquier tipo de legislación debe ser respaldada por el conocimiento y la certeza de un efecto biológico nocivo para la salud, ya sea mediante estudios epidemiológicos o sistemas experimentales "in vivo". Puesto que si existiera esta relación causa-efecto en un nivel más bajo del ya establecido como aceptable, se tendrían que modificar múltiples hábitos de vivienda en diversas partes del planeta. Por ejemplo, en el caso de México, Espinosa reporta los niveles de Rn encontrados en el interior de casas-habitación en el sur de Distrito Federal y determina que el monitoreo más alto fue del orden de 458 Bq/m^3 , es decir, tres veces más que el nivel aceptado para interiores en EU (150 Bq/m^3) y subraya la necesidad de precisar el estudio de los niveles de Rn en todo el país (Espinosa, 1990b).

Este problema en particular, conlleva a un fenómeno más amplio: definir cuál es el efecto biológico de las "bajas dosis" de radiación ionizante, con todas las complicaciones probabilísticas que esto ocasiona, ya sean físicas (p.ej. dualidad partícula-onda en el caso de la radiación ionizante), o biológicas (p.ej. la capacidad de los mecanismos de reparación del ADN y otros procesos homeostáticos en los seres vivos) (fig. 2.0).

Por otra parte, el riesgo asociado a la incidencia de un cáncer pulmonar no se debe fundamentalmente al gas radón, sino a sus productos de decaimiento, referenciados como progenie de decaimiento de vida corta, especialmente, el polonio 218 y polonio 214, respectivamente, cuya contribución a la dosis primaria por radiación alfa se ha demostrado que es arriba del 95% (O'Riordan, 1981).

Asimismo, el gas radón como elemento radiactivo, tiene una serie de cambios a través del tiempo, transformándose en diferentes productos sólidos, por ejemplo, los polonios, mismos que se adhieren a los materiales presentes en el interior de una casa, incluyendo paredes, techos y polvos, estos últimos pueden ser considerados aerosoles (Mercer, 1976; Kotrappa, et al, 1978).

Por lo tanto, el riesgo asociado a altos niveles de radón radica en que las partículas sólidas adheridas a aerosoles, sean inhaladas y queden dentro de los pulmones; algunas de ellas al liberar partículas

alfa, incrementan la posibilidad de aparición de un cáncer pulmonar (UNSCEAR, 1977). En la tabla 2.1, se pueden observar el tipo de emisión y energías correspondientes a la progenie del radón (Durrani, et al,1985).

Como ya se mencionó en el capítulo 1, la radiación alfa está constituida por núcleos de helio, estos tienen alto poder de ionización pero bajo poder de penetración, son fácilmente detenidos por una hoja de papel o por la piel del cuerpo; sin embargo, si la progenie del radón es inhalada, esta misma energía alfa, emitida por los radionúclidos de la progenie, puede penetrar y dañar el sensible tejido localizado dentro de los pulmones (Holleman, et al,1969; Gastineau, et al,1977).

Por otra parte, el comportamiento del radón en espacios cerrados está determinado por diversos factores que justifican su estudio por separado. El espacio cerrado puede ser una casa, apartamento, mina, túnel, sótano o cualquier otro sitio con nula o baja tasa de ventilación.

Los cambios de concentración de radón y su progenie en el aire, se rigen en términos generales por: *una tasa de exhalación* de posibles fuentes del gas, los *fenómenos de desintegración radioactiva* (equilibrios radiactivos), *adherencia o recombinación* (depósito, sedimentación) y *transporte* por dispersión mediante una corriente de aire de la progenie sólida del Rn (UNSCEAR, 1977).

En múltiples casos, estos factores incrementan la concentración de la actividad del Rn y su progenie en interiores, por lo tanto esta acumulación está íntimamente relacionada con la dosis de radiación depositada en una célula o un tejido blanco. Una tasa de ventilación baja, por ejemplo, tiene una relación inversa con el aumento relativo de la concentración de la actividad alfa potencial del Rn y su progenie, (en la fig. 2.1, puede apreciarse como influye una tasa de ventilación en un espacio cerrado)¹ (Stranden, et al,1979).

El factor que corresponde a la capacidad de emanación de las fuentes, se refiere a las tasas de exhalación de los materiales presentes en una casa-habitación. Así, el Rn acumulado en un interior, se origina por la liberación del gas encerrado en las paredes, el suelo y demás estructuras construídas con piedra, tierra u otros materiales rocosos (fig. 2.2) (OECD, 1987; Pensko, et al,1980; Hamilton, et al,1971). El gas natural que contiene Rn, puede ser también una fuente importante de este núclido. La elaboración industrial de gas natural en bruto, implica la eliminación de impurezas y la separación de hidrocarburos. Algunos de éstos, principalmente el propano y el butano, se embotellan a

¹ La energía alfa potencial de un átomo en la cadena de decaimiento del Rn, se define como la energía alfa total emitida por ese átomo hasta su trasmutación en pb210.

presión para su venta como gas petróleo licuado (G.L.P.), mientras que los demás se utilizan como combustibles o para procesos en la industria química; cuando se quema gas de este tipo (GLP) en una casa, se libera Rn que eleva el nivel de este nucleído dentro del edificio (Gasell, 1977).

En minas, túneles y otras construcciones subterráneas, las fuentes de Rn son las rocas, el suelo y el agua. El drenaje o el empleo de grandes cantidades de agua subterránea rica en Rn puede provocar su liberación localmente. Esto puede ocurrir en minas, túneles, cuevas, estaciones hidroeléctricas, subterráneas y balnearios; con respecto a este último, desde hace varios siglos se acostumbra técnicas curativas de balneoterapia (tratamiento de las enfermedades por medio de baños generales o locales en establecimientos ad hoc), y entre los individuos que se expone deliberadamente figuran niños que convalecen de poliomielitis y otras neuropatías² (UNSCEAR, 1977).

En lo que se refiere a los fenómenos de desintegración radiactiva y como se mantienen los niveles del Rn y su progenie, es importante entender como se define el factor de equilibrio "F" que es un índice de equilibrio del radón y su progenie, es decir, la exposición de un individuo a la actividad del radón y su progenie es la integral en el tiempo de la concentración de la actividad del gas, más la integral en el tiempo de la energía alfa potencial de cada uno de los productos de decaimiento, por lo tanto, la suma de estas actividades radiactivas individuales proporciona una actividad radiactiva total, y para el caso en que el hijo tiene una vida media mucho menor que la del padre (que es generalmente el caso del decaimiento en la serie del U^{238} , de donde proviene el Rn^{222}).

H. Bateman, ha formalizado matemáticamente los decaimientos radiactivos para cualquier número de productos, y cuya expresión gráfica se representa en la fig. 2.2.b., en este gráfico se observa que el factor de equilibrio que se acerca a la unidad (donde se espera un equilibrio transitorio o secular) equivale a que toda la progenie involucrada en el equilibrio radiactivo, tenga la misma concentración

² Uzunov y colaboradores terminan su artículo en los términos siguientes: "...no ponemos en duda los muy positivos efectos que la balneoterapia tiene para el ser humano, según los defensores de este tratamiento. Lo que hallamos dudoso es que el radón sea un componente necesario y justificable en el tratamiento. Teniendo en cuenta el empeño que se viene poniendo, a escala mundial, en reducir la irradiación deliberada de los seres humanos, parece un anacronismo evidente exponer a grupos significativos de la población - incluso sin control- a uno de los agentes carcinógenos más fuertes que se conocen, es decir, a los productos de desintegración del radón que producen radiación alfa en la atmósfera."

radiactiva, por lo que se puede hablar de un ambiente radiactivo "constante". Lo importante de todo esto es considerar cómo influyen factores como la tasa de ventilación (Vv) en el rompimiento del equilibrio radiactivo del Rn con su progenie en un espacio cerrado: en la fig. 2.3, se observa que el aumento relativo de la concentración de Rn en un espacio cerrado es mayor cuando la tasa de ventilación es igual a cero (Mustonen, et al,1980).

Por otro lado, los factores de recombinación y adherencia, están íntimamente relacionados con el depósito y la sedimentación de la progenie sólida del Rn, al formarse el primer descendiente del Rn²²², el Po²¹⁸ (que es un pequeño ión libre predominantemente positivo), tenderá a adherirse a moléculas de vapor de agua, gases o polvos suspendidos en el aire (aerosoles con un Diámetro Aerodinámico Mediano de Actividad, DAMA, del orden de 10-2 μ m) y, en posteriores desintegraciones alfa, el átomo o ión radiactivo puede quedar de nuevo libre durante un breve periodo de tiempo, debido a la energía de retroceso cuando se desintegra el radionúclido, para despues volver a unirse a una partícula de aerosol (fig.2.4). Esta adherencia disminuye la velocidad de precipitación de una partícula sólida radioactiva (la velocidad de depósito de los descendientes adheridos caen en el intervalo de 10-5 m/s, mientras que para los descendientes no adheridos es de 10-2 m/s) (Mercer, 1976). Por lo tanto, al estar más tiempo las partículas radiactivas suspendidas en el aire, se incrementa la probabilidad de inhalarlas, permitiendo que se acumulen en el tracto respiratorio.

A su vez, la adherencia de los descendientes del Rn a los aerosoles depende del coeficiente de difusión de los átomos, del número de iones libres, de la humedad relativa, de la concentración o distribución de las partículas de aerosol y, en consecuencia, de las tasas de ventilación Vv (Bricard, et al,1965; Wilkening, et al,1966). Se ha observado que el efecto de la turbulencia del aire en las minas y otros interiores, conduce a una disminución de los descendientes del Rn en el aire, debido a una mayor adherencia a las superficies periféricas en el espacio contenedor del gas, siendo esta tasa de depósito (plateout), aproximadamente 60 veces mayor para los descendientes adheridos que para los no adheridos. Esta tasa de adherencia suele estar comprendida en el intervalo de 10⁻¹-10⁻² s⁻¹, con los valores más altos en el aire polvoriento, (fig.2.5) (Wrenn, et al,1969).

Independientemente del efecto potencial que tuviera por si solo el humo del cigarro como potencial carcinogénico, este humo puede ser definido como un aerosol más que incrementa la concentración de energía alfa potencial en un espacio no ventilado (UNSCEAR,1988).

Con respecto al transporte por dispersión del Rn, las variaciones más significativas en la concentración dependen sobre todo de las condiciones de ventilación, presión barométrica, temperatura, y humedad relativa (fig. 2.6) (Swedjemark, et al,1979).

Además, el hecho que identifica a la inhalación (con respecto a la digestión) de la progenie de vida corta del Rn como la principal vía de exposición- dosis, es que ésta conduce a una distribución bastante uniforme del gas noble en todo el organismo, y a su vez, debido a la baja solubilidad del gas por sí mismo en los tejidos, el equivalente de dosis efectiva resultante por la inhalación del gas, suele ser pequeño comparado con la dosis de radiación que ocasiona la inhalación de los descendientes de vida corta adheridos a aerosoles.

Por lo tanto, las consideraciones o factores antes mencionados se refieren principalmente a la estimación de la radiación entre la exposición o incorporación de la energía alfa potencial debida a los descendientes de vida corta del Rn, y la dosis resultante en los tejidos blanco, principalmente en los pulmones, tiende a ser constante cuando se ven favorecidos estos parámetros, especialmente una alta tasa de exhalación del gas Rn y una tasa de ventilación V_v igual a cero. (UNSCEAR, 1977). El Radón es uno de los contaminantes más bien documentados en interiores. La relación entre la exposición al Rn y la incidencia de cáncer pulmonar, se ha valorado en estudios a largo plazo en mineros del uranio (Nazaroff, et.al.,1988).

Incluso, el Instituto Nacional de Cáncer de los EEUU, ha estimado que de 130 mil muertes reportadas anualmente por cáncer pulmonar, de 5 mil a 20 mil se pueden atribuir al radón en interiores, (USEPA, 1988).

En resumen, es importante hacer notar que el riesgo asociado al radón en interiores esta relacionado con dos factores: el aumento en la concentración de gas radón con sus productos de decaimiento, y una prolongada exposición individual, (USPHS, 1988).

CAPITULO 3:

ENSAYOS BIOLOGICOS CON RADON.

Los estudios en animales se han enfocado por varias décadas a identificar la naturaleza y los niveles de los contaminantes en el aire que pueden ser los responsables de producir cáncer de pulmón entre los mineros del uranio. Ya en el año de 1939 Read, y posteriormente Jackson en 1940, realizaron los primeros estudios que estuvieron concentrados en la evaluación de los efectos patológicos tempranos o a corto plazo del Rn. En estos estudios las exposiciones se basaban principalmente en las concentraciones de radon, dando poca o ninguna importancia a la información de las concentraciones de los productos de decaimiento del Rn. En la década de los cuarenta, se realizaron los primeros estudios donde se indujeron tumores de pulmón, sin embargo, se consideran metodológica o estadísticamente inadecuados para demostrar la relación entre la aparición de tumores pulmonares y la exposición al radón con sus productos de decaimiento (Richmond, et al, 1971).

En los años cincuentas, al observarse un incremento en la incidencia de cáncer respiratorio en las poblaciones mineras del uranio de Europa y EEUU, se iniciaron estudios sistemáticos para identificar los agentes responsables de este incremento y desarrollar relaciones de dosis-respuesta en biosistemas (Cross, et al, 1987). Cohn, en ese tiempo, demostró que el tracto respiratorio de animales que inhalaban Rn y sus productos de decaimiento contiene 125 veces más actividad que aquellos animales que inhalaban Rn únicamente (Cohn, et al, 1953). Shapiro en 1954, expuso ratas y perros a varios niveles de Rn solo y, con la presencia de su progenie adherida a aerosoles, demostrando así, que los productos del Rn adheridos a polvo es un factor primario en la dosis de energía potencial alfa ¹ del epitelio del tracto respiratorio, y que esta dosis es debida principalmente (>95%) a la progenie de vida corta, especialmente Po ²¹⁸ y Po²¹⁴, más que al Rn²²² mismo (Shapiro, et al, 1954).

Básicamente, han sido tres los principales laboratorios que han desarrollado estudios de los efectos de las dosis agudas y crónicas del Rn: la Universidad de Rochester (UR), el Pacific Northwest Laboratory

¹ La energía alfa potencial de un átomo en la cadena de desintegración del Rn, se define, como la energía alfa total emitida durante la desintegración de este átomo hasta Pb 210, por lo tanto, la energía alfa potencial de cualquier mezcla de descendientes de período corto de Rn en el aire, es la suma de la energía alfa potencial de todos los átomos presentes.

(PNL) y la Compagnie Générale des Matières Nucléaires (COGEMA). (Cross, et al, 1988).

En la UR, los investigadores enfocaron su atención en el comportamiento físico y biológico de los productos del decaimiento del Rn, así como de su contribución a la dosis de radiación para el tracto respiratorio (Bale, 1951; Harris, et al, 1954). En estos estudios, que consideraban la relación entre la dosis-respuesta en ratones, ratas y perros expuestos a Rn y su progenie involucraron aproximadamente a 2000 ratones de la línea CAF1, 100 ratas machos Sprague-Dawley, de las líneas estándar (S) y libres de patógenos específicos (SPF) y 80 perros (beagle dogs), así como animales control (Morken, 1955; 1973).

Las exposiciones se efectuaron con aire sin filtrar en una cámara de 2 m³, con una temperatura de 25°C y 50% de humedad relativa, la concentración de polvo fue del orden de 0.1 mg /m³ cuyo Diámetro de Actividad Media Aerodinámica (DAMA), fue 0.2 μm y la fracción de Po²¹⁸ libre es de 20 %. Los aerosoles consistieron de polvo, aceite y gotas de agua. Las concentraciones de Rn fueron aproximadamente de 0.5 μCi/l (1.8 x 10⁷ Bq/m³), en los experimentos de ratones y perros ; y en los experimentos de ratas se tuvo alrededor de 1 μCi/l (3.7 x 10⁷ Bq/m³) (Morken, 1966; 1973).

Los ratones fueron expuestos crónicamente por 150 h a la semana durante 10 a 35 semanas a 2000 working level (WL) (~1800 working level month (WLM))² y cuyas dosis promedio fueron 280 rads/semana³ en pulmones-traquea-bronquio (Morken, 1966).

Las ratas se organizaron en 2 grupos de 48 machos, los cuales fueron expuestos a 25 h/semana/24 semanas en un promedio de 1100 WLM/semana y a una exposición acumulada de aproximadamente 26000 WLM, estimándose una dosis media del pulmón de 4300 rads (Morken, 1973). Se observó incremento en metaplasia, y fibrosis en el tracto respiratorio sin que al parecer estén relacionadas con la dosis.

En los perros, las exposiciones fueron por 1, 2, 4, 8, 15 y 50 a 200 WLM /día durante un periodo de 1 a 50 días, lo que daba una dosis acumulada del orden de 200 a 10000 WLM. Los animales se

² Un Working Level, es una unidad especial de la energía alfa potencial de una mezcla de progenie de vida corta de Rn en el aire, que se encuentra en equilibrio radioactivo con una concentración de Rn de 3.7 KBq/m³; y un Working level month, es la exposición de la misma unidad por mes de trabajo y corresponde a la exposición de un WL por 170 horas, que equivalen a una exposición de progenie de Rn de período corto de 6.3 x 10⁵ h/m³

³ Un rad = 100 ergios/g; y la unidad del Sistema Internacional para dosis absorbida es el GRAY (Gy), donde : 1Gy = 100 rads.

sacrificaron a 0, 1, 2 y 3 años posteriores a la exposición al Rn , y se obtuvieron dosis para el pulmón entre 0.17 y 21 rads/WLM (Morken, 1973).

En los pulmones de las tres especies aparecieron lesiones destructivas hiperplásicas y metaplásicas . Adenomas y otros tumores aparecieron en los pulmones de ratones, en los cuales, después de la exposición, la sangre se limpió rápidamente, sugiriendo que las partículas radioactivas adheridas se separaron rápidamente del aerosol que las transportaba. En el caso de los perros se observó una inflamación pulmonar crónica, pero de ninguna manera carcinomas. Los efectos en ratas incluyen tumores, dos adenomas y dos carcinomas .

Estos experimentos son los más notables en el establecimiento de relaciones de exposición a la dosis del pulmón completo, secciones del mismo e incluso otros órganos; los efectos encontrados no pudieron establecer la relación de las exposiciones y actividad carcinogénica. La influencia de la progenie del Rn en los resultados de estos experimentos es incierta. (Cross, et al, 1988).

Los estudios de la Compañía General de Materiales Nucleares (COGEMA), se iniciaron al final de los años 60's , para determinar si el Rn y su progenie inducían tumores en ratas y obtener un soporte experimental para los datos epidemiológicos de la progenie del Rn carcinogénica (Chameaud, et al, 1980, 1984).

Desde el año de 1972, las ratas Sprague-Dawley (SPF) fueron expuestas a aire ambiental pasado a través de un circuito que contenía polvo fino con 25% de Uranio. Las concentraciones de Rn fueron de 0.75 μ Ci/l (2.8×10^7 Bq/m³), y los factores de equilibrio de los productos fueron de un 30%, que con filtros se redujeron a 1%; por cálculo, la concentración de energía alfa potencial fue del orden de 2300 y 75 WL para las dos condiciones del equilibrio mencionadas.

A la fecha los estudios de COGEMA han producido mas de 800 cánceres de pulmón después de exponer aproximadamente a 10000 ratas a aerosoles ambientales adheridos, en varias concentraciones de Rn que van del orden de 25 a 5000 WLM (tabla 3.1) estos estudios han sido de utilidad para esclarecer los datos epidemiológicos aún con las diferencias entre los tumores inducidos en las ratas y los hallados en seres humanos, puesto que no son fácilmente extrapolables (Chameaud, et al, 1984).

Por último, los estudios del Pacific Northwest Laboratory (PNL), se iniciaron en los años 60's y 70's; en estos laboratorios fueron expuestos al aire enrarecido de las minas perros (beagle dogs) y roedores (hamsters y ratas), para identificar los agentes y los niveles responsables de producir lesiones en el tracto respiratorio. Los

roedores de 12 a 14 semanas de edad fueron expuestos a niveles de Rn entre 0.1 y 0.3 μ Ci/l (3.7×10^6 a 11×10^6 Bq/m³). Los perros fueron expuestos a estos mismos niveles a la edad de 2 a 2.5 años, como fuente de Rn se utilizó polvo de mina con un contenido de 4% a 25% de Oxido de Uranio (U₃O₈).

Uno de los resultados más interesantes fue el observar que, en general, las lesiones más graves las presentan los animales expuestos a concentraciones más altas de aerosoles adheridos a la progenie del Rn, las dosis más altas producen un acortamiento en el periodo de vida de los organismos expuestos, así como una evidente pérdida de peso, en especial para los casos de exposiciones crónicas, este acortamiento de la vida se debía en parte a los cambios patológicos inducidos por la exposición entre los que se cuentan: desordenes urológicos, fibrosis pulmonar, enfisemas pulmonares (no muy comunes), adenomas, carcinomas bronquioalveolares y bronquiales, hiperplasia y metaplasia en el epitelio nasal y adenocarcinomas. Asimismo, se determinó la mayor sensibilidad de los perros con respecto a los roedores como sistemas de bioensayo (Cross, et al, 1981, 1982, 1984).

Las exposiciones crónicas de hamster, ratas y perros de 10 a 10000 WL de energía alfa potencial con cantidades variables de polvo de mina de uranio, humo de diesel y humo de cigarro, produjeron fibrosis pulmonar, enfisema y lesiones neoplásicas del tracto respiratorio (Palmer, et al, 1973; Cross, et al, 1981, 1982, 1984).

Los cánceres del tracto respiratorio incluyen carcinoma epidermoide y carcinoma bronquioalveolar, en perros que recibieron de 4 a 4.5 años de exposición a los productos de decaimiento con polvo de mina de Uranio (con o sin cigarro incluido) a una energía alfa potencial de 12000 a 16000 WLM. Muy pocos carcinomas fueron observados en los hamsters expuestos a 10000 WLM de energía alfa potencial a partir de Rn solo, así como de polvo de Uranio y en algunos casos mezclados con humo de diesel. Las ratas expuestas a diferentes concentraciones de la progenie del Rn y polvo de Uranio desarrollaron algunos carcinomas, adenocarcinomas y carcinomas mixtos; la incidencia dependía tanto de la tasa de exposición como de la energía alfa potencial acumulada; como en COGEMA la incidencia de tumores a muy altas exposiciones fue baja debido al acortamiento del periodo de vida (UNSCEAR, 1977).

Cuatro variables surgen como la principales influencias que potencian la eficiencia de la progenie del Rn para inducir tumores:

- 1.- Exposición acumulada de energía potencial alfa debido a una alta tasa de exposición a la progenie del Rn.
- 2.- Indice de progenie del Rn adherida en aerosoles.
- 3.- Desequilibrio de la progenie del Rn que favorece a los polonios.

4.-Efectos sinérgicos de varios contaminantes no radioactivos. (UNSCEAR,1977).

Todos estos factores que incrementan la posibilidad de aparición de tumores en sistemas biológicos están afectados en una relación inversamente proporcional, por una variable de capital importancia, la tasa de ventilación (Vv), que decrementa la energía potencial depositada en las células del tejido blanco (a una alta tasa de ventilación, disminuyen todos estos factores.

El papel de exposiciones, a otros contaminantes que actúan sinérgicamente con el Rn y su progenie, depende no sólo de la naturaleza del contaminante sino también del tiempo y la secuencia de exposición. Las exposiciones simultáneas a la progenie del Rn combinadas con polvo de mina de Uranio, humo de diesel o humo de cigarro incrementan la incidencia de lesiones preneoplásicas pero, con excepción del humo del cigarro, no se observa un cambio aparente en la incidencia de tumores pulmonares al compararlos con los experimentos de PNL (PNL expuso al Rn únicamente). Los estudios en rata de COGEMA, evidencian una clara diferencia en cuanto al orden de exposición y el papel que juega el humo de cigarro. El humo del cigarro actúa como co-carcinogénico con la progenie del Rn, si y solo si, la exposición es primero a la progenie y después al humo, de lo contrario no se observa efecto (Cross, et al,1988).

Dosimétricamente, los datos experimentales en animales no pueden ser fácilmente extrapolables debido a las posibles diferencias en la sensibilidad de los tejidos y los sitios del pulmón afectados. Sin embargo, las aproximaciones de los datos dosimétricos y carcinogénicos, al menos a más altas tasas de exposición y para niveles que exceden los 100 WLM, sugieren que los modelos animales particularmente las ratas, son razonablemente similares al humano (Cross,et al,1988).

En resumen, los principales efectos biológicos son, para niveles altos (13000 WLM): acortamiento en el tiempo de vida, enfisema pulmonar, fibrosis pulmonar y cáncer respiratorio.

Por otra parte, los datos observados en animales no son infaliblemente demostrados en humanos pero indican que los efectos de la exposición a la progenie del Rn son: 1) el incremento en la producción de tumores está relacionado directamente con la fracción de la progenie del Rn adherida y en desequilibrio y 2) la importancia de la secuencia temporal para el papel de otros contaminantes del aire que actúan sinérgicamente con el Rn.

Hay que señalar, que ninguno de los sistemas experimentales tradicionalmente utilizados para evaluar el efecto biológico del Rn, profundiza en los eventos citogenéticos que pueden ser inducidos por la acumulación de la energía potencial alfa debida al Rn y sus productos de decaimiento, como podrían hacerlo sistemas procariontes y eucariontes comúnmente utilizados en pruebas de Genética Toxicológica.

CAPITULO 4.

EL SISTEMA *DROSOPHILA* COMO ORGANISMO DE BIOENSAYO.

Del vasto conjunto disponible de organismos eucariontes pluricelulares, los que se utilizan con mayor amplitud para la investigación en genética son: el maíz (*Zea mays*), el ratón (*Mus musculus*), el ser humano (*Homo sapiens*) y la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*); este último es quizás el organismo eucarionte más extensamente estudiado desde el punto de vista genético (Goodenough, 1981).

Utilizada durante muchos años en estudios de genética básica, la *Drosophila* se ha constituido en uno de los organismos más adecuados para realizar experimentos sobre los efectos genéticos de diferentes mutágenos, ya que no solamente se pueden estudiar variaciones hereditarias, sino que además, se han desarrollado técnicas que garantizan la existencia de muestras homogéneas en poblaciones celulares meióticas y mitóticas en algunas de las etapas sucesivas en su ciclo de vida, lo que permite utilizarlas como un índice de daño genético (fig. 4.1) (Guzmán, 1984).

Además, entre las ventajas de este organismo como sistema de prueba se encuentran la de tener gran cantidad de individuos en un espacio reducido y ser un sistema eucarionte que permite verificar la presencia de daño genético "in vivo" en un periodo de tiempo corto, ya que su ciclo de vida es aproximadamente de 10 días a 25°C \pm 1, por lo tanto el espectro de valoración de riesgo genético que puede ser detectado con el uso de este insecto es muy amplio (Abrahamson, et. al., 1971).

Desde el año de 1927, H.J. Muller publicó los primeros resultados demostrativos en favor de que los rayos "X" son efectivos inductores de mutaciones genéticas; en los experimentos que desarrolló, utilizó como bioensayo precisamente a *Drosophila melanogaster*; y con estas pruebas la genética entró a una nueva era, ya que ésta fue la primera evidencia de que un agente ambiental podía inducir un cambio genético perdurable en las siguientes generaciones, como posteriormente demostró el mismo Muller, (Guzmán, 1984).

En la actualidad el sistema *Drosophila* está considerado como un organismo de bioensayo rutinario para detectar mutágenos (Brusik, 1985), en parte, la utilidad que se le ha dado a este insecto como sistema de prueba, se apoya en el conocimiento que se tiene

acerca de la biología de su desarrollo (Hardorn, 1968).

Analizando su desarrollo, la *Drosophila* se puede caracterizar como un insecto que tiene un tipo de metamorfosis completa (holometábolo), este desarrollo parte de un huevo y atraviesa por varios estadios larvales hasta llegar al "imago" o adulto (fig.4.2). Pero el adulto o imago, no es simplemente una forma mayor y madura de la larva, ya que tiene una estructura totalmente diferente; la mosca adulta surge en gran parte de ciertos grupos de células denominadas **células imagales**, y éstas se encuentran en los estadios larvales organizadas en paquetes llamados **discos imagales** (fig. 4.3). Los discos son bolsas epiteliales parecidas a globos deshinchados y aplanados que durante la metamorfosis se evaginan y diferencian para formar las estructuras del adulto, por lo tanto, se podría afirmar que la larva es análoga de las estructuras extraembrionarias de un mamífero, es decir, es el vehículo que transporta las células imagales a partir de las cuales se desarrollará la mayor parte del cuerpo de un adulto (Schneiderman, 1976).

Existen diecinueve discos imagales dispuestos en nueve pares a los costados de la larva, más un disco en la línea media. A partir de dos discos se desarrollarán los ojos y las antenas; de otros surgen las alas y parte del tórax; de otro el primer par de patas, etc. (Fristom, 1969).

La larva crece mediante una sucesión de mudas en las que abandona su vieja cubierta, la cutícula, y produce otra mayor. A medida que la larva crece, también lo hacen sus discos imagales, cuyas células proliferan estando ya determinadas, pero indiferenciadas. Finalmente, una alteración de los niveles hormonales circulantes, fundamentalmente las ecdiosonas, inducen a que la larva entre en fase de pupa y experimente la metamorfosis a mosca adulta, (Gehring, 1967).

El mismo cambio que desencadena el inicio de la fase de pupa también induce la diferenciación de las células de los discos imagales. Se ha observado que las condiciones hormonales del adulto son similares a las encontradas en la larva joven (Morata, et al, 1979).

A finales de los años sesentas se realizaron los primeros experimentos con *Drosophila* en los que también se utilizaron rayos "X" para originar una célula mutante en un disco imagal, y así, tiempo después la progenie de esta célula formaba un clon marcado genéticamente, diferente a las células vecinas por su carácter mutante (Stern, 1968). Es decir, se intentaba marcar células individuales en diversos momentos del desarrollo larvario de *Drosophila* y poder estudiar su genealogía celular (fig. 4.4).

El fundamento de la técnica era el siguiente: como resultado de un cruzamiento especial, se obtienen larvas en las que cada célula es heteróciga para una mutación, (por cada par de cromosomas homólogos se tiene un cromosoma que contiene una mutación y otro que contiene un gen normal), al ser ésta una mutación marcadora recesiva, solamente puede expresarse cuando la célula es homóciga (los dos cromosomas heredan la mutación), y por lo tanto, las moscas heterócigas tendrán un fenotipo normal (García-Bellido, 1979).

Ahora bien, cuando una larva de estas características es irradiada con rayos "X", se produce una serie de rupturas cromosómicas que normalmente vuelven a sellarse recomponiendo el cromosoma original. Sin embargo, en ocasiones, estas rupturas dan lugar a que segmentos de cromosomas se recombinen durante la proliferación celular o mitosis (recombinación mitótica) y en la siguiente división celular, después de la irradiación, se produce una célula homóciga para la mutación. Las sucesivas divisiones de esta célula originarán un clon de células homócigas, que expresarán las características de la mutación marcadora, y en la cutícula adulta aparecerá este clon como una mancha de tejido mutante rodeado de tejido normal (García-Bellido, 1979; Stern, 1968).

Dos rasgos en *Drosophila* facilitan el marcaje de clones celulares por medio de la recombinación mitótica. En primer lugar, el proceso se puede provocar artificialmente exponiendo a la larva a un agente recombinogénico, p. ej. la radiación ionizante. En segundo lugar el fenotipo del animal heterócigo se puede seleccionar de entre un amplio y bien catalogado surtido de mutaciones marcadoras diferentes (Lewis, 1978).

El tamaño del clon marcado depende del número de divisiones celulares que se han producido desde que se originó el clon. Los grandes clones marcados se producen en general por el tratamiento con un agente recombinogénico en las primeras fases de desarrollo larvario, si la irradiación o la exposición a un agente se efectúa más tarde se obtendrán clones más pequeños (fig.4.5) (García-Bellido, 1979).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en 1974, Mollet y Würigler, proponen un nuevo método para la detección de probables mutágenos, empleando organismos heterócigos para mutaciones recesivas en células somáticas, ésta técnica se denomina SMART, por sus respectivas siglas en inglés Somatic Mutation A n d Recombination Test (Graf, 1983; Ramos, 1989). La importancia que tiene la detección de la actividad recombinogénica de un agente con esta prueba, radica en la correlación que existe entre esta actividad y la inducción de tumores cancerosos, por lo tanto, no sólo la

actividad mutagénica, sino también la recombinogénica, probablemente esté relacionada con la incidencia de cáncer (Würgler, 1980). Además la formación de clones mutantes en células somáticas puede deberse a mutaciones puntuales, no disyunción o deleciones (Graf, 1989).

Esta técnica consiste en exponer larvas transheterocigas para un gen marcador a un agente, la actividad mutagénica y recombinogénica de este agente se valora a través de la frecuencia de aparición de mosaicos (clones) caracterizados fenotípicamente en estructuras del adulto emergido (p.ej. cutícula alar), misma que se compara con la frecuencia encontrada en testigos negativos, en la figura 4.6 se presenta un diagrama general de esta prueba. Para los testigos negativos, que se prueban simultáneamente, se emplean sustancias inocuas cuyo fin es someter a los organismos a la misma manipulación a la que se someten los grupos tratados, por lo que se puede corroborar una frecuencia de mutación de fondo (Graf, et al, 1989). Además la prueba tiene una gran versatilidad en cuanto a tiempo, tipo de administración y edad de las larvas al momento de la exposición (fig. 4.7).

El fundamento de este bioensayo, se basa en el conocimiento que se tiene del desarrollo de los discos imagales ya antes mencionado, es decir, si durante el crecimiento y proliferación de las células imagales ocurriera una alteración heredable, por el efecto de algún agente, esta alteración en la célula imagal dará origen a una estirpe celular con la misma característica alterada originando así un clon que será observado como una mancha en la cutícula (fig. 4.4).

Una variante de este sistema, el bioensayo SMART-ala, utiliza los discos imagales mesotorácicos dorsales, que darán origen al mesonotum del segundo segmento torácico, incluyendo el ala. El ala es una estructura cuticular formada por dos monocapas de tejido epitelial, dorsal y ventral; estas capas se desarrollan independientemente, por lo que sus eventos genéticos también son independientes (fig.4.8) (Demereck, 1965; Wilkins, 1985).

En la superficie alar existen dos estructuras quitinizadas en forma de pelos, la primera se origina por cuatro células y dos de ellas son de carácter nervioso, y esta estructura denominada **cerda**, se puede considerar un órgano sensorial; la segunda, denominada **tricoma** es producto de una célula, y es precisamente en estas últimas, donde se han detectado y caracterizado fenotípicamente, mutaciones o eventos genéticos tales como: mutación puntual, deleción, no disyunción o recombinación mitótica, que alteran su diferenciación terminal, y que pueden formar "pelos múltiples" unidos por su base (mwh, multiple wing hair) o tricomas en forma

de "llamarada" (flr(3), flare) por lo que es posible utilizarlos como marcadores fenotípicos, que proporcionen un índice de la actividad mutagénica o recombinogénica de un agente en particular (fig. 4.9) (García-Bellido, 1974; Graf, 1983; Delgado, 1990).

Los genes marcadores empleados, mwh y flr(3), están ubicados en el brazo derecho del cromosoma tres (Würgler, 1985).

La inducción de algunos de los eventos genéticos mencionados por el efecto del agente a probar se expresará en la superficie del ala como "manchas"; una "mancha simple" de fenotipo mwh o flr(3), en un contexto de células con fenotipo silvestre, habrá sido inducida por una mutación puntual o delección del locus silvestre para cualquiera de los dos marcadores (mwh o flr(3)). La aparición de "manchas dobles" mwh y flr(3), viene dada por la inducción de recombinación entre el marcador flr(3) y el centrómero; mientras que la inducción de la recombinación entre los marcadores producirá manchas mwh (fig. 4.10) (Szabad, et al, 1983; Graf, et al, 1984; Würgler, 1984).

Los parámetros de caracterización de estos clones o "manchas" que aparecen en la cutícula alar del insecto adulto tratado, son el tamaño (el número de células mutantes dividido por magnitud, en clases) y el fenotipo de la mancha, teniendo en cuenta que se pueden distinguir entre sí los marcadores y el tipo silvestre.

El análisis estadístico de los resultados, se valora mediante el software "SMART", siendo el diagnóstico estadístico: positivo, negativo, débil positivo o sin decisión, para diferentes factores de multiplicación "m" (m=2 o m=5, según sea el tamaño y/o fenotipo de mancha), a un nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0.05$, (Frei, Würgler, 1988).

Por lo tanto, basándose en los antecedentes que se tienen del radón como potencial agente mutagénico en espacios cerrados (con todas las complicaciones experimentales que involucra su comportamiento en interiores), y la posible capacidad de respuesta del bioensayo SMART- ala, que proporciona alternativas de experimentación para este gas, el presente trabajo tuvo como **objetivos:**

1.-Caracterizar un ambiente contaminado por Rn, que tenga condiciones constantes plausibles de ser monitoreadas por dos tipos de detectores sensibles al Rn y su progenie: Detectores de Trazas Nucleares en Estado Sólido (DTNES) y detector dinámico de señal instantánea (monitor Honeywell).

2.-Determinar la frecuencia de mutación somática y recombinación mitótica inducidas en Drosophila melanogaster por la atmósfera de radón en la cámara experimental.

MATERIAL Y METODO.

En este capítulo se proporciona una descripción de los materiales, métodos y técnicas utilizados para valorar dos aspectos fundamentales en el presente trabajo, que son:

- 1.- Monitoreo de las atmósfera de Rn, para exposición experimental.
- 2.- Evaluación *in vivo* mediante el ensayo SMART-ala, en *Drosophila melanogaster*, de dichas exposiciones experimentales.

De manera introductoria, en la figura M.1. se muestra, el diagrama operativo del proceso experimental en su totalidad. A continuación se describe cada una de las etapas.

1. Monitoreo de Radón.

Como ya se mencionó, el Rn y su progenie se identifican por sus radiaciones respectivas, mediante detectores apropiados. En la medición de concentraciones de actividad muy bajas en el aire (menos de 150 Bq/m³), se puede captar Rn utilizando filtros de carbón activado, en concentraciones más altas, la colecta y medición pueden hacerse directamente por métodos de ionización, centelleo, gamma espectrométricos, termoluminiscencia o con un detector de trazas nucleares en sólidos (DTNES)(ICIRP, 1977).

Este último, se basa en el hecho de que al penetrar la radiación particulada en materiales dieléctricos (aislantes), se forman zonas de daño llamadas *trazas latentes*, que pueden ser amplificadas mediante un *grabado químico* adecuado, hasta obtener trazas medibles con un *microscópio óptico*, y que al contabilizarse permiten establecer un orden de actividad, es decir, un monitoreo radiológico, (Durrani, et. al., 1990). Además, para este monitoreo, es necesario obtener un *patrón de calibración*, con su respectiva discriminación de la radiación de fondo, este se obtiene irradiando detectores con muestras de una cantidad de Rn conocidas, encontrándose (después de grabarlos) una relación gráfica y/o analítica, entre el número de trazas y la cantidad de Rn *conocida*, que permite interpolar a través de la densidad de trazas la concentración de Rn de una muestra *desconocida*. A continuación se describirán por separado los parámetros y factores que involucran este método de detección (Khan, et. al. 1990)

Los DTNES y el monitoreo de Rn.

Los DTNES son cristales inorgánicos, vidrios o polímeros orgánicos, que se consideran monitores "integradores" de radiación, puesto que una simple medición indica la integral de la actividad en el tiempo de registro. Por lo tanto, las mediciones de niveles ambientales (en exposiciones que pueden se de horas o años) se puede obtener

una adecuada precisión a bajos costos confiables y con un buen índice de reproducibilidad, además, la información obtenida no se pierde en el momento de la lectura, ya que ésta, se registra permanentemente en el detector, (Durranii, et. al., 1990) .

En particular un DTNES polimérico debe de tener las siguientes propiedades (Frank y Benton, 1977):

I. Sensibilidad a las partículas cargadas pesadas y no detectar las partículas ligeras y fotones.

II. Transparencia óptica, las mediciones precisas de trazas requieren que la superficie sea altamente transparente después del grabado.

III. Composición y morfología uniforme, regiones de diferente composición o arquitectura en el polímero, conducen a fluctuaciones en la rapidez del grabado químico.

IV. Dominio del rompimiento de cadenas sobre la formación de enlaces químicos entre ellas.

V. Respuesta dependiente del tiempo y estabilidad de la traza latente a temperatura ambiente.

En el presente trabajo, al tomar en cuenta que la vasta mayoría de las emisiones alfa en el medio ambiente natural son derivadas de las series del U^{238} , Th^{232} y U^{235} , donde las más importantes desde el punto de vista de seguridad radiológica, son las del Rn^{222} y Rn^{220} , se consideró la sensibilidad máxima y mínima de diferentes detectores plásticos poliméricos posibles de utilizarse. Por consiguiente, es importante destacar que el curso de las emisiones alfa (así como de los neutrones) puede ser caracterizado por un umbral (dE/dx) en un intervalo lineal de pérdida de energía, asociado al cual se tiene un óptimo grabado de las trazas que son formadas en cada DTNES plástico. Esto implica la existencia de un intervalo de energías alfa mínimas y máximas (E_{min} y $E_{máx}$) que son detectables por los diferentes DTNES plásticos (Lovett, 1969). En la fig. M.2, se representa este umbral, haciendo la aclaración que los valores precisos dependen de condiciones particulares, tanto en el registro como en el grabado de los detectores (Green, 1984).

Cuando se analiza el intervalo de energías en la serie del U^{238} y que están representadas en las tablas m.1 y m. 2 (Durranii, et. al., 1990), se concluye que el DTNES plástico más eficiente y que cumple con las propiedades de un DTNES polimérico es el plástico CR-39. Este detector es fabricado por Pershore, Mouldings L.t.d. y es un homopolímero de alil-diglicol carbonato, que presenta una alta sensibilidad, y prácticamente no tiene límites para la detección de partículas alfa. En la tabla m.3, se representa la comparación en los

límites de detección mínimos y máximos para diferentes energía alfa en diferentes DTNES plásticos (Frank y Benton, 1977).

Este detector se caracteriza por ser un absorbedor homogéneo de la radiación por su especial composición química ($C_{12} H_{18} O_7$), cuyas fracciones de peso respectivas son $W_H = 0.0662$, $W_C = 0.5255$ y $W_O = 0.4084$; además en este material absorbedor, una partícula que se mueve es retardada y finalmente llevada al reposo por la acción combinada de procesos elásticos e inelásticos. En lo que se refiere a la geometría de las trazas en el CR-39, éstas tienden a adoptar forma de aguja, a diferencia de las formas circulares u ovals, predominantes en vidrios inorgánicos (Auxier, et. al., 1971).

El grabado químico.

El daño producido por la radiación alfa en los DTNES, permanece en estado latente hasta que se emplea un procedimiento que las "revela" o "amplifica" hasta hacerlas visibles.

Existen tres diferentes técnicas de revelado: a) por microscopía electrónica de transmisión; b) por sustitución con base en métodos de contraste y c) por eliminación del material dañado a traves de un agente químico adecuado, dentro de esta técnica se encuentran, el grabado electroquímico (GEQ) y el grabado químico (GQ), (Lovett, 1969).

Cualquier agente químico que ataque a suficiente velocidad puede ser utilizado como grabador, el uso de diferentes grabadores conduce a diferencias en la velocidad de grabado, pero no a la sensibilidad del detector. Los reactivos más frecuentemente utilizados para revelar plásticos son: NaOH, $KMnO_4$, H_2SO_4 , HF y KOH. En un material dado, la velocidad de grabado depende de los siguientes parámetros: tipo y velocidad de partícula cargada registrada; composición química del atacante; temperatura, concentración, viscosidad del grabador y del tratamiento físico-químico del detector pre y post irradiación (Evans, 1969)

En estas condiciones sólo las trazas de la superficie que son accesibles al grabador pueden ser hechas visibles, por lo tanto para mediciones precisas, se requiere gran reproducibilidad de las condiciones de grabado, en particular de los cambios de concentración del grabador (debidos a su evaporación), los cuales deben ser minimizados, ya que la densidad de trazas obtenida depende de la temperatura del grabado y de las propiedades químicas de la solución (Durranii, 1990).

Para grabar químicamente al CR-39, se utilizó hidróxido de potasio (KOH), que ataca únicamente la interfase líquido-sólido; y sus

parámetros de grabado fueron los siguientes: KOH al 6 normal, con un tiempo de grabado de 5 hrs. a $60 \pm 1^\circ\text{C}$, en donde se obtiene una densidad de trazas del orden de 100 trazas/cm^2 , y un diámetro de 30 a $50 \mu\text{m}$, que son valores adecuados para su conteo, (Evans, 1969).

Sistemas y técnicas de conteo.

La información básica necesaria para los estudios por trazas, consiste en mediciones de la densidad de trazas reveladas en el plástico (proporcionan un orden de actividad radiológica). El método más directo para conteo es utilizando un microscopio óptico con una rejilla calibrada en el ocular, que permite contar el número de trazas en una serie de campos de observación, (Khan, et.al., 1990). En la tabla m.4, se describen otros procedimientos para el conteo de trazas, pero en particular el método de exploración por medio de microscopía óptica compuesta, se caracteriza por ser un método directo bastante confiable, con una velocidad promedio de exploración de $0.15 \text{ cm}^2/\text{min}$, y no requiere instrumentación compleja adicional para su implementación. Para este trabajo, los detectores fueron analizados con un microscopio óptico marca Carl Zeiss, mod. Winkell, con amplificación de 200 aumentos, y cuyo ocular posee una cuadrícula cartesiana que permite contabilizar al mover el detector de trazas en los cuatro sentidos del plano, facilitando la sistematización de las áreas observadas para obtener el número de trazas en un área conocida; calculando su promedio y desviación estándar con las siguientes ecuaciones (Fleischer, et. al., 1980):

$$\bar{x} = 1/n \sum X_i$$

donde:

\bar{x} = promedio de trazas por cuadrante

X_i = número de trazas por cuadrante

n = número de cuadrantes revisados

$$s = [1/n (n-1) \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2]$$

donde:

s = desviación estándar

n = número de cuadrantes revisados

X_i = número de trazas por cuadrante

\bar{x} = promedio de trazas por cuadrante

Para la obtención del *factor de calibración* que permite determinar la concentración de Rn y su progenie en una muestra de aire *desconocida*, es necesario que bajo las mismas condiciones de irradiación y grabado, sea calibrado el detector de trazas CR-39. Para esto Khan, et.al., en 1990, realizaron experimentos donde se irradiaron estos detectores en una cámara calibrada para Rn, bajo las siguientes consideraciones: 1) Conocimiento de los niveles de Rn valorados con precisión, 2) medios ambientes caracterizados en el equilibrio del Rn y su progenie, 3) caracterización de la concentración y tamaño de aerosoles, 4) instrumentación asociada a monitores continuos para el Rn, 5) uniformidad del contenido de Rn en la cámara de calibración (lo que permite exposiciones simultáneas de diferentes detectores).

Las exposiciones se realizaron por periodos de ± 20 h, de manera que el número de trazas reveladas fueran estadísticamente significativas como tamaño de muestra. En la tabla M.5, se deduce el factor de calibración, siendo igual a: $1\text{Bq.m}^{-3} = 0.18 \text{ trazas.cm}^2 \text{ d}^{-1}$ que es el valor promedio de los nueve ensayos realizados a diferentes niveles de actividad de Rn y que se representan en la misma tabla. En la figura M.3 se observa la representación de la función, que permite interpolar dentro del rango descrito en la tabla anterior, una muestra de aire cuya concentración de Rn se desconoce (Khan, et. al., 1990; Milles y Dew, 1982; Urban, 1986).

Khan, concluye su trabajo mencionando que el sistema utilizado para la calibración del CR-39 es confiable, y que los resultados de esta calibración muestran que la respuesta del detector es lineal y por lo tanto la representación gráfica de la misma, puede ser extrapolada para utilizarse, incluso, en el monitoreo de bajas concentraciones; además, al comparar el factor de calibración encontrado por otros autores para el mismo detector (Ver tabla M.6), resulta ser muy semejante al factor descrito por Urban (et. al.1986) y se mantiene en el orden del factor calculado por Milles y Dew (1982).

En lo que respecta a la *determinación de la radiación de fondo*, es necesario establecer que la cantidad de trazas que no se deben a las partículas alfa, que no son emitidas por una muestra radiactiva, pueden ser causadas por:

- 1) La radiación ambiental de fondo.- Los detectores son expuestos a radiaciones durante su transporte al laboratorio o en su almacenamiento.
- 2) Impurezas del material.- Estas son introducidas en los detectores durante su fabricación.
- 3) Esfuerzos mecánicos.- En la elaboración, corte y grabado químico de los detectores se producen tensiones que pueden romper las cadenas

del polímero y formarse entonces trazas latentes (Nero y Lowder, 1983).

Por lo tanto, para obtener la radiación de fondo, se exponen juegos de detectores CR-39 a ± 20 h, en atmósferas libres de Rn (en donde se encuentran los grupos testigos negativos de *Drosophila melanogaster*) y los datos obtenidos se restan a las densidades de los detectores expuestos a las atmósferas con Rn (grupos de *Drosophila* tratados) para finalmente obtener la actividad promedio de las exposiciones de *Drosophila* en términos de Bq. m⁻³ y poderlos relacionar con la actividad monitoreada por el monitor Honeywell.

Este último, puede ser caracterizado como un monitor de Rn continuo o dinámico, esta categoría está basada en la colección electrostática de Po²¹⁸ (Wren, et. al.; 1975).

2. EVALUACION MEDIANTE EL ENSAYO SMART-ALA DEL Rn.

En el capítulo 4, al cuestionar la utilidad del ensayo SMART-ala para la evaluación del potencial genotóxico del Rn en *Drosophila*, se mencionó que esta técnica consiste en la exposición de larvas transheterocigas mwh +/+ flr(3) al agente sospechoso, en las que al emerger como adulto se les analiza la posible aparición de clones o manchas caracterizadas en la cutícula alar para determinar si el agente (en este caso Rn), induce o no un aumento significativo a la frecuencia basal de aparición de estas manchas. Las larvas transheterocigas, parten de dos líneas¹ progenitoras que poseen los marcadores específicos flr³/TM₃ Ser y mwh/mwh de los que se aislaron machos no mayores a 48 h y hembras no mayores a 72 h de edad respectivamente para el entrecruzamiento.

La línea portadora del genotipo flr³/TM₃ Ser, se define a partir de estos tres marcadores, y se distingue fenotípicamente por la presencia de tricomas de forma irregular en el tórax y el abdomen (Lindsley, et. al., 1985), en particular, el marcador flr³ se ubica a 39 unidades de mapa sobre el cromosoma 3, y en condición homociga es letal, por lo tanto, para mantener esta línea, se necesita la presencia de un gen balanceador, que es el TM₃ Ser, que a su vez porta el marcador dominante "serrata" (Ser), que permite un reconocimiento más evidente de la línea flr³/TM₃ Ser, por la expresión fenotípica que

¹A un grupo de individuos con antecedentes genéticos similares se les denomina: línea, cepa, variedad o raza.

corresponde a individuos que poseen alas con bordes discontinuos (bordes en forma "serrata"). El marcador serrata, es también letal en condición homociga, por lo que sólo se obtienen individuos heterocigos para los marcadores flr^3 y Ser, es decir individuos flr^3/TM_3 Ser, (Graf, et. al. 1984).

En lo que se refiere a la otra línea progenitora, portadora del genotipo mwh/mwh (siglas en inglés de: multiple wing hairs, pelos múltiples en ala), puede identificarse fenotípicamente por el marcador portado, el cual expresa una alteración en el número de tricomas por célula en el ala, ya que se llegan a presentar de dos a cinco tricomas, en lugar de uno (como sería en el fenotipo silvestre, que no presenta el marcador mwh), este marcador se encuentra también en el cromosoma tres, a cero unidades mapa y en las figuras M.4 y M5, se representa el esquema de cruce para la obtención de larvas heterocigas y diferentes tipos de tricomas caracterizados en el ala, respectivamente, (Graf, et. al. 1984).

Una vez realizado el entrecruzamiento entre estas dos líneas progenitoras, se colectan sus huevos durante dos horas en cajas Petri, que contienen el medio de cultivo levadura-agar, y se les permite desarrollar durante 72 horas más, para proceder a recuperar larvas de 72 +/- 1 h de edad, a través del procedimiento de Nöthiger ²(Nöthiger, 1970).

Es importante señalar que previo a cualquier ensayo de valoración genotóxica a través de SMART-ala, se debe seleccionar el protocolo adecuado, tanto para la ruta de administración, como para la edad larval al momento de la exposición,(Graf, et. al. 1984). Para este caso fue inhalación, (el radón es un gas), y larvas de 72 h, respectivamente,³ (ver fig. M.6.).

Una vez recuperadas las larvas, se dividieron en dos grupos de igual número de individuos: grupos A y B; "A", es el grupo testigo y "B" el tratado. Los dos grupos se siembran, una vez más, en medio de cultivo contenido en cajas Petri que se forraron con malla nylon no higroscópica que permitiera el libre intercambio gaseoso, al grupo

² Este procedimiento se basa en la formación de un gradiente de densidad que permite separar las larvas por flotación, sin manipularlas táctilmente, y para protegerlas de un efecto adverso por alta osmolaridad, se recomienda utilizar una solución de sacarosa al 20 % p/v.

³ La edad preseleccionada al momento del tratamiento, es un factor importante que considera a su vez otros dos factores, que poseen una relación inversa entre sí: la frecuencia y el tamaño del clon, es decir, un clon inducido, es más pequeño conforme más avanzadas en edad sean las larvas, en las que se induce; por el contrario, la frecuencia de los clones por ala, aumenta cuando mayor es la edad larval en la que se induce, ya que en este último caso, aumenta el número de células blanco en el disco imagal (ver fig. 4.5)

tratado se le expuso durante 72 h en ambientes contaminados (simultáneamente monitoreados) con Rn; por el contrario, al grupo testigo se le colocó en ambientes libres del gas. Las 72 h, implican una exposición crónica al mutágeno, según el protocolo SMART (Graf, et. al., 1984).

Al terminar el periodo de exposición de los dos grupos larvales, se les permitió desarrollarse hasta su etapa adulta, para proceder a sacrificarlas con eter y conservarlas en alcohol etílico al 70%(v/v), para inmediatamente después separar las alas y montarlas en preparaciones permanentes con solución de Fauré, tomando en cuenta que normalmente sólo se analizan las alas de las moscas "no serrata" 4.

Estas alas se analizaron con un microscopio óptico marca Nikon mod.361, a 400 aumentos y se registró cada clon con base en los siguientes criterios:

1) Ubicación del clon en el ala.- Debe anotarse de acuerdo con el sector del ala predeterminado en un mapa, donde la región distal del ala queda dividida en siete secciones: A, B, C, C', D, D', y E. (ver fig. M.7)

2) Clasificación del tamaño de las manchas.- Con el fin de mejorar el análisis estadístico, las manchas pueden ser clasificadas en dos tipos: I) Manchas pequeñas con una o dos células afectadas, y II) manchas grandes con tres o más células afectadas. Esta diferencia hace posible probar las frecuencias de manchas grandes en el grupo tratado contra frecuencias bajas de manchas grandes, en el grupo control. Sin embargo, en el caso de manchas pequeñas y manchas totales, las pruebas pueden hacerse contra efectos espontáneos altos o variables, en el grupo control.

3) Clasificación de acuerdo al fenotipo de manchas.- Además del tamaño, las manchas se pueden reagrupar en tres tipos básicos:

I.- Manchas pequeñas de una o dos células con fenotipo mwh o flr. 5

4 La progenie resultante para el tipo de cruce mencionada, puede consistir de larvas transheterocigas, mwh flr+ / mwh+ flr3 (alas "no serrata") y heterocigas de inversión, mwh flr+/TM3/Ser mwh+ flr+ (alas "serrata"). En el ensayo SMART-ala, sólo se selecciona la progenie "no Serrata", ya que permite obtener moscas que poseen una baja frecuencia de mutaciones espontáneas (que se expresan como pequeñas manchas mutantes), una baja frecuencia de células con dos tricomas, y sólo son ligeramente sensibles a la temperatura.

5 En algunas ocasiones se expresan células con dos tricomas, éstas pueden originarse debido a alteraciones en la diferenciación celular que no corresponden a expresiones mwh, por lo tanto, para evitar errores en el conteo de las manchas, las células de dos tricomas se consideran expresiones mwh sólo cuando se encuentran dentro de la periferia de una mancha mwh bien definida (Graf, et. al., 1984).

II.- Manchas grandes de tres células o más con fenotipo mwh o flr.

III.- Manchas dobles o gemelas, con fenotipo mwh y flr en un área adyacente.

Estos tres tipos, así como el total de manchas, se analizan por separado, sin embargo, se debe considerar que aunque la mayoría de los clones grandes son continuos, algunos pueden presentar interrupciones, debido a la separación parcial de las células del clon durante el desarrollo por presiones tisulares o movimientos independientes. Por lo tanto, se contabilizan como clones independientes, aquellos que se encuentren separados por tres hileras o más de tricomas normales (Graf, et. al. 1991).

ANALISIS ESTADISTICO DEL SISTEMA SMART-ala.

Para el análisis de la frecuencia de manchas por ala, el procedimiento de decisión múltiple para un coeficiente de mutación, de un locus específico en ratones, ideado por Selby Y Olson, en 1981, es utilizado para decidir entre, si un resultado es positivo, débilmente positivo, inconcluso o negativo. Este procedimiento está basado en probar dos hipótesis; la primera, denominada hipótesis nula, establece que la frecuencia de mutación, (inducida más la espontánea) en las series tratadas no es mayor que la frecuencia de mutación en las series control; la segunda, denominada hipótesis alternativa, establece que las frecuencias de mutación en las series tratadas es "m" veces más alta que la observada en la serie control. Ambas hipótesis se prueban en el nivel 5% de significancia estadística.

Siguiendo este procedimiento se puede llegar a las siguientes conclusiones:

negativo.- Si se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa.

inconcluyente.- Si se acepta la nula y también se acepta la alternativa.

débil positivo.- Si se rechaza la nula y se rechaza la alternativa.

positivo.- Si se rechaza la nula y se acepta la positiva.

Debido a que las manchas pequeñas y el número total de manchas, presentan una frecuencia espontánea comparativamente alta, el valor "m" es fijado en dos ($m=2$), para las dos clases de manchas mencionadas. Esto es por su alta frecuencia espontánea y por lo tanto se requiere de una inducción de daño mayor para doblar la frecuencia basal.

Por otra parte, un valor de $m=5$ (cinco veces la frecuencia basal), está fijado para considerar positiva la frecuencia de aparición de

manchas simples grandes y dobles en el grupo tratado. Estas manchas son menos frecuentes en el grupo control, por lo que es necesario que se quintuplique su frecuencia en el grupo tratado para considerarlo positivo.

En 1988, Frei y Wurgler, publican una comparación de métodos estadísticos para decidir, a través de la prueba de mutagénesis SMART-ala(Frei y Wurgler1988), si la respuesta del ensayo indica que el compuesto valorado es positivo, negativo, débil positivo o inconcluso. Los métodos estadísticos comparados son la prueba binomial condicional, la prueba Xi cuadrada para proporciones y **un método alternativo basado en el establecimiento de límites de confianza** observados en las frecuencia de mutación. En principio estos tres métodos son equivalentes y conducen a las mismas conclusiones; sin embargo, en 1984, Wurgler y Frei, utilizando el método que establece intervalos de confianza, generan el software SMART versión PC (sin publicar), que permite un manejo más ágil a la vez de una forma estandarizada en el reporte de los resultados para esta prueba. Este programa fue utilizado para el procesamiento de los datos, cuyos resultados se presentan en el capítulo siguiente.

RESULTADOS.

Monitoreo de Radón.

Con respecto a la valoración de las atmósferas experimentales de radón, los dos métodos utilizados para el monitoreo del gas (trazas en CR-39 y monitor dinámico Honeywell) determinaron una actividad promedio, de $3071 \text{ Bq/m}^3 \pm 25\%$. En cada método se realizaron tres monitoreos independientes, uno para cada grupo tratado, no encontrándose ningún sesgo significativo entre ellos ($P < 0.05$).

Es necesario puntualizar que el $\pm 25\%$ de varianza es el promedio establecido por la diferencia entre ambos métodos al correlacionarlos entre sí. En la figura R.1, se presentan las funciones gráficas obtenidas en esta correlación, sin embargo, se requiere enfatizar lo siguiente: la obtención del patrón de calibración en el método de trazas, es con base en la calibración reportada por Kahn, et.al, 1990. (representado por la función A) y la extrapolación (representado por la función A'), de 3071 Bq es el valor de actividad radiactiva promedio obtenido para la densidad de trazas de las nueve réplicas realizadas (tres réplicas por cada monitoreo), con su respectiva discriminación de radiación de fondo. En la misma figura R.1, se presenta el monitoreo a diferentes tiempos realizados con el monitor Honeywell (función B), en donde no se observa una meseta de saturación por Rn en el contenedor, pero si se advierte que la respuesta del monitor es lineal, para el comportamiento del gas en el contenedor.

Asimismo, un cálculo teórico basado en las ecuaciones de Bateman, (fig. R.2), proporcionó la actividad del radionúclido inmediato anterior al Rn^{222} , el Ra^{226} , cuya actividad resultó ser de 2774.69 Bq/m^3 .

$$N_B \lambda_B = N_A \lambda_A (1 - e^{-\lambda_B t}) \quad (\text{Fig. R.2})$$

Valoración del Radón mediante SMART-ala, en *Drosophila melanogaster*.

En lo que se refiere a la valoración genotóxica de las atmósferas monitoreadas, en la tabla R.1 se presentan los resultados obtenidos para el bioensayo SMART- ala a través del software SMART (sin publicar). Los tres grupos testigos (lotes de larvas mantenidas en atmósferas libres de Rn), presentaron una frecuencia basal de aparición de manchas, por lo que pueden ser tratados como un grupo único de 227 alas, que es el resultado de la suma de las frecuencias encontradas para cada control, mismo que se muestra en la tabla mencionada.

Además, en la tabla R.1, se advierte que el diagnóstico para la inducción de manchas simples pequeñas, resultó **positivo**, para los tratamientos (repeticiones), 1 y 3; **negativo**, para las manchas simples grandes en todos los tratamientos, e **inconcluyente**, para las manchas dobles, excepto para el tratamiento número dos, cuya respuesta puede ser considerada como un "falso positivo", por el valor de su control correspondiente.

Estas frecuencias de los diferentes tipos de manchas, proporcionan una frecuencia total de manchas, cuyo diagnóstico, según la tabla R.1, indica que los tratamientos 1 y 3 con Rn, inducen una respuesta positiva.

El promedio de división celular resultante, tanto para el grupo control como para los tres tratamientos, fue de 1.99 con una dispersión de 0.1087, estableciendo así un índice aceptable de estandarización para el momento larval de tratamiento.

En las figuras R.3, R.4, R.5 y R.6, se proporcionan las gráficas de las frecuencias de inducción de manchas de la tabla R.1, y que son respectivamente: la frecuencia de inducción de manchas simples y dobles para el tratamiento 1 (fig.R.3); la inducción de manchas simples y dobles para el tratamiento 2 (fig. R.4), y la frecuencia de inducción de manchas simples para el tratamiento 3 (fig. R.5), no se incluye la gráfica correspondiente a las manchas dobles para este tratamiento debido a que las frecuencias encontradas tanto para el control como para el tratado son nulas, (ver tabla R.1). Por último, en la figura R.6, se presenta la frecuencia de manchas totales con respecto al testigo, de cada una de las repeticiones.

Las gráficas de barras R.3, R.4 y R.5, se construyen con base en la comparación de las frecuencias de manchas por tamaño de clase entre el grupo control y el grupo tratado, el cual está dado por la cantidad de divisiones "n", que deben ocurrir para que una célula genere un clon de un tamaño determinado. A diferencia, en el gráfico R.6, únicamente se muestra la frecuencia total de manchas entre el grupo control y los tres tratamientos con Rn a $3071 \text{ Bq/m}^3 \pm 25\%$.

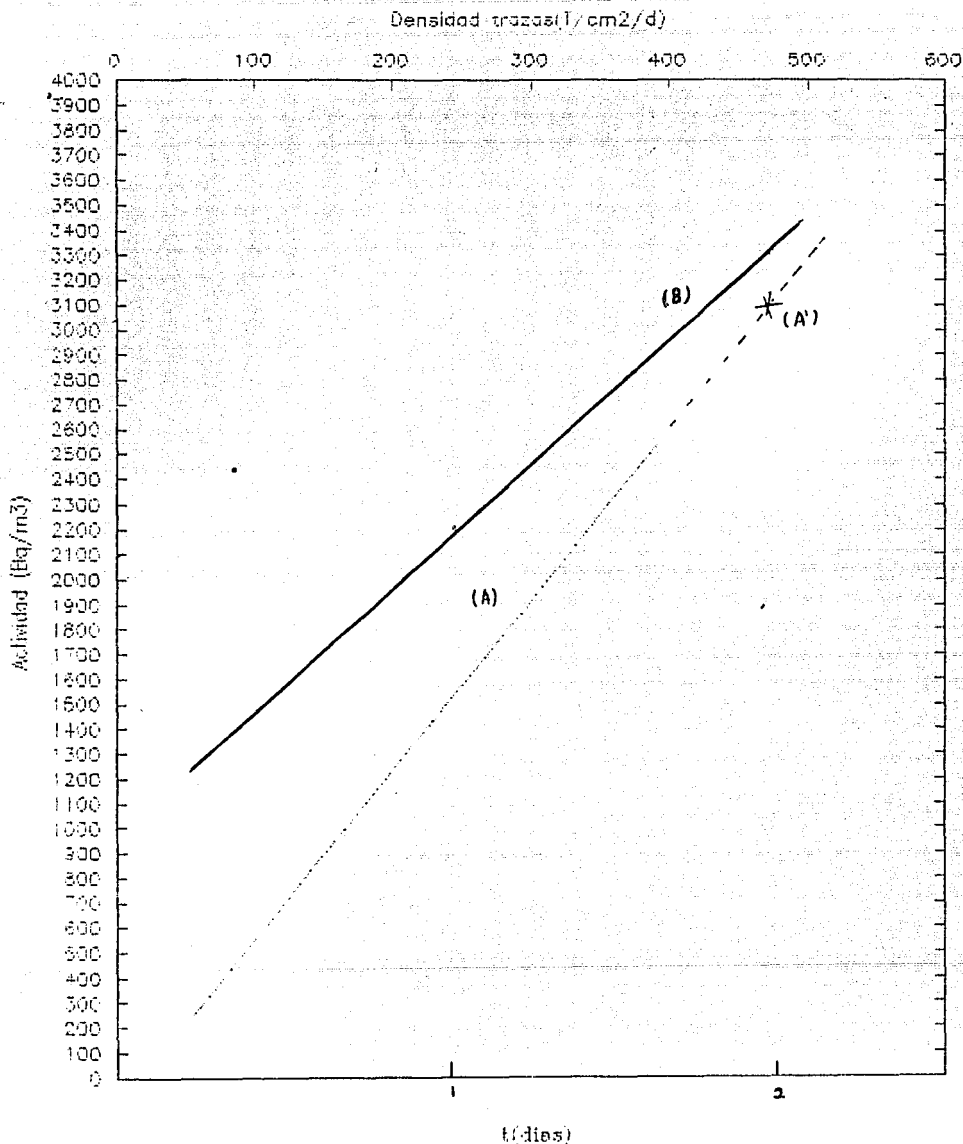


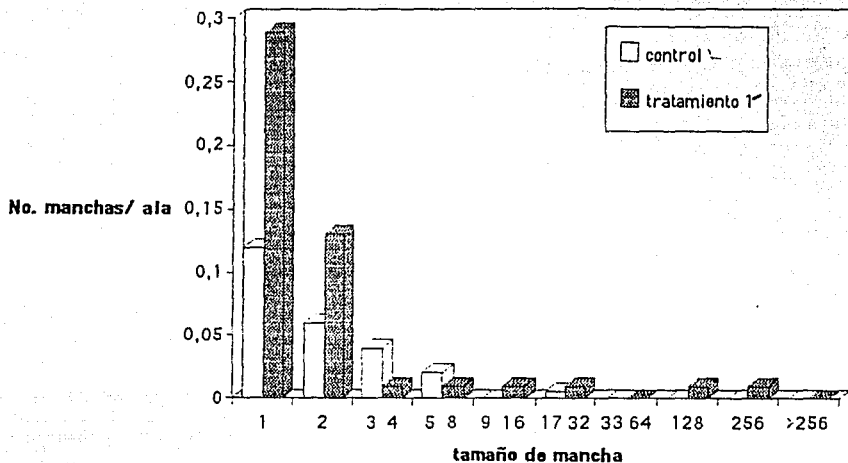
Fig. R.1. Correlación gráfica para el monitoreo de Rn, mediante un método dinámico (el monitor Honeywell), representado por (B) y un método integrador (detector de trazas nucleares en sólidos CR-39), representado por la línea (A) y su extrapolación correspondiente (A').

Tabla R.1. Resultados obtenidos con la prueba de SMART para Radón 222 en el ala de *Drosophila melanogaster*.

	manchas simples		manchas grandes		manchas simples		manchas dobles		manchas totales		clones div. mwh cel		prom. div. observ.		frec. clonal (10 ⁻⁵)	
	fr	no.	fr	no.	fr	no.	fr	no.	m=2	m=5	m=2	m=5	fr	no.	fr	no.
CONTROL	227	0,18 (41)	0,07 (15)	0,00 (1)	0,00 (1)	0,25 (57)	0,00 (1)	0,03 (2)	0,51 (41)+	0,25 (57)	0,00 (1)	0,03 (2)	57	2,00	1,0	1,0
tratamiento 1	80	0,41 (33)-	0,08 (6)-	0,06 (5)-	0,06 (5)+	0,35 (28)i	0,03 (2)	0,06 (5)+	0,35 (28)i	0,03 (2)	0,06 (5)+	0,35 (28)i	41	2,10	2,1	1,1
tratamiento 2	80	0,25 (20)	0,04 (3)-	0,00 (0)	0,00 (0)	0,39 (28)+	0,00 (0)	0,00 (0)	0,39 (28)+	0,00 (0)	0,00 (0)	0,39 (28)+	28	2,07	1,4	0,4
tratamiento 3	72	0,31 (22)+	0,08 (6)-	0,00 (0)	0,00 (0)	0,39 (28)+	0,00 (0)	0,00 (0)	0,39 (28)+	0,00 (0)	0,00 (0)	0,39 (28)+	28	1,82	1,6	0,6

Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frej y Wuergler (Mutation Res., 203 (1988) 297-308):
 + = positivo, - = negativo, w = debil positivo; J = inconcluyente; m = factor de multiplicación, Niveles de probabilidad : alfa = beta = 0.05.

A) Tratamiento 1 con Radón frecuencia de manchas simples



B) Tratamiento 1 con Radón frecuencia de manchas dobles

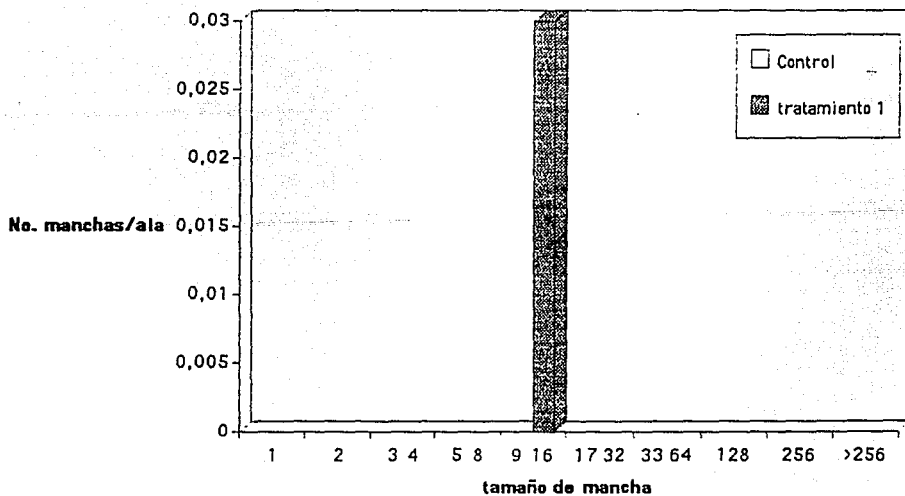
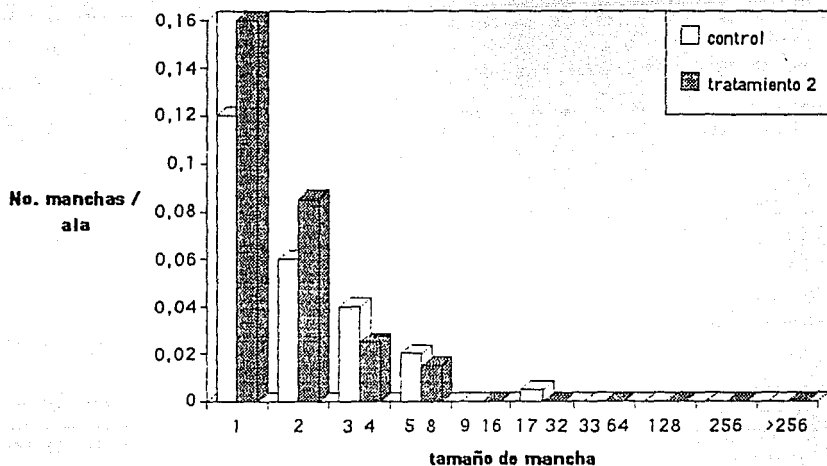


Fig. R.3. Frecuencia de inducción para manchas simples A) y dobles B) para el tratamiento 1, mediante el ensayo SMART- ala en *Drosophila melanogaster*

A) Tratamiento 2 con Radón frecuencia de manchas simples



B) Tratamiento 2 con Radón frecuencia de manchas dobles

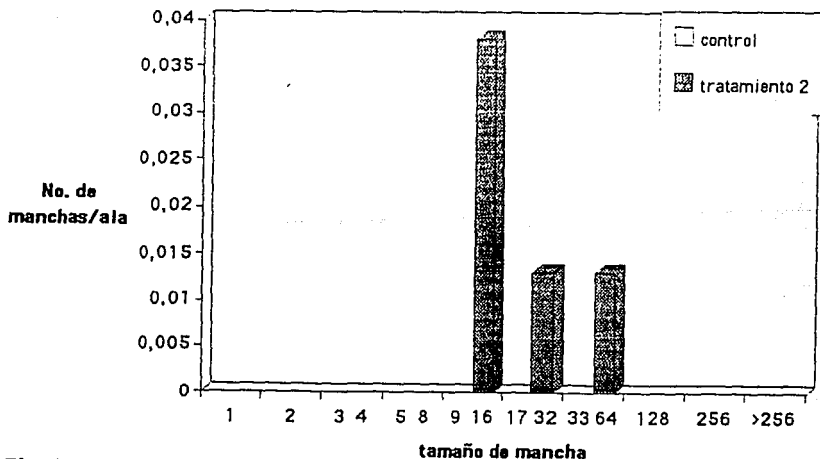


Fig. R.4. Frecuencia de inducción para manchas simples A) y dobles B) para el tratamiento 2, mediante el ensayo SMART- ala en *Drosophila melanogaster*.

Tratamiento 3 con Radón frecuencia de manchas simples

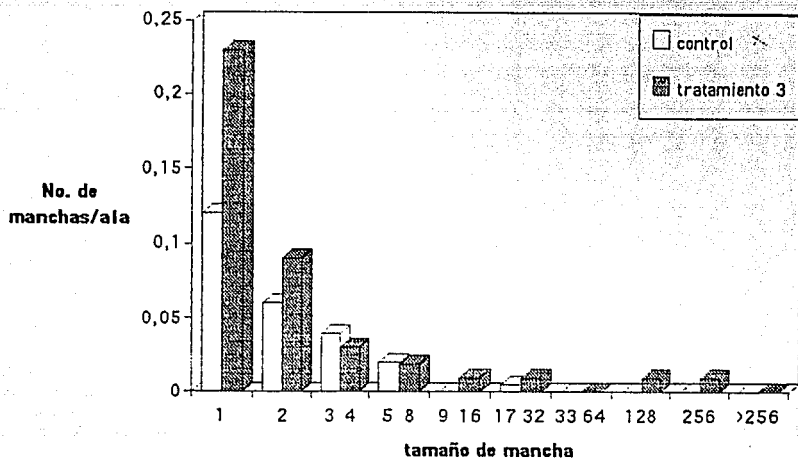


Fig. R.5. Frecuencia de inducción para manchas simples para el tratamiento 3, mediante el ensayo SMART- ala en *Drosophila melanogaster*.

Frecuencia total de manchas, control y tratamientos

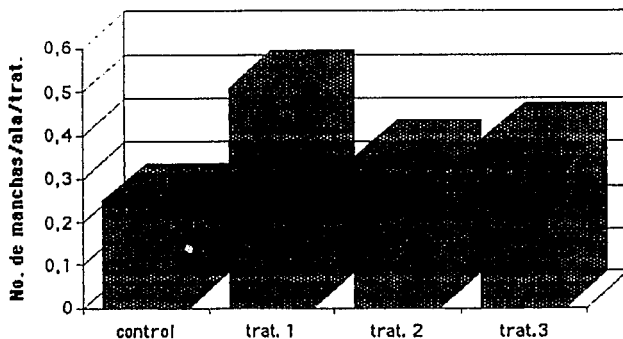


Fig. R.6. Frecuencia total de inducción de manchas per ala, para el control y las tres réplicas con Rn a 3071 Bq/m³ +/- 25%.

DISCUSION.

Fundamentalmente, el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, se centra en los siguientes aspectos:

- a) La resolución obtenida por los dos métodos de monitoreo utilizandos en las atmósferas experimentales de Rn (monitor dinámico Honeywell *At-ease* y sistema integrador por trazas), así como de su aplicabilidad.
- b) La respuesta obtenida por el bioensayo SMART-ala, para estas atmósferas experimentales de Rn.
- c) Perspectivas del bioensayo SMART-ala en *Drosophila*, como un sistema de prueba integral de daño genético .

MONITOREO RADIOLOGICO.

Es importante precisar que la resolución de un monitoreo radiológico, establece un orden de actividad específica, de la energía alfa potencial del Rn y su progenie, por lo que la "recogida" o medición de concentraciones de actividad en el aire, debe estar asociada a un intervalo de incertidumbre amplio, en este caso, la actividad específica se establece, ya sea en pCi/l o en Bq/m³. Además, este rango de actividad de la energía alfa potencial del Rn y su progenie **no proporciona** una relación directa con la dosis absorbida por un organismo de prueba; ni tampoco define la dosis absorbida por un organismo de prueba; y cuyo establecimiento corresponde a un estudio microdosimétrico en *Drosophila*, por ejemplo, a través de microrradiografías de los detectores de trazas nucleares.

Sin embargo, el establecer preliminarmente si existe un cambio citogenético en un bioensayo integral como SMART-ala, así como el definir los niveles de exposición al Rn y su progenie en los que se generó este cambio, posibilita su consideración para posteriores ensayos; o en caso contrario, manejar exposiciones de forma crónica y/o aguda, que permitan definir la sensibilidad del ensayo.

Particularmente, el análisis de la resolución para ambos métodos de monitoreo utilizados, se concentra en el gráfico R.1, en el que puede observarse que el proceso de detección para los dos métodos es acumulativo, ya que las respuestas de ambos detectores dependen del tiempo de irradiación, en el caso del detector dinámico Honeywell, la respuesta es lineal con un índice de correlación de 88.3% ¹ ; mientras que para la función definida por el método de trazas, se consideró la

¹ Con base en : $r = m \frac{O_x}{O_y}$ donde r = índice de correlación lineal, m = pendiente, O_x = desviación estandar de los valores de x ; O_y = desviación estandar de los valores de y .

curva patrón descrita por Khan en 1990, y cuya extrapolación, por lo tanto, carece de índice de correlación pero establece una actividad aproximada a los 3071 Bq/m³.

Además, considerar el resultado de 2774.69 Bq/m³ calculado a partir del modelo teórico de H. Batteman (fig. R.2), permite establecer que para la serie de decaimiento del Rn²²² es alcanzable el equilibrio con su progenie, en intervalos de tiempo relativamente cortos (días).

Al comparar la fuente de Rn utilizada por Khan (Khan, 1990), basada en una solución de 1.85 Bq de Ra²²⁶, en forma de nitrato de Radio, resulta ser una fuente con mayor actividad específica, que permite calibrar el plástico CR-39 en un intervalo amplio de actividad (250-2550 Bq/m³) en tiempos de exposición de \pm 20 hrs., mientras que en el presente trabajo, los 3071 Bq/m³ se alcanzaron en un tiempo de exposición de \pm 48 hrs..

Asimismo, se aprecia que ambas funciones tienden a converger en los puntos en los que aumenta la actividad radiológica, y que el índice de incertidumbre más amplio entre ambos métodos, se encuentra en los niveles de baja actividad (1300-200 Bq/m³); niveles en los que se recomienda colectar el Rn en el aire mediante filtros de carbón vegetal activado, a temperatura baja o ambiental, para lograr mayor eficiencia (UNSCEAR, 1988).

Sin embargo, a pesar de que en estos niveles se encuentra una incertidumbre del orden de 767 Bq/m³, este intervalo está considerado como un intervalo de dispersión esperado por el monitor dinámico cuyas especificaciones de patente, indican que la lectura tiene asociado un error estándar de \pm 25%.

Una limitación que preocupa en este tipo de monitores, que se fundamentan en la colección electrostática del Po²¹⁸, (ICRP, 1981), es que su sensibilidad se ve afectada por la humedad relativa del ambiente; factor muy importante, si consideramos que el vapor de agua es un aerosol más en el ambiente; y que al adherirse el Po²¹⁸, y por lo tanto, neutralizarse, este puede no ser colectado por el detector, modificando de esta manera, la lectura real. Además, dado que los ensayos experimentales se realizaron en una cámara hermética², el único factor que tendía a aumentar por el metabolismo de las larvas de *Drosophila* expuestas es, precisamente, la humedad, por lo que el error en la colección electrostática del Po²¹⁸, se incrementa en los niveles más bajos de actividad, es decir, en las primeras horas de emanación del Rn dentro de la cámara.

²Para controlar coeficientes de desintegración radiactiva, adherencia, recombinación, depósito, sedimentación y transporte por dispersión del Rn y su progenie de vida corta

En lo que corresponde a los detectores de trazas plásticos, se han desarrollado varias opciones, aunque el CR-39, sigue siendo el detector óptimo, sin embargo, algunos autores consideran que la carga estática en la cubierta del plástico asociado a los grupos 2-propenil-diéster, afecta la respuesta del detector, ya que al incrementarse la deposición de la progenie sólida en la cubierta del material (plateout) afectaría la lectura en un 20% o más.

Esta divergencia entre los sistemas de monitoreo, puede ser explicada por la baja resolución del método de trazas en niveles de actividad **muy bajos**, debido a que este sistema de monitoreo requiere una densidad de trazas registradas del orden de 100 trazas por cm^2 , que es un valor óptimo para su conteo y que depende a su vez, del tiempo de irradiación, por lo que en periodos cortos de exposición del polímero (en bajos niveles de actividad), es difícil alcanzar el nivel óptimo de lectura.

Por otro lado, considerando que al aumentar la actividad del monitoreo, la diferencia entre las lecturas de ambos métodos disminuye, permite definir que el índice de resolución más confiable se encuentra en las lecturas mayores a los 1500 Bq/m^3 y puede ser extendido hasta los niveles de saturación de cada detector.

En contraste, la diferencia más significativa entre ambos métodos, es el costo por medición, factor que condiciona la aplicabilidad de cada método: mientras, que una hoja del detector plástico de trazas CR-39 (que proporciona 100 detectores) implica un costo de 5 dólares, el costo de un monitor Honeywell At-ease para R_n , fluctúa entre 700 y 1000 dólares, además, dicho monitor requiere una calibración anual no contemplada en el costo del aparato, así como el consumo de energía eléctrica durante doce horas continuas, lo que incrementa el costo por cada medición.

RESPUESTA OBTENIDA POR EL BIOENSAYO SMART-ALA PARA EL R_n .

La valoración de la actividad genotóxica para los niveles monitoreados de R_n y su progenie de vida corta estuvo determinada por una inducción, estadísticamente significativa, de aparición de las manchas simples y gemelas en el ala, de los grupos tratados con respecto a los grupos control. El procedimiento estadístico se basa en el planteamiento de dos hipótesis alternativas, utilizadas para distinguir entre las posibilidades de respuesta de la prueba. El Software SMART versión PC. (sin publicar), se utilizó para el procesamiento de los datos y se basa en el establecimiento de intervalos de confianza, que definen

(utilizando tablas de distribución F) si el compuesto es: negativo, inconcluyente, débil positivo o positivo (Frei y Wüergler 1988).

Existen otras dos pruebas estadísticas equivalentes y que proporcionan la misma información: la prueba Binomial condicional, que utiliza las tablas de Kastenbaum y Bowman (Kastenbaum y Bowman 1970), o la prueba de X^2 para proporciones; pero además, para aplicar la prueba es necesario realizar tres réplicas, independientes entre sí, que valoren la reproducibilidad del experimento; a continuación, se procede a cotejar las frecuencias de inducción basal, para manchas simples pequeñas, simples grandes y gemelas, encontradas en los tres grupos control y observar si corresponden a los valores reportados para la cruz utilizada en este trabajo.

Se observa por ejemplo, que para la cruz $mwh+/flr^3$ se han reportado valores de frecuencias basales de 0.20, 0.03 y 0.02, para manchas simples chicas, simples grandes y dobles, respectivamente, (Wüergler y Vogel 1986); mientras que los valores correspondientes determinados en este trabajo para el grupo control son: 0.18, 0.07 y 0.001, por lo que no se descarta un "falso positivo", que generalmente aparece si un valor de frecuencia del control es muy bajo, y este es cotejado con una frecuencia superior del grupo tratado, que en realidad no es alta, cuando esto sucede, dicho resultado es juzgado estadísticamente positivo, sin embargo, no indica un potencial genotóxico del compuesto valorado (Graf, 1989).

Posteriormente se analiza cada tratamiento. Para el tratamiento número 1 (fig R.3), la inducción de manchas chicas resultó positivo principalmente en las clases 1 y 2, ya que, la frecuencia de inducción total (igual a 0.41) resultó superior al doble de la basal (0.18), es decir $m=2$; para manchas simples grandes resultó negativo, con una frecuencia de inducción de 0.08 *versus* 0.07 del control. La actividad recombinogénica, se valora mediante la inducción de manchas dobles, y en este caso fue inconcluyente, con un valor de inducción de 0.03 para el tratado.

Para el tratamiento número 2 (figura R.4), la inducción de manchas simples pequeñas tiende a aumentar para las clases 1 y 2, y a decrecer (incluso por abajo de la basal) para las clases más grandes, por lo tanto, la respuesta de la prueba para estas manchas resultó negativa. En cuanto a su actividad recombinogénica (manchas dobles), resultó 5 veces mayor que la basal, pero al tomar en cuenta este último, es un valor basal muy bajo y por lo tanto a este resultado, se le considera un "falso positivo", incluso, porque el valor encontrado en este grupo tratado no rebasa en $m=5$, el valor basal reportado por Wüergler y col.(que es igual a 0.02)..

Con respecto a tratamiento número 3 (figura R.5), la inducción mutagénica (manchas simples), es muy semejante a la del tratamiento 1, no expresando, al mismo tiempo, una actividad recombinogénica por parte del grupo tratado (ver tabla R.1).

Este tipo de inducción modal para manchas simples chicas, que se observa en los tratamientos 1 y 3, puede establecer que el daño inducido se expresa al final del desarrollo larval (Graf et al.1989) o que posiblemente se genera también una acción citotóxica, que inhibe los clones producidos tempranamente, por lo que éstos no llegan a desarrollarse debido a la muerte de las células alteradas (Tomlinson, 1980). Al respecto es más probable la primera opción, ya que el protocolo SMART-ala, seleccionado para este ensayo, implicaba exposiciones subagudas en larvas de 72 ± 2 hrs. de edad; sin embargo, el experimentar con el mismo protocolo, múltiples dosis más altas dilucidaría entre estas dos hipótesis (suponiendo que se registrara la misma tendencia en la respuesta del bioensayo), ya que si al aumentar la dosis se aumentara el tamaño promedio de manchas implicaría que la citotoxicidad no está en función de la dosis, y por lo tanto sería muy improbable que se generara en dosis menores.

Por lo que se refiere al tipo de evento recobrado mediante el bioensayo, era muy probable esperar una alta capacidad recombinogénica, por parte de la progenie de vida corta del Rn, fundamentalmente, dos aspectos fortalecían esta suposición: el primero, es que se ha reportado al Rn como uno de los contaminantes ambientales carcinogénicos más importantes que existen; y el segundo, es que el bioensayo SMART-ala ha demostrado ser sensible con agentes mutágeno-cancerígenos de referencia, para validar la prueba. Además, existe un modelo teórico para explicar la transferencia lineal de energía por la radiación ionizante particulada, el cual establece que la interacción de la componente alfa de cada radionúclido emisor (en este caso, fundamentalmente, por el Po^{218} y el Po^{214}) con la materia, tiene un alcance limitado³ (Gastineau y Walsh;1972), pero una gran capacidad de ionización primaria en el medio en el que viaja⁴ (Fahmy y Fahmy; 1980), hasta que su energía cinética es prácticamente cero y se frena, por lo que se infiere que la radiación ionizante incide directamente con el ADN, o con otras moléculas de las células, y que al ser estas ionizadas interaccionan con el ADN, rompiendo la doble hélice en una o ambas cadenas, efecto que también es producido por la

3 El Rn^{222} , Po^{218} y el Po^{214} poseen una energía de 3.49, 6.40 y 7.69 Mevs, que confieren un alcance de 41, 48 y 71 micras en el epitelio pulmonar humano.

4 Se han hecho determinaciones de la ionización específica de estas partículas alfa en el aire, y se ha establecido que en promedio se producen +/- pares iónicos por pulgada de trayectoria.

interacción con los productos de la radiólisis primaria y secundaria del agua (figura D.1), cuando esto último ocurre, la reparación de las cadenas del ADN, resulta difícil y en vez de ello, se asiste una deleción o una translocación de un fragmento de ADN, que se incardina en un lugar distinto del cromosoma del que originalmente ocupaba, este es el modelo general más empleado a la hora de explicar el efecto mutagénico de las radiaciones ionizantes. Sin embargo, la producción de mutaciones puntuales se ha demostrado en microensayos como la prueba de Ames (Ames et. al., 1973).

Cabe señalar, que en este último aspecto, que se refiere a la dilucidación del evento molecular genotóxico inducido por las radiaciones alfa, no se puede establecer con certeza a través del bioensayo SMART-ala, ya que hasta el momento, sólo la recombinación mitótica entre cromátidas homólogas no hermanas en la región cromosómica entre el locus flr^3 , es el evento caracterizado fenotípicamente (manchas gemelas), y por lo tanto, fácil de interpretar (manchas gemelas), mientras que, una recombinación más distal, deficiencias o mutaciones génicas dan lugar a manchas mwh o, de manera análoga, manchas flr . La no disyunción aparece como una posibilidad teórica, puesto que las células en aneuploidía para el cromosoma tres no son viables en los discos imaginales de las ala (Graf, 1989).

Sin embargo, a pesar de ser las manchas gemelas un evento genético caracterizado fenotípicamente en bioensayo, se debe considerar que, debido a las bajas frecuencias de inducción de estas manchas, son generalmente el último tipo de manchas que muestran un incremento estadísticamente significativo, puesto que la detección de estas, es en ocasiones, limitado por las características del clon flr . Por ejemplo, las manchas gemelas muy grandes, mayores a 100 células están usualmente ausentes, por que los clones flr muy grandes no sobreviven. Asimismo, las manchas gemelas muy pequeñas 2-4 células son raras porque flr no muestran un efecto perdurable ($flr+$ se "diluye" fuera de las células flr/ flr homólogas en aproximadamente dos divisiones celulares). Esto da como resultado una menospreciada manifestación del fenotipo flr , y por esta razón las manchas gemelas observadas representan una mínima estimación de las manchas gemelas y por ende, de los eventos de recombinación mitótica.

Finalmente en la gráfica R.6, se observa que la inducción total de manchas por ala para el control *versus* cada una de las tres réplicas ensayadas resultó positiva para el tratamiento 1 y 3, mientras que el tratamiento 2, ofrece una respuesta inconclusa, puesto que la frecuencia de mutación inducida en la serie tratada para esta réplica

no es mayor de "m" veces la basal encontrada en el testigo. El valor de "m" asignado a para la inducción total de manchas está fijado en $m=2$.

La diferencia de respuesta que presenta cada una de las tres gráficas, aún cuando existe cierta tendencia, puede ser atribuida a la gran incertidumbre observada para el monitoreo de los 3071 Bq/m³, ya que al asociarle un error de +/- 25%, significa hablar de un intervalo de 2303 a 3838 Bq/m³, es decir, una incertidumbre asociada de 1535 Bq/m³, que es un error difícilmente despreciable.

PERSPECTIVAS DEL BIOENSAYO SMART-ALA EN *DROSOPHILA*, COMO UN SISTEMA DE PRUEBA INTEGRAL DE DAÑO GENÉTICO .

La rentabilidad, sensibilidad y futuro desarrollo del DTNES polimérico CR-39⁵, lo posibilita como un sistema de monitoreo para valorar el nivel de Rn y su progenie de vida corta en interiores, ya sea en ensayos experimentales o monitoreos ambientales en todo el territorio nacional.

La basta extensión del país, asociada a una gran diversidad de zonas geológicas, climáticas y tipos de vivienda, hacen necesario que se genere una base de datos sobre la determinación de Rn, especialmente en las ciudades, para conocer si se ajustan los límites de tolerancia establecidos por la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP)(Espinosa, 1990).

El realizar experimentos con exposiciones agudas y/o crónicas de Rn, así como experimentar con microradiografías de los detectores plásticos, puede establecer la microdosimetría de *Drosophila* para el Rn y su progenie, como ya se ha probado en el caso del bivalvo *Myrtilus eudilis*, donde se han hecho estimaciones semejantes a los 10 pCi, de Am 241, por gramo de tejido analizado (en: PORSTENDORFER y WISKE; 1980).

Por otro lado, para vislumbrar las perspectivas del bioensayo SMART, es necesario entender la estrecha relación que guardan los procesos mutágenos carcinogénicos.

Las pruebas de inducción de mutaciones en células somáticas *in vivo*, ya sea en humanos ⁶ o en sistemas animales de prueba (por ejemplo SMART-ala), valoran el riesgo de un individuo expuesto a

⁵ Actualmente, existe una línea de investigación que intenta a través de un "dopado" químico, generar plásticos conductores de electricidad que potencialmente se pudieran utilizar como sensores de radiación si se colocaran en una atmósfera gaseosa dopante activa.

⁶ En los últimos 15 años, básicamente se han desarrollado cuatro sistemas para detectar mutaciones somáticas *in vivo* en genes humanos: dos para la línea de las células rojas de la sangre y dos en linfocitos T.

mutágenos o cancerígenos ambientales, como el Rn y su progenie de vida corta. En relación al proceso de carcinogénesis, se ha propuesto que es un fenómeno que ocurre en etapas entre las que se distinguen: etapas de iniciación y las etapas de promoción. La primera, es de carácter irreversible, y se considera que deriva de la ocurrencia de mutaciones que permanecen sin expresarse hasta que, bajo la acción de agentes promotores, se desencadena un proceso de transformación (Miller y Miller, 1981).

Si bien, en el caso de los contaminantes ambientales, los ensayos para valorar las mutaciones somáticas *in vivo* en humano, son los que proporcionan las correlaciones más precisas, siempre será necesario experimentar con modelos no humanos, que valoran el riesgo genético de diversos agentes y que además cuentan con las siguientes características: un amplio espectro de valoración genética, un alto índice de reproducibilidad, poseer un tamaño de muestra representativo y manejable, así como una capacidad de bioactivación metabólica semejante a la del humano y que sean de bajo costo. Todo lo anterior son características del ensayo SMART (Graf, 1989).

Además, los notables avances logrados en la genética de formación del patrón de *Drosophila*,⁷ han recibido un gran apoyo de la utilización de mutaciones inducidas por radiación ionizante, ya que una forma de investigar la disposición espacial de un órgano en desarrollo, es inducir cambios genéticos con la radiación gamma en una célula individual, principio del cual parte el fundamento del bioensayo SMART, y del que se esbozan amplias perspectivas para la biología del desarrollo (Gilbert, 1988)

Por otra parte, el hecho de que se tenga caracterizado el evento genético asociado a la inducción de manchas gemelas en el bioensayo SMART-ala, se debe en gran parte, al desarrollo de técnicas de clonado y secuenciación de genes por parte de la biología molecular. Y es precisamente en *Drosophila* en donde estas técnicas se han aplicado para los genes que forman su patrón básico de desarrollo, y cuyos resultados han propuesto la existencia de secuencias comunes (conocida como cajas homeóticas) que se requieren de algún modo para el control genético para el establecimiento del patrón mencionado. El análisis de los genes homeóticos ha sido el punto de encuentro entre la biología molecular, la genética, la biología del desarrollo, la neurología y la evolución, por lo que el modelo mutacional del cáncer se ve enriquecido con los aportes de la

⁷ Avances que se han cristalizado en la dilucidación de procesos como: la diferenciación, determinación, transdeterminación y la regulación genética del plan estructural de los artrópodos y muchos otros Phyla, incluyendo los mamíferos.

investigación en *Drosophila*, puesto que plantea múltiples posibilidades de desarrollo a través de la biología molecular, con nuevos elementos que potencien las posibilidades del bioensayo SMART (Alberts, 1985).

En este último punto, a pesar de que se han propuesto múltiples modelos para explicar el proceso carcinogénico, todos comparten el concepto de que la célula cancerosa responde de manera anormal a los mecanismos que regulan la división de las células normales, y que implica un cambio biológico que afecta a todos los descendientes (Cairns, 1981). El modelo mutacional, plantea en términos generales, que cuando existe una reordenación génica o cromosómica, tales genes reordenados tienden a influir en la actividad de sus vecinos, por lo que los efectos de la reordenación inducirían, tanto la represión de los genes que deberían ser activos como la activación de los genes que deberían ser inactivos. En terminos particulares, la explicación genética convencional, que relaciona la recombinogénesis con la carcinogénesis, parte de considerar al cancer como *recesivo*, puesto que la consecuencia genética de la recombinación mitotica es la homocigosis de un gen, y éste, a pesar de ser un evento muy raro (puesto que en la mitosis no existe un mecanismo de apareamiento de cromosomas homólogos como en la meiosis), puede ser inducido por un agente promotor de la carcinogénesis presente en el ambiente, por ejemplo la radiación ionizante. Este modelo no descarta la activación oncogénica (elemento que podría ser considerado como un cambio inherente a la célula) por inducción de agentes ambientales, y que se ha comprobado sucede como consecuencia a la exposición de radiación ionizante, (Cairns, 1981). En consecuencia todos estos argumentos, aumentan el espectro de aplicación del bioensayo SMART, por ejemplo en la valoración de fármacos oncolíticos, en la industria farmacéutica.

Pero la aplicación del bioensayo SMART, puede estar más allá de la industria farmacéutica, por ejemplo, en epidemiología del cáncer se requiere continuamente pruebas de laboratorio para valorar hipótesis que sirvan para establecer los elementos causales de dichos cánceres, para proponer consecuentemente acciones preventivas. Un ejemplo de lo anterior lo proporciona precisamente el llamado "Cáncer laboral", que por razones de concentración y distribución, el estudio de la elevada frecuencia de cánceres en determinadas industrias es relativamente sencillo (no considerando intereses creados, claro está), puesto que se sabe que algunos cánceres son prevalentes en determinadas industrias y estudios epidemiológicos, con base en pruebas de laboratorio, han establecido que los agentes causales de neoplasias malignas, en la mayoría de los casos, son productos industriales, por ejemplo los asbestos, anilinas, cloruros de vinilo, etc.(Florey, 1970).

Con respecto, a la incidencia del cáncer de pulmón como problema de salud en Mexico, es difícil establecer un argumento claro por la forma en que se han realizado las estadísticas clínicas en nuestro país, sin embargo, se pueden proporcionar algunos datos importantes: por ejemplo, en los hombres el cáncer de pulmón ocupa uno de los primeros lugares, junto a cánceres como el de próstata y los linfomas (Brand,1968); en las mujeres la incidencia a aumentado de forma alarmante junto con los cánceres de cervix y mama(Hensons, 1983). Por consiguiente, si es difícil establecer la epidemiología del cáncer de pulmón en México, más difícil resulta definir los elementos causales del mismo, uno de los cuales potencialmente podría ser el gas Rn y su progenie de vida corta.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugieren que existen alternativas versátiles que pueden ser aplicadas en la investigación dentro del área de Radiobiología. Por un lado, un sistema detector de trazas nucleares en estado sólido DTNES CR-39, cuya implementación compete eficientemente contra sistemas digitalizados bastante caros, y que en la mayoría de los casos, son inaccesibles para el investigador que utiliza radionúclidos en nuestro país.

El segundo elemento que se puede implementar en radiobiología, y en el área de Toxicología en general, es un bioensayo integral *in vivo* a corto plazo, que puede ser utilizado como un sistema preliminar para la valoración de diversos agentes mutagénicos, entre ellos la radiación ionizante, por lo que dependiendo del protocolo y tipo de cruz se puede valorar el perfil genotóxico de sustancias que no son mutagénicas por sí mismas, sino que adquieren ese carácter vía una activación metabólica, por distintas enzimas, que promueven en aquellas, epoxidaciones, hidroxilaciones o desaminaciones, lo que en otras palabras significa que el bioensayo SMART podría tener un amplio espectro de aplicación en países en desarrollo como el nuestro.

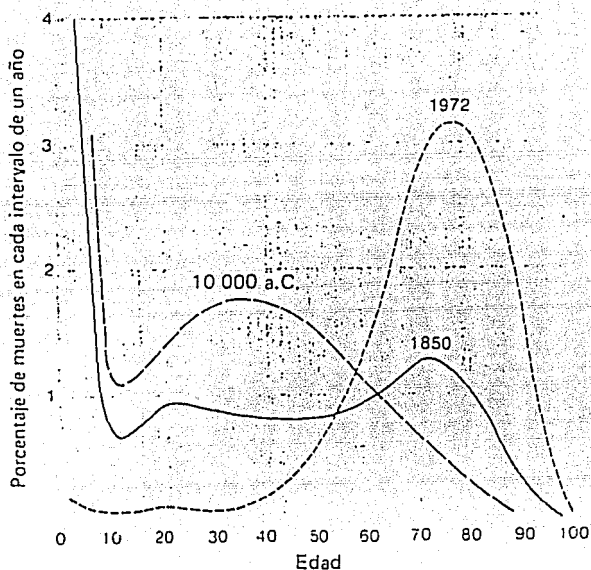


Fig. U.1. Distribución de la edad de todas las muertes (excluyendo la mortalidad infantil) ocurridas en Inglaterra entre 1852 y 1972. Estas son comparadas con la distribución por edades de esqueletos mesolíticos que datan de aproximadamente unos 10 000 años a.C. (Segun: Dumond, 1975)

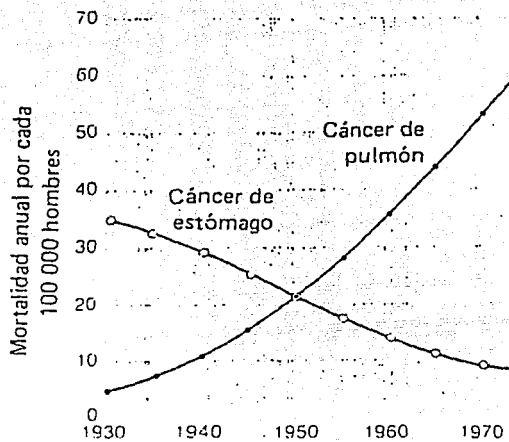


Fig. 0.2. Tasas de muertes por cáncer de estómago y cáncer de pulmón en hombres en los Estados Unidos desde 1930. Se muestran valores estandarizados para una población con una distribución por edades invariable. (Segun: Burban, 1971).

Causa	Número de muertes	Porcentaje
Enfermedades vasculares		
Enfermedades del corazón	674 747	35
Enfermedades vasculares del cerebro	211 390	11
Otras	154 155	8
Total	1 040 292	54
Todas las formas de cáncer	318 547	17
Violencia y accidentes		
Accidentes de automóvil	54 862	3
Otros accidentes	64 317	3
Suicidio	21 372	1
Homicidio	14 686	1
Total	155 237	8
Enfermedades respiratorias	123 440	6
Mortalidad infantil	43 840	2
Anormalidades congénitas	16 793	1
Enfermedades infecciosas	17 776	1
Total	1 715 925	89
Todas las causas	1 930 082	100

Tabla 0.1. Mortalidad en los Estados Unidos en 1968. (Segun: V.S.U.S. 1968).

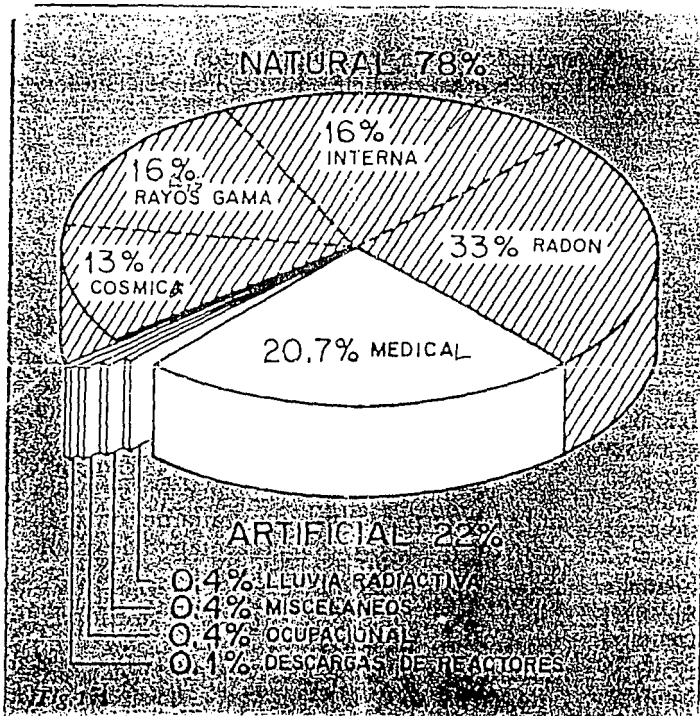


Fig. 1.1. Contribución del Rn a la radiación natural. (Según: Espinosa, 1990).

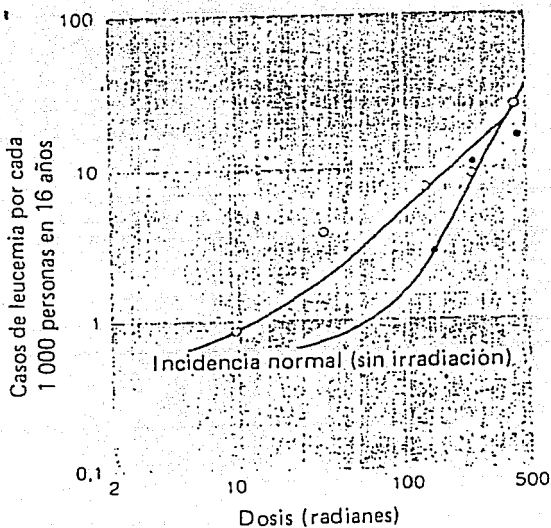


Fig. 1.2. Incidencia de la leucemia en un periodo de 16 años en Hiroshima y Nagasaki. La incidencia producida por los neutrones de la bomba de Hiroshima se incremento en proporción directa a la dosis; la producida por los rayos X de la bomba de Nagasaki se incrementó con el cuadrado de la dosis. Incidencia en Hiroshima ●, incidencia en Nagasaki ○. (Según: Rossi y Kellerer, 1974).

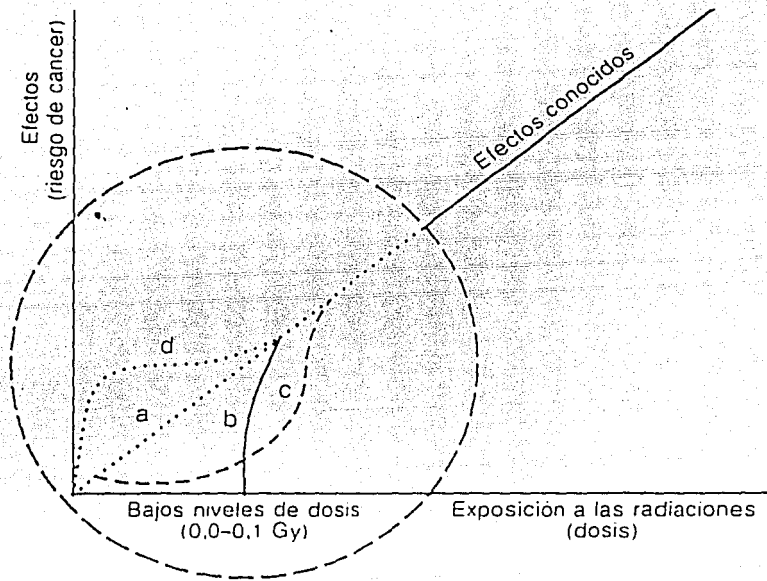
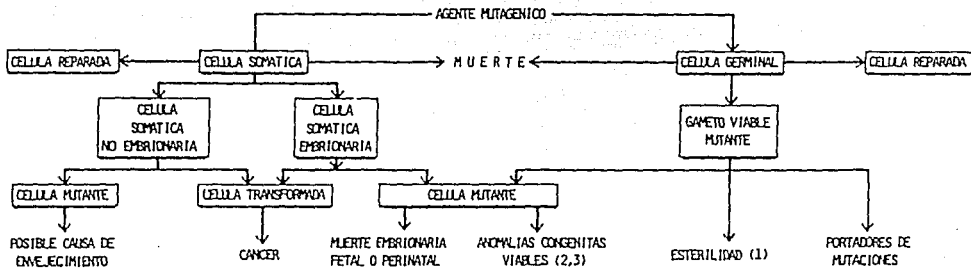


Fig. 1.3. Algunos modelos propuestos para mostrar la variación de los efectos de las radiaciones a dosis de bajo nivel. (Segun: Murkherjee, 1991).



- 1 TANTO LA MUERTE DE LOS GAMETOS COMO SU INCAPACIDAD PARA REALIZAR LA FECUNDACION PUEDEN MANIFESTARSE COMO ESTERILIDAD
- 2 ESTO PUEDE TRADUCIRSE EN INCAPACIDAD REPRODUCTIVA DEL INDIVIDUO
- 3 PUEDEN TRANSMITIRSE DE UNA GENERACION A OTRA CUANDO EL GAMETO ES AFECTADO

Fig. 1.4. Riesgos clinicos de las mutaciones. (Segun: Cortina, 1988).

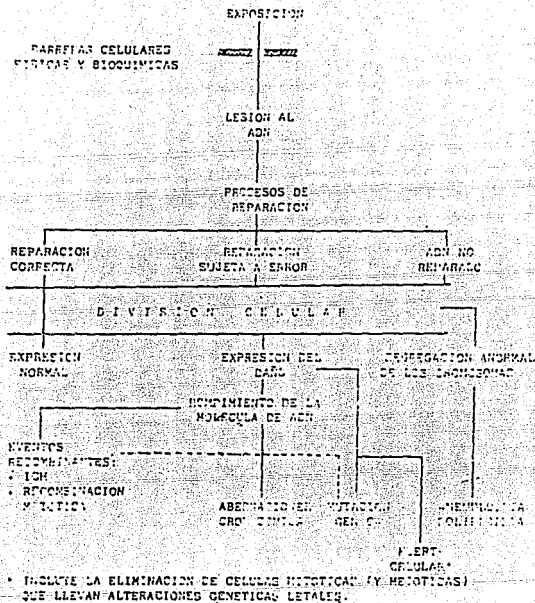


Fig. 2.0. Interacción hipotética entre un agente mutagenico y el ADN. (Según: Delgado, 1990).

Radionucleido	Número atómico	Período	Intensidad energética e intensidad de la radiación					
			α		β		γ	
			MeV	%	MeV	%	MeV	%
Ra^{226}	Radio	1,6 10^4 a	4,60	6			0,186	3,3
Rn^{222}	Emanación	3,822 d	4,78	54				
Po^{218}	Radón (Rn)		5,49	100				
	Radio A	3,05 min	6,00	~100				
Po^{214}	Radio B	26,8 min			0,67	48	0,295	19
					0,75	42	0,352	27
					1,02	6		
						~0,1		
Pb^{214}	Radio C	19,7 min	1,02	100	1,0	22	0,456	45
			1,51	0,003	1,51	20	1,12	15
					3,26	15	1,764	16
Po^{214}	Radio C'	164 μ s	7,69	100				
Tl^{214}	Radio C''	1,3 min			1,3	25	0,256	89
					1,9	56	0,795	107
					2,3	19	1,31	21
Pb^{214}	Radio D	22,3 a			1,13	61	0,647	4
					1,51	19		
Bi^{214}	Radio E	5,61 d			1,61	~100		
Po^{214}	Radio F	138,4 d	5,325	100				
Tl^{214}	Radio E''	4,2 min			1,53	100		
Pb^{210}	Radio G	Estable						

Tabla. 2.1. Propiedades de desintegración de la serie de Ra 226 (Segun: Lederer, et. al., 1978; Weast, et. al. 1968).

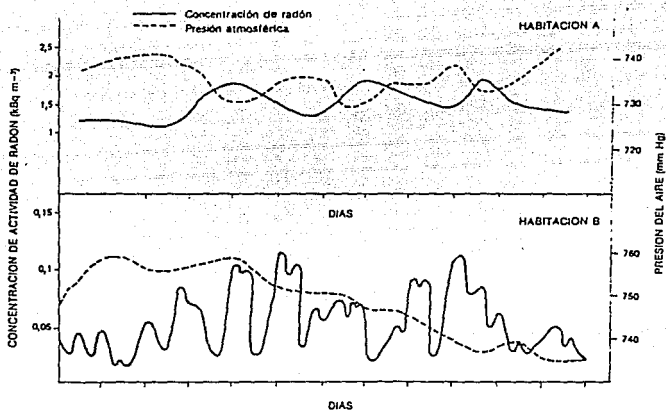


Fig. 2.1. Variación de la concentración de radón en una habitación no ventilada (a) y en una habitación ventilada artificialmente (B). Mediciones hechas en invierno (A) y en primavera (B). (Según: Stranden, et. al. 1979)

País	Material	Número de muestras	Concentración de actividad media (Bq kg ⁻¹)			Ref.	Observaciones
			Ra ²²⁶	Th ²³²	Th ²³¹		
Alemania, República Federal de	Arena y grava	50	< 15	< 19	[N2]	Numerosos orígenes	
	Granito	32	100	81	[N2]	Diferentes tipos	
	Ladrillos (componentes tradicionales)	109	59	67	[N2]	Diferentes tipos	
	Bloques de hormigón con áridos de piedra pómez	31	74	81	[N2]	Muestreo adecuado	
	Bloques de hormigón con áridos de escoria	9	152	100	[N2]	Depende de los materiales utilizados	
	Cemento Portland	14	< 25	< 19	[N2]	Diversos orígenes	
	Yeso natural	23	< 19	< 11	[N2]	Numerosos orígenes	
	Yeso químico (fosfoyeso)	33	253	< 19	[N2]	Depende del origen de la roca	
	Ladrillos de barro rojo	23	251	233	[N2]	Composición variable	
	Ladrillos de barro blanco	—	211	13	[N2]	Numerosos orígenes	
República Checa	Yeso de mina (variación de la estructura geológica y de los niveles de contaminación de las rocas)	—	—	—	[N2]	La estimación depende de la estructura geológica y de los niveles de contaminación de las rocas	
	Yeso de mina (instalación de viviendas)	—	221	10	[U3]	Muestras de distintas instalaciones de elaboración	
	Coque de minas de uranio	—	4625	—	[C1:1]	Evaluación personal de una situación compleja	
Hungría	Hormigón	95	11	11	[T7]	Promedio ponderado por la producción relativa	
	Ladrillos	176	56	43	[T7]	Promedio ponderado por la producción relativa	
Italia	Toba lioleida (Tufo lioleida, Monte Cimino)	—	129	122	[N2]	Material utilizado corrientemente para viviendas	
	Nenfro (variedad de toba, Tosseana)	—	241	218	[N2]	Material de revestimiento para muros	
Polonia	Ceniza volante	106	63—610	33—320	[P4]	Típico material de construcción utilizado en Polonia	
	Escoria	42	17—260	22—590	[P4]		
	Yeso (subproducto)	4	25—740	11—44	[P4]		
	Ladrillos rojos	3	19—22	22—44	[P4]		
	Ladrillos de sílice	3	7,4—15	< 4—7,4	[P4]		
	Cemento	4	7,4—26	11—67	[P4]		
Reino Unido	Tierra	5	3,7—19	< 6—15	[P4]		
	Granitos	7	89	61	[H2]	Muestreo inadecuado	
	Arena y grava	10	4	7	[O2]	Muestreo inadecuado	
	Cemento	6	23	18	[O2]	Muestreo inadecuado	
	Ladrillos de arcilla	25	52	44	[H2]	Muestreo probablemente inadecuado	
	Ladrillos blancos (trabados y calificados) (trabados en autoclave)	5	4	5	[H2]	Pueden variar los áridos	
	Yeso natural	72	22	7	[H2]	Muestreo adecuado	
	Bloques ligeros de distintos áridos	10	19	26	[H2]	Muestreo inadecuado	
Fosfatos procedentes de materiales sedimentarios	69	629	15	[O2]	Depende de la fuente del mineral		

Fig. 2.2. Concentraciones de medias de actividad de algunos materiales de construcción. (Según: OEDC, 1987; Hamilton, et. al. 1991).

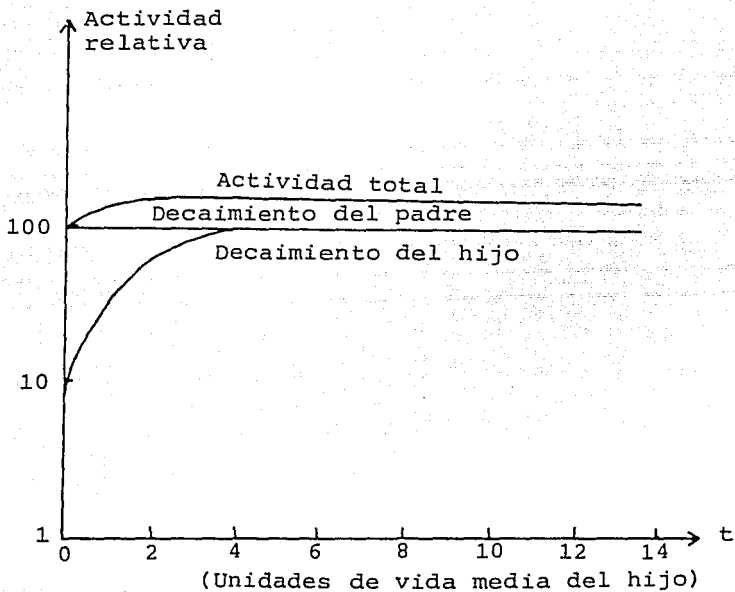


Fig. 2.2b. Relación Padre- Hijo en equilibrio secular.
(Según: Gamboa, 1983).

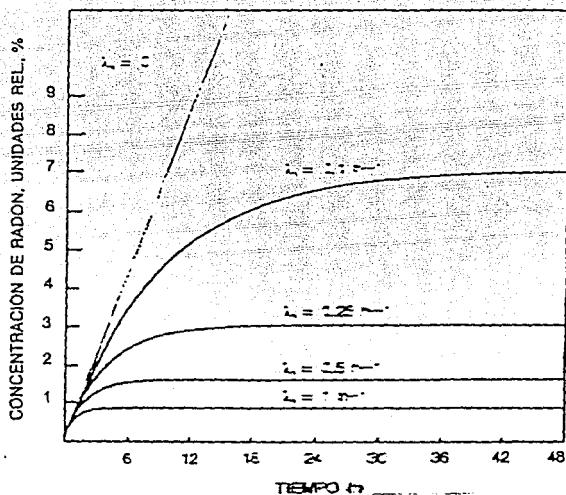


Fig. 2.3. Aumento relativo de la concentración de radón en un espacio cerrado como porcentaje del valor de equilibrio para ausencia de ventilación frente a tiempo con diferentes tasas de ventilación λ (h^{-1}) (Según: Mustonen, et. al., 1980).

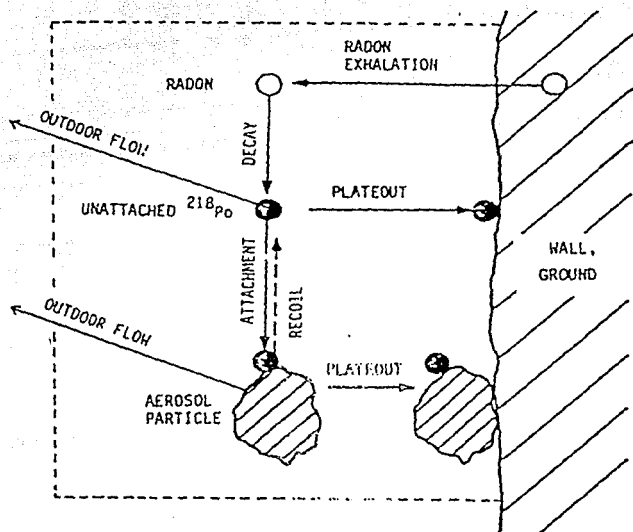


Fig. 2.4. Procesos básicos que influyen en el balance de actividad de los productos de decaimiento del radón. (Según: Mercer; 1976).

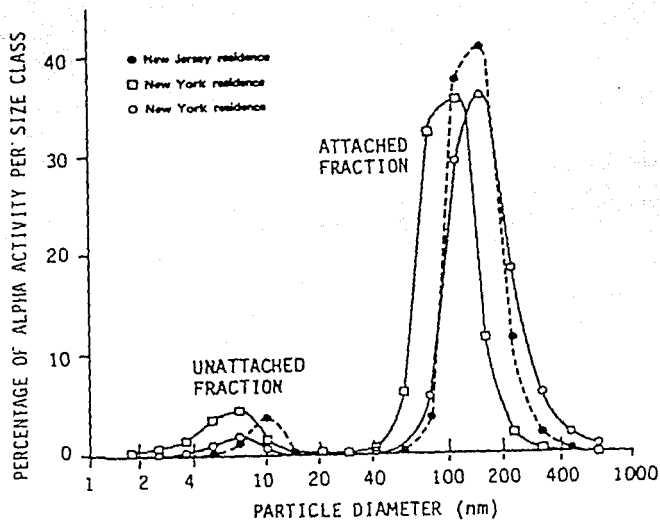


Fig. 2.5. Histograma de la distribución por tamaño de partícula de los productos de decaimiento del radón. (Según: Wrenn; et. al., 1969).

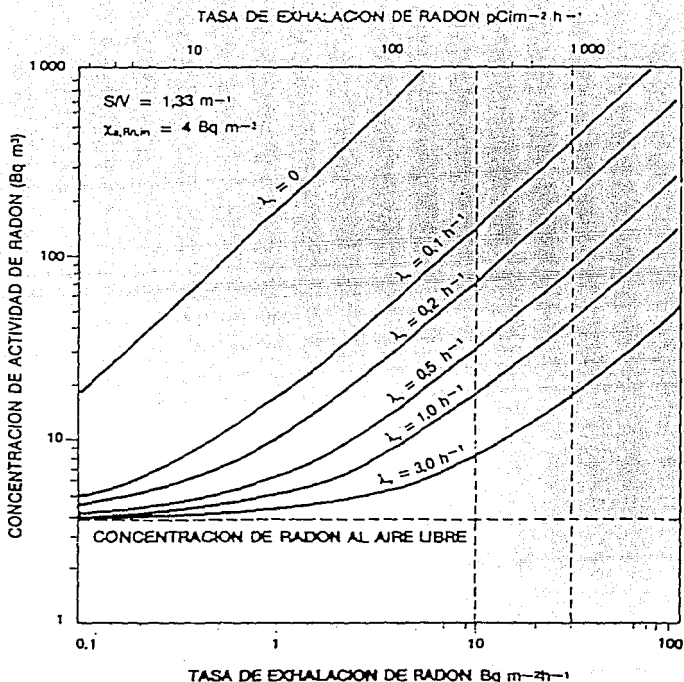


Fig. 2.6. Concentración de actividad de radón en aire de locales en función de la tasa de emanación de radón para diferentes valores de la tasa de ventilación. La zona delimitada con líneas de trazo discontinuo corresponde a tasas de emanación a partir del hormigón obtenidas por medición. (Según: Swedjenark, et. al., 1979).

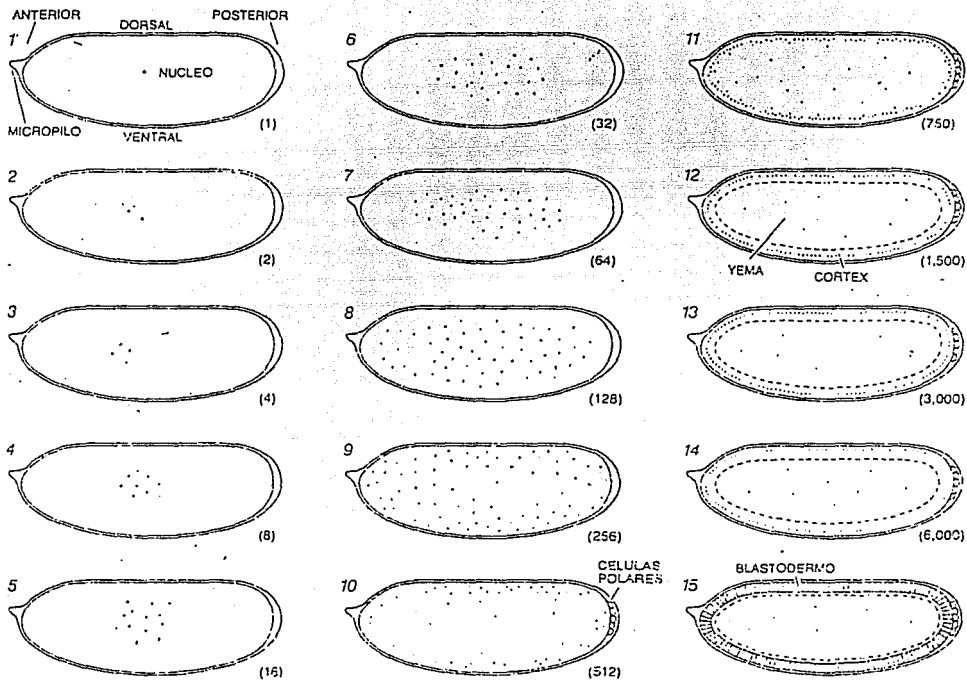


Fig. 4.1. Caracterización de las poblaciones de células en un embrión de *Drosophila* (Segun: Gehring, 1979).

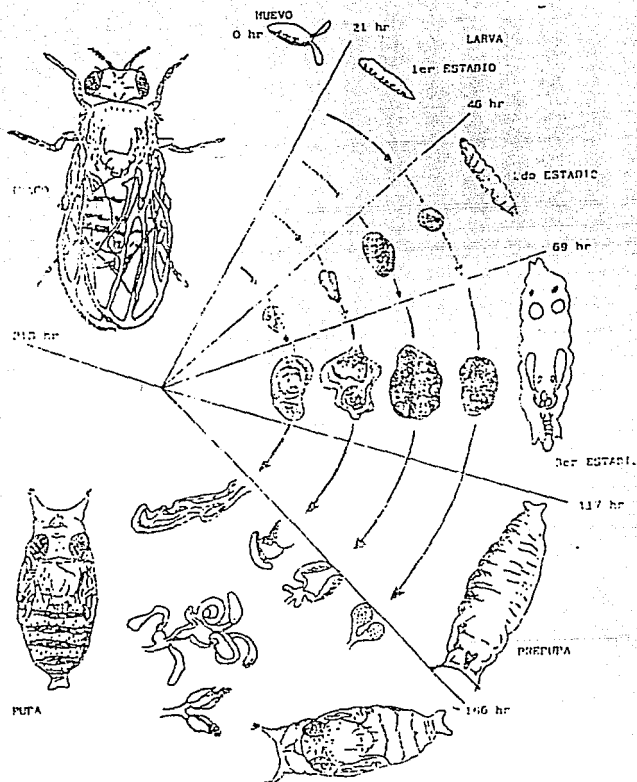


Fig. 4.2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. (Según: Delgado, 1990).

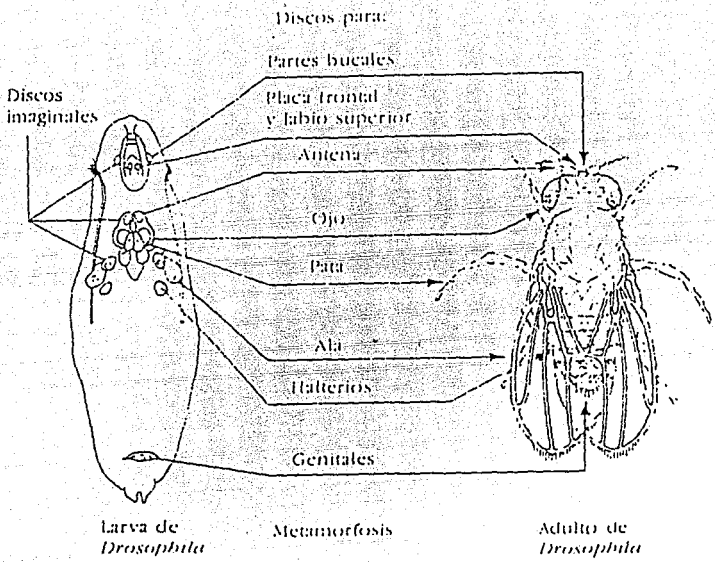


Fig. 4.3. Localizaciones y destinos de desarrollo de los discos imaginuales de *Drosophila melanogaster*. (Según: Gilbert, 1988).

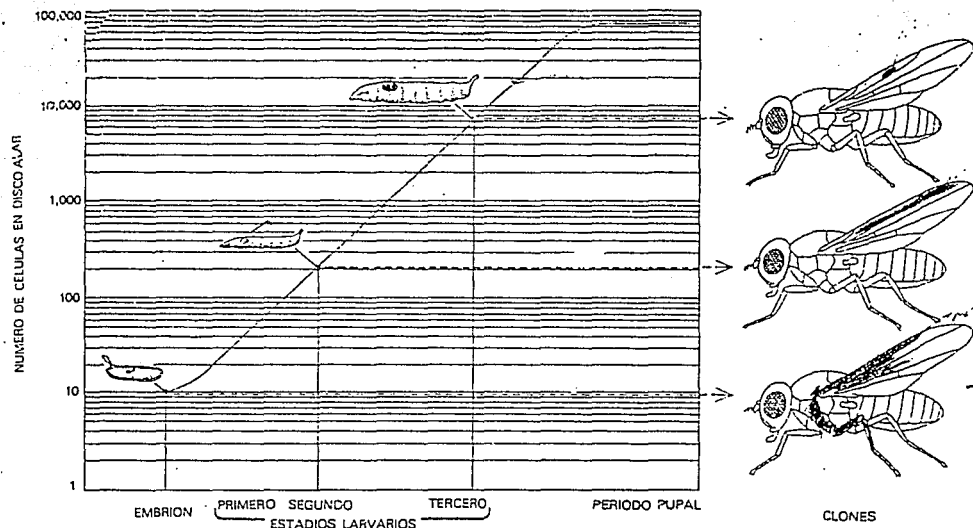


Fig. 4.4. Análisis de los clones inducidos en sucesivos estadios del desarrollo de *Drosophila melanogaster*. (Según: Garcia Bellido, et. al. 1971).

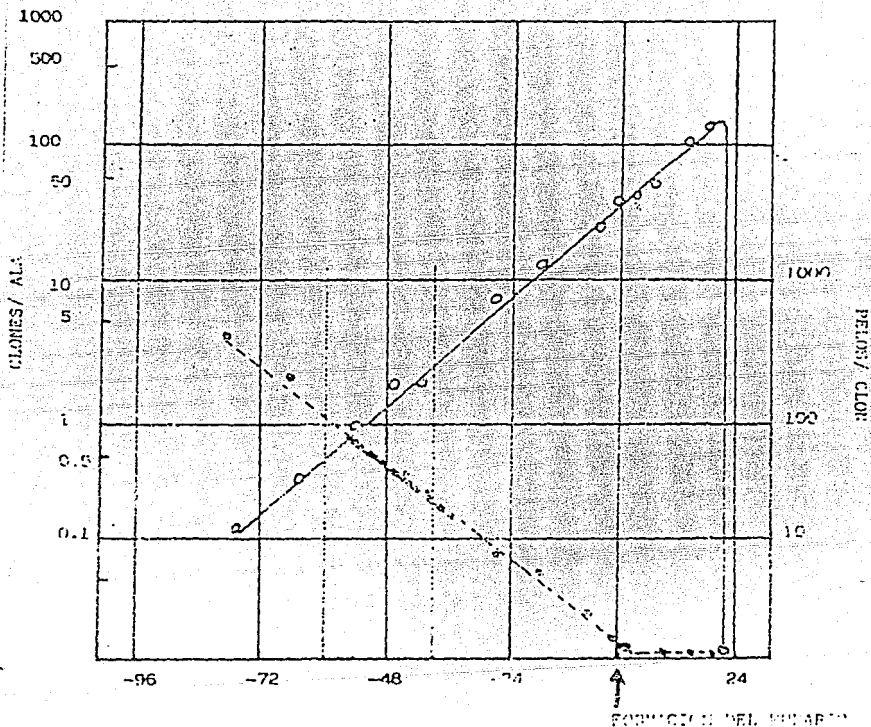
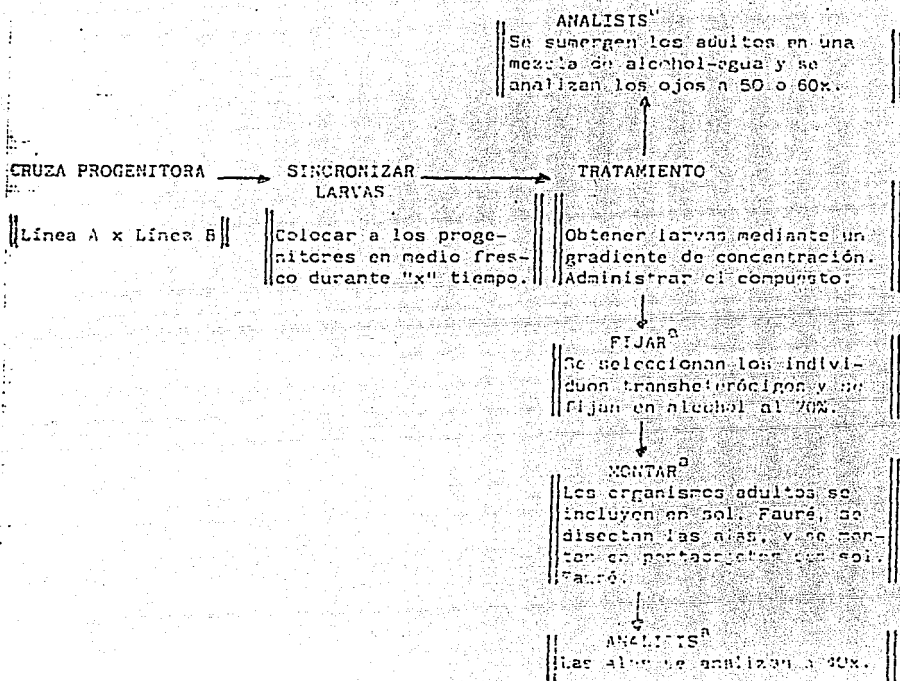


Fig. 4.5. Frecuencia y tamaño de los clones mwh inducidos a través del desarrollo de *Drosophila melanogaster*. El área marcada entre las líneas punteadas indica la edad aproximada al momento del tratamiento. (Según: García-Bellido y Merriam, 1979).



a. Especifico para el protocolo de alas.
 b. Especifico para el protocolo de ojos.

Fig. 4.6. Diagrama general de la técnica SMART. (Según: Graf, 1979).

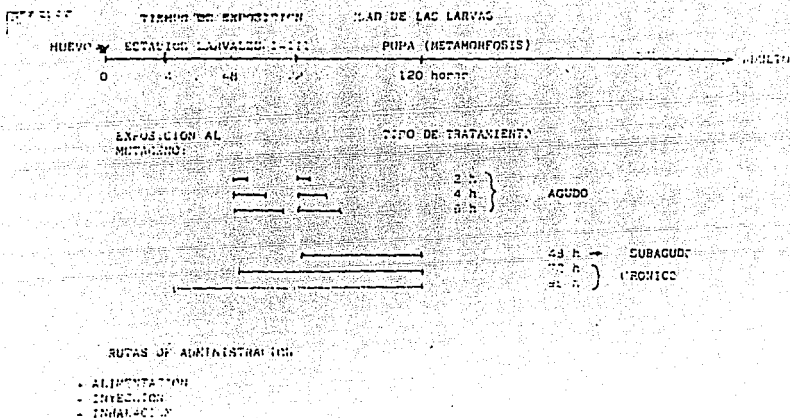
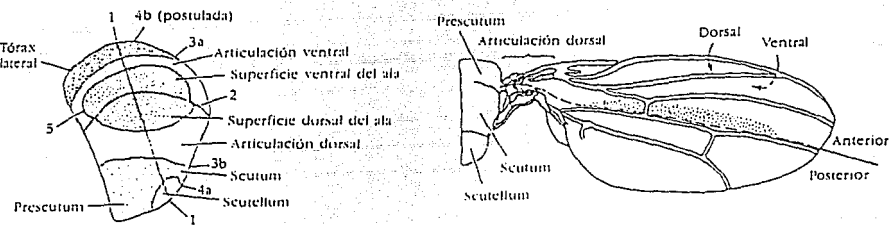


Fig. 4.7. Versatilidad del protocolo de la prueba SMART. (Según: Delgado, 1990).



(A) DISCO DEL ALA

(B) ALA ADULTA

Fig. 4.8. Fronteras de formación entre los compartimientos del disco del ala en *Drosophila*. (Según: Gilbert, 1988).

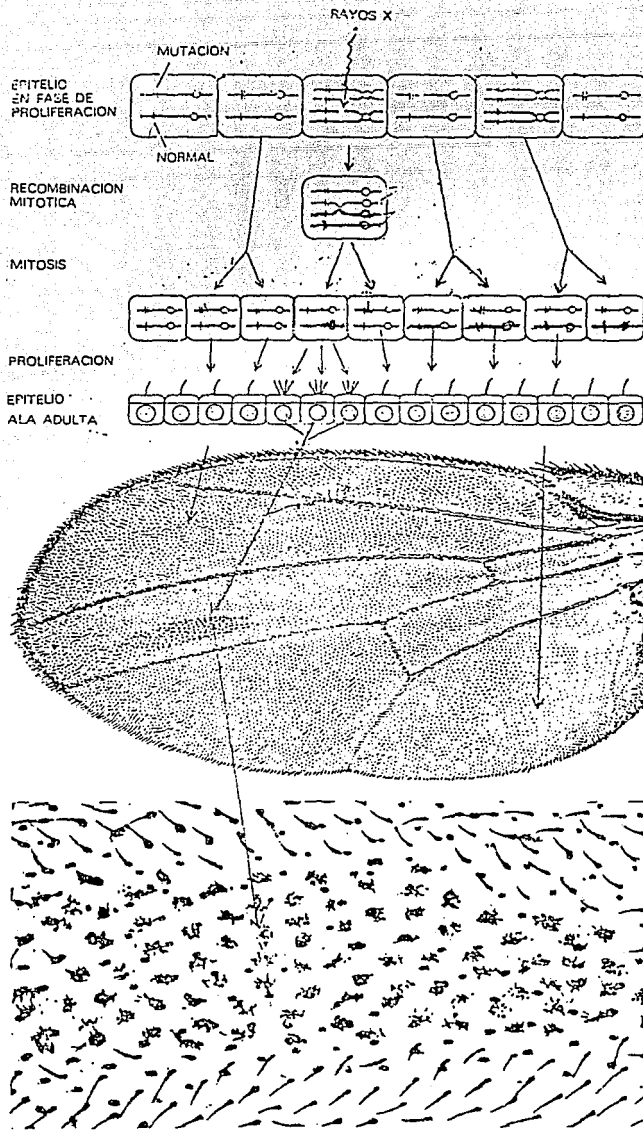


Fig. 4.9. Tricomas caracterizados en el ala de *Drosophila melanogaster*, utilizados como base de una prueba de mutagenesis. (Segun: Garcia-Bellido, et al., 1979).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Fig. 4.10. Eventos recobrados con la prueba de SMART en las alas de *Drosophila melanogaster*. (Según: Graf, 1989).

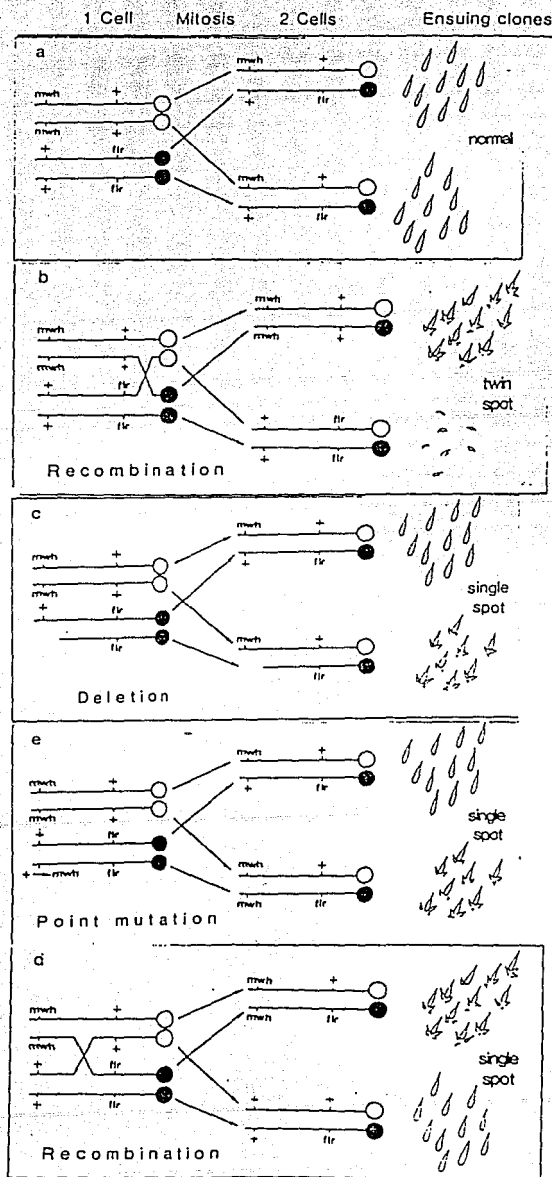
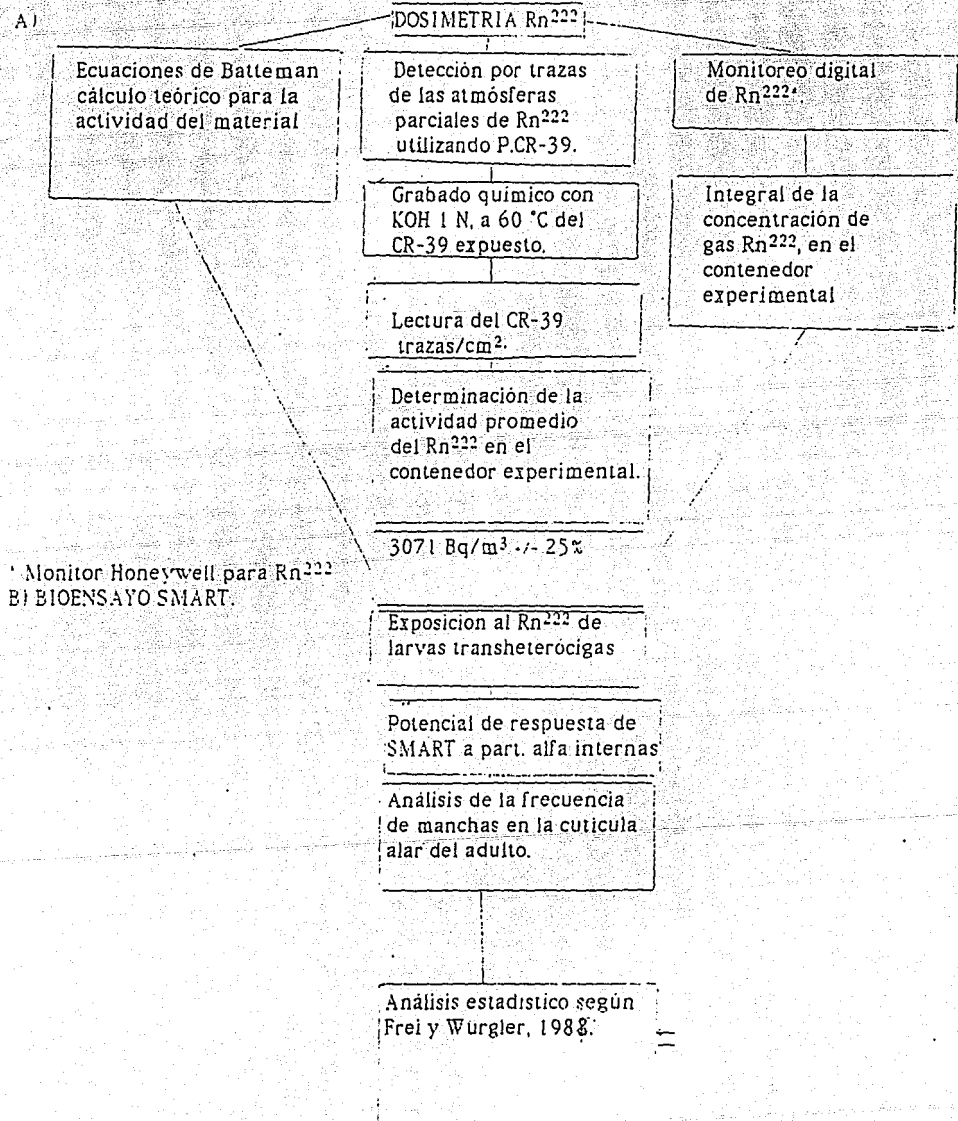


Fig. M.1. DIAGRAMA DE TRABAJO PARA LA DOSIMETRIA DE ATMOSFERAS PARCIALMENTE SATURADAS DE Rn²²² Y SU VALORACION A TRAVES DE SMART.



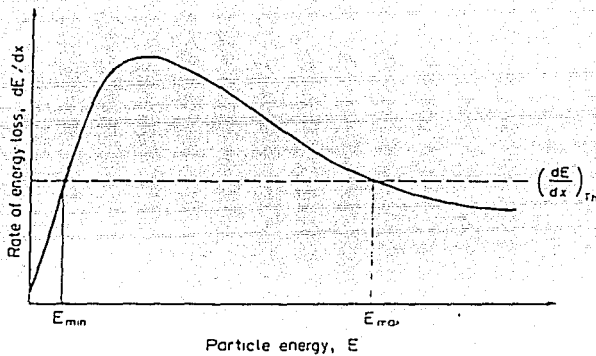


Fig. M.2. Caracterización de las sensibilidades máxima y mínima de un DTNES polimérico como el LR-115 o el CR-39. (Según: Green, 1984).

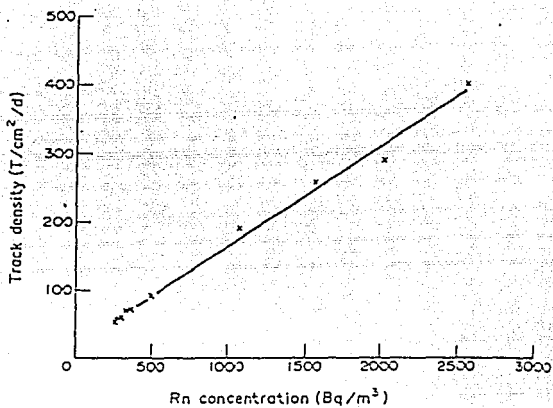


Fig. M.3. Curva patrón para el DTNES CR-39, expuesto a diferentes concentraciones de Rn. (Segun: Khan, 1990).

LÍNEA DE HEMBRAS

mwh / mwh

LÍNEA DE MACHOS

$flr^3 / TM_3, Ser$ x $flr^3 / TM_3, Ser$

$\frac{mwh}{flr^3}$	flr^3	TM_3, Ser
flr^3	flr^3 / flr^3 <u>total</u>	$flr^3 / TM_3, Ser$ <u>Serrata</u>
TM_3, Ser	$flr^3 / TM_3, Ser$ <u>Serrata</u>	$TM_3, Ser / TM_3, Ser$ <u>total</u>

CRUZA PROGENITORA mwh / mwh x $flr^3 / TM_3, Ser$

F_1 mwh + / + flr^3
mwh - / - TM_3, Ser

Fig. M.4. Esquema de cruce para la obtención de larvas mwh/ flr^3, Ser . (Según: Graf. et. al. 1984).



Fig. M.5. Tricomos en la superficie del ala. a) normales, b) tricomos no considerados mwh o flr, c) diversas formas en las que se puede presentar mwh, d) expresiones típicas de flr (Según: Graf, et. al., 1984).

Cruza : Hembras mwh/ mwh x machos flr³/TM₃ Ser

Tratamiento : Subagudo (larvas de 72 -- 2h)

Testigo : Medio normal, exposicion nula de Radon ²²².

Ruta de administración : Inhalacion (irradiacion interna).

Repeticiones : 3

Registro de datos : Análisis de la frecuencia de manchas (simples y dobles) en la cutícula alar del adulto por medio de microscopio compuesto a 40x.

Análisis estadístico: Software SMART, (Frei y Wurgler, 1988).

Fig. M.6. Características del protocolo SMART empleadas para el Radón ²²².

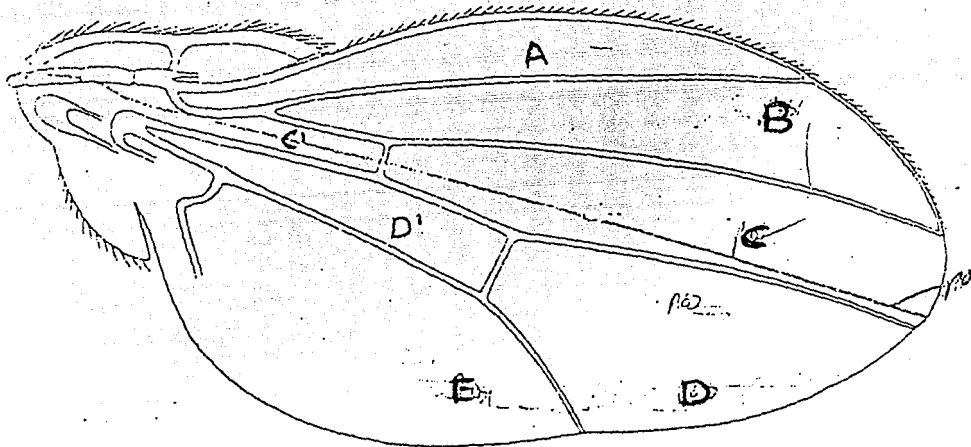


Fig. M.7. Forma en la que se divide el ala para el registro de manchas en SMART-a. (Según: García-Bellido y Merriam, 1971).

<i>Traditional name</i>	<i>Isotope</i>	<i>Half-life</i>	<i>Radiations</i>	<i>α-particle decay energy (MeV)</i>
Radon	^{222}Rn	3.82 days	α	5.49
Radium A	^{218}Po	3.05 min	α	6.00
Radium B	^{214}Pb	26.8 min	β, γ	-
Radium C	^{214}Bi	19.8 min	β, γ	-
Radium C'	^{214}Po	164 μs	α	7.69
Radium D	^{210}Pb	22.3 years	β, γ	-
Radium E	^{210}Bi	5.01 days	β	-
Radium F	^{210}Po	138.4 days	α	5.30
Radium G	^{206}Pb	stable		

Tabla M.1. Intervalo de energía de la energía de la progenie del Rn 222 , correspondiente a la serie del U 238 . (Según: Durranii, et. al., 1990).

<i>Traditional name</i>	<i>Isotope</i>	<i>Half-life</i>	<i>Radiations</i>	<i>α-particle decay energy (MeV)</i>
Thoron	^{220}Rn	55.6 s	α	6.29
Thorium A	^{218}Po	0.15 s	α	6.78
Thorium B	^{214}Pb	10.64 h	β	-
Thorium C	^{214}Bi	60.55 min	β (66.3%) (to ^{214}Po) α (33.7%) (to ^{210}Tl)	-
Thorium C'	^{214}Po	0.3 μs	α (to ^{210}Pb)	6.1
Thorium C''	^{210}Tl	3.05 min	β (to ^{210}Pb)	8.78
Thorium D	^{210}Pb	stable		

Tabla M.2. Algunas características de la progenie del Rn 220 , correspondiente a la serie del Th 232 . (Según: Durrani, et. al., 1990).

<i>Type of plastic</i>	E_{min} (MeV)	E_{max} (MeV)
Lexan and Makrofol E polycarbonates	~0.2	~3
Cellulose nitrate (CA80-15; CN 85; LR 115 ^t ; Daicel)	~0.1	4-6
CR-39 (homopolymer of allyl diglycol carbonate)	~0.1	>20

Tabla M.3. Límites en las energías detectables de partículas alfa por los detectores plásticos. (Según: Durrani, et. al., 1990).

TECNICA	VELOCIDAD DE EXPLORACION cm ² /min	DENSIDAD DE TRAZAS cm ⁻²	COMENTARIOS
Exploración óptica	0.15		Discriminación por altura de pulsos. Selección de señal característica.
Exploración óptica (con enfoque automático)	0.002	10^3 a 10^5	Aplicable a policarbonatos.
Conteo por chispas en C. D. con escalador	10	0 a 3000	El voltaje genera defectos.
Conteo por chispas en C. A.	100 a 200		Evita muchos defectos.
Dispersión de luz		10^4 a 10^6	
Transmisión de luz por DTES. Plástico opaco		4×10^4 a 3×10^6	Luz ultravioleta a través de Mylar
Detector de barrera superficial + DTES		4×10^2 a 10^5	Registra partículas alfa a través de las trazas del DTES.
Conductividad eléctrica a través del DTES		1 a 10^{11}	
Contador de bacterias			Se puede seleccionar la zona y la forma del área contada.

Tabla M.4. Descripción de procedimientos para el conteo de trazas en DTNES.
(Segun: Gamboa, 1983).

Source strength (Bq m ⁻³)	Exposure time (h)	Measured track density (cm ⁻² d ⁻¹)	Calibration factor tracks cm ⁻² d ⁻¹ per (Bq m ⁻³)
250	20.25	51	0.20
290	68.75	58	0.20
353	68.33	69	0.19
321	20.58	68	0.21
485	20.17	90	0.18
1070	20.33	189	0.18
1554	20.25	256	0.16
2009	20.50	288	0.14
2550	20.33	400	0.16

Tabla M.5. Factor de calibración para el detector CR-39 expuesto al Rn. (Segun: Khan, 1990).

Sample No.	Type of detector	Calibration factor	
		Tracks $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ per (Bq m^{-3})	Tracks $\text{cm}^{-2} \text{d}^{-1}$ per (WL)
1	Teradex	0.06	—
2	Teradex	0.05-0.062	—
3	LR-115	0.037	—
4	LR-115	0.02	—
5	LR-115	—	4.2×10^2
6	LR-115	0.028	4.8×10^2
7	CR-39	0.05-0.1	$(3.4-7.7) \times 10^2$
8	CR-39	0.2	—
9	CR-39	0.18	1.6×10^3

Tabla M.6. Valores de los factores de calibración para diferentes DNTES. (Según: Khan, 1990).

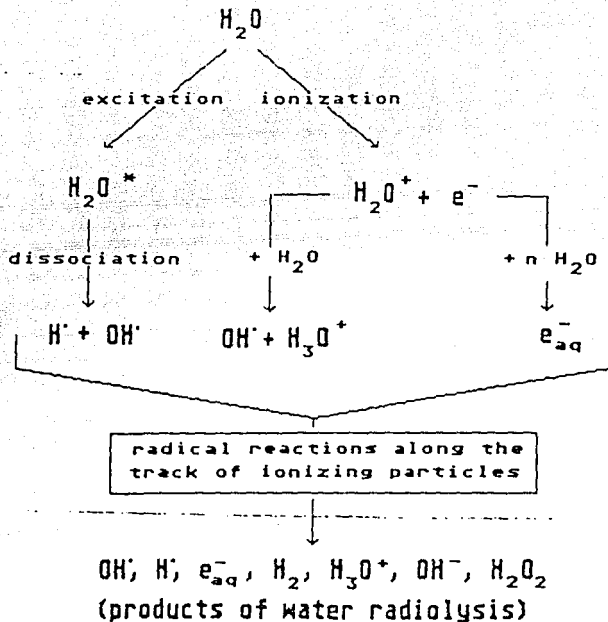


Fig. D.1. Esquema de la radiolisis primaria del agua.

(Según: Stark, 1991):

No Hay Hoja

95
/m

BIBLIOGRAFIA.

- ABRAHAMSON, S. y Lewis, E. B. (1971). The detection of mutation in *Drosophila melanogaster*: sions and lung cancers induced in rats by inhaled radon-222 at various equilibriums with radon daughters. Health Phys. Vol. 27 No. 34.
- ALBERTS, B.; Watson, F.; Bruce, B. (1985) Biología molecular.
- ALPER T. (1979) Cellular Radiobiology. Cambridge Univ. Press. London.
- AMES, B.; (1973) An improved bacterial test system for the efecion and classification of mutagenes and carcinogens (Proc. Natl. Academ. Csi USA 70:782-830.
- Bale w. (1951) Hazards asociater with radon :Health Phys.:38.1061.
- BRAND, M. (1968) Cancer en México; Rev. Med; Hosp. Gral. Mex;31,267-278
- BRICARD, C; Bouth, G; Belanger R (1965) The need for radiation controls : Health Phys 32:285-290.
- BRUSICK, D (1988) Principles of genetic toxicology :Pleum Press. New York USA, pp.284
- BURBAN F. (1971), Patterns in cancer mortality in the United States, 1950-1967: Nat. Cancer Inst. Mograph 33. US.
- DUMOND, D. (1985) Population and American future; Science:187:713-721.
- CAIRNS, J; (1981) Cancer science and society ; W.h. Freeman and Co. San francisco.
- CHANDLEY, A.C. and Bateman A.J. (1962). Timing of espermatogenesis in *Drosophila melanogaster* using tritiated thymidine. Nature, 20, 299-300.
- Ciencias por una educacion popular; vol.2; .Fac de Ciencias UNAM.
- COHN, S; Skoow, R ; Gongg J.; (1953) Radon inhalation Studies in rats Arch. Ind Med; 7-508
- CROSS, F. (1988) Inhalation hazard to uranium miners ;NISS-UA No.41
- CROSS, F.; Palmer R; Busch, R; (1987) An overview of PNL Radon experiment; Environ. Prot. Agency, Rockville.
- CROSS, F.T. (1984). A review of radon inhalation studies in animals with reference to epidemiological data. Research Report for Senes Consultants, LTD. Ontario. Canada. Battelle Pacifics Northwest Laboratories Richland, W.
- CROSS, F.T., Palmer, R.F. and Stuart, B.O. (1982). Carcinogenic effetcs of radon daughters, uranium ore dust and cigarette smoke in beagle dogs. Health Phys.

Vol. 42 No. 35.

DELGADO A. (1990) Dano genético inducido por mutagenos positivos en el ala de *Drosophyla melanogaster*. Tesis Fac. de Ciencias UNAM

DEMERECK, M.(1965). Biology of *Drosophila*. Hafner Publishing Co. New York. pp.633.

DIAZ, P. (1990). La radiacion y la medicina; ICYT INFORMACION Vol.12 No.5

DURRANI, I.; Bull L; Read,k.(1985) Solid stae nuclear track detection, principles methods and applications; Pergamon Press Oxford.p.p547.

ESPINOSA, G.(1990). El Radon y su impacto en la salud publica.Bol. Soc. Mex.Fis. Vol. 4 No. 1.p.36.

ESPINOSA,G. (1990a) Eighth due Workshop on personal neutron dosimetry; june 18-19

ESPINOSA,G. (1990b)Proc VII th conf. on SSNTDS Bristol.

FAHMY, M.J and Fahmy O.G.(1980). Altered control of gene activity in the soma by carcinogens. Mutation Res. 72. 165-172.

FIALKOW, P, (1974) The origin and development of human tumors studied with cell marker; New Eng Med: 291,26-35.

FLOREY L (1983).General Pathology 4a ed (Wb.Sanders Co.) Lond. Pres. p.p 611.

FREI, H.;Wurgler, F.E. (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. Mut. Res. 203: 297-308.

FRISTOM, J.W. (1969). Problems in biology. Ed. E.W. Hanley. UTAH Press. p.383.

GAMBOA, M.(1983) Determinacion de uranio en agua por detectores por trazas en solidos (DTES); Tesis Fac. de Ciencias UNAM

GARCIA-BELLIDO, A.; Dapena,J. (1974) Induction detection and caracterization of cell differentiation mutants in *Drosophyla mol.gen.* ; Genet:128,117-130.

GARCIA-BELLIDO, A.; Lawrence, P.A. Morata, G. (1979). Compartments in animal development. Sci. Am. 241(11): 102-111.

GARCIA-BELLIDO,A; Meriam, J.:(1971) Parameters of the wing imagal disc development of *Drosophyla melanogaster* Dev. Biol.24:61-87.

GASELL,T.(1977)The teach nologically enchanled natural .Radiat. Environ. Health Phys. 28:361-366.

GASTINEAU, R.M., P.J. Walsh. (1972). Thickness of bronchial epithelium with

- relation to exposure to radon. Health Phys. 23:857-860.
- GASTINEAU,R;Gasell,t; Prichard,P.(1977)The tecnologically enchaced natural radiation environmental.:Health. Phys.28.361-366.
- GEHRING. W. (1967). Clonal analysis of determination dynamics in cultures of imagal disk in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. 16: 438-457.
- GILBERT, S. (1988). Developmental Biology. Sinauer. USA.
- GILBERT. S.:(1988) Biologia del desarrollo. Omega Barcelona España
- GOODENOUGH, U. (1981). Genetica ed. Omega. Barcelona. España. 820 pp
- GRAF, U., Frei H., Kagi, A., Katz, A.J., Wuergler F.E. (1989). Thirty compounds tested in wing spot test. Mutation Res. 222. 359-373.
- GRAF, U., Wuergler F.E.,Frei H. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. Environ. Mutagen. 6,153-188.
- GRAF, U.; Juon, A.; Katz, H.;Frei,H.; Wuergler,F. (1983) A pilot study on new *Drosophy/a* spot test ;Mut. Res 1220:233-239
- GRAF, U; and Schaik Van(1991)Improved "high bioactivation" cruse for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophy/a* Mut. Res .
- GRAF,U; Frei,H; Froelich A.; Wuergler F.(1989) The *Drosophy/a* wing somatic mutation and recombination tests Mutagenesis.; 4:318
- GUZMAN. R. J. I. (1984). Efecto de la cafeina y la radiacion ionizante en *Drosophila melanogaster*. Tesis doctoral. Fac. Ciencias. UNAM.
- HAMILTON E. Kolow, I.;Chimirth, S.(1971) The chemical elements and humanmorbidity, Sci Total Environ 3:3-85.
- HARDON, E. (1968). Transdetermination in cells. Sci. Am. 299 (5) : 110-123.
- HENSON DE JNC (1983) Topicos del desarrollo del cancer en Mexico. Henson de JNC:1:1983,979-984.
- HOLLEMAN, D., B. Martz and K. Schiager. (1969). Total respiratory deposition of radon daughters from inhalation of uranium mine atmospheres. Health Phys. 17: 187-192.
- INTERNATIONAL Commission on Radiological Protection (ICRP). (1977). Limits for inhalation of radon daughters by workers. ICRP,publication 30. Pergamon Press. New York.

INTERNATIONAL Commission on Radiological Protection (ICRP). (1981). Limits for inhalation of radon daughters by workers. ICRP, publication 32. Pergamon Press. New York.

JACKSON, M.L. (1940). The biological effects of inhaled radon. Massachusetts Institute of Technology Cambridge.

JANSEN, H. and Schultzer, P. (1926). Experimental investigations internalradium emanation therapy. Acta Radiol. Vol. 6 No.631.

KARP, S (1987) Biología celular; Interamericana; Bogotá Colombia; p.p.830

KASTENBAUM, M; Bowman, M; (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frecuencies; Mut. Res :9,527-549.

KHAN, A.J., Varshney, A.K. (1990). Calibration of a CR-39 plastic track detector for the measurement of radon and its daughters in dwellings. Nucl. Tracks Radiat. Meas. Vol. 17 No.4 p.497-502.

KOTRAPPA, P., D.P. Bhandi and R. Dhandayutham. (1975). Diffusion sampler. useful for measure diffusion coefficients and unattached fraction of radon and thoron products. Health Phys. 29:155-162.

KUSHNEVA, V.S. (1959). On the problem of the long term effects of combined injury to animals of silicon dioxide and radon. US Atomic Energy Commission Division of Technical Information. Washington, DC. p.21.

LEDERER, D; Linton, R. and Loh, D (1978) Surface predominance of trace element in airborne particles; Science 191:852-854.

LEWIS, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* Nature 276 : 565- 570.

MARTIN J. (1972) Environmental aspects of nuclear power stations. Report 234 (OIEA) Viena Austria p.p.337.

MERCER, T.T. (1976). The effect of particle size on the escape of recoiling RaB atoms from particulate surfaces. Health Phys 31:173-175.

MORATA, G.; Lawrence, P.A. (1977). Homeotic genes compartments and celdetermination in *Drosophila* Nature 265: 211-216.

MORGAN, R.; Strandem F.; Rothery, D; (1967) Methods for evaluation of radiation from buildns materials. Radiat. Prot. Dos.:65,34-45.

MURKHERJEE, R; Mrcheva J.; Pensko, J; (1991) Los sectores biológicos de

las radiaciones de bajo nivel y el riesgo de cáncer: Bol. OIEA:21, 1991
MUSTONEN R.; Sranden E.; Ulbak,K.(1980) Activity concentration of building material ; Radiat. Prot. Sci:29:361-369.

NAZORF,B; Cross,F; Palmer,R; (1988) Carcinogenic effects of radon daughters:Health.Phys.:42,30-33

NEGRON A. (1986) Evolución Química y síntesis abiótica :CIENCIAS Fac. Ciencias UNAM. p.p.4-13.

NERO. A.; Lowder V.(1983) Radon concentration and infiltration rates measured: Healt.. Phys. 45,401

NOTHIGER, R. (1976). Clonal analysis in imagal disk. In : Insect Development. P.A. Lawrence.(ed). Royal Entomological Society of London Simposium No.8 pp. 109-117.

NUCLEAR Enegy Agency of OCED(1987) Exposure to radiation from the natural radioactivity of building materials Report: SSNN OCED/NEA..

O RIORDAN C.(1981) Radiological controls for construction materials p.p.1053-1056:International Congress of IRPA.

O RIORDAN, M.C.(1980). A review of indoor exposure from natural radiation, p.183-192. in: Seminar on the Radiological Burden of man from natural radioactivity in The Countries of the European Community. CEC.doc.V/2408/80. p.p.430

PENSKO J.;Spezynska Z.; Polgar E.(1980) Natural arificial radioactivity. IV th. International congress of IRPA procedins.

PERRAUD,R., Chameaud, J. (1970). Cancer pulmonaires experimentaus chez le rat apres inhalation de radon associe a des poussieres non radioactives. Compt. Rend. Serv. D. 270, 2594.

PORSTENDORFER,J., Wiske, A.(1980). Methods for a continuous registration of radon, thoron and their decay products indoors and outdoors. p.1293-1307. In: CONF-780422.

PRICE W.; (1971) Nuclear Radiation Detection Mc Grall-Hill N.Y.,p.p.547.

PROGRAMA Universitario de Investigacion en Salud(1985);Anales; Radiat. Prot. Dos. 7.-45.

RICHMOND, C.;Boecker, B.; Stewart C.(1971)Experimntal studes environmental; Protection Agency, Rockville D.D. SS11-45

ROSSI,H; Kellerer, A; (1974) The validity of risk estimates of lukemia incidence based on japanese data.;Radiat Res. 58,131-140.

SANKARANARAYANAN, K; Sobels, F; (1975) Radiation genetics en: Genetics and biology of *Drosophyla*; Ashburner and novitski eds. Academic Press New York.

SCHNEIDERMAN, H.A.:(1976).New ways to probe pattern formation and determination in insects. In : Insect Development. P.A. Lawrence.(ed). Royal Entomological Society of London Simposium No.8 pp. 3- 34.

SHAPIRO J.; Archer.V. Wagoner J.(1954) An evaluation of the pulmonary radiation ;Pros-report Ur-298

STARK,G. (1991) The effects of ionizing radiation on lipids membranes.Biochemical et biophysical acta:1071,103-122.

STERN, C. (1968). Genetic mosaics and other essays. Cambridge: Harvard University Press.

STRANDEN,R;Stynadon,C;(1979)Surface enrichment of aluminosicate minerals atm.environment 15:307-313.

SWEDJEMARCK G.; Hakanson. B; Halberg GN.(1979) Radiation Levels in houses buildings on waste S.S.I. 1979-006.

SZABAD J.; Pulgar, G(1993) Testing the mutagenicity of malondialdehyde by the *Drosophyla* mosaic and the sex-linked recessive lethal test .Mut.Res.:113,117-133.

SZABAD, J., Soos .I. ;(1983). Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test. Mutation Res. 113, 117-133.

TOMLINSON C.:(1980) Effects of ph on the mutagenicity of sodium azide *neurospore crasa* and *salmonella* Mut. Res 70:179-191.

UNITED Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. (1977). Sources and effects of ionizing radiation. United Nations, New York.

UNITED Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation.(1988). Sources and effects of ionizing radiation. United Nations, New York.

UNITED States Environmental Protection Agency. (1988). Environmental analysis of uranium fuel cycle. Part I. Fuel Supply. EPA - 520/9-73-003-B.

URBAN K.:(1984) Radon exhalation from samples of concrete

VITAL Statistical of the United States (1968) Mortality; Washington D.C. U.S. Printing Office p.p.3040.

Vol 19, 2 ; UNAM :p..12

WEAST,W: Wallace,R: Wachsman,F (1968) Measurement of ionizing radiation from color television receivers by thermoluminescent dosimeters ; Healt. Phys.: 28.78-80.

WILKENING, B; Dixon, D; Zurk W.(1966) The radiological testing of consumer products WRPB-R85.

WILKINS, A.S.(1985). Genetic analysis of animal development . Ed. J. John Wiley and Sons, New York, USA. 1500 pp.

WRENN, A.; Reid, D ;Sackeid (1969) Uranium and Radio 226 in florida: Health Phys. :237: 269-277.

WUERGLER F.; Graf u.; Frei.H. and Juon.H. (1984) Detection of point mutation chromosome aberrations, and somatic recombination ;Bass, R. eds. p.p.185-223.

WUERGLER F.; Graf, U.;Frei.H.(1985) Somatic mutation and recombination in winwg of *Drosophyla* M. Ishidate eds.p.p.325-340.

WUERGLER,F; Vogel E.(1986) In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophyla*;en: Mutagens, Principples and method for detection.vol 10 Plenum press New York .

WURGLER, F. (1980). Mutagenicity Testing with *Drosophila* Arch. Toxicol. 46 pp. 77-87.