

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y CLÍNICA MÉDICA

ESTATUS DE PARÁMETROS OXIDATIVOS Y DEL GEN
p53 EN SANGRE DE NIÑOS EN EDAD ESCOLAR DE
ZONAS AFECTADAS POR EL ACCIDENTE NUCLEAR DE
CHERNOBYL

M^a CARMEN GARCÍA MORA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 29 de Setembre de 2004 davant un tribunal format per:

- D. José Ricardo Cabo Soler
- D. Rafael Fernández-Delgado Cerdá
- D. Pedro Anig Parellada
- D. Miguel Soler Tortosa
- D. José Enrique O'Connor Blasco

Va ser dirigida per:

D. Guillermo Sáez Tormo

D. Joaquín Donat Colomer

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Carmen García Mora

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6137-7

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT D VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia |



Estatus de parámetros oxidativos y del gen p53 en sangre de niños en edad escolar de zonas afectadas por el accidente nuclear de Chernobyl

TESIS DOCTORAL

M^a Carmen García Mora

Valencia, mayo 2.004

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia |



Estatus de parámetros oxidativos y del gen p53 en sangre de niños en edad escolar de zonas afectadas por el accidente nuclear de Chernobyl

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

M^a Carmen García Mora

Dirigida por:

Prof. Dr. Guillermo Sáez Tormo

Prof. Dr. Joaquín Donat Colomer



VNIVERSITAT (ò) **Facultat de Medicina i Odontologia**
ID VALÈNCIA

Dr. GUILLERMO SÁEZ TORMO, Profesor titular del Departamento de Biloquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia.

Dr. JOAQUÍN DONAT COLOMER, Profesor titular del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de Valencia y Jefe de la Unidad de Oncohematología del Servicio de Pediatría del Hospital Clínico de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral, titulada: "Estatus de parámetros oxidativos y del gen p53 en sangre de niños en edad escolar de zonas afectadas por el accidente nuclear de Chernobyl", ha sido realizada bajo su dirección por M^a CARMEN GARCÍA MORA, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura para la obtención del grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste, en cumplimiento de la legalidad vigente, firman la presente certificación en Valencia, a veinte de mayo de 2004

Fdo. Prof. Dr. Guillermo Sáez Tormo

Fdo. Prof Dr. Joaquín Donat Colomer

A todos los niños discapacitados y enfermos,
y en especial, a sus padres,
que tanto tienen que luchar
y a los que muy pocos comprenden.

A Ximo, por compartir su vida conmigo.

A Joan, mi pequeño de los ojos rasgados,
e Isaac, que están en la época más bonita de sus
vidas y a los que en ocasiones no he podido dedicar
todo el tiempo que me habría hecho ilusión.
Ellos me han enseñado a valorar las cosas
importantes de la vida.

A mis padres, que lo dan todo a cambio de nada y
que tanto me han ayudado en todos mis años de
estudios y en el cuidado de mis niños. Sin ellos no
hubiera sido posible esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Guillermo Sáez y Joaquín Donat, por haber hecho posible mi ilusión de realizar este trabajo, por escucharme en todo momento, por sus consejos, por su apoyo, ayuda y confianza. Gracias a los dos por dirigir esta tesis.

A las personas del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular que colaboraron en la realización de este estudio. En especial a M^a Carmen Tormos, por su disposición en todo momento y su ayuda desinteresada en el trabajo de laboratorio. Sin ella, la realización de este trabajo no hubiera sido posible. También quiero dar las gracias a Olga y Domingo, por su aportación en el último periodo de la realización de este trabajo.

A las personas del Departamento de Pediatría del Hospital Clínico que participaron en la revisión clínica de los niños.

Al Departamento de Patología, por su trabajo en el estudio cromosómico de los niños. En especial a la Dra. Concha López Ginés, por su ayuda en los temas genéticos.

A la Asociación Abogados sin Fronteras y a todas las personas que hicieron posible el Proyecto Ucrania 2000. A Lourdes Paramio, abogado, y a Carlos García, psicólogo, por hacer posible que se iniciara este trabajo; su ilusión y su esfuerzo en colaborar conmigo han sido fundamentales.

A Joaquim Martí, por sus consejos y su gran ayuda en la elaboración estadística.

A todas las personas del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitari La Fe, con las que comparto el trabajo diario de nuestros pacientes oncológicos. En especial a:

- Dr. Ignacio Petschen, por ser mi maestro. Su pasión por la Oncología Radioterápica ha sido siempre un ejemplo para mí.

- Dra. M^a Dolores Badal, mi compañera y maestra, por su apoyo psicológico en todo momento, incluso en los momentos más difíciles.

- Dr. Alejandro Tormo, compañero de Sección, porque además de ser mi otro maestro, ha sabido comprenderme durante la elaboración de este trabajo.
- A mis compañeros físicos, y en concreto al Dr. J. Pérez Calatayud, por su asesoramiento en los aspectos físicos de este trabajo.
- A Erika Collado, residente del Servicio. Su exquisito trato a los pacientes me daban la tranquilidad de dejar la consulta en sus manos en los últimos momentos de dedicación a esta tesis.
- A Sary, Raquel , Lola y Reme, auxiliares y secretaria del Servicio, por escucharme y estar a mi lado.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

8-oxo-dG: 8-oxo-2'-deoxiguanosina

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosín Trifosfato

C: Citosina

CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

Cit: Citocromo

COX: Citocromo oxidasa mitocondrial

Cys: Cisteína

e⁻ : Electrón

e⁻_{aq} : Electrón acuoso

ECLIS: The European Childhood Leukaemia-Lymphoma Incidence Study

EDTA: Ácido etilendinitrilo tetra-acético

EUROCAT: European Economic Communities Concerted Action on Congenital Anomalies

FAD: Dinucleótido de Flavina y Adenina

G: Guanina

GADD45: Growth Arrest and DNA Damage

Glu: Acido glutámico

Gly: Glicina

GOT: Glutámico-Oxalacético Transaminasa

GPT: Glutámico-Pirúbico Transaminasa

GPx: Glutation Peroxidasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCM: Hemoglobina Corpuscular Media

HLA: Antígeno de Histocompatibilidad

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta presión)

HPLC - EC: High Pressure Liquid Chromatography with Electrochemical detection

IAEA: International Atomic Energy Agency

IARC: International Agency for Research on Cancer

IG: Inmoglobulina

IST: Índice de Saturación de Transferrina

L[•]: Radical Alquil

LDH: Deshidrogenasa del ácido láctico

LOO[•]: Radical peroxilo

LOOH: Hidroperóxido

M: Molar

MAO: Monoamino oxidasa

MDA: Malondialdehido

MDM2: Murine doble minute

mM: Milimolar

NADP: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (forma oxidada)

NADPH: Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (forma reducida)

NEA: Nuclear Energy Agency de la OECD

NO[•]: Radical óxido nítrico

NO₂[•]: Dióxido de nitrógeno

O₂^{•-}: Radical superóxido

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development

•OH: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Anión peroxinitrico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

r.p.m.: Revoluciones por minuto

RBMK: Designación de los reactores nucleares soviéticos. Las iniciales RBMK corresponden a una abreviatura en lengua rusa que significa reactor de alta producción, tipo multicanal.

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SI: Sistema Internacional

SOD: Superóxido dismutasa

SSCP: Single-stranded conformation polymorphism (polimorfismos conformacionales de cadena simple)

T: Timina

T_{1/2}: Periodo de semidesintegración

T3: Triyodotironina

T4: Tiroxina

T4L: Tiroxina Libre

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TRH: Hormona liberadora de TSH

TSH: Hormona estimulante de tiroides

TTPr: Tiempo parcial de Tromboplastina

TTr: Tiempo de Trombina

U.R.S.S.: Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas

UNESCO: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura)

UNSCEAR: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (Comité Científico de las Naciones Unidas para los efectos de la Radiación Atómica)

VCM: Volumen Corpuscular Medio

WAF1: Wild Activated Fragment

XOD: Xantina oxidasa

I. INTRODUCCIÓN

1.- EL ACCIDENTE NUCLEAR DE CHERNOBYL.....	1
1.1.- Breve recuerdo histórico.....	1
1.2.- Implicaciones sobre la salud.....	9
1.2.1.- Efectos agudos.....	9
1.2.2.- Efectos tardíos.....	10
1.2.2.1.- Cáncer.....	10
1.2.2.2.- Defectos hereditarios.....	13
1.2.3.- Conclusiones del impacto del accidente sobre la salud.....	14
2.- EFECTOS DE LA RADIACIÓN SOBRE EL MATERIAL BIOLÓGICO	16
2.1.- Mecanismos de acción elementales.....	17
2.1.1. Acción directa.....	17
2.1.2. Acción indirecta.....	17
2.2.- Lesiones moleculares radioinducidas.....	19
2.3.- Efectos de la radiación sobre los cromosomas.....	20
2.4.- Efectos de la radiación sobre poblaciones celulares.....	21
2.5.- Efectos de la radiación sobre los tejidos. Efectos agudos y crónicos. Efectos estocásticos y deterministas.....	23
2.6.- Efectos sobre el embrión y el feto.....	25
3.- ESTRÉS OXIDATIVO.....	27
3.1. Concepto de radical libre y estrés oxidativo.....	27
3.2. Principales radicales libres.....	28
3.2.1.- Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	29
3.2.2.- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	29
3.2.3.- Radical hidroxilo ($\cdot OH$).....	30
3.2.4.- Radical peroxilo ($ROO\cdot$).....	30
3.2.5.- Oxígeno singlete (1O_2).....	30
3.2.6.- Óxidos de nitrógeno	31
3.3. Fuentes de radicales libres.....	31
3.3.1. Fuentes exógenas	31
3.3.2. Fuentes endógenas.....	32
3.4. Moléculas susceptibles de lesión por especies reactivas.	34
3.4.1. Glúcidos.....	34
3.4.2. Lípidos.....	34
3.4.3. Proteínas.....	36
3.4.4. Ácidos nucleicos.....	36

Indice

3.5. Defensa antioxidante.....	37
3.5.1. Antioxidantes enzimáticos.....	38
3.5.1.1 Superóxido dismutasa.....	38
3.5.1.2 Catalasa.....	38
3.5.1.3 Glutation peroxidasas.....	39
3.5.1.4 Glutation reductasas.....	40
3.5.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	40
3.5.2.1. Glutation.....	40
3.5.2.2. Vitamina C.....	41
3.5.2.3. Vitamina E.....	42
3.5.2.4. Carotenoides.....	43
3.5.2.5. Otros antioxidantes.....	43
4.- GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER. GEN Y PROTEÍNA p53.....	44
4.1.- Oncogenes.....	44
4.2.- Genes supresores.....	45
4.3.- Genes de reparación del ADN.....	46
4.4.- Gen p53 y su proteína.....	47
4.4.1.- Función de la Proteina P53.....	49
4.4.2.- Mecanismos de inactivación del gen p53 y su proteína.....	51
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
1.- MATERIAL.....	57
1.1.- Sujetos de estudio y muestras.....	57
1.2.- Instrumentos.....	58
1.3.- Productos y reactivos químicos.....	59
2.- MÉTODOS.....	61
2.1.- Procesamiento de las muestras.....	61
2.2.- Estudio del estrés oxidativo.....	61
2.2.1.- Catalasa.....	61
2.2.2.- Superóxido dismutasa.....	61
2.2.3.- Glutation reducido.....	62
2.2.4.- Malondialdehído.....	63
2.2.5.- Determinación de hemoglobina.....	64
2.2.6.- Extracción de ADN.....	64

2.2.7.- Determinación de 8-oxo-dG.....	65
2.3.- Estudio del gen p53.....	66
3.- METODOLOGÍA ESTADÍSTICA Y SOPORTE INFORMÁTICO.....	68

IV. RESULTADOS

1.- DATOS DESCRIPTIVOS GENERALES DE LOS NIÑOS.....	69
2.- ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	73
2.1.- Relación con factores de irradiación.....	73
2.2.- Relación con la edad de los niños en el momento del accidente.....	74
2.3.- Análisis en función de si el niño había nacido o no en el momento del accidente.....	77
3.- ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN TIROIDEA.....	79
3.1.- Relación con factores de irradiación.....	79
3.2.- Relación con la edad de los niños en el momento del accidente.....	82
3.3.- Análisis en función de si el niño había nacido o no en el momento del accidente.....	82
4.- ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO	85
4.1.- Datos descriptivos de los niños en los que se ha efectuado el estudio de parámetros del estrés oxidativo.....	85
4.2.- Análisis de valores de los marcadores del estrés oxidativo.....	88
4.2.1.- Enzimas y sustrato antioxidantes: Catalasa, SOD y GSH.....	88
4.2.2.- Marcador de peroxidación lipídica: MDA.....	94
4.2.3.- Base mutagénica: 8-oxo-2'-deoxiguanosina.....	96
4.3.- Relación con el sexo y edad.....	99
4.4.- Relación con factores de irradiación.....	105
4.4.1.- Análisis de correlación de los parámetros de estrés oxidativo con la distancia al lugar donde se produjo el accidente y años de exposición.....	105
4.4.2.- Modelo de regresión lineal con la distancia	108
4.4.3.- Comparación de medias de valores en función de la distancia al foco de radiación.....	112

Indice

4.4.4.- Análisis de diferencias de medias por sexo en función de la distancia.....	118
4.5.- Relación con la edad de los niños en el momento del accidente.....	126
4.6.- Análisis en función de si el niño había nacido o no en el momento del accidente.....	129
4.7.- Relación con factores nutricionales.....	132
4.7.1.- Peso.....	132
4.7.2.- Índice de McLaren o Suckla.....	133
4.7.3.- Lugar donde se produce la alimentación.....	135
5.- ESTUDIO DEL GEN p53.....	139
6.- ANÁLISIS CROMOSÓMICO.....	144

V. DISCUSIÓN

1.- FACTORES ANALIZADOS EN RELACIÓN A LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS.....	151
1.1.- Distancia al foco de radiación.....	151
1.2.- Tiempo de irradiación.....	152
1.3.- Edad en el momento del accidente.....	153
1.4.- El hecho de haber nacido antes o después de producirse el accidente.....	154
2.- ESTUDIO DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	155
3.- ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN TIROIDEA.....	158
4.- ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	162
4.1.- Relación con el sexo y la edad.....	163
4.2.- Relación con la distancia al lugar del accidente y con los años de exposición crónica a la irradiación.....	164
4.3.- Relación con la edad en el momento del accidente y al hecho de haber nacido o no cuando se produjo.....	166
4.4.- Relación con los factores nutricionales.....	167
5.- ESTUDIO DEL GEN p53.....	169
6.- ANÁLISIS CROMOSÓMICO.....	171

<u>VI. CONCLUSIONES</u>	175
--------------------------------	-----

VII. APÉNDICES

1.- Unidades físicas de radiactividad. Concepto y equivalencias.....	177
2.- Relación de átomos de isótopos radiactivos utilizados en el texto.....	179
3.- Ficha de recogida de datos clínico-analíticos.....	180
4.- Programa Ucrania 2000.....	182
5.- Cartas a Organismos Oficiales.....	185
6.- Recortes de prensa.....	191

VIII. BIBLIOGRAFÍA

205

1.- El accidente nuclear de Chernobyl

1.1.- Breve recuerdo histórico

- **El nombre**

El nombre de Chernobyl (en ruso) o Chornobyl (en ucraniano) es la traducción del nombre de una hierba, el ajenojo (*Artemisia vulgaris*). En el trabajo utilizaremos la denominación rusa "Chernobyl" que es la más difundida.

- **Localización y población**

La Central Nuclear de Chernobyl está situada en la ribera del río Pripyat, al noroeste de Ucrania, cerca de la frontera con Bielorrusia, en una región conocida como "la región boscosa".

El Pripyat es un afluente del río Dnieper, el cual atraviesa toda Ucrania de norte a sur, desembocando en el Mar Negro junto a la ciudad de Odessa. Muchas ciudades importantes de Ucrania se asientan a las orillas de este río, incluyendo Kiev.

Kiev, la capital ucraniana, con unos 2.500.000 habitantes se halla a unos 125 km en línea recta de la Central de Chernobyl, mientras que la capital de Bielorrusia, Minsk, que cuenta con una población de 1.300.000 habitantes, dista unos 320 km de la central nuclear.

La capital de la región donde se halla situada la Central es Chernobyl (que da nombre a la Central Nuclear) histórica ciudad fundada en el siglo XII, que en 1.986 contaba con 12.500 habitantes. La ciudad de Chernobyl está situada a unos 15 km de la Central, en dirección sudoeste.

Tan sólo a tres km al noreste de la Central se hallaba la ciudad de Pripyat, que fue construida para albergar a los trabajadores de la Central y sus familias. En el momento de la catástrofe contaba con 49.000 habitantes.

El total de habitantes de Ucrania en 1.986 era de unos 60 millones, de ellos unos 10.800.000 niños. Bielorrusia contaba con unos 10 millones de habitantes, 2.300.000 de los cuales eran niños.

Tanto Chernobyl como Prypiat fueron evacuados después del accidente. El día 2 de mayo, seis días después del accidente, se completó la evacuación de los habitantes en un radio de 10 Km de la Central, el día 5 se finalizó la evacuación de la zona de un radio de 30 Km de la Central. Esta zona de 30 km alrededor de la Central es lo que se denomina la zona de exclusión.

En total, hasta septiembre de 1.986 fueron evacuadas más de 116.000 personas de Ucrania y Bielorrusia y algunas pequeñas aldeas de Rusia. Ello supuso evacuar 2.100 Km² de Bielorrusia, 2.044 Km² de Ucrania y 170 Km² de Rusia. Se evacuaron las zonas cuya contaminación superaba los 1.480 kBq/m². Estas zonas incluían "Lugares calientes" con niveles de contaminación del orden de 370.000 kBq/m² (10.000 Ci/Km²) de ¹³⁷Cs, 185.000 kBq/m² (5.000 Ci/Km²) de ⁹⁰Sr o 555 kBq/m² (15 Ci/km²) de Plutonio (Jensen, 1996).

Para acomodar a los trabajadores de la Central Nuclear fue construida la ciudad de Slavutich fuera del radio de la zona de exclusión de los 30 km a la otra parte del río Pripyat en dirección a la ciudad de Chernigov. La zona fue remodelada rápidamente, fueron construidas nuevas carreteras y un largo puente sobre el río Pripyat, para facilitar el acceso de los trabajadores a la central nuclear.

- **La explosión**

La central nuclear de Chernobyl disponía de 4 reactores tipo RBMK. Cada reactor poseía dos turbinas, cada una de ellas con una capacidad de producción eléctrica de 500 Mw.

El día 26 de abril de 1.986 a la 1: 23 h. explotó el reactor nº 4 de la Central. Se estaban realizando unos trabajos de mantenimiento y un experimento.

Oficialmente el gobierno soviético explicaría tres meses más tarde a la IAEA lo siguiente:

Durante una revisión rutinaria de mantenimiento del reactor, los técnicos de la Central pretendieron realizar un experimento que tenía como objeto comprobar cuánto tiempo podría generar electricidad una turbina a la que se hubiera cortado el flujo de vapor. Por esta razón los técnicos bajaron drásticamente la potencia del reactor.

Dicho descenso de potencia conllevaba la posibilidad de que los sistemas automáticos de protección del reactor entrasen en

funcionamiento. Ante esta posibilidad, que hubiese inutilizado el experimento, el personal de la central desconectó el sistema de regulación de potencia y el sistema de refrigeración del núcleo del reactor, además de otros sistemas de protección.

La tesis oficial soviética se basaba en que el accidente se produjo básicamente por errores humanos y especialmente porque se violaron las normas fundamentales de seguridad.

No es objeto de este estudio el analizar las circunstancias del accidente, sino las consecuencias sobre la salud de las personas de la liberación a la atmósfera de gran cantidad de material radiactivo.

- **La contaminación**

La liberación de radionúclidos a la atmósfera durante los 10 días siguientes al accidente alcanzó un total de 1-2 EBq. En gran parte, la diseminación de estos radionúclidos vino determinada por condicionantes atmosféricos, fundamentalmente por el viento y la lluvia. Las condiciones meteorológicas en el momento de la catástrofe provocaron que la nube radiactiva alcanzara gran altura y fuera arrastrada lejos, cayendo inicialmente sobre Finlandia y Suecia donde fue detectada por primera vez, concretamente en Forsmark.

La nube radiactiva formada tras el accidente vagó sobre Europa y fue arrastrada por vientos cambiantes, que junto con las lluvias ocasionaron elevadas concentraciones de radiactividad en zonas bastante alejadas del origen del accidente.

La detección de la actividad radiactiva se produjo sólo en el hemisferio norte, el 2 de mayo en Japón, 4 de mayo en China, 5 de mayo en la India, 5-6 de mayo en Canadá y Estados Unidos. No se detectó actividad en el hemisferio sur.

Las áreas altamente contaminadas, con medidas de ^{137}Cs que excedían 37 KBq/m² fueron Bielorrusia, la Federación Rusa y Ucrania. Otros países que recibieron dosis importantes fueron Finlandia, Noruega, Suecia, Austria y Bulgaria. Las lluvias radiactivas produjeron contaminación del suelo y el agua.

Se liberaron al medio ambiente una gran variedad de radioisótopos. Un detalle de esta liberación puede verse en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 - Estimación de la liberación de radioisótopos a la atmósfera
(Mould, 2000)

Inventario de material radiactivo en el núcleo del reactor a 26 de abril de 1.986			Liberación durante el accidente	
Radionúclido	Periodo semidesintegración	Actividad (PBq)	Porcentaje del inventario	Actividad (PBq)
³³ Xe	5.3 d	6500	100	6500
¹³¹ I	8.0 d	3200	50-60	~ 1760
¹³⁴ Cs	2.0 a	180	20-40	~ 54
¹³⁷ Cs	30.0 a	280	20-40	~ 85
¹³² Te	78.0 h	2700	25-60	~ 1150
⁸⁹ Sr	52.0 d	2300	4-6	~ 115
⁹⁰ Sr	28.0 a	200	4-6	~ 10
¹⁴⁰ Ba	12.8 d	4800	4-6	~ 240
⁹⁵ Zr	65.0 d	5600	3.5	196
⁹⁹ Mo	67.0 h	4800	> 3.5	> 168
¹⁰³ Ru	39.6 d	4800	> 3.5	> 168
¹⁰⁶ Ru	1.0 a	2100	> 3.5	> 73
¹⁴¹ Ce	33.0 d	5600	3.5	196
¹⁴⁴ Ce	285.0 d	3300	3.5	~ 116
²³⁹ Np	2.4 d	27000	3.5	~ 95
²³⁸ Pu	86.0 a	1	3.5	0.035
²³⁹ Pu	24400.0 a	0.85	3.5	0.03
²⁴⁰ Pu	6580.0 a	1.2	3.5	0.042
²⁴¹ Pu	13.2 a	170	3.5	~ 6
²⁴² Cm	163.0 d	26	3.5	~ 0.9

a = años

d = días

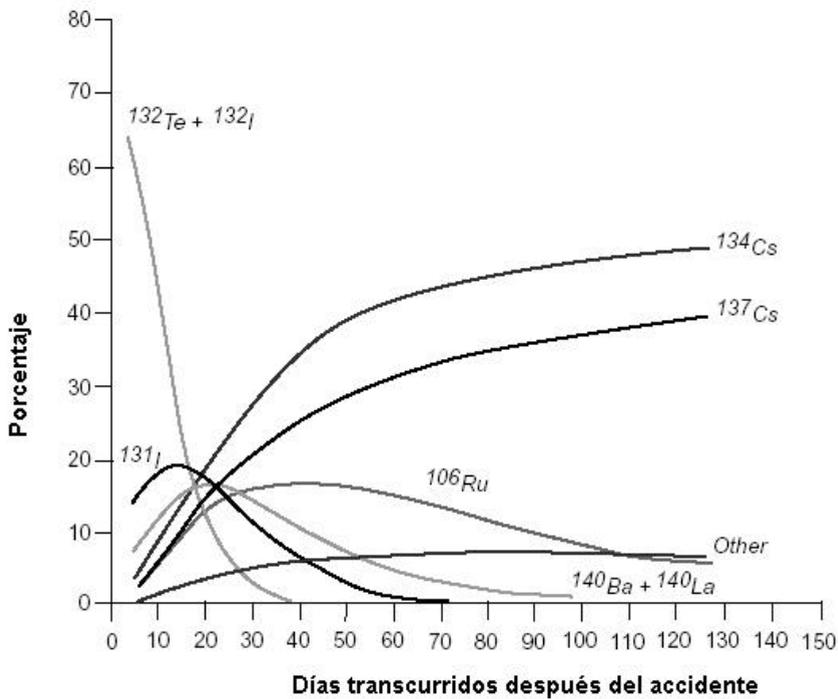
h = horas

La presentación del material radiactivo se produjo en dos formas:

- Sustancias radiactivas volátiles en forma de gases y aerosoles.
- Radionúclidos incluidos en la matriz del fuel y liberados como polvo radiactivo.

La exposición inicial a la irradiación fue debida sobre todo, al ¹³¹I; en fases más tardías la contaminación del medio ambiente sería causada principalmente por los radioisótopos: ¹³⁷Cs, ¹³⁴Cs y ⁹⁰Sr (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Contribución de los diferentes radionúcleos a la radiación absorbida los meses posteriores al accidente (NEA-OECD, 2000)



Desde el punto de vista radiobiológico los isótopos ^{131}I y ^{137}Cs (cuyos periodos de semidesintegración - $T_{1/2}$ - son de 8 días y 30 años, respectivamente) son los radionúclidos más importantes a considerar, pues fueron los mayores responsables de la contaminación radiactiva de la población.

Las principales vías de contaminación por isótopos de ^{131}I fueron el consumo dentro de los primeros días de vegetales contaminados y leche proveniente de vacas y cabras que habían ingerido pastos contaminados.

El ^{137}Cs depositado en el suelo y el agua (Smith *et al*, 2000) produce la contaminación de los alimentos. Debido a $T_{1/2}$ de este radioisótopo (30 años) los niveles de contaminación disminuyen muy lentamente.

En la tabla 1.2 se muestra la dosis estimada de residuos radiactivos de los principales radionúcleos, tras el accidente, diez años después y en el año 2.056.

Tabla 1.2 - Estimación de dosis radiactivas residuales en el medio ambiente debidas al accidente nuclear de Chernobyl (PBq) (Mould,2000)

Radionúclido	Liberación en 1986 corregido a 26 de abril	Radiación remanente en 1996	Radiación remanente en 2056
¹³¹ I	1200-1700	0	0
⁹⁰ Sr	8	6	1'5
¹³⁴ Cs	44-48	1'6	0
¹³⁷ Cs	74-85	68	17
²³⁸ Pu	0'03	0'03	0'02
²³⁹ Pu	0'03	0'03	0'03
²⁴⁰ Pu	0'044	0'044	0'03
²⁴¹ Pu	5'9	3'6	0'2
²⁴¹ Am	0'005	0'08	0'2

- **La población tras el accidente. Clasificación en función de la radiación recibida.**

Después del accidente la población expuesta a la irradiación ha sido dividida en cuatro categorías, según las dosis estimadas recibidas (NEA-OECD, 2002):

1.- **"Liquidadores"**, trabajadores que participaron en las operaciones de limpieza y construcción del "sarcófago" tras el accidente: más de 600.000 personas cuyos datos dosimétricos varían desde 170 mSv en 1986 a 15 mSv en 1989. Las fuentes de radiación fueron la radiación externa gamma/beta de la nube radiactiva, los depósitos en piel y la inhalación de partículas radiactivas. Más de 20 años después no es posible una estimación exacta de las dosis recibidas por muchas de estas personas; tras el accidente en los alrededores de la central, la radiación estaba fuera del rango de medición de los monitores de radiación y dosímetros. Obviamente no se estaba preparado para una situación como la que se vivió.

2.- **Residentes cercanos a la central nuclear (<30 Km)** que fueron evacuados dentro de las dos primeras semanas tras el accidente: más

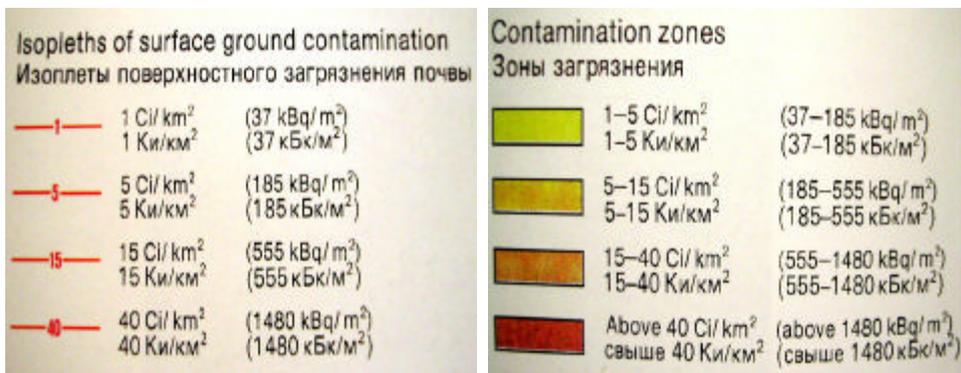
de 110.000 personas, las cuales fueron expuestas a la inhalación de radioyodos y a radioactividad externa por la nube radiactiva y por los radionúclidos depositados en el suelo. Las dosis estimadas fueron de un promedio de 15 mGy en todo el cuerpo; y en tiroides, de 1 Gy en niños menores de 3 años y 70 mGy en adultos.

3.- Población de la antigua Unión Soviética, incluyendo los residentes de áreas contaminadas: alrededor de unas 270.000 personas residentes en áreas contaminadas con niveles de ^{137}Cs de unos KBq/m^2 . Las dosis recibidas en el cuerpo debidas al ^{137}Cs depositado en el suelo se estimaron de 5 a 250 mGy con un término medio de 40 mGy y la dosis en tiroides en un rango desde insignificante hasta 40 Gy, con un término medio de 1 Gy en niños de 0 a 7 años, debido principalmente al consumo de leche contaminada.

4.- Población de ciudades fuera de la Unión Soviética: El material radiactivo de naturaleza volátil se extendió a través del hemisferio norte. La dosis recibidas fueron relativamente bajas y varían bastante de unos lugares a otros dependiendo del régimen de vientos y de las precipitaciones que ocurrieron al paso de la nube radiactiva.

Los niños objetos de nuestro estudio estarían comprendidos en los grupos 2 y 3. En el siguiente mapa se indica la zona de exclusión de 30 Km alrededor de la central y los niveles de contaminación radiactiva. Se señalan también las ciudades de Slavutich, Irpen y Kiev de donde proceden los niños analizados.

Figura 1.2 - Mapa de la zona de la Central de Chernobyl con la zona de exclusión y con indicación de nivel de contaminación. Se señalan las localidades de procedencia de los niños objeto de nuestro estudio (Mould, 2000).



----- 30km zone around the Chernobyl nuclear power plant
30-километровая зона вокруг Чернобыльской АЭС

1.2.- Implicaciones sobre la salud

Entre las consecuencias derivadas del accidente nuclear sobre la salud podemos distinguir las que acontecen por los efectos directos de la irradiación, que analizaremos a continuación y las que se han relacionado con el estrés psíquico que el accidente ha provocado y que en algunos casos han llevado a la aparición de la llamada "Distonía Vegetativa" (NEA-OECD, 2002) caracterizada por un conjunto de síntomas somáticos poco definidos y sin un diagnóstico claro; que son el resultado del estrés social, cultural y psicológico causado por el accidente.

Por un lado podemos hablar de efectos agudos o tardíos, en función del tiempo transcurrido entre el inicio de la exposición a la radiación y su detección y por otro de efectos estocásticos, debidos al azar, y deterministas o somáticos cuya gravedad depende de la dosis recibida.

Analizamos seguidamente los efectos agudos y tardíos. En este trabajo haremos mayor hincapié en los tardíos, fundamentalmente la aparición de cáncer y efectos hereditarios, que constituyen los efectos estocásticos.

1.2.1.- Efectos agudos

Los efectos somáticos agudos ocurrieron fundamentalmente en las personas presentes en el lugar del accidente y en aquellos que participaron en las operaciones de limpieza ("liquidadores"). El informe a Naciones Unidas por UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) en 1988 habla de 31 muertos en las primeras semanas y de un total de 499 personas que ingresaron en los Hospitales para observación, 237 sufrieron el síndrome de irradiación aguda que incluye diarrea, vómitos, fiebre y eritema como primeros síntomas, así como afectación de la mucosa orofaríngea con sequedad y ulceraciones haciendo dificultosa la salivación y respiración. La alteración de las células sanguíneas (fundamentalmente linfopenia y plaquetopenia) llevaron a realizar trasplante de médula ósea en algunos pacientes (fundamentalmente a aquellos que habían recibido una dosis mayor de 4 Gy).

1.2.2.- Efectos tardíos

Se han realizado muchas predicciones sobre el impacto del accidente en la población. Éstas indican que salvo las alteraciones tiroideas, los efectos causados directamente por el accidente serán difíciles de distinguir de los producidos por causas naturales (NEA-OECD, 2002).

Dentro de los efectos tardíos, vamos a analizar los efectos estocásticos, es decir, aquellos que se producen al azar y cuya probabilidad de que aparezcan (y no la gravedad de los mismos) dependerá de la dosis. Se trata del cáncer y de los defectos hereditarios.

1.2.2.1.- Cáncer

La carcinogénesis es un proceso que sigue varias etapas: iniciación, promoción y progresión, llegando finalmente a un crecimiento incontrolado de las células. La carcinogénesis está causada por la activación o amplificación de los oncogenes o por la inactivación de genes supresores o de genes que participan en la reparación del ADN.

La radiación ionizante puede iniciar la carcinogénesis por interacción directa sobre el ADN o causando la formación de radicales libres que pueden conducir a lesiones genéticas. Las consecuencias son alteraciones cromosómicas como translocaciones, inversiones, adiciones y deleciones. Si estas alteraciones cromosómicas no causan la muerte celular y no son reparadas, pueden conducir a una transformación maligna por la alteración de la expresión de los genes o por la pérdida de función de genes supresores.

Se han asociado algunos tipos de leucemia y cánceres de tiroides, pulmón y mama a la exposición a la radiación ionizante (Ron, 1998).

Los estudios sobre los supervivientes de las bombas atómicas en Japón evidencian una relación dosis-respuesta lineal entre la exposición a la irradiación y los cánceres sólidos, con un modelo lineal cuadrático para la leucemia (Piere *et al*, 1996). A altas dosis, el incremento no es lineal, debido probablemente a la muerte celular.

El aumento del riesgo relativo para la mayoría de los cánceres parece disminuir con el incremento de la edad a la exposición (Ron, 1998).

El accidente nuclear de Chernobyl tuvo unas consecuencias negativas a nivel social y psicológico, teniendo en cuenta la particular situación socio-

política de la antigua U.R.S.S. y los cambios socio-económicos y políticos ocurridos. Los datos oficiales suministrados a los equipos médicos eran incompletos, difíciles de evaluar y no estaban bastante detallados para excluir o confirmar la posibilidad del incremento en la incidencia de algunos tipos de tumores.

Las primeras estimaciones que se realizaron sobre el incremento del cáncer respecto a la incidencia natural fueron de 0,01% en Europa y de 0,004% en todo el hemisferio norte.

La mayoría de los estudios epidemiológicos publicados se han centrado en la aparición del cáncer de tiroides y la leucemia.

- **Cáncer de tiroides**

En los supervivientes de las bombas atómicas en Japón y en individuos que han recibido tratamiento médico con radioterapia, existe una susceptibilidad al cáncer de tiroides que está inversamente relacionado con la edad en que se produjo la exposición. Este hecho puede ser en parte explicado por la mayor absorción de radionúclidos del tejido tiroideo en personas más jóvenes.

Los estudios previos sobre el incremento del cáncer de tiroides por radiación externa establecían la aparición de tumores a partir de seis a ocho años de exposición a la irradiación y continuaba más de veinte años después, particularmente en niños. Lo que no se esperaba era la aparición de cáncer tiroideo a los cuatro años del accidente.

Existen muchos estudios epidemiológicos sobre el cáncer de tiroides tanto en niños como en adultos (Prisyazhiuka *et al.*, Stsjazhko *et al.*, 1995; Schwenn y Bertrand Brill, 1997; Shibata *et al.*, 2001; Ivanov *et al.*, 1997). Podemos decir que en base a estos estudios existe una relación entre la aparición de cáncer de tiroides y la exposición a la irradiación en niños, si bien en adultos esa asociación no queda clara (Moysich, 2002).

La mayor proporción de tumores se encontró en niños que tenían una edad menor de 5 años en el momento en que se produjo el accidente. Estos tenían características más agresivas que los esporádicos, un periodo de latencia inusualmente corto y casi todos eran carcinomas papilares. En algunos de estos tumores inducidos por la radiación se observó un reordenamiento del oncogen *ret*, siendo un rasgo característico de algunos cánceres de tiroides de comienzo temprano

en los niños expuestos al accidente nuclear de Chernobyl. Sin embargo, los estudios que evidencian la presencia de estos reordenamientos del gen *ret* utilizaron muy pocas muestras, por lo que su interpretación ha de tomarse con cautela (Moysich, 2002).

En cuanto a otras alteraciones tiroideas, no se han demostrado diferencias de aparición de nódulos o tiroiditis autoinmune en áreas contaminadas y no contaminadas en la antigua U.R.S.S. Tras el accidente los niños ucranianos mostraron un incremento del nivel de tiroxina, sin clínica de tirotoxicosis, que volvió a la normalidad en 12 a 18 meses. Esto fue más marcado en niños más pequeños. Aunque se trata de una alteración transitoria, podría ser un marcador para la enfermedad tiroidea en un futuro, especialmente cuando se asocia a regiones con deficiencia en iodo (NEA-OECD, 2002).

• **Leucemias**

Se ha relacionado la exposición a la radiación con el desarrollo de algunas leucemias en personas como los trabajadores profesionalmente expuestos, los que reciben radiación diagnóstica y terapéutica, incluso en las que recibieron la radiación de las bombas atómicas de Japón.

Algunas formas de leucemia se asocian con eventos genéticos específicos, a menudo como resultado de la asociación de la activación de proto-oncogenes. Diferentes tipos de leucemias han sido asociadas a la radiación ionizante como la leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda y la leucemia mieloide aguda.

Algunos estudios han examinado la asociación entre la exposición a la irradiación relacionada con el accidente nuclear de Chernobyl y el riesgo de leucemia. La mayoría de éstos se han centrado en los niños, aunque algunas investigaciones han incluido adultos, fundamentalmente a los "liquidadores" y a individuos que vivían en áreas altamente contaminadas de Ucrania y Rusia.

El más exhaustivo y completo estudio para examinar la incidencia de leucemia y linfoma en la infancia en relación a la exposición a la radiación procedente de Chernobyl fue diseñado por ECLIS (The European Childhood Leukaemia-Lymphoma Incidence Study) (Moysich, 2002). Se recogieron datos de niños menores de 14 años, obtenidos de 36 registros de cáncer en 23 ciudades. El término medio de la

radiación fue calculada para cada área geográfica en base a las estimaciones del informe UNSCEAR 1988.

En los informes posteriores referentes a este estudio (Parkin *et al.*, 1996) se observó un pequeño incremento en la leucemia en la infancia en todas las ciudades Europeas, pero no hubo evidencia de que ese incremento fuera mayor en áreas más contaminadas.

Otros estudios valoran la exposición intrauterina a la irradiación (Petridou *et al.*, 1996; Hoffman, 2002) encontrando evidencia de que la leucemia en la infancia puede ser causada por exposición intrauterina a la radiación ionizante. Sin embargo esto no fue confirmado en investigaciones realizadas en Bielorrusia.

En conclusión, podemos decir que no existe evidencia de que la tasa de leucemia en la infancia haya aumentado como resultado del accidente nuclear de Chernobyl. La probabilidad de observar un incremento significativo de leucemias disminuye con el tiempo y los próximos años serán concluyentes (NEA-OECD, 2002).

1.2.2.2.- Defectos hereditarios

Dentro de las malformaciones congénitas se han estudiado con más detalle algunos síndromes concretos como la trisomía 21 y las alteraciones del Sistema Nervioso Central.

En 1994, se publicó un estudio sobre el incremento de la prevalencia de trisomía 21 tras el accidente, en Alemania (Sperling, 1994) que fue severamente criticado (Boice y Linet, 1994) y posteriores estudios no han confirmado este aumento en otros lugares de Europa (Dolk y Nichols, 2000).

La trisomía 21 se produce en la mayor parte de los casos por una no-disyunción en la meiosis. Los resultados experimentales demuestran que la irradiación puede inducir a una no-disyunción en la ovogénesis o espermatogénesis, aunque no pueden ser extrapolados en humanos (Verger, 1997).

La primera evidencia de una posible asociación entre malformaciones del SNC (esпина bífida y anencefalia) y el accidente nuclear de Chernobyl fue publicado por Akar *et al.* en 1988 en Turkia, observando un incremento durante los 6 primeros meses de 1987, fundamentalmente

en el subgrupo de anencefalias, con una disminución en la prevalencia en los últimos 6 meses de ese mismo año (Akar *et al.*, 1988).

Posteriormente se encontró un aumento en la prevalencia de anencefalia y espina bífida en áreas de Bielorrusia donde había más contaminación de ¹³⁷Cs, en el periodo comprendido entre 1987-1994 comparado con la del periodo comprendido entre 1982-1985 (Lazjuk *et al.*, 1997).

El grupo de trabajo EUROCAT (European Economic Communities Concerted Action on Congenital Anomalies) recoge datos de 16 regiones de Europa. Su análisis revela que no hay un incremento en la prevalencia del Síndrome de Down, anencefalia ni espina bífida (Dolk y Nichols, 1999).

Los datos epidemiológicos difieren de unos estudios a otros. Se han de tener en cuenta algunas consideraciones. Por una parte, existen dudas sobre los criterios de calidad de las bases de datos de los estudios epidemiológicos. Además, la mayoría de ciudades no registran las malformaciones diagnosticadas en el periodo prenatal que conducen a abortos. Por otra, las dosis estimadas de irradiación en varios países del hemisferio norte están dentro del rango de la radiación natural de fondo, por lo que no se puede afirmar que las malformaciones congénitas sean debidas a la irradiación producida por el accidente.

En base a los diferentes estudios realizados, UNSCEAR en su último informe (NEA-OECD, 2002) concluye que "no existe un incremento de defectos al nacimiento, malformaciones congénitas, abortos o nacimientos prematuros que pudieran estar unidos a la exposición a la radiación causado por el accidente".

1.2.3.- Conclusiones del impacto del accidente sobre la salud

Las principales conclusiones del impacto del accidente nuclear de Chernobyl sobre la salud que podemos establecer siguiendo el informe UNSCEAR 2000 (NEA-OECD, 2002), se pueden resumir en (Rahu, 2003):

1.- El único impacto sobre la salud atribuible a la irradiación ha sido el incremento del cáncer de tiroides en la infancia. Aunque este hallazgo

fue recibido con gran escepticismo por el período corto de latencia, hoy día es ampliamente aceptado.

2.- No existe actualmente evidencia internacionalmente acreditada de un riesgo aumentado de leucemia.

3.- No hay evidencia científica de un incremento de la incidencia del cáncer en general ni de mortalidad que pueda ser asociado a la exposición radiactiva.

4.- No hay evidencia de un incremento en las alteraciones congénitas.

5.- Existe evidencia de un aumento de alteraciones psicológicas debido al miedo a la irradiación y a la pobre y defectuosa información a la población sobre ésta.

6.- Los informes y estudios sobre los efectos causados por la irradiación difieren según el origen del análisis de los datos.

2.- Efectos de la radiación sobre el material biológico

Los conocimientos radiobiológicos son actualmente muy amplios. En este apartado haremos referencia a los mecanismos elementales de acción de la irradiación y de forma general a su efecto sobre el ADN, los cromosomas, las poblaciones celulares y los tejidos, así como un breve comentario de los efectos sobre el embrión y feto.

Es necesario considerar a la célula como una unidad anatómica y funcional para comprender las lesiones bioquímicas radioinducidas que en ésta se producen (Valls y Algara, 1994).

Dentro de la célula se llevan a cabo una serie de funciones relacionadas entre sí, siendo algunas de estas funciones procesos muy largos y complicados, mientras que otros son muy simples.

La alteración en alguna de las funciones complicadas da lugar a un trastorno que puede incluso llevar a la muerte celular; sin embargo la alteración en alguno de los procesos más simples permite que el resto de las funciones se desarrollen con aparente normalidad, mientras se repara la lesión producida.

A pesar de los numerosos estudios realizados en Radiobiología existen todavía dudas sobre los "blancos críticos" o estructuras vitales de cuya lesión deriva la destrucción celular, aunque parece cada vez más claro que el "blanco" fundamental está definido por el material genético (Alper, 1979).

La evidencia de que el "blanco crítico" de la lesión celular de la irradiación es el ADN se hace patente por los siguientes hechos (Mc Millan y Steel, 1997):

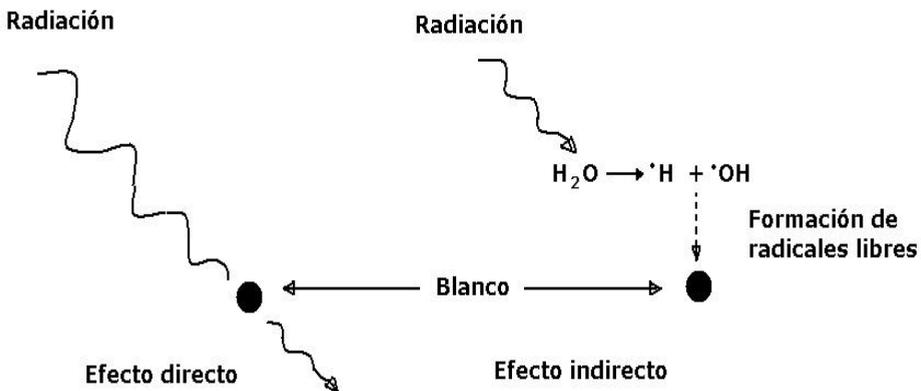
- Los estudios muestran que para matar a las células con irradiación, el citoplasma requiere una dosis más alta que el núcleo.
- Los isótopos como ^3H , ^{125}I al incorporarse al ADN producen daño en éste y muerte celular.
- La incidencia de aberraciones cromosómicas tras irradiación está íntimamente unida a la muerte celular.
- Cuando los análogos de la timidina se incorporan específicamente a la cromatina, modifican la radiosensibilidad celular.

Por tanto, las lesiones debidas a la irradiación pueden producirse en cualquiera de los órganos de la célula (mitocondrias, ribosomas, aparato de golgi, retículo endoplásmico...); sin embargo la porción más radiosensible de la célula es el núcleo. La lesión producida sobre el ADN es fundamental en la génesis de los efectos biológicos y especialmente en todo el proceso que conduce a la destrucción celular (Alper, 1979).

2.1.- Mecanismos de acción elementales

Distinguimos, como consecuencia de la lesión producida por la irradiación, dos tipos de acción elemental sobre la célula y más concretamente sobre el material genético incluido en el núcleo: acción directa y acción indirecta.

Figura 1.3 - Efecto directo e indirecto de la radiación



2.1.1.- Acción directa

Cuando las lesiones producidas son consecuencia inmediata de la ionización inducida por la radiación sobre el ADN.

2.1.2. Acción indirecta

Cuando la radiación puede interaccionar con cualquier estructura celular (esencialmente, el agua) e inducir la formación de especies químicas o radicales activos con capacidad de difusión suficiente para alcanzar y lesionar los "blancos celulares críticos".

Un "radical activo" es un átomo o molécula que como consecuencia de la ionización radioinducida queda con un electrón desapareado en su órbita externa, lo que le confiere un alto grado de actividad química.

En el efecto indirecto el proceso de la radiolisis del agua (componente mayoritario de la célula) es el más importante.

En la radiolisis del agua una molécula se ioniza causando la pérdida de un electrón:



La molécula de agua ionizada reacciona con otra molécula de agua formando el radical hidroxilo.

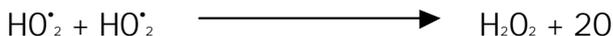


El electrón formado interactúa rápidamente con moléculas de agua, produciendo una molécula de agua excitada (H_2O^*), que da lugar a los radicales H^* y $\cdot\text{OH}$.



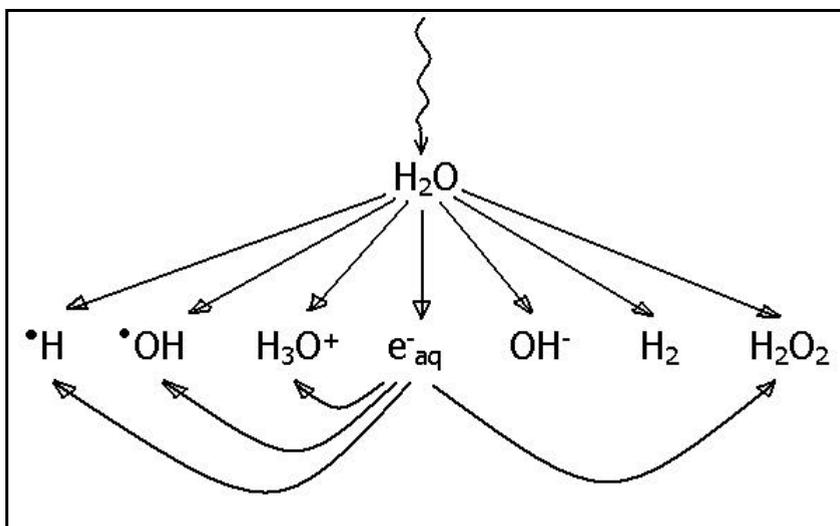
La vida de estos radicales no sobrepasan los 10^{-5} segundos. Durante este tiempo se recombinan unos con otros o reaccionan con el sustrato disuelto.

En presencia del oxígeno, se forman otros productos de radiolisis con propiedades oxidantes, como el radical hidroperóxido $\text{HO}\cdot_2$ y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 .



Además de los productos de oxidación, una forma de electrón estable aparece en la radiolisis del agua (e^-_{aq}). Estos electrones son altamente reactivos, siendo agentes reductores, al igual que el hidrógeno atómico.

Figura 1.4 - Productos de la radiolisis del agua. Interacciones de los electrones acuosos (Yarmonenko, 1988).



El abordaje de los radicales libres constituye el tema principal de este trabajo y se verán con más detalle en su apartado correspondiente.

Así pues, la ionización y consiguiente rotura de enlaces químicos por un lado (acción directa) y la inactivación mediante los diferentes "radicales activos", como consecuencia de la radiolisis del agua de fragmentos del ADN (acción indirecta) por otro, constituyen los mecanismos principales a través de los cuales se produce el efecto biológico radioinducido.

2.2.- Lesiones moleculares radioinducidas

Los tipos de lesión que presenta el ADN se pueden dividir en (Frankenberg-Schwager, 1989; Mc Millan y Steel, 1997):

- Rotura unihélice: Puede localizarse en el enlace fosfato o en el enlace azúcar-base. Se encuentra mediada por el radical $\cdot OH$. Es una lesión frecuente de fácil y rápida reparación a través del mecanismo "excisión-resíntesis"
- Enlace cruzado ADN-proteínas: Se localiza principalmente en regiones activas del ADN desde el punto de vista de la replicación

y/o transcripción. Reconoce como mediador químico el radical $\cdot\text{OH}$. Su mecanismo de reparación no se conoce bien.

- Lesión en las bases nitrogenadas: Suele adoptar tres formas diferentes: pérdida de una o más bases, modificación química de alguna de ellas y ligadura recíproca entre dos bases contiguas (dímero). La mayor parte de estos tipos de lesión afectan a la timina y reconocen como mecanismo de génesis la hidroxilación. Son lesiones susceptibles de reparación, procesos que cuando son defectuosos pueden conducir al desarrollo de "mutaciones puntuales" .
- Rotura bihélice: Suele producirse como consecuencia de los fenómenos ionizantes inducidos en puntos simétricos de ambas hélices. Su reparación es complicada por el defecto o ausencia de la información genética necesaria para la restitución. Se piensa que la doble rotura de ADN constituye una lesión crítica que puede conducir a la inactivación celular. Apoya esta idea el hecho de que pacientes afectados de "ataxia - telangiectasia", enfermedad hereditaria en la que existe deficiencia en la capacidad de reparación del ADN, son particularmente sensibles a los efectos de la radiación.
- Daño Múltiple localizado: Se produce una combinación de lesiones en un fragmento corto del genoma, una o más roturas dobles de hélice y un mínimo de roturas simples de cadena y/o lesiones de bases o azúcar. Esta lesión compleja se ha denominado Daño múltiple localizado (Ward, 1986).

2.3. Efectos de la radiación sobre los cromosomas

Las alteraciones morfológicas observables en los cromosomas se pueden clasificar en (Valls y Algara, 1994):

- Rotura simple en un cromosoma: se producen dos fragmentos, uno con centrómero y otro sin él. En la mayor parte de estas rupturas se produce la "restitución", es decir se vuelven a unir los fragmentos.
- Rotura simple en dos cromosomas: se producen 4 fragmentos: en la "translocación" se une un fragmento con centrómero a otro sin centrómero y viceversa. En el caso de que se produzcan en las

- células germinales pueden aparecer malformaciones congénitas en los individuos de la descendencia.
- Rotura doble en un cromosoma: si se produce en un brazo, puede perderse el fragmento intermedio ("deleción"), siendo el daño dependiente de la información genética perdida, o bien puede cambiar el lugar de los fragmentos conservando el cromosoma el material genético con alteración de la secuencia genética ("inversión"). Si se produce en los dos brazos del cromosoma, los dos extremos se pueden cambiar entre sí ("inversión"), o bien los dos extremos del fragmento con centrómero se unen formando los "cromosomas en anillo".
 - Adhesividad de los cromosomas: cuando la irradiación alcanza a la célula en fase de división, especialmente en anafase, aparecen puentes químicos entre los cromosomas que impiden que se separen unos de otros. Este fenómeno se expresa en el laboratorio por un aumento de la densidad de las soluciones de ADN en las células irradiadas.

2.4.- Efectos de la radiación sobre poblaciones celulares

Cualquier población celular se caracteriza por el hecho de que sus componentes no tienen todos la misma actividad proliferativa. Esquemáticamente, podríamos dividir a las células en compartimentos funcionales. Así, podemos hablar de células fisiológicamente muertas, células estériles (correspondería a células biológicamente muertas), células en reposo (G_0) y células con actividad mitótica o proliferativa (que comprende células en las diferentes fases del ciclo celular activo: G_1 o fase de pre-síntesis de ADN, S o fase de síntesis, G_2 o fase de post-síntesis de ADN y M o mitosis).

Todos los compartimentos celulares están relacionados entre sí, así las células resultado de la proliferación pueden quedar en reposo G_0 , pasar a células estériles o morir tras la mitosis. Además, las células en reposo pueden reincorporarse al ciclo activo.

Desde el punto de vista radiobiológico es muy importante tener en cuenta la proporción de células con actividad mitótica en relación al número total de células de tejido (el llamado factor de crecimiento) puesto que éste va a ser un factor determinante de los efectos de la

radiación sobre las poblaciones celulares y en consecuencia sobre los tejidos correspondientes.

Dependiendo de la dosis de irradiación, los fenómenos que se observan en un cultivo celular, administrando dosis progresivamente crecientes, pueden ser: retraso en la división celular, fallo reproductivo, muerte celular intermitótica y muerte inmediata por necrosis.

- Retraso en la división celular: las bajas dosis impiden progresar a una parte de células que habían iniciado la mitosis. A medida que transcurre el tiempo las células se recuperan y reinician su actividad paulatinamente. Estas células, junto con las que habían sido detenidas hace que el número de mitosis aumente por encima de lo normal, para luego descender a valores normales.

- Fallo reproductivo: cuando las dosis son algo más elevadas, las lesiones celulares son más importantes y algunas células, tras la primera mitosis, pierden su capacidad de división. Como consecuencia el número de mitosis permanece por debajo de lo normal.

- Muerte intermitótica: si las dosis son aún más elevadas, el daño celular radioinducido es mayor y las células no pueden progresar a mitosis. Algunas consiguen recuperarse pero el número de mitosis permanece por debajo de lo normal.

- Muerte inmediata por necrosis: Ocurre cuando las dosis son muy elevadas. La necrosis por licuefacción ocurre de una manera más rápida que la necrosis por coagulación.

Otro factor importante a tener en cuenta es el efecto de la irradiación sobre las diferentes fases del ciclo celular, puesto que dependiendo de la fase en que se encuentren las células serán más o menos sensibles a la irradiación. Así pues, la sensibilidad de las células a la irradiación es menor en fase G_1 , cuando no se ha iniciado la síntesis de ADN. A medida que ésta aumenta la radiosensibilidad también aumenta, disminuyendo cuando la célula entra en mitosis (Steel, 1997).

El concepto de radiosensibilidad y de su inverso, la radiorresistencia, nos va a ayudar a comprender el por qué algunos tejidos expresan efectos de la irradiación de forma temprana o tardía.

En 1906 los radiobiólogos franceses Bergonie y Tribondeau, irradiando testículos de ratón, observaron que las células mitóticas activas (células

germinales) sufrían en mayor grado los efectos de la radiación que las células intersticiales, mitóticamente menos activas. De esta observación se concluyó que las células son más radiosensibles cuanto más se multiplican y más indiferenciadas son. Como consecuencia, la radiosensibilidad será directamente proporcional a su índice mitótico e inversamente proporcional a su diferenciación.

2.5.- Efectos de la irradiación sobre los tejidos. Efectos agudos y crónicos. Efectos estocásticos y deterministas.

Teniendo en cuenta los conceptos comentados anteriormente, podemos decir que los tejidos de proliferación rápida manifestarán precozmente los efectos de la radiación, porque las células se dividen con mucha frecuencia; en cambio los tejidos de proliferación lenta manifestarán los efectos de forma tardía.

Podemos hablar de efectos agudos propios de los tejidos de proliferación rápida (como la piel, epitelio intestinal, médula ósea, sistema inmunitario, células germinales) y efectos crónicos como consecuencia de las alteraciones en los tejidos de proliferación lenta (como cartílago y hueso, sistema nervioso, tejido conjuntivo).

Los efectos producidos por la irradiación serán muy variados dependiendo de los tejidos y órganos afectados (Enami *et al.*,1991; Fajardo, 1998). Estos efectos y su gravedad dependerán no sólo del tejido afecto, sino también de otros factores como el volumen comprometido del tejido en cuestión, la dosis y tasa de dosis recibida, así como la capacidad de reparación y regeneración del tejido.

En la tabla 1.3 observamos ejemplos de diversos efectos, agudos y crónicos, producidos por la radiación sobre diferentes tejidos y órganos.

Tabla 1.3 - Efectos producidos por la irradiación

Órgano	Efecto de la irradiación
Piel	Eritema, epidermitis, alopecia, fibrosis
Glándulas salivares	Xerostomía
Ojos	Cataratas
Tiroides	Hipotiroidismo
Aparato digestivo	Disfagia, náuseas, vómitos, diarreas
Hígado	Enf. veno-oclusiva, hepatopatía
Pulmón	Neumonitis, fibrosis
Corazón	Pericarditis, miocarditis
Riñón	Nefritis
Vejiga urinaria	Cistitis
Médula ósea	Anemia, leucopenia, plaquetopenia
Sistema inmunitario	Linfopenia
Gónadas	Amenorrea, esterilidad
SNC	Encefalopatía, mielitis transversa

Los efectos producidos por la irradiación, también los podemos clasificar como efectos deterministas o estocásticos:

1.- Efectos somáticos o deterministas (también llamados "no estocásticos"):

Como consecuencia de la irradiación determinado número de células de un órgano o tejido mueren o se ven inutilizadas para la división o funcionamiento normal, por lo que habrá una pérdida de función del órgano. La gravedad de estos efectos aumenta a medida que aumenta la dosis de radiación recibida, siempre que esté por encima de la dosis umbral (dosis que establece el límite entre la aparición o no del efecto). Los efectos deterministas ocurren a dosis relativamente altas, si bien la dosis umbral y la severidad de los efectos están influenciados, entre otros factores, por la susceptibilidad individual.

2.- Efectos estocásticos:

Son efectos de naturaleza aleatoria, es decir, ocurren al azar. Pueden tener lugar tras exposiciones a muy bajas dosis (no existe dosis umbral). Son de naturaleza probabilística, es decir, que la probabilidad de que tenga lugar el efecto aumenta según aumenta la dosis, pero su gravedad no depende de la dosis recibida.

Si la célula modificada es una célula somática hablaremos de efectos estocásticos somáticos, pero si se trata de una célula germinal el efecto

biológico no se pondrá de manifiesto en el individuo expuesto sino en su descendencia, denominándose efectos estocásticos hereditarios.

Los efectos estocásticos más relevantes son el desarrollo del cáncer y los defectos hereditarios.

Tabla 1.4 - Esquema de las características de los efectos estocásticos y deterministas

	Estocásticos	Deterministas
Aparición	Tardía	Inmediata o tardía
Dosis umbral	NO	SI
Relación dosis - efecto	?	Lineal
Naturaleza	Somáticos o hereditarios	Somáticos
Gravedad	Independiente de la dosis	Dependiente de la dosis
Mecanismo	Lesión subletal de una o pocas células	Lesión de muchas células

2.6. Efectos de la radiación sobre el embrión y feto

Los efectos de la radiación sobre el embrión y feto los podemos clasificar en:

- Efectos genéticos: como consecuencia de las alteraciones en los genes del óvulo y/o espermatozoide.

- Efectos congénitos: como consecuencia de la irradiación "in útero" una vez se ha producido la fecundación y que son consecuencia de la alteración en el desarrollo.

Los efectos producidos en embriones y fetos dependen del momento del desarrollo en que se encuentren (Hall, 1978), ya que sus células presentan una etapa madurativa diferente (fase de preimplantación, fase de organogénesis y fase fetal).

Los principales conocimientos derivan de estudios con animales de experimentación, accidentes nucleares, explosiones atómicas y exposiciones médicas.

De una forma general, los estudios en embriones animales nos muestran los efectos derivados de la irradiación según en la fase en que se produzcan:

- Fase de preimplante: en esta fase el número de células totales es bajo. Una dosis de radiación, por pequeña que sea, tiene muchas probabilidades de llevar a la muerte prenatal. Si el embrión sobrevive lo habitual es que no tenga malformaciones pero, en caso de que aparezcan, las más frecuentes son la anencefalia o exencefalia.

- Fase de organogénesis: Se inicia la formación de los órganos por diferenciación de las células del embrión. Se pueden producir malformaciones, sobre todo las relacionadas con el Sistema Nervioso Central y órganos relacionados como los ojos o el macizo facial.

- Fase fetal: En esta fase las células ya están diferenciadas, produciéndose el crecimiento, por lo que el feto tolera dosis más altas. Los efectos se pueden manifestar más tarde, como el envejecimiento prematuro, carcinogénesis o alteraciones en el desarrollo.

La incidencia de anomalías congénitas y/o genéticas en embriones humanos tiene un notable interés debido a la utilización de radiaciones con fines diagnósticos, terapéuticos, industriales y relacionadas con pruebas nucleares.

El problema principal se plantea cuando se intenta establecer la relación causa-efecto. Ello es debido, por una parte, a la existencia de anomalías congénitas espontáneas y por otra, a que los trastornos radioinducidos no son distinguibles de los espontáneos. Si además se añade la dificultad que existe en determinar cual ha sido la dosis absorbida, la dificultad en atribuir a una determinada exposición una malformación concreta es mucho mayor.

3.- Estrés oxidativo

3.1. Concepto de radical libre y estrés oxidativo

El oxígeno es vital para la existencia de los organismos aerobios. En contrapartida, este oxígeno es inherentemente lesivo para ellos. Este hecho viene dado por la transformación del oxígeno en radicales libres.

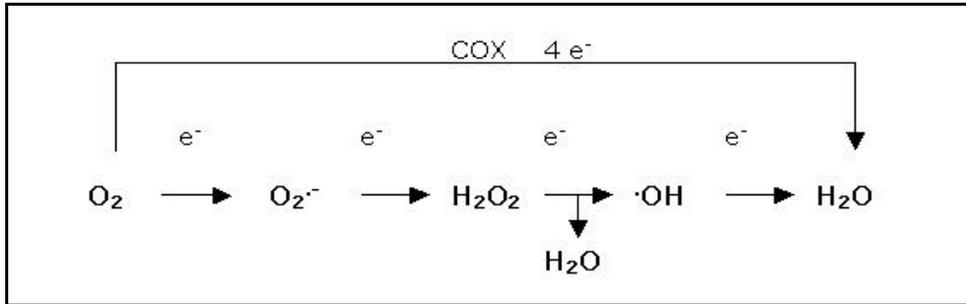
Los radicales libres son moléculas, de naturaleza paramagnética, que en su configuración electrónica presentan un electrón desapareado, lo cual les confiere una reactividad muy alta y por tanto inestabilidad y una vida media muy corta. Esta reactividad les permite interactuar con moléculas orgánicas a las que modifican oxidativamente alterando su estructura y posteriormente su función.

Estas moléculas o átomos están implicados en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades (Halliwell y Gutteridge, 1989; Gutteridge, 1993), entre las que podemos citar: cánceres, diabetes, patologías cardiovasculares, procesos reumáticos, patologías gastroentéricas, afecciones broncopulmonares y en procesos neurodegenerativos. También se han visto implicados en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Bondy, 1992) y en el ejercicio físico extremo.

Esto ha dado lugar a numerosos estudios con el fin de desarrollar captadores inhibidores enzimáticos o moduladores de los mismos.

La mayor parte de los radicales libres derivan del oxígeno molecular como consecuencia de su activación a través de su reducción secuencial o monovalente. Ésta consiste en la captación progresiva por parte del mismo de cuatro electrones, provocando su reducción a dos moléculas de agua. Este proceso químico se acompaña de la generación de radicales libres (Fridovich, 1978).

Según se puede observar en la figura 1.5, se forman especies reactivas por adición secuencial de electrones: en el siguiente orden: $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y $\cdot OH$. En cambio, la adición de cuatro electrones al oxígeno, como ocurre en la citocromo oxidasa mitocondrial (COX), permite su reducción a agua sin que se liberen radicales libres

Fig.1.5 - Vía univalente de reducción del oxígeno

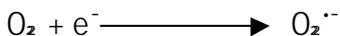
Mediante este mecanismo, el oxígeno molecular se reduce parcialmente para dar lugar a los intermediarios de este gas, entre los que destacan el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Estos intermediarios, parcialmente reducidos del oxígeno son producto del metabolismo oxidativo normal de las células, lo que justifica la existencia de efectivos sistemas antioxidantes para contrarrestar su actividad citotóxica y hacer compatible el estilo de vida aerobia.

Podemos definir el **estrés oxidativo** como el desequilibrio entre la concentración de sustratos pro-oxidantes y antioxidantes, siendo el predominio de los primeros frente a los segundos lo que condiciona el estado de destrucción oxidativa o citotoxicidad celular (Sies, 1986). El estrés oxidativo es un resultado inevitable de la vida en un medio rico en oxígeno.

3.2.- Principales radicales libres

3.2.1.- Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Se forma al añadir un electrón al oxígeno molecular.



Es una de las especies oxigénicas menos reactiva, pero potencialmente tóxica ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos.

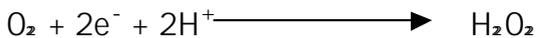
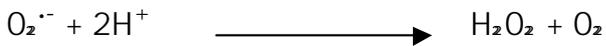
La mayor fuente de producción de este radical es la fuga de electrones desde varios componentes de la cadena de transporte electrónico (Boveris *et al.*, 1972). Una gran cantidad de radical $O_2^{\cdot-}$ intracelular se produce en la mitocondria.

El anión superóxido se genera como producto de reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de deshidrogenasas flavoproteínicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, etc.) de oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, citocromo P450, galactosa oxidasa) y en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la riboflavina o la cisteína (Sáez *et al.* 1982; Viña *et al.*, 1983).

3.2.2.- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

No es un radical propiamente dicho, pero su toxicidad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas.

Constituye el estado de reducción de dos electrones por reducción directa del O_2 o por dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$



La producción de peróxido de hidrógeno a partir del oxígeno se puede llevar a cabo por muchas enzimas como superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, Diaminoácido oxidasa, etc. (Fridovich, 1986a) así como por reacciones químicas, como la auto-oxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre.

Algunos autores describen la relación del H_2O_2 con los factores de transcripción NF κ B y AP-1, capaces de inducir la transcripción de genes como la IL-2 (interleukina-2), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), antígenos del complejo de histocompatibilidad y c-fos (Schreck y Baeuerle, 1994). Por otra parte también se ha comprobado que otro agente oxidante como el tBOOH aumenta la expresión de antígenos HLA de clase I a través de la activación de NF κ B, c-fos y c-jun en células de fibrosarcoma murino (Oliva, 2001; Tormos, 2004).

3.2.3.- Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

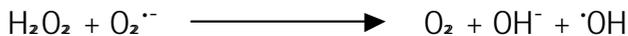
Es el radical libre más reactivo con una vida media estimada de aproximadamente unos 10^{-9} s (Liochev y Fridovich, 1994), lo que le confiere su gran toxicidad con importantes implicaciones fisiopatológicas en diversas entidades nosológicas.

Existen varios mecanismos de formación del radical hidroxilo "in vivo":

- Radiación ionizante sobre moléculas de agua.
- Fotólisis de peróxido de hidrógeno.
- Reducción de ozono por transferencia electrónica.
- Reacción de Fenton (Fenton 1984). En presencia de catalizadores metálicos como el ión ferroso (Fe^{2+}) o el ión cuproso (Cu^{2+}).



- Reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1934)



Esta reacción también es catalizada por metales como hierro o cobre.

3.2.4.- Radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$)

Tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos. Se forma a partir de hidroperóxidos orgánicos como los lípidos, o por pérdida de hidrógeno en ROOH .

3.2.5.- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

Constituye una forma excitada del oxígeno molecular. Si al oxígeno basal (forma triplete), que es un birradical con espines paralelos, se le suministra energía suficiente, uno de sus dos electrones desapareados sufre una inversión de espín quedando ambos antiparalelos, lo que le confiere una gran reactividad (oxígeno singlete) (Barja, 1997).

Su vida media es del orden de 10^{-6} segundos.

Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varios enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, la lipooxigenasa y prostaglandínsintetasa, entre otros (Karnofsky, 1989).

3.2.6.- Óxidos de nitrógeno

Algunos de los óxidos de nitrógeno son radicales libres, al tener electrones desapareados. Entre ellos está el radical nitrosilo, producido por la reducción monovalente del óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\bullet}).

Se forma enzimáticamente a partir de la arginina, reacción catalizada por la óxido nítrico sintetasa (Moncada *et al.*, 1991). Se han descrito efectos citotóxicos y citoprotectores para el óxido nítrico (Wink *et al.*, 1995; Wink *et al.*, 1996).

Por una parte juega un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo local, en la defensa inmunitaria, en la inhibición de la agregación plaquetaria y como neurotransmisor. Sin embargo, un exceso de óxido nítrico es citotóxico. La formación de un anión peroxinitrico (ONOO^-) puede inducir la peroxidación lipídica e interferir con la señalización celular por interacción de residuos de tirosina en proteínas (Beckman, 1996). Además, la capacidad de reacción del NO^{\bullet} con el hierro de proteínas intracelulares o con ácidos nucleicos puede dar lugar a mutaciones y roturas de ADN.

3.3. Fuentes de radicales libres

Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un doble origen:

- Endógeno: como consecuencia de las reacciones de óxido-reducción del metabolismo intermediario.
- Exógeno: aquellas que se encuentran en los procesos físico-químicos propios del medio ambiente.

3.3.1.- Fuentes exógenas

- Radiaciones ionizantes o de alta energía: Es el ejemplo más representativo de las fuentes exógenas de radicales oxigénicos al mismo tiempo que supone el mecanismo de inducción tumoral más conocido y estudiado. La radiación ionizante genera intermediarios reactivos del oxígeno a través de la radiólisis del agua, siendo los

radicales $\cdot\text{OH}$ la especie predominante en estas reacciones. Bajo condiciones aerobias, también se producen los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 . Los productos de la radiolisis del agua, por radiación X o gamma, así como los efectos tóxicos inducidos por estos, han sido estudiados con gran interés durante los últimos años, como ya hemos visto anteriormente.

- Biotransformación de drogas e inducción de ciclos re-dox: destacan por su importancia clínica los antibióticos antitumorales de estructura quinónica. Estos compuestos son biotransformados a través de una serie de reacciones de óxido-reducción cíclica en la que, además de radical semiquinónico, se generan radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y donde la participación catalítica de iones metálicos es, a veces, inevitable. Este hecho ha sido demostrado y es especialmente interesante en el caso de diversos xenobióticos con capacidad cancerígena conocida.

- Radiación solar: la luz ultravioleta induce la formación de dímeros pirimidínicos y a determinadas longitudes de onda produce también H_2O_2 responsable de la modificación oxidativa de bases nucleotídicas del ADN (timina glicol). Este efecto es potenciado por la presencia de metales de transición en el medio.

- Humo de tabaco: constituye una fuente importante de intermediarios reactivos de origen exógeno. La fase gaseosa del humo inactiva al inhibidor de la alfa 1 proteinasa dejando libre y descontrolada la actividad elastásica. Los componentes del humo del tabaco contienen además estructuras quinónicas y metales de transición formándose así radicales $\cdot\text{OH}$ responsables de la modificación oxidativa del ADN.

- Otros contaminantes ambientales: como el ozono que interacciona con las membranas de las mucosas generando aldehídos reactivos y H_2O_2 , y los pesticidas, como el paraquat que produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el producto de su dismutación, H_2O_2 .

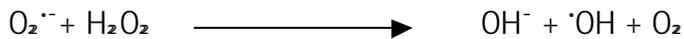
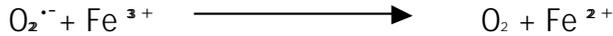
3.3.2.- Fuentes endógenas

- Cadena de transporte mitocondrial

En los tejidos sanos la fuente principal de radicales libres son las mitocondrias, donde tiene lugar la cadena de transporte electrónico, generándose anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

- Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, siendo el más importante el ión ferroso.



El superóxido reduce el hierro férrico a ferroso y este reduce monoeléctricamente al peróxido de hidrógeno dando lugar a la formación del radical hidroxilo, altamente reactivo.

- Células fagocíticas activadas

Las células polimorfonucleares y los macrófagos experimentan un aumento muy avanzado de su consumo de oxígeno, llamado "estallido respiratorio" tras el contacto con un agente infeccioso. Este consumo de oxígeno ocurre fundamentalmente en la membrana plasmática donde el complejo enzimático NADPH oxidasa se activa y produce radicales libres a partir del oxígeno basal como el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y electrones derivados de la vía de las pentosas (Bellavite, 1988).

- Sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico

Los citocromos P450 y b5 oxidan los ácidos grasos insaturados y xenobióticos. Los citocromos P450 están constituidos por monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a radicales libres o generadores de radicales libres que pueden ser liberados por la célula (Dolphin, 1988).

- Metabolismo oxidativo en el que intervienen diferentes enzimas

Sistema hipoxantina/xantina oxidasa: La xantina deshidrogenasa participa en el metabolismo de las purinas, oxidando la hipoxantina a xantina y ésta a ácido úrico. En su forma deshidrogenasa no produce especies reactivas del oxígeno pero en condiciones de hipoxia la xantina deshidrogenasa se convierte en xantina oxidasa, empleando el oxígeno

molecular como aceptor de electrones (Radi *et al*, 1992) generando grandes cantidades de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 .

Otra enzima importante es la monoamino oxidasa (MAO) que interviene en la vía de eliminación de los neurotransmisores dopamina y adrenalina, generándose peróxido de hidrógeno.

Enzimas citosólicos como la aldehído oxidasa y óxido nítrico sintasa o enzimas unidos a la membrana plasmática como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa que participan en el metabolismo del ácido araquidónico, generan radicales libres (Frei, 1994).

- Reacciones de autooxidación de grupos tiólicos, proteínas, flavinas reducidas, quinonas reducidas...

3.4. Moléculas susceptibles de lesión por especies reactivas

3.4.1.- Glúcidos

Los radicales libres provocan la excisión del enlace C-H de la desoxirribosa y despolimerizan macromoléculas glucídicas como el ácido hialurónico y los proteinglicanos. Este daño oxidativo a los polisacáridos de función estructural da lugar a procesos degenerativos como la artritis reumatoide (Greenwald y Moy, 1980).

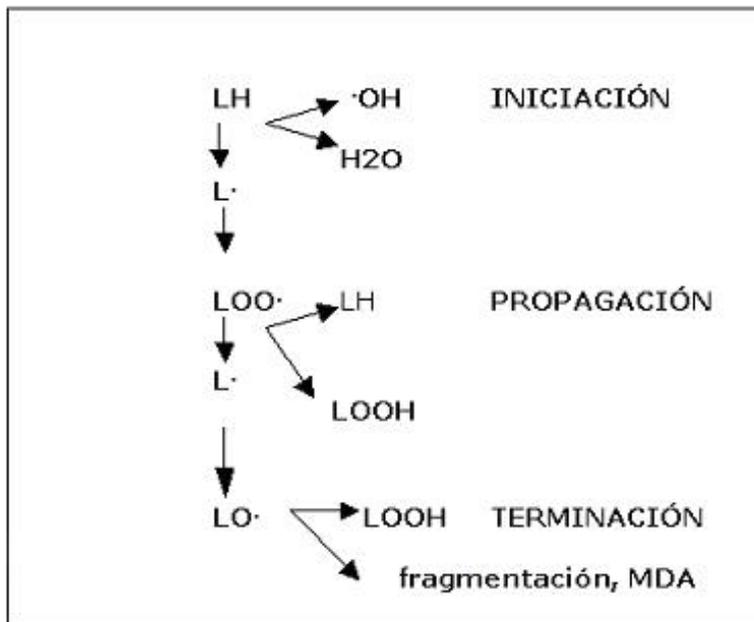
3.4.2.- Lípidos

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por los radicales libres (Cheeseman, 1993). Los ácidos grasos insaturados son los constituyentes fundamentales de las membranas celulares, por lo que la peroxidación provoca una alteración en la conductibilidad de las membranas que puede conducir a la lisis celular.

El mecanismo de peroxidación lipídica tiene lugar en tres fases: Iniciación, propagación y terminación.

La iniciación consiste en la extracción de un electrón de un carbono contiguo a un doble enlace por parte de un iniciador como el $\cdot\text{OH}$. Se forma un radical alquil ($\text{L}\cdot$) que se convierte en peroxilo ($\text{LOO}\cdot$) por adición del oxígeno y que en varias reacciones, como su reducción a hidroperóxido (LOOH), puede dar lugar a la propagación de la peroxidación al generar otro radical alquil ($\text{L}\cdot$) en el ácido graso de la membrana. La reacción se termina por la reacción de radicales (por ejemplo de tipo alquil) contiguos, dando lugar a puentes cruzados (L-L) o mediante la fragmentación del ácido graso en gran número de productos como el malondialdehido (el marcador más ampliamente utilizado) el 4-hidroxinonenal o alcanos que aparecen en el aire espirado (hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano) (Freeman y Crapo, 1982; Cheeseman, 1993; Halliwell, 1994).

Figura 1.6 - Esquema de peroxidación lipídica (Barja, 1997)



La lipofucsina, un pigmento que se genera de la degeneración de estructuras fundamentalmente lipídicas, se acumula intracelularmente concomitante con el envejecimiento de los tejidos. Este hecho es uno de los puntos de partida para la hipótesis de la intervención de los radicales libres en el proceso de envejecimiento (Lippman, 1985).

3.4.3.- Proteínas

Los aminoácidos presentes en las proteínas son susceptibles de ser atacados por los radicales libres, siendo la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina y cisteína los que más procesos oxidativos sufren (Davies *et al.*, 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y por tanto a una pérdida o modificación de su función biológica.

Otro mecanismo de oxidación de proteínas son los llamados "Sistemas de oxidación catalizada por metal", cuyos aminoácidos más sensibles son la histidina, prolina, arginina, lisina y cisteína (Stadtman, 1992).

La prolina forma parte del colágeno, proteína estructural fundamental en el proceso de cicatrización. Se ha demostrado que el radical hidroxilo provoca una desnaturalización del colágeno al romper los enlaces de la prolina integrante (Arisawa *et al.*, 1996).

3.4.4.- Ácidos nucleicos

El ADN puede sufrir daños oxidativos en todos sus componentes. La lesión del ADN por estos mecanismos lleva la puesta en marcha de mecanismos reparadores con la disminución de concentraciones intracelulares de NAD-H, NDAP-H, GSH y ATP. Esta depleción provoca en la célula un aumento de niveles de calcio que induce la liberación de metales pesados a nivel citosólico y posteriormente a la expansión de especies reactivas y destrucción celular (Halliwell y Guteridge, 1989).

El daño al ADN por radicales libres puede ocurrir por reacción con los residuos de desoxirribosa o reacción con las bases del ADN.

Cuando un radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN se produce una ruptura de la hebra. La hebra intacta puede mantener juntos los dos extremos de la hebra dañada hasta que actúen enzimas reparadoras, por lo que no se considera crítico, a no ser que se produzca una ruptura cercana en las dos cadenas (Breen y Murphy, 1995).

Cuando los radicales libres reaccionan con las bases de ADN, provocan la aparición de bases modificadas, que pueden ser determinadas como medida indirecta del estrés oxidativo sobre los ácidos nucleicos. Una de las lesiones más frecuente es la hidroxilación de la deoxiguanosina en la porción C8, lo que da lugar a la formación de 8-hidroxi-deoxiguanosina

(8-OHdG) que a su vez sufre un paso más de oxidación en el organismo pasando al isómero cetónico 8-oxo-2'- deoxiguanosina (8-oxo-dG).

Existen datos que apoyan la capacidad mutagénica de esta base modificada. Se han encontrado cifras elevadas de 8-oxo-dG en algunos tumores malignos como el carcinoma colorectal (Oliva, 1997; Ripoll, 1996), así como el cáncer de pulmón, ovárico, prostático y de mama (Olinski *et al.*, 1992). En el caso del carcinoma colorectal las cifras de 8-oxo-dG se relacionan con alteraciones genéticas en distintos genes supresores, localizándose la mayoría de las mutaciones en el gen p53.

El daño oxidativo al ADN mitocondrial es unas 15 veces superior al del ADN nuclear (Richter, 1988). Se debe, fundamentalmente, a la cercanía de dicho ADN al lugar principal de generación de radicales libres en la célula sana, la cadena de transporte electrónico mitocondrial y a su carencia de histonas y poliaminas que pueden protegerlo, por lo que su capacidad de reparación es mínima en relación con el ADN nuclear. Además el ADN mitocondrial no posee intrones, por lo que la modificación de cualquier base afecta normalmente a una zona de ADN codificante (Linnane *et al.*, 1989; Ames *et al.*, 1993).

El daño oxidativo al ADN mitocondrial juega un papel determinante en el envejecimiento (Barja, 1996).

3.5.- Defensa antioxidante

El mantenimiento de la homeostasis redox del tejido sólo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y la intensidad de eliminación de los radicales libres.

Cuando aumenta la producción de radicales libres debido a causas exógenas o endógenas se puede dar una regulación compensadora con las defensas antioxidantes.

Halliwell definió antioxidante como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato" (Halliwell, 1996; Sies, 1993).

Desde el punto de vista de la fisiología celular se pueden clasificar como:

- antioxidantes primarios: previenen la formación de radicales libres, como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina).
- Antioxidantes secundarios: captadores de radicales libres como el Glutatión, Vit E, Vit C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell y Guterigde, 1990).
- Antioxidantes terciarios: reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres, como los sistemas proteolíticos intracelulares que degradan las proteínas dañadas oxidativamente (Davies *et al.*, 1987) enzimas reparadoras de ADN, etc.

Desde el punto de vista bioquímico los antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos.

3.5.1.- Antioxidantes enzimáticos

3.5.1.1.- Superóxido dismutasa

De los sistemas enzimáticos fue la primera enzima en descubrirse. Fue descubierta por Joe Mc Cord e Irwin Fridovich en 1969 (Mc Cord y Fridovich, 1969).



Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta O_2 molecular, mientras que la otra se reduce a H_2O_2 , por lo tanto lo que hace es transformar una especie reactiva (el superóxido) a otra (peróxido de hidrógeno). Esto podría explicar algunos resultados aparentemente paradójicos en los que un exceso de enzima puede llevar al individuo a una situación deletérea.

Existen dos tipos de SOD intracelular: la SOD manganeso (SOD Mn) localizada en la mitocondria y la SOD cobre/ cinc (SOD Cu/Zn) que se encuentra en el citosol (Fridovich, 1983).

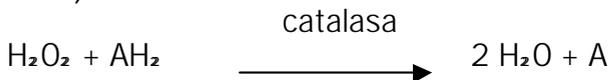
3.5.1.2.- Catalasa

La catalasa cataliza dos grupos de reacciones:

- Reacción catalítica: Se produce la dismutación de dos moléculas de peróxido de hidrógeno. Una se oxida a oxígeno y la otra se reduce a dos moléculas de agua.



- Reacción peroxidativa: Se utiliza un sustrato inespecífico (alcoholes, aldehídos o ácidos orgánicos) como reductor para transformar una sola molécula de peróxido de hidrógeno en dos de agua (Halliwell y Guterigde, 1989)



La catalasa se encuentra fundamentalmente en los peroxisomas (Tolbert, 1981). En los últimos estudios se ha descrito cierta actividad también en mitocondrias y citosol (Rodríguez *et al*, 2000).

3.5.1.3.- Glutation peroxidasa

En la década de los 50, Mills descubre la actividad de la enzima glutacion peroxidasa (GPx). Ésta elimina hidroperóxidos utilizando GSH (glutacion reducido) como reductor.

Existen dos tipos:

Glutation peroxidasa dependiente de selenio, proteína tetramérica con 4 átomos de selenio. El selenio es un elemento esencial para su actividad y controla la síntesis de la proteína.

Elimina tanto hidroperóxidos orgánicos (ROOH) como inorgánicos (H_2O_2). Su actividad se ve muy afectada por el contenido de selenio en la dieta (Ketterer, 1986).



Glutation peroxidasa no selenio dependiente: Es una proteína dimérica, en algunas de sus formas. Es capaz de eliminar peróxidos orgánicos (ROOH).

Las GPx están presentes en el citosol y en las mitocondrias (Ketterer, 1986).

3.5.1.3.- Glutation reductasa

La glutatión reductasa reduce una molécula de glutatión oxidado (GSSG) a dos de glutatión reducido (GSH) a expensas de equivalentes de reducción en forma de NADPH.

La elevación del cociente GSSG/GSH es altamente tóxico para la célula. La GSH reductasa presenta FAD unido a la enzima que es esencial ya que actúa como coenzima.

Ya que la glutatión reductasa necesita de NADPH, las enzimas de las vías de las pentosas, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (productoras de NADPH) constituyen una segunda línea de defensa antioxidante.

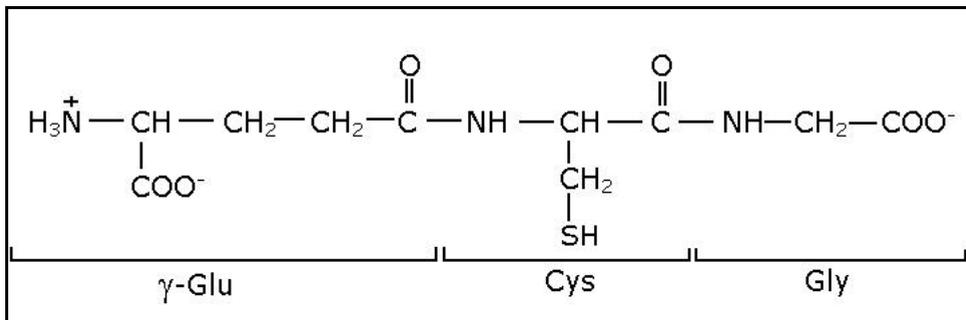
La glutatión reductasa se encuentran fundamentalmente en el citosol, aunque también existe actividad en la mitocondria (Panfili *et al*, 1991).

3.5.2.- Antioxidantes no enzimáticos

3.5.2.1.- Glutation

Fue descubierto por Hopkins en 1921. Es un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina. Su actividad antioxidante se debe a la capacidad reductora del grupo tiólico de la cisteína.

Figura 1.7 - Estructura química del glutatión



Existen dos formas de glutatión, atendiendo a su estado de reducción:

- glutatión reducido (GSH)
- glutatión oxidado (GSSG)

El glutatión reducido actúa como antioxidante en reacciones enzimáticas como la GPx:



También es capaz de reaccionar independientemente de la GPx con especies reactivas como el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y $\cdot\text{OH}$.

El glutatión oxidado es un compuesto de dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas. Es muy tóxico para las células. Como ya se ha comentado anteriormente la elevación del cociente GSSG/GSH representa una situación de oxidación. El enzima glutatión reductasa regenera el glutatión oxidado a glutatión reducido.

Las funciones fisiológicas del GSH son diversas: constituye uno de los antioxidantes más abundantes de la célula adquiriendo un papel protector frente al estrés oxidativo, participa en la regulación de la síntesis de proteínas (Zehavi-Willner *et al.*, 1970), interviene en funciones como la síntesis de ADN, detoxificación de xenobióticos (Orrenius y Moldeus, 1984), captación de aminoácidos de algunos tejidos (Viña *et al.*, 1989), modulación de actividades enzimáticas (Pajares *et al.*, 1992) y proliferación celular (Terrádez *et al.*, 1993) entre otras.

3.5.2.2.- Vitamina C

La idea de que el ascorbato es un reductor importante en el organismo fue introducido por Szent-Gyorgyi en 1928. Linus Pauling, durante varias décadas posteriores constituyó un hito fundamental en la investigación de la vitamina C.

Se considera uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (Bendich *et al.*, 1986).

Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa pero en humanos y cobayas no pueden sintetizarla, teniendo que ser incorporado a la dieta.

El ácido ascórbico puede eliminar $Q^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 y también puede extinguir oxígeno singlete (Sies, 1992).

Cuando reacciona con las especies reactivas del oxígeno, se oxida a dihidroascorbato, el cual aunque es muy inestable puede ser reducido nuevamente a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa.

Se sabe que el GSH y el ascorbato interaccionan de forma cooperativa (Meister, 1994; Winkler *et al.*, 1994). Los suplementos de la dieta con ácido ascórbico elevan los niveles de GSH.

Actualmente existen numerosos estudios que atribuyen un papel protector del ascorbato y otros antioxidantes naturales de la dieta al desarrollo de cánceres (Blot *et al.*, 1993), enfermedades cardiovasculares (Gey *et al.*, 1993), cataratas (Vitale *et al.*, 1993) y otra enfermedades degenerativas (Barja, 1996).

3.5.2.3.- Vitamina E

Este grupo vitamínico fue descubierto por Evans y Bishop en 1922. Constituye un conjunto de compuestos fenólicos llamados tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol y sus correspondientes tocotrienoles. De ellos el alfa-tocoferol es el que muestra más actividad biológica. Su actividad antioxidante se debe al carácter reductor del grupo hidroxilo de su anillo cromanol.

Estos grupos de compuestos son altamente lipofílicos, por lo que suelen ser el principal antioxidante de las membranas en las células animales.

Las concentraciones de vitamina E varían de forma considerable en los distintos tejidos, encontrándose en mayor concentración en aquellos que tienen un mayor contenido de lípidos como el tejido adiposo y las glándulas suprarrenales (Szent-Gyorgyi, 1928).

Su solubilidad en membranas le permite accesibilidad directa a grupos peroxil (ROO^{\cdot}) que serían reducidos a hidroperóxidos, los cuales son degradados hasta alcoholes (estables) por la GPx. Así pues, impiden que los radicales ROO^{\cdot} oxiden a otra sustancia orgánica, impidiendo la reacción de propagación en la peroxidación lipídica.

3.5.2.3.- Carotenoides

Los carotenoides, junto con la vitamina E son los principales antioxidantes de las membranas biológicas. El carácter antioxidante se basa en el sistema de dobles enlaces conjugados.

Los principales ROS sobre los que actúan son el oxígeno singlete y los radicales peroxilos.

Dentro de los carotenoides se pueden citar el alfa y beta caroteno, luteína, licopenos, la zeaxantina y la criptoxantina provenientes de una gran variedad de frutas y vegetales.

Se han descrito interacciones positivas de los carotenos con la SOD, ascorbato y otros antioxidantes (Krinsky, 1993a), así como el beta caroteno con los tocoferoles protegiéndose mutuamente frente a la pérdida por oxidación (Palozza y Krinsky, 1992).

Existen algunos trabajos que indican una capacidad antimutagénica y anticarcinogénica (Krinsky, 1993b).

3.5.2.3.- Otros antioxidantes

Existen otras sustancias con capacidad antioxidante que pueden producirse en el organismo o provenir de la dieta. Entre ellos se encuentran: ácido úrico, bilirrubina, transferrina, ferritina, quelantes de iones metálicos, proteínas como la ceruloplasmina, polifenoles, flavonoides, aminos aromáticas, haptoglobina o el ácido lipoico.

En décadas pasadas se habló de la ubiquinona como generador mitocondrial de radicales libres (Boveris *et al*, 1976). Hoy se sabe que esta sustancia actúa fundamentalmente como antioxidante (Ernster y Forsmark-Andrée, 1993).

Recientemente se ha propuesto la hormona de origen pineal melatonina como antioxidante (Reiter, 1995).

Entre los antioxidantes sintéticos podemos citar la Nacetilcisteína, penicilamina, aminosalicilatos, lazaroides y tamoxifeno entre otros.

4.- Genes implicados en el desarrollo del cáncer. Gen y proteína p53.

A lo largo del desarrollo, todas las células se encuentran en un equilibrio dinámico entre la proliferación celular, que permite a las células crecer y multiplicarse, y la diferenciación celular, que permite a las células adquirir un fenotipo característico que define su función especializada.

El descubrimiento de los genes reguladores de los procesos de proliferación y/o diferenciación celular ha constituido un hito relevante dentro de la Investigación Biomédica de este siglo.

Existen genes que controlan positivamente la proliferación celular, los denominados genes de iniciación o progresión del ciclo celular y los genes que controlan negativamente el ciclo celular, denominados genéricamente genes supresores. El proceso de proliferación celular depende del equilibrio entre ambos tipos de genes; este equilibrio se rompe en los procesos cancerígenos bien activándose aquellos que son capaces de estimular la proliferación celular o inactivándose aquellos que inhiben dicho proceso.

En general podemos clasificar los genes implicados en el desarrollo del cáncer en:

- 1- Oncogenes o genes cuya activación anómala conduce a lesiones neoplásicas.
- 2.- Genes supresores cuya inactivación funcional se asocia al cáncer.
- 3.- Genes que intervienen en la reparación del genoma.

4.1.- Oncogenes

Son formas alteradas de genes normales llamados proto-oncogenes. Los proto-oncogenes regulan la cascada de eventos que mantiene la progresión ordenada del ciclo, la división y la diferenciación celular. En una célula cancerosa esta progresión ordenada se pierde cuando uno o más componentes de esta cascada se altera. El proceso de control de crecimiento o diferenciación celular se inicia por la interacción de factores de crecimiento y citoquinas extracelulares con sus correspondientes receptores de membrana. Esta activación desencadena una serie de señales intracelulares que finalmente dan lugar a una activación y/o inhibición de la expresión de genes celulares.

Los proto-oncogenes funcionan como puntos críticos de estas vías, así tenemos proto-oncogenes que codifican citoquinas, receptores transmembrana de factores de crecimiento (como el factor de crecimiento epidérmico erbB), proteínas asociadas a la membrana celular que intervienen en la transducción de señales (como src y ras), proteínas intermedias de estas vías de señalización de localización citoplasmática y proteínas nucleares que intervienen en la regulación de la expresión génica (factores de transcripción, como los proto-oncogenes fos, jun y myc) (Newmark, 1987).

Los proto-oncogenes pueden sufrir alteraciones como mutaciones puntuales, reordenamientos, translocaciones, amplificaciones, deleciones, etc, transformándose en oncogenes con potencial oncogénico.

Son genes de carácter dominante. Un cambio en uno de los alelos del gen es suficiente para expresarse.

Los oncogenes fueron descubiertos inicialmente como parte del genoma de los virus (v-oncogenes) (Bishop, 1985) en estudios con retrovirus en la transmisión de los tumores. Genes análogos fueron encontrados en genomas normales de animales y del hombre denominados oncogenes celulares (c-oncogenes) o proto-oncogenes.

4.2.- Genes supresores

Codifican proteínas que intervienen en la regulación del crecimiento o diferenciación celular mediante un proceso de control negativo y la pérdida de su función contribuye a la aparición de un fenotipo tumoral.

Los estudios epidemiológicos de Knudson (Knudson, 1971) en el caso del retinoblastoma condujeron a la hipótesis de los "dos eventos" o de la "doble lesión": se necesitan dos mutaciones inactivantes para que aparezca el retinoblastoma. Los pacientes que presentan retinoblastoma heredan una mutación directamente por la línea germinal, preexistente en alguno de los progenitores o que aparece durante la gametogénesis. Esta mutación les hace más susceptibles a contraer el retinoblastoma tras adquirir una segunda mutación por vía somática.

Esta hipótesis de Knudson explica, por una parte como pueden colaborar las mutaciones germinales y somáticas en el proceso de la tumorigénesis y por otra el patrón de herencia recesivo.

Como ejemplo de este tipo de genes podemos citar: p53, que estudiaremos más adelante, RB1, BRCA1, BRCA2, NF-1, etc.

4.3.- Genes de reparación del ADN

A principios de la década de los 80 se sugirió que las células cancerosas presentaban un fenotipo de hipermutabilidad que explicaría el gran número de mutaciones presentes en los tumores.

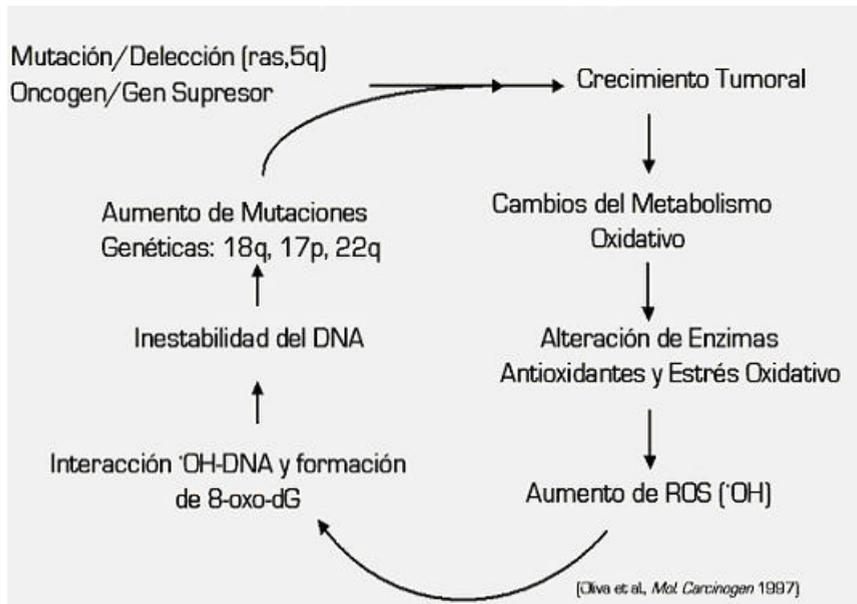
Posteriormente se descubrió un nuevo tipo de anomalías en el genoma: inserciones o deleciones en zonas repetitivas del genoma (Ionov, 1993). El espectro mutacional en las secuencias repetidas era similar al observado en hongos y bacterias que carecían de maquinaria enzimática para corregir los alineamientos incorrectos del ADN. Este sistema es un complejo multienzimático que corrige los errores de la replicación del ADN que ocurren durante la fase S del ciclo celular y algunos de los genes implicados son hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2.

Los genes que codifican proteínas que intervienen en la reparación del ADN ante diferentes tipos de agresiones celulares (radiaciones ionizantes, luz UV, mutágenos químicos) o bien en el proceso de replicación celular fisiológica se han encontrado inactivados en un conjunto de síndromes familiares de predisposición a tumores como ataxia-telangiectasia, sdr. de Bloom, anemia de Fanconi, cáncer colorectal hereditario no polipósico, etc.

Se da la circunstancia que en estos síndromes el metabolismo oxidativo está alterado, presentando aumento de la producción de ROS y/o disminución de los sistemas antioxidantes.

En este sentido cabe destacar la estrecha relación existente entre el estrés oxidativo y el proceso tumoral. Recientemente se ha observado una correlación significativa entre el grado de oxidación del material genético y el acúmulo de mutaciones que se produce de forma característica en la progresión de tumor colorectal humano (Oliva *et al.* 1997).

Figura 1.8 - Radicales libres oxigénicos y acúmulo de mutaciones genéticas en la progresión tumoral

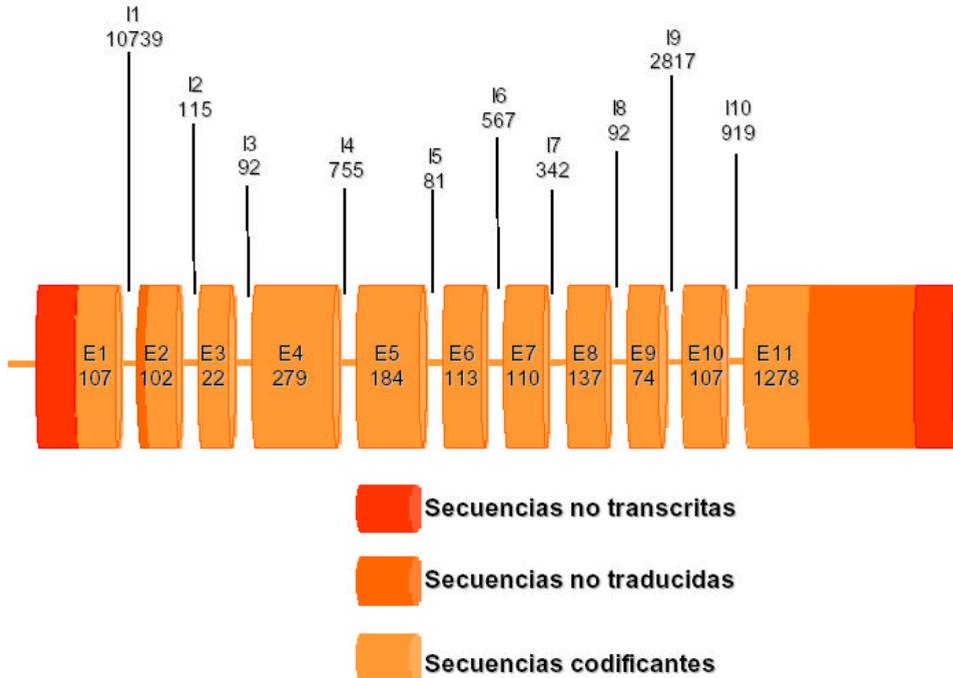


4.4. Gen p53 y su proteína

El gen supresor p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17, en la región 17p13.1, comprende una porción de ADN de 16-20 Kb (Mc Bride *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1986; Isobe *et al.*, 1986). Está formado por 11 exones, de los cuales el primero no codifica la proteína.

El mRNA transcrito por el gen p53 tiene aproximadamente 2,5 kb y comprende una secuencia que codifica el polipéptido de 393 aminoácidos, producto del gen (Harlow *et al.*, 1985).

Figura 1.9 - Esquema del gen p53 en el que se indican el tamaño de los exones e intrones



El gen p53 fue inicialmente descrito como un oncogén dominante en base a experimentos realizados en que la sobre-expresión de éste conducía a la inmortalización de células de roedores en cultivo. Sin embargo el análisis de las proteínas P53 sobre-expresadas puso de manifiesto que se trataba de proteínas mutadas, cuyas propiedades diferían de la P53 nativa (Lane y Benchimol, 1990). Tras la realización de nuevos experimentos utilizando alelos del gen p53 normales se observó que se producía la supresión del crecimiento en algunos oncogenes virales o celulares (Hind *et al*, 1989).

En estudios recientes se ha demostrado que la región correspondiente al exón 1 es capaz de formar una estructura tipo stem-loop suficientemente estable que liga la proteína P53 nativa pero no la mutada; así, esta unión inhibe específicamente la traducción del mRNA de p53 produciéndose el control a nivel celular (Mosner *et al*, 1995).

La proteína P53, producto del gen p53, es una fosfoproteína nuclear constituida por 393 aa., como hemos dicho anteriormente, y tiene un peso molecular de aproximadamente 53 KDa.

En la estructura primaria se pueden distinguir tres regiones:

1.- la región Nterminal que contiene el dominio de activación transcripcional que permite inducir la transcripción de nuevos mRNA y por tanto la expresión de determinados genes (Fields y Jang, 1990).

2.- la región central que incluye el dominio de unión a secuencias específicas de ADN (Wang *et al*, 1993).

3.- la región C-terminal con propiedades claves para la regulación, ya que contiene los dominios de localización nuclear, tetramerización y de unión a secuencias de ADN específicas para el reconocimiento del daño primario (Soussi y May, 1996).

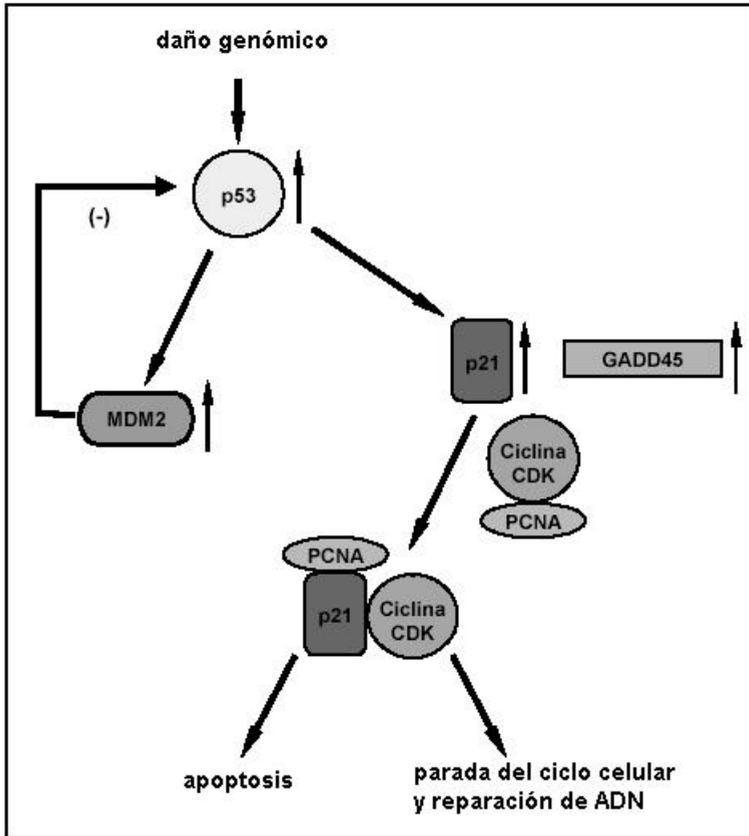
La proteína P53 nativa se encuentra mayoritariamente en forma tetramérica (Wang *et al*, 1994) y se une a secuencias específicas de ADN para realizar su función propia como factor de transcripción en colaboración con otras proteínas activadoras.

4.4.1.- Función de la proteína P53

La función de la proteína P53, en condiciones normales, es la de regular la proliferación celular. La proteína nativa es capaz de unirse a secuencias específicas de ADN, estimulando así la expresión de genes del ciclo celular que inhiben el crecimiento (Stenger *et al*, 1992).

Muchos son de los genes inducibles por la proteína P53. Entre ellos cabe destacar el MDM2, WAF1/p21 y GADD45.

Figura 1.10 - Regulación del crecimiento celular y apoptosis



El gen MDM2 (Murine Double Minute 2), localizado en el brazo largo del cromosoma 12, 12q, bajo el control transcripcional de la proteína P53 codifica una proteína de 90 KDa, que posee un lugar de unión a la proteína P53 nativa. Al interactuar ambas proteínas el complejo formado se convierte en un complejo regulador negativo que inhibe la capacidad de unión de la proteína P53 a secuencias de ADN específicas (Oliner *et al*, 1992). Se produce, por tanto, un mecanismo de retroalimentación del MDM2 sobre la proteína P53, lo que constituye un sistema de regulación de su función. En este sentido el MDM2 funciona más como un oncogén que como un gen supresor de tumores (Finlay, 1993).

El gen WAF1 (Wild Activated Fragment 1) localizado en el brazo corto del cromosoma 6, 6p, codifica una proteína de 21 KDa, conocida como p21. La asociación de p21 con el complejo ciclina-CDK (Kinasa ciclina

dependiente) y el PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) provoca la parada del ciclo celular y reparación del ADN.

El gen GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage 45) fue descrito inicialmente como un gen capaz de ser inducido por la acción de la radiación ionizante sobre linfoblastos y fibroblastos (Papathanasiou *et al*, 1991; Kastan *et al*, 1992). Su proteína, puede ejercer diversas actividades, como interactuar directamente con el factor de replicación PCNA, bloquear la replicación del ADN y coordinar la activación de la reparación del ADN dañado en la excisión de nucleótidos (Cox y Lane, 1995).

En presencia de daño celular la proteína P53 ejerce el control del ciclo; las células aumentan su expresión y la acumulación de proteína provoca la parada del ciclo celular en la fase G₁ del ciclo celular permitiendo la puesta en marcha de los mecanismos de reparación celular. En el caso de que fracase la reparación, la proteína P53 puede conducir a la célula dañada a la apoptosis (Lane, 1992). La finalidad es mantener la integridad del genoma.

4.4.2.- Mecanismos de inactivación del gen p53 y su proteína

Durante el proceso de tumorigénesis se desarrollan mecanismos por los cuales se inhibe el gen p53 y su proteína, entre ellos destacan: las mutaciones y la unión a proteínas virales o celulares.

- Mutaciones

La mutación es el principal mecanismo de inactivación de la función de p53. Se han encontrado en la mayoría de los cánceres humanos. Se estima que del orden del 45-50% de cánceres contienen mutaciones de p53 (Greenblatt *et al*, 1994) y en el caso concreto del adenocarcinoma colorectal el porcentaje se eleva del 50% al 70% de los casos (Harris, 1996).

De todas las mutaciones, las más frecuentes son las puntuales y se pueden adquirir por múltiples causas: agentes carcinogénicos exógenos o procesos endógenos como la deaminación de citosina y 5-metilcitosina y la oxidación por radicales libres generados a partir de otros procesos biológicos entre otros.

Independientemente de su origen, las mutaciones suelen estar asociadas a la pérdida del otro alelo del mismo gen.

En cuanto al tipo de mutaciones que suelen afectar el gen son las de sentido erróneo ("missense") las más abundantes, con una frecuencia del 79% en la región central en comparación a la región C-terminal cuya frecuencia es de un 23%, habiendo en esta región un predominio de mutaciones de otro tipo ("no missense"), entre las que se incluyen las mutaciones sin sentido ("nonsense"), las de alteración del marco de la lectura ("frameshift"), las de alteración de la excisión intrónica ("splicing") y las silentes (Greenblatt *et al*, 1994).

Existen determinados codones que presentan muy frecuentemente mutaciones, son los codones 175, 245, 248, 273 y 282. Estos cinco codones parecen compartir el mismo mecanismo de mutación, que es la deaminación espontánea de la 5-metilcitosina que lleva a la transición G:C a A:T (Ehrlich *et al*, 1990). De hecho el 42% de las mutaciones que afectan al gen p53 son transiciones C > T, el 60% de las cuales afecta a los dinucleótidos CpG (Soussi, 1997).

- Unión a proteínas virales

Se produce la formación de complejos de la proteína P53 con distintas oncoproteínas virales como son el antígeno T grande del SV 40, proteína E2B del adenovirus 5 o el producto del gen E6 del papilomavirus humano del tipo 16 y 18.

En el caso de las dos primeras, la unión con la proteína P53 provoca un incremento de ésta impidiendo el desarrollo de su función normal (Chang *et al*, 1993). La proteína E6 actúa facilitando la degradación de la P53 nativa (Scheffner *et al*, 1990).

- Unión a proteínas celulares

De forma similar a lo que sucede con las oncoproteínas virales, existen productos génicos capaces de bloquear la acción de la proteína P53. Así sucede con la proteína MDM2, No sólo puede revertir las propiedades inhibitoras del crecimiento celular de la proteína P53 nativa, si no que, sobre-expresada puede producir la inmortalización y transformación de células de cultivos de fibroblastos de embriones de ratas (Finlay, 1993).

Hipótesis de trabajo y objetivos

Los efectos que la radiación produce sobre la salud han sido ampliamente estudiados. No obstante, muchos de los datos de los que se disponen han sido obtenidos en animales de experimentación y no siempre es posible realizar extrapolaciones en humanos.

La acción que la radiación produce sobre la células y más concretamente sobre el material genético puede ser directa como consecuencia inmediata de la ionización del ADN o indirecta, cuando la radiación mediante la formación de radicales libres genera una situación de estrés oxidativo, que se puede cuantificar mediante parámetros específicos.

Estos parámetros indicativos del estrés oxidativo incluyen entre otros, enzimas antioxidantes (como la catalasa y la superóxido dismutasa), glutatión reducido que constituye un sustrato antioxidante y marcadores de peroxidación lipídica como el malondialdehído.

En los últimos años se ha estudiado el efecto de las especies reactivas del oxígeno sobre los ácidos nucleicos, en los que se producen la oxidación de bases como ocurre con la guanina que se convierte en 8-oxo-dG siendo éste un marcador de daño oxidativo sobre los ácidos nucleicos.

Los efectos que la radiación produce en el organismo se clasifican en deterministas y estocásticos. Dentro de los efectos estocásticos se incluyen las alteraciones genéticas y la carcinogénesis, que se pueden producir transcurrido varios años después de la irradiación o en generaciones sucesivas.

Tanto las alteraciones genéticas como la carcinogénesis están íntimamente ligadas al daño producido por las especies reactivas del oxígeno a los ácidos nucleicos.

La carcinogénesis, además, es un proceso con múltiples etapas en las que se ven implicados diversos genes que controlan el ciclo celular, entre ellos cabe destacar el gen supresor p53, cuya alteración se ha relacionado con el aumento de las especies reactivas del oxígeno y la formación de la base modificada 8-oxo-dG.

Tras el accidente nuclear de Chernobyl, la mayoría de los estudios realizados han sido clínico-epidemiológicos; han sido pocos los trabajos

encaminados a valorar parámetros bioquímico-moleculares relacionados con los efectos que el accidente ha producido sobre la salud de las personas afectadas.

Los efectos producidos por la radiación dependen de la dosis, tanto los efectos deterministas o somáticos cuya gravedad depende de la dosis, como los efectos estocásticos, producidos al azar, puesto que la posibilidad de que ocurran depende también de ella.

La imposibilidad del conocimiento de las dosis recibidas por cada uno de los niños de nuestro estudio, ya que para ello hubiera sido necesario un historial dosimétrico individual, nos ha llevado a utilizar parámetros indirectos de la dosis, como son la distancia al foco del accidente nuclear y el tiempo de exposición a la irradiación.

Desde el punto de vista radiobiológico dos han sido los radioisótopos que mayor influencia han tenido en la salud de la población afecta: el ^{131}I con un periodo de semidesintegración de unos 8 días (cuya importancia viene dada por la incorporación de este radioisótopo a la glándula tiroides) y el ^{137}Cs con un periodo de semidesintegración de unos 30 años, que es el responsable de la exposición crónica a la irradiación.

En base a lo dicho anteriormente, nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Valoración clínica y analítica general de niños aparentemente sanos procedentes de diferentes poblaciones de Ucrania, ubicadas en un radio de 125 Km del lugar donde ocurrió el accidente nuclear de Chernobyl.
- 2.- Estudio del recuento de células sanguíneas y su relación con los factores de irradiación.
- 3.- Estudio de la función tiroidea y su relación con los factores de irradiación.
- 4.- Determinación y estudio de parámetros relacionados con el estrés oxidativo en sangre de los niños: enzimas antioxidantes (catalasa y SOD), sustrato antioxidante GSH, marcador de peroxidación lipídica MDA y base modificada 8-oxo-dG.
- 5.- Relación de los parámetros de estrés oxidativo con los factores de irradiación.

6.- Relación de los parámetros de estrés oxidativo con el estado nutricional.

7.- Identificación de mutaciones puntuales del gen p53 en muestras sanguíneas de los niños.

8.- Estudio cromosómico de los niños mediante la determinación de cariotipos.

1.- Material

1.1.- Sujetos de estudio y muestras

El estudio se realizó en un conjunto de niños y niñas aparentemente sanos en edades comprendidas entre 5 y 16 años, residentes de Ucrania en un radio de unos 125 Km al lugar donde ocurrió el accidente nuclear de Chernobyl. Los niños provenían de orfanatos o familias de tres localidades: Slavutich, Bucha-Irpen y Maliatko (Kiev), cuyas distancias al lugar donde se produjo el accidente nuclear de Chernobyl son de 45, 100 y 125 Km., respectivamente.

Estos niños fueron acogidos por familias valencianas gracias al programa Ucrania-2000 de la asociación no gubernamental "Abogados sin fronteras", bajo los auspicios de la UNESCO y con la autorización del Ministerio de Sanidad de Ucrania, durante los periodos de diciembre de 1.994 y enero de 1.995 y julio-agosto de los años 1.995, 1.996 y 1.997.

A los niños se les realizó un control médico en el servicio de Oncohematología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario bajo la dirección del Prof. Dr. J. Donat.

Se llevó a cabo una revisión médica, realizando las siguientes valoraciones (ver ficha de recogida de datos en apéndice 3):

- una valoración clínica general completa por aparatos (piel, cabello, ojos, labios, lengua, encías, mucosas, dientes, glándula tiroides, glándulas parótidas, esqueleto, neurológico, extremidades, frecuencia cardíaca y tensión arterial máxima y mínima).
- una valoración nutricional (peso, talla, perímetro craneal, perímetro braquial, pliegue tricipital, Índice de Mc Laren, circunferencia muscular del brazo y área muscular del brazo con sus percentiles correspondientes).
- una valoración analítica, que comprendía:
 - o valoración de anemias: hematíes, hemoglobina, hematocrito, VCM, HCM, CHCM, sideremia, IST, transferrina, ferritina, vitamina B12 y folato.
 - o Valoración de la coagulación: plaquetas, Índice de Quick, TTPr, TTr y fibrinógeno.

- Valoración del estado inmune: leucocitos (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos CD4 y CD8) IgA, IgG, IgM, IgE, C3 y C4.
- Valoración tiroidea: T3, T4, T4 Libre y TSH
- Perfil bioquímico, proteínico y enzimático: Glucosa, urea, creatinina, sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, GOT, GPT, LDH, fosfatasa alcalina, proteínas totales, prealbúmina, albúmina y cociente albúmina/globulina.

La extracción de sangre de estos niños se realizó en el Servicio de Pediatría, parte de la misma fue remitida al laboratorio general para la obtención de los parámetros citados anteriormente y otra parte al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia para la obtención de cariotipos.

Durante los veranos de los años 1996 y 1997, se recogió, además, muestras de sangre que fueron remitidas al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Valencia, bajo la dirección del Prof. Dr. G. Sáez, para la determinación de enzimas y metabolitos procedentes del estrés oxidativo, cuyo material y métodos vamos a describir a continuación.

1.2.- Instrumentos

- ◆ Centrifugas de alta velocidad (Kendro Laboratories Products, Osterode, Germany):
 - Sorvall, modelo RC5C
 - Heraeus, Biofuge 22 R
 - Heraeus, Labofuge 200
- ◆ Autoclave: Marca Autester, modelo S-437-G (Electroscience, Suffolk, UK)
- ◆ pHmetro: Marca Radiometer, modelo pH M83 (Radiometer Analytical S. A., Lyon, France)
- ◆ Balanza de precisión: "Precisa" (Pacisa y Giral S. L., Madrid, España)

- ◆ Espectrofotómetros:
 - Shimadzu modelo UV-160 (Global Medical Instruments, Inc., Minnessota, U.S.A.)
 - Uvikon modelo 860 (Bio-Tek Kontron Instruments Ltd, Milano, Italia)

- ◆ HPLC (Waters™ 600 Pump):
 - Detector de U.V.: modelo Waters 486.
 - Detector electroquímico: ESA Modelo 5100 Coulochem equipado con célula analítica modelo 5011.
 - Columna (250 x 4.6 mm) OD-5^a SPHERI-5, C-18 de fase reversa de 5 micras de tamaño de poro.
 - Programa integrador: Milenium 3.0 Waters.

- ◆ Baño térmico: Unitronic. 320 OR. P Selecta (Eleco S.A., Montevideo, Uruguay).

- ◆ Vórtex Heidolph, modelo REAX 2000 (Heidolph Instruments, Schwabach, Germany)

- ◆ Electroforesis:
 - Sequencing Gel. Electrophoresis Apparatus. Model S2. Life Technologies, Inc. Gibco BRL.
 - Fuentes de alimentación:
 - Power Supply. Model 1000/500. Bio-rad.
 - Consort. E734. Bio-rad.

- ◆ PCR (ciclador térmico). Perkin Elmer (Cetus) 4800.

1.3.- Productos y reactivos químicos

Los reactivos inorgánicos para la preparación de tampones y otras diluciones han sido suministrados por Panreac (Montcada i Reixac, España) y Merck (Darmstadt, Alemania).

Reactivos y soluciones orgánicas:

- TBE: Tris-Borato-EDTA, 0.045 M: 10 mM.
- Acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico (APS), Temed, Urea (Sigma. Sigma Chemical Co. St Louis, Estados Unidos).

- Buffer de extracción ADN: Tris-HCl (ph 7.5), 150 mM NaCl y 2 mM EDTA (pH:8.0)
- Isótopo radiactivo : [α^{32} P] ATP 10 mCi/ml, 6000 Ci/mmol. Amershan Life Science. U.K. (USB).

Película Kodak de autorradiografía. Biomax Film. ®Eastman Kodak Company.

Los enzimas y coenzimas para los análisis bioquímicos, son de Boehringer Mannheim, (Mannheim, Alemania) y Sigma Chemical Co. (St Louis, Estados Unidos).

Para el estudio de las mutaciones puntuales se utilizó GeneAmp® PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA Polymerase. Perkin Elmer. (Roche).

2.- Métodos

2.1.- Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron recogidas en tubos con EDTA en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular dentro de las 4 horas siguientes a la extracción sanguínea.

De los 10 ml aproximadamente de sangre extraída se recogieron 2 ml que se centrifugó a 13.000 r.p.m. guardándose el sobrenadante a -80°C para la determinación de **Malondialdehído (MDA)**.

A 200 μl del precipitado se le añadió un volumen de agua bidestilada igual al del sobrenadante retirado y tras agitar en vórtex se dejó 2 horas a 4°C para producir hemólisis. Se recogieron alícuotas de 0'4 ml del hemolizado que se guardaron a -4°C para posterior determinación de **proteínas (hemoglobina) y glutatión reducido**.

Al resto de este precipitado se le añadió una disolución de cloroformo-etanol 3/5 y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante en un eppendorf para el posterior estudio de las enzimas **superóxido dismutasa (SOD) y catalasa**.

El resto de la sangre recogida fue destinada a la extracción de ADN y posterior estudio de la base modificada **8-oxo-dG y gen p53**.

2.2.- Estudio del estrés oxidativo

2.2.1.- Catalasa

Para la determinación de esta enzima se siguió el método descrito por Cleiborne A.J. (1986), basada en la reacción:



La reducción del peróxido de hidrógeno por unidad de tiempo medido por espectrofotometría de luz ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm, es proporcional a la cantidad de catalasa existente en la muestra.

A esta longitud de onda, el coeficiente de extinción molar para el peróxido de hidrógeno es de $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

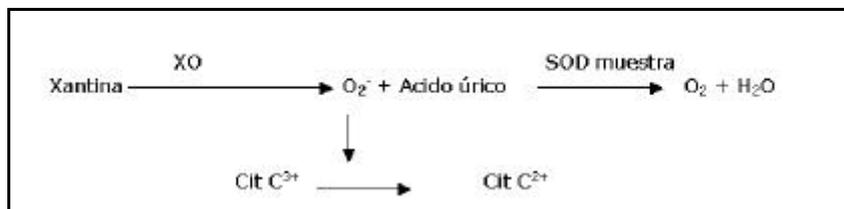
La actividad específica a 25°C de la catalasa es definida en términos de micromoles de peróxido de hidrógeno consumido por minuto y por miligramo de la muestra de proteína. Se expresa en U/gr de Hb.

2.2.2.- Superóxido dismutasa

Para la cuantificación de esta enzima se siguió el método de Fridovich (1986b).

Se basa en la capacidad de los aniones superóxido para la reducción del citocromo C oxidado y la inhibición de esta reacción por el enzima. La descomposición de la xantina como fuente de aniones superóxido por parte de la enzima xantina-oxidasa se basa en la reacción que se muestra en el gráfico 3.1.

Gráfico 3.1 - Reacción de descomposición de la xantina



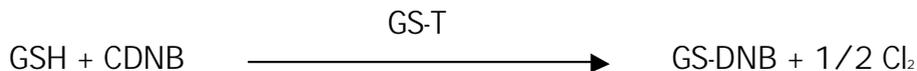
La cantidad de Citocromo C reducido en presencia de la muestra que se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 546 nm , indica la cantidad de SOD existente.

Se define una unidad de esta enzima como la concentración de la misma capaz de disminuir en un 50% la velocidad de reducción del citocromo C oxidado. Se expresa en U/mg de Hb.

2.2.3.- Glutation reducido (GSH)

Para su determinación se empleó el método de la glutatión S-transferasa (GS-T), descrito por Brigelius *et al.* (1983).

Se basa en la siguiente reacción:



CDNB: 1- cloro- 2,4-dinitrobenceno

GS-T: Glutation S tranferasa

La producción de GS-DNB se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 340nm, siendo proporcional a la cantidad de GSH de la muestra.

La cantidad de GSH determinado se expresa en U/ gr de Hb.

2.2.4.- **Malondialdehído (MDA)**

El MDA es un producto de peroxidación lipídica que se genera en proporción constante al proceso de peroxidación, siendo por este motivo un buen marcador de la misma.

Se siguió el test del ácido tiobarbitúrico descrito por Wong *et al.* (Wong *et al.*, 1987).

A 500 μl de tampón AcOH 2M pH 3'5 + TBA 0'2% se le añaden 50 μl de muestra. Se incuban durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. En este paso se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de MDA, que se conjuga con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), determinándose el aducto MDA-TBA₂ como índice de peroxidación lipídica.

A cada muestra se añaden 500 μl del tampón KH₂PO₄ 50 mM ph 6'8 y se centrifuga durante 5 minutos a 13.000 r.p.m. y a 4° C. Posteriormente se toman 200 μl de sobrenadante y se añaden 200 ml de tampón KH₂PO₄ 50 mM ph 3'5. Se centrifuga durante 5 minutos a 13000 r.p.m. y a 4° C.

El sobrenadante resultante se somete a cromatografía de alta presión (HPLC). La detección del aducto MDA-TBA₂ se realizó con un detector ultravioleta a una longitud de onda de 532 nm.

Los resultados se expresan en nmol/ml de plasma.

2.2.5.- Determinación de hemoglobina

La cantidad de hemoglobina fue valorada a través del test colorimétrico de la casa comercial Boehringer Mannheim, siguiendo el método de Van Kampen y Zijlstra (1961) basado en la reacción:



Se toman 2,5 ml del reactivo y se le añaden 10 μl del hemolizado. Esta mezcla se deja reaccionar durante unos 20 minutos. Paralelamente se realiza lo mismo en otro tubo que contiene 10 μl de agua bidestilada. Este último servirá de muestra "blanco". Mediante espectrofotometría se determina posteriormente la absorbancia a una longitud de onda de 546 nm. El resultado final se calcula de la siguiente manera:

$$[\text{HB}] = \text{Absorbancia a 546 nm} \times 0,367 \text{ g/ml}$$

2.2.6.- Extracción de ADN

Tratamiento y digestión celular

La muestra sanguínea se resuspende en Buffer de extracción de ADN que contiene Tris-HCl 1M, 150 mM NaCl y 2 mM EDTA (pH 8).

Posteriormente se añadió docecilsulfato de sodio (SDS) a una concentración final de 0,5% y proteinasa K (solución: 200 $\mu\text{gr/ml}$) a la suspensión (concentración final de 2 mgr/ml), siendo la mezcla incubada una hora a 56° C y dejándose a 37° C durante toda la noche.

Extracción y purificación

Tras la incubación se procede a la extracción. Se añade un volumen igual al de Phenol (1:1), posteriormente una mezcla 1/1 de fenol/cloroformo: alcohol isoamílico (SEVAG) (24:1) y por último con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), para precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20° C y 0,1 volumen de NaCl 5M. A continuación el ADN se seca y resuspende en un volumen de TE (TrisClH 10mM-EDTA 1mM).

Cuantificación

En un espectrómetro en sistema dual (longitud de onda 260 nm (ADN) y 280 nm (Proteínas) se hace un blanco con 495 µl de H₂O destilada en una cubeta de cuarzo micro.

Posteriormente se añade al agua destilada 5 µl de muestra y se mezcla por inversión tapando con parafilm. Se coloca en el espectrofotómetro y se mide la absorbancia a 260 y 280 nm. Se realizan los cálculos pertinentes para la cuantificación de ADN y la pureza de la muestra que vendrá dada por el cociente ADN/Prot.

2.2.7.- Determinación de 8-oxo-dG

Digestión de ADN

La digestión se lleva a cabo incubando 0'5 µgr ADN/µl con 100 unidades de DNAsa I en 40 µl de Tris-HCl (10mM) y 10 µl de MgCl₂ 0'5 M (20 mM) a 37° C durante 1 hora. El pH de la solución es disminuido con 15 µl de ZnSO₄ 10 mM (para dar una concentración final de 1 mM), siendo la mezcla incubada durante 1 hora a 37° C. Después de reajustar el pH con 100 µl de Tris-Hcl 0,4 M (pH 7.8) se añaden 20 µl de fosfatasa alcalina (3U) y la mezcla se incuba de nuevo durante 30 minutos.

Cuantificación de 8-oxo-dG

Para el análisis de 8oxo-dG se utiliza el método por combinación de HPLC y EC, que permite discriminar entre bases modificadas y las no modificadas ya que las primeras son activas electroquímicamente mientras las normales no lo son.

Las muestras de ADN digeridas se resuspenden en agua grado HPLC y se filtran a través de microfiltros de 0'2 µm, antes de aplicar las muestras a una columna de cromatografía (Waters ODS HPLC- 2'5 x 0.46 i.d.; tamaño de la partícula 5nm).

La cantidad de 8-oxo-dG digerida se mide mediante detector electroquímico y U.V., según describe Floyd (1990).

La concentración de esta base fue registrada y calculada utilizando un programa informático siendo expresado en 8-oxo-dG/10⁵ dG.

2.3.- Estudio del gen p53

PCR - SSCP

Muchas de las alteraciones que aparecen en el genoma son mutaciones puntuales, alteraciones de una única base nitrogenada. Su estudio se realiza mediante la secuenciación directa. Debido a la complejidad de la misma se utiliza uno de los métodos de mayor utilidad para seleccionar aquellos casos en que presente mutación del gen p53: la determinación de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP: Single-stranded conformation polymorphism) que permite ver si existe alteración en el gen de la muestra. En el caso de que encontremos alteración, se puede caracterizar el punto exacto y tipo de mutación producida por secuenciación directa (Orita *et al.*, 1989).

En nuestro trabajo no se encontraron alteraciones en el gen p53, por lo que no se llevó a cabo la realización de la secuenciación directa.

Para la amplificación de las secuencias objeto de estudio se utilizaron 8 primers o iniciadores diferentes (oligonucleótidos) que, uniéndose a la cadena que queremos ampliar, catalizan el inicio de la síntesis de la cadena complementaria por parte de la polimerasa (PCR). Las secuencias de los primers se obtuvieron desde zonas lindantes intrón-exón de los exones 5-8 del gen p53 humano, abarcando casi la totalidad de la zona codificante del gen.

De cada muestra de estudio, y de una muestra de ADN normal para control se utilizaron 100 ng de DNA genómico combinados con 8 µl de un compuesto formado por:

- dNTPs (10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Perkin Elmer); concentración final: 34 µmolar, en tampón 10x
- 10 pmol de iniciador o primer de cada uno (5' y 3')
- Polimerasa Taq (Ampli Taq DNA polymerase, Perkin Elmer Cetus, 250 u/vial, 8U/ml (concentración final: 1U/muestra)
- H₂O destilada y estéril para completar el volumen hasta 8 µl
- Cl₂Mg (concentración final 2mM).

Añadimos a cada muestra 1 μl de $^{32}\text{PdCTP}$ (deoxicitosina trifosfato, marcado con fósforo 32), dilución 1/10 (con una actividad de 300Ci/nmol) dando lugar a un volumen final de reacción 10 μl .

Las amplificaciones se realizaron en un ciclador térmico de ADN, sometiendo las muestras a diferentes programas, en función de los iniciadores, de acuerdo con las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización: 94° C 30 segundos, temperatura de hibridación 30 segundos y temperatura de síntesis: 72° C 1 minuto, durante 30 ciclos.

Las secuencias obtenidas de los iniciadores y las temperaturas de hibridación para cada uno de los exones se detallan en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 - Secuencias obtenidas de los iniciadores y las temperaturas de hibridación para cada uno de los exones

EXÓN	SECUENCIA	TEMPERATURA
5	5´TTCCTCTTCCTGCAGTACTC	63° C
	3´ACCCTGGGCAACCAGCCCTGT	
6	5´ACAGGGCTGGTTGCCAGGGT	63° C
	3´AGTTGCAAACCAGACCTCAG	
7	5´GTGTTGTCTCCTAGGTTGGC	63° C
	3´GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT	
8	5´TATCCTGAGTAGTGGAATC	58° C
	3´AAGTGAATCTGAGGCATAAC	

Una alícuota (2'5 μl) de cada una de las muestras amplificadas es mezclada con 9 μl de solución frenado de la secuenciación (Stop solution. USB), 1'5 μl de NaOH 0'08 N y 1,5 μl de SDS 0'1%, e incubadas a 95°C durante 10 minutos para su desnaturalización completa, y rápidamente enfriados con hielo seco a fin de evitar su renaturalización. Se carga un volumen de 3 μl de cada muestra desnaturalizada, en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%, que contiene 10% de glicerol, y sometido a un campo eléctrico de 10-12 vatios durante 12-16 horas a temperatura ambiental. Los geles se secan a 80° C al vacío y son posteriormente expuestos a películas de rayos X a -80° C durante 24 horas.

3.- Metodología estadística y soporte informático

Para efectuar el análisis de datos y cálculo de resultados estadísticos se han utilizado los programas informáticos Excel 2000 y SPSS para Windows versión 11.5.1.

En los contrastes de hipótesis que se han efectuado, el nivel de significación que hemos considerado para la aceptación de la hipótesis nula ha sido 0'05, que es el valor más comunmente aceptado por la comunidad científica (Cuadras *et al.*, 1991; Milton, 1998; Pardo y Ruiz 2000).

Además de los estadísticos descriptivos habituales (media aritmética, mediana, desviación típica, varianza, valor máximo, valor mínimo, etc.) y del análisis de regresión lineal, hemos utilizado las siguientes pruebas y contrastes de hipótesis (Cuadras *et al.* 1991; Milton, 1998; Pardo y Ruiz 2000; Ferrán, 2001):

- Prueba de normalidad: prueba de Kolmogorov-Smirnov
- Análisis de correlaciones bivariadas:
 - Correlaciones paramétricas: coeficiente de correlación de Pearson
 - Correlaciones no paramétricas: Tau-b de Kendall
- Contrastes paramétricos sobre igualdad de medias:
 - Para el caso de comparación de medias de dos grupos: prueba T de Student para muestras independientes.
 - Para más de dos grupos: ANOVA de un factor, con el contraste *post hoc* de la Diferencia Honestamente Significativa (HDS) de Tukey.
- Contrastes no paramétricos sobre igualdad de medias:
 - Para el caso de comparación de medias de dos grupos: prueba U de Mann-Whitney.
 - Para más de dos grupos: prueba H de Kruskal-Wallis.

1.- Datos descriptivos de los niños

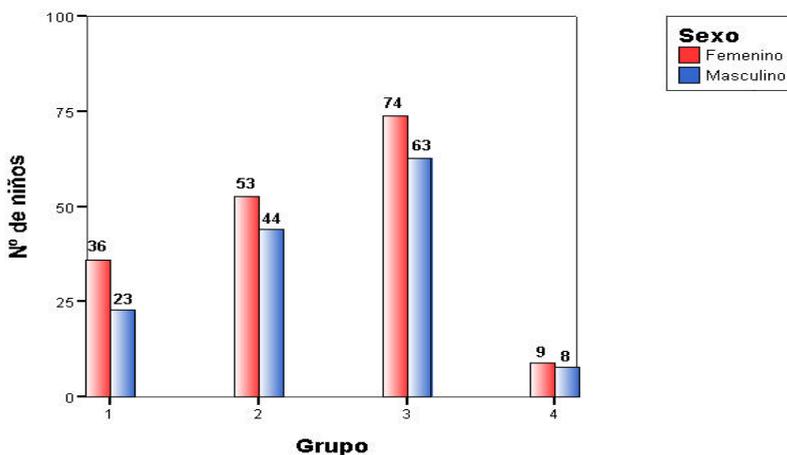
A lo largo de los cuatro años de duración del programa se efectuaron análisis a un total de **310** niños, cuyas edades en el momento de la revisión estaban comprendidas entre los 5 y 16 años. A continuación se detallan las características más relevantes para nuestro estudio del grupo de niños.

Las revisiones se efectuaron en cuatro periodos diferentes en función de las fechas de llegada a Valencia de los niños:

- **Grupo 1:**
Nº de niños analizados: 59
Fechas de reconocimiento: 27/12/1994 a 04/01/1995
- **Grupo 2:**
Nº de niños analizados: 97
Fechas de reconocimiento: 17/07/1995 a 09/08/1995
- **Grupo 3:**
Nº de niños analizados: 137
Fechas de reconocimiento: 01/07/1996 a 09/08/1996
- **Grupo 4:**
Nº de niños analizados: 17
Fecha de reconocimiento: 15/07/1997

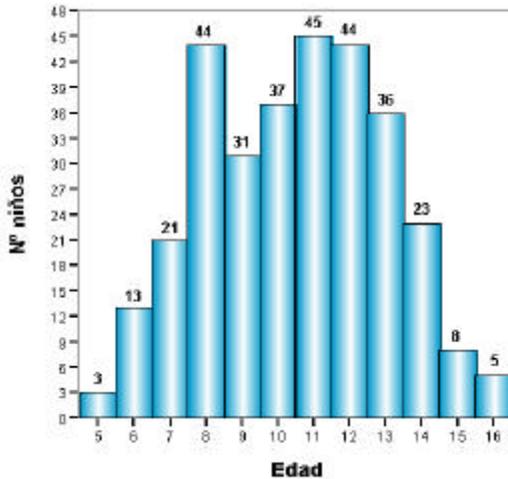
La distribución por sexo de los niños se indica en el gráfico 4.1.

Gráfico 4.1 - Distribución por grupos y sexo



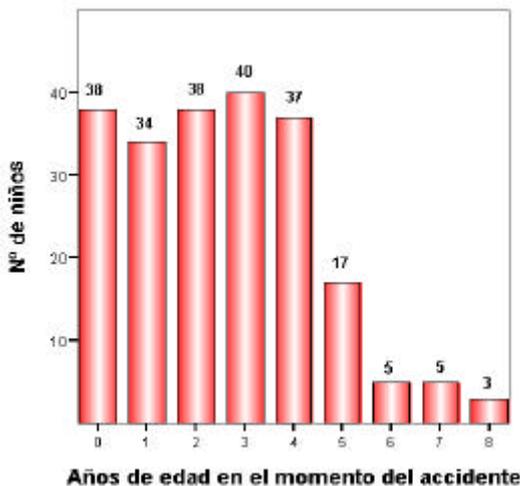
La distribución de edades de los niños analizados se detalla en el gráfico 4.2.

Gráfico 4.2 - Distribución por edades en el momento del reconocimiento médico



Calculamos la edad de los niños en el momento del accidente de la Central de Chernobyl. 92 niños no habían nacido en el momento del accidente, el resto tenía edades comprendidas entre 1 mes y 8 años (gráfico 4.3).

Gráfico 4.3 - Edades de los niños analizados en el momento del accidente de la Central de Chernobyl

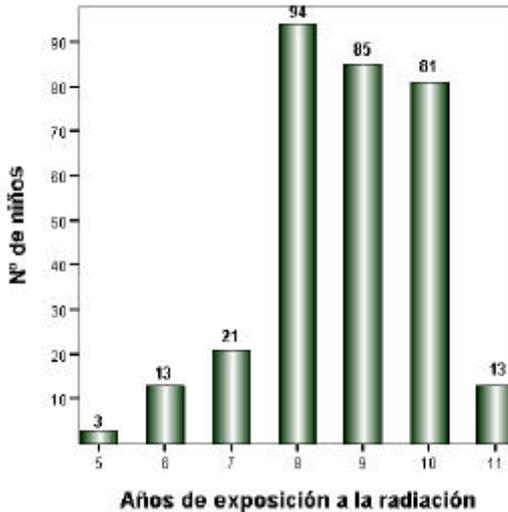


0 = edad de 0-12 meses

92 niños no habían nacido en el momento del accidente

Hemos calculado para cada niño el número de años de exposición a la radiación crónica (número de años transcurridos entre el accidente de Chernobyl y el reconocimiento médico). El número de años oscila entre 5 y 11. Los datos se detallan en el gráfico 4.4.

Gráfico 4.4 - Número de años de exposición a la radiación de los niños



Los niños procedían de cuatro poblaciones de Ucrania: Slavutich, Bucha, Irpen y Kiev.

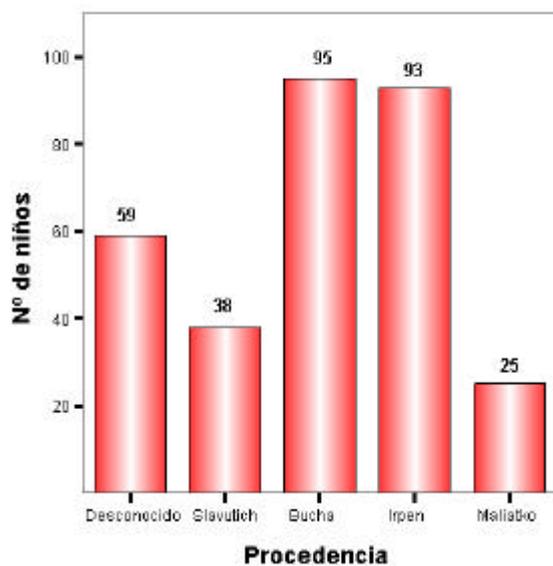
La distancia desde estas poblaciones a la Central de Chernobyl es la siguiente:

- Slavutich: 45 Km
- Irpen y Bucha: 100 Km (Irpen y Bucha son localidades colindantes)
- Kiev: 125 Km.

La distribución de niños por procedencia se indica en el gráfico 4.5.

La mayoría proceden de Bucha e Irpen, el 60'7 % del total. El 12'3 % procede de Slavutich y el 8% de los niños residían en el orfanato de Maliatko de la ciudad de Kiev. Del 19% restante no conocemos su origen.

Los 59 niños que se indican como de origen desconocido corresponden a los del grupo 1, cuya procedencia no figura en los datos de que disponemos.

Gráfico 4.5 - Distribución por procedencia de los niños

2.- Estudio de las células sanguíneas

Hemos realizado un análisis de los valores del recuento de células sanguíneas en **306** niños (hematíes, plaquetas y leucocitos). Comparando dichos valores con valores de normalidad para cada una de las edades, observamos que los hematíes y las plaquetas están dentro del rango de normalidad.

Tabla 4.1 Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. tip.
Hematíes ($\times 10^9 / \text{mm}^3$)	306	3,74	5,42	4,5112	,29679
Plaquetas ($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	306	130	436	273,92	56,497
Leucocitos Tot. ($/\text{mm}^3$)	306	3200	14200	7038,27	1699,998
Linfocitos Tot. (mm^3)	306	600	5500	2788,04	755,595
N válido (según lista)	306				

En el caso de los leucocitos, no podemos afirmar que exista leucopenia en ningún caso. Sólo se detectó un caso de leucocitosis. En relación con los linfocitos, únicamente podemos hablar de linfopenia en un caso. Se trata, por tanto, de dos casos aislados que no tienen significado en el conjunto de grupo.

2.1.- Relación con factores de irradiación

Hemos analizado más detalladamente los leucocitos y linfocitos por ser las células más sensibles a la irradiación para ver si existe una correlación entre sus valores y la distancia del lugar de residencia de los niños al origen de la radiación (la Central de Chernobyl) y los años a los que ha estado expuesto a la radiación.

Para ello se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson.

Los datos obtenidos se relacionan en la tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Correlaciones de valores de células sanguíneas factores de radiación

		Distancia	Años Radiación	Leucocitos	Linfocitos
Distancia	Correlación de Pearson	1	-,262(**)	-,111	-,018
	Sig. (bilateral)	.	,000	,083	,783
	N	251	251	247	247
Años Radiación	Correlación de Pearson	-,262(**)	1	,031	-,051
	Sig. (bilateral)	,000	.	,592	,371
	N	251	310	306	306
Leucocitos	Correlación de Pearson	-,111	,031	1	,553(**)
	Sig. (bilateral)	,	,592	.	,000
	N	247	306	306	306
Linfocitos	Correlación de Pearson	-,018	-,051	,553(**)	1
	Sig. (bilateral)	,783	,371	,000	.
	N	247	306	306	306

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

No hemos hallado ninguna correlación significativa.

2.2.- Relación con la edad de los niños en el momento del accidente

Del mismo modo que antes, verificamos, mediante el coeficiente de correlación de Pearson, si existe relación entre el valor de leucocitos y linfocitos con la edad de los niños en el momento del accidente.

El resultado se muestra en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 - Correlaciones de valores de células sanguíneas factores de radiación

		Edad en el momento del accidente	Leucocitos (T)	Linfocitos (T)
Edad en el momento del accidente	Correlación de Pearson	1	-,073	-,141(*)
	Sig. (bilateral)	.	,285	,039
	N	217	214	214
Leucocitos (T)	Correlación de Pearson	-,073	1	,553(**)
	Sig. (bilateral)	,285	.	,000
	N	214	306	306
Linfocitos (T)	Correlación de Pearson	-,141(*)	,553(**)	1
	Sig. (bilateral)	,039	,000	.
	N	214	306	306

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Sólo es significativa la correlación de linfocitos con la edad del niño en el momento del accidente ($p=0,04$). Es decir, el número de linfocitos es menor cuanto mayor era la edad del niño en el momento del accidente.

Hemos obtenido los datos de regresión para cuantificar el grado de influencia de la edad del niño sobre el nivel de linfocitos:

Regresión Linfocitos / Edad del niño en el momento del accidente

Tabla 4.4 - Variables introducidas/eliminadas (b)

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Edad en el momento del accidente(a)	.	Introducir

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: Linfocitos (T)

Tabla 4.5 - Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,141(a)	,020	,015	732,895

a Variables predictoras: (Constante), Edad en el momento del accidente

Tabla 4.6 - ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	2316029,174	1	2316029,174	4,312	,039(a)
	Residual	113872488,583	212	537134,380		
	Total	116188517,757	213			

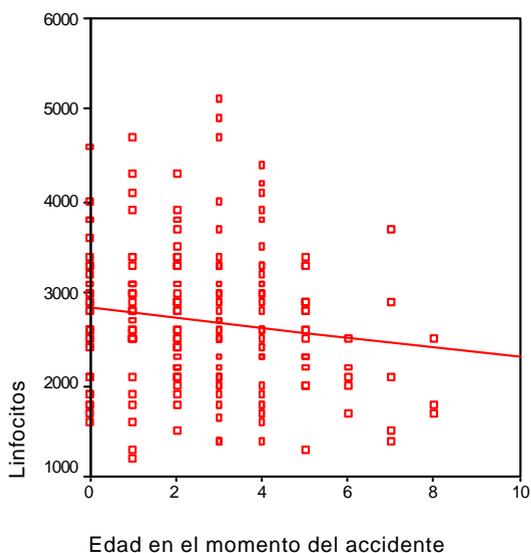
a Variables predictoras: (Constante), Edad en el momento del accidente

b Variable dependiente: Linfocitos (T)

Tabla 4.7 - Coeficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error tip.	Beta		
1	(Constante)	2854,453	84,637		33,726	,000
	Edad en el momento del accidente	-.55,115	26,542	-,141	-2,076	,039

a Variable dependiente: Linfocitos (T)

Gráfico 4.6 – Diagrama de dispersión y recta de regresión: Linfocitos en función de la edad en el momento del accidente.

Se observa que pese a que existe una correlación lineal negativa entre ambas variables, la influencia de la edad del niño en el momento del accidente explica en un porcentaje muy bajo el valor de Linfocitos (R^2

tiene un valor de 0'02 y R corregida es 0'015). Es decir, según el modelo la variación en el valor de linfocitos está explicada por la edad del niño en el momento del accidente en un 2% (o 1'5% si tomamos R² corregida).

La dispersión observada y el bajo valor de R² muestran que el ajuste de la recta obtenido es bastante pobre.

2.3.- Análisis en función de si el niño había nacido o no en el momento del accidente

Adicionalmente hemos estudiado también si existe alguna diferencia entre los valores de leucocitos y linfocitos entre los niños que habían nacido y los que no habían nacido en el momento del accidente.

Para este análisis hemos efectuado la prueba T de comparación de medias de ambos grupos de niños para ver si se obtenía alguna diferencia significativa:

Comparación de medias - Prueba T

Tabla 4.8 - Estadísticos de grupo

	Nacidos / No nacidos	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Linfocitos (T)	No había nacido	60	2783,33	757,150	97,748
	Sí había nacido	216	2820,56	756,412	51,467
Leucocitos (T)	No había nacido	60	6874,67	1628,635	210,256
	Sí había nacido	216	7112,82	1734,939	118,048

Según los datos que se muestran en la tabla 4.9 podemos concluir que ni en el caso de leucocitos ni en linfocitos existe diferencia significativa de medias entre los niños nacidos antes y después del accidente de la Central de Chernobyl.

Tabla 4.9 - Prueba de igualdad de medias muestras independientes datos células sanguíneas.

		Prueba de Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Linfocitos	Se han asumido varianzas iguales	,075	,785	-,337	274	,736	-37,22	110,408	-254,579	180,134
	No se han asumido varianzas iguales			-,337	94,261	,737	-37,22	110,469	-256,554	182,110
Leucocitos	Se han asumido varianzas iguales	,030	,862	-,953	274	,341	-238,16	249,925	-730,175	253,860
	No se han asumido varianzas iguales			-,988	99,350	,326	-238,16	241,128	-716,587	240,272

3.- Análisis de la función tiroidea

De los 306 niños en los que se obtuvo el valor de la TSH, 39 tenían un valor por encima del normal (un 12'7%). Los valores de T4L de estos 39 niños eran normales. En 4 niños se encontró un valor de TSH por debajo del normal, de éstos 3 tenían un valor de T4L normal y uno por debajo de los límites normales.

3.1.- Relación con factores de irradiación

Al igual que en el caso de las células sanguíneas hemos buscado la correlación entre la distancia del lugar de residencia de los niños al origen de la radiación (la Central de Chernobyl) y los años a los que ha estado expuesto a la radiación y los valores de T4 Libre y TSH. Para ello se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson.

Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.10.

La conclusión es que sólo es significativa la correlación T4L / Años de exposición a la radiación ($p < 0'001$). Existe una correlación negativa: a más años de exposición a la radiación menor valor de T4L.

El resto de correlaciones no son significativas.

Tabla 4.10 - Correlaciones función tiroidea - factores de radiación

		Distancia	Años Radiación	T4L	TSH
Distancia	Correlación de Pearson	1	-,262(**)	-,076	-,066
	Sig. (bilateral)	.	,000	,238	,299
	N	251	251	244	248
Años Radiación	Correlación de Pearson	-,262(**)	1	-,222(**)	,045
	Sig. (bilateral)	,000	.	,000	,433
	N	251	310	303	306
T4L	Correlación de Pearson	-,076	-,222(**)	1	-,028
	Sig. (bilateral)	,238	,000	.	,621
	N	244	303	303	305
TSH	Correlación de Pearson	-,066	,045	-,028	1
	Sig. (bilateral)	,299	,433	,621	.
	N	248	306	303	306

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Para la variable cuya correlación es significativa se han obtenido los correspondientes valores de la recta de regresión:

Regresión T4L / Años de exposición

Tabla 4.11 - Variables introducidas/eliminadas (b)

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Años Radiación(a)	.	Introducir

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: T4 Libre

Tabla 4.12 - Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error tip. de la estimación
1	,222(a)	,049	,046	,2197

a Variables predictoras: (Constante), Años de radiación

Tabla 4.13 - ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	,756	1	,756	15,666	,000(a)
	Residual	14,534	301	,048		
	Total	15,291	302			

a Variables predictoras: (Constante), Años Radiación

b Variable dependiente: T4 Libre

Tabla 4.14 - Coeficientes(a)

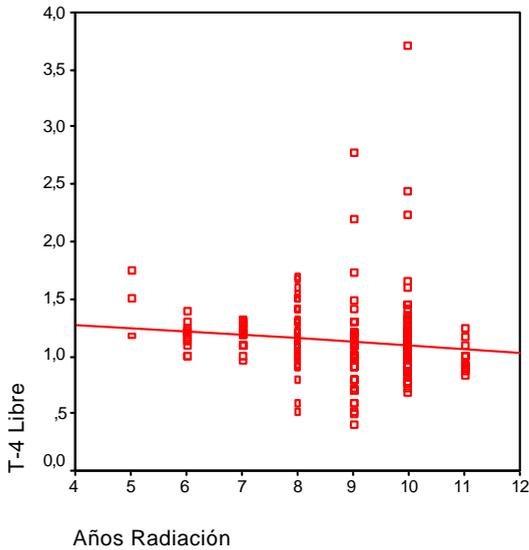
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error tip.	Beta		
1	(Constante)	1,470	,092		15,983	,000
	T4 Libre	-,041	,010	-,222	-3,958	,000

a Variable dependiente: T4 Libre

Pese a que existe una correlación lineal negativa entre ambas variables, la influencia de la distancia explica en un porcentaje bajo el valor de la T4L (R^2 tiene un valor de 0'049 y R^2 corregida es 0'046). Es decir, según el modelo, la variación en el valor de T4L está explicada por los años de exposición en un 4'9% (o 4'6% si tomamos R^2 corregida).

La dispersión observada y el valor bastante bajo de R^2 indican que el ajuste de la recta obtenido es bastante pobre. La recta de regresión mínimo-cuadrática no parece muy adecuada para explicar satisfactoriamente la pauta de relación de estas variables.

Gráfico 4.7 – Diagrama de dispersión y recta de regresión: T4L / Años de exposición.



3.2.- Relación con la edad de los niños en el momento del accidente

Buscamos ahora la correlación entre la edad del niño en el momento del accidente y los valores de T4 Libre y TSH. Para ello utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson. El resultado se muestra en la tabla 4.15.

Tabla 4.15 - Correlaciones función tiroidea - factores de radiación

		Edad en el momento del accidente	T4 Libre	TSH
Edad en el momento del accidente	Correlación de Pearson	1	-,034	-,056
	Sig. (bilateral)	.	,625	,412
	N	217	214	214
T4 Libre	Correlación de Pearson	-,034	1	-,028
	Sig. (bilateral)	,625	.	,621
	N	214	303	305
TSH	Correlación de Pearson	-,056	-,028	1
	Sig. (bilateral)	,412	,621	.
	N	214	303	306

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

No se han hallado correlaciones significativas.

3.3.- Análisis en función de si el niño había nacido o no en el momento del accidente

Comprobamos ahora si existe alguna diferencia entre los valores medios en los grupos de niños que ya habían nacido en el momento del accidente y los que no habían nacido.

Para ello hemos utilizado la prueba T de igualdad de medias con los siguientes resultados:

Prueba T - Función tiroidea**Tabla 4.16 - Estadísticos de grupo**

	Niño nacido antes/después accidente	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
T4 Libre	No había nacido	61	1,118	,3041	,0389
	Sí había nacido	215	1,131	,2931	,0200
TSH	No había nacido	60	3,948	1,4377	,1856
	Sí había nacido	216	2,911	1,6222	,1104

En el caso de T4L no hay diferencias significativas en las medias en ambos grupos.

En cambio en el caso de la TSH hemos encontrado que los niños nacidos después del accidente nuclear tienen un valor medio de TSH más bajo que los niños que aún no habían nacido en el momento del accidente ($p < 0,001$).

Tabla 4.17 - Prueba de muestras independientes de igualdad de medias de T4L y TSH en niños nacidos y no nacidos

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	T	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
T4 Libre	Se han asumido varianzas iguales	,614	,434	-,304	274	,762	-,013	,0429	-,0974	,0714
	No se han asumido varianzas iguales			-,297	93,951	,767	-,013	,0438	-,0999	,0739
TSH	Se han asumido varianzas iguales	1,962	,162	4,484	274	,000	1,037	,2312	,5815	1,4919
	No se han asumido varianzas iguales			4,801	104,523	,000	1,037	,2160	,6085	1,4649

4.- Estudio de los parámetros de estrés oxidativo

4.1.- Datos descriptivos de los niños sobre los que se han realizado el estudio de parámetros del estrés oxidativo

En los grupos 3 y 4 cuyas fechas de reconocimiento fueron del 01/07/1996 a 09/08/1996 y el 15/07/1997 respectivamente, además de los datos clínico-analíticos se realizó estudio de parámetros oxidativos.

Al igual que hemos hecho antes con el total de niños efectuamos a continuación una descripción de este conjunto de niños,

Número total de niños estudiados: **154**

71 niños (46'1 %)

83 niñas (53'9 %)

106 proceden de orfanatos (68'8 %)

48 vivían con familias (31'2%)

Las edades de los niños en el momento de la revisión y la distribución de edades de los niños analizados en el momento del accidente de la Central de Chernobyl se pueden observar en los gráficos 4.8 y 4.9.

Gráfico 4.8 - Edades de los niños en el momento del accidente

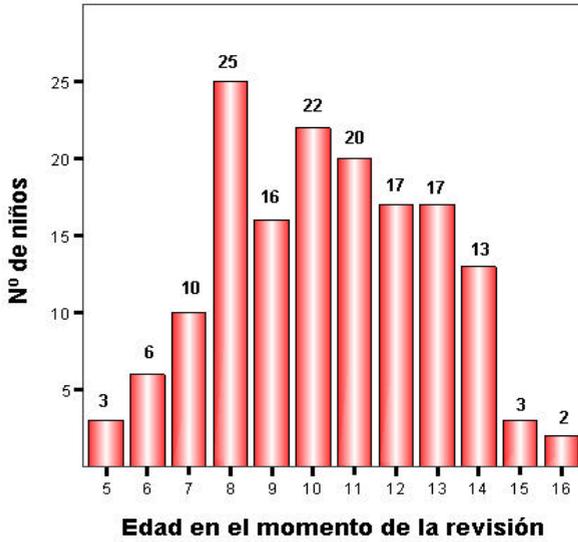
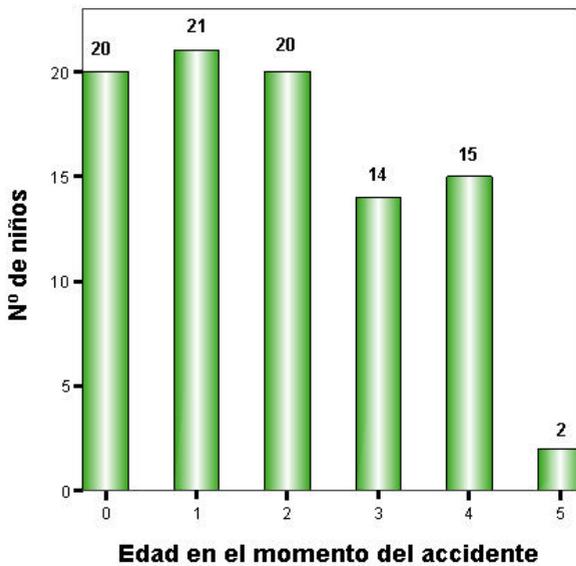
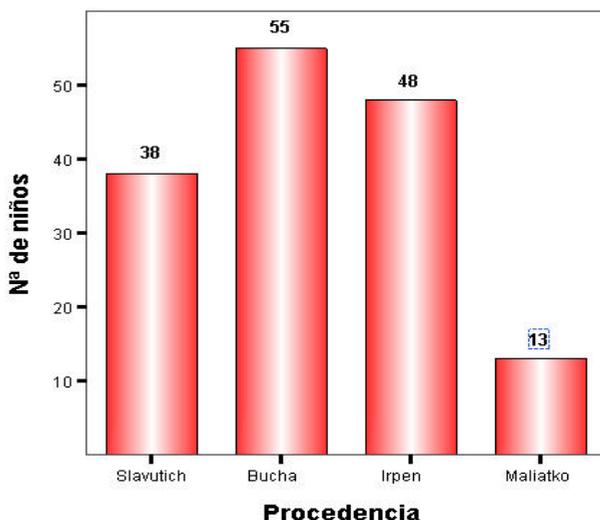


Gráfico 4.9 - Distribución por edades de los niños en el momento del accidente



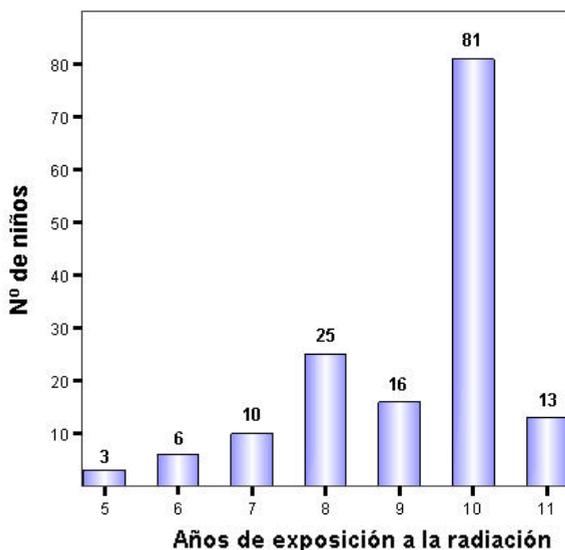
En el gráfico 4.10 se indica el número de niños por lugar de procedencia.

Gráfico 4.10 - Distribución por lugar de procedencia



La distribución de los niños por años de exposición a la radiación se detalla en el gráfico 4.11.

Gráfico 4.11 - Distribución por años de exposición a la radiación



4.2.- Análisis de valores de marcadores del estrés oxidativo

Además de una descripción estadística de los resultados de cada valor, dado que en la literatura médica no hemos encontrado suficientes estudios que permitan asumir la hipótesis de que los valores de estas variables se distribuyen normalmente, efectuaremos en cada caso un contraste de hipótesis de validación de que la muestra procede de una población con distribución normal. Para este contraste, al ser el tamaño de la muestra suficientemente grande utilizaremos la prueba de Kolmogorov-Smirnov-Lillefors.

4.2.1.- Enzimas y sustrato antioxidantes

CATALASA

Se obtuvo el valor de catalasa en 109 niños, con un valor mínimo de 54'77 U/g Hb. y un valor máximo de 198'91. El valor medio de los obtenidos fue 130'87.

Tabla 4.18 - Datos descriptivos obtenidos de CATALASA (U/g Hb)

		Estadístico	Error tip.	
Catalasa Nº casos = 109	Media	130,8706	3,20380	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	124,5202	
		Límite superior	137,2211	
	Media recortada al 5%	131,6160		
	Mediana	135,4600		
	Varianza	1118,814		
	Desv. tip.	33,44868		
	Mínimo	54,77		
	Máximo	198,91		
	Rango	144,14		
	Amplitud intercuartil	48,8400		
	Asimetría	-0,296	0,231	
	Curtosis	-0,431	0,459	

Tabla 4.19 - Prueba de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Estadístico	gl	Sig.
Catalasa	,062	109	,200(*)

* Este es un límite inferior de la significación verdadera.
a Corrección de la significación de Lilliefors

Por tanto, en base al resultado obtenido, aceptamos que la muestra procede de población con distribución normal.

Tanto el histograma como los gráficos QQ normal y QQ normal sin tendencias vienen a confirmar esta hipótesis.

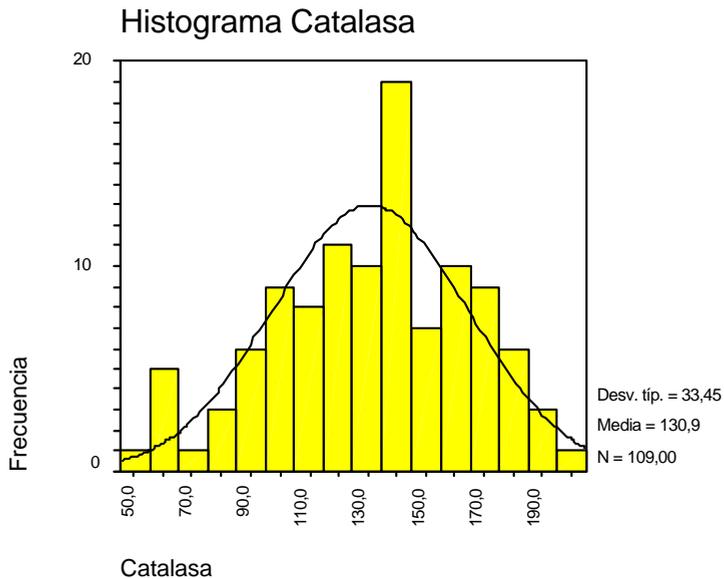
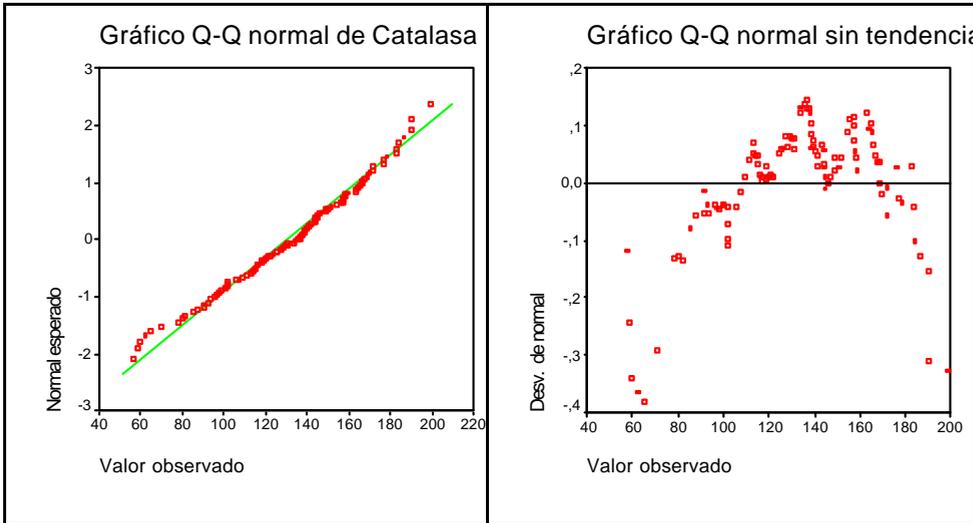
Gráfico 4.11 – Histograma con curva normal de la Catalasa

Gráfico 4.12 – Gráfico Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias de Catalasa



SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

El valor de SOD se obtuvo en 106 niños. Los valores extremos obtenidos fueron de un mínimo de 3'01 U/mg Hb. y un máximo de 23'81. La media fue 9'32.

Tabla 4.20 - Descriptivos obtenidos de SOD (U/mg Hb.)

		Estadístico	Error tip.	
Superóxido dismutasa Nº casos = 106	Media	9,3192	0,53845	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Limite inferior	8,2515	
		Limite superior	10,3868	
	Media recortada al 5%	8,9272		
	Mediana	7,6200		
	Varianza	30,732		
	Desv. típ.	5,54363		
	Mínimo	3,01		
	Máximo	23,81		
	Rango	20,80		
	Amplitud intercuartil	7,5400		
	Asimetría	1,033	0,235	
	Curtosis	0,042	0,465	

Tabla 4.21 - Prueba de normalidad SOD

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Estadístico	gl	Sig.
Superóxido dismutasa	,188	106	,000

a Corrección de la significación de Lilliefors

En este caso concluimos que la muestra no procede de población con distribución normal. Este resultado viene avalado por la observación del histograma y los gráficos Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias

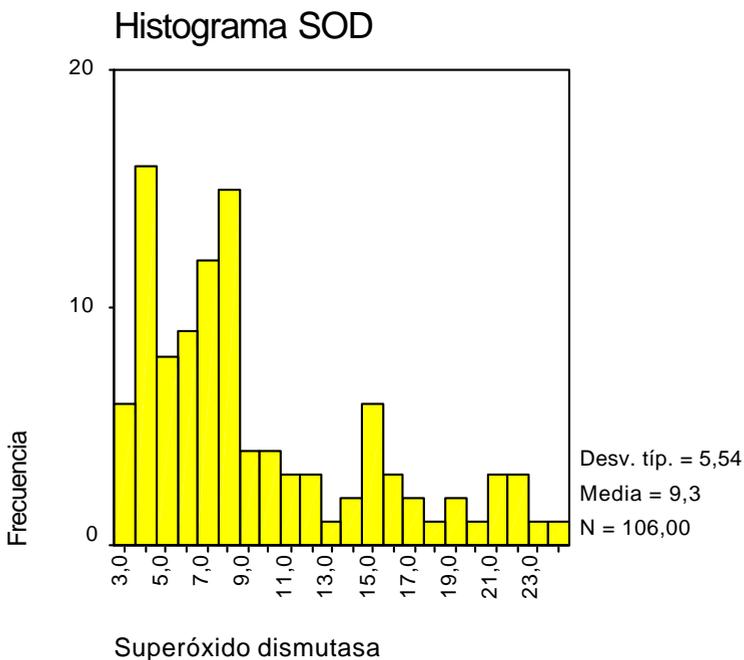
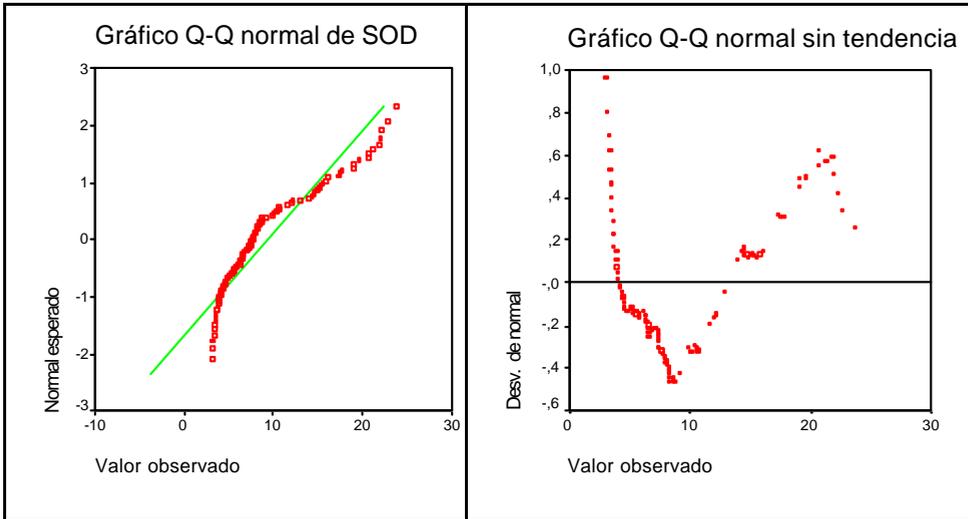
Gráfico 4.13 Histograma de la Superóxido dismutasa.

Gráfico 4.14 – Gráfico Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias de Superóxido dismutasa



GLUTATION REDUCIDO (GSH)

Los valores de glutacion reducido se obtuvieron de un total de 123 niños, con un valor mínimo de 1'10 U/g Hb. y un máximo de 7'89. La media fue de 3'80.

Tabla 4.22 - Datos descriptivos obtenidos de GSH (U/g Hb.)

		Estadístico	Error tip.	
Nº casos = 123	Media	3,7967	0,14185	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Limite inferior	3,5159	
		Limite superior	4,0775	
	Media recortada al 5%	3,7605		
	Mediana	3,7900		
	Varianza	2,475		
	Desv. tip.	1,57318		
	Mínimo	1,10		
	Máximo	7,89		
	Rango	6,79		
	Amplitud intercuartil	2,5900		
	Asimetría	0,266	0,218	
	Curtosis	-0,649	0,433	

Tabla 4.23 - Pruebas de normalidad GSH

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Estadístico	gl	Sig.
Glutation reducido	,073	123	,171

a. Corrección de la significación de Lilliefors

El resultado de la prueba nos lleva a admitir que la muestra procede de una población normal. Además ello es confirmado por la observación del histograma y los gráficos Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias.

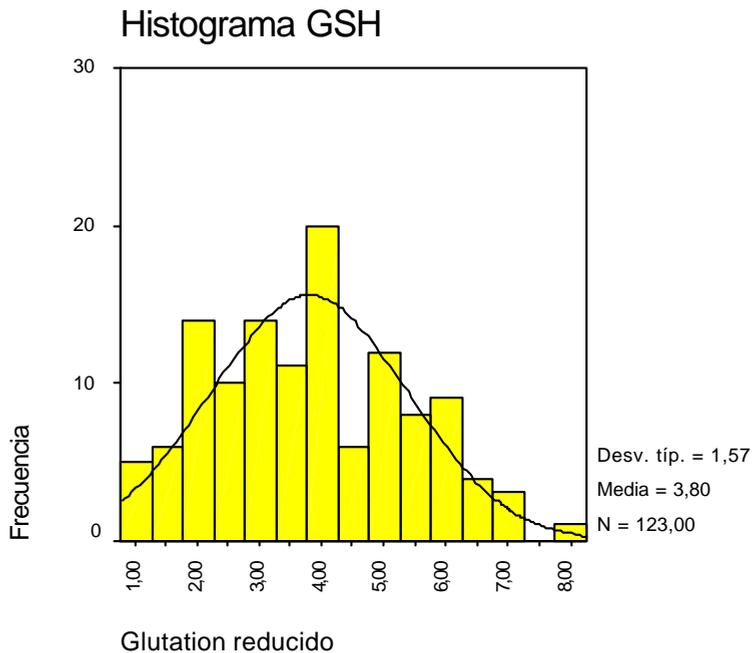
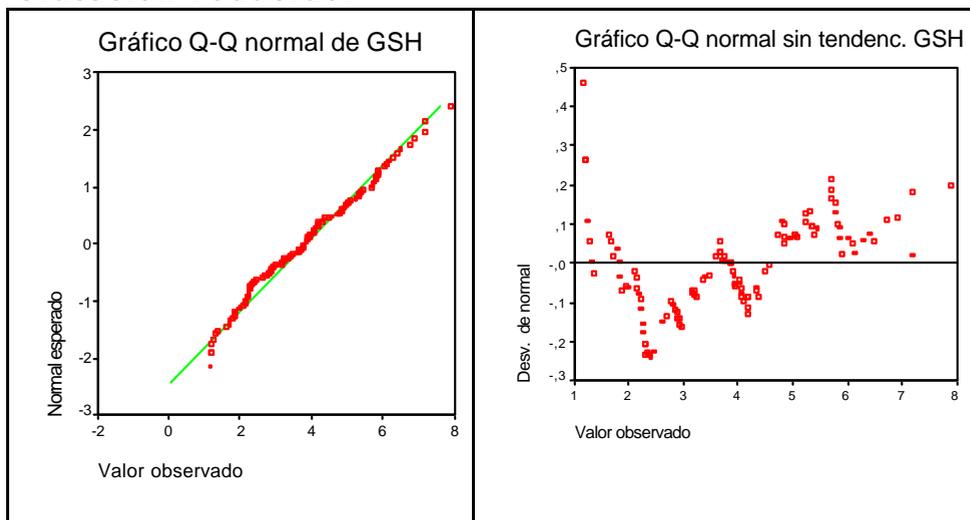
Gráfico 4.15 Histograma con curva normal del Glutation reducido.

Gráfico 4.16 – Gráfico Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias del Glutacion reducido.



4.2.2.- Marcador de peroxidación lipídica

MALONDIALDEHÍDO (MDA)

Se han obtenido datos de 137 niños. El valor mínimo hallado es de 11'66 nmol/ml, el valor máximo ha sido 69'6 y la media 30'19.

Tabla 4.24 - Datos descriptivos obtenidos de MDA (nmol/ml)

		Estadístico	Error tip.	
Nº casos = 137	Malondialdehído	Media	30,1930	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Limite inferior	28,4290	
		Limite superior	31,9571	
	Media recortada al 5%		29,4325	
	Mediana		27,9099	
	Varianza		109,013	
	Desv. tip.		10,44095	
	Mínimo		11,6586	
	Máximo		69,5981	
	Rango		57,934	
	Amplitud intercuartil		10,2454	
	Asimetría		1,358	0,207
	Curtosis		2,797	0,411

Tabla 4.25 - Pruebas de normalidad MDA

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Estadístico	gl	Sig.
Malondialdehído	,126	137	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Concluimos que la muestra no procede de población con distribución normal. El histograma y las tablas Q-Q normal y Q-Q sin tendencias obtenidas son las siguientes:

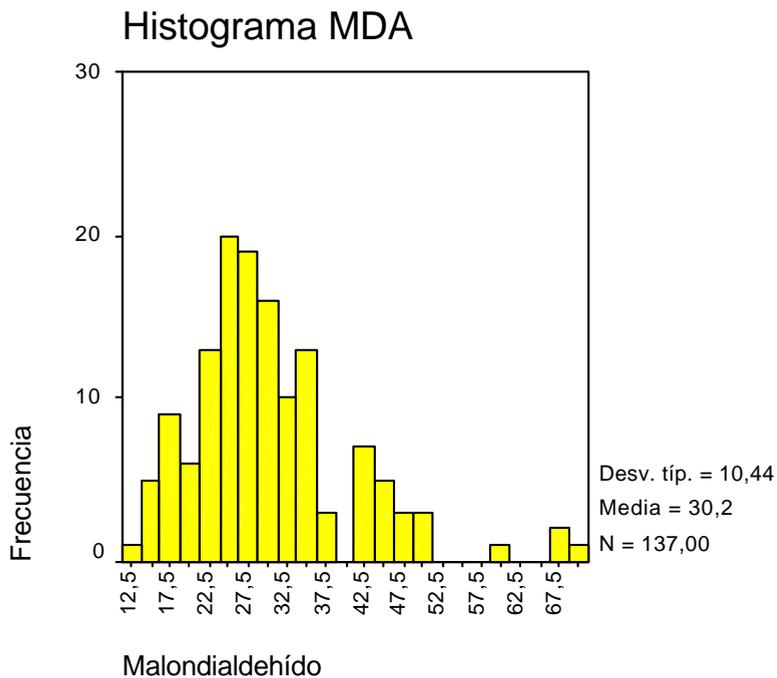
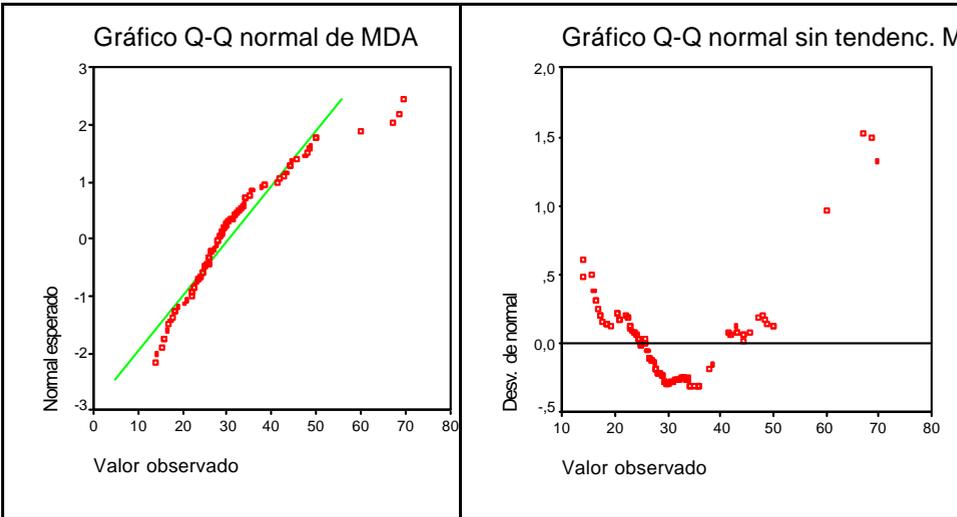
Gráfico 4.17 – Histograma del Malondialdehído

Gráfico 4.18 – Gráfico Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias del Malondialdehído



4.2.3.- Base mutagénica 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG)

Se han obtenido datos de 91 niños. Los valores están comprendidos entre un mínimo de 1'89 moléculas/10⁵ dG y un máximo de 14'53. La media ha sido 5'94.

Tabla 4.26 - Datos descriptivos obtenidos de 8-oxo-dG /10⁵ dG

		Estadístico	Error tip.	
8-oxo-dG Nº casos = 91	Media	5,9419	0,33657	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Limite inferior	5,2732	
		Limite superior	6,6105	
	Media recortada al 5%	5,7121		
	Mediana	5,2000		
	Varianza	10,308		
	Desv. tip.	3,21064		
	Mínimo	1,89		
	Máximo	14,53		
	Rango	12,64		
	Amplitud intercuartil	3,9000		
	Asimetría	1,006	0,253	
Curtosis	0,260	0,500		

Tabla 4.27 - Prueba de normalidad 8-oxo-dG

	Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Estadístico	gl	Sig.
8-oxo-dG	0,125	91	0,001

a. Corrección de la significación de Lilliefors

En este caso concluimos que la muestra no procede de población con distribución normal. La observación del histograma y los gráficos Q-Q normal y QQ normal sin tendencias también nos lleva a concluir lo mismo.

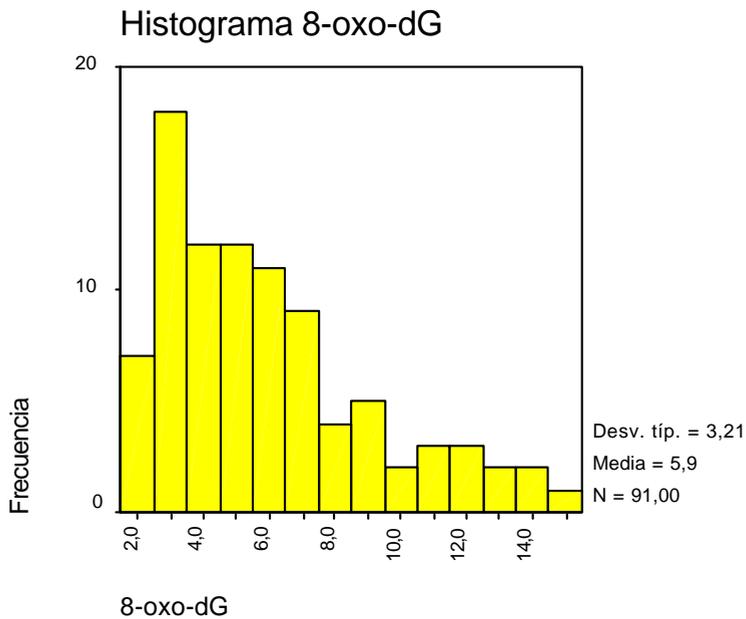
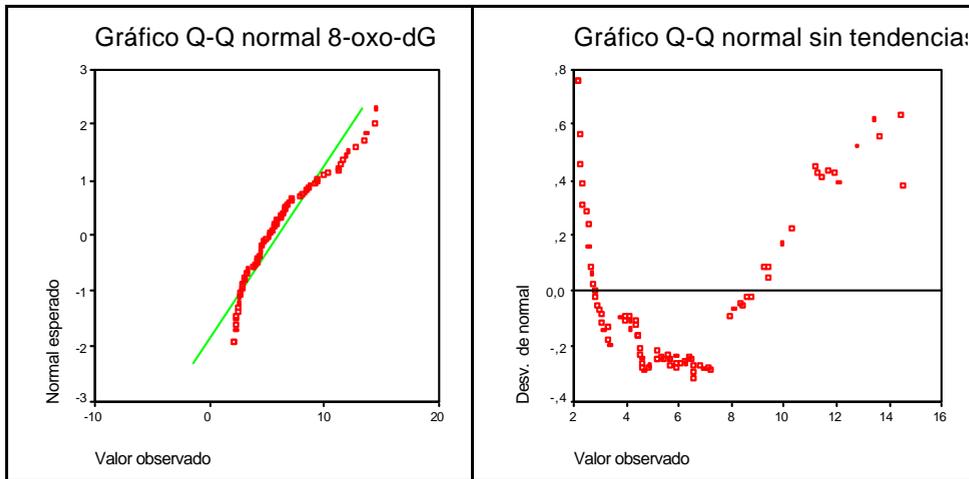
Gráfico 4.18 – Histograma de 8-oxo-dG

Gráfico 4.19 – Gráfico Q-Q normal y Q-Q normal sin tendencias del 8-oxo-dG

4.3.- Relación con el sexo y la edad

- **SEXO:**

El número de casos por sexo era el siguiente:

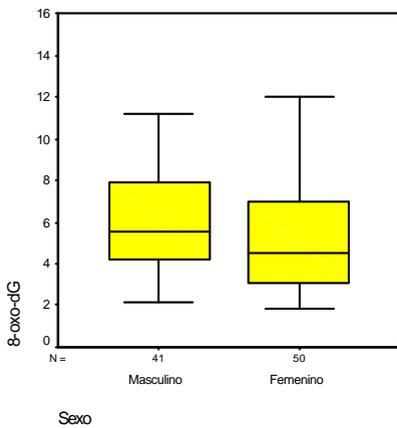
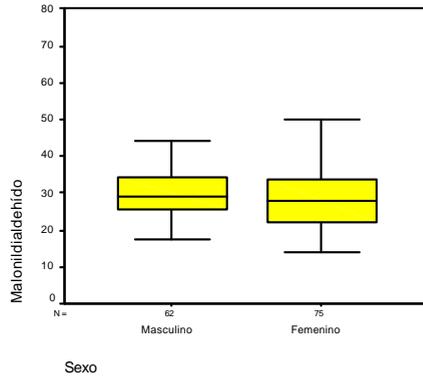
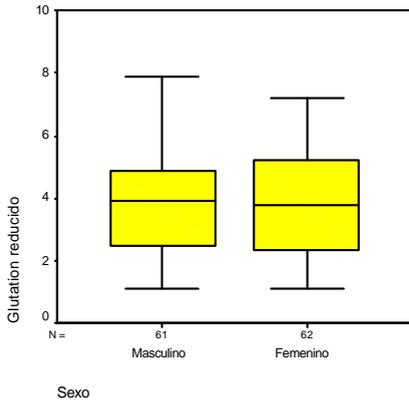
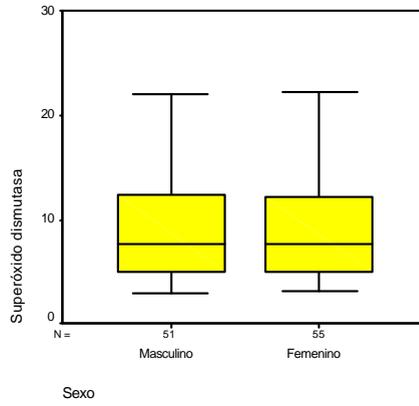
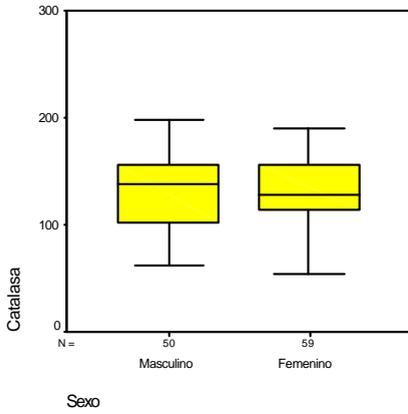
Tabla 4.27 - Resumen de casos

	Sexo	N
Catalasa	Masculino	50
	Femenino	59
SOD	Masculino	51
	Femenino	55
GSH	Masculino	61
	Femenino	62
MDA	Masculino	62
	Femenino	75
8-oxo-dG	Masculino	41
	Femenino	50

En primer lugar buscamos si existen diferencias en los valores de los parámetros oxidativos en función del sexo.

Mediante el gráfico 4.20 es posible realizar un análisis preliminar sobre las diferencias de media por sexo en cada sustancia. A primera vista no parece haber diferencias importantes entre uno y otro sexo. No obstante, hemos efectuado los correspondientes contrastes de hipótesis estadísticos para verificar si estas diferencias son significativas o no.

Gráfico 4.20 - Valores medios de catalasa, SOD, GSH, MDA y 8-oxo-dG



Hemos utilizado la prueba T de Student para contrastar la hipótesis de que las medias son iguales en niños y en niñas en el caso de la Catalasa y Glutation reducido, Para la GSH, 8oxo-dG y MDA dado que no podemos asegurar que sus valores poblacionales se distribuyan normalmente, utilizaremos contrastes no paramétricos, concretamente la prueba U de Mann-Whitney.

Prueba T de igualdad de medias de Catalasa y GSH entre sexo masculino - femenino

Tabla 4.28 - Estadísticos de grupo

	Sexo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Catalasa	Masculino	50	132,4392	33,26628	4,70456
	Femenino	59	129,5414	33,82995	4,40428
GSH	Masculino	61	3,7531	1,59147	,20377
	Femenino	62	3,8395	1,56677	,19898

Tabla 4.29- Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de conf, para la diferencia	
									Inferior	Superior
Catalasa	Se han asumido varianzas iguales	,000	,996	,449	107	,654	2,8978	6,45346	-9,89538	15,69107
	No se han asumido varianzas iguales			,450	104,630	,654	2,8978	6,44443	-9,88079	15,67648
GSH	Se han asumido varianzas iguales	,054	,816	-,303	121	,762	-,0864	,28477	-,65018	,47737
	No se han asumido varianzas iguales			-,303	120,876	,762	-,0864	,28481	-,65025	,47745

No podemos rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias. Por tanto, no es posible aceptar que las medias de Catalasa y GSH de ambos grupos sean diferentes.

Prueba U de Mann-Whitney de igualdad de medias entre sexo masculino y femenino de valores de SOD, MDA y 8-oxo-dG

Tabla 4.30 - Rangos

	Sexo	N	Rango promedio	Suma de rangos
SOD	Masculino	51	52,47	2676,00
	Femenino	55	54,45	2995,00
	Total	106		
MDA	Masculino	62	74,55	4622,00
	Femenino	75	64,41	4831,00
	Total	137		
8-oxo-dG	Masculino	41	48,18	1975,50
	Femenino	50	44,21	2210,50
	Total	91		

Tabla 4.31 - Estadísticos de contraste(a)

	Superóxido dismutasa	Malondialdehído	8-oxo-dG
U de Mann-Whitney	1350,000	1981,000	935,500
W de Wilcoxon	2676,000	4831,000	2210,500
Z	-,332	-1,488	-,714
Sig. asintót. (bilateral)	,740	,137	,475

a Variable de agrupación: Sexo

Tampoco en este caso podemos rechazar la igualdad de medias.

Por tanto concluimos que no se han hallado diferencias significativas entre niños y niñas en los niveles de Catalasa, Superóxido dismutasa, Glutacion reducido, malondialdehído y 8-oxo-2'-deoxiguanosina.

- **EDAD:**

Buscamos a continuación si existe alguna correlación entre los valores de estos cinco parámetros con la edad en el momento de la revisión.

En el caso de la Catalasa y GSH utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson:

Tabla 4.32 - Correlaciones Catalasa - GSH con edad en el momento de la revisión

		Edad en revisión	Catalasa	GSH
Edad en el momento de la revisión	Correlación de Pearson	1	-,110	,064
	Sig. (bilateral)	.	,254	,484
	N	310	109	123
Catalasa	Correlación de Pearson	-,110	1	,167
	Sig. (bilateral)	,254	.	,112
	N	109	109	92
GSH	Correlación de Pearson	,064	,167	1
	Sig. (bilateral)	,484	,112	.
	N	123	92	123

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

La conclusión es que no se ha hallado ninguna correlación significativa entre los valores de Catalasa y GSH y las edades de los niños en el momento de la revisión.

Para el realizar el mismo estudio en el caso de la SOD, MDA y 8-oxo-dG utilizaremos correlaciones no paramétricas, concretamente usaremos la Tau-b de Kendall.

Este contraste nos muestra que no existe correlación significativa entre los valores SOD, MDA y 8-oxo-dG y la edad de los niños en el momento de la revisión.

Tabla 4.33 - Correlaciones no paramétricas SOD, MDA, 8-oxo-dG - Tau-b de Kendall

			Edad	SOD	MDA	8-oxo-dG
Tau-b de Kendall	Edad	Coefficiente de correlación	1,000	-,025	,033	,074
		Sig. (bilateral)	.	,723	,585	,324
		N	310	106	137	91
	SOD	Coefficiente de correlación	-,025	1,000	-,002	-,125
		Sig. (bilateral)	,723	.	,982	,146
		N	106	106	96	64
	MDA	Coefficiente de correlación	,033	-,002	1,000	,118
		Sig. (bilateral)	,585	,982	.	,125
		N	137	96	137	79
	8-oxo-dG	Coefficiente de correlación	,074	-,125	,118	1,000
		Sig. (bilateral)	,324	,146	,125	.
		N	91	64	79	91

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

4.4.- Relación con factores de irradiación

4.4.1.- Análisis de correlación de los parámetros de estrés oxidativo con la distancia al lugar donde se produjo el accidente y años de exposición

A continuación buscamos la correlación entre los valores de los cinco parámetros y los factores de irradiación, la distancia al foco de la radiación y los años de exposición crónica a la misma.

En el caso de la Catalasa y GSH utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson (tabla 4.34).

Tabla 4.34 - Correlaciones Catalasa - GSH con factores de irradiación

		Distancia	Años Radiación	Catalasa	GSH
Distancia	Correlación de Pearson	1	-,262(**)	,194(*)	,287(**)
	Sig. (bilateral)	.	,000	,043	,001
	N	251	251	109	123
Años Radiación	Correlación de Pearson	-,262(**)	1	-,132	,043
	Sig. (bilateral)	,000	.	,170	,635
	N	251	310	109	123
Catalasa	Correlación de Pearson	,194(*)	-,132	1	,167
	Sig. (bilateral)	,043	,170	.	,112
	N	109	109	109	92
GSH	Correlación de Pearson	,287(**)	,043	,167	1
	Sig. (bilateral)	,001	,635	,112	.
	N	123	123	92	123

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significante al nivel 0,05 (bilateral).

El valor de catalasa y la distancia al origen de la radiación se correlacionan positivamente de forma significativa ($p=0'043$).

El valor de GSH y la distancia al origen de la radiación se correlacionan positivamente de forma significativa ($p=0'001$).

Es decir, los niveles de catalasa y GSH aumentan a medida que nos alejamos del foco de radiación.

La correlación con los años de exposición no es significativa.

En el caso de la SOD, MDA y 8-oxo-dG utilizamos contrastes no paramétricos, obtenemos la Tau-b de Kendall (tabla 4.35).

Tabla 4.35 - Correlaciones no paramétricas SOD, MDA 8-oxo-dG con factores de irradiación - Tau-b de Kendall

			Distancia	Años Radiación	SOD	MDA	8-oxo-dG
Tau-b Kendall	Distancia	Coefficiente de correlación	1,000	-,255(**)	-,058	,141(*)	-,108
		Sig. (bilateral)	.	,000	,455	,040	,202
		N	251	251	106	137	91
	Años Radiación	Coefficiente de correlación	-,255(**)	1,000	,048	,004	,080
		Sig. (bilateral)	,000	.	,519	,945	,325
		N	251	310	106	137	91
	SOD	Coefficiente de correlación	-,058	,048	1,000	-,002	-,125
		Sig. (bilateral)	,455	,519	.	,982	,146
		N	106	106	106	96	64
	MDA	Coefficiente de correlación	,141(*)	,004	-,002	1,000	,118
		Sig. (bilateral)	,040	,945	,982	.	,125
		N	137	137	96	137	79
8-oxo-dG	Coefficiente de correlación	-,108	,080	-,125	,118	1,000	
	Sig. (bilateral)	,202	,325	,146	,125	.	
	N	91	91	64	79	91	

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Este estadístico nos indica que el valor de MDA se correlaciona con la distancia al origen de la radiación positivamente de forma significativa ($p=0,04$). El valor de MDA aumenta con la distancia al foco de radiación.

El resto de correlaciones no son significativas

Por tanto, los resultados obtenidos nos muestran una relación entre la distancia al lugar del accidente y los valores de Catalasa, GSH y MDA.

4.4.2.- Modelo de regresión lineal con la distancia

Hemos buscado un modelo de regresión que permita explicar los valores de estos parámetros en función de la irradiación. Utilizando los datos de que disponemos en este estudio podríamos intentar establecer un modelo suponiendo que el nivel de irradiación recibido es función de la distancia al origen de la radiación y al nº de años a los que se ha estado expuesto a la radiación.

No obstante, en el caso de la SOD y 8-oxo-dG no hemos encontrado que los factores de irradiación produzcan efectos significativos en los valores de estos parámetros (no existe correlación entre las variables). En el caso de la Catalasa, GSH y MDA existe correlación con la distancia al origen de la radiación, pero no se ha hallado correlación con la variable tiempo de exposición a la radiación.

• CATALASA

El análisis de la regresión lineal simple tomando como variable independiente la distancia muestra los siguientes resultados:

Tabla 4.36 - Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,194(a)	,038	,029	32,96490

a Variables predictoras: (Constante), Distancia

b Variable dependiente: Catalasa

Tabla 4.37 - ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	4556,652	1	4556,652	4,193	,043(a)
	Residual	116275,260	107	1086,685		
	Total	120831,912	108			

a Variables predictoras: (Constante), Distancia

b Variable dependiente: Catalasa

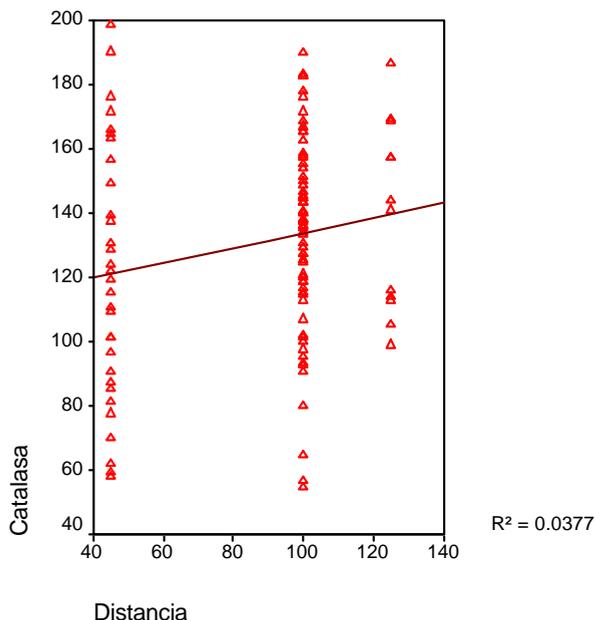
Tabla 4.38 - Coeficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error tip.	Beta		
1	(Constante)	110,480	10,446		10,576	,000
	Distancia	,234	,114	,194	2,048	,043

a Variable dependiente: Catalasa

Pese a que existe una correlación lineal positiva entre ambas variables la influencia de la distancia al origen de la radiación explica en un porcentaje bastante bajo el valor de la Catalasa (R^2 tiene un valor de 0'038 y R corregida es 0'029). Según este modelo la variación en el valor de la catalasa está explicada por la distancia al origen de la radiación en un 3'8 % (o 2'9 % si tomamos R^2 corregida).

La dispersión observada y el bajo valor de R^2 muestran sin embargo que el ajuste de la recta obtenido es bastante pobre. La recta de regresión mínimo-cuadrática no parece muy adecuada para explicar satisfactoriamente la pauta de relación de las variables.

Gráfico 4.21 – Diagrama de dispersión, recta de regresión y ajuste: valores de Catalasa en relación a la distancia al origen de la radiación.

- **GSH**

El análisis de la regresión lineal simple tomando como variable independiente la distancia muestra los siguientes resultados:

Tabla 4.39 - Variables introducidas/eliminadas (b)

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Distancia(a)	.	Introducir

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: Glutation reducido

Tabla 4.40 - Resumen del modelo(b)

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,287(a)	,082	,075	1,51314

a Variables predictoras: (Constante), Distancia

b Variable dependiente: Glutation reducido

Tabla 4.41 - ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	24,895	1	24,895	10,873	,001(a)
	Residual	277,042	121	2,290		
	Total	301,937	122			

a Variables predictoras: (Constante), Distancia

b Variable dependiente: Glutation reducido

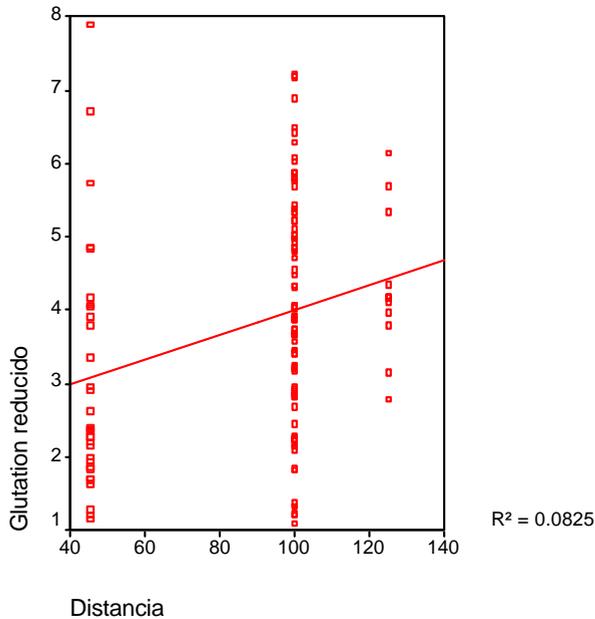
Tabla 4.42 - Coeficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	2,283	,479		4,766	,000
	Distancia	,017	,005	,287		

a Variable dependiente: Glutation reducido

Pese a que existe una correlación lineal positiva entre ambas variables la influencia de la distancia al origen de la radiación explica en un porcentaje relativamente bajo el valor del GSH (R^2 tiene un valor de 0'082 y R^2 corregida es 0'075). La variación en el valor del GSH está explicada por la distancia al origen de la radiación en un 8'2 % (o 7'5 % si tomamos R^2 corregida).

Gráfico 4.22 – Diagrama de dispersión, recta de regresión y ajuste valores de GSH en relación a la distancia al origen de la radiación.



- **MDA**

El modelo de regresión lineal simple tomando como variable independiente la distancia no ofrece resultados significativos.

Tabla 4.43 - Variables introducidas/eliminadas (b)

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Distancia(a)	.	Introducir

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: Malondialdehido

Tabla 4.44 - Resumen del modelo(b)

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error tip. de la estimación	Durbin-Watson
1	,099(a)	,010	,002	10,42858802	1,037

a Variables predictoras: (Constante), Distancia

b Variable dependiente: Malondialdehido

Tabla 4.45 - ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	143,850	1	143,850	1,323	,252(a)
	Residual	14681,986	135	108,755		
	Total	14825,835	136			

a Variables predictoras: (Constante), Distancia

b Variable dependiente: Malondialdehído

Tabla 4.46 - Coeficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	26,580	3,266		8,139	,000
	Distancia	,041	,035	,099	1,150	,252

a Variable dependiente: Malondialdehído

4.4.3.- Comparación de medias de valores en función de la distancia al foco de radiación

• CATALASA Y GLUTATION REDUCIDO

Agrupando a los niños con relación a su residencia, se pretende contrastar si la media de los valores de Catalasa y GSH es diferente en cada grupo (se consideran tres grupos de niños que residen a 45, 100 y 125 Km de la Central Nuclear).

Para ello utilizamos el análisis de la varianza (ANOVA) del factor distancia.

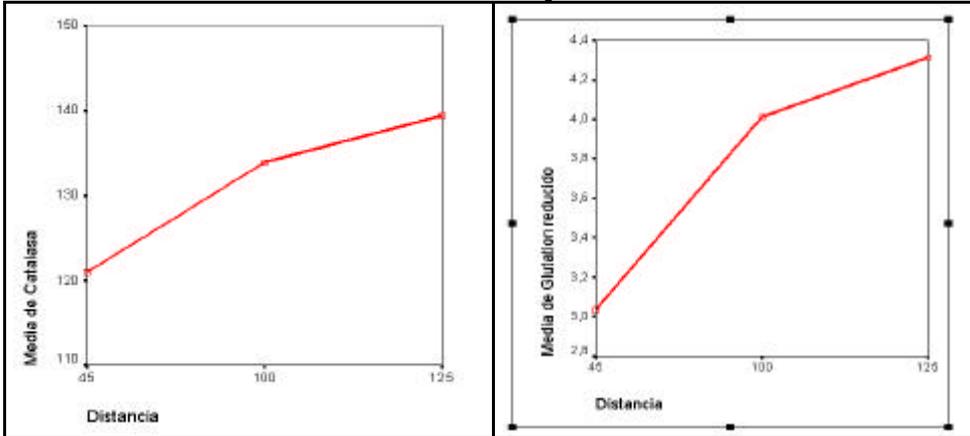
A primera vista, en base a los resultados descriptivos, parece que la media de ambos valores aumenta con la distancia (el análisis previo de los coeficientes de correlación ya indicaba este hecho). No obstante, habrá que efectuar los correspondientes contrastes estadísticos para poder aceptar este supuesto.

ANOVA de un factor**Tabla 4.47 - Descriptivos**

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Catalasa	45	31	120,9729	39,70869	7,13189	106,4076	135,5382	58,49	198,91
	100	66	133,9492	30,28654	3,72801	126,5039	141,3946	54,77	190,06
	125	12	139,5075	29,15179	8,41540	120,9853	158,0297	99,21	186,63
	Total	109	130,8706	33,44868	3,20380	124,5202	137,2211	54,77	198,91
Glutation reducido	45	31	3,0335	1,64056	,29465	2,4318	3,6353	1,15	7,89
	100	80	4,0146	1,53286	,17138	3,6735	4,3557	1,10	7,20
	125	12	4,3150	,97677	,28197	3,6944	4,9356	2,78	6,13
	Total	123	3,7967	1,57318	,14185	3,5159	4,0775	1,10	7,89

Tabla 4.48 - ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Catalasa	Inter-grupos	4557,600	2	2278,800	2,077	,130
	Intra-grupos	116274,312	106	1096,927		
	Total	120831,912	108			
Glutation reducido	Inter-grupos	25,077	2	12,539	5,435	,006
	Intra-grupos	276,860	120	2,307		
	Total	301,937	122			

Gráfico 4.23 – Medias de Catalasa y GSH en función de la distancia.

En el caso de la **Catalasa**, aunque se observa que el valor de la media de los tres grupos aumenta con la distancia, estadísticamente no podemos rechazar la igualdad de medias de los tres grupos.

En el caso del **GSH** debe rechazarse la hipótesis de igualdad de medias ($p=0,006$). Hay al menos un grupo cuyo valor de GSH difiere del de al menos otro.

Para saber qué media o medias difieren de qué otras efectuamos un contraste post hoc. Utilizamos el contraste de Diferencia Honéstamente Significativa (HDS) de Tukey.

Pruebas post hoc

Tabla 4.49 - Comparaciones múltiples - HSD de Tukey

Variable dependiente	Distancia (I)	Distancia (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Limite inferior	Limite superior
Catalasa	45	100	-12,9763	7,2114	,175	-30,119	4,166
		125	-18,5346	11,260	,231	-45,301	8,232
	100	45	12,9763	7,2114	,175	-4,166	30,119
		125	-5,5583	10,394	,854	-30,265	19,147
	125	45	18,5346	11,260	,231	-8,232	45,301
		100	5,5583	10,394	,854	-19,149	30,265
Glutation reducido	45	100	-,9811(*)	,32135	,008	-1,743	-,2185
		125	-1,2815(*)	,51642	,038	-2,507	-,0559
	100	45	,9811(*)	,32135	,008	,2185	1,744
		125	-,3004	,47022	,799	-1,416	,8155
	125	45	1,2815(*)	,51642	,038	,0559	2,507
		100	,3004	,47022	,799	-,8155	1,416

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

En el caso de la Catalasa observamos que ninguna diferencia de medias es significativa.

Con respecto a los valores de Glutation reducido, los niños situados a 100 Km de distancia tienen una media de GSH más alta que los que están a 45 Km de distancia ($p < 0,01$).

Los niños situados a 125 Km de distancia tienen una media de GSH más alta que los que están a 45 Km de distancia ($p < 0,05$).

La comparación de los grupos situados a 100 y 125 Km de la Central de Chernobyl muestra que los más alejados tienen un valor medio más alto, no obstante, el análisis estadístico no nos permite rechazar la hipótesis de igualdad de medias.

Concluimos por tanto que el valor de GSH aumenta con la distancia al origen de la radiación.

- **SOD, MDA, 8-oxo-dG**

Realizamos la misma comparación de medias para los valores de SOD, MDA, 8-oxo-dG con relación a la distancia al foco de la radiación.

Agrupando a los niños con relación a su residencia, se pretende ahora contrastar si la media de los valores de MDA es diferente en cada grupo (se consideran tres grupos de niños que residen a 45, 100 y 125 Km de la Central Nuclear). Utilizamos la prueba H de Kruskal-Wallis. Pese a que el coeficiente de correlación en el caso de SOD y 8-oxo-dG no era significativo, y en principio no cabe esperar diferencias en las medias en estas sustancias, obtenemos también los valores para ellas, para confirmar este resultado.

Tabla 4.50 - Valores de MDA por grupos.

	Distancia	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
MDA	45	32	28,6827	12,93360	2,28636
	100	94	30,3279	9,78997	1,00976
	125	11	33,4341	7,32474	2,20849

A primera vista parece que la media va aumentando con la distancia (dato éste que ya apuntaba el análisis previo de los coeficientes de correlación).

Tabla 4.51 - Valores de 8-oxo-dG por grupos.

	Distancia	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
8-oxo-dG	45	28	6,4089	3,54849	,67060
	100	57	5,8896	3,12177	,41349
	125	6	4,2583	1,93643	,79055

A primera vista parece que la media de 8-oxo-dG va disminuyendo con la distancia (aunque como ya hemos visto anteriormente el coeficiente de correlación de ambas variables no es significativo).

Tabla 4.52 - Valores de SOD por grupos

	Distancia	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Superóxido dismutasa	45	32	9,7547	5,09383	,90047
	100	62	9,1469	6,01948	,76448
	125	12	9,0475	4,30019	1,24136

A primera vista parece que la media de SOD va disminuyendo con la distancia (aunque tampoco en este caso el coeficiente de correlación de ambas variables es significativo)

Debemos por tanto contrastar estas apreciaciones mediante procedimientos estadísticos:

Prueba de Kruskal-Wallis comparación de medias SOD, MDA, 8-oxo-dG con relación a la distancia al foco de la radiación

Tabla 4.53 - Rangos

	Distancia	N	Rango promedio
SOD	45	32	58,81
	100	62	49,94
	125	12	57,75
	Total	106	
MDA	45	32	59,11
	100	94	70,21
	125	11	87,45
	Total	137	
8-oxo-dG	45	28	49,82
	100	57	45,61
	125	6	31,92
	Total	91	

Tabla 4.54 - Estadísticos de contraste(a,b)

	SOD	MDA	8-oxo-dG
Chi-cuadrado	2,018	4,454	2,305
gl	2	2	2
Sig. asintót.	,365	,108	,316

a Prueba de Kruskal-Wallis

b Variable de agrupación: Distancia

En los tres casos, no podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias.

4.4.4.- Análisis de diferencias de medias por sexo en función de la distancia

Vemos en primer lugar el grupo de niños procedentes de la localidad de Slavutich, que está situada a 45 Km de la Central de Chernobyl.

Tabla 4.55 - Prueba T de comparación de medias de Catalasa y GSH por sexo en niños procedentes de Slavutich (45 Km distancia)

	Sexo	N	Media	Desviación típ.	Error tip. de la media
CATALASA	Masculino	15	126,5207	45,91048	11,85404
	Femenino	17	121,2759	39,63907	9,61389
GSH	Masculino	17	3,2218	1,85444	,44977
	Femenino	15	2,6720	1,41676	,36581

Aunque a primera vista parece que el valor medio en hombres de Catalasa y GSH es más alto, esta diferencia no es estadísticamente significativa, por lo que no podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias de niños y niñas.

Tabla 4.56 - Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
CATALASA	Se han asumido varianzas iguales	,531	,472	,347	30	,731	5,2448	15,11942	-25,63318	36,12275
	No se han asumido varianzas iguales			,344	27,909	,734	5,2448	15,26254	-26,02370	36,51327
GSH	Se han asumido varianzas iguales	2,136	,154	,932	30	,359	,5498	,58967	-,65450	1,75403
	No se han asumido varianzas iguales			,948	29,444	,351	,5498	,57974	-,63517	1,73470

Prueba de Mann-Whitney de comparación de medias de SOD, MDA y 8-oxo-dG por sexo en niños procedentes de Slavutich (45 Km distancia)

Tabla 4.57 - Rangos

	Sexo	N	Rango promedio	Suma de rangos
SOD	Masculino	16	16,06	257,00
	Femenino	17	17,88	304,00
	Total	33		
MDA	Masculino	16	17,44	279,00
	Femenino	17	16,59	282,00
	Total	33		
8-oxo-dG	Masculino	14	14,64	205,00
	Femenino	14	14,36	201,00
	Total	28		

Tabla 4.58 - Estadísticos de contraste(b)

	SOD	MDA	8-oxo-dG
U de Mann-Whitney	121,000	129,000	96,000
W de Wilcoxon	257,000	282,000	201,000
Z	-,540	-,253	-,092
Sig. asintót. (bilateral)	,589	,801	,927
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,606(a)	,817(a)	,946(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: Sexo

No podemos rechazar la igualdad de medias en ambos grupos.

A continuación vemos los datos obtenidos en los niños procedentes de Irpen y Bucha (a 100 Km de distancia de la Central).

Prueba T de igualdad de medias por sexo en niños procedentes de localidades a 100 Km de la Central de Chernobyl

Tabla 4.59 - Estadísticos de grupo

	Sexo	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
CATALASA	masculino	34	136,3241	29,04369	4,98095
	femenino	32	131,4259	31,82140	5,62528
GSH	masculino	43	3,7442	1,63848	,24987
	femenino	41	3,9546	1,72864	,26997

Tabla 4.60 - Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
CATALASA	Se han asumido varianzas iguales	,193	,662	,654	64	,516	4,8982	7,49253	-10,06987	19,86623
	No se han asumido varianzas iguales			,652	62,548	,517	4,8982	7,51357	-10,11861	19,91497
GSH	Se han asumido varianzas iguales	,038	,845	-,573	82	,568	-,2104	,36738	-,94128	,52039
	No se han asumido varianzas iguales			-,572	81,161	,569	-,2104	,36785	-,94234	,52144

Tampoco en este caso podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias.

Prueba de Mann-Whitney de igualdad de medias por sexo en niños procedentes de localidades a 100 Km de la Central de Chernobyl

Tabla 4.61 - Rangos

	Sexo	N	Rango promedio	Suma de rangos
SOD	Masculino	33	32,35	1067,50
	Femenino	30	31,62	948,50
	Total	63		
MDA	Masculino	46	54,86	2523,50
	Femenino	49	41,56	2036,50
	Total	95		
8-oxo-dG	Masculino	28	28,82	807,00
	Femenino	30	30,13	904,00
	Total	58		

Tabla 4.62 - Estadísticos de contraste(a)

	SOD	MDA	8-oxo-dG
U de Mann-Whitney	483,500	811,500	401,000
W de Wilcoxon	948,500	2036,500	807,000
Z	-,158	-2,350	-,296
Sig. asintót. (bilateral)	,874	,019	,767

a Variable de agrupación: Sexo

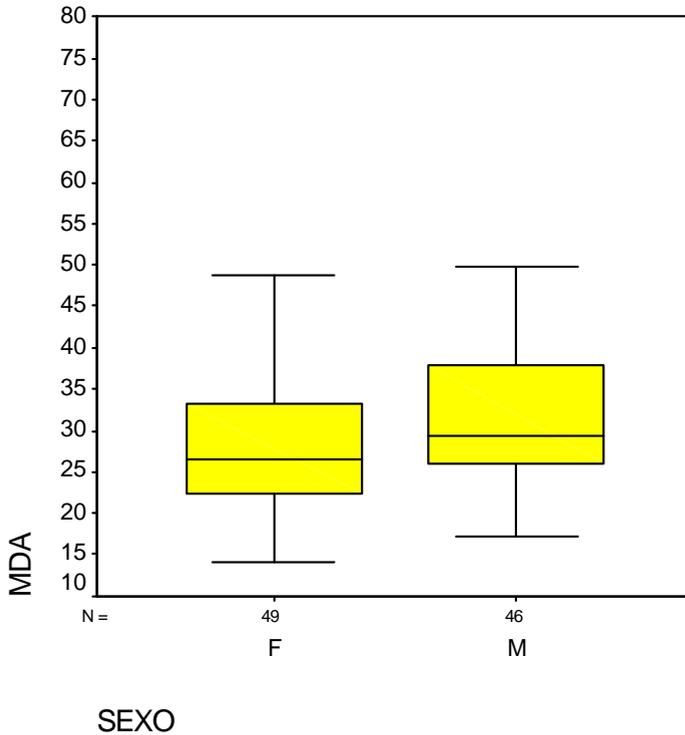
En el caso de la SOD y 8-oxo-dG no podemos rechazar la igualdad de medias.

Sin embargo para la MDA no podemos aceptar la igualdad de medias ($p=0,02$). Los niños tienen una media más alta que las niñas.

Tabla 4.63 - Descriptivos

	SEXO		Estadístico	Error tip.	
MDA	Femenino	Media	28,7606900	1,519415	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	25,7057010	
			Límite superior	31,8156790	
		Media recortada al 5%	27,9006972		
		Mediana	26,4967500		
		Varianza	113,123		
		Desv. típ.	10,6359064		
		Mínimo	14,13160		
		Máximo	69,59813		
		Rango	55,46653		
		Amplitud intercuartil	11,3052800		
		Asimetría	1,517		,340
	Curtosis	3,472		,668	
	Masculino	Media	32,9508142	1,549616	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	29,8297280	
			Límite superior	36,0719005	
		Media recortada al 5%	31,8775885		
		Mediana	29,3230700		
		Varianza	110,460		
		Desv. típ.	10,5100052		
		Mínimo	17,31121		
		Máximo	74,19090		
Rango		56,87969			
Amplitud intercuartil	11,8352150				
Asimetría	1,837		,350		
Curtosis	4,601		,688		

Gráfico 4.64 - Diagrama de caja de medias de valores de MDA por sexo en niños procedentes de poblaciones situadas a 100 Km de la Central de Chernobyl.



Por último, hemos realizado el mismo análisis en los niños procedentes de Maliatko (a 125 Km de la Central). La muestra de estos niños es más pequeña, por lo que utilizamos contrastes no paramétricos en todos los casos.

Prueba de Mann-Whitney**Tabla 4.65 - Rangos**

	Sexo	N	Rango promedio	Suma de rangos
Catalasa	Masculino	5	5,40	27,00
	Femenino	7	7,29	51,00
	Total	12		
Superóxido dismutasa	Masculino	5	8,00	40,00
	Femenino	7	5,43	38,00
	Total	12		
Glutation reducido	Masculino	5	6,30	31,50
	Femenino	7	6,64	46,50
	Total	12		
Malondialdehído	Masculino	5	5,10	25,50
	Femenino	6	6,75	40,50
	Total	11		
8-oxo-dG	Masculino	2	4,50	9,00
	Femenino	4	3,00	12,00
	Total	6		

Tabla 4.66 - Estadísticos de contraste(b)

	Catalasa	SOD	GSH	MDA	8-oxo-dG
U de Mann-Whitney	12,000	10,000	16,500	10,500	2,000
W de Wilcoxon	27,000	38,000	31,500	25,500	12,000
Z	-,893	-,1218	-,163	-,823	-,926
Sig. asintót. (bilateral)	,372	,223	,871	,410	,355
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,432(a)	,268(a)	,876(a)	,429(a)	,533(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: Sexo

Tampoco hemos hallado diferencias significativas en las medias.

En conclusión, agrupando los niños por lugar de procedencia y buscando diferencias significativas en las medias de valores por sexo en los diferentes grupos, sólo hemos hallado diferencias significativas en el caso de MDA para el grupo de niños procedentes de localidades situadas a 100 Km (la media es mayor en el caso del sexo masculino).

En el resto de casos las diferencias de medias no estadísticamente significativas.

4.5.- Relación con la edad de los niños en el momento del accidente

Buscamos a continuación si existe alguna correlación entre los valores de estos cinco parámetros con la edad de los niños en el momento del accidente.

En el caso de la Catalasa y GSH utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson:

Tabla 4.67 - Correlaciones Catalasa - GSH con edad en el momento del accidente

		Edad en momento accidente	Catalasa	GSH
Edad en el momento del accidente	Correlación de Pearson	1	-,044	,100
	Sig. (bilateral)	.	,740	,408
	N	217	60	71
Catalasa	Correlación de Pearson	-,044	1	,167
	Sig. (bilateral)	,740	.	,112
	N	60	109	92
GSH	Correlación de Pearson	,100	,167	1
	Sig. (bilateral)	,408	,112	.
	N	71	92	123

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

La conclusión es que no se ha hallado ninguna correlación significativa entre los valores de Catalasa y GSH y las edades de los niños en el momento del accidente.

Para el realizar el mismo estudio en el caso de la SOD, MDA y 8-oxo-dG utilizaremos correlaciones no paramétricas, concretamente usaremos la Tau-b de Kendall.

Según se puede observar en la tabla 4.51, el valor de SOD se correlaciona con la edad de los niños en el momento del accidente negativamente de forma significativa ($p=0'03$). Es decir, los niveles de

SOD son mayores cuando la edad del niño en el momento del accidente era menor.

El resto de correlaciones no son significativas.

Tabla 4.68 - Correlaciones no paramétricas SOD, MDA, 8-oxo-dG - Tau-b de Kendall

			Edad en el mom. accid.	SOD	MDA	8-oxo-dG
Tau-b de Kendall	Edad en el mom.del accidente	Coefficiente de correlación	1,000	-,212(*)	,113	,017
		Sig. (bilateral)	.	,032	,164	,867
		N	217	57	83	56
	SOD	Coefficiente de correlación	-,212(*)	1,000	-,002	-,125
		Sig. (bilateral)	,032	.	,982	,146
		N	57	106	96	64
	MDA	Coefficiente de correlación	,113	-,002	1,000	,118
		Sig. (bilateral)	,164	,982	.	,125
		N	83	96	137	79
	8-oxo-dG	Coefficiente de correlación	,017	-,125	,118	1,000
		Sig. (bilateral)	,867	,146	,125	.
		N	56	64	79	91

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

A continuación buscamos un modelo de regresión lineal de la relación de SOD con la edad de los niños en el momento de accidente. Los datos del modelo obtenido son los siguientes:

Regresión SOD con edad de los niños en el momento del accidente

Tabla 4.69 - Variables introducidas/eliminadas (b)

Modelo	Variables introducidas	Variables eliminadas	Método
1	Edad en el momento del accidente(a)	.	Introducir

a Todas las variables solicitadas introducidas

b Variable dependiente: Superóxido dismutasa

Tabla 4.70 - Resumen del modelo(b)

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error tip. de la estimación
1	,163(a)	,026	,009	5,57763

a Variables predictoras: (Constante), Edad en el momento del accidente

b Variable dependiente: Superóxido dismutasa

Tabla 4.71 - ANOVA(b)

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	46,537	1	46,537	1,496	,227(a)
	Residual	1711,046	55	31,110		
	Total	1757,582	56			

a Variables predictoras: (Constante), Edad en el momento del accidente

b Variable dependiente: Superóxido dismutasa

Tabla 4.72 - Coeficientes(a)

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Error tip.	Beta		
1	(Constante)	10,497	1,191		8,816	,000
	Edad en el momento del accidente	-,644	,527	-,163	-1,223	,227

a Variable dependiente: Superóxido dismutasa

El modelo no es significativo, no podemos rechazar la hipótesis de que la pendiente de la recta de regresión sea distinta de cero.

Por tanto no podemos obtener un modelo de regresión lineal significativo que explique el valor de SOD en función de la edad del niño en el momento del accidente.

4.6.- Análisis en función de si el niño había nacido o no en el momento del accidente

Buscamos ahora si existen diferencias significativas en las medias de los valores de estos parámetros entre los niños que ya habían nacido cuando ocurrió el accidente de Chernobyl y los que aún no habían nacido.

En el caso de la catalasa y glutation reducido utilizamos la prueba de la T de Student.

Prueba T igualdad de medias valores Catalasa y GSH entre niños nacidos y no nacidos en el momento del accidente

Tabla 4.73 - Estadísticos de grupo

	Niño nacido antes/después accidente	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Catalasa	No había nacido	26	133,2646	33,37589	6,54555
	Sí había nacido	75	130,8328	33,76835	3,89923
Glutation reducido	No había nacido	30	4,0137	1,53019	,27937
	Sí había nacido	81	3,6278	1,61216	,17913

No podemos rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias. Por tanto, no es posible aceptar que los niños nacidos y los no nacidos en el momento del accidente tengan medias significativamente diferentes.

Tabla 4.74 - Prueba de muestras independientes Catalasa y GSH

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Dif. de medias	Error tip. de la difer.	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Catalasa	Se han asumido varianzas iguales	,031	,862	,317	99	,752	2,4318	7,66271	-12,77266	17,63629
	No se han asumido varianzas iguales			,319	44,019	,751	2,4318	7,61894	-12,92296	17,78659
Glutation reducido	Se han asumido varianzas iguales	,015	,904	1,135	109	,259	,3859	,33999	-,28796	1,05974
	No se han asumido varianzas iguales			1,163	54,412	,250	,3859	,33187	-,27935	1,05113

Para la GSH, 8-oxo-dG y MDA, dado que no podemos asegurar que sus valores poblacionales se distribuyan normalmente, utilizaremos contrastes no paramétricos, concretamente la prueba U de Mann-Whitney.

Prueba de Mann-Whitney de igualdad de medias de SOD, MDA y 8-oxo-dG entre niños nacidos y no nacidos en el momento del accidente

Tabla 4.75 - Rangos

	Niño nacido antes/después accidente	N	Rango promedio	Suma de rangos
SOD	No había nacido	28	42,05	1177,50
	Sí había nacido	69	51,82	3575,50
	Total	97		
MDA	No había nacido	34	59,43	2020,50
	Sí había nacido	91	64,34	5854,50
	Total	125		
8-oxo-dG	No había nacido	22	41,61	915,50
	Sí había nacido	62	42,81	2654,50
	Total	84		

Tabla 4.76 - Estadísticos de contraste(a)

	SOD	MDA	8-oxo-dG
U de Mann-Whitney	771,500	1425,500	662,500
W de Wilcoxon	1177,500	2020,500	915,500
Z	-1,548	-,674	-,198
Sig. asintót. (bilateral)	,122	,500	,843

a Variable de agrupación: Niño nacido antes/después accidente

En base a los datos obtenidos, no podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias.

4.7.- Relación con factores nutricionales

Analizamos a continuación si los factores nutricionales tienen relación con los niveles de estas sustancias. Como variables relacionadas con la nutrición hemos analizado:

- 1.- El peso
- 2.- Índice de McLaren o de Sukla
- 3.- Lugar donde se produce la alimentación del niño: orfanato o familia.

4.7.1.- Peso

Para la Catalasa y GSH utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 4.77 - Correlaciones Catalasa - GSH con peso del niño en el momento de la revisión

		Peso (kg)	Catalasa	Glutation reducido
Peso (kg)	Correlación de Pearson	1	-,043	,044
	Sig. (bilateral)	.	,661	,627
	N	310	109	123
Catalasa	Correlación de Pearson	-,043	1	,167
	Sig. (bilateral)	,661	.	,112
	N	109	109	92
Glutation reducido	Correlación de Pearson	,044	,167	1
	Sig. (bilateral)	,627	,112	.
	N	123	92	123

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

No se ha hallado ninguna correlación significativa entre los valores de Catalasa y GSH y los pesos de los niños.

En el caso de la SOD, MDA y 8-oxo-dG utilizamos correlaciones no paramétricas:

Tabla 4.78 - Correlaciones no paramétricas SOD, MDA, 8-oxo-dG - Tau-b de Kendall

			Peso (kg)	SOD	MDA	8-oxo-dG
Tau-b de Kendall	Peso (kg)	Coefficiente de correlación	1,000	-,053	-,013	,084
		Sig. (bilateral)	.	,419	,822	,237
		N	310	106	137	91
	SOD	Coefficiente de correlación	-,053	1,000	-,002	-,125
		Sig. (bilateral)	,419	.	,982	,146
		N	106	106	96	64
	MDA	Coefficiente de correlación	-,013	-,002	1,000	,118
		Sig. (bilateral)	,822	,982	.	,125
		N	137	96	137	79
	8-oxo-dG	Coefficiente de correlación	,084	-,125	,118	1,000
		Sig. (bilateral)	,237	,146	,125	.
		N	91	64	79	91

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En este caso tampoco hemos hallado ninguna correlación significativa entre los valores de SOD, MDA y 8-oxo-dG y los pesos de los niños.

4.7.2.- Índice de McLaren o Sukla

Para la valoración del estado nutricional hemos calculado para cada niño el índice de McLaren o de Sukla según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso (Kg)} / \text{Talla (m) del niño}}{\text{Peso (Kg)} / \text{Talla (m) para el percentil 50}} \times 100$$

Tabla 4.79 - Estadísticos descriptivos

	N	Mínimo	Máximo	Media
Índice de McLaren	310	62,8920	158,0799	95,91810
N válido (según lista)	310			

Teniendo en cuenta que un índice inferior a 90 se considera malnutrición, en nuestra muestra hemos hallado 111 casos de niños que se pueden considerar mal nutridos, los cuales suponen el 35'8 % del total.

Hemos procedido a buscar una correlación entre los valores de este índice y los de los cinco parámetros del estrés oxidativo.

Tabla 4.80 - Correlaciones Índice de McLaren, Catalasa y Glutation reducido

		Indice de McLaren	Catalasa	Glutation reducido
Indice de McLaren	Correlación de Pearson	1	,081	-,007
	Sig. (bilateral)	.	,404	,943
	N	310	109	123
Catalasa	Correlación de Pearson	,081	1	,167
	Sig. (bilateral)	,404	.	,112
	N	109	109	92
Glutation reducido	Correlación de Pearson	-,007	,167	1
	Sig. (bilateral)	,943	,112	.
	N	123	92	123

Tabla 4.81 - Correlaciones no paramétricas de Índice de McLaren, SOD, MDA y 8-oxo-dG

			Indice de McLaren	SOD	MDA	8-oxo-dG
Tau-b de Kendall	Indice McLaren	Coefficiente de correlación	1,000	-,024	-,029	,016
		Sig. (bilateral)	.	,710	,617	,824
		N	310	106	137	91
	SOD	Coefficiente de correlación	-,024	1,000	-,002	-,125
		Sig. (bilateral)	,710	.	,982	,146
		N	106	106	96	64
	MDA	Coefficiente de correlación	-,029	-,002	1,000	,118
		Sig. (bilateral)	,617	,982	.	,125
		N	137	96	137	79
	8-oxo-dG	Coefficiente de correlación	,016	-,125	,118	1,000
		Sig. (bilateral)	,824	,146	,125	.
		N	91	64	79	91

Concluimos que no existe ninguna correlación significativa entre los cinco parámetros del estrés oxidativo y el índice de McLaren.

4.7.3.- Lugar donde se produce la alimentación

En primer, en base al índice de McLaren o de Sukla, hemos efectuado una valoración del estado nutricional de los niños de forma separada en función de si proceden de orfanato o familia. Hemos encontrado un índice de McLaren inferior a 90 (que se considera malnutrición) en 68 niños de los 158 que proceden de orfanato (un 43%) y en 37 niños de los 93 que proceden de familia (un 39'8%). Se observa un mayor porcentaje de malnutrición en niños procedentes de orfanato en comparación de los procedentes de familias, aunque la diferencia no es muy grande.

Además, hemos efectuado el contraste estadístico de la T de Student para valorar si existe diferencia significativa en la media del índice de McLaren en ambos grupos de niños.

Según se observa en las tablas 4.82 y 4.83 la diferencia de medias no es significativa. No podemos aceptar que la media del índice de McLaren en ambos grupos sea significativamente diferente.

En el caso de la Catalasa y Glutation reducido también hemos utilizado la prueba de la T de Student para comprobar si la media de estos valores entre ambos grupos de niños es diferente o no existe diferencia significativa.

Según los datos obtenidos que se muestran en las tablas 4.84 y 4.85, no hay diferencias significativas en las medias de Catalasa y Glutation reducido en ambos grupos. No podemos rechazar la hipótesis nula de igualdad de medias y por tanto, no es posible aceptar que los niños procedentes de familia y orfanato tengan medias significativamente diferentes.

Prueba T de igualdad de medias del Índice de McLaren en niños procedentes de familia y orfanato.**Tabla 4.82 - Estadísticos de grupo**

	Origen	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
Índice de McLaren	Orfanato	158	92,5863	11,2990	,898902
	Familia	93	93,9112	13,5651	1,406639

Tabla 4.83 - Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Índice de McLaren	Se han asumido varianzas iguales	,341	,560	-,832	249	,406	-1,3249	1,5926	-4,4616	1,8118
	No se han asumido varianzas iguales			-,794	166,238	,429	-1,3249	1,6693	-4,6208	1,9709

Prueba T de igualdad de medias de Catalasa y GSH en niños procedentes de familia y orfanato.**Tabla 4.84 - Estadísticos de grupo**

	Origen	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Catalasa	Familia	37	132,3189	24,56757	4,03888
	Orfanato	72	130,1264	37,33859	4,40039
Glutation reducido	Familia	38	3,6911	1,72290	,27949
	Orfanato	85	3,8439	1,50986	,16377

Tabla 4.85 - Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilat.)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Catalasa	Se han asumido varianzas iguales	9,282	,003	,323	107	,748	2,1925	6,79413	-11,27604	15,66110
	No se han asumido varianzas iguales			,367	100,436	,714	2,1925	5,97294	-9,65699	14,04205
Glutation reducido	Se han asumido varianzas iguales	1,324	,252	-,496	121	,621	-,1528	,30795	-,76249	,45683
	No se han asumido varianzas iguales			-,472	63,472	,639	-,1528	,32394	-,80007	,49441

Para la SOD, MDA y 8-oxo-dG utilizamos un contraste no paramétricos, la U de Mann-Whitney.

Prueba de Mann-Whitney

Tabla 4.67 - Rangos

	Origen	N	Rango promedio	Suma de rangos
SOD	Orfanato	72	53,49	3851,50
	Familia	34	53,51	1819,50
	Total	106		
MDA	Orfanato	91	70,37	6404,00
	Familia	46	66,28	3049,00
	Total	137		
8-oxo-dG	Orfanato	62	45,75	2836,50
	Familia	29	46,53	1349,50
	Total	91		

Tabla 4.68 - Estadísticos de contraste(a)

	SOD	MDA	8-oxo-dG
U de Mann-Whitney	1223,500	1968,000	883,500
W de Wilcoxon	3851,500	3049,000	2836,500
Z	-,003	-,570	-,132
Sig. asintót. (bilateral)	,997	,569	,895

a Variable de agrupación: Origen

No podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias. No es posible aceptar que los niños procedentes de familia y orfanato tengan medias significativamente diferentes.

5.- Estudio del gen p53

Se ha realizado el estudio del gen supresor p53 de 151 muestras de sangre de los niños procedentes de las diferentes poblaciones de Ucrania, distantes de la Central Nuclear de Chernobyl entre 45-125 Km. El estudio se ha llevado a cabo mediante la determinación de polimorfismos conformacionales de cadena simple (SSCP) en los exones 5,6,7 y 8 que constituyen los exones donde más frecuentemente se localizan las mutaciones del gen p53.

No hemos encontrado alteraciones en el gen p53 en las muestras analizadas.

En las figuras siguientes se muestran varios ejemplos del análisis por PCR-SSCP de los diferentes exones estudiados 5, 6, 7 y 8.

Como se puede ver, en ninguna de las muestras estudiadas se aprecia cambio en la movilidad electroforética de las cadenas de ADN con respecto a los controles negativos utilizados.

Figura 4.1 - Exón 5

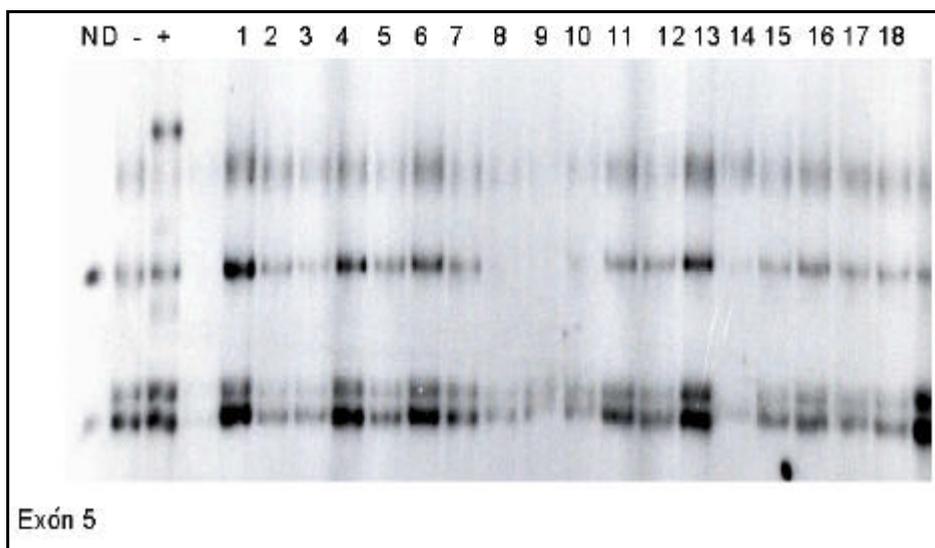


Figura 4.2 - Exón 5

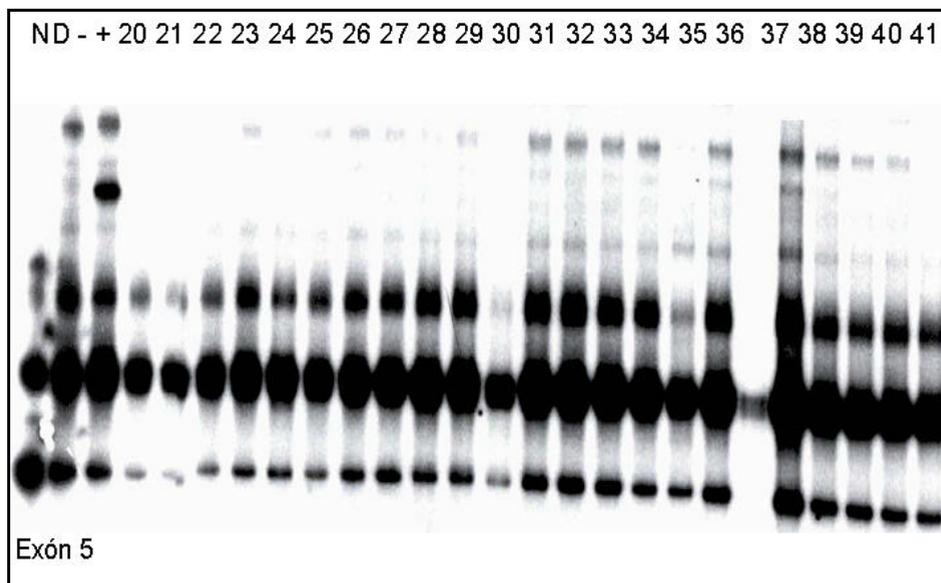


Figura 4.3 - Exón 6

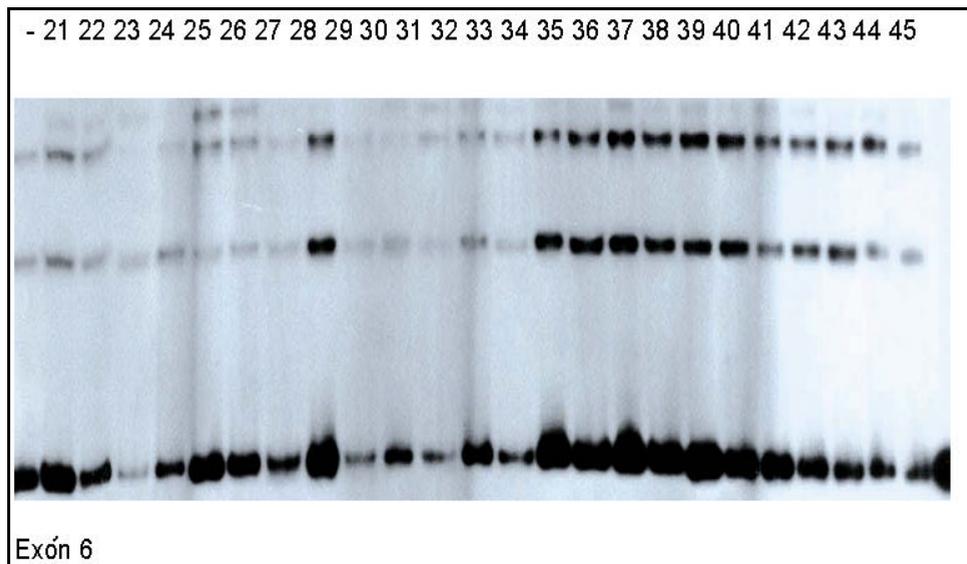


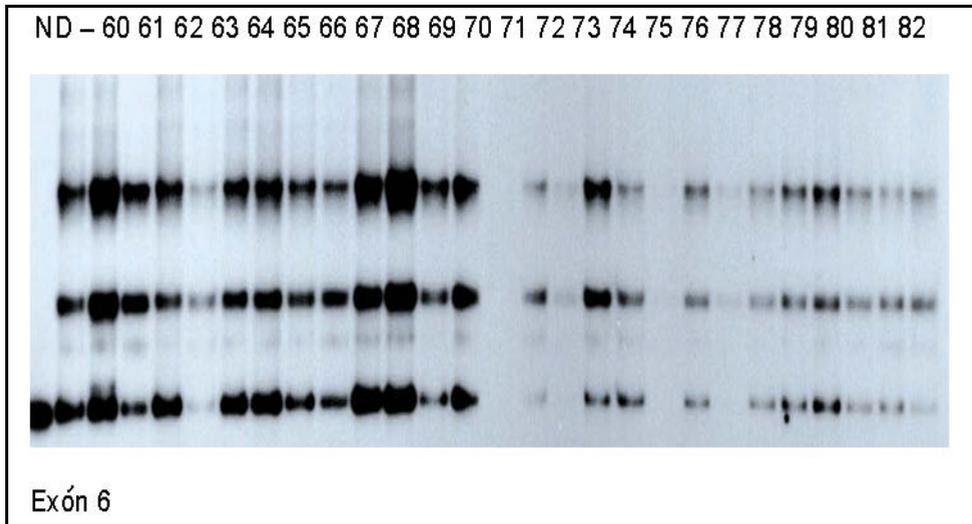
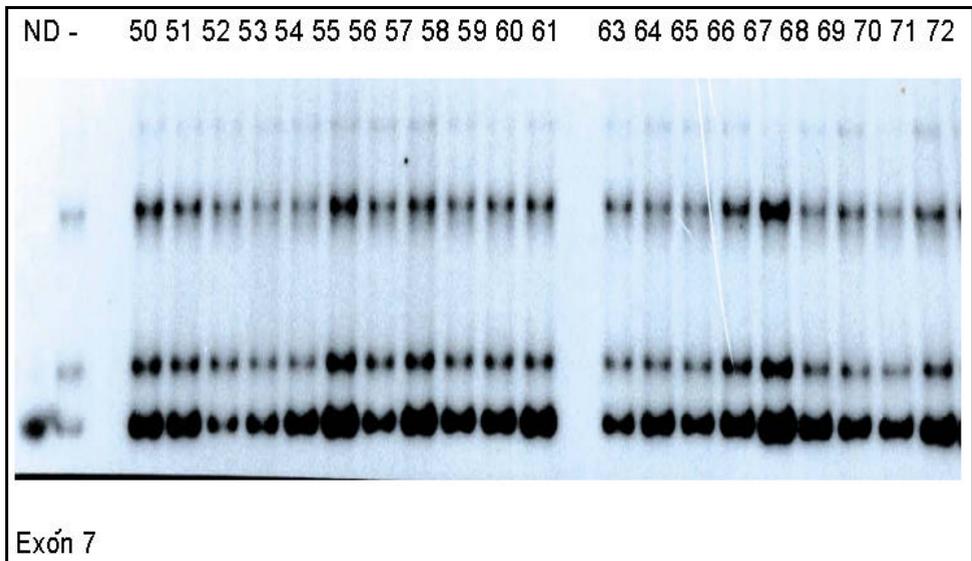
Figura 4.4 - Exón 6**Figura 4.5 - Exón 7**

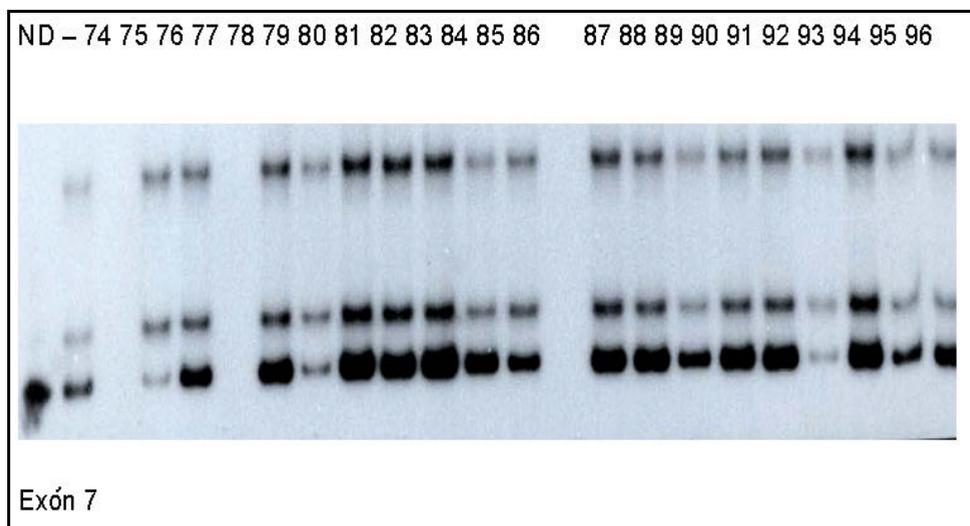
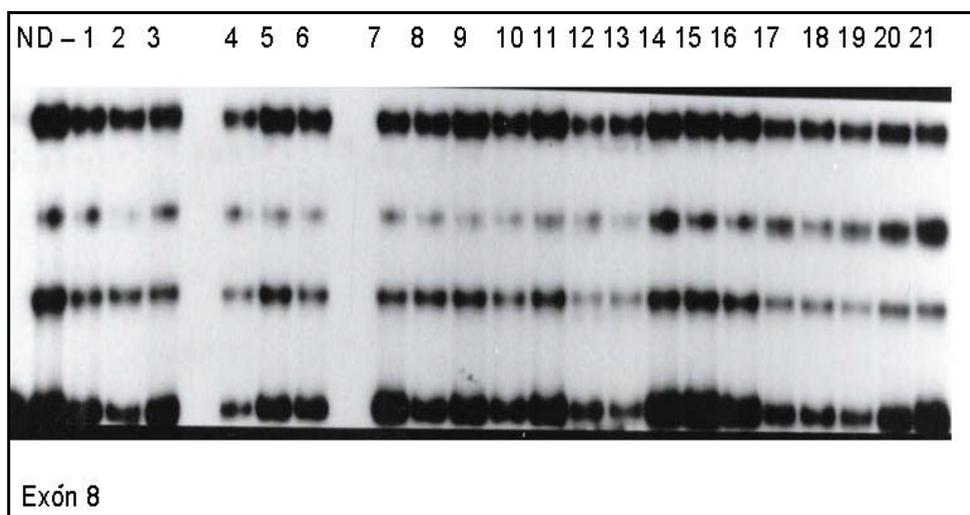
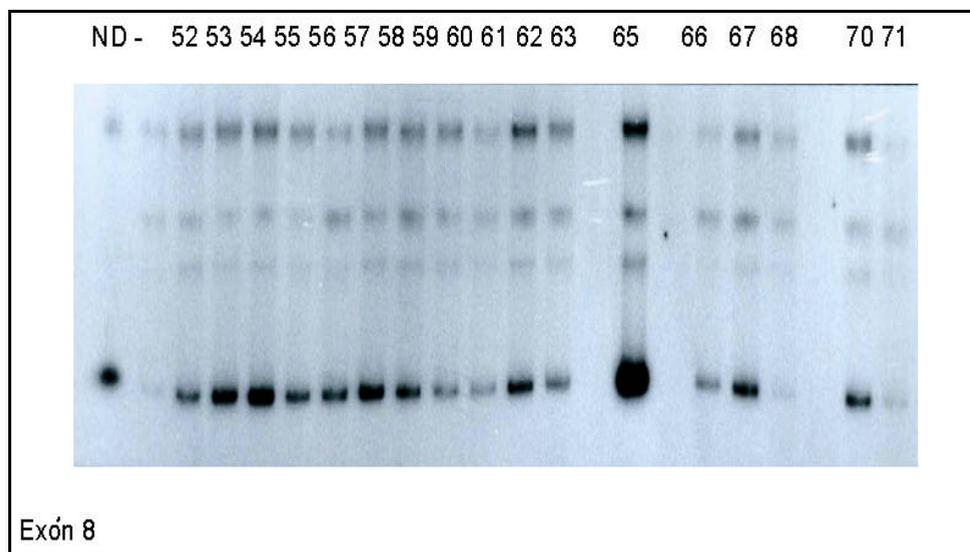
Figura 4.6 - Exón 7**Figura 4.7 - Exón 8**

Figura 4.8 - Exón 8

6.- Análisis Cromosómico

En el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de Valencia se realizó el cariotipo en un total de 122 niños. El estudio se realizó mediante tinción morfológica con Giemsa con valoración de 100 metafases y con bandas G tripsina-Giemsa en 15-20 metafases para valorar anomalías constitutivas.

En las tablas siguientes se describen el número de niños estudiados de cada grupo, por sexo, indicando el número de niños en el que se han detectado alteraciones cromosómicas y el tipo de estas alteraciones.

Las alteraciones que se describen como lesiones en distintos cromosomas incluyen roturas, gaps y fragilidades.

En 12 niños, de los 122 niños estudiados, se encontraron alteraciones, lo que representa un 9.8 %. La mitad de los niños que presentan lesiones pertenecen al grupo 1 (niños que fueron vistos en el año 1994), de los cuales desconocemos su procedencia. De la otra mitad de los niños en los cuales hemos encontrado alteraciones proceden de Bucha-Irpen excepto uno que procede de Kiev. Ninguno de los niños con alteraciones procede de Slavutich (ciudad más cercana a la central nuclear).

Tabla 4.69 - Estudio cromosómico - Año 1994

1994	Totales	Sin alteraciones	Alteraciones
Niños 46XY	7	5	2 inv.(9) (p11q13) 25% lesiones en distintos cromosomas
Niñas 46XX	16	11	5 fra. 9q12 en 7% 25 % lesiones en distintos cromosomas 18 % lesiones en distintos cromosomas 8 % roturas en distintos cromosomas 22% lesiones en distintos cromosomas

Tabla 4.70 - Estudio cromosómico - Año 1995

1995	Totales	Sin alteraciones	Alteraciones
Niños 46XY	9	7	2 6% add (9) roturas 2% 10 % roturas en distintos cromosomas
Niñas 46XX	17	16	1 20 % lesiones en distintos cromosomas

Tabla 4.71 - Estudio cromosómico - Año 1996

1996	Totales	Sin alteraciones	Alteraciones
Niños 46XY	27	27	0
Niñas 46XX	31	30	1 t (1;7) (q32;q32)

Tabla 4.72 - Estudio cromosómico - Año 1997

1997	Totales	Sin alteraciones	Alteraciones
Niños 46XY	9	7	2 6 % roturas en distintos cromosomas 4% rotura - 4% fra. en distintos cromosomas
Niñas 46XX	6	6	0

En las figuras siguientes vemos ejemplos de algunas de las alteraciones encontradas en las muestras estudiadas (cedidas por el Departamento de Patología, Universitat de Valencia):

- rotura cromosómica (Figura 4.9)
- fragilidad cromosómica (Figura 4.10)
- translocación 46 XX, t(1;7) (q32; q32) (Figura 4.11)
- fragilidad en el cromosoma 9 (Figura 4.12).

Figura 4.9: Rotura cromosómica

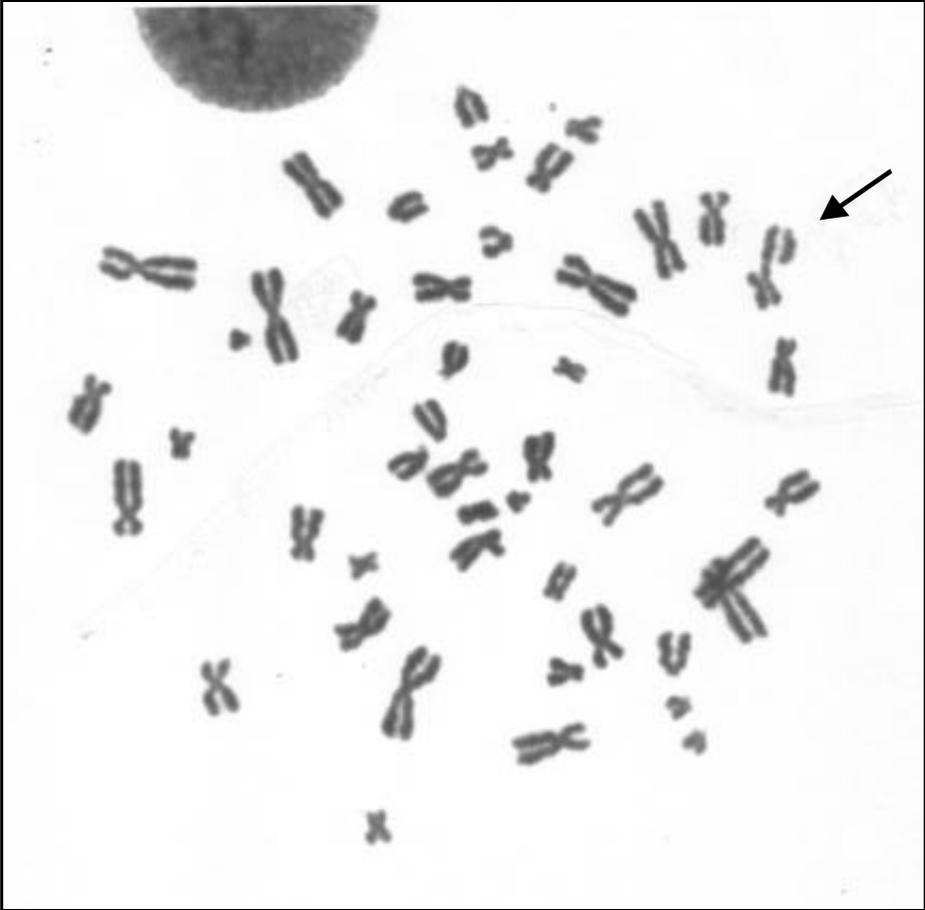


Figura 4.10: Fragilidad cromosómica



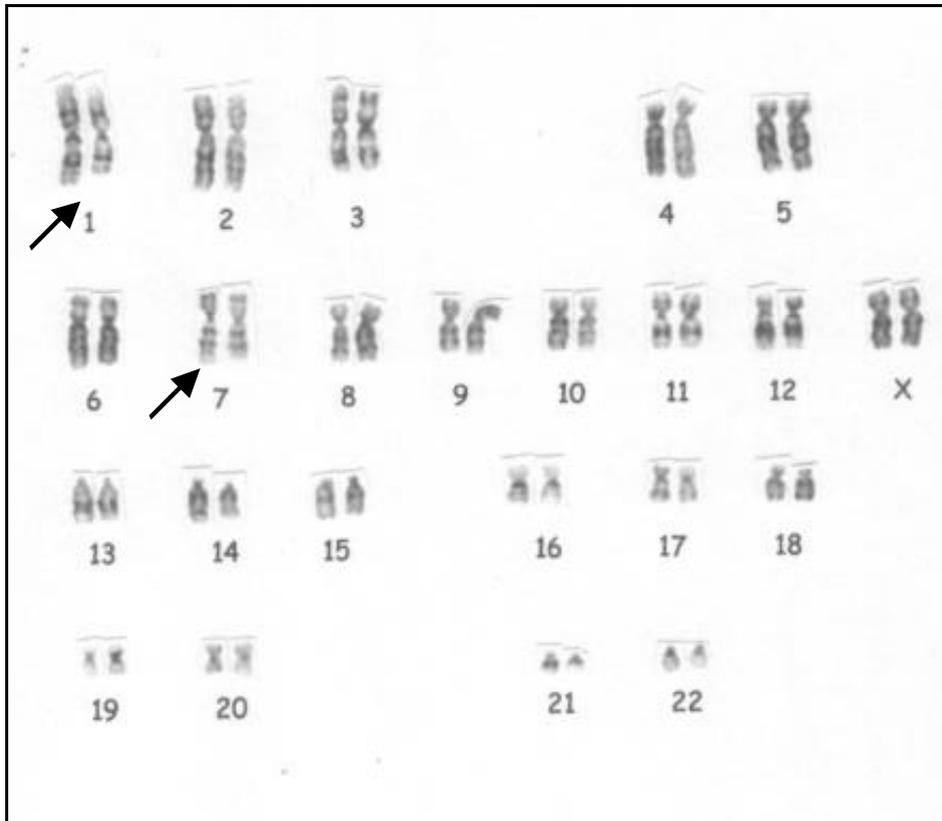
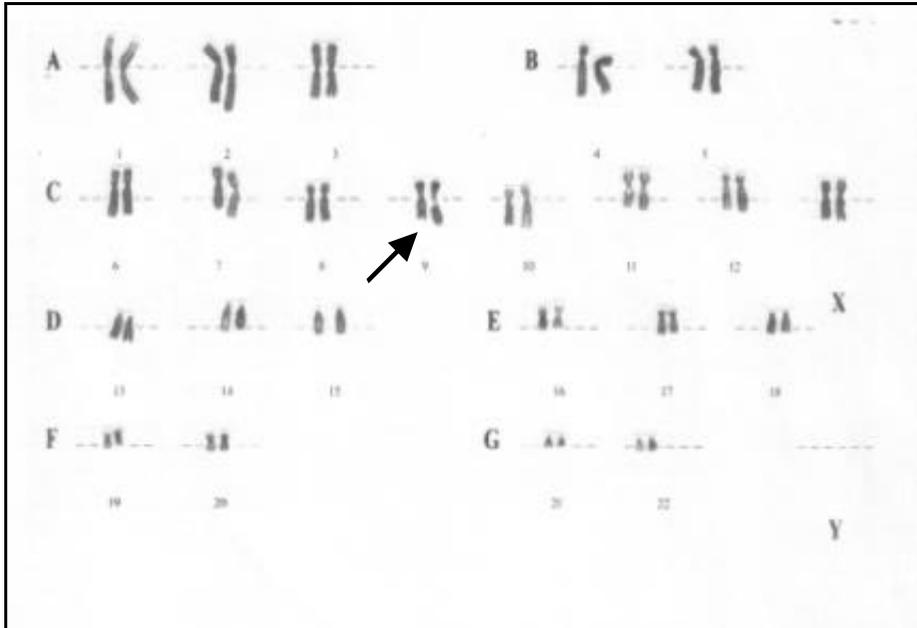
Figura 4.11: 46 XX, t(1;7) (q32; q32)

Figura 4.12: Fragilidad en el cromosoma 9



1.- Factores analizados en relación a los parámetros estudiados

Hemos realizado una valoración clínico-analítica de este grupo de niños y estudiado con más profundidad los parámetros que están más relacionados con la irradiación: el recuento de células sanguíneas, la valoración de la función tiroidea y, fundamentalmente, los marcadores del estrés oxidativo.

Previamente, antes de analizar cada uno de los resultados obtenidos, detallamos los factores con los cuales los hemos correlacionado estos parámetros.

El hecho de no disponer de un grupo de control, hace necesario que los resultados obtenidos hayan de compararse con los valores de referencia. Esto es posible en el caso de las células sanguíneas y de la función tiroidea; por el contrario, para los marcadores del estrés oxidativo no disponemos de valores de referencia; hecho que comentaremos más adelante.

Es conocido que los efectos de la radiación dependen de la dosis recibida. Después del accidente de Chernobyl se han realizado múltiples estimaciones de las dosis en diferentes áreas, algunas muy detalladas, no obstante, no es posible disponer de estimaciones exactas sobre dosis individuales recibidas (Mould, 2000). En nuestro estudio, dado que no disponemos de datos individuales sobre las dosis recibidas por cada uno de los niños, hemos de considerar parámetros indirectos, como la distancia al foco de radiación y el número de años que el niño ha estado expuesto a la misma (Sánchez *et al.*, 1988).

1.1.- Distancia al foco de radiación

La radiación ionizante, fundamentalmente la radiación gamma y los rayos X, ya que las radiaciones alfa y beta tienen un alcance más limitado en el aire, se propaga en el aire siguiendo la conocida ley de proporcionalidad del inverso al cuadrado de la distancia.

$$D_1 d_1^2 = D_2 d_2^2$$

siendo d_1 y d_2 la distancia de dos lugares diferentes y D_1 , D_2 la dosis recibida para cada una de las distancia.

La dosis recibida en la distancia D_2 , conocida la D_1 será de:

$$D_2 = D_1 \cdot d_1^2 / d_2^2$$

Así, la zona de exclusión establecida a 30 Km, supone aproximadamente una disminución de la dosis recibida en ese punto (a los 30 Km) de 9×10^8 veces respecto del lugar donde se produjo el accidente.

De manera similar podemos realizar una aproximación de la disminución de dosis para las poblaciones de nuestro estudio: Slavutich (45 Km), Bucha-Irpen (100 Km) y Kiev (125 Km). La dosis recibida supondría una disminución respecto del lugar donde se produjo el accidente de 2×10^9 para Slavutich, 10^{10} para Bucha-Irpen y $1,56 \times 10^{10}$ para Kiev.

Por ello, al alejarse de la fuente de irradiación, la intensidad de ésta disminuye en la misma proporción en que aumenta el cuadrado de la distancia. Tras esta afirmación y puesto que la irradiación sigue un modelo isotrópico, cabría pensar que la irradiación producida tras el accidente de Chernobyl ha sido mayor en las zonas más cercanas y se va haciendo menor cuanto más nos alejamos. Pero en la realidad esto no ha sido del todo cierto, ya que en el momento de la liberación de material radiactivo fueron determinantes los factores meteorológicos, fundamentalmente los vientos que trasladaron este material en la dirección de éstos y las lluvias que provocaron el depósito de sustancias radiactivas en diferentes zonas, algunas bastante alejadas. Por tanto, aunque el factor distancia es importante a la hora de realizar análisis y comparaciones, se han de tener en cuenta las limitaciones que acabamos de comentar. En cualquier caso siempre existirá cierta dependencia con la distancia, ya que a mayor distancia, menor probabilidad de alcance de la nube radiactiva así como menor concentración de la misma.

1.2.- Tiempo de irradiación

Hace referencia al tiempo en que el niño ha estado expuesto a la irradiación crónica, fundamentalmente a la exposición a los radioisótopos de vida media larga.

Un factor importante a considerar que caracteriza a un radionúclido es el periodo de semidesintegración o $T_{1/2}$ (tiempo necesario para que la actividad de una sustancia se reduzca a la mitad).

La tasa de dosis recibida disminuirá conforme transcurra el tiempo. Este es un dato muy importante a tener en cuenta en isótopos de $T_{1/2}$ corto como es el ^{131}I (con un $T_{1/2}$ de unos 8 días). En el caso de isótopos como el ^{137}Cs con un $T_{1/2}$ de unos 30 años, no existirá una variación importante en el plazo de unos pocos años.

Sabemos que la dosis recibida es proporcional al tiempo al que se ha estado expuesto.

$$D = \dot{D} t$$

siendo D la dosis recibida, \dot{D} : tasa de dosis y t : tiempo.

Por ello, consideraremos que cuantos más años se haya estado expuesto a la irradiación, más dosis se acumula y por tanto cabe pensar que los efectos son mayores.

Otros dos factores que hemos tenido en cuenta a la hora de realizar nuestro estudio han sido la edad que el niño tenía cuando se produjo el accidente y el hecho de haber nacido antes o después de producirse.

1.3.- Edad en el momento del accidente

El organismo del niño está en continuo desarrollo y la maduración de cada uno de los órganos se va realizando conforme éste va desarrollándose, por lo que las poblaciones celulares que constituyen la mayoría de sus órganos están en continua proliferación. Es importante tener esto en cuenta puesto que estos órganos son más sensibles a la irradiación en las primeras fases de su desarrollo y por tanto más susceptibles de padecer alteraciones.

En principio cabría pensar que los efectos producidos pueden ser mayores en aquellos niños que tenían menos edad cuando se produjo el accidente.

1.4.- El hecho de haber nacido antes o después de producirse el accidente

Este factor podría ser importante debido a que dentro del grupo de niños analizado, algunos no recibieron irradiación debida a la exposición por radioisótopos de vida media corta como el ^{131}I , puesto que no habían nacido en el momento en que se produjo el accidente.

De entrada, ello nos induce a pensar que los efectos derivados de los radioyodos no se producirán en aquellos que hayan nacido varios días después del accidente y por tanto en el análisis de la irradiación acumulada recibida, no se incluye esa irradiación.

Para un análisis detallado de esta circunstancia, deberíamos haber dividido a los niños en tres grupos: aquellos que habían nacido antes del accidente, los que estaban en gestación cuando se produjo éste y aquellos que nacieron después.

No obstante y dado de que no disponíamos de la fecha exacta de nacimiento de cada uno de los niños, hemos procedido a dividirlos en dos grupos. Por un lado los que no habían nacido ni estaban en gestación en el momento del accidente y por otro, los que habían nacido o estaban en gestación. Un tercer grupo de niños, de los que no podíamos estar seguros si habían nacido o no o si eran gestantes o no, no se han considerado para este análisis.

En nuestro estudio, a pesar de que la valoración clínica y analítica no ha mostrado evidencias de afectación por irradiación de una forma general, hemos querido profundizar en dos aspectos importantes relacionados con la irradiación: el recuento de las células sanguíneas y la función tiroidea.

2.- Estudio de las células sanguíneas

El recuento de las células sanguíneas, tanto de la serie mieloide como linfoide, nos permite valorar la función de la médula ósea y el sistema inmunitario.

Ambos están constituidos por tejidos de proliferación rápida, esto es, son muy radiosensibles, pero a la vez inician su reparación de forma rápida.

Del conjunto celular que denominamos médula ósea, formado por células inmaduras que proliferan y células maduras que no lo hacen, son fundamentalmente las primeras, las que sufren el efecto de la radiación. Esto da lugar a una disminución de las células proliferantes que conlleva una disminución del número de células maduras circulantes (leucopenia, trombopenia y anemia).

Dependiendo de la radiosensibilidad de cada estirpe celular, su vida media y el tiempo de regeneración de las mismas, unas células desaparecen antes del torrente circulatorio y otras después. Las primeras que desaparecen son los leucocitos, con una vida media no superior a 2 días y un tiempo de regeneración de 8 días; de estas células las más radiosensibles son los linfocitos que juegan un papel fundamental en el sistema inmunitario. Las plaquetas tienen un tiempo de regeneración de 5 días y su vida media es de 7-14 días. Por último, los glóbulos rojos o hematíes tienen un tiempo de regeneración de 7 días con una vida media de 100-120 días.

Los linfocitos, que constituyen una parte de la totalidad de los leucocitos, merecen una mención especial por sus características. Sabemos que las células más radiosensibles, tras la irradiación, mueren en mitosis y la mayoría de células que no se dividen requieren altas dosis para provocar su muerte. El linfocito rompe estas reglas: normalmente no se divide y sufre muerte intermitótica, a la vez que constituye una de las células más radiosensibles (Hall, 1978).

En nuestro estudio observamos que el recuento de células sanguíneas del total de niños estudiados, está dentro de los valores de referencia que consideramos normales (Nathan y Oski's, 1998). No existen anemias ni trombopenias. En el caso del recuento de la serie blanca, se encontró un caso de linfopenia y un caso de leucocitosis. Estos, constituyen casos aislados que no tienen significación dentro del estudio de grupo.

A pesar de la normalidad de estos valores, debido a la gran sensibilidad de los leucocitos y en concreto de los linfocitos a la radiación, hemos analizado éstos en función de los parámetros indirectos de irradiación: la distancia al lugar donde se produjo el accidente y el tiempo de exposición a la irradiación crónica (debidos a radioisótopos de vida media larga como es el ^{137}Cs). También se ha estudiado la correlación de los valores de leucocitos y linfocitos con la edad que el niño tenía en el momento en que se produjo el accidente y si estos valores están influenciados por el hecho de que el niño ya hubiera nacido o no en el momento de producirse el accidente.

No se han encontrado correlaciones significativas entre el conjunto de leucocitos y los parámetros estudiados, sin embargo en el caso de los linfocitos, la única correlación significativa es la hallada entre el número de linfocitos y la edad del niño en el momento del accidente, tratándose de una correlación negativa. Esto es, encontramos que cuanto más pequeño era el niño en el momento de la irradiación los niveles de linfocitos son mayores y al contrario, cuanto más mayor era el niño los niveles de linfocitos son menores.

Podríamos pensar en una activación mayor por parte de la médula ósea y del sistema inmune secundaria a la irradiación al ser el niño más pequeño en el momento en que se produjo el accidente. No existen estudios al respecto, por lo que no podemos afirmar este hecho. Además en el modelo de regresión lineal observamos que la influencia de la edad del niño en el momento del accidente explica en un porcentaje muy bajo el valor de los linfocitos (aproximadamente en un 2%).

El hecho de que la irradiación produce una depleción de la serie blanca en sangre está ampliamente demostrado por los tratamientos radioterápicos, por la exposición a altas dosis de irradiación y por la irradiación de las plaquetas en uso de las transfusiones (Luban *et al.*, 2000).

En el caso de dosis bajas de irradiación los estudios con animales demuestran que aunque se produce una disminución de los leucocitos y concretamente de los linfocitos, esta disminución es transitoria (Kajioka *et al.*, 1999) incluso en algunos estudios se afirma que no existe una modificación de la inmunidad celular (Courtade *et al.*, 2001).

En cuanto a las personas que recibieron irradiación por el accidente nuclear de Chernobyl, observamos que en aquellos que sufrieron los efectos agudos por altas dosis se produjo una alteración de las células

sanguíneas (fundamentalmente linfopenia y plaquetopenia). En el caso de la irradiación a bajas dosis (dosis recibida por la población general) las alteraciones que pueden producirse son menores y se pueden corregir de forma natural sin consecuencias médicas. Esto explica el hecho de que los niños de nuestro estudio tengan valores de leucocitos y linfocitos dentro de los rangos de normalidad.

3.- Análisis de la función tiroidea

La radiación del tiroides se produjo por una parte por la ingestión de radioyodos (^{131}I) y por otra, por la exposición externa de isótopos como el ^{137}Cs .

Aunque la mayoría de los estudios realizados sobre las alteraciones tiroideas en relación a la irradiación se han centrado en el cáncer de tiroides debido a la evidencia del incremento de éste unos años tras el accidente, algunos han estudiado el impacto que el accidente ha tenido sobre la función tiroidea (Eheman *et al*, 2003).

La importancia del tiroides es su gran susceptibilidad a la captación de radioyodos. El tiroides está formado por células con muy poca actividad reproductora y manifiesta tarde los efectos de la radiación. No obstante, dosis altas de radiación pueden llevar a la degeneración de las células en el parénquima y por tanto a una hipofunción de la glándula (hipotiroidismo). Este hecho queda claro considerando el tratamiento mediante yodo radiactivo realizado en casos de hipertiroidismo. El hipotiroidismo producido por la irradiación requiere de la afectación de una gran parte de la glándula.

En la valoración clínico-radiológica del tiroides de los niños de nuestro estudio, no se han encontrado anomalías morfológicas y, por tanto, no se ha evidenciado ningún caso de cáncer tiroideo.

La función tiroidea está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis. El principal agente regulador es la TSH, hormona de la adenohipófisis segregada por unas células especializadas llamadas tirotropas. La TSH ejerce una acción estimuladora sobre todas las fases de la biosíntesis de las hormonas tiroideas.

Las células tirotropas de la adenohipófisis están sometidas a dos controles principales, uno supresor y otro estimulador. El control supresor se ejerce a través de un mecanismo de retroalimentación negativo entre tiroides e hipófisis que ejercen las hormonas tiroideas, cuyo aumento frena la secreción de TSH; cuando están bajas, el efecto supresor disminuye y se estimula la síntesis y secreción de TSH. El control estimulador lo ejerce la TRH, hormona liberadora de TSH, cuya concentración máxima se encuentra en el hipotálamo.

Para la valoración de la función tiroidea se utiliza principalmente la determinación de T4L y TSH. Los niveles de T4L ofrecen una idea

bastante ajustada de la cantidad de T4 no unida a proteínas que se encuentra en el suero, y que se intercambia con los diferentes tejidos periféricos. Por otro lado, la concentración de TSH es un buen indicador del nivel de actividad biológica de la secreción de la hipófisis.

La TSH se considera uno de los indicadores de hipotiroidismo primario más sensible (Nelson, 1989). Entre las causas más frecuentes de hipotiroidismo primario se encuentran las de etiología autoinmune, detectándose en el 90% de estos casos anticuerpos circulantes dirigidos contra la membrana o cualquier otro componente de la célula tiroidea.

Hemos observado que de los 306 niños en los que se ha valorado la función tiroidea, 39 tenían un valor de TSH por encima del valor normal (0,4-5 mU/L) que representa un 12,7%, sin embargo en todos estos niños los valores de la hormona tiroidea T4L fueron normales, por lo que no se puede hablar de una hipofunción tiroidea. Podríamos estar ante casos de hipotiroidismo subclínico.

El hipotiroidismo subclínico no presenta, por definición, ningún cuadro sintomático, aunque los pacientes refieren alteraciones inespecíficas que posteriormente suelen desaparecer con el tratamiento hormonal sustitutivo. Analíticamente se diagnostica por niveles elevados de TSH con cifras normales de T4L en plasma y suele acompañarse de anticuerpos antitiroideos positivos. Dependiendo de las cifras de TSH, el hipotiroidismo subclínico puede llevar a un hipotiroidismo clínico.

En nuestro estudio no hemos valorado los anticuerpos antitiroideos, por lo que no podemos asegurar que estos niños tengan un hipotiroidismo subclínico.

Si consideramos que Ucrania es un país de bocio endémico y debido a la alimentación deficitaria por el bajo nivel socio-económico de este país, quedaría justificado este aumento de TSH como compensación a una deficiencia en la glándula tiroidea. No obstante, no hemos detectado ningún caso de bocio tiroideo.

En cuanto a los casos que presentan un nivel de TSH por debajo de los niveles normales, hemos observado que existen 4 niños. De estos, 3 presentan cifras de T4L normales. Sólo ha habido un caso en el que el nivel de T4L estaba por debajo de los límites normales (0,8-2,4 ng/dl).

En este último caso, observamos que existe un hipotiroidismo que podría ser secundario o terciario por secreción insuficiente de TSH o de TRH, respectivamente. Para hacer esta distinción hubiera sido necesario realizar la prueba de estimulación con TRH, dato del que no disponemos. En caso de hipotiroidismo secundario la concentración de TSH no aumenta con la estimulación de TRH.

El hipotiroidismo generado por la irradiación se produce por afectación de la glándula, por tanto, se trata de un hipotiroidismo primario. No obstante, existe algún autor que da explicación a la posibilidad de un hipotiroidismo secundario (Mangano, 1996), por afectación de la hipófisis, considerando que dentro del material radiactivo liberado había una gran cantidad de radioisótopos incluyendo el ^{90}Sr con un $T_{1/2}$ de 28 años. Este isótopo radiactivo se concentra en hueso y el producto de su desintegración es el ^{90}Y que infiltra órganos como la hipófisis, lo cual produciría una disminución de TSH.

No hemos encontrado relación entre los parámetros indirectos de la irradiación (distancia y años de exposición) con los valores de TSH. Sin embargo, si que observamos una correlación negativa entre los años de exposición y los valores de T4 libre. Este resultado es coincidente con el hecho de que la radiación produce hipofunción tiroidea, pero al no haberse hallado una relación con los valores de TSH, no podemos afirmar que exista una menor función tiroidea (dentro de los límites normales) en aquellos niños que llevan expuestos más años a la irradiación.

Observamos, además, que en el intento de establecer un modelo de regresión lineal, las variaciones de los valores de T4 libre quedan explicadas en un porcentaje muy pequeño por los años de exposición (4,9%).

Al analizar los valores tiroideos respecto al hecho de que hubieran nacido o no en el momento del accidente, encontramos diferencias significativas en el valor de TSH: los niños nacidos antes del accidente tienen un valor de TSH más alto que los que no habían nacido.

El hecho de haber nacido antes del accidente significa que ese grupo de niños ha recibido el impacto de los radioyodos y además llevan más años expuestos a la radiación crónica. Es lógico pensar que ese aumento de TSH sea debido a una compensación por una hipofunción a nivel de la glándula tiroidea.

Existen varios trabajos que han estudiado la relación entre la radiación medio-ambiental y la enfermedad tiroidea benigna (fundamentalmente la presencia de anticuerpos antitiroideos y la función tiroidea). En los referentes al accidente nuclear de Chernobyl, observamos resultados diferentes.

En algunos existe una correlación positiva significativa con la dosis recibida y los niveles de TSH, así como con los anticuerpos antitiroideos (Vikovanets *et al.*, 1997). En otros no se ven diferencias entre los valores de TSH y hormonas tiroideas entre los grupos de mayor y menor exposición a la irradiación, aunque sí se encuentra un mayor aumento de anticuerpos antitiroglobulina en los niños que viven en áreas más contaminadas (Pacini *et al.*, 1998). Otros no encuentran diferencias en ciudades de alta y baja exposición (Sugenova *et al.*, 1995; Ito *et al.*, 1995; Bebeshko *et al.*, 1999; Pacini *et al.*, 1999).

Realmente no existen estudios en los que los hallazgos de hipotiroidismo o enfermedad autoinmune haya sido relacionado con dosis individuales medidas tras la exposición, por lo que estos datos han de ser valorados con precaución (Eheman *et al.*, 2003).

4.- Estudio de los parámetros de estrés oxidativo

En nuestro estudio no disponemos de un grupo control ni tampoco de valores de referencia para cada uno de los marcadores de estrés oxidativo, como ya hemos comentado anteriormente.

Existen varios trabajos que han intentado buscar valores de referencia en sangre, estudiando individuos sanos de cada uno de los parámetros del estrés oxidativo que analizamos: enzimas antioxidantes: catalasa y SOD (Goth, 1991; Guemouri *et al*, 1991; Bolzan *et al*, 1997; Bogdanska *et al*, 2003), sustrato antioxidante: GSH (Pastore *et al*, 2003) y MDA, producto derivado del estrés oxidativo (Nielsen *et al*, 1997; Kharb y Ghalaut, 2003).

En general, podemos decir que la gran dispersión de los valores de estos marcadores en individuos sanos no permite el uso de valores de referencia y consecuentemente no es factible el uso de los mismos en la práctica clínica diaria. Cada laboratorio debería establecer "sus propios valores de referencia".

Tampoco existe evidencia del tipo de distribución que presentan los valores de los parámetros oxidativos. Si bien en algún trabajo se ha postulado que los enzimas antioxidantes (catalasa y SOD) y MDA adoptan una distribución normal o gaussiana (Diaz *et al*, 1998; Bogdanska *et al*, 2003) estimamos que no hay suficientes argumentos para esta afirmación.

Por ello, hemos realizado un contraste de hipótesis de validación de que las muestras proceden de una población normal. Este dato será importante a la hora de realizar el análisis estadístico, puesto que de ello dependerá el que utilicemos pruebas paramétricas o no paramétricas en nuestro estudio.

Tras la realización de este contraste de hipótesis y en base a los datos muestrales de que disponemos, concluimos que la enzima catalasa y el GSH proceden de una población con distribución normal y la enzima SOD, el producto de peroxidación lipídica MDA y la base mutagénica 8-oxo-dG no proceden de una población con distribución normal.

4.1.- Relación con el sexo y la edad

La edad y el sexo son dos factores que también se han estudiado respecto a los parámetros de estrés oxidativo en muchos trabajos. Tras el análisis de nuestros datos observamos que no existen correlaciones significativas entre los parámetros oxidativos analizados y la edad en el momento en que se realiza el análisis. Tampoco existen diferencias significativas en cuanto al sexo se refiere.

Para un mejor análisis de la relación entre el sexo y los parámetros oxidativos hemos agrupado a los niños por lugar de procedencia, buscando diferencias significativas entre las medias de valores por sexo. Sólo se han encontrado diferencias significativas en el caso del MDA, para los niños procedentes de Bucha-Irpen (situado a 100 Km de la central), observando que la media es mayor en el caso del sexo masculino.

En los estudios realizados observamos que no todos llegan a las mismas conclusiones: en algunos, la edad no influye en los parámetros oxidativos, como la catalasa y SOD (Bogdanska *et al.*, 2003); en otros, se observa un incremento de la actividad de SOD con la edad y no con la catalasa (Bolzan *et al.*, 1997), o bien un incremento de la catalasa con la edad (Goth, 1991) o bien un incremento de lipoperoxidación lipídica (MDA) con la edad (Kharb y Ghalaut, 2003). En cuanto al sexo, algunos estudios no encuentran diferencias entre grupos de hombres y mujeres en catalasa y SOD (Guemouri *et al.*, 1991); en otros observamos diferentes resultados: los valores de SOD y CAT en mujeres son más altos respecto a los hombres (Bolzan, 1991), los valores de catalasa son más altos en hombres (Goth, 1991), los valores de MDA son mayores en hombres (Díaz *et al.*, 1998) o bien los valores de MDA son mayores en mujeres (Kharb y Ghalaut, 2003).

Estos estudios se han realizado fundamentalmente en adultos, si bien alguno incluye niños (Guemouri *et al.*, 1991). Los estudios realizados en niños sanos suelen ser muestras pequeñas y formando parte de los grupos controles en estudios realizados en algunas enfermedades concretas (Devasena *et al.*, 2001).

4.2.- Relación con la distancia al lugar del accidente y con los años de exposición crónica a la irradiación

Los efectos de la irradiación están implicados con el estrés oxidativo. El mecanismo indirecto que la radiación produce sobre el material biológico mediante la hidrólisis del agua conlleva a la producción de radicales libres que van a lesionar las estructuras celulares con sus consiguientes efectos sobre los diferentes tejidos y órganos.

En función de la cantidad de radiación recibida se va a producir un mayor o menor estrés oxidativo en el organismo. Se ha demostrado un aumento de estrés oxidativo, incluso a bajas dosis de irradiación (Chenal *et al.*, 2000).

En el análisis que hemos realizado del valor de los parámetros oxidativos en función de los factores indirectos de irradiación, no hemos obtenido ninguna relación entre cada uno de los parámetros oxidativos y los años de exposición a la misma.

En cuanto a la distancia al lugar donde se produjo el accidente nuclear, encontramos correlaciones significativas positivas con la catalasa, GSH y MDA.

Es lógico pensar que tanto la catalasa como el GSH (enzima y sustrato antioxidantes) estén aumentados conforme nos alejamos del foco de irradiación, puesto que asumimos que a mayor distancia las dosis recibidas son menores. Esto significaría un efecto menor del estrés oxidativo.

No encontramos una explicación al hecho de que exista una correlación positiva entre la distancia y el producto de lipoperoxidación lipídica (MDA) puesto que por el mismo razonamiento anterior (a más distancia, menos dosis recibida) los resultados esperados serían opuestos a los que hemos obtenido.

No podemos comparar estos resultados con otros estudios, puesto que no hemos encontrado trabajos al respecto.

Se ha realizado un modelo de regresión lineal para estas variables (con correlaciones significativas) buscando cuantificar la influencia de la distancia sobre estos parámetros. Se han obtenido bajos porcentajes de influencia: 3,8% para la catalasa y 8,2% para la GSH. En el caso del MDA este modelo no ofrece resultados significativos.

Aunque los porcentajes de influencia de la distancia no son altos tanto para la catalasa como para GSH, observamos que el porcentaje es mayor en GSH que para la catalasa.

Hemos realizado una comparación de medias de todos los parámetros del estrés oxidativo entre cada grupo de niños pertenecientes a cada una de las poblaciones estudiadas (Slavutich, Bucha-Irpen y Kiev). Sólo encontramos significación en el sustrato antioxidante GSH. La correlación nos muestra que a medida que nos alejamos del foco de irradiación los valores de GSH son más altos. En la comparación de medias por grupo observamos que existen diferencias significativas entre el grupo de niños situado a 45 Km y 100 Km ($p < 0,01$) y entre el grupo de 45 Km y 125 Km ($p < 0,05$). El que no existan diferencias significativas entre el grupo de 100 Km y de 125 Km parece lógico ya que la diferencia es sólo de 25 Km. y la diferencia de irradiación recibida esperada entre estas dos poblaciones (Bucha-Irpen y Kiev) sería mucho menor si la comparamos con la diferencia de dosis recibida entre cada una de estas poblaciones y Slavutich.

Concluimos que existe una relación significativa entre el GSH y la distancia al foco de irradiación. Cuanto más nos acercamos a la Central Nuclear y por tanto, asumimos que la radiación recibida ha sido mayor, los valores de GSH disminuyen.

La disminución de GSH en el organismo se puede producir por una parte, por una disminución de su síntesis (en la que está implicada la enzima GSH sintetasa) y por otra, por oxidación de GSH que pasa a GSSG (Glutation oxidado) por acción de la enzima Glutation peroxidasa.

Los resultados obtenidos coinciden con los estudios que relacionan la irradiación con los valores de GSH donde se observa que la radiación produce una disminución de GSH (Navarro *et al.*, 1997; Demir *et al.*, 2003) y esta disminución es debida fundamentalmente al incremento de GSSG, dando lugar a una disminución del cociente GSH/GSSG, que constituye un indicador del estrés oxidativo. Dos razones pueden explicar el incremento en sangre de GSSG, por un lado, la reacción de GSH con otros radicales libres inducidos por la radiación producen la formación de radicales tioles que reaccionan produciendo GSSG, y por otro, como consecuencia del incremento de GSSG que se produce en diferentes órganos y su transporte al torrente sanguíneo (Navarro *et al.*, 1997).

En nuestro estudio no se han valorado los niveles de GSSG, ni el enzima glutation peroxidasa, por lo que no podemos afirmar que ese incremento o disminución de los valores de GSH según nos acercamos al foco de irradiación se deba a un aumento de GSSG.

Es importante destacar el papel fundamental que los tioles no proteicos celulares y en concreto el GSH juegan en la protección de las células ante la irradiación con una implicación en la reparación de las roturas de ADN producidas por la irradiación (Révész y Malais, 1983). El interés de todos los trabajos realizados al respecto radica en la radioprotección que este sustrato antioxidante ofrece (Riklis *et al.*, 1996; Lenton *et al.*, 1999; Inal *et al.*, 2002), así como en la sensibilización de los tumores a la irradiación (Estrela *et al.*, 1995). En relación con esto se encuentran otros estudios en los que se demuestra que el GSH protege contra la ruptura del ADN inducida por un estrés oxidativo de carácter químico (Sáez *et al.*, 1993; Muñoz *et al.*, 1995).

4.3.- Relación con la edad en el momento del accidente y al hecho de haber nacido o no cuando se produjo

Al realizar la correlación con los cinco parámetros de estrés oxidativo y la edad en el momento del accidente observamos sólo correlación significativa en el caso de la enzima SOD, siendo ésta una correlación negativa; es decir, los niveles de SOD son mayores cuando la edad del niño en el momento del accidente era menor.

Cabría pensar que cuando el niño es más pequeño existe una activación poniéndose en marcha los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo y por tanto un aumento de una de las enzimas antioxidantes (SOD). No hemos encontrado estudios al respecto, por lo que no podemos contrastar este hecho.

No existe relación de los cinco parámetros del estrés oxidativo en relación al hecho de que el niño hubiera nacido antes del accidente o después. No hay, por tanto, una relación con la exposición a los isótopos de vida media corta (¹³¹I).

4.4.- Relación con los factores nutricionales

La valoración nutricional del niño tiene como objeto el control del crecimiento y estado de nutrición, así como identificar el origen del trastorno.

La valoración del estado nutricional de un niño se realiza mediante una anamnesis, exploración clínica, evaluación de datos antropométricos y exploraciones complementarias.

Entre las causas de malnutrición distinguimos causas primarias y causas secundarias (Martínez y Pedrón, 2002). Las causas primarias obedecen a la ingesta insuficiente o inadecuada de alimentos y puede ser debido a: errores en la alimentación por defecto de técnica (frecuencia desordenada, alimentos hipocalóricos, etc), alteración en el desarrollo de la conducta alimentaria del niño y la marginación social y pobreza. Las causas secundarias se deben a cualquier enfermedad que incida sobre el organismo que desencadene un trastorno nutricional; son las enfermedades que producen una imposibilidad de ingestión, las que cursan con maldigestión-malabsorción y enfermedades crónicas que conllevan a un aumento del gasto energético.

Existen evidencias claras de la relación entre la nutrición y el estado del estrés oxidativo en el organismo, ya que se han descrito numerosos nutrientes con propiedades antioxidantes, fundamentalmente derivados de frutas y verduras, como la vitaminas A, C y E, carotenos, licopenos, polifenoles, selenio, etc. (Evans y Halliwell, 2001; Mayne, 2003; Cabo, 2003).

Hemos estudiado la relación de los parámetros del estrés oxidativo con algunos indicadores que valoran el estado nutricional.

El peso, por sí solo, no es un buen indicador de nutrición (aunque imprescindible en la recogida de datos para realizar una valoración nutricional) no obstante, hemos querido ver si existe una correlación entre éste y los parámetros de estrés oxidativo, no encontrando ninguna correlación significativa.

Existen varios índices para valorar la nutrición. Nosotros hemos elegido el índice de Mc Laren o de Sukla ya que hace una valoración conjunta de la talla y el peso.

Tenemos dos limitaciones al uso de este índice. Por una parte, el cálculo de este índice se ha realizado en base a las tablas de la talla del percentil 50 que disponemos en nuestro país y por otro, al no disponer de las fechas exactas de nacimiento, en las tallas del percentil 50 se han tomado los valores sin tener en cuenta los meses. Si bien la valoración no es exacta, podemos considerar que se trata de una buena aproximación.

De los 310 niños incluidos en nuestro estudio, hemos observado que 111 niños presentan algún grado de malnutrición, que representa un 35,8% del total.

Tras la valoración clínica de los niños que hemos estudiado, no se han encontrado enfermedades que puedan conducir a una malnutrición. Este porcentaje de niños malnutridos se puede explicar por la procedencia de los mismos. Ucrania es un país con un bajo nivel socio-económico, lo que constituye una causa de malnutrición primaria.

No hemos encontrado una correlación entre el índice de Mc Laren y los parámetros de estrés oxidativo. Tampoco hemos encontrado estudios con los que podamos comparar estos resultados.

También hemos valorado si existe alguna relación entre los parámetros del estrés oxidativo y el hecho de que la alimentación se produjera en orfanatos o en familias, pensando en la posibilidad de que la alimentación pudiera ser diferente.

En primer lugar hemos analizado el porcentaje de niños que presentan algún grado de malnutrición en base al índice de Mc Laren en cada uno de los grupos (procedentes de orfanatos o de familias). Hemos encontrado un índice de Mc Laren < 90% en 68 niños de 158 que proceden de orfanatos (43%) y en 37 niños de 93 que proceden de familias (39,8%). Aunque observamos que el porcentaje de malnutrición en orfanatos es ligeramente mayor que en el caso de las familias, el análisis estadístico no muestra una diferencia estadísticamente significativa en ambos grupos de niños.

En el estudio de los parámetros oxidativos tampoco existen diferencias significativas en las medias de los valores de estos marcadores del estrés oxidativo en relación a haberse producido la alimentación en orfanatos o familias. El bajo nivel socio-económico de este país nos induce a considerar que el tipo de alimentación no varía sustancialmente entre una institución o una familia.

5.- Estudio del gen p53

La estructura y función del gen supresor tumoral p53 han sido extensamente estudiados. Es el gen que con más frecuencia se ha hallado mutado en los cánceres humanos. La mayoría de mutaciones que se han detectado son las de sentido erróneo ("missense") localizados fundamentalmente en los exones 5-8 (Levine *et al.*, 1991).

El efecto mutagénico de la radiación es bien conocido en la actualidad (Breimer, 1988). Este efecto mutagénico ha sido estudiado tanto para los rayos X y radiación gamma que constituyen radiación de baja LET (transferencia lineal de energía), como para las partículas alfa y neutrones (radiación de alta LET) (García-España *et al.*, 1996).

En 1994, tras la descripción de mutaciones en el gen p53 en cánceres de pulmón en trabajadores de las minas de uranio (Taylor *et al.*, 1994) se postuló que las alteraciones de este gen podrían constituir un marcador de cáncer radioinducido.

Los estudios sobre las alteraciones del gen p53 de tumores en personas afectas por el accidente nuclear de Chernobyl se han basado principalmente en el cáncer de tiroides (Hillebrandt *et al.*, 1996; Nikirov *et al.*, 1996; Waldmann *et al.*, 1998) que constituye el único cáncer en el que se ha demostrado que ha habido una mayor incidencia tras el accidente.

Si bien algunos estudios realizados al respecto han concluido que las mutaciones del gen p53 en cáncer de tiroides podrían ser relevantes en el desarrollo de estos tumores inducidos por la radiación (Hillebrandt *et al.*, 1996), en otros estudios el gen p53 no parece ser importante en el desarrollo de estos tumores, aunque podrían jugar un papel en la progresión a un fenotipo más agresivo (Nikirov *et al.*, 1996). Existen trabajos en los que no se ha encontrado relación de las alteraciones del gen p53 en los cánceres de tiroides radioinducidos (Waldmann *et al.*, 1998).

Algunos autores han descrito los reordenamientos del gen *ret* como la alteración más importante en estos tumores de tiroides radioinducidos (Klugbauer *et al.*, 1995; Waldmann *et al.*, 1998; Klugbauer *et al.*, 1998).

También se ha llevado a cabo el estudio del gen p53 en otros tejidos, aparte del tiroideo, como el urotelio vesical, con el objeto de estudiar

mecanismos que puedan conducir al desarrollo del cáncer de vejiga (Yamamoto *et al.*, 1999; Morimura *et al.*, 2004). Estas alteraciones del p53 en el urotelio vesical se han relacionado con mecanismos de estrés oxidativo (Romanenko *et al.*, 2000).

En nuestro estudio hemos analizado muestras sanguíneas de los niños procedentes de Ucrania, no habiéndose observado alteraciones en el gen p53 en ninguna de ellas.

En 1997 Hillebrandt estudió muestras sanguíneas en un grupo de 40 niños afectos de cáncer de tiroides tomando como grupo control 30 niños sanos, no encontrando diferencias significativas en la frecuencia de polimorfismos en el p53 en ambos grupos (Hillebrandt *et al.*, 1997).

Cabría la posibilidad que aunque no estuviera alterado el gen p53, hubiera una amplificación del gen MDM2 que justificara la inactivación de la proteína P53. En nuestro trabajo no hemos analizado el gen MDM2. No obstante, en estudios de tumores inducidos por la radiación en animales no se ha encontrado un aumento de mutaciones del p53 ni una amplificación del gen MDM2, indicando la existencia de vías alternativas que permitieran a las células tumorales evitar el control producido por los genes p53-MDM2 (Sáez *et al.*, 1994).

6.- Análisis cromosómico

La irradiación produce lesiones sobre el ADN que pueden ser reparadas o llevar a la formación de alteraciones o aberraciones cromosómicas. Estas alteraciones se pueden clasificar por el número de roturas y las interacciones entre ellas, como ya hemos visto en el apartado correspondiente, dando lugar a deleciones, inversiones, translocaciones, etc.

En general, las anomalías cromosómicas se pueden dividir en dos categorías: *constitutivas*, aquellas con las que se nace y *adquiridas*, las que surgen tras el nacimiento por diferentes causas, como la irradiación.

Otras forma de clasificar estas alteraciones es en función de su estabilidad: *estables*, aquellas que pueden persistir durante múltiples divisiones celulares, como las translocaciones e *inestables*, las que se pueden perder a lo largo de sucesivas divisiones, como las deleciones (Makino, 1975)

En nuestro estudio hemos encontrado alteraciones cromosómicas en 12 niños de los 122 estudiados. Dentro de éstas, hay 2 alteraciones cromosómicas constitutivas, una inversión pericéntrica inv (9) (p11q13) y una translocación t (1;7) (q32;q32).

No podemos considerar que estas alteraciones se deban a la exposición a la irradiación de los niños ya que se tratan de alteraciones estables que pueden haberse heredado o bien haberse producido durante la meiosis en la ovogénesis o espermatogénesis de sus progenitores.

Las inversiones, aunque pueden ser producidas por la irradiación, se encuentran entre las anomalías más frecuentes en la población general; de estas, la inversión más común es la inversión pericéntrica del cromosoma 9 que se encuentra en más del 1% de la población general. Estas inversiones no están relacionadas con un incremento de riesgo de defectos en el nacimiento y/o dificultades en el desarrollo.

En el caso de la translocación hallada podríamos plantearnos el hecho de que se hubiera provocado por la irradiación en las células germinales de los padres, ya que se trata de un niño nacido tras el accidente nuclear. En cualquier caso, no disponemos de los datos suficientes para poder realizar esta afirmación.

Las roturas, gaps y fragilidades encontradas en diferentes cromosomas son alteraciones adquiridas, que se pueden haber producido por el efecto de la radiación.

Los estudios realizados sobre las personas expuestas a la irradiación producida por el accidente se han basado fundamentalmente en el análisis de acéntricos, dicéntricos y cromosomas en anillos (Braselman *et al.*, 1992; Sevan´Kaev *et al.*, 1995), que constituyen alteraciones cromosómicas inestables bastante específicas de la irradiación.

De hecho, en los últimos años se han publicado varios estudios encaminados a la determinación de la dosis de exposición basándose en la detección de estas alteraciones cromosómicas, ya que existe una relación directa entre la dosis absorbida y la cantidad de alteraciones cromosómicas producidas (Barguineiro *et al.*, 1995; Cigarran *et al.*, 1998).

Nosotros no hemos encontrado ninguna de estas alteraciones. Por una parte, el estudio no fue diseñado para ello y por otra, en este tipo de estudios de dosimetría biológica se realiza la valoración de al menos 500 metafases.

En un trabajo realizado en Bielorrusia y Rusia, sobre 1855 personas en que se incluían niños y adultos, se observa un aumento en las aberraciones cromosómicas en los sujetos expuestos a la radiación, divididos por grupos según poblaciones, frente a grupos controles, con una significación estadística en los niños que fueron evacuados y en niños y adultos residentes en zonas en las que la contaminación ambiental de ^{137}Cs era de 1000 KBq/m². En este mismo estudio se analizaron niños que habían recibido irradiación *in útero*, no encontrando diferencias significativas entre éstos y los que sólo estuvieron expuestos tras el nacimiento (Sevan´Kaev *et al.*, 1995).

Estudios citogenéticos en niños recién nacidos sanos, muestran una incidencia de anomalías cromosómicas del 0,5-1% de la población (López Ginés *et al.*, 1987) sin que se describan alteraciones como roturas, fragilidades o gaps.

Nuestros datos no nos permiten asegurar que algunas de las alteraciones encontradas, fundamentalmente las inestables, sean debidas a la irradiación, puesto que no disponemos de un grupo control; aunque como ya hemos dicho no es habitual encontrar este tipo de alteraciones en la población general.

Al analizar la procedencia de los niños, en base a los datos de los que disponemos, tampoco podemos afirmar que estas alteraciones se hayan producido con mayor frecuencia en poblaciones más cercanas al lugar donde se produjo el accidente.

Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados inicialmente y a través de los resultados del presente estudio pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 1.- En la población estudiada y en el periodo en que se ha realizado el estudio, no se ha descrito ningún caso de cáncer.
- 2.- No se han apreciado alteraciones hematológicas.
- 3.- No se ha evidenciado ningún caso de hipotiroidismo primario clínico.
- 4.- En el análisis de las enzimas antioxidantes se ha encontrado una correlación positiva, entre los valores de la catalasa y la distancia al lugar donde se produjo el accidente y una correlación negativa de los valores de la superóxido dismutasa con la edad de los niños en el momento del accidente.
- 5.- Los valores del glutatión reducido se correlacionan con la distancia al lugar donde se produjo el accidente de forma positiva, siendo este parámetro de estrés oxidativo el que presenta una mayor relación con la distancia. Los niños procedentes de la población más cercana a la central nuclear muestran valores de GSH menores respecto a los niños procedentes de poblaciones más alejadas.
- 6.- No se han encontrado relaciones de los valores de MDA y la base modificada 8-oxo-dG con los factores analizados.
- 7.- No se ha evidenciado una relación de los parámetros de estrés oxidativo analizados con el estado nutricional.
- 8.- No se han detectado mutaciones puntuales en el gen p53 mediante la técnica SSCP-PCR en ninguna de las muestras sanguíneas analizadas.
- 9.- En el estudio citogenético se han encontrado alteraciones cromosómicas adquiridas sin expresión a nivel clínico.
- 10.- En base a las alteraciones bioquímicas encontradas que reflejan un estrés oxidativo, no se debe descartar la aparición o desarrollo de futuros procesos patológicos.

Apéndice 1.- Unidades físicas de radiactividad. Concepto y equivalencias.

ACTIVIDAD

Es el número de transformaciones nucleares o desintegraciones por unidad de tiempo. $A = dN/dt$

- Unidad antigua: Curio (Ci)
- Unidad S.I.: Becquerel o Bequerelio (Bq)= 1dps (desintegración por segundo)
- Equivalencias:
 - $1C = 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq}$
 - $1Bq = 2,70 \times 10^{-11} \text{ Ci}$

Tabla A.1 - Múltiplos de Bq

Prefijo	Símbolo	Equivalencia
Exa	EBq	10^{18} Bq
Peta	PBq	10^{15} Bq
Tera	TBq	10^{12} Bq
Giga	GBq	10^9 Bq
Mega	MBq	10^6 Bq
Kilo	KBq	10^3 Bq

CONTAMINACIÓN

Actividad por unidad de superficie

- Unidad antigua: Ci/Km²
- Unidad S.I.: Bq / m²

DOSIS ABSORBIDA

Cociente entre el valor esperado de la energía impartida por la radiación dE y la propia masa del elemento dm . $D = dE/dm$

- Unidad antigua: Rad (rad).
 $1 \text{ Rad} = 100 \text{ ergios/gr}$
- Unidad S.I.: Gray (Gy)
 $1 \text{ Gy} = 1 \text{ julio/Kg}$
- Equivalencias:
 $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$
 $1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}$

TASA DE DOSIS ABSORBIDA

Dosis absorbida por unidad de tiempo.

- Unidad antigua: rad/s, rad/h
- Unidad S.I.: Gy/s, Gy/h

DOSIS EQUIVALENTE

Es el producto de la dosis absorbida D por el factor de calidad de la radiación considerada Q . $Deq = D \times Q$.

- Unidad antigua: radiation equivalent man (rem)
- Unidad S.I.: Sievert (Sv)
- Equivalencias:
 $1 \text{ Sv} = 100 \text{ rem}$
 $1 \text{ rem} = 10^{-2} \text{ Sv}$

La mayoría de isótopos contemplados en este estudio son emisores gamma, para los que $Q= 1$ por lo que la dosis equivalente y la dosis absorbida son equivalentes (1 Gy equivale a 1 Sv).

Apéndice 2. - Relación de átomos de isótopos radiactivos utilizados en el texto

Tabla A.2 - Átomos de isótopos radiactivos

Símbolo	Nombre del elemento	Nº atómico
Ba	Bario	56
Ce	Cerio	58
Cm	Curio	96
Cs	Cesio	55
I	Yodo	53
Mo	Molibdeno	42
Np	Neptunio	93
Pu	Plutonio	94
Ru	Rutenio	44
Sr	Estroncio	38
Te	Teluro	52
Xe	Xenón	54
Y	Itrio	39
Zr	Circonio	40

Apéndice 3. - Ficha de recogida de datos clínico-analíticos

Informe clínico sobre:

Edad:

I. VALORACIÓN NUTRICIONAL

Peso (Kg)	P		
Talla (cm)	P	Índice Mc Laren	
P. craneal (cm)	P	Circunferencia muscular brazo	P
P. braquial (cm)	P	Área muscular brazo	P
Pliegue tricipital (mm)	P		
Conclusión estado de nutrición:			

II. VALORACIÓN CLÍNICA

Aspecto general:

Piel:	Cabello:	Labios:	Lengua:
Ojos:	Dientes:	Encías:	Mucosas:
Glándulas tiroideas:		Esqueleto:	Extremidades:
Glándulas parótidas:		Neurológico:	
Otros:			

F. cardíaca (lpm)	T. arterial max. (mmHg)	P
	T. arterial min. (mmHg)	P

Conclusión valoración clínica:

BEG: Buen estado general N: Normalidad NHP: Ningún hallazgo patológico
--

III. VALORACIÓN ANALÍTICA

III.1. Valoración de anemias

Hematíes (mm ³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)
VCM (fl)	HCM (pg/ml)	CHCM (g/dl)
Sideremia (lg/dl)	IST (%)	Transferrina (mg/dl)
Ferritina (ng/ml)	Vitamina B12 (pg/ml)	Folato (ng/ml)

Comentario (III.1)

III.2 Valoración coagulación

Plaquetas (mm ³)	I. Quick (%)	TTP(r)	TT(r)
Fibrinógeno (g/l)			
Comentario (III.2)			

III.3 Valoración estado inmune

Leucocitos (mm ³)	CD4 (%)	IgA (mg/dl)
Neutrófilos (mm ³)	CD8(%)	IgG (mg/dl)
Monocitos (mm ³)		IgM (mg/dl)
Eosinófilos (mm ³)		IgE (UI/ml)
Basófilos (mm ³)		C3 (mg/dl)
Linfocitos (mm ³)		C4 (mg/dl)

Comentario (III.3)

III.4 Valoración tiroidea

T4 (ig/dl)	T4 libre (ng/dl)	T3 (ng/ml)	TSH (mU/L)
------------	------------------	------------	------------

Comentario (III.4)

III.5 Perfil bioquímico, proteínico y enzimático

Glucosa (mg/dl)	GOT (mU/ml)	P. totales (mg/dl)
Urea (mg/dl)	GPT (mU/ml)	Prealbúmina (mg/dl)
Creatinina (mg/dl)	LDH (mU/ml)	Albúmina (mg/dl)
Sodio (mEq/l)	F. Alc. (mU/ml)	Cociente Alb./globulina
Potasio (mEq/l)		
Cloro (mEq/l)		
Calcio (mg/dl)		
Fósforo (mg/dl)		

Comentario (III.5)

III.6 Otras determinaciones

Cariotipo

Comentario (III.6)

Valencia, agosto de 1996

Fdo. Dr. J. Donat
 J.U. Oncohematología Pediátrica
 Hospital Clínico Universitario
 Valencia

Apéndice 4 .- Programa Ucrania 2000

ABOGADOS SIN FRONTERAS

**PROGRAMA DE ACOGIMIENTO TEMPORAL
UCRANIA 2000**

Abogados sin Fronteras es una fundación de naturaleza benéfico-asistencial que se sitúa en el contexto de las O.N.G. y que tiene como fines el fomentar, desarrollar y difundir valores como: la libertad, la igualdad, la justicia, la solidaridad, el respeto, el pluralismo, tanto a nivel nacional como internacional.

Durante los años 1994 a 2000, Abogados sin Fronteras (A.S.F.) desarrolló el del Proyecto "UCRANIA 2000", cuyo objetivo fundamental se centró en propiciar el desplazamiento a nuestro país, en régimen de acogimiento familiar temporal y durante los meses de julio y agosto, de un número aproximado de 2000 niños y niñas de edades entre 6 y 14 años, procedentes del área de población afectada por la catástrofe nuclear de Chernobyl en Ucrania, y pertenecientes a familias con un patrón socio-familiar deficiente, así como a instituciones de acogida y tutela de niños huérfanos o abandonados.

Este desplazamiento era absolutamente gratuito para todos los niños y niñas trasladados a nuestro país, quedando exoneradas las familias de origen o las instituciones de su procedencia, de cualquier pago por la participación de sus niños en el Programa. La financiación del proyecto se realizó a través de subvenciones, actividades culturales para captar fondos y de las aportaciones de las familias colaboradoras.

La estancia de los niños y niñas se llevó a cabo en el seno de familias pues en un entorno familiar estable, los niños pueden encontrar modelos de convivencia que les permite desarrollar su autoconcepto y mejorar su autoestima. La participación en la vida de la familia y su entorno de relaciones, favorece el desarrollo de habilidades sociales y fomenta actitudes solidarias, ya que comparten y participan de todas las actividades de la familia acogedora. Estos aspectos favorecen un proceso de madurez y de equilibrio personal que les permitirá afrontar con más recursos etapas posteriores de su vida.

Los compromisos que asumían las familias al colaborar en este programa eran:

- a) Colaborar en el programa hasta su finalización (año 2000)
- b) Asumir parte del coste económico que supone el acogimiento del niño o niña. (Viaje y manutención)
- c) Acompañar al niño o niña a las revisiones previstas en el programa médico.
- d) Compromiso de seguir las indicaciones de la fundación.
- e) Firma de un convenio de acogimiento.

Además del acogimiento temporal, ASF incluyó también como objetivo esencial del Programa, el reconocimiento médico de todos los niños y niñas desplazados, y la asistencia sanitaria específica que en su caso fuera necesaria. A tal efecto, ASF contó con la colaboración de las autoridades de la Conselleria de Sanitat i Consum de la Generalitat Valenciana y de la Universitat de València, la continuidad de la colaboración tan eficazmente prestada por estas instituciones se realizó a través de los servicios correspondientes del Departamento de Oncología Infantil del Hospital Clínico Universitario de Valencia

y de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València. Los resultados obtenidos de dichos reconocimientos se ofrecieron a las Autoridades Sanitarias de Ucrania, a través de la Embajada de Ucrania en España.

Además, el programa contó también con la colaboración de la embajada de España en Ucrania y con el patrocinio de la UNESCO.

APÉNDICE 5.- Cartas a organismos oficiales



EL CONSELLER
DE SANITAT I CONSUM

Joaquín Colomer Sola

Ilmo. Sr. D. Alejandro Blanco
SUBDIRECTOR GENERAL DE ASUNTOS CONSULARES
MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

Valencia, 7 de Abril de 1995

Excmo. Sr.:

Me complace comunicarle que la Consellería de Sanidad y Consumo de la Generalidad Valenciana apoya y respalda a la Organización No Gubernamental Fundación Abogados Sin Fronteras en el desarrollo del "Programa Chernobil" de dicha Organización, dirigida a propiciar el Acogimiento Temporal Familiar por familias Valencianas y el reconocimiento médico de niños ucranianos, con un patrón socio-familiar y sanitario deficiente.

Así mismo, le comunico que la Consellería de Sanidad y Consumo participa en el citado Programa, asumiendo la atención sanitaria y el reconocimiento médico de los niños que se desplazaron a Valencia en el Programa de Navidad, a través de la Organización Abogados Sin Fronteras y lo continuará haciendo en los sucesivos Programas diseñados por esta Organización.

La Consellería de Sanidad y Consumo es conocedora de los objetivos y detalles del Programa y avala el mismo ante las Autoridades Ucranianas. Dentro de este Programa, y en el viaje humanitario que Abogados Sin Fronteras realizará próximamente a Kiev, se hará entrega al Ministerio de Sanidad de Ucrania del estudio médico-sanitario confeccionado por la Unidad de Oncohematología Pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, dirigida por el Dr. Joaquín Donat, y dependiente de la Consellería de Sanidad y Consumo. El citado informe constituye un estudio muy valioso, de cara a la atención integral de los niños del área de Chernobil (Ucrania).

Le ruego en la medida de sus posibilidades, facilite a los responsables de la Organización Abogados Sin Fronteras la tarea humanitaria que los mismos pretenden desarrollar durante su estancia en Kiev, por lo que le quedo muy agradecido.

Atentamente le saluda,



GABINETE DE MINISTROS DE UCRANIA
Kiev

5 de mayo de 1996
nº28-1132/9

Presidente de la Fundación
"Abogados sin Fronteras
D. José Ramón Juaniz Maya

Estimado Sr. Maya:

Quiero agradecerle la información entregada por
Usted durante nuestra reunión el día 5 de abril.

El programa de ayuda médica a los niños de la región
de Chernobil, su tratamiento médico es muy importante al tomar
en cuenta las consecuencias de la catástrofe en la CEN de
Chernobil. Los datos de investigaciones científicas sobre la
influencia de los factores de esta catástrofe a la salud de los
niños permitirán hacer su rehabilitación más eficaz.

La acción de su Fundación se valora muchísimo por el
Gobierno de Ucrania y de partes de las estructuras estatales se le
va a asegurar todo apoyo en la realización del programa.

Atentamente,

Vice Primer Ministro de Ucrania (hay firma) I.F. Kuras

UCRANIA
MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

15-1934|103

El Ministerio de Asuntos Exteriores de Ucrania saluda atentamente a la Embajada de España en Ucrania y tiene el honor de remitir adjunto para su entrega al destinatario la carta de parte del Vice Primer Ministro de Ucrania D. Iván Kuras para el Presidente de la Fundación "Abogados sin Fronteras" D. José Ramón Juaniz Maya con el agradecimiento por la información sobre la ayuda médica a los niños de la región de Chernobil.

El Ministerio de Asuntos Exteriores aprovecha la ocasión para testimoniar a la Embajada de España en Ucrania su más alta consideración.

Anejo: 1 página.

Kiev 13 de mayo de 1996
(Hay sello del MAE de Ucrania)

A LA EMBAJADA DE ESPAÑA EN UCRANIA. - KIEV



United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture

La Subdirectora General
para las Ciencias Sociales y Humanas

REF. :

SHS/HRS/96/111

19 de febrero de 1996

Estimado señor:

En nombre del Director General, le agradezco mucho su carta del pasado 13 de diciembre, así como la documentación sobre las actividades de la *Fundación Abogados Sin Fronteras* que ha tenido la amabilidad de transmitir a la UNESCO.

He estudiado atentamente los documentos referentes al Programa de acogida de niños de la región de Chernobyl (Ucrania) que llevan Vds. a cabo y quisiera felicitarle por tan magnífica iniciativa. La conexión de la tarea jurídico-formal, en la que radica el origen de la Fundación que Vd. preside, con un proyecto de asistencia a la infancia, es un inmejorable ejemplo del relevante papel que las Organizaciones No Gubernamentales desempeñan en la cooperación internacional.

La UNESCO se identifica por entero a esta labor, y nos complacería que el *Programa Ucrania 2000* contase con el Patrocinio de la Organización. Para ello, es necesario consultar con la Comisión Nacional Española de la UNESCO. Tengo el placer de comunicarle que he iniciado dicho trámite, de cuyo resultado le informaré tan pronto como sea posible.

Con mis mejores deseos de éxito, aprovecho la ocasión para saludarle muy atentamente.

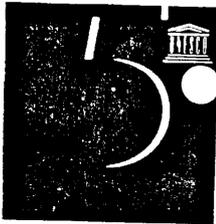
A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Francine Fournier'.

Francine Fournier

Sr. D. José Ramón JUANIZ MAYA
Presidente
Fundación Abogados Sin Fronteras
Conde Altea, 2, 1º, 3º
46005 VALENCIA
España

Adresses postales : 7, place de Fontenoy, 75352 Paris 07 SP / 1, rue Miollis, 75732 Paris Cedex 15
Télex : 204461 Paris / 270602 Paris - Téléphone central : + (33.1) 45.68.10.00 - direct : (33.1) 45.68.39.23
Téléfax central : + (33.1) 45.67.16.90 - direct : (33.1) 40.65.98.71

Organización de las Naciones Unidas
para la Educación, la Ciencia y la Cultura



cincuenta años

El Director General

Referencia: DG/3.4/209

3 ABR 1996

Estimado señor:

Como resultado de la deliberación sobre la cual le informé D^a Francine Fournier, Subdirectora General para las Ciencias Sociales y Humanas, en su carta del pasado 19 de febrero, me complace comunicarle que otorgo gustosamente el patrocinio de la UNESCO al Programa Ucrania-2000 de la *Fundación Abogados sin Fronteras*, que Ud. preside.

Quisiera también agradecerle su amable invitación a las jornadas sobre el tema "Chernobil existe: 10 años de una catástrofe" durante las cuales se presentará el Programa Ucrania 2000. Lamento profundamente que los compromisos contraídos para el mes en curso me impidan acompañarlos en esta ocasión, como hubiese sido mi deseo.

Hago votos por el éxito de esta iniciativa y aprovecho la ocasión para saludarlo con atenta consideración.

Federico Mayor

Sr. Don José Ramón JUANIZ MAYA
Presidente
Fundación Abogados Sin Fronteras
Conde Altea, 2, 1º, 3º
46005 VALENCIA
España

7, place de Fontenoy
75352 Paris 07 SP Francia
Teléfono + (33 1) 45 68 10 00
Fax + (33 1) 47 34 85 57
Dirección telegráfica: UNESCO Paris
Telex 204461 Paris/270602 Paris

APÉNDICE 6.- Recortes de prensa

Sufrirán una revisión médica en Oncología

Niños huérfanos de Chernobil pasan la Navidad con familias valencianas

Cincuenta niños huérfanos afectados por el llamado síndrome Chernobil pasarán las Navidades y Reyes con otras tantas familias valencianas, que los acogerán temporalmente entre el 22 de diciembre y el 10 de enero.

El objetivo de su presencia en Valencia tiene la doble finalidad de someterse a un reconocimiento médico y por otra "sensibilizar a la sociedad en general y a la valenciana en particular de que existe otra realidad menos confortable que la nuestra y no tan lejana", según manifestó ayer el presidente de la Fundación Abogados sin Fronteras, **José Ramón Juániz**, que en colaboración con la Asociación "Niños del Mundo" se han encargado de llevar a cabo este proyecto.

Los cincuenta niños ucranianos de entre 7 y 17 años no sufren fases agudas por la radiación nuclear y están calificados sanitariamente como "recuperables". El objetivo de su estancia en Valencia responde a la iniciativa de la Fundación Abogados sin Fronteras que ha propiciado el traslado de 350 niños afectados.

Este grupo llegará a Madrid el jueves 22 de diciembre y viajarán en varios grupos a Madrid, Valladolid, Guadalajara y Valencia. Los niños serán sometidos a un reconocimiento médico en la sección de Oncología Infantil del Hospital Clínico de Valencia "para conocer en qué estado se encuentran sus defensas y evaluar el efecto de la irradiación en su desarrollo o nutrición", tal como señaló también en

rueda de prensa el jefe del departamento, **Joaquín Donat**.

El programa incluye una selección de las familias valencianas que deseen acoger temporalmente a estos niños, para lo cual deben contactar con la Fundación en el teléfono 3743358. A pesar del ofrecimiento, un buen número de ellos ya han sido acogidos por las propias familias de Abogados sin Fronteras.

Otro de los objetivos de esta iniciativa es la de recoger fondos económicos para la compra de material escolar y ropa, aunque esto mismo se puede aportar personalmente. En caso de contribuir con dinero pueden hacerlo a través de la cuenta 3100476960, sucursal 0701 (urbana Goya) de Bancaja, a nombre de Fundación Abogados sin Fronteras-Niños Chernobil.

En el mismo programa colabora la organización **Bomberos sin Fronteras**, que cederán un local para almacenar los materiales aportados, incluso destinarán dos vehículos para recoger el material a domicilio, tal como constató el presidente de este colectivo **Ignacio Iturriaga**.

El desplazamiento de los niños a Valencia alcanza un importe de dos millones de pesetas, a razón de 40.000 pesetas por billete de ida y vuelta, que será sufragado por la Conselleria de Trabajo y Asuntos Sociales con 500.000 pesetas, Presidencia de la Generalitat aporta otro medio millón y "el resto hemos pedido a Bancaja que lo financie y confío en que así sea", matizó **José Ramón Juániz**.

Fulgencio Torremocha

LAS PROVINCIAS 3-12-1994

Niños de Chernobil

R. VENTURA MELIÀ

LA catástrofe nuclear de la central de Chernobil nos afectó a todos. Hemos aprendido una grave lección de la que hemos de sacar consecuencias prácticas. La primera de ella es no olvidar el peligro de la energía nuclear y que hay otras fuentes alternativas de energía. No estamos condenados a depender del plutonio y del uranio. Incluso cuando no llueve, como estos meses, el sol puede darnos la energía que necesitamos.

Estos días se encuentran por Valencia unos niños de Chernobil a quienes la fuga radiactiva afectó. Como en aquella película premonitoria de **Josef Losey**, ya conocen en su propia carne el precio del progreso. Ahora se merecen toda la solidaridad humana, en su país o en el nuestro, porque Ucrania o Rusia atraviesan tiempos difíciles.

Se sabía que existía el peligro, y aún hoy tratan de ocultarlo o de negarlo. Hay fuertísimos y poderosísimos intereses en juego. Ahí cerca tenemos Cofrentes y cuando tienen una avería, nos enteramos tarde y mal de lo que sucede.

La cantidad de personas con secuelas tras el resquebrajamiento del núcleo

de la central de Chernobil es para asustar. La incidencia de las enfermedades, como el cáncer, o de las malformaciones en fetos, es espantosamente alta y pone los pelos de punta.

Alguna de las fundaciones humanitarias tendría que intervenir en este tema y ayudar a los damnificados. A los enfermos que necesitan tratamiento, a quienes necesitan apoyo psicológico o económico y, sobre todo, a los niños. Estos niños encantadores que cuentan historias crueles sin darse cuenta, que hablan del suicidio de un padre, de la muerte de sus parientes, de su soledad, de que echan de menos el calor de un hogar o de una familia.

Parten el alma de los más curtidos. Hemos de evitar ser un día niños de Chernobil o que nuestros hijos o nietos sufran en carne propia esa plaga terrible. Hay que poner remedio a tiempo y renunciar a la energía nuclear, que tiene un futuro muy caro (no digamos donde habrán de echar los residuos).

El afán desmedido de producir, los objetivos políticos, las mentiras burócraticas están detrás de estos crímenes y estas víctimas inocentes. ¿Quién paga por todo eso?

LEVANTE - EMV - 19-12-1994

Los hijos de Chernóbil comen turrón

Niños afectados por la catástrofe nuclear pasan la Navidad en Valencia

ESPERANCA COSTA, Gandia. La joven Alona, de 12 años, estuvo preocupada durante el trayecto de autobús que le llevó desde el aeropuerto de Madrid hasta Valencia. "¿Es buena gente?". Ala, la intérprete rusa, respondió sin dudar. "Claro que sí. ¿Quién si no os iba a acoger, sino gente buena?". Alona, y otros 400 niños ucranianos del área de Chernóbil, pasan las navidades en España, dentro de un programa de acogida organizado por las delegaciones en España de ~~Asociación~~ sin Fronteras y Bomberos sin

Fronteras. Respondiendo a una llamada de una asociación no gubernamental de Kiev, numerosas familias, que acogen a estos niños hasta el 10 de enero, les proporcionarán calor y atención médica. Muchos de estos pequeños —un total de 60 están en la provincia de Valencia— son huérfanos o sus familias han sufrido las consecuencias del accidente nuclear que se produjo, en abril de 1986, en la central de Chernóbil. No se sabe todavía si están afectados por la radiación, por ello se someterán a pruebas en el Hospital Clínico de Valencia.

Ayer, en la casa de L'Alfàs, un antiguo molino azucarero de Potries (La Safor), Alona y otros

seis niños pálidos correteaban felices al sol. Cogían naranjas de los árboles y chapoteaban con sus manitas en las acequias. Adela, Ana y María, las vecinas que han acogido a cinco de estos chavales, cocinaron en su honor una *fidauá* y pollo al ajillo. "Y sobre todo mucho zumo de naranja", dijo Adela. El matrimonio de Valencia compuesto por José y Juana María, con dos hijos, se ha convertido en la nueva familia de Nicola, un chico de 14 años. "Es como un hijo más, y desde luego intentaremos mantener el con-

tacto cuando regrese a su país", afirmaron. Los hijos del plutonio vivieron ayer en Potries una auténtica jornada familiar. La pequeña Olga, de seis años, sonrió por primera vez. "Esta niña ha debido sufrir un trauma terrible, porque hasta hoy no ha querido ni jugar con sus compañeras", comentó Ana, su nueve *madre*. "Todas las prendas que trajó estaban marcajadas con el purpura del orfanato, y yo le compré ropa nueva", agregó.

Todos coinciden en que no hay que ofrecerles nada extraordinario, como excursiones o salidas en grupo. "No han venido a hacer turismo", explican Elena y Ximo, que han acogido a Nadia, otra de las niñas. "Lo que necesi-



CARLES FRANCESC

Un grupo de niños que están acogidos en Potries.

tan es integrarse en un ambiente familiar, para que sepan que aquí hay alguien que les quiere y les ayuda". El desconocimiento del idioma se suple con el tacto y el calor. Así, los más pequeños no dejan de abrazar a los niños de las familias con las que conviven. Alona, la mayor de las niñas acogidas en Potries, se ha convertido en la portavoz del grupo porque sabe algo de inglés. La

niña, que a sus 12 años toca el piano y el violoncelo, ha pedido que le comprén unas castañuelas, y, como Nadia, Nicola y los demás chavales, ha comido y ha recibido de sus mayores el tradicional aguinaldo. Los Reyes Magos también se acordarán de ellos. El jueves, los Niños Cantores de Kiev ofrecerán un recital benéfico en Gandia para costear los gastos médicos.

27.12.1994

EL PAIS



Una de las niñas procedentes de Chernobil, en el Clínico de Valencia.

EFE/J. C. CARDENAS

El grupo pasa la Navidad acogido por varias familias valencianas

Niños de Chernobil se someten a un chequeo médico en Valencia

Ocho niños rusos afectados por el escape radiactivo de Chernobil fueron sometidos ayer en Valencia a un chequeo médico para comprobar su estado de salud. Los pequeños han sido acogidos por familias valencianas para pasar la Navidad.

EFE

VALENCIA

Un grupo de ocho niños rusos, de los 59 procedentes de Chernobil que llegaron el pasado viernes a Valencia a pasar las Navidades, fue sometido ayer a un reconocimiento médico en el Hospital Clínico de la ciudad, para determinar cuál es su estado de salud, según fuentes sanitarias.

El jefe del departamento de oncología infantil del Hospital Clínico, Joaquín Donat, explicó que el resto de niños, que tienen edades comprendidas entre los 7 y 17 años, serán reconocidos a lo largo de esta semana y la próxima.

Los pequeños, que, según Joaquín Donat, presentan un estado general «aceptable», han sido sometidos a varios análisis de sangre para determinar si sufren anemia, afecciones en el tiroides o en su

sistema inmunitario, así como a una exploración clínica para comprobar si sufren dolores o alteraciones óseas.

No obstante, hasta dentro de varios días, cuando se conozca el resultado de las analíticas, no podrá realizarse una valoración real del estado de estos niños, que están pasando las Navidades en nuestro país acogidos por familias de la provincia de Valencia.

Joaquín Donat señaló que a los pequeños no se les ha detectado, de momento, «ningún problema importante», y agregó que algunos de los niños más pequeños «han mostrado un comportamiento asustado, y nos ha costado conectar con ellos».

El traslado de estos niños ha sido organizado por la Asociación Niños del Mundo, y en el mismo han colaborado las organizaciones Abogados sin

Fronteras, Bomberos sin Fronteras y la Generalitat.

Sensibilizar a la sociedad valenciana de los problemas sanitarios que sufren estos niños, proporcionarles por unos días un hogar del que carecen y realizarles un reconocimiento médico que les sirva de base para un posterior tratamiento en Ucrania, son los principales objetivos de este viaje.

La iniciativa de Niños del Mundo permitirá que un total de 380 niños y jóvenes afectados por las radiaciones atómicas pasen estos días de Navidad y Año Nuevo en los hogares de familias de distintas ciudades española.

Durante su estancia en Valencia, los niños visitaron Expojove 94, donde participaron en las actividades de diversos talleres, sin que su desconocimiento del español fuera un problema. Este grupo coincidió en la visita con otro de niños bosnios acogidos en Valencia.

Los pequeños de Chernobil asistirán a un acto conjunto mañana, jueves, 29 de diciembre, en Gandia, donde se celebrará la actuación de una coral.

Los sesenta pequeños estarán en Valencia hasta el martes, día 10

Las familias que han acogido a niños de Chernobil quieren repetir la experiencia

LEVANTE-EMV

VALENCIA

Las familias valencianas que durante estos días acogen en sus hogares a los niños afectados por el desastre nuclear de Chernobil han mostrado su satisfacción por esta experiencia, y la Fundación Abogados Sin Fronteras ha anunciado su intención de repetirla.

José Antonio Iborra, una de las personas que ha recibido en su casa a uno de estos niños, juzgó muy positiva la estancia de Anna. «*Lo que resulta muy simpático es que conmigo o con mi mujer se ha entendido un poco. Pero con mis hijas se ha entendido a la perfección*», comentó. Iborra añadió además que la experiencia vivida durante

estos días era imborrable tanto para él como para su familia, y que no le importaría repetirla. «*Nuestra relación con la niña ha sido muy estrecha, y nos gustaría mucho que no se perdiera. Si se repite próximamente nos encantaría que Anna o que cualquier otro niño pasara unos días con nosotros*», aseguró Iborra.

«Mi segunda madre»

Por su parte, Julia, una de las niñas acogidas, aseguró que se lo estaba pasando muy bien. «*Me ha llamado mucho la atención que aquí en Navidad se come uva. En mi país no hay uva en estas fechas*».

La niña comentó que su relación con la familia había sido ex-

cepcional. «*Con esta familia he estado muy bien —indicó— y desde ahora la señora con la que he estado es como mi segunda madre*».

El pasado jueves, los sesenta niños procedentes de Chernobil, quienes han sido sometidos a diversos análisis médicos desde su llegada a la ciudad, fueron recibidos, «*como unos valencianos más*», por el presidente de la Generalitat Valenciana, Joan Lerma, y por la alcaldesa de Valencia, Rita Barberá.

La visita a Valencia, donde permanecerán hasta el próximo martes, día 10, después de haber pasado las fiestas navideñas, ha sido tan satisfactoria que el presidente de la Fundación Abogados Sin Fronteras, José



Los niños de Chernobil, en Valencia.

MANUEL MOLINES

Ramón Juániz, apuntó que la intención de la asociación es repetirla. «*Hay cerca de 5.000 niños afectados y la idea es que, aun- que sea de grupo en grupo, vayan viniendo poco a poco para prolongar las experiencias y hacerlas llevaderas*», explicó.

Juániz destacó también que la solidaridad debe ser funda-

mental en las relaciones entre los distintos pueblos del mundo.

«*La solidaridad —manifestó el abogado de esta asociación— no enaltece a quien la practica, ni humilla a quien la recibe: sólo es un acto de justicia. Y cuando se realiza entre pueblos distintos genera concordia entre los mismos*».



Joan Lerma, con una niña.



La alcaldesa recibió a los niños rusos.

Lerma y Barberá, con los niños de Chernobil

EFE

VALENCIA

El presidente de la Generalitat, Joan Lerma, dijo ayer que se sentía «orgullosa» de las familias que han acogido a sesenta niños de la zona de Chernobil durante las fiestas navideñas, y que fueron recibidos por el presidente del Ejecutivo valenciano y por la alcaldesa de Valencia, Rita Barberá.

A ambas recepciones, los niños acudieron acompañados por las familias que les han

acogido en estos días. Joan Lerma deseó que el idioma no haya constituido una barrera entre los niños y las familias y que «se lleven el testimonio de amor de toda la sociedad valenciana».

Tanto en la Generalitat como en el ayuntamiento, los niños fueron obsequiados con distintos recuerdos de su estancia en la Comunidad Valenciana, al tiempo que fueron invitados por la alcaldesa de la ciudad, Rita Barberá, a presenciar la cabalgata

de los Reyes Magos desde el balcón de la casa consistorial.

Estos sesenta niños, de edades entre los 6 y los 17 años, además de convivir con las familias valencianas, han recibido atención médica por parte de personal especializado en oncología infantil del Servei Valencià de Salut, mediante reconocimientos médicos para detectar las posibles consecuencias de la contaminación radiactiva provocada por el accidente nuclear ocurrido hace unos años en su región.

LEVANTE 6.1.1995



La familia Aznar observa con interés la bienvenida que se dio a los niños de Chernobyl, llegado a Manises.

FOTOS PENALBA

Llegaron ayer para pasar el verano con familias valencianas

Aznar coincide con 122 niños de Chernobyl en Manises

Ciento veintidós niños, entre 6 y 14 años, llegados de Chernobyl (Ucrania) pasarán el verano con familias valencianas. Pero sobre todo, la gran mayoría, podrán por primera vez en su vida ser sometidos a un exhaustivo chequeo médico. Abogados Sin Fronteras ha hecho posible este viaje bajo el lema "Solidaridad y Justicia".

Uno de los testigos de excepción de la llegada de este grupo de niños y niñas ucranianas fue el presidente del Partido Popular, José María Aznar, que siguió, en compañía de su mujer y sus hijos, la recepción que se brindó a los pequeños en el aeropuerto de Manises. La familia Aznar-Botella se dirigía a la sala VIPs cuando quedó gratamente sorprendida de la presencia de los niños, familias y organizadores, y sobre todo por las voces de la Escola Coral de Quart de Poblet que entonaban en ese instante una canción de bienvenida a los chavales.

Aznar, al igual que su familia, se mantuvo en todo momento muy atento de lo que allí acontecía. En sus caras se vislumbraba admiración,

emoción y a la vez extrañeza, pues no es corriente encontrarse con escenas así en un aeropuerto. El presidente popular quiso ser un pasajero más y trató de mantenerse a una distancia prudencial, pues no quería convertirse en el centro de las atenciones.

Pese a ello su estancia no pasó desapercibida, y fueron los mismos organizadores quienes anunciaron por megafonía su presencia, que fue muy aplaudida. El pequeño de la familia Aznar-Botella era el más inquieto y sorprendido al ver allí a tantos chicos de su misma edad. Su padre fue el encargado de explicarle que los niños venían de Chernobyl para pasar el verano en Valencia.

La escena que pudo presenciar la familia Aznar emocionaba a cualquiera. Los niños, al oír que eran llamados por su nombre, salían sonrientes para ir a encontrarse con la familia de acogida. Los pequeños reían, sin embargo, los matrimonios se emocionaban y muchos de ellos dejaban correr alguna lágrima. Una de esas parejas al preguntarle, contestaba: "mira se me

pone la carne de gallina sólo de estar aquí esperando".

Natalia, Helen y Paco, tripulantes del Airbus 320 de Iberia que trasladó a los niños ucranianos a Valencia, coincidían en señalar la pena que suponía para ellos tener que dejarlos. "El viaje ha sido maravilloso, son todos muy cariñosos. Esperamos poder hacer el viaje de vuelta", decían.

Carlos García, psicólogo y miembro de la organización Abogados Sin Fronteras, ha sido una de las personas que ha viajado con los niños desde la capital ucraniana. "El sesenta por cien viene de orfanatos de la ciudad de Irpeñ, y el resto de familias pobres, que aún pasan más necesidad. La mayoría no ha tenido vínculos afectivos y esta experiencia es muy positiva".

Estos niños ucranianos sufren problemas de tiroides y buco-dentales, debido a no poder consumir ni agua ni leche; tan sólo beben zumos. Dos millones de niños ucranianos están afectados por la radioactividad en alguna medida.

J. M. Esteve

Sábado 13 de abril de 1996 EL PAÍS

Abogados sin Fronteras firma cuatro convenios en Ucrania para traer 'niños de Chernóbil'

S. V., Valencia
Los 200 niños de la zona afectada por la catástrofe nuclear de Chernóbil (Ucrania) que la Fundación Abogados sin Fronteras (ASF) trasladará a Valencia para que pasen el verano con familias valencianas, ya tienen nombre y apellido. Un grupo de 15 personas de la fundación visitó durante una semana Kiev y varias poblaciones en el límite del cinturón de seguridad que rodea la central y ha firmado convenios con dos orfanatos y dos asociaciones para dar cobertura legal al programa de solidaridad Ucrania 2000. El plan, que desarrolla la experiencia del verano pasado, prevé la acogida temporal y la asistencia sanitaria de 2.000 niños en los próximos cinco años. Los primeros 200 —de los que unos 80 vendrán por segunda vez para reforzar los lazos de amistad— se han seleccionado en entrevistas que los miembros de la fundación han realizado con

sus familias y en los orfanatos. ASF ha insistido en conocer a los niños en las difíciles circunstancias en que viven para evitar "fraudes" y elegir a los más necesitados, lo que ha sorprendido a las autoridades locales, acostumbradas a trabajar con asociaciones que envían intermediarios, según explica su presidente, el abogado José Ramón Juániz.

A las bendiciones de las autoridades ucranianas se ha sumado el compromiso oficial de patrocinio de la UNESCO al programa. Ucrania 2000 se presentará próximamente en Valencia con la asistencia del embajador de aquel país. El décimo aniversario de la catástrofe centrará unas jornadas que se celebrarán este mes y que incluirán un concierto de 20 niños de Chernóbil y una exposición de fotos y dibujos. La recaudación del concierto benéfico a cargo de la Orquesta Municipal José Iturbi en el Palau ayudará a financiar el viaje de los niños.

16-4-1996 - LAS PROVINCIAS / 35

La organización traerá en julio 200 niños

Ucrania reconoce el plan de acogimiento de niños de Abogados sin Fronteras

El gobierno de Ucrania tiene previsto efectuar un reconocimiento oficial del programa de acogimiento de niños que la organización no gubernamental Abogados sin Fronteras realiza desde Valencia.

El programa "Ucrania 2.000" tiene como objetivo trasladar a nuestra ciudad durante los meses del próximo verano a 2.000 niños de las poblaciones más afectadas por la catástrofe nuclear de Chernobí, un gravísimo accidente que costó la vida a miles de personas y que ha dejado secuelas de por vida a varios miles de personas que vivían en torno al área de la catástrofe.

Las precarias condiciones de vida y sanidad en que han quedado los nuevos países que formaron parte de la URSS hacen especialmente graves las secuelas del accidente, pues no se dan los niveles óptimos para una calidad de atención y de vida.

La semana pasada un equipo multidisciplinar de Abogados sin Fronteras visitó cuatro poblaciones ucranianas próximas a la central nuclear para conocer, caso por caso, la situación de las familias más necesitadas.

José Ramón Juaniz, presidente de esta ONG, aseguró que "la precariedad en que viven miles de familias es impresionante, es impresionante su carencia de todo. Ha sido un viaje muy duro, porque la gente vive en unas condiciones muy difíciles".



FOTO LLORET
Docenas de niños han estado en Valencia en campañas anteriores.

Juaniz afirmó que el recibimiento de estas familias fue en principio receloso, "porque éramos los primeros extranjeros que visitan a las familias en sus casas, para conocer las condiciones reales en que viven. Es increíble que, ahora que se cumple el décimo aniversario de la catástrofe de Chernobí, se gasten millones de pesetas en conferencias sin que ninguna de las personas que hablan de ello hayan ido a la zona".

El próximo día 1 de julio 200 niños ucranianos, cuyas condiciones de vida son difíciles, vendrán a Valencia para recuperar la salud durante dos meses.

Uno de los objetivos de este acogimiento es puramente médico, ya que es fundamental para ellos alejarse durante una temporada de las zonas con radiación. Aquí, en el Hospital Clínico, se les harán pruebas para conocer si sufren alteraciones genéticas.

T. L.

Ayer partieron de Valencia los 200 niños ucranianos

“Voy a echar mucho de menos a mis padres y hermanos españoles”

Hoy comienza para decenas de familias valencianas una cuenta atrás muy especial. Dentro de diez meses volverán a recibir una visita inolvidable: cerca de doscientos chicos y chicas procedentes de Chernóbil.

Ayer por la tarde partieron hacia su país el grupo de niños procedentes de Kiev y de otros pueblos cercanos que han pasado el verano con familias valencianas.

El programa “Ucrania 2000” ha tenido éxito por segundo año consecutivo y los organizadores, pertenecientes a la ONG “Abogados sin fronteras”, esperan poder repetirlo el año que viene.

“Lo que más voy a echar de menos es a mis padres españoles, a mis hermanos y a mis amigos”. Vitalia es una joven de trece años que ha venido este segundo verano, pero en esta ocasión ha llegado acompañada de su hermano, pequeño Dimitri. El no pudo venir el año pasado “pues aún no había cumplido cinco años, puesto que las autoridades ucranianas no dejan salir del país para los niños de menos de esa edad”, declaró a LAS PROVINCIAS Mercedes Rubio, una

de las organizadoras.

“La hermana mayor de Vitalia tampoco ha podido disfrutar de la oportunidad de estar aquí durante dos meses porque es mayor de quince años, la edad topé para poder participar en el programa”, añadió Mercedes.

Escenas emotivas se podían ver en el aeropuerto de Manises. Aunque el momento del embarque estaba anunciándose por los altavoces, los niños se abrazaban a las familias, aprovechando los últimos segundos; mientras, los más mayores intentaban aguantar estoi-

claramente su pena por tener que partir y alejarse de los amigos que aquí han conocido y con quienes han compartido juegos, diversiones, chapuzones en la piscina... Las familias que los han acogido también mostraban tristeza al tener que despedir a estos chicos que han sido como “uno más de nuestros hijos”.

El amor que une a estos jóvenes con su familia que los acogen es tal que los niños llaman a sus anfitriones “mamá” y “papá”. Además,



FOTO RAQUEL SUAY
Las familias valencianas grabaron el momento de la despedida.

quince de los jóvenes de Chernóbil que ya vivieron el año pasado han permanecido en Valencia durante todo este curso escolar. “Y para este año, además de los quince del pasado, van a quedarse más para el siguiente curso”, comentó Mercedes Rubio.

Con el programa “Ucrania 2000” se ha intentado que estos niños respiren aire puro ya que han estado expuestos a la contaminación radiactiva. El polvo radiactivo está

presente diariamente en las calles de su ciudad y ha de ser retirado con agua.

“Lo que pretendemos es que la UNESCO haga algo. Antes de comenzar los dos meses se les hace un chequeo médico completo y después también para conseguir pruebas que demuestren que este verano de aire y comida sana pueden alargar su esperanza de vida de aire”, concluyó Mercedes Rubio.

M. Puy Ignacio

LAS PROVINCIAS 1-9-1996

F. GOITIA
Yulia Slabutich dijo ayer adiós a la familia valenciana con la que ha vivido durante los dos últimos meses. A las 19.20 horas partió en el vuelo 5092 de Iberia con destino Kiev, la capital de Ucrania. En el avión viajaba acompañada por los otros 199 niños ucranios que han pasado sus vacaciones de verano en la Comunidad Valenciana gracias al programa Ucrania 2000 promovido por la organización no gubernamental Abogados Sin Fronteras.

Yulia nació hace 10 años, el mismo año en que en su país se producía el mayor accidente nuclear de la historia: la catástrofe de Chernóbil. Como el resto de la expedición, durante su estancia en España, la pequeña fue atendida médicamente y se le efectuó un estudio cromosómico para evaluar la influencia de la radiación en su cuerpo. El presidente de Abogados Sin Fronteras, José Ramón Juániz, señaló que ninguno de estos niños pre-

Adiós Valencia, adiós

Los 200 niños ucranios que pasaron
el verano con familias de la Comunidad
Valenciana regresaron ayer a su país

senta "secuelas importantes" o "patologías evidentes" por haber vivido cerca de la siniestra central nuclear.

El pasado 29 de junio, Yulia y los demás niños, de edades comprendidas entre los cinco y los 15 años, llegaron al aeropuerto de Manises, el mismo que ayer les vio partir de regreso a casa. "Ha sido muy corto" comentó apenada con sus básicas nociones de

castellano asimiladas en dos meses de vacaciones. "Tiene una memoria prodigiosa, por eso habla tan bien", apunta orgulloso su *padre* valenciano, el juez decano de Valencia, José María Tomás y Tío. Yulia desea volver en 1997, pero el programa sólo contempla la acogida de un niño por familia, por lo que la próxima vez le tocará a su hermano de cinco años, si bien Juániz señaló

que harán lo que puedan para que repita la experiencia. Los *padres* valencianos saben poco de las familias de sus *invitados*, la madre de la pequeña trabaja. En cualquier caso, Yulia quiere "ir a casa, saludar y, enseguida, regresar".

Las 170 familias valencianas que se ofrecieron para acoger a los niños ucranios acudieron ayer a despedirlos. El servicio de megafonía del aeródromo valenciano, ante el caos que se apoderó del vestíbulo, instaba con insistencia a que sólo un miembro de la familia acompañara a los niños en las colas ante los mostradores de facturación. Nadie parecía prestar mucha atención a los avisos. El intenso deseo de permanecer hasta el último momento junto a sus vástagos temporales estaba por encima de todo.

Cuando el avión se elevó sobre la pista de Manises un mar de manos se arremolinó en la puerta del aeropuerto hasta observar co-

mo el aparato desaparecía en el horizonte. A todos se les encogió el corazón.

El esfuerzo de Abogados Sin Fronteras permitió que los niños volvieran a Ucrania con un extra de ocho toneladas de ayuda humanitaria: alimentos, abundante material escolar y quirúrgico e incluso, un ecógrafo para un hospital ginecológico valorado en cinco millones de pesetas.

Yulia, al igual que Serguei Mielnik, de 13 años, o Andrei Pavlienko, de ocho, y muchos otros niños ucranios, empezarán mañana el curso escolar. Usarán los 200 paquetes de tiza que Juániz ha conseguido enviar a requerimiento del director del orfanato cercano a Chernóbil donde van a clase.

El presidente de Abogados Sin Fronteras subraya que "los niños regresan a casa con reservas psicológicas y físicas". Un buen ejemplo: Tatiana Slabutich, una niña que llegó delgadísima, se marchó con 12 kilos más.

Mi hermano de Chernobil

El pasado 31 de agosto, el grupo de trescientos niños y niñas ucranianos, entre 7 y 15 años, que pasaron una vez más las vacaciones en pueblos de Valencia, regresaron a su país. Se han ido y les vamos a echar mucho de menos, nosotros en especial a Dimitri, que tiene 13 años, es un niño encantador y supercariñoso, un nuevo hijo para mis padres y un nuevo hermano para mí. Al igual que los demás, te muestran todo su amor y afecto hacia la familia que les acoge. Estos niños proceden de los lugares más afectados por la catástrofe de la central nuclear de Chernobil, donde el aire que respiran, las tierras que allí son cultivadas y todo lo que les

rodea está contaminado por la radioactividad que hace 10 años sufrió aquel accidente que a tantos les costó la vida. La mayoría de los niños son de familias humildes y orfanatos; todos ellos carecen del afecto de su familia, así como de padres, abuelos, tíos... Sufren también de pobreza, de falta de alimentos, de ropa, de cariño... y vienen a España unos por primera vez y otros ya por tercera, para respirar y alimentarse de todo aquello que no está contaminado; por algo también muy importante, el pasar felices unos meses con la familia acogedora que les ofrece su ayuda y amor como si fuera uno más entre ellos, un nuevo hermano o un nuevo hijo temporal, y con todo esto practicando el lenguaje, conociendo su cultura e intercambiando costumbres; pasando grandes y divertidas anécdotas que no podremos olvidar y formando, entre España y Ucrania, un gran lazo de amistad. Todos estos niños regresarán a su país con el recuerdo de las vacaciones en Valencia con sus nuevos amigos, con sus familias, esperando impacientemente el próximo verano para volvernos a encontrar.

Pues bien, quiero dar las gracias a la Fundación Abogados sin Fronteras, por haber vuelto a traer a los niños, y por programar las pasadas Pascuas el viaje a Ucrania en el cual pude conocer todo aquello y ver zonas muy afectadas como Kiev, Bucha e Irpien... Dar las gracias también a **LAS PROVINCIAS**, que publicó la feliz llegada, y la triste despedida de los niños, que muy pronto, volverán aquí el año que viene.

Sofía Cruz Olivares (Mislata)

LEVANTE - EMV 1.9.1996

BIBLIOGRAFÍA

- Akar N., Cavdar A.O. and Arcasoy A. (1988). High incidence of neural tube defects in Bursa, Turkey. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.*, **2**: 62-65.
- Alper T. (1979). *Cellular Radiobiology*. London University Press.
- Ames B., Shigenaga M.K. and Hagen T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90** (17): 7915-7922.
- Arisawa S., Arisawa T., Ohashi M., Nitta Y., Ilkeya T. and Asai J. (1996). Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23** (3): 222-228.
- Bagdanska J. Korneti P., Todorova B. (2003). Erythrocyte superoxide dismutasa, glutathione peroxidasa and catalasa activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. *Bratisl. Lek. Listy*, **104** (3): 108-114.
- Barguineiro J.F., Barrios L., Caballín M.R., Miró R., Ribas M., Subias A. and Egozcue J. (1995). Establishment and validation of a dose-effect curve for gamma-rays by cytogenetic analysis. *Mutat. Res.*, **326** (1): 65-69.
- Barja G. (1996). Ascorbic acid and aging. En (J.R. Harris ed.), "*Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology*" Plenum Press, New York, USA. Vol 25 pp.157-158.
- Barja G. (1997). Radicales libres y antioxidantes. *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo*. Real Academia de Farmacia IV. Madrid.
- Bebeshko V.H., Hryd'ko O. M. and Mishchenko L.P. (1999). The functional status of the thyroid system in those irradiated as a consequence of the accident at Chernobyl Atomic Electric Power Station base on screening study data. *Lik. Sprava*, **3**: 44-48.
- Beckman J.S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxyntrite. *Chem. Res. Toxicol.*, **9** (5): 836-844.
- Behar D., Czaspski G., J. Rabami, Dorfman L.M. y Schwarz H.A. (1979). The acid dissociation constant and decay kinetics of parhydroxyl radical. *J. Phys. Chem.* **74**: 3209-3215.

- Bellavite P. (1988). The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad. Biol. Med.*, **4**: 225-261.
- Bendich A., Machlin L.J., Scandurra O., Burton G.W. and Wayner D.M. (1986). The antioxidant role of vitamin C. *Free Rad. Biol. Med.*, **2**: 419-444.
- Beyer R.E. (1992). An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an oxidant. *Biochem Cell. Biol.* **70**: 390-403.
- Bishop J.M. (1985). Viral Oncogenes. *Cell* **42**: 23-36.
- Blot W.J., Li J.Y., Taylor P.R., Guo W., Dawsey S., Wang G.Q., Yang C.S., Zheng S.F., Gail M., Li G.Y., Yu Y., Liu B., Tangrea J., Sun Y., Liu F., Fraumeni J.F., Zhang YH, Li B. (1993). Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Nat Cancer Inst.* **85**: 1483-1491.
- Bogdanska J.J., Kornetti P. and Todorova B. (2003). Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. *Bratisl. Lek. Listy*, **104** (3): 108-114.
- Boice J. and Linet M. (1994). Chernobyl, childhood cancer, and chromosome 21. Probably nothing to worry about. *B.M.J.* **309**: 139-140.
- Bolzan A.D., Bianchi M.S. and Bianchi N.O. (1997). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin. Biochem.*, **30** (6): 449-454.
- Bondy, S.C. (1992). Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage. *Neurotoxicology* **13** (1): 87-100.
- Boveris A., Oshino N. y Chance B. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide". *Biochem. J.*, **128** (3): 617-630.
- Boveris A., Cadenas E. and Stoppani O.M. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, **153**: 435-444.
- Braselmann H., Schmid E. and Bauchinger M. (1992). Chromosome analysis in a population living in an area of Germany with the highest fallout deposition from the Chernobyl accident. *Mutat. Res.* **283**: 221-225.
- Breen A.P. and Murphy J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.*, **18** (6): 1033-1077.

- Breen A.P. and Murphy J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **18** (6): 1036-1077.
- Breimer L.H. (1988). Ionizing radiation-induced mutagenesis. *Br. J. Cancer*, **57** (1): 6-18.
- Brigelius R., Muckel C. Akerboom T.P. and Sies H. (1983). Identification and quantification of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem. Pharmacol.*, **32**: 2529-2534.
- Byers T., and Bowman B. (1993). "Vitamin E supplements and coronary heart disease". *Nutrition Reviews*, **51** (11): 333-336.
- Cabo J. (2003). Dieta mediterránea y antioxidantes. *Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina. Importancia y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados*. Valencia. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados.
- Chang F., Syrjänen S., Tervahauta A. and Syrjänen K. (1993) Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br. J. Cancer*, **68** : 653-661.
- Cheeseman K.H. (1993). Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol. Aspects Med.*, **14** (3): 191-197.
- Chenal C, Legue F, Nourgalieva K, Brouazin (2000). Exposition of humans to low doses and low dose rate irradiation: an urgent need for new markers and new models. *Radiats. Biol. Radioecol.*, **40** (5): 627-629.
- Cigarran S., Barrios L., Barguineiro J.F., Caballín M.R., Ribas M. and Egozcue J. (1998). Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting. *Int. J. Radiat. Biol.*, **74** (4): 449-455.
- Cleiborne A.J. (1986) Catalasa Activity. Editor: Greenwald RR. Ed: CRC Press, Floride, pp 283-4.
- Courtade M., Caratero A., Jozan S., and B. Caratero C. (2001). Influence of continous, very low-dose gamma-irradiation in the mouse inmune system. *Int J. Radiat. Biol.*, **77** (5): 587-592.
- Cox L.S. and Lane D.P. (1995). Tumor suppressors, Kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bio. Essays*, **17**: 501-508.

- Cuadras C.M., Echevarría B., Mateo J., Sánchez P. (1991). *Fundamentos de Estadística, Aplicación a las Ciencias Humanas*. Barcelona, PPU.
- Davies K., Delsignore M.E. and Lin W. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **262** (20): 9902-9097.
- Demir M., Konukoglu D., Kabasakal L., Kadir H., Ergen K. and Ahmed S. (2003). The effects of exposure of 60 Co on the oxidant/antioxidant status among radiation victims. *J. Environ. Radioact.*, **64** (1): 19-25.
- Devasena t., Lalitha S. and Padma K. (2001). Lipid peroxidation, osmotic fragility and antioxidant status in children with acute post-streptococcal glomerulonephritis. *Clin. Chim. Acta*, **308**: 155-161.
- Díaz J., Serrano E. Acosta F., Carbonell L. (1998). Lipoperoxides Kit Evaluated for Measuring Lipoperoxides in Biological Samples: Reference Intervals for Human Plasma. *Clin. Biochem.*, **31** (4): 277-279.
- Dolk H. and Nichols R. (1999). Evaluation of the impact of Chernobyl on the prevalence of congenital anomalies in 16 regions of Europe. EUROCAT Working Group. *Int. J. Epidemiol.* **28** (5): 941-948.
- Dolphin D. (1988). The generation of radicals during the normal and abnormal functioning of cytochromes P450. *Basic Life Sci.*, **49**: 491-500.
- Eheman C.R., Garbe P. y Tuttle M. (2003). Autoimmune Thyroid Disease Associated with Environmental Thyroidal Irradiation. *Thyroid*, **13** (5): 453-464.
- Ehrlich M., Zhang X.Y., Inamdar N.M. (1990) Spontaneous damination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat. Res.*, **238** : 277-286.
- Emami B., Lyman J., Brown A., Coia L (1991). Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **21**, 109-122.
- Ernster L., Forsmark-Andrée P. (1993). "Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms." *Clin. Investig.*, **71**: S60-S65.

- Estrela J.M., Obrador E., Navarro J., Lasso de La Vega M.C. And Pellicer J.A. (1995). Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nat. Med.*, **1** (1): 84-88.
- Evans P. and Halliwell B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.*, **85** (Suppl.2): 67-74.
- Fajardo L.P. (1998). Morphology of radiation effects on normal tissues (Chaper 4). En: Pérez, A.: *Principles and Practice of Radiation Oncology* (3 ed.). Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers.
- Fenton, H.J.H. (1984). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.*, **65**: 889-910.
- Ferrán Aranaz M. (2001). *SPSS para Windows. Análisis Estadístico*. Madrid, Ed. McGraw.
- Fields S. and Jang S.K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, **249**: 1046-1049.
- Finlay C.A. (1993) The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 301-306.
- Floyd R.A. (1990): The role of 8hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*; **11**: 1447-1450.
- Frankenberg-Schwager M. (1989) "Review of repair Kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionising radiation." *Radiother. Oncol.* **14**: 320.
- Freeman, B.A. and Crapo J.D. (1982). "Biology of disease: free radicals and tissue injury". *Lab. Invest.*, **47** (5): 412-426.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of actions". *Am. J. Med.*, **97** (3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Frenkel K. (1992). Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmac. Ther.* **53**: 127-166.
- Fridovich I. (1974). Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.*, **41**: 35-97.
- Fridovich I. (1978). Superoxide dismutases: defense against endogenous superoxide radical. *Ciba Found Symp.*, **65**: 77-93.
- Fridovich I. (1983). Superoxide dismutases: regularities and irregularities. *Harvey Lect.*, **79**: 51-75.

- Fridovich I. (1986a). Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247** (1): 1-11.
- Fridovich I. (1986b). "Cytochrome C CRC Handbook of methods for oxygen radical research." Editor: Greenwald R.D., Ed. Boca Ratón, Florida; pp. 213-215.
- Fritz-Niggli H. (1995). 100 years of radiobiology: implications for biomedicine and future perspectives. *Experientia*, **51** (7): 652-664.
- García-España A., Kahn J.M., Sáez G. and Pellicer A. (1996). Mutagenic Effects of tumorigenic neutron radiation *Int. J. Cancer*, **65**: 677-681.
- Gerbitz, K.D. (1992). "Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes?". *Diabetologia*, **35** (12): 1181-1186.
- Gey K.F., Moser U.K., P.Jordan, Stahelin H.B., Eichholzer M. and Luedin E. (1993). "Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C." *Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 787S- 797S.
- González A.J. (1994). Los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante. *Radioprotección*, **7**: 31-51.
- Goth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Chim. Acta*, **196**:143-151.
- Greenblatt M.S., Benett W.P., Hollstein M., Harris C.C. (1994). Mutations in the p53 tumor supressor gene: clues to cancer eriology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, **54**: 4855-4878.
- Greenwald R.A. and Moy W.W. (1980). Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.*, **23**: 455-463.
- Guemouri L., Artur Y., Herbeth B. Jeandel C., Cuny G. and Sies G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem.*, **37** (11): 1932-1937.
- Gutteridge J.M. (1993). Free Radicals in Disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comms.* **19** (3): 141-158.
- Haber, F. and Weiss J. (1934). "The catalitic compensation of hydrogen proxide by iron salts." *Proc. R. Soc. London*, **147**: 332-351.

- Hall E.J. (1978). *Radiobiology for the radiologist* (2nd ed.). Philadelphia. Harper and Row Publishers.
- Halliwell B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet*, **344**: 721-724.
- Halliwell B. (1996). Antioxidants in Human Health and Disease. *Ann. Rev. Nutr.*, **16**: 33-50.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2nd ed.). Oxford. Clarendon Press.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **280** (1): 1-8.
- Harlow E., Williamson N.M., Ralston R., Helfman D.M., Adams T.E. (1985). Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol. Cell. Biol.*, **5** : 1601-1610.
- Harris C.C. (1996). Structure and function of p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88** : 1442-1445.
- Hillebrandt S., Streffer C., Reiners C. and Demidchik E. (1996). Mutations in the p53 tumour suppressor gene in thyroid tumours of children from areas contaminated by the Chernobyl accident. *Int. J. Radiat. Biol.*, **69**: 39-45.
- Hillebrandt S., Streffer C., Demidchik E. P., Biko J. and Reiners C. (1997). Polymorphisms in the p53 gene in thyroid tumours and blood samples of children from areas in Belarus. *Mutat. Res.*, **381**: 201-207.
- Hinds P., Finlay C., Levine A.J. (1989) Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.*, **63** : 739-746.
- Hoffman W. (2001). Fallout from the Chernobyl nuclear disaster and congenital malformations in Europe. *Arch. Environ. Health.* **56** (6): 478-84.
- Hoffman W. (2002). Has fallout from the Chernobyl accident caused childhood leukaemia in Europe? A commentary on the epidemiologic evidence. *Eur. J. Public Health*, **12** (1): 72-76.

- Inal M. E., Akgun A. and Kahraman A. (2002). Radioprotective effects of exogenous glutathione against whole-body gamma-ray irradiation: age- and gender-related changes in malondialdehyde levels, superoxide dismutase and catalase activities in rat liver. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **24** (4): 209-213.
- Ionov Y., Peinado M.A. Malkosyan S., Shibata D. and Perucho M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, **363**: 558-561.
- Isoobe M., Emanuel B.S. Givol D, Oren M. Croce C.M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, **320** : 84-85
- Ito M., Yamashita S., Ashizawa K., Namba H., Hoski M., Shibata Y., Sekine I., Nagataki S. and Shigenmatsu I. (1995). Childhood thyroid diseases around Chernobyl evaluated by ultrasound examination and fine needle aspiration cytology. *Thyroid*, **5**: 365-368.
- Ivanov V.K., Tysb A.F., Gorsky A.I. et al. (1997). Thyroid cancer among "liquidators" of the Chernobyl accident. *Br. J. Radiol.*, **70**: 937-941
- Jensen .H. (1996). One decade after Chernobyl: environmental impact assessments. Summing up the Consequences of the accident. Vienna IAEA, 8
- Kajioka E.H., Gheorghe C., Andres M.L., Abell G.A., Folz-Holbeck J., Slater J.M., Nelson G.A. and Gridley D.S. (1999). Effects of proton and gamma radiation on lymphocyte population and acute response to antigen. *In vivo*, **13** (6): 525-533.
- Kampen E. and Zijlstra W.G. (1961). Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta*, **6**: 538-544.
- Kampmann B. Fallout from Chernobyl. (1994). Chromosomal abnormalities increase in Latvia. *B. M. J.* **309** (6964):1299.
- Kanno T., T.Utsumi, Y.Takehara; I.de A, J.Akiyama, T.Yoshioka, A.Horton and K.Utsumi (1996). "Inhibition of neutrophil-superoxide generation by alfa-tocoferol and coenzyme Q." *Free Rad. Res.* **24**: 281-289.
- Karnofsky, J.R. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chem. Biol. Interact.*, **70** (1-2): 1-28.

- Kastan M.B., Zhan Q., El-Deiry W.S., Carrier F, Jacks T., Walsh W.V. Plunkett B.S., Vogelstein B. and Fornace A.J. Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71** : 587-597.
- Ketterer B. (1986). Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*, **16**: 957-973.
- Kharb S. y Ghalaut V. (2003). Plasma lipoperoxides: a preliminary reference range. *Indian J. Med. Sci.*, **57** (3): 105-107.
- Klugbauer S., Lengfelder E., Demidchick E.P. and Rabes H. (1995). High prevalence of RET rearrangement in thiroid tumors of children from Belarus after Chernobyl accident. *Oncogene*, **11**: 2459-2467.
- Klugbauer S., Demidchick E., Lengfelder E. and Rabes H. (1998). Detection of a Novel Type of RET rearrangement (PTC5) in Thyroid Carcinomas after Chernobyl and Analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Research.*, **58**: 198-203.
- Knudson A.G. (1971). Mutation and cancer. Statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**: 820-826.
- Krinsky N.I. (1993a). Actions of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* **13**, 561-587.
- Krinsky N.I. (1993b). Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann. NY Acad. Sci.*, **686**: 229-242.
- Lane D.P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**: 15-16.
- Lane D.P. and Benchimol S. (1979) p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev.*, **4** : 1-8.
- Lazjuk G.I. Nikolaev D.L. and Novikova I.V. (1997). Changes in registered congenital anomalies in the Republic of Belarus after the Chernobyl disaster. *Stem Cells*, **15** (Supl. 2): 255-260.
- Lenton K.J., Therriault H., Fulo T., Payette H. and Wagner J.R. (1999). Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **20** (4): 607-613.
- Levine A.J. Nomand J. Finlay C. A. (1991): The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, **351**: 453-456.
- Linnane A., Marzuki W.S., Ozawa T. and Tanaka M. (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*, **1**(8639): 642-645.

- Liochev S.I. and Fridovich I. (1994). The role of O_2^- in the production of $HO \cdot$: in vitro and in vivo. *Free Rad. Biol. Med.*, **16** (1): 29-33.
- Lippman R.D. (1985). Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.*, **20** (1): 1-5.
- López Ginés C., Gil R., Gregori M., Galán F., Andrés M., Castelló M.L., Pellín A., Colomer J. y Lombart A. (1987). Anomalías cromosómicas encontradas en un estudio citogenético realizado en 750 niños recién nacidos sanos. *An. Esp. Pediatr.*, **27** (6): 417-420.
- Loschen G, Azzi A., Richter C. and Flohé L.. (1974). "Superoxide radicals precursors of mitochondrial hydrogen peroxide." *FEBS Lett.*, **42**: 68-72.
- Luban N.L., Drothler D., Moroff G. and Quinones R. (2000). Irradiation of platelet components: inhibition of lymphocyte proliferation assessed by limiting-dilution analysis. *Transfusion*, **40** (3): 348-352.
- Lynn et al. (1988). Global impact of the Chernobyl Reactor Accident. *Science*, **242**: 1513-1519.
- Makino S. (1975). *Human Chromosomes*. Amsterdam-Oxford. North-Holland Publishing Company.
- Mangano J. J. (1996) Chernobyl and hypothyroidism. (1996). *Lancet*, **348**: 476-477.
- Martínez C. y Pedrón C. (2002). *Valoración del estado Nutricional. Nutrición*. Asociación española de Pediatría.
- Mayne S.T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr.*, **133** (Suppl. 3) 933-940.
- Mc Bride O.W., Merry D. Givol D. (1986). The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 130-134.
- Mc Cord J.M. (1974). "Free radicals and inflammation protection of synovial fluid by superoxide dismutase." *Science*, **24**: 529-534.
- Mc Cord J.M. and Fridovich I. (1969). "Superoxide dismutasa. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." *J Biol. Chem.* **244**: 6049-6055.

- Mc Millan T.J. and Steel. G.G. (1997). DNA Damage and cell killing (Chapter 8). En: Steel G.G. *Clinical Radiobiology* (2nd Ed.). London. Arnold.
- Meister A. (1994). Glutathione-ascorbic acid antioxidant system en animals. *J. Biol. Chem.*, **269**: 9397-9400.
- Michel L.A., Donckier J.E. (2002). Thiroid cancer 15 years after Chernobyl. *Lancet*, **359** (9321): 1947.
- Miller C., Mohandas T., Wolf D., Prokocimer M., Rotter V., Koeffler H.P. (1986). Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. *Nature*, **319** : 783-784.
- Milton J.S. (1998). *Estadística para la Biología y Ciencias de la Salud*. Madrid, Ed. McGraw.
- Modam B. (1987). Cancer and leukemia risk after low level radiation-controversy, facts and future. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.*, **4** (3-4): 151-161.
- Moncada S., Palmer R.M. and Higgs E.A. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology." *Pharmacol. Rev.*, **43** (2): 109-142.
- Morel F., Doussiere J. and Vignais P.V. (1991). "The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects." *Eur. J. Biochem.*, **201**: 523-546.
- Morimura K., Romanenko A., Min W, Salim E.I. Kinoshita A. Wanibuchi H., Vozianov A. And Fukushima S. (2004). Possible distinct molecular carcinogenic pathways for bladder cancer in Ukraine, before and after the Chernobyl disaster. *Oncol. Rep.*, **11** (4): 881-886.
- Mosner J., Mummenbrauer T., Bauer C., Szakiel G., Grosse F. and Deppert W. (1995). Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J*, **14** : 4442-4449.
- Mould R.F. (2000). *Chernobyl Record. The definitive History of The Chernobyl Catastrophe*. Bristol and Philadelphia. Institute of Physics Publishing.
- Moysich K. B., Menezes R.J. and Michalek A.M. (2002). Chernobyl-related ionising radiation exposure and cancer risk: an epidemiological review. *Lancet Oncol.*, **3** (5): 269-279.

- Muhlendahl K.E, Muck K. (1996). Chernobyl, low-dose radiation, and trisomy 21: possibly something to worry about. *Eur. J. Pediatr.* **155** (7): 612-614.
- Muñiz P., Valls V., Pérez-Broseta C., Iradi A., Climent J.V., Oliva M.R. and Sáez G. (1995). The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* **18** (4): 747-755.
- Nathan D. G. and Oski's S. H (1998). *Hematology of Infancy and Childhood*. 5th Ed. U.S.A. Saunders Company.
- Navarro J., Obrador E., Pellicer J., Asensi M., Viña J. and Estrela J. (1997). Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic. Biol. Med.*, **22** (7): 1203-1209.
- NEA-OECD, (2002). Nuclear Energy Agency. Organisation for economic co-operation and development. Chernobyl 2002. Assessment of Radiological and Health Impacts. Update of Chernobyl: Ten Years on.
- Nelson W., Behrman R. and Vaughan V. (1989). *Tratado de Pediatría*. (13 ed.) Madrid. Mc Graw-Hill.
- Newmark P. (1987). Oncogenes and cell growth. *Nature*, **327** (6118): 101.
- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R. and Grandjean P. (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of live-style factors. *Clin. Chem.*, **43** (7): 1209-1214
- Nikiforov Y., Nikirova M., Gnepp D. and Fagin J. (1996). Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene*, **13**: 687-693.
- Okamoto, H. (1985). "The role of poly (ADP-ribose) synthetase in the development of insuline-dependent diabetes and islet B-cell regeneration." *Biomed. Biochim Acta*, **44** (1): 15-20.
- Oliner J.D. Kinzler K.W., Meltzer PS, George D.L. and Vogelstein B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, **358**: 80-83.
- Olinski R., Zastawny T., Budzbon J., Skokowshi J., Zegarsky W. and Dizdaroglu M. (1992). DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.* **309** (2): 193-198.

- Oliva M.R., Ripoll F., Muñiz P., Iradi A., Truyenke R., Valls V., Drehmer E. and Sáez G. (1997). Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol. Carcinog.*, **18** (4): 232-243.
- Oliva M.R., Iradi A., Garrido M., Ramos A. M., Oltra P., Muñiz P. and Sáez G. (2001). Oxidative stress induces the expression of the major histocompatibility complex in murine tumor cells. *Free Radic. Res.* **35**: 119-128.
- Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. and Hayasi K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using PCR. *Genomics*, **5**: 874-879.
- Orrenius S. and Moldeus P. (1984). The multiple roles of glutathione in drug metabolism. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **5**: 432-435.
- Pacifi R.E. and K.J. Davis (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." *Gerontology*, **37**: 166-180.
- Pacini F., Vorontsova T., Molinaro E. Kuchinskaya E., Agate L., Shavrova E., Astachova L., Chiovato L. and Pinchera A. (1998). Prevalence of thyroid autoantibodies in children and adolescents from Belarus exposed to the Chernobyl radioactive fallout. *Lancet*, **352**: 763-766.
- Pacini F., Vorontsova T., Molinaro E., Shavrova E., Agate L., Kuchinskaya E., Elisei R., Demidchick E.P., and Pinchera A. (1999). Thyroid consequences of the Chernobyl nuclear accident. *Acta Paediatr., Suppl.* **88** (433): 23-27.
- Padovani L.; Caporossi D., Tedeschi B., Vemole P., Nicoletti B. and Mauro F. (1993). Cytogenetic Study in Lymphocytes from children exposed to ionizing Radiation after Chernobyl Accident. *Mut. Res.*, **319**: 55-60.
- Pajares M.A., Durán C., Corrales M., Pliego M. and Mato J.M. (1992). Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione. *J. Biol. Chem.*, **267** (25): 17598-17605.
- Palozza P. and Krinsky N.I. (1991). "The inhibition of radical-initiated peroxidation of microsomal lipids by both α -tocopherol and β -carotene." *Free Rad. Biol. Med.*, **11**: 407-414.
- Palozza P. and Krinsky N.I. (1992). β -carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**: 184-187.

- Panfill E., Sandri G. and Ernster (1991). Distribution of glutathione peroxidases glutathione reductase in rat brain mitochondria. *FEBS Lett.*, **290** (1-2): 35-37.
- Papathanasiou M.A., Kerr N.C., Robins J.H., Mc Bride O.W., Alamo I.J., Barret S.F., Hickson I.D. and Formace A.J. Jr. (1991). Induction by ionizing radiation of the GADD45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein Kinase C. *Mol. Cell. Biol.*, **11**: 1009-1016.
- Pardo Merino A. y Ruiz Díaz, M.A. (2002). *SPSS 11. Guía para el análisis de datos*. Madrid: Ed. McGraw Hill.
- Parkin D.M., Clayton D., Black R.J. et al. (1996). Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *B. J. Cancer*, **73**, 1006-1012.
- Parmentier N. and Nénot J.C. (1989). Radiation Damage Aspects of the Chernobyl Accident. *Atmospheric Environment*, **23**: 771-775.
- Pastore A., Federici G., Bertini E. and Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta*, **333** (1): 19-39.
- Petridou E. Trichopoulos D, Dessypris N., Flytzani V., Haidas S., Kalmanti M., Kolioussas D., Kosmidis H., Piperopoulou F. and Tzortzatos F. (1996). Infant leukaemia after in uteri exposure to radiation fom Chernobyl. *Nature*, **382**: 352-3.
- Pierce D.A., Shimizu Y., Preston D.L. et al. (1996). Studies of the mortality of atomic bomb survivors. *Radiat. Res.*, **146**: 1-27
- Prisyazhniuk A., Griestchenko V., Zakordonets V. (1995). The time trends of cancer incidence in the most contaminated regions of the Ukraine before and after the Chernobyl accident. *Radiat. Environ. Biophys.*, **34**: 3-6
- Radi R.S. Tan S., Prodanov E., Evans R.A. and Parks D.A. (1992). Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical production. *Biochim. Biophys. Acta*, **1122** (2), 178-182.
- Rahu M. (2003). Health effects of the Chernobyl accident: fears, rumours and the truth. *Eur. J. Cancer*, **39** (3): 295-299.
- Reardon W.R., Ross J., Sweeny M.G., Luxon L.M., Pembrey M.E., Harnding A.E. and Trembath R.C. (1992). "Diabetes mellitus associated with pathogenic point mutation in mitochondrial DNA." *Lancet*, **340** (8832): 1376-1379.

- Reiter R.J. (1995). "Oxygen radical detoxification processes during aging: the functional importance of melatonin." *Aging Clin. Exp. Res.* **7**: 340-351.
- Révész L. and Malaise E.P. (1983). Significance of cellular glutathione in radioprotection and repair of radiation damage. En: *Functions of glutathione. Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical aspects*. Edited by A.Larsson et al. New York, Raven Press.
- Richter C. (1988). Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?. *FEBS Lett.*, **241** (1-2): 1-5.
- Riklis E., Emerit I. and Setlow R. B. (1996). New approaches to biochemical radioprotection: antioxidants and DNA repair enhancement. *Adv. Space Res.* **18**: 51-54.
- Ripoll F., Oliva M.R., Muñoz P., Dávila D., Trullenque R. and Sáez G.T. (1996). Genes supresores de tumores y carcinoma colorrectal humano. Estudio en una población de la comunidad Valenciana. *Cir. Esp.*, **60**: 354-360.
- Rodríguez A.M., Carrico P.M., Mazurkiewiewicz J.E. and Meléndez J.A. (2000). Mitochondrial or cytosolic catalase reverse the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, ATP production and decreasing the steady state levels of H₂O₂. *Free Rad. Biol. Med.*, **29** (9): 801-813.
- Romanenko A., Morimura K., Wanibuchi H., Salim E. I. Kinoshita A., Kaneko M., Vozianov A. And Fukushima S. (2000). Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the Chernobyl accident. *Int. J. Cancer*, **86** (6): 790-798.
- Ron E. (1998). Ionizing Raditaion and Cancer risk: evidence from epidemiology. *Radiat. Res.*, **150** (Suppl.5): 30-41.
- Rousseau E.J., Davison A.J. and Dunn B. (1992). Protection by β -carotene and related compounds against oxygen mediated cytotoxicity and genotoxicity. *Free Rad. Biol. Med.* **13**: 407-433.
- Sáez G., Thornalley P.J., Hill H.A., Hems R. and Bannister J.V. (1982). "The production of free radicals during the autoxidation of cystine and theri effect on isolated rat hapatocytes." *Biochim. Biophys. Acta*, **719** (1): 24-31.
- Sáez G., Valls V., Muñoz P., Pérez-Broseta C., Iradi A. Oliva M.R., Bannister J. V. and Bannister W. H. (1993). The role of glutathione in protection against DNA damage induced by rifamycin and copper (II) ions. *Free Rad. Res. Comms.* **19** (2): 81-92.

- Sáez G., Oliva M., Mangues R. and Pellicer A. (1994). Absence of MDM-2 Gene Amplification in Experimentally Induced Tumors Regardless of p53 Status. *Mol. Carcinog.*, **9**: 40-45.
- Sánchez B., Bezares M., López P. Ortiz P. (1988). *Protección radiológica*. Parte I: Conceptos generales. Madrid. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Scheffner M., Werness B.A. Huibregtse J.M., Levine A.J. and Howley P. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**: 1129-1136.
- Schreck R. and Baeuerle P.A. (1994). Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol.*, **234**: 151-163.
- Schwenn M., and Bertrand Brill A. (1997). Childhood cancer 10 years after the Chernobyl accident. *Current Opinions in Pediatrics*, **9**: 51-54.
- Sen C.K. and L.Packer (1996). "Antioxidant and redox regulation of gene transcription." *The FASEB Journal: Official publications of American Societies for Experimental Biology*, **10** (7): 709-720.
- Senturker S., Karahalil B., Inal M. Yilmaz H. Muslumanoglu H., Gedikoglu G. and Dizdaroglu M. (1997). Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett.*, **416** (3): 286-290.
- Sevan´KaeV A. V., Lloyd D.C., Potetnya O.I., Zhloba A., Moiseenko V.V. and Edwards A.A. (1995). Chromosomal Aberrations in Lymphocytes of Residents of Areas Contaminated by Radiocactive Discharges from the Chernobyl Accident. *Rad. Prot, Dosim.* **58** (4): 247-254.
- Shibata Y., Yamashita S., Masyakin V., Panasyuk G. and Nagataki S. (2001). 15 years after Chernobyl: new evidence of thyroid cancer. *Lancet*, Dec 8; **358**: 1965-66.
- Sies H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* **25**: 1058-1071.
- Sies H. (1992). Carotenoids and tocopherols as antioxidants and singlet oxygen quenchers. *J.Nutr. Sci. Vitaminol.* Spec No: 27-33
- Sies H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European J. Biochem.* **215** (2): 213.

- Smith J.T., Comans R.N.J., Beresford N.A., Wright S.M, Howard B.J. and Camplin W.C. (2000). Chernobyl's legacy in food and water. *Nature*, **405**: 141.
- Soussi T. (1997). The p53 tumour supressor gene: from molecular biology to clinical investigation. En: Klijn J.G.M. *Prognostic and predictive value of p53*. Amsterdam. Elsevier Science.
- Soussi T. and May P. (1996). Structural aspects of p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol*, **260** : 623-637.
- Sperling K., Pelz J., Wegner R. D., Dörries A., Grütters A. and Mikkelsen M. (1994). Significant increase en trisomy 21 in Berlin nine months after Chernobyl reactor accident: temporal correlation or causal relation?. *B.M.J.* **309**: 158-162.
- Stadtman E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, **257**: 1220-1224.
- Steel G.G. (1997). *Clinical Radiobiology* (2nd Ed.). London. Arnold.
- Stenger J.E., Mayr G.A. Mann K. and Tegtmeyer P. (1992). Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol. Carcinog*, **5** : 249-253.
- Stsjazhko V.A., Tsyb A.F., Tronko N.D., Souchkevitch and Baverstock K.F. (1995). Childhood thyroid cancer since accident al Chernobyl. *B M J*, **310**: 801.
- Sugenoya A., Asanuma K., Hama Y., Masuda H., Skidanenko G.S., Anatoliebna A. T. Koike K., Komiyama A and Iida F. (1995). Thyroid abnormalities among children in the contaminated area related to Chernobyl accident. *Thyroid*, **5**: 29-33.
- Szent-Gyorgyi A. (1928). Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex. *Biochem. J.*, **22**: 1387-1409. En: *Bioquímica y fisiopatología del estrés oxidativo 1997*. Madrid. Real Academia de Farmacia.
- Taylor J.A., Watson M.A., Devereux T.R., Michels R.Y., Saccomano G. and Anderson M. (1994). P53 mutation hotspot in radon-associated lung cancer. *Lancet*, **343**: 86-87.
- Terrádez P., Asensi M., Lasso de la Vega M.C. Puertes I.R., Viña J. and Estrela J.M. (1993). Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: Modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem. J.* **292**: 477-483.

- Tolbert N.E. (1981). Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxisomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **50**: 133-157.
- Tormos C., Chaves J., García M. J., Garrido F., Jover R., O'Connor J. E., Oltra A., Oliva M. and Sáez G. (2004). Role of glutathione in the induction of apoptosis and cfos and cjun mRNAs by oxidative stress in tumor cells. *Cancer Lett.*, **208**: 103-113.
- Valls A. y Algara M. (1994). *Radiobiología*. Madrid. Ed. Eurobook.
- Verger P. (1997). Down Syndrome and ionizing radiation. *Health Phys.* **73** (6): 882-893.
- Vikovanets E. V, Chernyshov V.P., Slukvin I. I. Antipkin Y.G., Vasyuk A. N., Klimenko H.F. and Strauss K. W. (1997). ¹³¹I Dose-dependent thyroid autoimmune disorders in children living around Chernobyl. *Clin. Immunol. Immunopath.*, **84**: 251-259.
- Viña J., Sáez G.T., Wiggins D., Roberts A.F., Ems R.H. and Krebs H.A. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes". *Biochem. J.*, **212** (1): 39-44.
- Viña J.R., Palacin M., Fuentes I.R., Hernández R. and Viña J. (1989). Role of the gamma-glutamyl cycle in the regulation of amino acid translocation. *Am. J. Physiol.*, **257**: 916-922.
- Vitale S., West S., Hallfrisch J., Alston C., F.Wang F., C.Moorman C., Muller D., Singh V. and Taylor H.R. (1993). "Plasma antioxidants and risk of cortical and nuclear cataract." *Epidemiol*, **4**: 195-203.
- Waldmann S., Klugbauer S. and Rabes H.M. (1998). Absence of RAS and p53 mutations in thyroid carcinomas of children after Chernobyl in contrast to adult thyroid tumours. *Br. J. Cancer*, **77** (6): 952-955.
- Wang Y., Reed M., Wang P., Stenger J.E., Mayr G., Anderson M.E., Schwedes J.F. and Tegtmeyer P. (1993). p53 domains: Identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev*, **7** : 2575-2586.
- Wang P., Reed M., Wang Y., Mayr G., Stenger J.E., Anderson M.E., Schwedes J.F. and Tegtmeyer P. (1994) p53 domains: structure, oligomerization and transformation. *Mol Cell Biol*, **14** : 5182-5191.
- Ward J.F. (1986): Mechanisms of DNA repair and their potential modification for radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **12**: 1027.
- Ward P., Warren J.S. and Johnson K.J. (1988)."Oxygen radicals, inflammation, and tissue injury". *Free Rad. Biol. Med.* **5**: 403-408.

- Weitz Z., Moak S.A. and Greenwald R.A.. (1988). "Degradation of hyaluronic acid by neutrophil derived oxygen radicals is stimulus dependent". *J. Rheumatol.*, **15** (8): 1250-1253.
- Williams E.D. (1995). Mechanism and pathogenesis of thyroid cancer in animals and men. *Mutat. Res.* **333** (1-2): 123-129.
- Wink D.A., Cook J.A., Krishna M.C., DeGraff W., J.Gamson J. and Mitchell J.B.. (1995). "Nitric oxide protects against alkyl peroxide mediated cytotoxicity: further insights into the role nitric oxide plays in oxidative stress." *Arch. Biochem. Biophys.* **319**: 402-407.
- Wink D.A., Cook J., Pacelli R., DeGraff W., Gamson J., Liebmann J., Krishna M.C. and Mitchell J.B. (1996). The effect of various nitric oxide donors agents on hydrogen peroxide mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys*, **331**: 241-248.
- Winkler B.S., Orselli S.M. and Rex T.S. (1994). The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective. *Free Rad. Biol. Med.*, **17**: 333-349.
- Wolf, S.P., Gamer A. and Dean R.T. (1986). *Trends Bioch.Sci.* **11**: 27-31
- Wong S.H.Y., Knight J.A., Hopfer S.M., Zaharia O., Leach C.N. Jr. and Sunderman F.W. Jr. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem*, **33**: 214-220.
- Yamamoto S., Romanenko A., Wei M., Masuda C., Zaparin W., Vinnichenko W., Vozianov A., Lee C. C., Morimura K., Wanibuchi H., Tada M. and Fukushima S. (1999) Specific p53 gene mutations in Urinary Bladder Epithelium after the Chernobyl accident. *Cancer Res.*, **59**: 3606-3609.
- Yarmonenko S.P. (1988). *Radiobiology of Humans and Animals*. Moscow. Mir Publishers.
- Zehavi- Willner T., Kosower N.S., Kosower E.M. and Hunt T. (1970). GSH oxidation and protein synthesis in rabbit reticulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **40** (1): 37-42.
- Zelicoff A.P. and Pezullo J.C. (2002). Thyroid cancer 15 years after Chernobyl. *Lancet*, **359** (9321): 1946-1947.