

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**“Evaluación del efecto genotóxico en trabajadores  
expuestos a Rayos X en el Hospital Nacional Luis N.  
Sáenz PNP”**

**TESIS**

Para obtener el título profesional de Licenciado en Biología

Presentado por:

Walter Ivan Infantes Vizcarra

**Lima-Perú**

**2014**

### *DEDICATORIA*

A Dios, por guiarme en el sendero correcto de la vida, cada día en el transcurso de mi camino e iluminándome en todo lo que realizo en el convivir diario.

A mis padres, por ser el ejemplo para seguir adelante, y por inculcarme valores que de una u otra forma me han servido en la vida, gracias por eso y por muchos más.

A mis hermanas por apoyarme en cada decisión que tomé, y por estar a mi lado en cada momento hoy, mañana y siempre.

A mis amigos y amigas y a todas las personas que me incentivaron y me motivaron para seguir adelante con los objetivos de este propósito.

## AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de genética del Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Medio Ambiente para la Salud, que abrió sus puertas y me permitió realizar el trabajo.

Al Dr. Jaime Rosales que me brindo su ayuda desinteresada.

A mi Director de Tesis y Jefe del Servicio de Radiología del Hospital Nacional Luis N. Sáenz PNP Dr. Víctor Manuel García Salazar por guiarme y permitirme realizar el trabajo en su servicio.

A mi asesor de tesis MSc. Mauricio Gonzales Molfino por la paciencia para guiarme por este proceso tan complicado.

# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>RESUMEN.....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>ANTECEDENTES.....</b>   | <b>11</b> |
| <b>HIPÓTESIS .....</b>   | <b>21</b> |
| <b>MATERIALES Y METODOS.....</b>   | <b>22</b> |
| OBTENCIÓN DE MUESTRAS. ....  | 22        |
| OBTENCIÓN DE LOS LINFOCITOS POR GRADIENTE DE PERCOLL.....                  | 23        |
| PREPARACIÓN DE LOS MICROGELES DE AGAROSA.....                              | 23        |
| LISIS DE MEMBRANA.....   | 23        |
| DESNATURALIZACIÓN Y ELECTROFORESIS.....                                    | 24        |
| NEUTRALIZACIÓN Y FIJACIÓN.....   | 24        |
| TINCIÓN Y VISUALIZACIÓN.....   | 24        |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....  | 25        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>26</b> |
| ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LA POBLACIÓN.....                               | 26        |
| EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO POR EL ENSAYO COMETA .....                | 28        |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                     | <b>37</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>40</b> |
| ANEXO 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL HOSPITAL NACIONAL LUIS N.SAENZ PNP ..... | 41        |
| ANEXO 2. EQUIPO DE RAYOS X DE LA INSTITUCIÓN.....                          | 43        |

|  |    |
|--|----|
| ANEXO 3. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE AL PERSONAL DE RADIOLOGÍA.....        | 44 |
| ANEXO 4. DIAGRAMA DEL PROCESO DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO COMETA..... | 45 |
| ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO.....                                   | 46 |

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto genotóxico causado por los Rayos X, en el ADN linfocitario en sangre periférica, utilizando el ensayo cometa como técnica de análisis, en el personal del Servicio de Radiología del Hospital Nacional LUIS N.SAENZ PNP. La población de estudio fue de 40 personas separadas en 2 grupos, el 1ero de 20 trabajadores expuestos a los Rayos X, con un tiempo laboral de exposición de 2-15 años y 16 años a más y de edades entre 20-30 y 31 años a más. El 2do grupo fue el grupo control, formado por personas del mismo centro de trabajo sin exposición a Rayos X. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción venosa en tubos con heparina, de los cuales fueron aislados los linfocitos y asu vez estos fueron colocados en láminas porta objetos con geles, para la realización del ensayo cometa. Las láminas fueron sometidas a lisis alcalina seguida de la corrida electroforética (pH=13), para seguir con la tinción lectura en un microscopio de fluorescencia. El análisis de imágenes se realizó usando el programa informático Komet 4, en el cual se almacenaron los datos recolectados en formato Excel y analizados en el programa estadístico SPSS. Los resultados indicaron que existe un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de daño genotóxico en el 10% de los trabajadores expuestos a los Rayos X y solo el 1% del grupo control. Respecto a la variable de estudio de la edad en el personal expuesto no se encontró resultados significativos. Por el contrario para la variable de tiempo de exposición, los individuos expuestos entre 2 a 15 años presentaron mayor daño celular (Nivel I y II) en relación a los expuestos de 16 a más años que presentaron niveles bajos. Los Rayos X causan un efecto medianamente nocivo en la integridad del genoma teniendo una correlación con los años de exposición del personal que trabaja en el servicio radiología. Los hallazgos confirman la utilidad del ensayo cometa como una herramienta útil para evaluar daño genotóxico y prevenir tempranamente el aparecimiento patologías radio inducidas.

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the genotoxic effect caused by X-rays in DNA in peripheral blood lymphocytes, using the comet assay and analysis technique, the staff of the National Hospital Radiology LUIS N.SAENZ PNP. The study population was 40 persons separated into 2 groups, the 1st of 20 workers exposed to X-rays, with a working time of exposure 2-15 years and 16 years and over age 20-30 and 31 years later. The 2nd group was the control group, consisting of people from the same workplace without exposure to X-ray Blood samples were obtained by venipuncture into heparinized tubes, which were isolated lymphocytes and assume time these were placed in partment sheets gels, for performing the comet assay. Slides were subjected to alkaline lysis followed by electrophoretic run (pH = 13) to continue reading staining fluorescence microscopy. Image analysis was performed using the Komet 4 software, in which the collected data to Excel and analyzed using the SPSS statistical program was stored. The results indicated that there is a significant increase ( $p < 0.05$ ) of genotoxic damage in 10% of workers exposed to X-rays and only 1% in the control group. With regard to the study variables of age in the exposed staff found no significant results. In contrast to the variable exposure time, exposed individuals between 2-15 years showed greater cell damage (Level I and II) compared to those exposed to more than 16 years had low levels. The X-rays cause a moderately adverse effect on the integrity of having a correlation with years of exposure of personnel working in the radiology service genome. The findings confirm the usefulness of the comet assay as a tool to assess genotoxic damage and prevent early onset pathologies induced within the tool.

# INTRODUCCIÓN.

La integridad del material genético se ve comprometida con la exposición a radiación ionizante, dando origen a cambios genéticos como supresiones y ruptura de una o de las dos cadenas del ADN. La aparición de estos cambios, altera el equilibrio y la función celular favoreciendo la susceptibilidad para eventos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos, los cuales han sido documentados en la literatura en diversas investigaciones. Los efectos biológicos por las radiaciones ionizantes (Rayos X) varían de acuerdo al tiempo de exposición e intensidad, y las consecuencias se manifiestan en muchos órganos, en concreto en la médula ósea, riñones, pulmones y el cristalino de los ojos.

Las afecciones para la salud debido a las radiaciones ionizantes se las puede dividir en los siguientes grupos: determinísticos, se observa en personas expuestas a altas dosis de radiación, lo que induce la muerte celular provocando la pérdida de funcionalidad de uno o varios tejidos, los estocásticos, cuando el contacto con la radiación ionizante potencia eventos de daño ya presentes en el individuo, provocando sinergismo entre las alteraciones genómicas, y los efectos producidos por la radiación.

Actualmente cobran importancia los efectos de las radiaciones ionizantes a dosis bajas y aún más a dosis menores de 20-250mSv/año, límite establecido por los organismos internacionales (IAEA) para la población expuesta laboralmente como el valor por debajo del cual, el riesgo es mínimo pero no inexistente. Estudios llevados a cabo en Estados Unidos, Canadá y el Reino Unido, sobre trabajadores expuestos a radiación ionizante a dosis bajas, mostraron aumento significativo de la incidencia de cáncer en tejidos blandos y leucemia.



En los últimos años el avance de las tecnologías médicas viene propiciando un imparable aumento de las técnicas que utilizan radiaciones, lo que hace muy necesario el conocimiento por todos los profesionales sanitarios del tipo de agentes físicos que se utilizan en todos los campos del trabajo y especialmente los riesgos a que se pueden someter las personas que pueden estar en contacto con este tipo de agentes en su medio de trabajo, ya que si las radiaciones ionizantes penetran en los tejidos vivos, pueden provocar importantes efectos biológicos.

Es por ello que se ha visto incrementada la investigación a este respecto *in vitro* e *in vivo*, desde el análisis de los mecanismos de toxicidad molecular, genotoxicidad, hasta la búsqueda de herramientas de biomonitoreo genético y biodosimetría que permitan una aproximación al daño y mejor evaluación de riesgo a corto, mediano y largo plazo, permitiendo la implementación de medidas de prevención antes de la aparición de condiciones clínicas irreversibles.

Por todo ello, es preciso saber cuáles son los efectos biológicos de estas radiaciones y conocerlos en aquellas personas que trabajan en contacto con radiaciones ionizantes (Rayos X) o lugares en los que se emplean, ya que en el medio sanitario proliferan dichas fuentes.

En el Perú existen pocas estadísticas que hablen de riesgos o accidentes y lesiones laborales, a los que se exponen los profesionales de la radiología. Sin embargo, algunos informes aislados hablan de un aumento de la exposición a 170 y 280 mSv en personas y personal que son sometidos a radiografías diagnósticas, por accidentes laborales u controles médicos; esto debido a que algunos centros laborales terciarizan los exámenes con servicios.

Los estudios genotóxicos permite analizar si las poblaciones expuestas a radiaciones ionizantes como los Rayos X, presentan alteraciones en la morfología de los cromosomas y en la integridad del ADN, y que a futuro podrían desencadenar enfermedades genéticas.

La utilidad del estudio genotóxico radica en demostrar y determinar la relación entre el daño genético y la radiación ionizante. Además permite realizar recomendaciones para prevenir enfermedades.

El propósito de esta investigación es determinar el efecto genotóxico de los Rayos X en el personal laboralmente expuesto del Servicio de Radiología del Hospital Nacional Luis N. Sáenz PNP de Lima.

## ANTECEDENTES

Los rayos X son radiaciones ionizantes electromagnéticas, invisible, capaces de atravesar cuerpos opacos y de impresionar las películas fotográficas. Los rayos X se generan cuando un haz de electrones muy energéticos se desacelera al chocar con un blanco metálico, el choque produce un espectro continuo llamados rayos X (Del Cura et al. 2010)

Al interaccionar la radiación ionizante con una célula se produce ionizaciones y excitaciones en las macromoléculas como son el ADN, ARN, enzimas, proteínas, etc. o con el medio en el que están en suspensión las estructuras celulares. Por esta razón suele dividirse la acción de la radiación en directa sobre las macromoléculas e indirecta sobre el medio. Las alteraciones en macromoléculas fundamentalmente como el ADN y otras proteínas celulares, inducen cambios en la estructura y funcionalidad de todo el sistema. (Sainz. 2005)

Existen dos tipos de efectos causados por la exposición a la radiación sobre la salud; determinísticos, se observan en personas expuestas a altas dosis de radiación; lo que induce la muerte celular provocando la pérdida de funcionalidad de uno o varios tejidos. Los estocásticos, cuando el contacto con la radiación ionizante potencia eventos de daño ya presentes en el individuo, provocando sinergismo entre las alteraciones genómicas y los efectos producidos por la radiación. (Touil et al. 2002)

La exposición a radiaciones ionizantes, ha sido estudiada ampliamente, siendo un grupo ocupacionalmente expuesto a este riesgo, los trabajadores de la salud en los cuales las medidas de prevención son la mejor forma de protección, la cual es dada por una vigilancia adecuada de las dosimetrías personales, exámenes para-clínicos como cuadro

hemático y TSH, como parámetros de evaluación y seguimiento del trabajador. (Munar y Rios. 2011)

Los hallazgos en relación con el tiempo y la presencia de aberraciones cromosómicas, debido a la exposición a bajas dosis (20-250 mSv) de radiación ionizante, se han encontrado: en promedio de 1,93 aberraciones por individuo; 39% entre 1 y 10 años de exposición, 27% entre los 11 y 20 años de exposición y 46% entre los 21 y 30 años de exposición). Los hallazgos sugieren que la exposición a bajas dosis de radiación ionizante, puede ocasionar daños cromosómicos y está en relación directa con el tiempo de exposición y la sensibilidad individual, mas no con la cantidad de radiación recibida. Los trabajadores expuestos deben tener un seguimiento biológico adicional a la dosimetría. (Baquero et al. 2004)

Un grupo de estudio compuesto por trabajadores ocupacionalmente expuestos "radioterapia y diagnóstico", trabajando hace 12 años en promedio con edades entre 25-45 años y sexo masculino, mostraron aumento de las CA (Aberraciones Cromosómicas) así como la frecuencia MN (Micronúcleos), son más sensibles a mutágeno MMC, pero no revelan un cambio en la SCE (Intercambio de cromátidas hermanas) frecuencia, RI o cuadro hemático. Una indicación preliminar del presente estudio es que a largo plazo la exposición a la radiación de bajo nivel puede probablemente dañar la constitución genética de un individuo. (Gadhia et al. 2004)

Las radiaciones ionizantes causan un efecto nocivo en la integridad del genoma; sin embargo el uso de medidas de protección como delantales y protectores de un material (como vinilo) que contiene plomo no evita el apareamiento de estas lesiones. El biomonitoreo genético es una herramienta útil para el diagnóstico y prevención tanto primaria como secundaria de apareamiento de patologías radio inducidas. (Muñoz et al. 2008)

La dosimetría biológica mide los efectos inducidos por las radiaciones ionizantes a nivel biológico, constituye una medida indirecta del grado de exposición a las mismas. A

priori puede ser considerado el método dosimétrico idóneo ya que nos refleja exactamente las alteraciones biológicas radioinducidas. Se han realizado numerosos estudios que demuestran que la irradiación *in vitro* o *in vivo* de los linfocitos sanguíneos produce idénticas alteraciones en los cromosomas por cada dosis de irradiación, permitiendo de esta forma, una relación entre los niveles de aberraciones observados en las personas expuestas, con una curva dosis-efecto producida *in vitro*. (Prieto et al. 2006)

Los linfocitos son las células más adecuadas para la realización de las pruebas de genotoxicidad porque pueden acumular lesiones debidas a exposiciones repetidas y prolongadas lo que nos permite detectar daños a exposiciones de baja dosis y de larga data. (Cueva. 2008)

Los linfocitos humanos se expusieron a irradiación X (250-2000 mSv) o se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (9,1 a 291 microM) a 4°C y el grado de migración de ADN se midió usando una técnica de electroforesis unicelular bajo condiciones alcalinas. Ambos agentes indujeron un aumento significativo en la migración del ADN, a partir de la dosis más baja evaluada. Los patrones de migración eran relativamente homogéneos entre las células expuestas a los rayos X. La mayor parte de la reparación del ADN se produjo dentro de los primeros 15 min, mientras que todos se completaron por 120 min después de la exposición. Sin embargo, algunas células no demostraron reparación durante este período de incubación, mientras que otras células demostraron patrones de migración de ADN indicativos de más daño que la inducida por la irradiación inicial con rayos-X. Esta técnica parece ser sensible y útil para la detección de daño y la reparación en células individuales. (Singh et al. 1988)

El siguiente estudio se realizó para contribuir a la caracterización del grado de variabilidad en el daño basal en las células blancas de la sangre de la población de control, y para investigar cómo esta variabilidad está asociada con factores externos e internos. Dos pruebas sensibles: el ensayo cometa alcalino y el ensayo de aberración

cromosómica se aplicaron para estudiar los niveles de fondo de daño del ADN en las células blancas de la sangre. La evaluación estadística de los datos confirmó que existe una correlación positiva entre la migración del ADN y el número de núcleos de cola larga encontrado con el ensayo de cometa y el número total de aberraciones cromosómicas. Los datos obtenidos pueden servir como valores de control en los estudios de biomonitorización próximas. (Nevenka et al. 2006)

En el presente trabajo se realizó un estudio de biomonitoreo humano, desde el punto de vista genotóxico ocasionado por la exposición a los plaguicidas, a través del Ensayo Cometa por registro visual y el software Comete Imagen. Los resultados obtenidos indican que existe un incremento significativo (0.05) de daño genotóxico en los agricultores ocupacionalmente expuestos. Los hallazgos confirman la utilidad del ensayo cometa para la realización de monitoreos humanos para evaluar daño genotóxico. (Larrea. 2007)

Actualmente cobran importancia los efectos de las radiaciones ionizantes a dosis bajas y aún más a dosis menores de 20-250mSv/año, límite establecido por los organismos internacionales (IAEA) para la población expuesta laboralmente. En el Perú existen pocas estadísticas que hablen de riesgos o accidentes y lesiones laborales, a los que se exponen los profesionales de la radiología. Sin embargo algunos informes aislados hablan de un aumento de la exposición a 170 y 280 mSv en personas y personal que son sometidos a Radiografías diagnosticas, por accidentes laborales o chequeos médicos. (Ramírez. 2002)

Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN, son parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad. Se ha demostrado su implicación en enfermedades degenerativas, en el cáncer, y recientemente, su vínculo con el estrés oxidativo. En la década de 1980 se desarrolló la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), para la

detección de daño en el ADN. Por primera vez se proporcionaron datos en células individuales. (Arencibia et al. 2011)

El ensayo cometa es una prueba muy versátil y adaptable, capaz de dar información sobre los diferentes tipos de daños al ADN presentes en una célula, y también sobre la capacidad celular para reparar los daños. Su aplicación en las pruebas de genotoxicidad de productos químicos y control biológico humano parece aumentar con el inminente desarrollo de métodos de alto rendimiento y de análisis totalmente automatizados. (Collins et al. 2008)

Las metodologías del ensayo del cometa que se aplican en los diferentes laboratorios son variadas pero, sin duda alguna, la versión alcalina es la más utilizada. A pH 13, la técnica resulta más sensible para la detección de niveles bajos de daño. (Zúñiga. 2009)

Las pruebas de ensayo cometa y micronúcleos, tienen como objetivo determinar el efecto genotóxico producido por los Rayos X en individuos expuestos laboralmente. En el ensayo cometa, se obtuvo un alto nivel de significancia: ( $p < 0.05$ ) para una cola. Los resultados muestran daño genómico inducido por radiaciones ionizantes. El ensayo cometa demostró tener mayor grado de sensibilidad en comparación con la prueba de micronúcleos. (Santiago. 2010)

La aplicación de la prueba cometa tiene como objetivo la evaluación de daño del ADN causado por diferentes dosis de radiación gamma en linfocitos humanos periféricos in vitro. Los criterios de valoración del ensayo del cometa mostraron valores significativamente más altos para todas las muestras de sangre irradiados en comparación con el control. Por tanto, la longitud de la cola y momento de la cola de dosis-efecto se encontró que era lineal en un intervalo de dosis de 10 Gy y 0.5Gy. En este trabajo también se señaló como posible, el uso de la prueba cometa en la detección de las lesiones del ADN causadas por la dosis de radiación extremadamente alta, que no es posible mediante el uso de métodos estándar citogenéticas. (Vera et al. 2004)

Se evaluaron las lesiones del ADN tempranas causadas por la exposición a dosis bajas de la radiación ionizante en 41 trabajadores de los departamentos de Radiología, Medicina Nuclear y Radioterapia y un grupo de 20 individuos sanos no expuestos, todos de la misma Institución. En todos los trabajadores ocupacionalmente expuestos a radiación se encontró un incremento en la fragmentación del DNA al terminar su jornada laboral. La cantidad de radiación en los tres departamentos es diferente, en Medicina Nuclear y Radioterapia, los trabajadores mostraron una dosis mensual mayor, así como un mayor daño en su DNA en comparación con los trabajadores de Radiología. Las colas de cometa más largas se encontraron en los trabajadores de Medicina Nuclear en donde se utilizan radionúclidos; estas sustancias son manejadas y administradas oral o intravenosamente por los trabajadores, lo cual implica un tipo de exposición diferente a la radiación, esto podría explicar las mayores diferencias encontradas en este estudio. El daño detectado por el ensayo cometa se repara en su mayoría, pero puede generar aberraciones estables y representar un riesgo para salud a largo plazo. (Martínez et al. 2010)

Se realizó una evaluación de riesgos laborales genotóxicos en 42 trabajadores del Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil, que habían sido expuestos al plomo (soldadura), el óxido de etileno (área de esterilización), los fármacos antineoplásicos (enfermeras y farmacéuticos) o radiación ionizante. Se compararon con 42 individuos no expuestos. Hubo un aumento en la frecuencia de linfocitos binucleados citocalasina-bloqueados con micronúcleos, aunque no fue significativa ( $P = 0,058$ ). Los grupos expuestos a fármacos antineoplásicos y la radiación tenían un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos ( $P = 0,038$  y  $P = 0,022$ , respectivamente). Las altas frecuencias de puentes dicéntricos sugieren la acción de clastogénica en estos dos grupos. Estos resultados sugieren que las medidas de seguridad adoptadas son muy importantes para proteger a los trabajadores contra la exposición a agentes mutagénicos



y deben ser mejorados en el radiológicos y áreas quimioterapéuticos. (Sharbel y Erdtmann. 2000)

Se evaluó el efecto mutagénico producido por exposición crónica a rayos X en sistemas celulares normales (CHO-K1) y deficientes en mecanismos de reparación (xrs-5) mediante la versión alcalina del ensayo cometa. La evaluación grupal y comparativa entre las líneas estudiadas mostró un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) en cuanto a la cantidad de células con daño para las células sensibles a la radiación. Específicamente, la magnitud del mismo se manifestó predominantemente por la observación de cometas de grado 1 y 2, no detectándose figuras apoptóticas y/o necróticas. Lo expuesto podría ser atribuido a la exposición de la cromatina en el momento de la irradiación, debido a la organización nuclear diferencial entre ambas líneas celulares. (Güerci y Grillo. 2007)

Se evaluó el daño inducido por rayos gamma a través del ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica, tratando de establecer los límites de detección y saturación de la técnica y contribuir al conocimiento de las relaciones dosis-respuesta para radiaciones de bajo LET. En numerosos trabajos la evaluación del daño genotóxico radioinducido se contempla desde la construcción de curvas de calibración con fines dosimétricos, aplicando técnicas citogenéticas. No obstante, el presente estudio propone, de manera innovadora, la utilización de estas curvas con el objetivo de evaluar la radiosensibilidad individual implementando el ensayo cometa. Los resultados permiten sugerir que dentro del valor de rango de 0 a 8 Gy la sensibilidad del método posibilita la predicción de la respuesta relativa individual (radiosensibilidad) en referencia al olive tail momento (momento cola). (Güerci et al. 2006)

Este trabajo de investigación ayuda a evaluar los efectos sanitarios de la exposición a los contaminantes orgánicos mediante ensayo cometa técnica por KOMET 3,1 software. Este estudio utilizó el biomonitoreo humano para evaluar los efectos genotóxicos de la exposición a los contaminantes orgánicos. Los datos experimentales sugieren que los parámetros de daño del ADN (OTM, % T-ADN y TL) se encontraban más alto valor en

el aumento en los valores de OTM. Este estudio demuestra que, mediante técnicas altamente sensibles, es posible detectar humana riesgos para la salud en una etapa temprana cuando es posible la intervención. (Ravi et al. 2010)

Ensayo del cometa, se llevó a cabo para evaluar el daño en el ADN en los linfocitos T, los linfocitos B y granulocitos de 41 trabajadores expuestos al benceno en una empresa de artes gráficas y 41 donantes no expuestos. En los linfocitos T, el daño del ADN fue ligeramente mayor en trabajadores expuestos que en los controles. Los momentos de cola en los dos grupos fueron  $1,75 \pm 0,29$  y  $1,47 \pm 0,41$ , respectivamente ( $P < 0,0006$ ). Daño en el DNA de los linfocitos B en los dos grupos mostraron la más significativa diferencia entre los tres tipos de células. Los momentos de cola fueron  $3,86 \pm 0,71$  y  $1,51 \pm 0,39$ , respectivamente ( $P < 0,0001$ ). En los granulocitos, daños en el ADN también fue diferente, los momentos de cola es  $3,61 \pm 0,75$  y  $2,60 \pm 0,59$ , respectivamente ( $P < 0,0001$ ). La comparación de daños en el ADN en ambos grupos, muestra que los linfocitos B podrían ser una diana útil de vigilancia biológica de la exposición humana a niveles bajos de benceno. (Donggeun et al. 2002)

Se evaluó el efecto genotóxico de los plaguicidas utilizados en actividades de empaque de banano, utilizando el ensayo cometa (electroforesis unicelular) como marcador biológico en los linfocitos Este fue un estudio caso-control doble ciego de 30 mujeres expuestas procedentes de 15 fincas bananeras y 28 mujeres no expuestas ocupacionalmente a plaguicidas de la misma área geográfica. Los resultados muestran el daño al ADN monocatenario después de trabajar 5 a 15 años ( $R^2 = 0,12$ ). En Costa Rica no tenemos un registro histórico de la clase de los plaguicidas utilizados en las fincas bananeras, el período de tiempo y por cuánto tiempo se utilizaron. Esto evitó un nuevo análisis sobre la dosis, la frecuencia de la exposición y el uso de nuevo o de tipo antiguo de pesticidas en las granjas en relación al daño del ADN. El ensayo cometa es de un valor en el control genético de las poblaciones expuestas pesticidas. (Ramírez y Cuenca 2002)

El ensayo cometa, se llevó a cabo para evaluar el daño del ADN en linfocitos humanos de 20 voluntarios antes y después de la coloración del cabello. El daño del ADN en los linfocitos se encontró que era ligeramente mayor en los voluntarios después de la coloración del cabello. El valor del momento cola antes y después de la coloración del cabello fueron  $1,47 \pm 0,41$  y  $1,75 \pm 0,29$ , respectivamente ( $p < 0,0008$ ). Daño en el ADN en los linfocitos mostró una diferencia significativa con el tratamiento y el tiempo de calentamiento. Los momentos de cola después de 15 min de tiempo de tratamiento antes y después de la coloración del cabello eran  $1,44 \pm 0,22$  y  $1,85 \pm 0,36$ , respectivamente ( $p = 0,0004$ ) y los momentos correspondientes en la cola 20 min de tiempo de calentamiento antes y después fueron  $1,37 \pm 0,15$  y  $1,78 \pm 0,34$  ( $p = 0,0002$ ). En conclusión, hemos encontrado que una exposición aguda de los tintes para el cabello con calentamiento causa daños del ADN en linfocitos periféricos y que este daño se relaciona significativamente. (Cho et al. 2003)

Para investigar el posible efecto genotóxico de la administración crónica in vivo del fármaco D-003 a ratas SD (Sprague Dawley) mediante la aplicación de la electroforesis alcalina de células individuales (Ensayo Cometa). Al finalizar el tratamiento, los leucocitos y las células del hígado de las ratas de los diferentes grupos fueron embebidos en agarosa, lisiados, sometidos a electroforesis y teñidos con nitrato de plata para analizar la inducción de rupturas de cadena (RC) y sitios lábiles al álcali (SLA) en el ADN. Los resultados no evidenciaron la inducción de RC y SLA por la administración crónica oral de D-003 ni en leucocitos, ni en hepatocitos de ratas SD, lo que permite corroborar los resultados obtenidos anteriormente, evidenciando la baja toxicidad del producto. (Gonzales et al. 2004)

El ensayo cometa ha sido estandarizado en diferentes especies, pero poco se conoce del análisis en los espermatozoides, es de vital importancia este análisis dado por su alta sensibilidad a los procesos oxidativos que incluyen la formación de radicales libres

durante el proceso de maduración o metamorfosis. Por lo cual el Ensayo Cometa será de gran utilidad en los ensayos de genotoxicidad y de estrés oxidativo en células germinales masculinas. (Arencibia et al. 2010)

El Software Komet 4 es un programa que utiliza una cámara de video de alta resolución conectada al microscopio de inmufluorescencia, transfiere una fotografía de video en vivo al monitor del ordenador. La imagen mostrada en el monitor refleja lo que se observa por la pieza óptica del microscopio. Sencillamente se utiliza el mouse para seleccionar una célula y el Software calculará instantáneamente todos los parámetros de medida; momento de la cola Olive, % de intensidad de cola, longitud de cola y % de ADN en la cola – ampliamente reconocidos como las mediciones de daños en el ADN en el ensayo cometa y luego añade los datos correspondientes a la célula a su lista de resultados. El sistema permite calificar todas las células de un portaobjetos en dos minutos. Cuando se ha calificado la cantidad de células requerido (50 células por muestra), se almacenan los datos en un archivo de formato Excel, los cuales son copiados y analizados en el programa estadístico SPSS 17.0., el cual puede amalgamar los datos, producir gráficos y generar resúmenes estadísticos de las pruebas de test de ANOVA, Kruskal-Wallis y Coeficiente de Correlación (Zúñiga. 2009)

# HIPÓTESIS

“La evaluación del efecto genotóxico en trabajadores expuestos a Rayos X determina que existe un alto daño de ADN linfocitario en el personal que labora en el Servicio de Radiología, del Hospital Nacional LUIS N. SAENZ PNP”

## MATERIALES Y METODOS.

El tipo de estudio fue observacional, descriptivo, prospectivo, transversal y comparativo. La población de estudio fue de 40 personas dividida en 2 grupos, el 1er grupo de 20 trabajadores expuestos a los Rayos X del Servicio de Radiología del Hospital Nacional PNP LUIS N.SAENZ de Lima, con 8 horas de exposición diaria por 5 días a la semana y un tiempo laboral de exposición de 2-15 años y 16 años a más y de edades entre 20-30 y 31 años a más. El 2do grupo fue el grupo control, formado por personas del mismo centro de trabajo sin exposición a Rayos X, cuyas edades y horario de trabajo fueron similares a los del grupo de trabajadores expuestos. La participación al estudio fue de forma voluntaria firmando una carta de consentimiento informado para autorizar la toma de muestra de sangre (Anexo 5). El lugar de estudio fue en el Servicio de Radiología del Hospital Nacional PNP LUIS N.SAENZ, que se ubica en el distrito de Pueblo Libre, Departamento de Lima-Perú. Donde se tomaron las muestras de sangre (Anexo 1).

El procesamiento y análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Genotoxicidad del Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente para la Salud del Instituto Nacional de Salud, ya que cuenta con los equipos especiales para las corridas electroforéticas y del software para la visualización y cuantificación de las imágenes fluorescentes del ensayo cometa.

### **Obtención de muestras.**

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas por punción venosa en tubos vacutainer de 3 ml, con Heparina como anticoagulante (Anexo 2). Luego las muestras fueron procesadas de acuerdo al protocolo inicialmente descrito por Singh et. al. (1988) con ligeras modificaciones de Ramírez (2002) y Zúñiga (2009).

## **Obtención de los linfocitos por gradiente de Percoll.**

Para la obtención de los linfocitos se preparó el gradiente de Percoll al 30% (1.080 g/mL) y 60% (1.020 g/mL) usando como diluyente la Solución salina bufferada de Hank (HBSS) y se homogenizo con Vórtex. Cada solución se depositó en un tubo cónico 1.5 mL de Percoll 60% y luego cuidadosamente se depositó por las paredes del tubo 1.5 mL de Percoll 30%, luego como mucho cuidado se agregó la muestra de sangre por la pared del tubo con el gradiente de Percoll suavemente y se centrifugo a 2200 rpm por 10 minutos. Después de la centrifugación se observó un anillo de color blanco entre las interfaces del Percoll de 30% y 60% y al fondo los hematíes, y de esta interfase se obtuvo con una micropipeta el anillo de los linfocitos. Este pequeño volumen del anillo se depositó en un tubo cónico para la respectiva preparación de los microgeles (Anexo 3).

## **Preparación de los microgeles de agarosa.**

Se utilizaron portaobjetos que fueron cubiertos con 150 ul de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%. Posteriormente se preparó alícuotas de 25 ul de las muestras de linfocitos que fueron mezcladas con 75 ul de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 0,5% en PBS, mantenida previamente a 37<sup>0</sup>C. Esta mezcla celular se depositó sobre los portaobjetos, rotulados e inmediatamente, se cubren con cubreobjetos de 24 mm x 60 mm. Se dejó solidificar a 4<sup>0</sup>C durante 15 min y transcurrido este tiempo, se retiraron los cubreobjetos. Posteriormente, se depositó una tercera capa de agarosa (LMA) al 0,5% sobre la capa celular, se cubrió nuevamente con un cubreobjetos de la misma medida y se dejó solidificar también por 10 min a 4<sup>0</sup>C. A continuación, se retiraron los cubreobjetos y las preparaciones fueron sumergidas en el tampón de lisis.

## **Lisis de membrana.**

La solución de lisis se compuso de NaCl 2,5 mol/L, EDTA 0,1 mol/L y Tris 0,01 mol/L, 1 % Tritón, 10 % DMSO y ajustado a pH 10, donde las preparaciones fueron sumergidas

entre 1 y 24 h, a 4°C. Esta solución fue enfriada previamente para asegurar la estabilidad de los geles en los portaobjetos, todo el proceso se realizó en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz en el DNA desprotegido (Anexo 4)

### **Desnaturalización y electroforesis.**

Tras la lisis, las preparaciones se colocaron en la cubeta de electroforesis horizontal. Se llenó la cubeta con tampón de electroforesis de manera que las preparaciones estuvieran completamente sumergidas y se dejaron en estas condiciones durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se procedió a una electroforesis durante 20 min a 25v y 300 mA. La solución de electroforesis estuvo compuesta por 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA y 300 mMNaOH con un pH 13 y se mantuvo a 4°C y en oscuridad durante todo el proceso (Anexo 4).

### **Neutralización y fijación.**

Finalizada la electroforesis, los portaobjetos se retiraron de la cubeta y se colocaron en una caja de lavados para someterlos a neutralización (3 veces x 5 min). Este tampón se preparó con 0,4 mM de Tris-HCl con pH 7,5 a 4°C. Luego las láminas fueron deshidratadas agregando en la superficie de cada una de ellas 2ml de etanol durante 3 min lo cual permite almacenar los portaobjetos durante un tiempo antes del recuento. Las preparaciones se guardaron en cajas oscuras para evitar el daño de la luz directa y se mantuvo a temperatura ambiente (Anexo 4).

### **Tinción y visualización.**

Las preparaciones se tiñeron con 60 ul de bromuro de etidio a una concentración de 0,4 ug/ml y se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 60 mm. La visualización se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50, equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm, bombilla de mercurio de 100 w y un filtro de barrera de 590 nm y conectado a una videocámara Hitachi Denshi, Ltd. CCD-IRIS. El recuento celular de cada muestra fue de 50 células por lámina y por duplicado. La imagen de cada célula



se capturo empleando el programa Komet 4, y la lectura de las células se realizó a 200X de aumento. Para cuantificar el daño genotóxico, se consideró la longitud de cola; clasificada cinco niveles según el daño al ADN (0 – no dañada, 1 - poco dañada, 2 – medianamente dañada, 3 - muy dañada y 4 - totalmente dañada) y el porcentaje de DNA en la cola como el parámetro de evaluación.(Zúñiga 2009) (Anexo 4).

### **Análisis Estadístico.**

Para el análisis estadístico se usó el Programa SPSS 17.0 y se utilizó el test de U de Man-Whitney y Coeficiente de Correlación.

# RESULTADOS.

## Estadística descriptiva de la población.

En la tabla 1 se muestra los datos del grupo expuesto a la radiación y en la tabla 2 del grupo control no expuesto a radiación.

Tabla 1. Datos generales de los trabajadores expuestos a los Rayos X

| INDIVIDUOS  | SEXO | EDAD | AÑOS DE EXPOSICION | DOSIS DE mSv | % DE ADN EN COLA |
|-------------|------|------|--------------------|--------------|------------------|
| 1           | M    | 50   | 6                  | 0.7          | 27.06            |
| 2           | M    | 30   | 5                  | 1.4          | 24.45            |
| 3           | M    | 53   | 28                 | 1.6          | 3.97             |
| 4           | F    | 49   | 23                 | 0.7          | 4.56             |
| 5           | F    | 53   | 4                  | 0.2          | 15.41            |
| 6           | F    | 46   | 8                  | 0.2          | 12.67            |
| 7           | M    | 28   | 5                  | 1.3          | 32.23            |
| 8           | M    | 38   | 5                  | 0.2          | 23.32            |
| 9           | M    | 51   | 13                 | 0.3          | 4.21             |
| 10          | M    | 42   | 5                  | 1.2          | 17.45            |
| 11          | M    | 29   | 5                  | 0.5          | 3.96             |
| 12          | M    | 32   | 5                  | 0.4          | 4.87             |
| 13          | M    | 40   | 6                  | 1.2          | 4.01             |
| 14          | F    | 40   | 10                 | 0.2          | 4.98             |
| 15          | M    | 50   | 27                 | 1.5          | 4.23             |
| 16          | M    | 50   | 20                 | 1.4          | 3.71             |
| 17          | M    | 56   | 30                 | 1.5          | 3.98             |
| 18          | M    | 51   | 20                 | 1.6          | 3.87             |
| 19          | F    | 51   | 10                 | 0.1          | 4.26             |
| 20          | M    | 31   | 7                  | 1.6          | 4.67             |
| MEDIA       |      | 43.2 | 12                 | 0.64         | 10.39            |
| MEDIANA     |      | 47.5 | 7.5                | 0.95         | 4.62             |
| DSVESTÁNDAR |      | 9.31 | 8.98               | 0.58         | 9.44             |

\*mSv= unidad de medida de la Radiación Ionizante. \*\*Límites para personal expuesto (<20mSv/año)

Tabla 2. Datos generales del grupo control no expuesto a Rayos X

| INDIVIDUOS   | SEXO | EDAD | TIEMPO DE TRABAJO AÑOS | % DE ADN EN COLA |
|--------------|------|------|------------------------|------------------|
| 1            | F    | 46   | 21                     | 1.43             |
| 2            | M    | 50   | 25                     | 0.89             |
| 3            | M    | 35   | 16                     | 1.23             |
| 4            | F    | 33   | 14                     | 1.63             |
| 5            | M    | 38   | 16                     | 1.43             |
| 6            | M    | 48   | 20                     | 1.33             |
| 7            | M    | 49   | 19                     | 1.01             |
| 8            | F    | 51   | 25                     | 0.93             |
| 9            | F    | 50   | 26                     | 0.84             |
| 10           | M    | 49   | 19                     | 1.53             |
| 11           | M    | 39   | 15                     | 1.43             |
| 12           | M    | 38   | 18                     | 1.14             |
| 13           | M    | 47   | 20                     | 1.07             |
| 14           | M    | 46   | 21                     | 1.35             |
| 15           | M    | 52   | 25                     | 0.97             |
| 16           | F    | 50   | 24                     | 0.57             |
| 17           | F    | 48   | 20                     | 1.32             |
| 18           | M    | 41   | 16                     | 1.53             |
| 19           | F    | 51   | 21                     | 1.24             |
| 20           | M    | 50   | 20                     | 2.38             |
| MEDIA        |      | 45.5 | 20.02                  | 1.26             |
| MEDIANA      |      | 48   | 20                     | 1.28             |
| DVS ESTÁNDAR |      | 5.92 | 3.59                   | 0.38             |

En la figura 1 se muestra la distribución del género de la muestra donde el 25% (n=05) fueron de sexo femenino y el 75% (n=15) del sexo masculino.

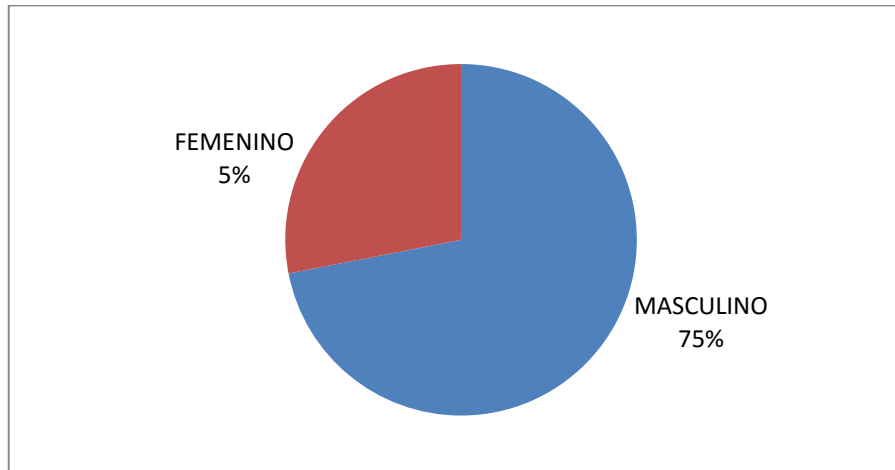


Figura 1. Distribución del género de la población expuesta a los rayos X.

## Evaluación del efecto genotóxico por el ensayo cometa

La tabla 3 se muestra los valores promedio del ensayo cometa del personal expuesto y grupo control (no expuesto). El personal expuesto mostró un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en valores de recuento total en el Nivel 0, Nivel 1 y Nivel 2, en relación con el grupo control en el que no se observó daño.

Tabla 3. Nivel de daño genotóxico en personal expuesto y control por el ensayo cometa

| NIVELES DE DAÑO | DESCRIPCIÓN                                | POBLACION CONTROL (n=20) | PERSONAL EXPUESTO (n=20) |
|-----------------|--|--------------------------|--------------------------|
| NIVEL 0         | CÉLULAS SIN DAÑO (< 5%)                    | 1.26±0.38                | 4.85±2.28                |
| NIVEL 1         | CÉLULAS CON BAJO NIVEL DE DAÑO (5-20%)     | 0                        | 16.43±1.44               |
| NIVEL 2         | CÉLULAS CON MEDIO NIVEL DE DAÑO (20-40%)   | 0                        | 26.77±3.97               |
| NIVEL 3         | CÉLULAS CON ALTO NIVEL DE DAÑO (40-90%)    | 0                        | 0                        |
| NIVEL 4         | CÉLULAS CON MUY ALTO NIVEL DE DAÑO (> 90%) | 0                        | 0                        |
| Recuento total  |  | 0                        | 69.97±1.67               |

\*( $p < 0,05$ , Prueba de U de Mann-Whitney)

En la figura 2 se muestra la magnitud media del % de ADN dañado. El ensayo cometa mostro que el Valor medio de daño en la población no expuesta a radiación solo fue de 1% y la expuesta fue de 10%. Estos últimos tan solo presentan niveles bajos y medios de daño celular (Tabla 3).

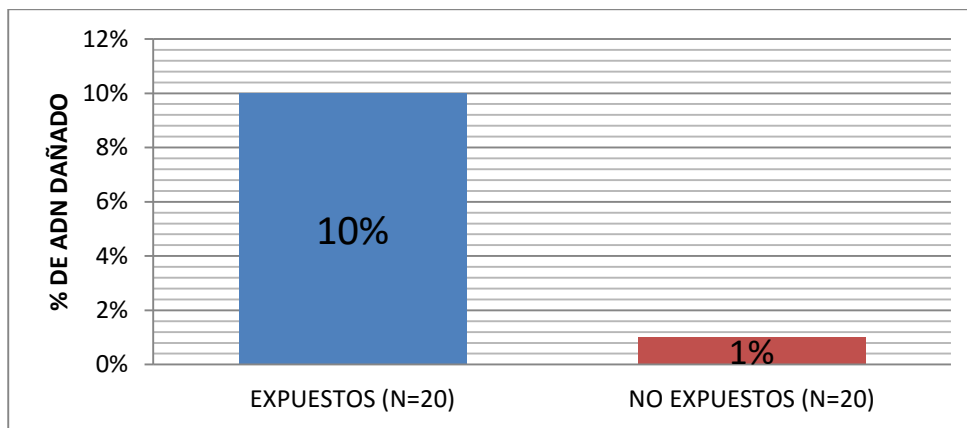


Figura 2. Porcentaje de daño genotóxico medido por el ensayo cometa en la población expuesta y no expuesta a radiación

La tabla 4 se muestra los valores promedio del ensayo cometa del personal expuesto según la edad. El personal expuesto no mostro incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en valores de recuento total en los nivel 0, nivel 1 y nivel 2.

Tabla 4. Daño genotóxico en personal expuesto a rayos X por el ensayo cometa según la edad

| NIVELES DE DAÑO | DESCRIPCIÓN                                | 20-30 AÑOS (n=3)  | MAYOR 31 AÑOS (=17) |
|-----------------|--|-------------------|---------------------|
| NIVEL 0         | CÉLULAS SIN DAÑO (< 5%)                    | 3.96 <sup>1</sup> | 4.92±2.36           |
| NIVEL 1         | CÉLULAS CON BAJO NIVEL DE DAÑO (5-20%)     | 0                 | 16.43±1.44          |
| NIVEL 2         | CÉLULAS CON MEDIO NIVEL DE DAÑO (20-40%)   | 28.34±5.50        | 25.19±2.64          |
| NIVEL 3         | CÉLULAS CON ALTO NIVEL DE DAÑO (40-90%)    | 0                 | 0                   |
| NIVEL 4         | CÉLULAS CON MUY ALTO NIVEL DE DAÑO (> 90%) | 0                 | 0                   |
| Recuento total  |  | 56.86±3.39        | 66.81±5.13          |

<sup>1</sup>El recuento es menor 3 en estos casos. \*(p<0,05, Prueba de U de Mann-Whitney)

En la figura 3 se muestra la magnitud media del % de ADN dañado según la edad. El ensayo cometa mostro que el Valor medio de daño en la población expuesta en las edades de 20-30 años se encuentra en 3.96%(Nivel 0) y 28.3%(Nivel 2) y los de edades de 31 a más años son de Nivel 0, 1 y 2. Estos últimos están solo presentan niveles bajos y medios de daño. (Tabla 4)

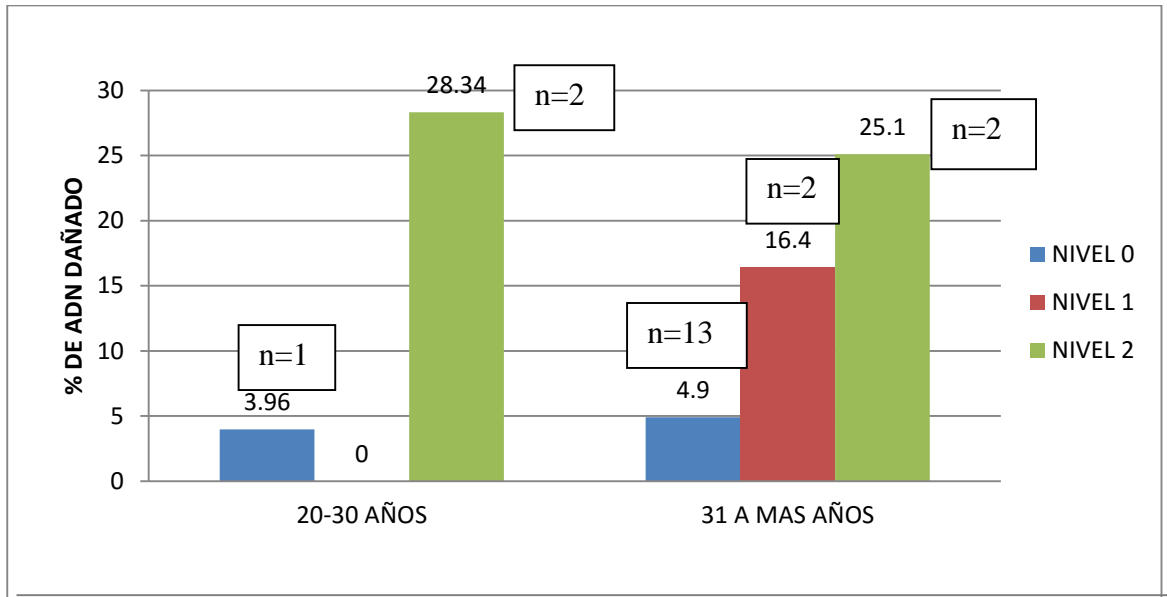


Figura 3. Magnitud media del % de ADN dañado según la edad.

En la figura 4 se muestra que no existe correlación entre la edad y el daño del ADN en el personal expuesto a Rayos X. El personal expuesto no mostró incremento estadísticamente significativo (Coeficiente de correlación -0.12  $p < 0,016$ )

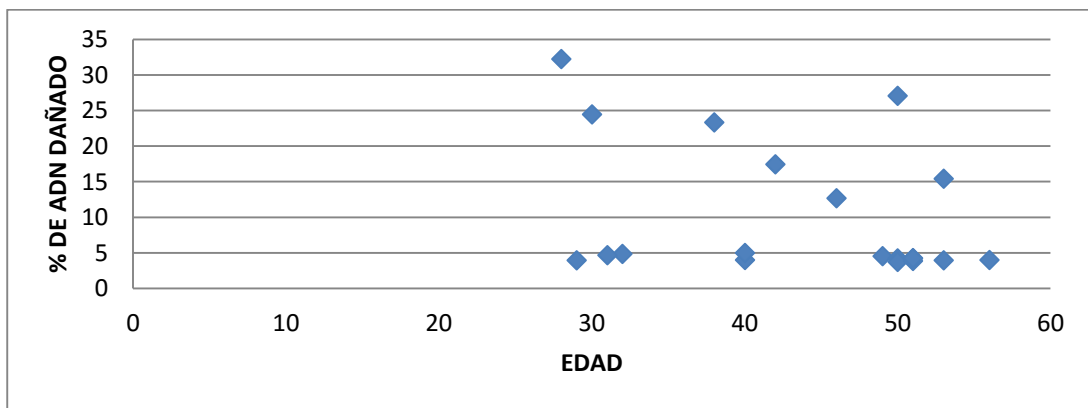


Figura 4. Distribución de la edad y % de daño de ADN en el personal expuesto

En la tabla 5 se muestra el daño genotóxico por el tiempo de exposición en el trabajo. Los individuos entre 2 a 15 años presentaron mayor daño celular (Nivel 1 y 2) así como mayor recuento total ( $69.97 \pm 0.78$ ), en relación con los de más de 16 años de exposición que no se observa daño (Nivel 0).

Tabla 5. Daño genotóxico en personal expuesto a rayos X por el ensayo cometa según el tiempo de exposición

| NIVELES DE DAÑO | DESCRIPCIÓN                                | 2-15 AÑOS (n=14) | MAYOR A 16 AÑOS (n=6) |
|-----------------|--|------------------|-----------------------|
| NIVEL 0         | CÉLULAS SIN DAÑO (< 5%)                    | $5.45 \pm 2.94$  | $4.05 \pm 0.30$       |
| NIVEL 1         | CÉLULAS CON BAJO NIVEL DE DAÑO (5-20%)     | $16.43 \pm 1.44$ | 0                     |
| NIVEL 2         | CÉLULAS CON MEDIO NIVEL DE DAÑO (20-40%)   | $26.77 \pm 3.97$ | 0                     |
| NIVEL 3         | CÉLULAS CON ALTO NIVEL DE DAÑO (40-90%)    | 0                | 0                     |
| NIVEL 4         | CÉLULAS CON MUY ALTO NIVEL DE DAÑO (> 90%) | 0                | 0                     |
| Recuento total  |  | $69.97 \pm 0.78$ | 0                     |

\*( $p < 0,05$ , Prueba de U de Mann-Whitney)

En la figura 5 se muestra la magnitud media del % de ADN dañado por el tiempo de exposición a los Rayos X. El ensayo cometa mostró que el Valor Medio en el tiempo de



2-15 años es de 16.43% (Nivel 1) y 26.77% (Nivel 2). Los expuestos de 16 a más años solo se observó Nivel 0 de daño (4.5%) (Tabla 5).

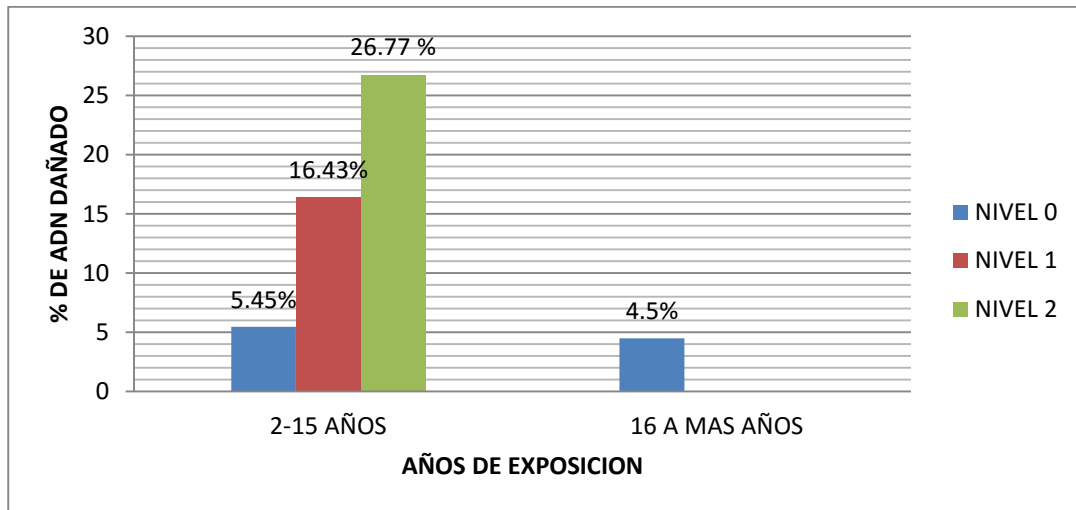


Figura 5. Magnitud media del % de ADN dañado según el tiempo de exposición

En la figura 6 se muestra que existe correlación entre el tiempo de exposición y el daño del ADN. El personal expuesto a más de 16 años de trabajo no mostró incremento estadísticamente significativo, en relación a los expuestos a menor tiempo de trabajo (2-15 años) los que si presentaron un incremento significativo (Coeficiente de correlación - 0.59  $p < 0,016$ ), aunque solo presentan niveles bajos y medios de daño (Tabla 5).

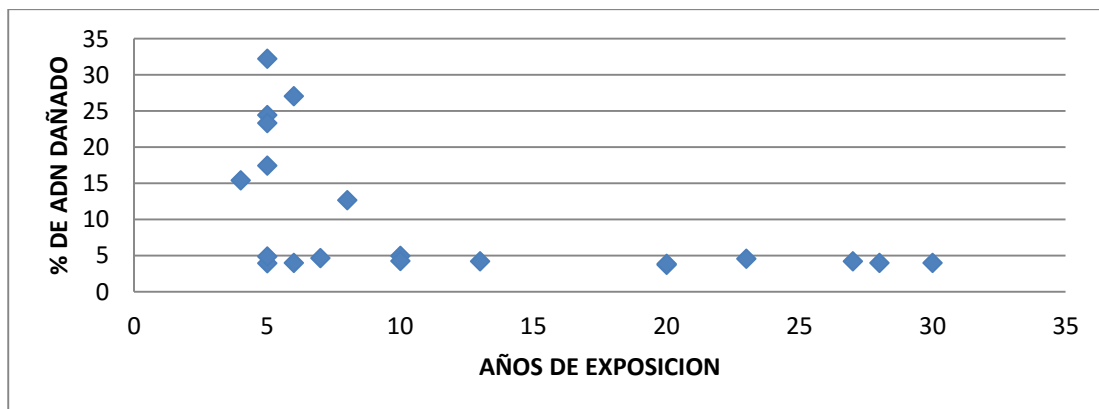


Figura 6. Distribución del % de daño de ADN y el tiempo de exposición.

## DISCUSIÓN

La radiación ionizante (Rayos X) es un agente genotóxico para toda la vida criaturas. Es capaz de causar daño genético incluso a dosis muy bajas, por lo que es necesario evaluar los posibles niveles de daño en el DNA en los individuos expuestos crónicamente a su lugar de empleo.

Es así que los resultados obtenidos nos sugieren que la exposición ocupacional en el personal del Servicio de Radiología mostró un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en valores de recuento total en el Nivel 0, Nivel 1 y Nivel 2, en relación con el grupo control en el que no se observó daño. El ensayo cometa mostró que el Valor medio de daño en la población control solo fue de 1% y la expuesta fue de 10%. Aunque tan solo presentan niveles bajos y medios de daño celular.

A pesar de tener una exposición baja de daño, variable e intermitente, este hallazgo está en concordancia con lo descrito por otros autores de estudios como Baquero et.al. (2004) y Ramírez (2002), en donde las dosis efectivas acumuladas mostraron que la cohorte expuesta presenta valores mayores con relación a la no expuesta, confirmando su exposición a la fuente emisora, es decir al intensificador de imágenes. Sin embargo, los valores encontrados se encuentran dentro de los límites establecidos para personal laboralmente expuesto ( $< 20\text{mSv/año}$ ).

Con respecto a la edad, la población expuesta se encuentra entre 28-53 años con una edad media de 43. El grupo expuesto fue clasificado en 2 grupos de edades: Grupo I (20-30 años) y Grupo II (31 a más años). El personal expuesto no mostró incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en valores de recuento total en los Nivel 0, Nivel 1 y Nivel 2. El ensayo cometa mostró que el Valor medio de daño en la población expuesta en las edades de 20-30 años, se encuentra en 3.96%(Nivel 0) y 28.3%(Nivel 2)

y los de edades de 31 a más años, son de 4.92%(Nivel 0), 16.43%(Nivel 1) y 25.19%(Nivel 2). Los resultados indicaron que no existe correlación entre la edad y el daño del ADN en el personal expuesto a Rayos X (Coeficiente de correlación  $-0.12$   $p<0,016$ ). Estos resultados concuerdan con los estudios de Gadhia et.al. (2004), Guerci et.al. (2006) y Martínez et.al. (2010), que no evidenciaron una relación directa de la edad en los individuos expuestos con la radiación, analizaron la relación de dosis de exposición y presencia de aberraciones en el ADN demostrando que es independiente a la edad, estos resultados también son confirmados por Baquero et.al. (2004), observando que no hubo variación de daño celular por la edad de los individuos expuestos a Radiaciones.

Al analizar el tiempo de exposición a los Rayos X en el personal de Radiología, se encontró que los individuos entre 2 a 15 años presentaron un mayor daño celular (Nivel 1 y 2) así como mayor recuento total ( $69.97\pm 0.78$ ), en relación con los de más de 16 años de exposición, no se observó daño (Nivel 0). El ensayo cometa mostro que lamagnitud media del % de ADN dañado por la exposición a los Rayos X durante el tiempo de 2-15 años fue de 16.43% (Nivel 1) y 26.77% (Nivel 2). Los expuestos de 16 a más años, solo se observó 4.5% de daño (Nivel 0). El personal expuesto a más de 16 años de trabajo no mostró incremento estadísticamente significativo, en relación a los expuestos a menor tiempo de trabajo (2-15 años) los que presentaron un incremento significativo (Coeficiente de correlación  $-0.59$   $p<0,016$ ), aunque solo presentan niveles bajos y medios de daño. Los resultados encontrados coinciden con los estudios que realizaron Munar et.al. (2011), Baquero et.al. (2004) y Zuñiga (2009) sobre aberraciones cromosómicas y los años de exposición a Rayos X en el trabajo, estos coincidieron que el aumento de daño genético estuvo entre 1-10 años de exposición, y que disminuyó en el periodo entre 11-21 años. Esto puede interpretarse como un incremento del daño cromosómico al inicio de la exposición, que disminuye con el tiempo, lo que podría obedecer a una mejora en los mecanismos de reparación celular, como adaptación a la exposición. Aunque autores Cueva et.al. (2008), Muñoz et.al. (2008) y Prieto et.al.

(2006), aseveran que hay un mayor daño pasado los 10 años de exposición en el trabajo, explican que esto se debe a que las dosis son acumulativas, lo que causa un incremento en el número de las aberraciones cromosómicas (daño del ADN). Debido a esta discrepancia se debería realizar en el futuro un seguimiento anual a los individuos expuestos.

## CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos se puede concluir que existe un nivel de daño bajo y medio, causado por la radiación ionizante a nivel genético en las personas que están expuestas ocupacionalmente a bajas dosis de Rayos X.

No se encontró correlación significativa en el personal que está expuesto a los Rayos X en el estudio con relación a la edad y el nivel de

Se encontró que existe una correlación significativa con el tiempo de exposición y el nivel de daño, el cual aumenta en los primeros 15 años de exposición y luego disminuye progresivamente.

El ensayo cometa demostró ser una técnica de fácil aplicación, interpretación y de alta sensibilidad para encontrar daños a nivel del ADN.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Del Cura J, Pedraza S, Gayete A. RADIOLOGIA ESENCIAL. 4ta Ed. Buenos Aires. Argentina. Editorial. Panamericana. 2010. Vol. 1. P. 1-27.

- Sainz C. Tesis Doctoral. Análisis de la influencia in vitro de bajas dosis de radiación producidas por  $^{222}\text{Rn}$  sobre proliferación celular, apoptosis y respuesta a agentes Citotóxicos. Universidad de Cantabria. Santander. España. 2005.
- Touil N, Aka P, Buchet, J, Thierens H, Kirsch M. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagénesis* 2002; 17 (3): 223-232
- Munar C. y Rios Y. Tesis de Grado. Análisis del programa de vigilancia epidemiológica de trabajadores con exposición a radiaciones ionizantes en una IPS de Colombia. Especialidad en salud ocupacional y toxicológica. Universidad Nacional de Colombia. . Bogotá. 2011
- Baquero H, Guevara G, Suarez M., Osorio L. Aberraciones cromosómicas en trabajadores expuestos a radiaciones ionizantes. *Rev. Cienc. Salud* 2004; 2 (1): 8-14.
- Gadhia P, Nehal S, Sweta N, Swati P, Krupa P, Meonis P. and Dipesh T. Cytogenetic Analysis of Radiotherapeutic and Diagnostic Workers Occupationally Exposed to Radiations. *Int J HumGenet* 2004; 4(1): 65-69.
- Muñoz J, López A, Sarmiento I, Herrera C, Sánchez M. Biomonitoring genético de individuos expuestos a radiaciones ionizantes y su relación con el cáncer. *Lab. Genética molecular y Citogenética. UCE* 2008; 18 (1): 75-82
- Prieto M, Moreno M, Nava P, Zapata. Tesis de Grado. Investigación, mediante técnicas de dosimetría biológica, de los efectos sobre la salud por causa de las radiaciones ionizantes de profesionales de líneas aéreas. Estudio poblacional. Hospital General Gregorio Marañón. Universidad Autónoma de Madrid. España. 2006
- Cueva R. Tesis de Maestría. Vigilancia Médica en Trabajadores expuestos a Radiaciones Ionizantes. Fac. de Biología y Ambiente. Universidad San Francisco de Quito. Ecuador. 2008
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp cell Res* 1988; 175 (1): 184-191.

Nevenka K, Davor Ž, Garaj V. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochimica Polonica*. 2006; 53 (2): 321–336.

Larrea P. Tesis de Grado. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. Facultad Farmacia y Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 2007.

Ramírez A. Tercerización del trabajo y sobreexposición a radiación ionizante en postulantes a *services* de minería. UNMSM. Facultad de Medicina. 2002; 63(4):291-300

Arencibia D, Rosario L., Rodríguez Y. Evaluación del daño basal e inducido en el ADN de linfocitos de tres líneas de ratones, mediante el ensayo cometa alcalino. *Biología Aplicada* 2011; 28 (2): 101-105

Collins AR., Oscoz A., Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R . The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 2008; 23(3):51-143

Zuñiga Liliana. Tesis Doctoral. Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en la biomonitorización Humana. Facultad de Biociencias. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 2009.

Santiago L. Helen. Maestría en Salud Ocupacional. Estudio de los daños en el ADN de los Técnicos expuestos a Rayos X. Escuela de Medicina y Homeopatía. Instituto Politécnico Nacional de México D. F. 2010.

Vera Garaj-Vr, DavorZel. Comet assay in the assessment of the human genome damage induced by  $\gamma$ -radiation in vitro. *Radiol Oncol*. 2004; 38 (1): 43-7.

Martínez A, Coleman M, Romero-Talamás CA, Frias S. An assessment of immediate DNA damage to occupationally exposed workers to low dose ionizing radiation by using the comet assay. *Rev. Invest. Clin*. 2010; 62 (1): 23-30.

Sharbel W, Erdtmann B. 2000. Evaluation of Occupational Genotoxic risk in a Brazilian Hospital. *Genet. Mol. Biol*. 2000; 23 (2): 485-488.

Güerci A., Grillo C. Evaluación del efecto genotóxico por exposición crónica a dosis bajas de radiación ionizante a través de un modelo *in vitro*. Revista Radiobiología 2007; 7: 166 – 173.

Güerci A, Zúñiga L, Marcos R. El Valor Predictivo del Ensayo Cometa en la Evaluación de la Radiosensibilidad Individual en Sangre Periférica. Theoria, 2006; 15(2): 41-52.

Ravi K, Santosh M, Ajay K. Assessment of DNA Damage by Comet Assay in Lymphocytes of Workers Occupationally Exposed to Petroleum fumes. International Journal of Genetics 2010; 2 (1): 18-22.

Donggeun S, Doyoung L, Hosub I, Eunha O., Jooja K., Eunil L. Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. Toxicology Letters.2002; 134: 87-95.

Ramírez V., Cuenca P. DNA damage in female workers exposed to pesticidas in banana plantations al Limón, Costa Rica. Rev Biol. Trop. 2002; 50: 507-518.

Cho JA, Oh E, Lee E, Sul D . 2003. Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes. J. OccupHealth 2003; 45: 376-381.

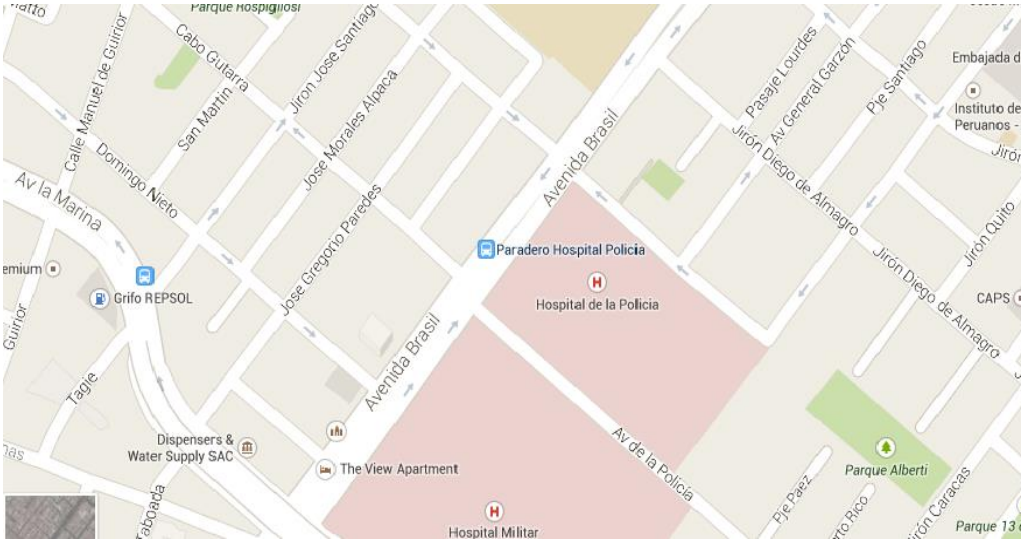
Gonzales J, Gámez R, Rodeiro I, García H. Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas SpragueDawley empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo Cometa). Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2004; 35 (2): 125-127.

Arencibia D, Rosario L, Suarez E, Soroa Y. 2010. Protocolo de ensayo cometa a partir de espermatozoides de epidídimos de roedores. Revista de Toxicología Retel. 2010; 29: 38-50.

## ANEXOS



# ANEXO 1. Ubicación Geográfica del Hospital Nacional LUIS N.SAENZ PNP



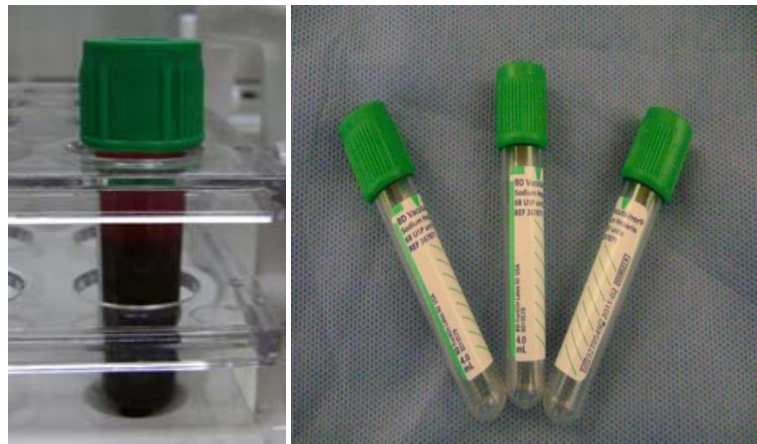
Ubicación en el Distrito de Pueblo Libre, Lima-Perú



ANEXO 2. Equipo de Rayos X de la Institución.



### ANEXO 3. Toma de muestra de sangre al personal de radiología



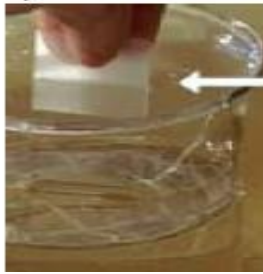
Toma de muestra de sangre en tubos con Heparina



## ANEXO 4. Diagrama del proceso de las muestras para el ensayo cometa.



1. Preparación de reactivos



2. Preparación de láminas con agar



3. Obtención de linfocitos con Percoll



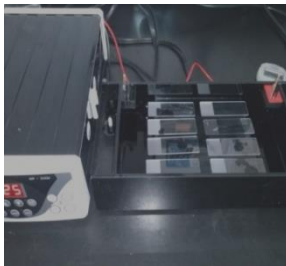
4. Cargado de las muestras



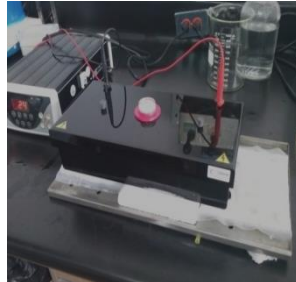
5. Montaje de células en agar



6. Lisis celular a 4°C-1h-24h



7. Desenrollamiento de ADN 4°C-20min



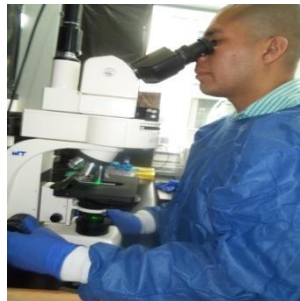
8. Electroforesis 20min-25v-300mA-4°C



9. Neutralización 3vcs-5min-4°C



10. Tinción con bromuro de etidio



11. Visualización en microscopio de Fluorescencia



12. Análisis de las imágenes por Software Komet 4.

## ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO

|                          |
|--------------------------|
| <b>CODIGO DE MUESTRA</b> |
|--------------------------|

Estimado participante. Soy Bachiller de Biología Walter INFANTES VIZCARRA, graduado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma. Como parte de los requisitos para la obtención de mi Título Profesional llevaré a cabo una investigación. La misma que trata sobre: “Evaluación del efecto genotóxico en trabajadores expuestos a Rayos X en el Hospital Nacional Luis N.

Sáenz PNP”.

Para cumplir con el objetivo propuesto, como primer paso deseo su CONSENTIMIENTO para el desarrollo de este estudio, que le tomará aproximadamente 5 minutos, el cual constará la información que Ud., proporcionará: Edad, Sexo y Tiempo que labora en el Servicio de Radiología. Finalmente se realizará un ensayo genético, orientado a identificar el efecto genotóxico de los Rayos X en células linfocitarias; esta prueba requiere la toma de una muestra de sangre periférica, en una sola vez. Esta muestra de sangre por usted aportada en forma voluntaria se utilizará únicamente con propósitos netamente científicos durante esta investigación.

Este estudio está regido por las normas de ética en investigación dictadas por el Estado Peruano en la Ley N. ° 26842 Ley del Ministerio de Salud y Ley N. ° 28303 Ley Marco de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica, que tiene como uno de sus objetivos funcionales Desarrollar y difundir la Investigación Científica y Tecnológica en Salud en el Ámbito Nacional.

Yo.....  
identificado con documento de identidad CIP o DNI N°.....  
EDAD.....SEXO..... Tiempo de Servicio en el Área..... acepto  
participar en este estudio y hago constar que se me ha explicado claramente y entiendo  
el carácter del mismo, además se me ha explicado que puedo renunciar a la misma.

.....

FIRMA DEL PARTICIPANTE

.....

FIRMA DEL INVESTIGADOR