



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

96
SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA

**EVALUACION DEL DAÑO AL ADN EN TRABAJADORES
OCUPACIONALMENTE EXPUESTOS A RADIACION
MEDIANTE EL METODO DE ELECTROFORESIS
UNICELULAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANGELICA GRACIELA MARTINEZ HERNANDEZ

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

MEXICO, D. F.

1995



FALLA DE ORIGEN



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Barule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "EVALUACION DEL DAÑO
AL ADN EN TRABAJADORES OCUPACIONALMENTE EXPUESTOS A RADIACION ME
DIANTE EL METODO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR"

realizado por ANGELICA GRACIELA MARTINEZ HERNANDEZ.

con número de cuenta 8715197-2 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario BIOL. MARCELA BEATRIZ BLANCO IBAÑEZ. *Blanco*

Propietario MED. CIR. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI. *Carnevale*

Propietario DRA. SARA FRIAS VAZQUEZ. *S. Frias*

Suplente BIOL. BERTHA MOLINA ALVAREZ. *Bertha Molina*

Suplente BIOL. LAURA GOMEZ LAGUNA. *Laura G.*

Consejo de Asesoría de Biología

[Firma]
COORDINACIÓN GENERAL
DE BIOLOGIA

A mis padres

por su confianza y dedicación.

A Carmen

el tenerla como hermana ha sido una gran experiencia.

A Alberto

*porque con cariño y paciencia me demostró que
el romper de una ola no es todo el mar.*

A Erika y Emir

por su amistad a través del tiempo.

A Daniel

por su apoyo incondicional.

A Gina, Suraya, Alfonso y Kenia

estar con ustedes fue una agradable experiencia.

A Ruth

*por no permitir que fuera un fantasma
en ese gran elefante blanco.*

Mi más sincero agradecimiento a:

Consuelo, Silvia y Emilio
por todos los momentos que pasamos juntos.

Las Dras. Sara Frías y Alessandra Carnevale
por compartir sus conocimientos de una manera incondicional.

Y las Biols. Beatriz B. , Patricia P., Bertha M. y Laura G.
por su gran apoyo para la elaboración de este trabajo.

***"La ignorancia mata a los pueblos,
por ello es preciso matar la ignorancia"***

José Martí

INDICE

1. Introducción	1
2. Justificación	14
3. Objetivos	14
4. Hipótesis	14
5. Población de estudio	15
6. Metodología	16
7. Resultados	18
8. Discusión	30
9. Conclusiones	33
10. Referencias Bibliográficas	39
11. Apéndices	34

INTRODUCCIÓN

Características de las radiaciones ionizantes

Los efectos de la radiación ionizante han sido investigados en el organismo completo y en sus tejidos, a nivel celular o molecular. Los primeros estudios de los cambios biológicos inducidos por la radiación ionizante comenzaron poco después del descubrimiento de los rayos X por Roentgen en 1895 (1).

La radiación es el acarreo de energía sin la necesaria intervención de un medio de transporte como el agua. Existen dos maneras de producir radiaciones ionizantes; la primera es cuando partículas cargadas excitan a electrones y éstos al desexcitarse producen radiaciones secundarias como los rayos X, o bien por desintegración de núcleos radiactivos (2). Las radiaciones emitidas por sustancias radiactivas se conocen con el nombre de radiaciones alfa, beta y gamma; su clasificación se basa en sus poderes de penetración crecientes y de ionización decrecientes; las dos primeras están formadas por partículas cargadas y la tercera por partículas sin carga y corresponde a la radiación electromagnética. Las diferentes formas de radiación electromagnética son cualitativamente iguales, la diferencia reside en la forma en que son producidas y detectadas, así como en sus longitudes de onda y sus frecuencias. Cuadro 1 (3).

Cuadro 1. Espectro de las ondas electromagnéticas.

Frecuencia/ Hertz		10 ⁹		10 ¹⁰		10 ¹¹		10 ¹²		10 ¹³		10 ¹⁴		10 ¹⁵		10 ¹⁶		10 ¹⁷		10 ¹⁸		10 ¹⁹		10 ²⁰		10 ²¹	
Energía/ electrón volt		10 ⁻⁴		10 ⁻³		10 ⁻²		10 ⁻¹		1		10		10 ²		10 ³		10 ⁴		10 ⁵		10 ⁶		10 ⁷		10 ⁸	
Microondas				Infrarrojo				ultravioleta				Rayos X				Rayos Gamma				Rayos cósmicos							
Longitud de onda/m		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		10 ⁻⁷		10 ⁻⁸		10 ⁻⁹		10 ⁻¹⁰		10 ⁻¹¹		10 ⁻¹²		10 ⁻¹³		10 ⁻¹⁴	

Tomado de : Keifer Jürgen (1990) Biological radiation effects. Springer-Verlag. New York.

Cuando las partículas cargadas interactúan con la materia producen colisiones con los átomos del absorbedor transfiriendo a éstos energía y cierta cantidad de movimiento; estas colisiones pueden llevarse a cabo en los electrones o en los núcleos y son de dos tipos: elásticas e inelásticas (4). En las colisiones elásticas la energía transferida continúa bajo la forma de energía cinética y por lo tanto no hay excitación de los átomos; por el contrario, en las colisiones inelásticas parte de la energía transferida produce excitación en los átomos e inclusive ionización (3).

Las colisiones inelásticas con electrones es el mecanismo predominante para transferencia de energía a materiales de bajo número atómico como el agua o tejidos. Como resultado, los electrones en el ambiente son excitados a un estado de energía más elevado o expulsados del átomo dando lugar a la ionización (4). Por consiguiente es importante establecer desde el punto de vista biológico las consecuencias de la interacción de este tipo de energía con la materia, especialmente en organismos vivos.

Con base al poder de penetración de las radiaciones ionizantes -el cuál depende de ciertas propiedades como carga, masa, energía, etc-, se considera a los rayos alfa, protones y núcleos como partículas cargadas pesadas, a los rayos beta como partículas cargadas ligeras y a los rayos gamma y rayos X como radiación electromagnética. Por ejemplo, en general se puede decir que los rayos alfa que tienen carga pesada con velocidades de 16,000 km/s, presentan un poder de penetración muy bajo en la materia y consecuentemente su poder de ionización es muy elevado; los rayos beta que tienen carga ligera, viajan a una velocidad de 130,000 km/s, su poder de penetración y de ionización es intermedio; por el contrario los rayos X y Gamma que viajan a una velocidad en el vacío de 2.9979×10^8 m/s tienen un gran poder de penetración y su ionización es muy baja (3, 5).

Como consecuencia de los diferentes poderes de penetración de estas radiaciones el espectro de absorción es diferente para cada una de ellas, de esta manera, los rayos alfa que penetran aproximadamente sólo 0.1mm de tejido, no representan un grave peligro; por el contrario las partículas beta penetran unos pocos milímetros dependiendo de su energía y es necesaria una fuente blindada para evitar la exposición. La radiación electromagnética que comprende a los rayos X y los rayos Gamma, tiene un alto poder de penetración, incluso puede penetrar un bloque de plomo (6).

La ionización puede ser producida de manera directa e indirecta. La radiación es directamente ionizante si lleva partículas con carga eléctrica -tales como los rayos alfa y beta-, estas partículas cargadas interactúan con el medio por atracción electrostática o por repulsión; por el contrario la radiación indirectamente ionizante se produce cuando el material que interactúa con el medio no tiene carga (Rayos gamma y X). Esta radiación transfiere su energía a electrones fuertemente ligados al átomo o prácticamente libres. Cualquiera que sea el mecanismo por el cual se produce la ionización, siempre ocurrirá que la energía depositada por la radiación medida en Joules por kilogramo, será utilizada para sacar el electrón del átomo, donde está sostenido por la atracción ejercida por el núcleo (4); estos electrones liberados son de alta energía y la interacción que tengan con la materia es de gran importancia ya que pueden producir efectos irreversibles en el material biológico.

Unidades de ionización

Con el objeto de estandarizar las medidas de ionización utilizadas en radiación se creó en 1925 la Comisión Internacional de Unidades y Medidas Radiológicas (ICRU). La unidad cuantitativa establecida fue el Roentgen (R) y se utilizaba para evaluar los efectos químicos y biológicos que ocurren en los materiales expuestos a radiación.

Más tarde se observó que el R era un término inadecuado, ya que la definición se limitaba únicamente a los rayos X y Gamma, además no tomaba en cuenta la energía absorbida por el organismo (7). Debido a esto la ICRU introdujo el término de Kerma (Kinetic Energy Released in the Matter) para describir la interacción inicial de los protones y neutrones (radiación indirectamente ionizante) con la materia: $K = dE_{tr} / dm$.

Donde dE_{tr} es el total de la energía cinética inicial de todas las partículas cargadas liberadas por radiación indirectamente ionizante en un volumen de material de masa dm .

Como no toda la energía depositada por la radiación es retenida por el medio se creó el término de dosis absorbida, el cual describe la cantidad de energía absorbida real en el tejido y de esta manera se puede estimar el riesgo biológico de la radiación ionizante: $D = dE_{abs} / dm$

Donde dE_{abs} es la energía promedio depositada por la radiación ionizante en una porción de materia con masa dm .

A pesar de que hasta hace poco la unidad de dosis absorbida era el rad, con una magnitud de 100 erg / g, actualmente en el sistema internacional (SI) la unidad de dosis absorbida es el gray (Gy), el cual tiene una magnitud de 1 J x Kg^{-1} . De esta manera, $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$ (4).

Desde el punto de vista de protección radiológica el término de dosis absorbida es insuficiente ya que no predice la severidad de los efectos biológicos inducidos a bajas dosis de radiación y debido a esto se introdujo el término de dosis equivalente (H) que se obtiene multiplicando la dosis absorbida (D) por los factores Q y N: $H = D \times Q \times N \text{ (J x Kg}^{-1}\text{)}$.

Q es el factor de calidad y es un valor preestablecido utilizado en protección radiobiológica. Para los rayos X y Gamma es igual a 1 y para las partículas alfa el valor de Q es 20.

N es el producto de todos los demás factores modificables (que incluyen rapidez de absorción en determinado tiempo, fraccionamiento de la misma o propiedades específicas de un órgano en particular), la Comisión Internacional de protección Radiológica (ICRP) le ha asignado el valor de 1.

La unidad de dosis equivalente utilizada era el rem con unidades de 100 erg/ g, pero en la actualidad este término está en desuso y ahora se utiliza el Sievert (Sv) (3). De esta manera $100 \text{ rem} = 1 \text{ Sv}$, $1 \text{ rem} = 1 \text{ centisievert (cSv)}$.

Límite anual de dosis

El límite anual de dosis son valores recomendados por el Consejo Nacional de Protección y Medidas Radiológicas (NCRP) y se han creado con el fin de asegurar que a las dosis recibidas, las personas ocupacionalmente expuestas a radiaciones no presentarán síntomas clínicos indicadores de un daño inicial, por ejemplo, descamación en piel, disminución en la cuenta de leucocitos, cataratas, etc. Los límites de dosis permisibles anual para los trabajadores son de 50mSv (5 rem) (8).

Fuentes de exposición a la radiación

Los organismos vivos están expuestos a radiaciones en forma *natural* y *artificial*:

En forma natural la exposición es por: a) Radiación ultravioleta (UV), la cual se divide en tres espectros dependiendo de su longitud de onda, de estos tres el más dañino es el espectro UV-B que se encuentra entre los 280 - 315 nm y que se ha visto involucrado en cáncer de piel (9); b) Rayos cósmicos que penetran profundamente en la tierra y, c) Radiaciones emitidas de elementos naturales tales como: el radio, plutonio, carbono¹⁴, tritio o por isótopos que se acumulan en el cuerpo al consumir alimentos, beber agua, etc (6). Se ha determinado un promedio de dosis recibida aproximada de 0.09 cGy/año en tejido gonadal y médula ósea, proveniente de radiaciones cósmicas e isótopos naturales (10).

La exposición artificial proviene de diversas fuentes como son: **Terapéutica**, **ocupacional**, por explosiones de bombas atómicas o por desechos radiactivos de plantas nucleares tales como el complejo Chernobyl (6). El promedio de dosis recibida por exposición **terapéutica** varía de acuerdo al tratamiento, por ejemplo en radioterapia los individuos reciben aproximadamente dosis diarias de radiación Gamma entre 1.8 y 2 Gy (11)

Clasificación de los efectos biológicos de la radiación ionizante.

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes se pueden dividir en dos categorías en función de su incidencia:

a) **Estocásticos.**- Estos efectos son de tipo probabilístico, es decir, un aumento en la dosis conduce a un aumento en la frecuencia con la que aparece el efecto en un grupo de personas, pero no se puede determinar a priori que a una dosis determinada se produzca con seguridad un efecto en una persona. La relación dosis-efecto se conoce únicamente para dosis elevadas, para dosis bajas, la relación no se conoce (8). Los principales efectos estocásticos son: la incidencia de cáncer de tiroides o leucemias; abortos espontáneos y alteraciones génicas que aparecen en células germinales de individuos irradiados (3).

b) **No estocásticos.**- Aquellos efectos que se producen a partir de una dosis umbral y aumentan en severidad dependiendo de la dosis. Para dosis altas recibidas en un tiempo corto el efecto se agudiza. El valor umbral varía entre los individuos, las condiciones de exposición y los tejidos irradiados, por ejemplo, para la piel el valor umbral es por debajo de los 6 Gy, mientras que para los ovarios es de 1.6Gy en dosis única. Si se rebasan estos valores se empiezan a observar efectos estocásticos; algunas manifestaciones de estos efectos son: lesiones no malignas en la piel, esterilidad temporal, cataratas, etc. Cuadros 2 y 3 (12, 13).

Cuadro 2. Efectos no estocásticos cuando la irradiación es a cuerpo total

<i>Dosis absorbida</i> <i>Gy</i>	<i>Efecto</i>
> de 0.1	Rupturas cromosómicas en cél. sanguíneas difíciles de detectar Interferencia con la organogénesis de embriones.
> de 0.25	Cambios sanguíneos.
> de 0.50	Probable retención momentánea de la espermatogénesis
> de 1	Síndrome de radiación probable.
> de 2	Náuseas, vómitos, agotamiento, etc.
> de 4	50% probabilidad de muerte.
> de 6	100% probabilidad de muerte

Cuadro 3. Efectos no estocásticos cuando la irradiación es en alguna parte del cuerpo

Parte del cpo. expuesta	Dosis Gy	Daño
Gónadas	0.5	Esterilidad temporal.
Gónadas	8	Esterilidad definitiva.
Cuero cabelludo	5	Caída del pelo temporal.
Cuero cabelludo	25	Caída del pelo definitiva.

Cuadro 2. Efectos no estocásticos cuando la irradiación es a cuerpo total

<i>Dosis absorbida</i> <i>Gy</i>	<i>Efecto</i>
> de 0.1	Rupturas cromosómicas en cél. sanguíneas difíciles de detectar Interferencia con la organogenesis de embriones.
> de 0.25	Cambios sanguíneos.
> de 0.50	Probable retención momentánea de la espermatogénesis
> de 1	Síndrome de radiación probable.
> de 2	Náuseas, vómitos, agotamiento, etc.
> de 4	50% probabilidad de muerte.
> de 6	100% probabilidad de muerte

Cuadro 3. Efectos no estocásticos cuando la irradiación es en alguna parte del cuerpo

Parte del cpo. expuesta	Dosis Gy	Daño
Gónadas	0.5	Esterilidad temporal.
Gónadas	8	Esterilidad definitiva.
Cuero cabelludo	5	Caída del pelo temporal.
Cuero cabelludo	25	Caída del pelo definitiva.

Interacción de la radiación ionizante con la célula

El daño que produce la radiación ionizante en la célula se puede estudiar a tres niveles:

a) En la membrana, ocasiona un desequilibrio en el intercambio de sustancias nutritivas o en la eliminación de toxinas, si el equilibrio no se restablece rápidamente se pueden generar daños irreversibles en la célula (13).

b) En el citoplasma, la radiación puede depositar su energía en los organelos celulares y en la molécula de agua, que puede ser ionizada o excitada. Los productos de la ionización y la excitación poseen electrones no apareados y representan radicales libres que son altamente reactivos, los cuales al reaccionar pueden producir: a) Peróxido de hidrógeno, el cual biológicamente es muy dañino y ocasiona alteraciones en el funcionamiento celular y, b) Hidronio, que es mucho más activo que el peróxido de hidrógeno y produce un envenenamiento en la célula (2).

La formación de radicales depende de la naturaleza de la radiación. La radiación alfa es mucho más dañina que la radiación beta y gamma, ya que con la primera hay una acumulación mayor de peróxido de hidrógeno (6). La producción de estos radicales significa un daño crítico en la célula y en los tejidos debido a que son altamente inestables y químicamente reactivos con otras moléculas; por ejemplo, se ha visto que el 75% del daño inducido al ADN por rayos X es producido por radicales hidroxilo (1), y que la presencia de oxígeno permite la formación de radicales adicionales llamados superóxidos, que inducen la formación de factores clastogénicos (4, 14).

c) En el núcleo, el cuál se ha demostrado que es el organelo celular más radiosensible, es posible que la radiación sea capaz de inducir muerte celular (15) o un incremento en la frecuencia de rearrreglos cromosómicos que pueden ocasionar deleciones y mutaciones puntuales en genes reguladores de la división celular implicados en el inicio de la carcinogénesis (16). Los cambios cromosómicos en células de la médula ósea pueden dar origen a clonas aberrantes directamente responsables de la aparición de leucemia o a complementos cromosómicos inestables y desbalanceados los cuales son más susceptibles a otros agentes leucogénicos (17). Estos efectos se han observado en los sobrevivientes de la bomba atómica, ya que después de la exposición se encontró aumento en la frecuencia de translocaciones, cromosomas dicéntricos y anillos (18) y varios años después se observó que estas personas desarrollaron algún tipo de cáncer (19, 20).

El daño inducido por la radiación ionizante en los cromosomas depende del ciclo celular y puede ser de tipo cromosómico o cromatídico. Las aberraciones de tipo cromosómico se producen durante las fases G_0 y G_1 , antes de la replicación del ADN y se dividen en:

a) Estables; son aquellas que permanecen en las siguientes divisiones celulares, algunos ejemplos son las inversiones y translocaciones.

b) Inestables; las células con estas aberraciones son eliminadas en las siguientes divisiones celulares, como ejemplo tenemos a los cromosomas dicéntricos, fragmentos céntricos y/o acéntricos y anillos.

Las aberraciones de tipo cromatídico se producen cuando la célula es irradiada después de la duplicación del ADN, es decir en G_2 o en la fase S y se les conoce como rupturas cromatídicas (21, 22).

Efectos de las radiaciones ionizantes en el ADN

La radiación ionizante al interactuar con el ADN produce diversas alteraciones como son: daño y pérdida de bases, desnaturalización de algunas zonas, puentes cruzados entre proteína y ADN, rupturas en una sola hebra (SSB) y en las dos hebras (DSB) del ADN (2).

Se ha observado que por cada 10 SSB inducidas por la radiación ionizante se produce 1 DSB, dependiendo esto, de la cantidad de energía absorbida por la célula, es decir, se requieren de 60 a 180 eV para producir SSB y una energía 1,000 a 1,800 eV para producir DSB (4).

Con base al tiempo requerido para la reparación, se han identificado tres tipos de rupturas: Las SSB constituyen el 90% de las rupturas iniciales, se reparan rápidamente y se reúnen en un tiempo promedio de 5 minutos; las segundas, (DSB) son aquellas que constituyen el 9 % del daño inicial y tienen un promedio de reparación de aproximadamente 70 min; y las no reparables, que representan el 1 % de las rupturas iniciales (23) y pueden ocasionar mutaciones estables en el ADN.

Algunos autores han demostrado que el daño inducido por la radiación está relacionado con la edad del individuo, ya que a mayor edad disminuye la capacidad de reconocimiento y reparación del daño (24), sin embargo, otros autores no han encontrado esta relación (25).

El registro de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivo de linfocitos es uno de los métodos más utilizados para monitorear poblaciones expuestas a radiación ionizante, ya sea por: a) Exposición accidental en individuos expuestos a la bomba atómica en quienes la magnitud de los efectos biológicos es fácil de cuantificar debido a las altas dosis, estos individuos recibieron radiaciones gamma y neutrones (26) con dosis equivalentes a 2 sV (19) y el tipo de aberraciones cromosómicas que se observaron en ellos fueron aberraciones cromosómicas estables (translocaciones recíprocas e inversiones) e inestables (dicéntricos y anillos) las cuales desaparecen debido a problemas de segregación en la mitosis (18), b) Exposición para diagnóstico médico u ocupacional; en este tipo de poblaciones es más difícil cuantificar los efectos biológicos de la radiación debido al uso de dosis bajas.

Por otra parte, una de las fuentes más importantes de exposición a la radiación ionizante es por diagnóstico médico. La radiografía con rayos X se usa en muchas ramas de la medicina para el diagnóstico o tratamiento de diversas enfermedades. Debido a que en ocasiones se requieren de múltiples radiografías, diversos autores han tratado de establecer una correlación en cuanto a la presencia de aberraciones cromosómicas y los efectos clínicos de la radiaciones en estos pacientes.

Stewart y Sanderson en 1961 (27) y Conen y col en 1963 (28) demostraron que pacientes que recibieron dosis entre 0.003 a 0.02 Gy de rayos X presentaron diversas anomalías cromosómicas. Más tarde Bloom y Tjio (29) encontraron una mayor frecuencia de cromosomas dicéntricos, anillos y fragmentos acéntricos en pacientes expuestos a dosis de 0.12 - 0.35 Gy de rayos X.

Por último, se debe considerar el hecho de que los individuos que aplican la radiación para diagnóstico y tratamiento médico están expuestos a este tipo de agente, y por lo tanto son susceptibles de tener daño en el ADN, de tal manera que la ICRU ha establecido que los límites permisibles de radiación para trabajadores ocupacionalmente expuestos sean de 50 mSv (30). Sin embargo, a pesar de que se trabaja por debajo de estos valores existen múltiples reportes en donde se observa una relación lineal entre la producción de aberraciones cromosómicas en linfocitos y el total de dosis acumulada de radiación en trabajadores expuestos a bajas dosis (31, 32).

En 1988 Bigatti y col. (33) y Barquinero y col (34) estudiaron a personas ocupacionalmente expuestas a rayos X y Gamma y encontraron un incremento significativo de fragmentos acéntricos, dicéntricos y otros rearrreglos. Jha y Sharman en 1991 reportaron observaciones similares (35) en individuos expuestos a dosis de 0.1 a 0.17 Gy y además ellos observaron que no hay incremento en la producción de aberraciones en función de la duración del empleo y de la edad. Sin embargo, a pesar de lo anterior cuando Balasem y col. (30) estudiaron a un grupo de trabajadores que tenían de 7-29 años de exposición y los compararon con otro grupo que tenía de 1-4 años, encontraron una mayor producción de fragmentos, anillos y dicéntricos en relación directa con el tiempo de trabajo. Recientemente Braselmann y col (36) estudiaron a trabajadores de plantas nucleares expuestos a Co^{60} , Cs^{137} , rayos Gamma y neutrones y observaron una frecuencia de cromosomas dicéntricos y anillos significativamente más elevada que en los individuos no expuestos.

Electroforesis unicelular

Si bien la presencia de aberraciones cromosómicas es uno de los métodos más utilizados para monitorear el daño inducido por la radiación ionizante, diversos autores han aplicado otras metodologías. Por ejemplo, Mutchinick y col en 1978 (37) demostraron que individuos ocupacionalmente expuestos a cantidades mínimas de metales de transición como el ^{99}Mo y el ^{99}Tc y a halógenos radiactivos del tipo del ^{125}I y ^{131}I presentaron una frecuencia elevada de Intercambio de Cromátides Hermanas. Lucas y col. en 1992 (38) evaluaron mediante las técnicas de Hibridación *in-situ* con fluorescencia (FISH) y de bandas G los efectos de la radiación en los sobrevivientes a la bomba atómica de 1945, sus resultados mostraron una mayor frecuencia de translocaciones en estas personas e indicaron que el "painting" de cromosoma completo es un método válido y rápido para analizar rearrreglos cromosómicos estructurales, ya que las dos metodologías utilizadas, bandas G y FISH, detectaron frecuencias equivalentes de rearrreglos.

Las técnicas de bandas G, Intercambio de Cromátides Hermanas e Hibridación *in-situ* con Fluorescencia, han mostrado ser de gran ayuda para evaluar el daño inducido por exposición crónica a la radiación ionizante, sin embargo, el estudio es laborioso por el gran número de células que se requiere analizar y los resultados son obtenidos después de varios días.

Además de todas las técnicas antes mencionadas y con las cuales se detecta daño inducido por exposición crónica, también es importante evaluar el tipo de daño producido por exposición inmediata y a bajas dosis de radiación.

En 1984 Ostling y Johanson introdujeron la técnica de electroforesis unicelular (EU) con pH neutro para medir las rupturas en la doble cadena del ADN inducidas por radiaciones ionizantes (39). La EU permite identificar el daño inducido por diversos agentes en células individuales sometiendo el material genético a un campo electroforético. La imagen que se obtiene como resultado es semejante a la de un cometa en el que el centro es el ADN no dañado y la cola es el ADN fragmentado, que a mayor longitud refleja mayor daño. Las ventajas de la técnica son: se requiere de muy poca muestra para el análisis (10,000 células aproximadamente), los resultados se pueden obtener en un solo día y es más económica que cualquier otra metodología (40).

Electroforesis unicelular

Si bien la presencia de aberraciones cromosómicas es uno de los métodos más utilizados para monitorear el daño inducido por la radiación ionizante, diversos autores han aplicado otras metodologías. Por ejemplo, Mutchinick y col en 1978 (37) demostraron que individuos ocupacionalmente expuestos a cantidades mínimas de metales de transición como el ^{99}Mo y el ^{99}Tc y a halógenos radiactivos del tipo del ^{125}I y ^{131}I presentaron una frecuencia elevada de Intercambio de Cromatides Hermanas. Lucas y col. en 1992 (38) evaluaron mediante las técnicas de Hibridación *in-situ* con fluorescencia (FISH) y de bandas G los efectos de la radiación en los sobrevivientes a la bomba atómica de 1945, sus resultados mostraron una mayor frecuencia de translocaciones en estas personas e indicaron que el "painting" de cromosoma completo es un método válido y rápido para analizar rearrreglos cromosómicos estructurales, ya que las dos metodologías utilizadas, bandas G y FISH, detectaron frecuencias equivalentes de rearrreglos.

Las técnicas de bandas G, Intercambio de Cromatides Hermanas e Hibridación *in-situ* con Fluorescencia, han mostrado ser de gran ayuda para evaluar el daño inducido por exposición crónica a la radiación ionizante, sin embargo, el estudio es laborioso por el gran número de células que se requiere analizar y los resultados son obtenidos después de varios días.

Además de todas las técnicas antes mencionadas y con las cuales se detecta daño inducido por exposición crónica, también es importante evaluar el tipo de daño producido por exposición inmediata y a bajas dosis de radiación.

En 1984 Ostling y Johanson introdujeron la técnica de electroforesis unicelular (EU) con pH neutro para medir las rupturas en la doble cadena del ADN inducidas por radiaciones ionizantes (39). La EU permite identificar el daño inducido por diversos agentes en células individuales sometiendo el material genético a un campo electroforético. La imagen que se obtiene como resultado es semejante a la de un cometa en el que el centro es el ADN no dañado y la cola es el ADN fragmentado, que a mayor longitud refleja mayor daño. Las ventajas de la técnica son: se requiere de muy poca muestra para el análisis (10,000 células aproximadamente), los resultados se pueden obtener en un solo día y es más económica que cualquier otra metodología (40).

Singh y col en 1988 (41) modificaron la técnica para condiciones alcalinas, con lo que lograron detectar rupturas en cadena sencilla del ADN inducidas por una dosis de 0.25 Gy de rayos X. Poco después Vijayalaxmi y cols (40) lograron que la técnica fuera lo suficientemente sensible como para detectar daño al ADN inducido por dosis de radiación tan bajas como 0.05 Gy.

A partir de las modificaciones que realizaron Singh y col (41), diversos autores han utilizado esta técnica con el fin de observar el efecto que tienen otros agentes. En 1990 este mismo autor encontró que existe una disminución en la capacidad de reparación del ADN en relación con un aumento en la edad (42). Más tarde Tice en 1991 (43) y Betti en 1994 (44) encontraron una correlación directa entre la migración del ADN y el daño inducido por el consumo del cigarro; también se ha observado que la ingesta de medicamentos asociada con infecciones bacterianas severas son la causa del aumento de migración en la cola del cometa (45).

En 1994 Green y col (46), reportaron que una buena alimentación y la ingesta de pequeñas cantidades de vitamina C producen un efecto protector contra la radiación ionizante y esta protección disminuye 6 horas después de haber ingerido el alimento.

JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se diseñó en el Instituto Nacional de Pediatría para cuantificar el daño al ADN mediante la técnica de electroforesis unicelular en las personas que laboran en los servicios de Radioterapia, Medicina Nuclear y Radiología; estas personas participan en el diagnóstico radiológico en pacientes pediátricos y están expuestas a radiación, por lo tanto es importante evaluar el daño genético en ellas.

OBJETIVOS

- 1.- Cuantificar el daño al ADN en linfocitos de trabajadores ocupacionalmente expuestos a radiación mediante la técnica de electroforesis unicelular.
- 2.- Determinar si existe correlación entre la dosis de radiación y el daño al ADN.

HIPÓTESIS

- 1.- El personal que aplica la radioterapia y participa en el diagnóstico radiológico presenta daño en el ADN detectable con la técnica de EU significativamente más elevado que el personal que no está en contacto con la radiación.
- 2.- Los trabajadores expuestos a mayores dosis de radiación presentan daño al ADN significativamente más elevado que los trabajadores expuestos a menores dosis.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Población de estudio:

La población estudiada estuvo integrada por dos grupos de personas que accedieron voluntariamente a colaborar en el estudio.

2

* Grupo 1: Formado por el personal técnico y médico de los servicios de Radiología, Medicina Nuclear y Radioterapia que participan activamente en los procedimientos de diagnóstico radiológico y radioterapia.

*Grupo Control: Constituido por personal administrativo que labora en otros servicios del INP, que no han estado expuestos a rayos X o Gamma, de edades similares a los sujetos del grupo 1.

Notas:

1.- Si alguna de las personas presentaba un padecimiento agudo (diarrea, enfermedades de las vías respiratorias, etc) o si estaba tomando medicamentos, la toma de la muestra se desplazó dos semanas aproximadamente.

2.- Cuando alguna persona no cumplió con la rutina de trabajo el día de la toma de la muestra, el estudio se repitió en otra ocasión.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron las personas que:

- 1.- Habían padecido algún tipo de cáncer.
- 2.- Habían recibido quimioterapia o radioterapia.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

1.- Se eliminaron a las personas a las cuales por cualquier motivo no fué posible obtener la segunda muestra.

METODOLOGIA

Se entrevistó personalmente a cada uno de los participantes para que firmaran la carta de consentimiento informado y para conocer sus hábitos y estilos de vida (Apéndices I y II). También se les solicitó que acudieran en ayunas el día programado para la toma de la muestra y que desayunaran inmediatamente después de la toma de la primera muestra y pasadas 6 horas de jornada laboral se les tomó la segunda muestra.

La población estuvo constituida por 41 individuos del grupo 1, de los cuales 6 pertenecían al servicio de medicina nuclear, 4 al de radioterapia y 31 al de radiología; y por 21 individuos del grupo control.

De cada individuo se tomó 1ml de sangre periférica en ayunas y antes de iniciar la jornada laboral, la segunda muestra se tomó 6 horas después de haber iniciado su trabajo.

Electroforesis unicelular

Preparación de las laminillas: A un portaobjetos esmerilado se le agregaron 110µl de agarosa regular y se colocó un cubreobjetos. Después de 3-5min se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionaron 80µl de la mezcla, la cuál contenía 75µl de agarosa de bajo punto de fusión y 5µl de sangre recién tomada. Se colocó sobre hielo de 3-5min con el fin de que solidificara la agarosa. Posteriormente se añadieron 75µl de agarosa de bajo punto de fusión y se cubrieron con un cubreobjetos. Después de 5min se retiró el cubreobjetos y las laminillas se colocaron en solución de lisis por 24 horas. Para cada muestra se elaboraron tres laminillas (Apéndice III para la preparación de reactivos).

Electroforesis y tinción: Las laminillas se retiraron de la solución de lisis y se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal la cuál contenía buffer con pH alcalino; después de 20 min se corrieron a 25 V y 300mA durante 20 min. Terminado este tiempo se sacaron del buffer alcalino y se le lavaron tres veces con buffer de neutralización (pH 7.5).

Finalmente para la tinción se adicionaron 50µl de Bromuro de etidio (EtBr) a cada laminilla y se colocó un cubreobjetos. Las preparaciones fueron guardadas en una cámara húmeda a 4°C para evitar la deshidratación de la agarosa, cubriéndolas de la luz para impedir el decremento de la fluorescencia. (Apéndice IV)

Análisis de los geles: Los geles se codificaron para ignorar a que grupo pertenecían las muestras; de los tres geles preparados se escogieron dos al azar para su análisis; el tercero se analizó en caso de existir diferencia en las dos lecturas anteriores. Utilizando un ocular micrométrico y un filtro de excitación de 546 nm se midió el largo de la cola del cometa en micras. Para cada muestra se analizaron 100 células y se calculó el promedio del tamaño de la cola en cada individuo. Se tomaron fotografías para ejemplificar células sin daño y células con daño. (Fig 1 y 2)

Análisis estadístico

Para observar si existían diferencias entre las muestras tomadas antes y después de la jornada laboral en los dos grupos, se utilizó la prueba de t de student para muestras dependientes; para observar si existían diferencias entre el grupo I y el grupo control se utilizó la prueba de t de student para muestras independientes.

El coeficiente de correlación simple de Pearson se utilizó para establecer una posible relación entre la dosis de exposición mensual (la cual corresponde a la registrada por el dosimetro en el mes anterior a la toma de la muestra) y la migración del ADN.

RESULTADOS

Debido a que las respuestas de los individuos en la hoja de captación de datos fueron negativas en cuanto a hábitos de fumador, ingesta de drogas, etc. Ninguno de ellos fue excluido del estudio (Apéndice I).

El los cuadros 4 y 5 se observan los datos obtenidos de los 41 individuos ocupacionalmente expuestos y de los 21 individuos control.

Al comparar los promedios de la migración del ADN en las muestras tomadas antes de la jornada laboral del grupo 1 con el grupo control, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.321$); sin embargo, cuando se compararon las muestras post jornada laboral, sí se observó un aumento significativo en la migración del ADN ($p = 0.013$) Cuadro 6.

El hecho que las desviaciones estándar sean tan grandes, demuestra la gran variabilidad que existe entre los individuos, sin embargo, en todos los casos observamos que tanto los individuos que presentaban una menor migración como los que tenían una mayor migración presentaban un incremento equivalente de la migración después de la jornada laboral Cuadro 4 y 6.

En los individuos control, no se observaron diferencias significativas en las muestras tomadas antes y después de la jornada laboral ($p = 0.285$) Cuadro 6, Gráfica 1.

Al comparar las muestras pre y post jornada laboral de los 41 individuos ocupacionalmente expuestos (Grupo 1), se demostró un incremento significativo en la migración del ADN, con una $p < 0.05$ Cuadro 6, Gráfica 1.

No se logró establecer una correlación entre la dosis de exposición mensual y la migración del ADN en la muestra tomada después de la jornada laboral ($r = 0.24$ y $p > 0.05$) Gráfica 2. Sin embargo, cuando se eliminaron a los tres individuos que presentaron una respuesta diferente a la radiación, observamos una correlación significativa entre la dosis de exposición y la migración del ADN ($r = 0.48$ y $p < 0.01$) Gráfica 3.

Por último quisimos averiguar si existía una correlación entre la migración del ADN y la edad de los individuos ocupacionalmente expuestos, por lo cual aplicamos nuevamente el coeficiente de correlación de Pearson y observamos una correlación negativa, es decir, a mayor edad menor migración del ADN ($r = -0.367$ y $0.01 < p < 0.05$) Gráfica 4.

Cuadro 4. Edad, sexo, dosis de exposición y promedio de migración del ADN de los individuos ocupacionalmente expuestos a radiación de los servicios de Medicina nuclear, Radioterapia y Radiología (Grupo I).

SUJETO	EDAD/ SEXO	DOSIS DE EXPOSICION (mSv)		MIGRACIÓN DEL ADN (micras)	
		Mensual	Acumulada/Años	Antes de la jornada laboral	Después
<i>Medicina Nuclear</i>					
1	25/F	0.15	1.85 / 2	58.52	102.88
2	52/M	0.16	18.91 / 11	42.09	60.7
3	52/F	0.18	9.32 / 11	48.87	56.03
4	30/F	0.19	15.24 / 10	54.89	94.01
5	33/M	0.26	13.74 / 9	66.99	180.3
6	30/F	0.29	15.24 / 10	47.94	61.17
<i>Radioterapia</i>					
7	23/F	---	0.85 / 3	82.62	103.64
8	37/F	0.16	9.21 / 4	3.5	51.0
9	50/F	0.19	24.73 / 14	19.0	30.8
10	29/M	0.8	4.06 / 2	38.8	68.2
<i>Radiología</i>					
11	42/F	---	---	7.3	25.7
12	31/F	---	---	9.0	22.0
13	38/M	0.04	6.15 / 3	8.8	18.1
14	28/M	0.05	5.72 / 2	4.5	15.4
15	26/M	0.05	1.17 / 1	3.51	6.48
16	31/M	0.06	3.17 / 3	6.8	20.9
17	49/M	0.07	6.92 / 4	23.6	25.5
18	39/M	0.08	3.5 / 3	4.7	14.3
19	31/F	0.10	4.12 / 2	6.7	18.34
20	37/M	0.11	0.75 / 7*	7.6	18.28
21	49/F	0.11	5.2 / 3	14.3	17.5
22	45/F	0.10	5.22 / 3	10.9	25.3
23	46/F	0.12	5.05 / 4	6.15	8.2
24	43/F	0.12	4.79 / 4	3.8	10.4
25	35/F	0.12	2.26 / 2	45.96	70.98

Continuación del Cuadro 4.

SUJETO	EDAD/ SEXO	DOSIS DE EXPOSICIÓN (mSv)		MIGRACIÓN DEL ADN (micras)	
		Mensual	Acumulada/años	Antes de la jornada laboral.	Después
26	42/F	0.13	2.73 / 2	2.6	12.2
27	30/F	0.13	5.1 / 2	27.43	36.81
28	25/F	0.14	0.97 / 1	21.22	32.66
29	45/M	0.14	0.48 / 1	17.3	18.8
30	41/F	0.15	4.22 / 2	6.8	17.5
31	40/F	0.16	5.88 / 3	1.3	16.2
32	32/F	0.19	2.14 / 2	5.52	17.51
33	40/M	0.19	5.49 / 3	13.5	20.5
34	27/F	0.20	2.91 / 2	31.4	58.5
35	38/F	0.22	3.43 / 3	24.26	62.24
36	34/F	0.25	3.69 / 3	54.11	56.54
37	38/F	0.27	7.39 / 3	16.0	23.68
38	22/F	0.28	3.12 / 2	38.4	74.0
39	39/M	0.30	1.08 / 1	2.7	19.0
40	20/F	0.34	0.76 / 5*	27.0	68.9
41	35/F	0.80	5.86 / 2	48.01	44.27

* meses

--- No existe registro de dosis de radiación.

Cuadro 5. Edad, Sexo y promedio de migración del ADN de los individuos control.

SUJETO	EDAD/ SEXO	MIGRACIÓN DEL ADN (micras)	
		Antes de la jornada laboral.	Después
1	36/M	4.4	6.8
2	35/F	5.7	9.6
3	45/F	6.21	8.4
4	43/F	6.38	3.78
5	50/F	6.8	7.5
6	50/F	7.6	6.3
7	55/F	7.6	18.9
8	24/M	7.7	9.5
9	23/F	13.5	13.2
10	35/F	14.2	18.6
11	45/F	15.6	7.4
12	31/M	17.1	23.0
13	26/F	20.63	11.55
14	48/M	24.8	24.22
15	50/M	23.0	25.22
16	25/F	29.0	24.52
17	22/F	29.0	18.6
18	23/F	30.99	24.89
19	19/F	39.17	34.06
20	22/F	56.4	46.8
21	36/M	81.2	122.7

Cuadro 6. Promedio y desviación estándar de la migración del ADN en los individuos control y ocupacionalmente expuestos a radiaciones ionizantes.

Individuos	Promedio (Micras)	Desviación estándar
<i>Antes de la jornada laboral</i>		
Grupo Control	21.28	19.07
Grupo 1 (Expuestos)	23.52	21.15
<i>Después de la jornada laboral</i>		
Grupo Control	22.15*	25.37
Grupo 1 (Expuestos)	41.64*	34.74

* Indica diferencia significativa entre estos dos grupo con una $p = 0.013$, t de student para muestras independientes.

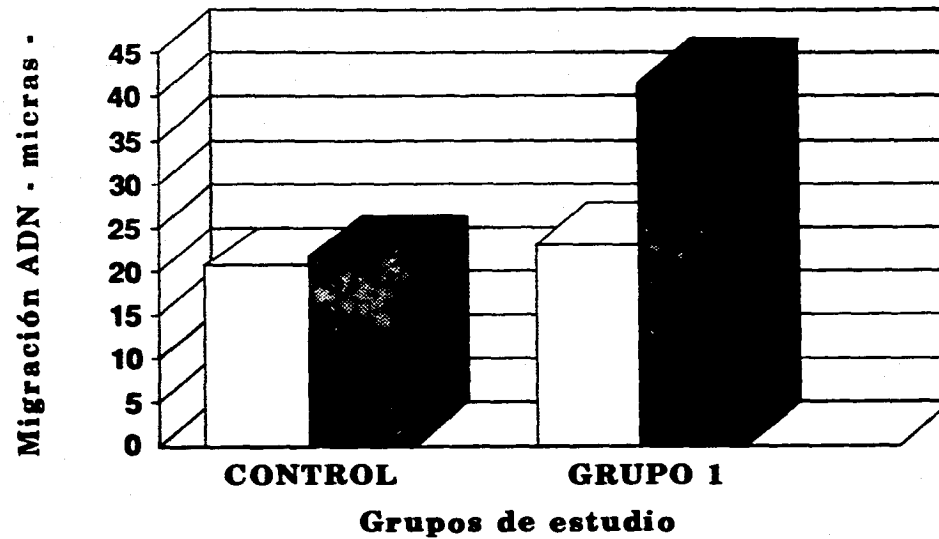


Fig. 1. Linfocito con daño de un individuo ocupacionalmente expuesto a radiación ionizante, en donde se observa la forma típica de un cometa.



Fig. 2. Linfocitos sin daño de un individuo control.

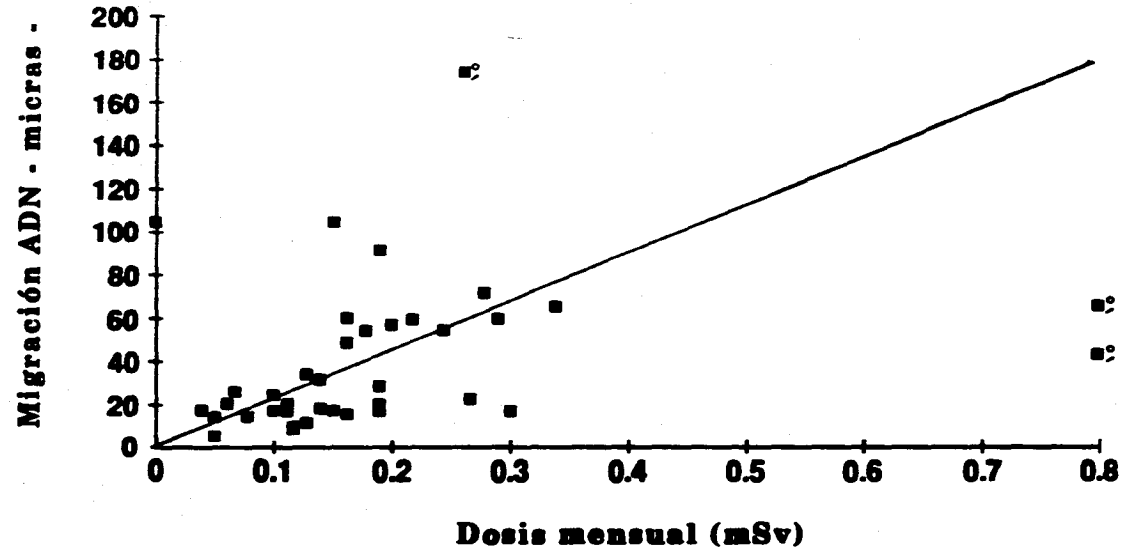
GRAFICA 1. Migración del ADN en individuos control y ocupacionalmente expuestos, antes y después de la jornada laboral.



Grupo 1= Individuos ocupacionalmente expuestos.

Antes
Despues

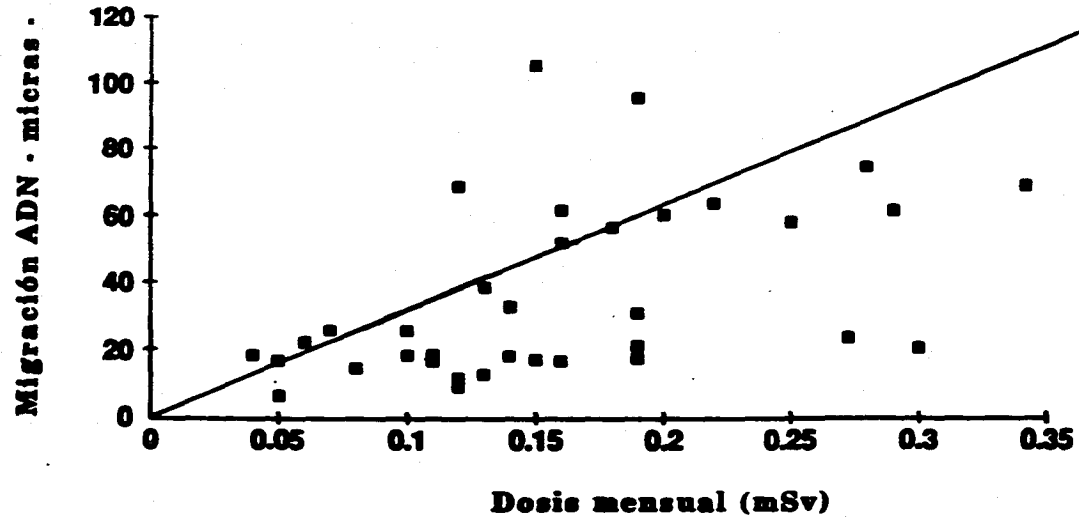
GRAFICA 2. Migración del ADN en función de la dosis de exposición en 38* individuos ocupacionalmente expuestos.



* Tres individuos no se incluyeron porque no tenían registro de dosis mensual.

◊ Individuos excluidos del análisis estadístico

GRAFICA 3. Migración del ADN en función de la dosis de exposición excluyendo a los tres individuos con diferente sensibilidad a la radiación.



DISCUSIÓN

Diversos autores han demostrado que las radiaciones ionizantes causan daño en el ADN en la población expuesta a intervalos de dosis entre 0.1 a 0.4 mSv (47,48); en el presente estudio el intervalo de exposición fue de 0.04 a 0.8 mSv /mes .

En 1991 Jha y Sharman (35) reportaron un incremento en la frecuencia de cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos en trabajadores expuestos a dosis entre 0.13 y 0.17 Gy de rayos X. Un año más tarde Balasem y col (30) observaron una frecuencia elevada de aberraciones cromosómicas (fragmentos acéntricos) en trabajadores expuestos a dosis acumuladas de 0.25 a 3.30 mSv. Barquinero y col en 1993 (34) encontraron que trabajadores de hospitales expuestos a rayos X y Gamma con dosis de radiación de 1.6 a 42.71 mSv presentaron un incremento significativo de anomalías cromosómicas estructurales.

A pesar de que en los reportes anteriores se analizó la frecuencia de aberraciones cromosómicas con bandas G, lo cuál es una manifestación del daño crónico; éstos resultados concuerdan con los obtenidos utilizando la técnica de EU - que detecta sitios lábiles a álcali y rupturas de monohebra- , ya que resultó ser lo suficientemente sensible para detectar el daño inmediato producido al ADN en los individuos ocupacionalmete expuestos a bajas dosis de rayos X y Gamma.

En los individuos control las dos muestras tomadas pre y post jornada laboral tienen valores similares (21.37 micras) excepto en el individuo 21 el cuál presentó un gran aumento en la migración del ADN (101.95 micras), una posible explicación a este aumento en la migración, fue que el individuo había realizado ejercicio antes de la toma de la muestra y no se informó. Este efecto fue reportado por Hartmann y col en 1994 (49), quienes encontraron que un ejercicio excesivo, es decir en los límites de las condiciones aeróbicas-anaeróbicas ocasiona aumento en la migración del ADN.

Debido a que se encontraron diferencias entre los individuos control y los ocupacionalmente expuestos después de la jornada laboral, nos preguntamos qué ocurría con las personas que comparten el ambiente donde se aplica la radiación, ya que esperábamos que este grupo tuviera un daño diferente al del grupo control y al ocupacionalmente expuesto, sin embargo debido a que el grupo era muy pequeño (4 individuos), estos resultados no fueron incluidos en el análisis estadístico final. El promedio de la migración del ADN en tres individuos de este grupo fue similar al de los del grupo control (21.3 micras), el cuarto individuo presentó una migración del ADN de 61.01 micras, por lo cual puede ser considerado como un individuo expuesto. Este hallazgo sugiere la necesidad de ampliar la muestra para obtener resultados concluyentes acerca de esta población.

Vijayalaxmi y col (40) y Singh y col. (41) observaron una respuesta de la migración del ADN dosis-dependiente en linfocitos irradiados, es decir a mayor dosis de radiación mayor migración del ADN. Estos resultados son similares a los que se observan en la gráfica 3, en donde se aprecia una correlación significativa del aumento de la migración del ADN en función de la dosis de exposición. Los tres individuos eliminados no presentan este comportamiento; ya que se esperaba que dos de estos tres individuos que estuvieron expuestos a una dosis mensual de 0.8 mSv tuvieran un daño al ADN mayor, lo cual no sucedió, ya que como se observa en la gráfica 2 , estos individuos presentaron una migración del ADN comparable con individuos expuestos a dosis de 0.1 y 0.2 mSv. Los resultados anteriores podrían explicarse con base a los hallazgos reportados por Green y col en 1991 (50), quienes observaron que existe una sensibilidad individual en los linfocitos T y por lo tanto respuestas diferentes a la radiación.

Los resultados obtenidos con respecto a la relación que se encontró entre la edad y la disminución de la migración del ADN, son apoyados por los hallazgos de Wiencke y col (51), Wolff y col (52) y Shadley y Dai (53) con respecto a que existe una respuesta adaptativa a la radiación ionizante; estos hallazgos proponen que repetidas exposiciones a dosis bajas de radiación inducen mecanismos de reparación responsables de una reducción en la frecuencia de aberraciones cromosómicas (54). Shadley y col. observaron que para los rayos X, la dosis que desencadena la respuesta adaptativa se encuentra entre 0.05-20 cGy (55). Sin embargo es necesario considerar que estos estudios están realizados *in-vitro* y las condiciones de irradiación están mejor controladas; en nuestro estudio, además de esas variables, existen otras que no se pueden controlar, ya que existen zonas no protegidas por los manteles de plomo como son: manos, cuello, etc. y habría que considerar la sensibilidad de estas partes del cuerpo; sin embargo no se puede descartar que un mecanismo similar de respuesta adaptativa este ocurriendo en estos individuos.

Son importantes los resultados anteriores, porque si bien, éstas personas se protegen con manteles de plomo, presentaron daño en el ADN. Es recomendable sensibilizar a la población de la responsabilidad que implica trabajar con radiaciones. La EU es una técnica útil para observar daño inmediato, el cuál es reparado dos horas después de la exposición, sin embargo, no se descarta la posibilidad que este daño no se repare eficientemente y se produzcan otro tipo de rearreglos.

CONCLUSIONES

- 1. La EU es una técnica útil para detectar daño inmediato en el ADN inducido después de la jornada laboral en los trabajadores ocupacionalmente expuestos.**
- 2. Existe una gran variabilidad en la migración del ADN en los linfocitos de los individuos control y ocupacionalmente expuestos.**
- 3. Se estableció una relación entre la dosis de exposición mensual y la migración del ADN.**
- 4. Se observó que a mayor edad se presenta una menor migración del ADN.**

APÉNDICE I

HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

Fecha _____
Registro int. _____
Nombre _____
Edad _____
Sexo _____
Puesto que desempeña _____
Servicio _____
Años de trabajo _____
Horas de trabajo _____
Dosis de exposición mensual _____

1.-¿Fumador?

0=No

1=Menos de 10 cigarros al día

2=Entre 10 y 20 cigarros al día.

3= Más de 20 cigarros al día.

2.-¿Fumador pasivo? (Convive con personas que fuman en su presencia)

0=No

1=Sí.

3.-¿Ingiere bebidas alcohólicas?

0=No

1=Esporádicamente

2=Una vez a la semana

3= Más de una vez a la semana

4.-¿Toma analgésicos?

0=No

1=Menos de una vez a la semana

2=Más de una vez a la semana

3=Todos los días.

¿Cuáles?

5.-¿En los últimos 15 días ha padecido de infecciones virales, bacterianas o parasitarias?

0=No

1=Si

6.-¿En los últimos 15 días tomó medicamentos?

0=No

1=Si

¿De qué tipo?

7.-¿Actualmente toma medicamentos?

0=No

1=Si

¿Cuáles?

8.-¿Actualmente tiene enfermedades de tipo viral, bacteriano o parasitario?

0=No

1=Si

9.-¿Actualmente ingiere alimentos que contienen vitamina C , por ejemplo naranja, limón, etc.?

0=No

1=Si

10.-¿En el último mes se expuso a los rayos solares de forma intensa. Por ejemplo, se fué de vacaciones al mar y se asoleo?

0=No

1=Si

11.-¿Trabaja por las tardes ?

0=No

1=Si

12.-¿En qué consiste el empleo?

APÉNDICE II

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ estoy de acuerdo en que se me tomen 4ml de sangre para colaborar con el proyecto: "Evaluación del daño en el ADN en trabajadores ocupacionalmente expuestos a la radiación mediante el método de electroforesis unicelular (EU)", desarrollado por investigadores del departamento de Investigación en Genética Humana.

Se me ha explicado que con el método de EU se puede identificar daño directo al ADN, sin embargo, puesto que es una técnica novedosa y sensible, habrá que evaluar cuidadosamente el valor biológico real de los resultados mediante la comparación entre personal expuesto a radiaciones y no expuesto.

Mi participación es voluntaria, no he sido objeto de presiones y si no deseara continuar en el estudio, esta decisión no afectará mi contrato laboral con el Instituto.

Fecha _____

Firma _____

APÉNDICE III

1.- Agarosa regular al 0.5%: Disolver 125mg de agarosa regular en 25 ml de buffer de fosfato salino (PBS) estéril pH 7.4.

2.- Agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%: Disolver 125mg de agarosa en 25ml de PBS. Ambas agarosas se guardan a temperatura de 4⁰C.

3.-Solución de lisis: A 1000ml de agua desionizada se le agregan 146.1g de NaCl 2.5M, 37.2g de EDTA 100mM y 1.2g de TRIS 10mM. (Solución stock)

Para hacer 50ml de solución de trabajo se mezclan perfectamente en un vaso Köplin: 44.5ml de sol. stock, 0.5ml de Triton y 5.0ml de dimetilsulfóxido.

La solución de lisis se prepara el mismo día de la electroforesis.

APÉNDICE IV

1.- Buffer de electroforesis.

- a) Sol. stock NaOH 10N (200g/ 500ml de H₂O desionizada)
 EDTA 200mM (14.89g/ 200ml H₂O desionizada pH 10)

Las soluciones se guardan en lugar fresco, protegidas de la luz y no deben ser usadas después de 1 semana.

b) Para preparar el buffer de electroforesis: Mezclar 30ml de NaOH y 5ml de EDTA de la sol. stock y aforar 1000 ml de H₂O desionizada.

2.- Buffer de neutralización: Disolver 48.5g de TRIS 0.4M en 1000ml de H₂O desionizada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl.

3.- Solución para la tinción de los geles. Disolver 10mg de bromuro de etidio en 50ml de agua desionizada. Guardarla protegida de la luz y a 4⁰C.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA.**

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Malkinson, F.D (1981) Some principles of radiobiology : A selective review. J Inves Der 76 (5): 32-38.**
2. **Keifer Jürgen (1990) Biological radiation effects. Springer-Verlag. New York. 431 p.**
3. **ININ (1990) Curso de protección radiológica en medicina nuclear. México. 360p.**
4. **Schmelter, R.F (1986) Nuclear medicine and the environment: Radiation interactions. Seminars in Nuclear Medicine, 16 (2): 87-105.**
5. **Mortimer Ch. (1983) Química. Iberoamericana. México. 768 p**
6. **Rabinowitz, J; y Z.Díaz. (1984) Aplicaciones de los radioisotopos en Química, Biología y Medicina (clínica y veterinaria). UNAM. México. 302 p**
7. **Attix, F; William R. (1968) Radiation dosimetry. Vol I Acad. press. New York. 404 p.**
8. **Organismo Internacional de Energía Atomica (OIEA) (1982) Normas básicas de seguridad en materia de protección radiológica**

9. Yuspa, S.H., and Dlugosz, A:A. (1991) Cutaneous carcinogenesis: natural and experimental. In: L.A. Goldsmith (ed.), *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*, Oxford University Press, New York., p: 1365-1402.

10. Segovia, N y Bulbulian S. (1986) La radioactividad en el habitat. *Ciencia y desarrollo*. 70 (XII): 41-50.

11. Comunicación personal realizada por la Dra. Ma. Teresa Lanche G. del servicio de Radioterapia del INP.

12. ICRP (1984) Nonstochastic effects of ionizing radiation. Vol. 14 (3) New York. Pergamon press.

13. Instituto Nacional de Pédíatria (1995) Curso monografico de seguridad radiológica. México, D.F. 70 pp.

14. Emerit, I. (1994) Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radical biol Med* 16: 99-109.

15. Kornberg, R.D. (1981) The nucleosome. *Sci Am* 244: 52-64.

16. IAEA National Seminar (1994) Molecular analysis of the genetic effects of radiation: late effects of adiation at low dose and low dose rates. National Radiological of Protection Board.

17. Forni, A. (1984) Chromosomal aberrations in monitoring exposure to mutagens-carcinogens. International Meeting Agency for Research on Cancer, Lyon. p 325-337.
18. Awwa, A.A. (1984) Radiations-induced chromosome aberrations in A-bomb survivors- a key biological dosimetry. In: Prentice R.L, Thompson J (eds) Atomic bomb survivor data: utilization and analysis. SIAM, Philadelphia, p. 99.
19. Beebe, G., Kato, H. and Land, C. (1977) Studies of the mortality of A-bomb survivors. 8. Mortality experience of A- bomb survivor, 1950-74. Radiation effects of research foundation, RERF Technical Repor.
20. Ishimaru, T., Hoshina T., Lechimaru, M. et al (1971) Leukaemia in atomic bomb survivors. Hiroshima and Nagasaki, I October 1950-30 September 1966. Radiat Res 45:216-233.
21. Pizzarello, D.J. and L. Colombetti (1982) Radiation biology. CRC Press, Inc. Florida 122p.
22. Wolff, S. (1968) Chromosome aberrations and the cell cycle. Radiat Res 66:76-89.
- 23.-Sakaik, O. (1984) Radiation-induced DNA damage and cellular lethality in cultered mammalian cells. Radiat Res 98:479-490

24. Tice, R. and Setlow, R. (1985) DNA repair and replication in aging organisms and cells, in: C:E. Finch and E:L. Scheider (eds.), Handbook of the biology of aging. 2nd edn., Van Nostrand Reinhold, New York. p. 173-224.
25. Mullaart, E., Boerringter, M., Brouwer, A. and Vijg, J. (1990) Spontaneous DNA breaks in the rat brain during development and aging. *Mutat Res* 237:9-15.
26. Neel, J., Schull, W., Awwa, A., Satoh, C., Kato, H., Otake, M. and Yoshimoto Y. (1990) The children of parents exposed to atomic bombs: Estimates of the genetic doubling dose of radiation for humans. *Am J Hum Genet* 46:1053-1072.
27. Stewart, J.S., and A. Sanderson (1961) Chromosomal aberrations after diagnostic X-irradiation, *Lancet*, i :978-979.
28. Conen, P.E., Bell, A. and Aspin N. (1963) Chromosomal aberration in an infant following the use of diagnostic x-rays. *Pedia* 31: 72-79.
29. Bloom, A. and Tjio, H. (1964) In vitro effects of diagnostic X-irradiation on human chromosomes. *J Med* 270:1341-1344.
30. Balasem, A.N., Abdul-Sahib,K.A., Hashmi,S.M. and Khattab, O. (1992) Chromosomal aberration analysis in peripheral lymphocytes of radiation workes. *Mutat Res* 271: 209-211.

31. Evans, H.J., Buckton, K.E., Halmilton, G.E. and Carothers, A. (1979) Radiation-induced chromosome aberrations in nuclear-dockyard workers. *Na* 227:531-534.
32. Lloyd, D.C., Purrott, R.J., and Reeder, E.J. (1980) The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat Res* 72: 523-532.
33. Bigatti, P., Lamberti, L., Ardito, G. and Armellino F. (1988) Cytogenetic monitoring of hospital workers exposed to low-level ionizing radiation. *Mutat Res* 204: 343-347.
34. Barquinero, J., Barrios, L., Caballin, M., Moro, R., Ribas, M., Subias, A. and Egozcue J. (1993) Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutat Res* 286:275-279.
35. Jha, A.N., and T.Sharman (1991) Enhanced frequency of chromosome aberrations in workers occupationally exposed to diagnostic X-rays. *Mutat Res* 260: 343-348.
36. Braselmann, H., E.Schmid. and M.Bauchinger (1994) Chromosome aberrations in nuclear power plant workers: the influence of dose accumulation and lymphocyte life-time. *Mutat Res* 306: 197-202.
37. Mutchinick, O., Lisker, R. and Ruz L. (1978) Intercambio de Cromatides Hermanas como método para la detección de mutágenos y carcinógenos ambientales. Estudio en personal de laboratorio expuesto a materiales radiactivos. Simposio de la Academia de Medicina. p. 579-584.

38. Lucas, J.N., Awa, A., Straume, T., Poggensee, M., Kodama, Y., Makano, M., Ohtaki, K., Weier, H.U., Pinkel, D., Gray, J. and Littlefield, G. (1992a) Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 62: 53-63.
39. Ostling, O., and Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291-298.
40. Vijalaxmi, R.R., Tice R.R., and Strauss, H.S. (1992) Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 271: 243-252.
41. Singh, N.P. McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
42. Singh, N., Danner, D., Tice, R., Brant, L. and Shneider, E. (1990) DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 237: 123-130.
43. Tice, R.R. (1991) The single cell gel. Workshop III Genetic Toxicology Division. Integrated Laboratory Systems. N. Carolina.
44. Betti, C., Davini, T., Giannesi, L., Loprieno, N. and Barele, R. (1994) Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333.

45. Betancourt, M., Pérez, P., Ortiz, R., Cortés, L., Gonzales, C., López, L., Rodriguez, L., and Amador, J. (1994) Assessment of DNA damage in lymphocytes from infected children using the single-cell gel electrophoresis. *Environ Mol Mutagen Vol.23, Suplemento 23*.
46. Green, M., Lowe, J., Waugh, A., Aldridge, K., Cole, J. and Arlett C. (1994) Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat Res 316: 91-102*.
47. Bauchinger, M., Kolin-Genesheim, E. J., Schmid, E., and Dresp, J. (1980) Chromosome analysis of nuclear power plant workers. *Int J Radiat Biol 38: 577-581*.
48. Bauchinger, M., Eckerl, H., Drexler, G., Streng, S., and Schmid, E. (1984) Chromosome dosimetry and occupational radiation exposure. *Radiat Prot Dosim 2: 93-97*.
49. Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grunert-Fuchs, M and Speit, G. (1994) Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis 9 (3): 269-272*.
50. Green, M., Arlett, C., Cole, J., Harcourt, S., Priestley, A., Waugh, A., Stephens, G., Beare, D., Brown, N., and Shun-shin, G. (1991) Comparative human cellular radiosensitivity: III. Radiation survival of cultured skin fibroblasts and resting T-lymphocytes from the peripheral blood of the same individual. *Int J Radiat Biol Vol 59 (3): 749-765*.
51. Wiencke, J., Azal, V., Olivieri, G. and Wolff, S. (1986) Evidence that the [³H]thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis 1: 375-380*.

52. Wolff, S., Afzal, V., Wiencke, J., Olivieri, G. and Michael A. (1988) Human lymphocytes exposed to low dose ionizing radiations became refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int J Radiat Biol* 53: 49-55.

53. Shadley, J. and Dai, G. (1992) Cytogenetic and survival adaptative response in G₁ phase human lymphocytes. *Mutat Res* 265: 273-281.

54. Olivieri, G., Bodycote, J and Wolff, S. (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Sci* 223: 594-597.

55. Shadley, J. and Wolff, S. (1987) Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2: 95-96.