
**Evaluación genotóxica por el test
de micronúcleos y el ensayo del
cometa en estudiantes de
odontología expuestos a rayos X
durante las radiografías dentarias**

**Deidamia Franco de Diana
y col.**

Ayudas a la investigación 2010

Investigador Principal

Deidamia Franco de Diana

Directora del Departamento de Ciencias Básicas
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Católica "Nuestra Señora de la Asunción" Campus Asunción

Equipo Investigador

Celeste Vega

Docente investigadora de la Carrera Medicina
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Católica "Nuestra Señora de la Asunción"
Directora del Centro para el desarrollo de la investigación científica (CEDIC)

Jaime Alfredo Segovia Abreu

Docente investigadora de la Carrera Medicina
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Católica "Nuestra Señora de la Asunción"

Diana Patrizia Castiglioni Serafini

Docente investigadora de la Carrera Medicina
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Católica "Nuestra Señora de la Asunción"

Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS Y ALCANCE	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	5
2.3. Impacto de los resultados de la investigación	5
3. METODOLOGÍA	5
3.1. Diseño metodológico del estudio	5
3.2. Universo y/o población de estudio	5
3.3. Criterios de inclusión y exclusión	5
3.4. Técnicas de instrumentos de recolección de datos	5
3.5. Análisis estadístico	6
4. RESULTADOS	7
4.1. Caracterización demográfica de las poblaciones estudiadas	7
4.2. Evaluación de efecto genotóxico a través del Test de Micronúcleos en mucosa bucal	7
4.3. Evaluación de efecto genotóxico por el ensayo del cometa	11
5. DISCUSIÓN	13
6. CONCLUSIONES	14
7. AGRADECIMIENTOS	14
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
9. ANEXOS	16
9.1. Encuesta	16
9.2. Cronograma de actividades programa de prevención y radioprotección	17

RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

A los efectos de determinar si la exposición crónica a rayos X durante la práctica clínica diagnóstica, que realizan los estudiantes de Odontología como parte de su formación académica, produce daño genético, se realizó esta investigación.

Para el efecto se desarrollaron dos bioensayos: el test de Micronúcleos en células de la mucosa bucal, que es un bioensayo que permite evaluar efectos clastogénicos como aneugénicos y otras anormalidades del núcleo que pueden ser utilizadas como marcadores de daño celular y el ensayo de electroforesis de células individuales o del Cometa, en muestras de sangre periférica, que determina el daño a la cadena simple o a la doble cadena del ADN.

Se analizaron dos cohortes una expuesta y otra control de estudiantes de la carrera universitaria de Odontología, correspondiendo a la expuesta, estudiantes del último año de la carrera, que realizan placas radiográficas a los pacientes que asisten a las clínicas, durante un periodo de exposición crónica de tres años. La cohorte control se caracterizó por estudiantes de los primeros años de la carrera que no están expuestos a rayos X.

Los resultados mostraron un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos ($p < 0.05$) y de células en apoptosis y otras anormalidades del núcleo como cariorrexis, cromatina condensada, broken eggs y picnosis, en células de la mucosabucal de los estudiantes expuestos crónicamente a la radiación emitida por los equipos de rayos X, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la medición del daño en el ADN, medido por el ensayo del Cometa, comparados con la población control, lo cual indica efecto citotóxico en células de la mucosa bucal y un daño mínimo al ADN en células de sangre periférica. Estos hallazgos confirman además, la utilidad de los bioensayos de Micronúcleos en mucosa bucal y del Cometa, en sangre periférica, de estudios de biomonitorio humano para evaluar genotoxicidad, y sugieren la necesidad de realizar biomonitoreos en otras poblaciones expuestas a dosis subtóxicas y en forma crónica a rayos X.

Como un aporte de este trabajo éste equipo de investigación, ha realizado un programa de concienciación de los cuidados a tener en cuenta para la exposición y manipuleo de equipo de rayos X, que será puesto en marcha a inicios del año académico 2012.

Palabras claves: micronucleos en mucosa – placas radiográficas – citotoxicidad – apoptosis- ensayo del cometa.

1. INTRODUCCIÓN

El principal efecto de las radiaciones ionizantes es sobre la molécula de ADN, y los efectos que tiene están relacionados a las dosis y el tiempo de exposición. Si se considera que cualquier dosis por pequeña que sea conlleva un riesgo, las dosis deben de reducirse a valores tan

bajos como sea posible. Sin embargo, es importante tener en cuenta el tiempo de exposición en forma crónica, al que se exponen trabajadores y personas en formación profesional, como estudiantes de carrera del área de la Salud y que la radiosensibilidad puede variar de un individuo a otro dependiendo de la edad, sexo y tipo de exposición (Mi-Young, 2002).

Las exposiciones a rayos X durante la radiografía panorámica en pacientes adultos y en niños, induce efectos genotóxicos en células gingivales, incrementando el daño cromosómico y la muerte celular. Por consiguiente, estas radiografías panorámicas dentales, deberían ser requeridas solo cuando fuese muy necesario ya que no puede ser considerado como un procedimiento de bajo o ningún riesgo (Cerqueira et/al 2008; Antonio, E. 2011).

Tolbert y colaboradores, 1992 sugieren la utilización del test de micronúcleos, como una herramienta para evaluar efecto genotóxico, ya que se originan por roturas de cromosomas, o por divisiones mitóticas anormales y para detectar otras anormalidades nucleares atípicas como picnosis, cariorrexis, cariolisis, que son indicadores de daño celular (Serto,1987) (Bonassi et al 2001).

Otro de los ensayos útiles para la detección de daño en la cadena del ADN es la electroforesis de una sola célula o ensayo del cometa, que permite evaluar los niveles de daño en la cadena simple y doble del ADN, en poblaciones celulares sin necesidad de estudios de proliferación y es una herramienta potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido por diferentes tóxicos en el sitio de acción de los mismos Mudry, (2006).

En Paraguay tanto los profesionales como estudiantes de la carrera de Odontología se encuentran expuestos con frecuencia durante las prácticas de diagnóstico por imágenes, a radiaciones, sin ningún tipo de protección, ya que este hábito de bioseguridad de radioprotección no es practicado estrictamente a este nivel, a pesar de la existencia de normas y legislaciones que regulan este tipo de actividad. Considerando esto, hemos analizado Micronucleos en células de la mucosa bucal y en muestras de sangre periférica daño en el ADN mediante el ensayo del Cometa, de estudiantes de la Carrera de Odontología, quienes están expuestos a dosis bajas de rayos X en forma crónica.

2. OBJETIVOS Y ALCANCE

La investigación se basa en la Hipótesis que la exposición crónica a rayos X emitidos durante la realización de radiografías dentarias tiene efecto genotóxico en estudiantes de la Carrera de Odontología con lo que aumentaría el riesgo de acumular las lesiones al ADN y el riesgo de ser susceptibles a desarrollar algún tipo de cáncer con el tiempo.

2.1. Objetivo General

- Determinar el efecto genotóxico de la exposición a rayos X durante las radiografías dentaria en estudiantes de Odontología.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la frecuencia de micronúcleos en células epiteliales de la mucosa bucal de estudiantes de Odontología expuestos a la radiación de rayos X.
- Determinar el daño en el ADN mediante la Técnica del Cometa en estudiantes de Odontología expuestos a rayos X.
- Elaborar un programa de prevención y radioprotección entre los estudiantes de Odontología expuestos a radiación de rayos X.

2.3. Impacto de los resultados de la investigación

Los resultados demuestran un efecto citotóxico y niveles bajos de daño en el ADN a una dosis subtóxica y a una exposición crónica, por lo que amerita un control periódico de la población a través de un biomonitorio, a los efectos de evaluar el nivel de daño genético y la ejecución del programa de prevención y radioprotección, que se realizará en las Facultades de Odontología de diferentes Universidades.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño metodológico del estudio

El diseño de la investigación corresponde a un estudio observacional analítico de corte transversal, de cohortes de expuestos y no expuestos con variables predictivas dicotómicas y resultantes cuantitativas. Este estudio brindará datos que permitirá comparar el daño genético por exposición en ambos grupos.

3.2. Universo y/o población de estudio

Población enfocada

Estudiantes de la carrera de odontología que se encontraban cursando las materias clínicas y que realizaban diagnósticos por radiografías.

Población accesible

Alumnos sin distinción de sexos que cursaban materias clínicas de la carrera de odontología de la Universidad Autónoma del Paraguay, que estuvieron expuestos a radiaciones ionizantes causadas por la toma de radiografías a pacientes de la clínica odontológica durante por lo menos tres años.

3.3. Criterios de inclusión y exclusión

Población expuesta

Criterios de inclusión

Estudiantes de ambos sexos cuyas edades estuvieron comprendidas entre 24 y 29 años, que estuvieron expuestos a radiaciones de Rayos X. producidas por los equipos radiográficos en las salas de la clínicas odontológicas

asistenciales y que accedieron a participar del trabajo y a responder el cuestionario.

Criterios de exclusión

Individuos de ambos sexos cuyas edades no estuvieron comprendidas entre 24 y 29 años, que no hayan estado expuestos ocupacionalmente a radiaciones ionizantes emitidas por los aparatos de rayos X.

Individuos que hayan estado expuestos durante tres semanas previas al trabajo a radiaciones, o que hayan consumido medicamentos, o alcohol, que no desearon participar del proyecto y no respondieron a la encuesta.

Población no expuesta

Criterios de inclusión

Estudiantes de la carrera de Odontología de cursos inferiores que no hayan participado de prácticas de diagnóstico por imágenes y que no realizaron radiografías, cuyas edades estuvieron comprendidas entre 18 y 20 años, que accedieron a participar del estudio y a responder al cuestionario.

Criterios de exclusión

Estudiantes de la Carrera de Odontología que hayan estado expuestos a rayos X, ya sea como parte de su formación o por otro motivo. Que hayan recibido tratamiento radioterápico o de quimioterapia. y que no desearon participar del estudio y no respondieron al cuestionario.

3.4. Técnicas de instrumentos de recolección de datos

Previo a la toma de muestra se aplicó una encuesta de carácter confidencial a individuos expuestos y no expuestos de manera a correlacionar los datos obtenidos de cada participante. En la misma se recabaron datos como la edad, curso, tiempo de exposición en horas, etc. (anexo 1).

Análisis Genotóxico

Se evaluó el efecto genotóxico mediante dos bioensayos el test de micronúcleos en células de la mucosa bucal y el ensayo del cometa.

Las muestras de mucosa bucal y de sangre periférica de cada individuo tanto de la población control como de la expuesta, se tomaron en forma simultánea durante los meses de junio a octubre.

Análisis de micronúcleos en células exfoliadas de mucosa bucal

Se obtuvo una muestra de células de la mucosa bucal, mediante un raspado de la cara interna de la mejilla con un baja lengua, con el cual se realizó un extendido en la lámina portaobjeto. Las muestras fueron fijadas con metanol / ac. Acético (3:1) y se colorearon con la técnica de Feulgen, la observación al microscopio se realizó mediante la utilización de filtros especiales para contrastar el citoplasma, se con-

taron 2000 células por individuo y se determinó la frecuencia de micronúcleos en ambas poblaciones, la control y la expuesta, según Tolbert, (1992) (Fenech, 1999).

Test del cometa para medir daño en el ADN

La técnica del ensayo del cometa se realizó según Singh et al (1988) y con pequeñas modificaciones(Singh,1994) y consideraciones de optimización. (Zuñiga 2009). Se obtuvieron 2µl de sangre periférica del dedo anular de cada uno de los participantes, las muestras fueron suspendidas en 0,5 % de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y pipeteadas en portaobjeto que previamente fueron cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1% y llevados a 4°C por 10 minutos y luego se sumergieron en buffer de lisis (2,5M NaCl, 100 µm Na2EDTA, 10 µm Tris- Hcl Ph 10,1, Triton – X – 100 y 10 % DMSO), por 1 hora a 4 °C en oscuridad, a los efectos de provocar la lisis y la des compactación del ADN. Posteriormente los portaobjetos fueron expuestos a buffer alcalino (1 mM Na2EDTA, 300mM NAOH buffer) Ph >13 por 20 minutos para degradar el ADN.

Cada uno de los portaobjetos fueron sometidos a electroforesis por 20 minutos a 25 V y 300 m A, en el mismo buffer, y posteriormente se lavaron con buffer 0,4 Try -Hcl (Ph 7, 5), para eliminar el exceso de álcali y remover los detergentes. La fijación de las muestras se realizaron alcohol p.a y las láminas finalmente fueron teñidas con Bromuro de etidio (10µg/ml). Se examinaron las láminas bajo microscopio de fluorescencia con un aumento de 400X.

Se evaluaron 100 células por placa, y la evaluación se realizó por registro visual y a través del software casp lab Comet Assay free (<http://casp-lab-comet-assay-software>).

Evaluación por registro visual

Se realizó según los criterios de Speit (1995) y Collins (2004) donde las células se clasifican teniendo en cuenta que a mayor descarga de ADN polifragmentado fuera del núcleo, mayor es el daño genotóxico. Para cuantificar el daño al ADN se establece una categoría de daño a las células basadas en el largo del cometa:

Categoría 0: células sin daño (5µm).

Categoría I: células con bajo nivel de daño 5 - 20 µm.

Categoría II: células con medio nivel de daño entre 20 y 40 µm).

Categoría III: células con alto nivel de daño entre 40 y 95 µm).

Categoría IV: células totalmente dañadas superior a 95 µm. Una vez establecido el porcentaje de células en cada categoría se calculó el índice de daño (N), por cada muestra de individuo:

$$N = N^{\circ} \text{ Cél Cat I} + 2XN^{\circ} \text{ Cél.Cat II} + 3XN^{\circ} \text{ Cél. Cat III} + 4 X N^{\circ} \text{ de Cel. Cat IV.}$$

Evaluación por el software Casp lab Comet assay IV

Se obtuvieron valores de momento de la cola (tail moment) que permite medir el porcentaje de ADN en la cola del

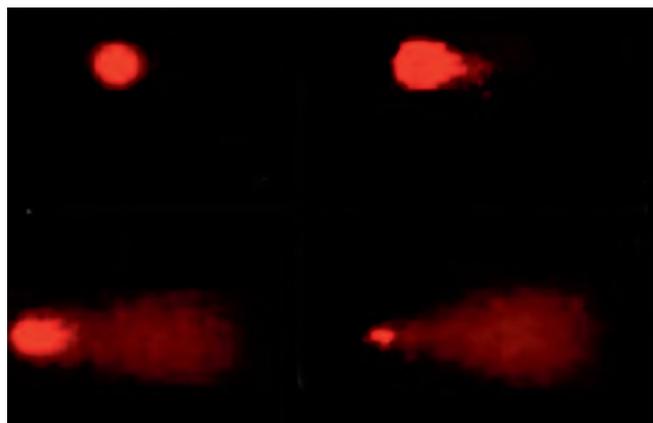


Figura 1. Categorías 0,II, III y IV de daño celular según el criterio de Speit (1995) y Collins (2004).

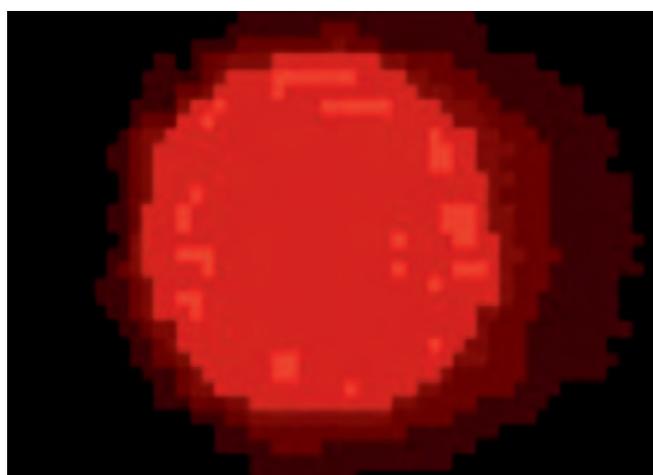


Figura 2. Categoría I de daño celular según el criterio de Speit (1995) y Collins (2004).

cometa y momento olive (tail moment olive) que describe la heterogeneidad de la respuesta dentro de una población celular ya que calcula las variaciones de la distribución de ADN dentro de la cola, se mide en µm.

7.4 Variables

- Predictiva: Estudiantes expuestos
Estudiantes no expuestos
- Resultante: Frecuencia de Micronucleos y longitud de la cola del cometas Hipótesis.

HA Aumenta la frecuencia de MN en individuos expuestos.

H0 No hay aumento de Frecuencia de MN en individuos expuestos.

HA: Existe mayor daño en el ADN en los individuos expuestos.

H0: No hay daño en el ADN en los individuos expuestos.

3.5. Análisis estadístico

Para el Análisis Exploratorio de los Datos de Micronúcleos en Células de la Mucosa Bucal para el Grupo de Control

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES (en meses) (Diagrama de Gantt)

ACTIVIDAD	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Entrenamiento en laboratorio externo para ajuste de la técnica	■											
Ajuste de las técnica		■	■									
Toma de muestra para MN y para técnica del Cometa y aplicación de la encuesta				■	■	■						
Evaluación de las muestras						■	■	■				
Análisis y discusión de resultados									■	■		
Elaboración de informe											■	

(n=31) y el Grupo Expuestos (n=30) se utilizó el paquete estadístico SPSS. Y los resultados fueron analizados estadísticamente por la prueba "t" de students y se aplicó además la prueba no paranéfrica U de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis.

Para el análisis de daño en el ADN por el ensayo del Cometa se analizó mediante la prueba de comparación de medias U de Mann-Whitney para dos muestras independientes de los datos de daño en el ADN y valores del momento de la cola (tail momento) y momento Olive (tail momento Olive).

Se consideraron estadísticamente significativos los valores < 0.005.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización demográfica de las poblaciones estudiadas

Población control o no expuesta

Alumnos estudiantes de Odontología, de edades comprendidas entre 18 y 20 años, cursando el primer año de la carrera. El 84% de la población es femenina (25/31) y el 16% (5/31) masculina.

El 43,3% (13/31) de la población presenta antecedentes familiares con algún tipo de cáncer, ya sea pulmón, próstata, útero y mayoritariamente de mama. El grado de parentesco reportado fue en abuelos y abuelas, tías y

madre. El 40% de la población analizada es consumidora casual de alcohol.

Población expuesta

La población expuesta consiste en 30 estudiantes de la Carrera de Odontología que actualmente se encuentran cursando el sexto año de la carrera cuyas edades se encuentran comprendida entre 23 y 29 años, el 83% de la población es femenina (25/30) y el 17% (5/30) masculina, el 56,7% de la población analizada es consumidora de alcohol en forma moderada.

El 26,7% (8/30) de la población presenta antecedentes familiares con algún tipo de cáncer, ya sea huesos, próstata, mamas y mayoritariamente de colon. El grado de parentesco reportado fue en abuelos, tías y padre.

Todos los encuestados reportan trabajar hace al menos 3 años en la sala de Rayos X, e l 100% de los encuestados no utiliza ningún tipo de protección contra los Rayos X. En la tabla 1 pueden apreciarse los datos demográficos más resaltantes dela población estudiada.

4.2. Evaluación de efecto genotóxico a través del Test de Micronúcleos en mucosa bucal

En la tabla 2 puede apreciarse las frecuencias de micronúcleos determinadas en la población no expuesta y algunas anomalías nucleares. En la tabla 3 se muestran los valores para la frecuencia de micrónúcleos y anomalías

Tabla 1. Caracterización de la población estudiada.

Características demográficas y clínicas	Población expuesta	No expuesta
Sexo	80% (24/30) femenino 20% (6 /30) masculino	84% (25/31) femenino 16% (5/31) masculino
Edad	23 – 29 años	17 – 20 años
Consumo casual de alcohol	56,7%	40%
Antecedentes familiares de cáncer	26,7%	43,3%
Tiempo de exposición a rayos X por radiografías dentarias	3 años	No se expone

Tabla 2. Frecuencia de micronucleos y anomalías nucleares en células de población no expuesta (control).

Estudiante Nº	edad	sexo	MN/2000 células	Anormalidades nucleares					
				BN	Cariolisis	cariorrexis	Broken Eggs	Cromatina condensada	picnosis
1	18	F	2					1	1
2	19	F	1					0	2
3	19	F	4					1	0
4	18	F	1	2	2	4		1	0
5	19	F	4					2	1
7	18	F	0					0	0
8	17	F	0	2				0	0
9	18	M	0					0	1
10	18	F	2					0	0
11	18	F	1				2	1	0
12	18	F	0					0	0
13	18	F	2	2			6	0	0
14	19	F	3	0	1	2	3	0	0
15	20	M	1					0	1
16	19	F	9			35	15	1	1
17	18	M	2	5			6	0	0
18	18	F	1					0	0
19	19	F	4			3		0	0
20	19	F	0	1	1		6	0	0
21	19	F	2				5	1	1
22	18	F	1				2	0	1
23	19	F	2					1	0
24	19	F	0		12		9	0	1
25	19	M	5				2	0	0
26	18	M	0					2	1
27	19	F	3					0	1
28	20	F	0				1	0	2
29	19	F	2					1	0
30	18	F	0					0	0
31	20	F	0		3		4	0	1
		Medias	1,68	0,39	0,61	1,42	2,06	0,37	0,48
		Desv. típ.	1,99	1,05	2,216	6,302	3,434	0,6	0,63

*BN = bi nucleada.

nucleares en la población expuesta. Mientras que la tabla 4 compara los promedios de frecuencias de micronucleos en ambas poblaciones, $1,68 \pm 1,99$ para la población control y $6,67 \pm 5,2$, para la expuesta y anomalías nucleares. Al aplicar la prueba de t student y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para el contraste de hipótesis, se obtuvo el valor de $p=0,006$, considerándose como valores significativos a aquellos que se encuentren por debajo de 0,05. Por lo que la diferencia de frecuencia de micronucleos entre

ambas poblaciones es significativa, lo que permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la alternativa. Las anomalías nucleares como picnosis, cariorrexis, y cromatina condensada también se tomaron como parámetros de evaluación genotóxica y citotóxica.

Los gráficos 1 y 2 muestran las medias de las frecuencias de micronucleos en poblaciones no expuestas y expuestas respectivamente, siendo mayor en la población expuesta.

Tabla 3. Frecuencia de micronucleos y anomalías nucleares en células de población expuesta.

Estudiante Nº	edad	sexo	MN/2000 células	Anormalidades nucleares					
				BN	Cariolisis	cariorrexis	Broken Eggs	Cromatina condensada	picnosis
1	24	F	6	6	2	1	10	1	1
2	25	F	0	0	8	16	10	1	2
3	27	F	0	6	2	28	5	4	4
4	27	F	6	14	12	20	7	10	8
5	25	F	4	14	10	24	12	1	12
6	24	F	6	10	6	32	7	2	2
7	24	F	6	2	1	16	4	2	1
8	23	F	6	12	6	20	12	1	8
9	24	F	4	10	12	36	24	4	2
10	37	M	12	6	6	35	12	1	2
11	24	F	10	12	12	2	2	1	2
12	24	F	6	4	10	14	28	8	12
13	24	F	0	6	1	1	1	1	2
14	24	F	8	4	8	8	6	5	8
15	24	M	26	4	4	4	8	4	12
16	24	F	6	1	1	6	2	1	0
17	24	F	8	1	1	1	10	1	1
18	27	F	6	0	1	6	4	0	0
19	24	F	4	0	1	2	7	1	1
20	24	F	16	0	1	1	12	0	1
21	24	F	0	0	1	1	1	1	1
22	24	F	10	0	1	2	2	0	0
23	26	F	2	1	1	4	5	1	0
24	29	F	6	4	1	1	4	0	1
25	25	F	4	0	0	1	4	1	2
26	24	F	2	0	2	2	6	0	0
27	24	F	12	10	10	36	12	4	8
28	25	M	8	6	15	20	26	2	10
29	25	F	10	6	10	30	18	1	1
30	26	M	6	10	12	28	22	5	0
		Media	6,67	4,97	5,27	13,27	9,43	2,13	3,47
		Desv. típ.	5,287	4,65	4,712	12,736	7,44	2,403	4,066

*BN = binucleada
MN =micronúcleos

La gráfica 3 indica comparativamente el promedio de anomalías nucleares entre la población expuesta y no expuesta, observándose un aumento en las medias de los individuos expuestos, considerando la picnosis, cariorrexis, la cromatina condensada. como figuras características de células en apoptosis y las binucleadas y broken eggs.

como figuras características de efecto genotóxico. En las fig. 3 y 4 pueden observarse células de la mucosa bucal teñidas con la técnica de feulgen a un aumento de 1000 x con micronucleo y sin micronúcleo respectivamente, mientras que las fig. 5 y 6 se aprecian anomalías nucleares como binucleadas y células con cariorrexis apoptótica.

Tabla 4. Comparación de promedios de frecuencias de MN y anomalías nucleares en poblaciones expuestas y no expuestas (control).

	Población no expuesta	Población expuesta
micro nucleos/2000 células	1,68	6,67
binucleadas	0,39	4,97
cariolisis	0,61	5,27
cariorrexis	1,42	13,27
broken eggs	2,06	9,43
Cromatina condensada	0,37	2,13
picnosis	0,48	3,47

Valor de P < 0.006 para Frecuencia de MN.

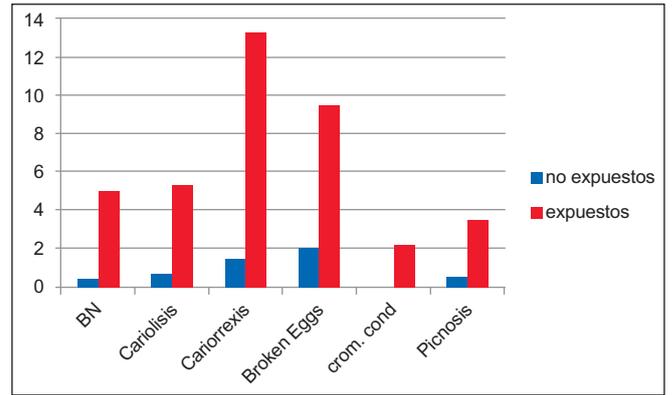


Gráfico 3. Anormalidades nucleares en poblaciones expuestas y no expuestas.

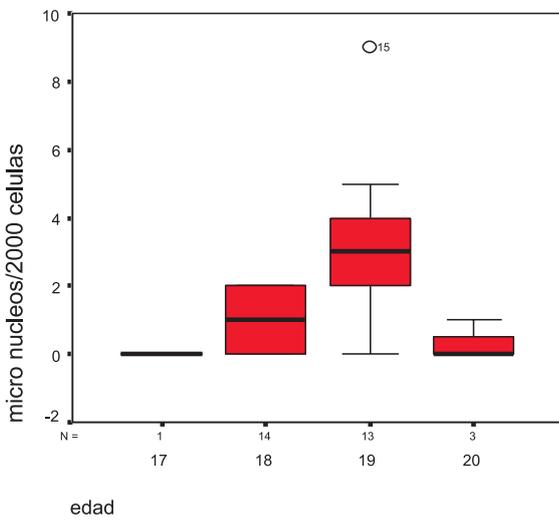


Gráfico 1. Diagrama de cajas de Micronúcleos/2000 células grupo control (no expuesto) distribuido por edades.

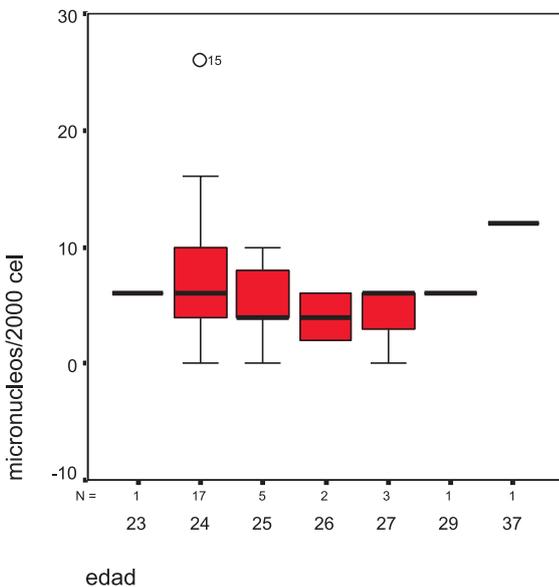


Gráfico 2. Diagrama de cajas de frecuencia de micronucleos en células de la población expuesta distribuido por edades.

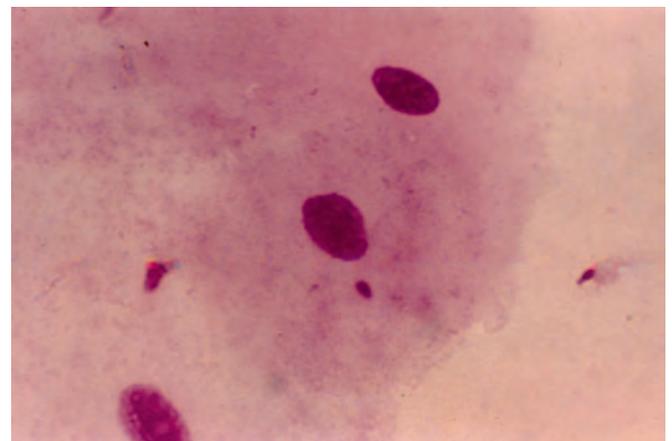


Figura 3. Células de la mucosa bucal con micronúcleo. Tinción Feulgen 1000x.

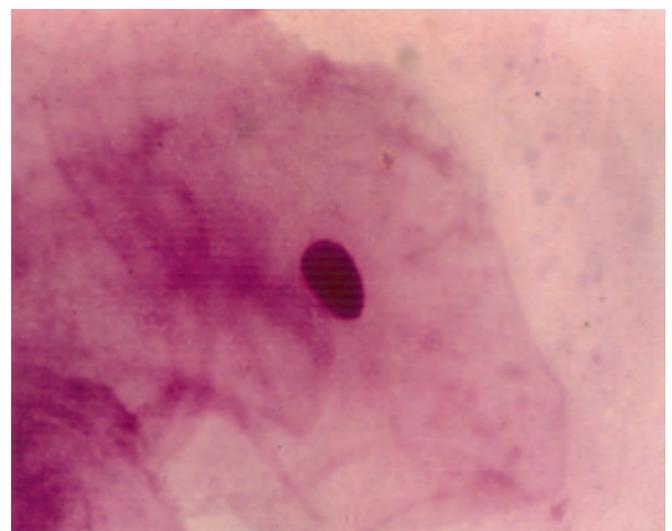


Figura 4. Células de la mucosa bucal sin micronúcleo. Tinción Feulgen 1000x.

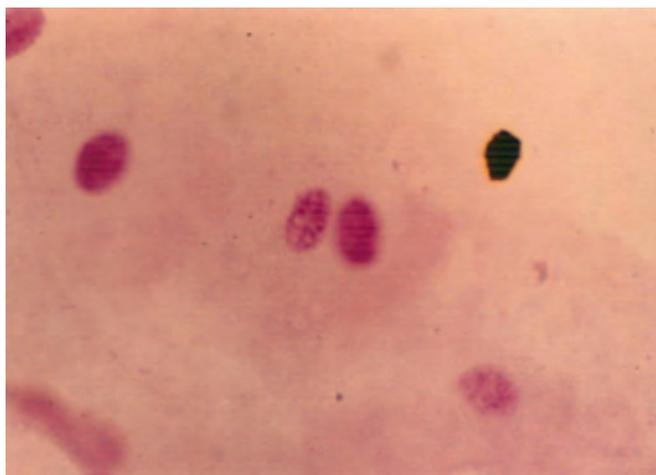


Figura 5. Célula de la mucosa bucal binucleada. Tinción Feulgen 1000x.

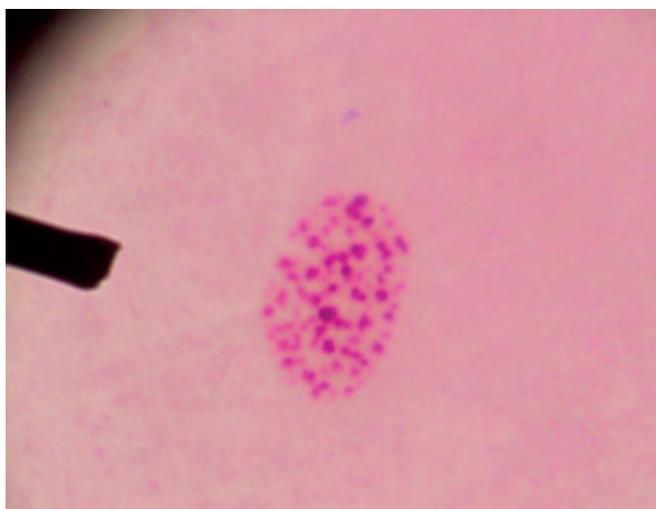


Figura 6. Célula de la mucosa bucal con cariorrexis apoptótica. Tinción Feulgen 1000x.

4.3. Evaluación de efecto genotóxico por el ensayo del cometa

Mediante registro visual

La tabla 5 muestra valores para las medias de porcentaje de células con diferentes niveles de daño celular en base al criterio de Speit (1995) y Collins (2004) (figuras 1 y 2), en la tabla se puede apreciar un aumento de los mismos para el nivel I (fig. 10), en la población expuesta comparada con la no expuesta. Sin embargo los valores obtenidos para los niveles II, III y IV no son significativos según la comparación de medias "t" de student y la prueba no paramétrica de U Mann Whitney, para muestras independientes que dio un valor de $p = 0.006$ menor a 0.05, para nivel I por lo que se consideró estadísticamente significativo, y valores superiores a 0,05 en las demás categorías. En la gráfica 4 se pueden apreciar los valores para los niveles I, II, III y IV en ambas poblaciones, haciéndose evidente el aumento significativo de daño de nivel I, en la población expuesta. El cálculo para índice de daño ($N = N^{\circ} \text{ Cél. Cat I} + 2 \times N^{\circ} \text{ Cél. Cat II} + 3 \times N^{\circ} \text{ Cél. Cat III} + 4 \times N^{\circ} \text{ de Cel. Cat IV.}$) fue de 37,8 para la población expuesta y 3,4 para la población no expuesta, con una diferencia significativa ($p < 0.05$) según la prueba de U Mann Whitney. Estos valores indican que en la población expuesta el índice de daño celular es bajo, por el predominio de células con daño nivel I. Las fig. 7, 8 y 9 muestran células sin daño y con niveles de daño I y II, respectivamente.

Con la técnica del Cometa es posible valorar la viabilidad celular por el porcentaje de viabilidad celular, determinando la frecuencia de células en apoptosis, (fig. 10). La tabla 6 indica los valores medios obtenidos de células en apoptosis de poblaciones no expuestas (22,6%) y expuestas (47,9%) mediante la determinación visual (fig. 10). La gráfica 5 muestra los valores células en apoptosis en ambas poblaciones.

Tabla 5. Niveles de daño celular según el criterio de Speit (1995) y Collins (2004).

	grupos	N	Media	Desviación típ.
nivel 0	grupo control	31	74,52	15,558
	grupo expuestos	30	64,38	16,003
nivel I	grupo control	31	,55*	,888
	grupo expuestos	30	6,41*	10,527
nivel II	grupo control	31	,03	,180
	grupo expuestos	30	,66	1,542
nivel III	grupo control	31	,00	,000
	grupo expuestos	30	,31	1,312
nivel IV	grupo control	31	,00	,000
	grupo expuestos	30	,31	1,339
Daño total	grupo control	31	3,4*	
	grupo expuestos	30	37,8*	

*prueba de U Mann Whitney $p < 0.05$

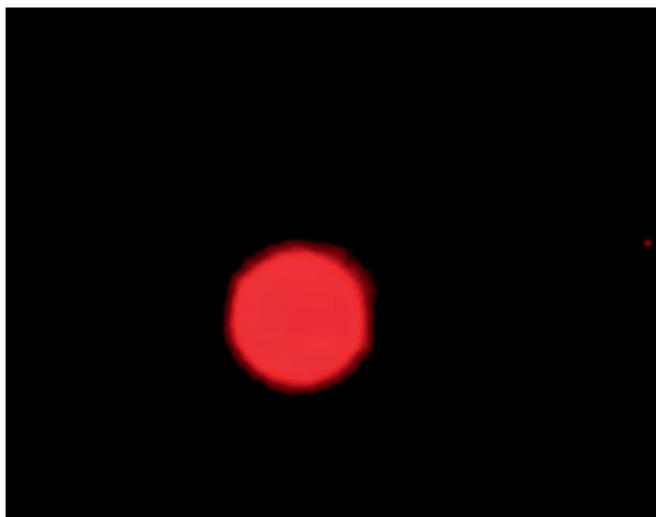


Figura 7. Célula sin daño (nivel 0).

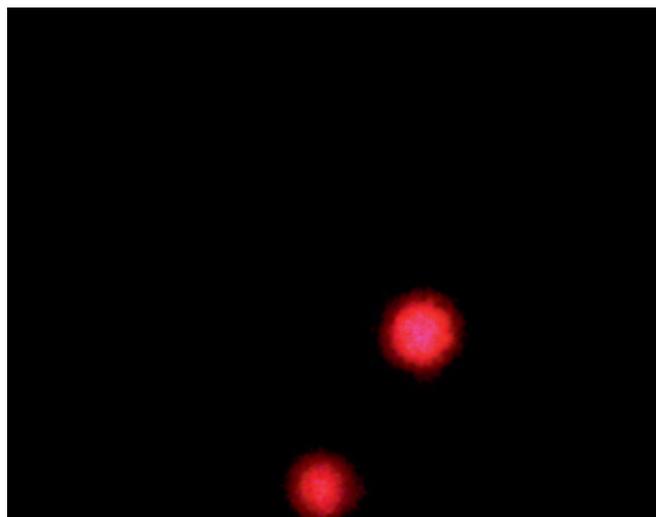


Figura 8. Célula con escaso daño (nivel I).

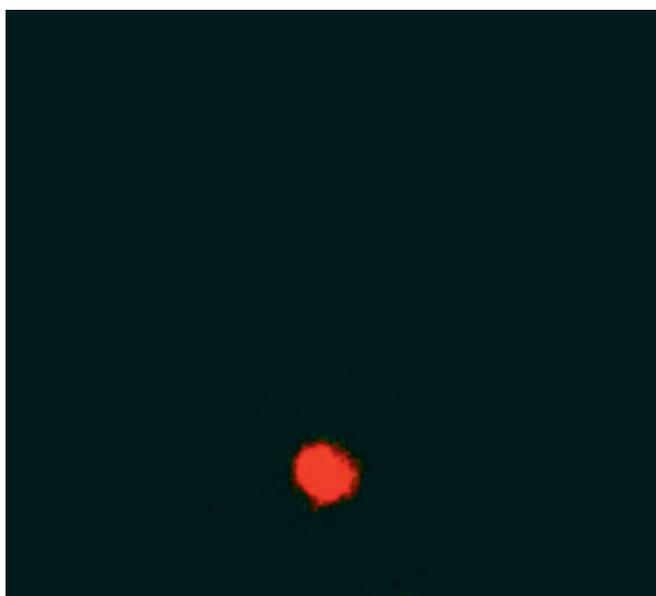


Figura 9. Célula con medio nivel de daño (nivel II).

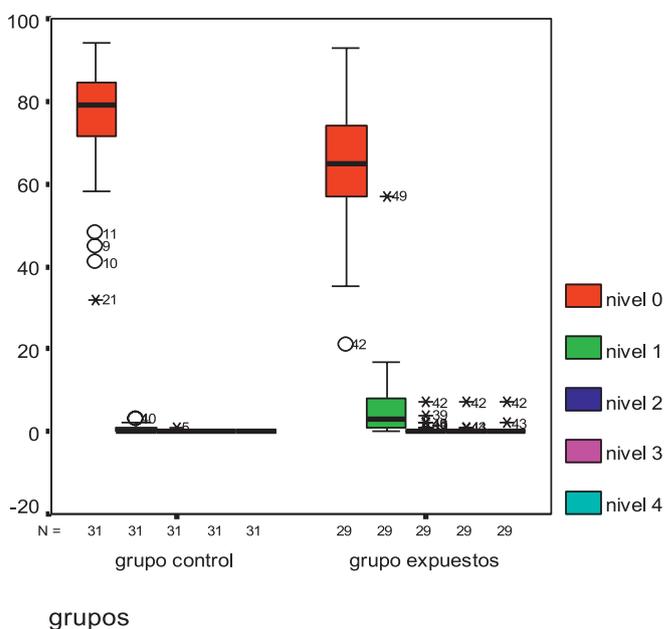


Gráfico 4. Diagrama de cajas del daño genotóxico por nivel en los grupos control y expuestos.

Tabla 6. Valores de medias de apoptosis en grupos expuesto y no expuestos.

	grupos	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
apoptosis	grupo control	31	22,68	13,029	2,340
	grupo expuestos	30	47,93	12,473	2,316

*Prueba de t p< 0,05

Evaluación por el software Casp Lab Comet assay

En la tabla 7 se observa los valores de las medias determinados para Tail momento y tail momento olive del ensayo del cometa de las poblaciones expuesta y control, notando un

leve aumento de los valores para la población expuesta, pero que según la prueba de t no son estadísticamente significativas, por otro lado las gráficas 6 y 7 muestran en el diagrama de cajas los valores promedios para ambas poblaciones.

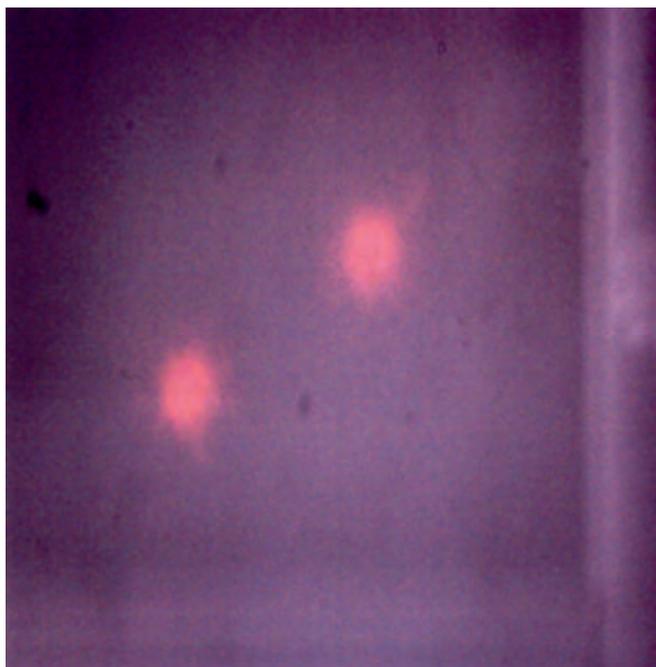


Figura 10. Células apoptóticas. Microscopia de fluorescencia 400X.

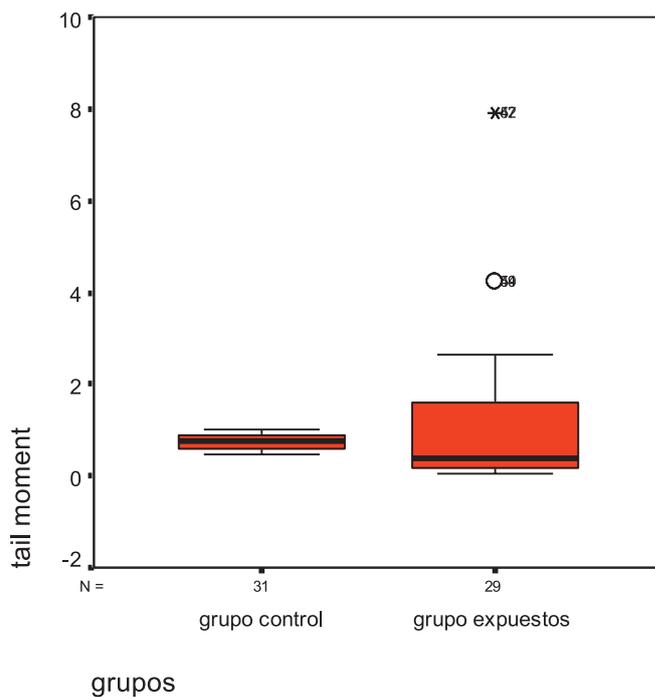


Gráfico 6. Diagrama de cajas para valores promedios de momento de la cola del cometa para poblaciones expuestas y no expuestas.

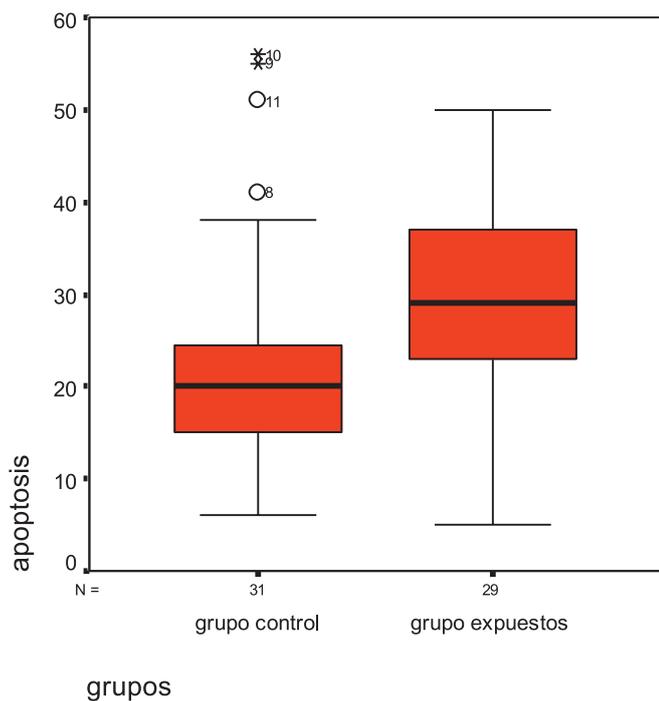


Gráfico 5. Diagrama de cajas de la comparación de apoptosis por grupo no expuesto y expuestos.

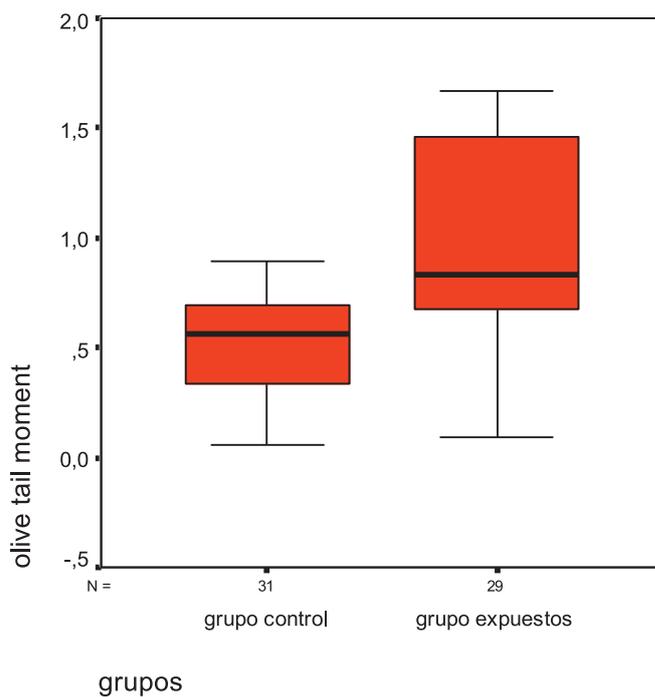


Gráfico 7. Diagrama de cajas para valores promedios de momento de la cola del cometa para poblaciones expuestas y no expuestas.

Tabla 7. Valores medios de tail momento y tail momento olive del cometa.

	expuestos	control
tail moment	1,34 ± 2,12	0,73 ± 0,15
tail moment olive	0,93±0,49	0,51±0,24

p>0.05 para prueba.

5. DISCUSIÓN

Los micronucleos son anomalías que se originan a partir de fragmentos acéntricos de cromosomas, por cromosomas rezagados durante la anafase de la mitosis, u otras anomalías de la división celular, evidenciando

un efecto clasto génico o aneugénico, por lo que se considera el test de micronucleos una herramienta valiosa para evaluar efectos genotóxicos en individuos expuestos a contaminantes químicos o físicos como las radiaciones ionizante. (Bonazzi et. al 2001) (Tolbert, 1992) (Mudry y col. 2006), ya que además permite determinar otras alteraciones nucleares apoptóticas como cariorrexis, picnosis, broken eggss, cromatina condensada, relacionadas a la genotoxicidad del agente. (Ribeiro 2003) En este estudio, se observó en la población expuesta, un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y un aumento en las frecuencias de alteraciones nucleares relacionadas al efecto citotóxico. El ensayo del Cometa por su parte es un bioensayo recomendado para medir el daño en el ADN, midiendo rupturas en la doble o en la simple cadena, permite discriminar además la viabilidad celular y el porcentaje de células en apoptosis. Los resultados encontrados en este estudio, demuestran que la dosis y el tiempo de exposición a rayos X, que tienen los estudiantes que realizan placas dentarias, producen un daño de bajo nivel (nivel I) a la molécula de ADN, encontrándose valores significativos para este nivel con respecto a los controles y no significativos para los demás niveles de daño, así mismo el porcentaje de ADN fragmentado en las colas de cometas, determinado para ambas poblaciones por los valores de tail momento y olive tail momento, no presentan resultados significativos. Por otro lado, hemos encontrado que la población expuesta muestra una frecuencia altamente significativa de células en apoptosis, con respecto a la población no expuesta, lo que indica que la dosis mínima de rayos X recibidas durante la realización de radiografías dentarias en forma crónica, actúa desencadenado efectos citotóxicos. Esta observación coincide con otros autores que reportaron aumento de citotoxicidad en mucosa bucal en pacientes adultos y niños luego de la realización de radiografías panorámicas (Cerqueira, 2004, Ribeiro, 2008 y Eman, 2008), pero no un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos, los valores significativos de las frecuencias de micronúcleos encontrados aquí, podrían deberse al tiempo de exposición (más de tres años) y a la dosis recibida ya que el aumento en la frecuencia de micronucleos aumenta con la dosis y tiempo de exposición a rayos X (Ribeiro, 2008) y el origen de los mismos podría deberse a fallas en el mecanismo de división celular y no a roturas de cromosomas. (Ribeiro, 2008).

6. CONCLUSIONES

La dosis de rayos X y el tiempo de exposición a los que están sometidos los estudiantes de la carrera de Odontología cuando realizan radiografías dentarias, induce un efecto citotóxico en células de la mucosa bucal y un daño mínimo al ADN en células de sangre periférica, evidenciado por el aumento significativo en las poblaciones expuestas, de micronucleos, anormalidades nucleares asociadas a células apoptóticas y al de células en apoptosis observadas a través del ensayo del Cometa.

Las células sufren apoptosis en respuesta a un factor que induce daño celular, por lo que no llegan a dividirse y a acumular daño en el material genético sin embargo el aumento de anormalidades nucleares y de micronucleos va en relación directa con la edad y la calidad de vida de las personas, por lo que se debería recomendar la exposición solo cuando es muy necesario y tomar las precauciones de radioprotección.

Los resultados encontrados por evaluación visual del cometa y el análisis de imágenes por el software y el test de micronúcleos fueron concordantes.

7. AGRADECIMIENTOS

A FUNDACIÓN MAPFRE a través del programa Ayudas a la investigación.

Al Centro para el desarrollo de la Ciencia (CEDIC) por permitir el uso de sus laboratorios.

Al Dr. Enrique Zamorano Ponce de la Universidad del Bío Bío de Chillán Chile por su constante asistencia y asesoramiento y por el entrenamiento recibido.

Al Dr. José Corvalán Amigo, Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica por su apoyo para la ejecución del proyecto y facilitar las instalaciones de los laboratorios.

A los Directivos de la Facultad de Odontología Pierre Fauchard por autorizar la participación de los estudiantes en la investigación.

A los estudiantes de Odontología que participaron de la investigación.

A los estudiantes de Medicina de la Universidad Católica "Nuestra Señora de la Asunción": Juan Segovia, Luis Gatti y Daniela Solís por su participación en el desarrollo del bioensayo del test de micronúcleos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mi-Young A & Tae-Hwan K. frequencies of micronuclei in peripheral lymphocytes in Korean population after chronic low dose radiation exposure *Veterinary science* 2002; 3: 213-218.
2. Cerqueira EMM. & Meireles JRC. Genotoxic effects of x-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofacial radiology* 2008; 37, 398-403.
3. Antonio E. L Genotoxicidade e citotoxicidade dos raios X no epitelio da mucosa oral de crianças submetidas a radiografias panoramica (Tesis de maestría), Curitiba, Universidad Federal do Paraná; 2010.
4. Serto F, Finottus S, Glaconelli L, Mazzotti D, Tamanin R. The micronucleous assay in exfoliated cells of the human bucal mucosa mutagenesis 1987; 2: 11-17.
5. Bonasssi S, Fenech M, Lando C, Yi-ping L, Ceppi M, Wushou et al. HUMAN MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Mutat Res.* 1999; 428: 271-283.
6. Mudry M. y Carballo, A. *Genetica Toxicologica*. De los Cuatro Vientos. Bs AS 2006.

7. Tolbert P, Shy C, Allen J. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res.* 1992; 271: 69-77.
8. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human Micronucleus Project-an international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mut Res.* 1999; 428: 271-283.
9. 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: 184 -191.
10. Singh NN, Stephens R, Schneider E. Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Inst Radiat Biol* 1994; 66: 23-28.
11. Zuñiga Venegas L. Optimizaciones metodológicas del ensayo del Cometa y su aplicación en biomonitorización humana (tesis doctoral) Barcelona Universidad Autónoma de Barcelona 2009.
12. Speit G, Hartman A. The comet assay (single cell gel test) a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Mutat Res* 1995; 113: 20-212.
13. Coolins A. The Comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 2004; 26: 249-261.
14. Ribeiro L., Salvadori D., Marques E. *Mutageneses ambiental.* Ulbra, Sao Paulo 2003.
15. Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to x-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res* 2004; 562: 111-117.
16. Ribeiro D & Angelieri F. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X rays. *Radiat Med* 2008; 26: 325-30.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.

9. ANEXOS

9.1. Encuesta

Evaluación genotóxica por el Test de Micronucleos y el ensayo del Cometa en estudiantes de Odontología expuestos a rayos X durante las Radiografías dentarias

El siguiente cuestionario ha sido diseñado para evaluar efecto genotóxico por el Test de Miconucleos y el ensayo del Cometa en estudiantes de la carrera de Odontología expuestos a rayos X durante las radiografías dentarias. Los datos de la encuesta son anónimos y se mantendrá en confidencialidad su contenido.

Encuestador: _____ Participante N° _____

Fecha: _____

Nombre y apellido	Edad	Sexo	Año académico que cursa
-------------------	------	------	-------------------------

HÁBITOS PERSONALES

1. ¿Es Ud. fumador activo? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	2. ¿Consume alcohol? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>
3. Consume algún tipo de droga Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Especificar cuál

ANTECEDENTES FAMILIARES

4. ¿Tiene algún familiar con cáncer? Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Tipo de cáncer:	5. Parentesco Padre <input type="checkbox"/> madre <input type="checkbox"/> hermanos/as <input type="checkbox"/> primos <input type="checkbox"/>
---	---

DATOS PERSONALES DE SALUD

6. Presenta algún tipo de enfermedad Cardíaca <input type="checkbox"/> renal <input type="checkbox"/> pulmonar <input type="checkbox"/> nerviosa <input type="checkbox"/> cáncer <input type="checkbox"/> digestiva <input type="checkbox"/> dérmica <input type="checkbox"/> ninguna <input type="checkbox"/> otra:	8. ¿Se encuentra actualmente bajo tratamiento médico? Sí <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Especificar cuál: _____
7. En caso de se de sexo femenino conteste si ha tenido algún embarazo interrumpido Sí <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	9. ¿Consume algún tipo de medicamento? antibióticos <input type="checkbox"/> antiparasitarios <input type="checkbox"/> psicofármacos <input type="checkbox"/> diuréticos <input type="checkbox"/> analgésicos <input type="checkbox"/> antipiréticos <input type="checkbox"/> hormonas <input type="checkbox"/> antialérgicos <input type="checkbox"/> Ninguno <input type="checkbox"/> Otro especificar cuál

