



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS

“APLICACIÓN DE LA DOSIMETRÍA DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA TÉCNICA DE ELUCIÓN ALCALINA DE ADN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

F Í S I C O

P R E S E N T A

ANTONIO LOZANO VINCENT



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

Directora: Dra. Ma. EUGENIA GONZALEZ BONAPARTE.

MÉXICO -D.F.



2002

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Aplicación de la dosimetría de radiación ionizante en la técnica de elución  
alcalina de ADN".  
realizado por LOZANO VINCENT ANTONIO

con número de cuenta 8837212-3 , quién cubrió los créditos de la carrera de Física.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE 

Propietario

DRA. ALICIA NEGRON MENDÓZA 

Propietario

DRA. ROSALIA RIDAURA SANZ 

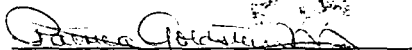
Suplente

M. EN C. ANA ELENA BUENFIL BURGOS 

Suplente

DRA. MARIA ISABEL GAMBOA DE BUEN 

Consejo Departamental de Física



DRA. PATRICIA GOLDSTEIN MENACHE  
Coordinadora de Licenciatura

## **AGRADECIMIENTOS:**

Deseo agradecer a mis padres por todo su apoyo sin el cual no hubiera sido posible concluir mi licenciatura.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, por todas sus atenciones, facilidades, apoyo, tiempo y transmisión de sus conocimientos al dirigir la presente tesis.

A la M. En C. Dora Patricia Guzmán Bazán por su amable colaboración en el trabajo experimental para la realización de la presente tesis.

A todas mis sinodales por sus valiosas aportaciones y sugerencias para corregir y enriquecer el presente trabajo, en particular quisiera agradecer a cada una de ellas:

Dra. Alicia Negrón Mendoza por todas las facilidades y apoyo en cuanto a las cuestiones de irradiación y uso del Gammacell 200 para el presente trabajo, así como de su amable asesoría cuando fue necesaria.

Dra. Rosalía Ridaura Sanz. Por su curso de biofísica el cual fue lo suficientemente motivante como para hacer mi tesis en una aplicación física de interés biológico.

M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos. Por los conocimientos impartidos por ella sobre dosimetría de radiación ionizante, los cuales me han sido muy útiles y estoy seguro me lo seguirán siendo en un futuro

Dra. María Isabel Gamboa de Buen. Quien me introdujo al apasionante mundo de la física de radiaciones.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.	5
<b>CAPÍTULO I. LA RADIACIÓN .</b>	<b>7</b>
<b>LA RADIACIÓN A LA QUE ESTAMOS EXPUESTOS.</b>	<b>7</b>
Radiación natural.	7
Radiación producida por el ser humano.	8
TIPOS DE RADIACIÓN.	9
TRANSFERENCIA LINEAL DE ENERGÍA (LET)	9
RADIACIÓN DIRECTAMENTE IONIZANTE	9
Radiación alfa.	9
Interacción de la radiación alfa con la materia.	10
Radiación beta.	10
Interacción de las partículas $\beta$ con la materia.	11
RADIACIÓN INDIRECTAMENTE IONIZANTE.	12
Rayos X.	13
Rayos gamma.	13
INTERACCIÓN DE LA RADIACION ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA.	14
Efecto fotoeléctrico.	14
Efecto Compton.	14
Producción de pares y tripletes.	15

ATENUACIÓN DE LOS RAYOS GAMMA.	16
Coeficiente lineal de atenuación.	16
Coeficiente másico de atenuación.	17
Coeficiente másico de transferencia de energía.	17
Coeficiente másico de absorción de energía.	18
RADIÓLISIS DEL AGUA.	18
DOSIS ABSORBIDA.	20
DOSIMETROS.	21
DOSIMETRO FRICKE.	21
Composición.	21
GAMMACELL 200 (INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES UNAM).	22
<b>CAPÍTULO II. ADN.</b>	26
MOLECULA DE ADN.	26
INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON EL ADN.	30
Rompimiento único de cadena (SSB).	30
Rompimiento doble de cadena (DSB).	30
Complejos ADN-proteína (DPC).	31
<b>CAPÍTULO III. ELUCIÓN ALCALINA.</b>	33
INTRODUCCIÓN AL MÉTODO DE ELUCIÓN ALCALINA DEL ADN.	33
EL PRINCIPIO DE LA ELUCIÓN ALCALINA.	34
IMPLICACIONES DEL PRINCIPIO DE ELUCIÓN ALCALINA.	35
MODELO FÍSICO DEL PASO DE LAS CADENAS DEL ADN A TRAVÉS DE UN	

FILTRO.	39
EL TEJIDO LINFOCITARIO EN LA DOSIMETRIA DE LA RADIACION.	40
<b>CAPÍTULO IV. REPORTE EXPERIMENTAL.</b>	42
HIPÓTESIS.	42
OBJETIVO GENERAL.	42
OBJETIVOS PARTICULARES.	43
MATERIAL.	43
PROCEDIMIENTO.	45
CÁLCULO DE LA RETENCION EN FUNCION DEL TIEMPO	47
DOSIMETRIA DEL GAMMACELL 200 (INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES. UNAM).	49
RESULTADOS.	51
DISCUSIÓN.	61
CONCLUSIONES.	62
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	63

## INTRODUCCIÓN

Todos los organismos vivos estamos continuamente expuestos a diferentes tipos de radiación ionizante. Uno de los efectos más peligrosos de la radiación es el daño que pueda ejercer sobre el ADN, el material genético de los organismos, donde reside la información de todas las proteínas que formarán a la célula para todas sus funciones. Los cambios inducidos en el ADN se conocen como mutaciones y pueden pasar a las siguientes generaciones produciendo defectos tales como malformaciones congénitas, enfermedades genéticas o cáncer.

Para poder predecir los efectos que producirá la radiación ionizante sobre un organismo, es necesario poder estimar la dosis o cantidad de radiación recibida. La dosimetría de la radiación se aplica a modelos dosis-efecto *in vitro*, que cuantifican generalmente el daño inducido al ADN (aberraciones cromosómicas, rompimientos de la hebra) en función de dosis conocidas.

El objetivo de este trabajo es evaluar la técnica de elución alcalina del ADN, para determinar la dosis de radiación ionizante depositada en sangre (particularmente en los glóbulos blancos). En el capítulo I se explica lo que es la radiación ionizante, como se clasifica así como algunos conceptos básicos acerca de su interacción con la materia en general y de su dosimetría, para concluir hablando del Gammacell 200, que fue la fuente de radiación gamma utilizada para el trabajo experimental. En el capítulo II se habla de la molécula de ADN, su estructura básica, la interacción de la radiación con el ADN, así como los daños más comunes que esta molécula puede sufrir. En el capítulo III se explica la técnica de elución alcalina del ADN, así como algunas cuestiones teóricas referentes a esta metodología. Finalmente en el capítulo IV se describen la hipótesis, los objetivos, el reporte



del trabajo experimental realizado con el método de elución alcalina del ADN, la dosimetría del Gammacell 200, para terminar con la discusión de los resultados y las conclusiones.

## CAPÍTULO I. LA RADIACIÓN

### LA RADIACIÓN A LA QUE ESTAMOS EXPUESTOS

Se podría decir que el ser humano está expuesto fundamentalmente a dos tipos de radiación: la radiación de tipo natural y la radiación debida a las actividades humanas.

#### Radiación natural

La radiación natural puede ser externa, cuando la fuente radiactiva proviene de fuera del cuerpo, e interna, cuando el individuo ha inhalado o ingerido la fuente radiactiva.

Entre las fuentes más importantes dentro de la radiación externa, están los rayos cósmicos que provienen principalmente de la actividad que se da en el núcleo de las estrellas y están llegando de manera constante a la Tierra. Dado que esta radiación proviene del espacio, la atmósfera cumple un papel absorbente importante de dicha radiación y por tanto mientras a mayor altura nos encontremos, será mayor la cantidad de este tipo de radiación que recibiremos.

Como detalle cabe mencionar que los viajes en avión aumentan la cantidad de la radiación recibida (proveniente de los rayos cósmicos) de manera importante. Por ejemplo, en un vuelo, que tenga 10 horas de duración a 10 000 metros de altura, ocasiona a los viajeros una dosis adicional de radiación equivalente a la dosis máxima recibida por vivir un año en las cercanías de una planta nuclear.

Dado que existe todo tipo de elementos en el suelo y el aire, y puesto que cierto pequeño porcentaje de ellos es de tipo radiactivo, entonces parte de la radiación que recibimos proviene del suelo y del aire. Como la composición del suelo no es homogénea en toda la

Tierra, la cantidad de este tipo de radiación recibida variará según el lugar donde vivamos; por ejemplo, se ha publicado que en lugares como Italia, Brasil, Francia, la India o Nigeria, este tipo de radiación es relativamente mayor al promedio en el resto del mundo.

Debido a lo anteriormente mencionado, parte de los elementos radiactivos que se encuentran en el ambiente, pudieran ser inhalados con el aire, o ingeridos por medio del agua o los alimentos; en estos casos estaríamos hablando de las fuentes de radiación interna al principio mencionadas. Por ello, hay elementos químicos como por ejemplo el  $^{14}\text{C}$  o el  $^3\text{H}$ , que al estar en ciclos biológicos como el del agua, o del carbono, forman parte del organismo de los seres vivos.

#### **Radiación producida por el ser humano**

La fuente más importante de exposición es la debida a exámenes médicos en donde son utilizados rayos X. En el primer mundo se estima que al año se realizan entre 300 y 900 radiografías por cada 1 000 habitantes, siendo esta cantidad, en el caso de los países del tercer mundo, 10 veces menor. En segundo lugar a las prácticas médicas, se encuentran los ensayos nucleares que se realizaron en el mundo a partir del año de 1945.

A continuación debemos considerar las plantas de energía eléctrica cuya fuente es la energía nuclear, también conocidas como centrales núcleo electricas.

Existen actividades humanas que aunque en principio no parezcan estar relacionadas con radiación, tienen consecuencias en ese sentido; por ejemplo la combustión del carbono libera al aire elementos radiactivos (principalmente uranio y torio), por lo que la presencia de una planta termoeléctrica aumenta en sus alrededores los niveles "normales" de radiación.

## **TIPOS DE RADIACIÓN**

Por el modo en que la radiación ioniza a la materia, ésta se clasifica en dos tipos: radiación directamente ionizante y radiación indirectamente ionizante.

### **TRANSFERENCIA LINEAL DE ENERGÍA (LET)**

Está definida como la cantidad de energía absorbida localmente por unidad de longitud. La unidad usual para LET es keV/ $\mu\text{m}$ . El atributo "localmente" es de especial importancia, ya que sólo se considera la energía que produce ionización y excitación en el sitio de interés, excluyéndose la energía cinética de las partículas que salen de él [Kiefer, 1990].

### **RADIACIÓN DIRECTAMENTE IONIZANTE**

La radiación directamente ionizante son partículas rápidas cargadas, que entregan su energía directamente en la materia, a través de muchas pequeñas interacciones de fuerza coulombiana, a lo largo de la trayectoria de la partícula [Attix, 1986]. Entre éstas se encuentran la radiación alfa y la radiación beta.

#### **Radiación alfa**

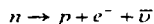
La radiación alfa consiste de partículas compuestas por dos protones y dos neutrones, o dicho de otro modo de núcleos de helio. Por ejemplo el caso del radio 226 del que en un gramo se transforman cada segundo  $3.7 \times 10^{10}$  átomos, en átomos de radón 222 [Bulbulian, 1987].

### **Interacción de la radiación alfa con la materia**

Puesto que las partículas alfa son partículas pesadas cargadas, se mueven relativamente más lentamente y existe mucha mayor probabilidad de interactuar con la materia, en comparación con los electrones de alta velocidad. Por ello, las partículas alfa van dejando, a su paso a través de la materia, "caminos" densamente poblados con iones y moléculas excitadas.

### **Radiación beta**

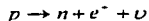
Cuando el núcleo de un átomo tiene un exceso de neutrones, este núcleo puede ser inestable en cuyo caso emitirá electrones, los que provienen de una desintegración de neutrones del núcleo. Una desintegración  $\beta^-$  se puede denotar de la siguiente manera:



representando en la fórmula anterior a "n" el neutrón, "p" un protón, "e<sup>-</sup>" un electrón, y " $\bar{\nu}$ " un antineutrino.

Los electrones y antineutrinos, producto de la reacción, son emitidos hacia fuera del núcleo, mientras que el protón permanece dentro de éste, por lo que el número de nucleones, o número de masa "A" dentro del átomo permanece constante a pesar de la reacción, ya que el protón sustituye al neutrón. Sin embargo, dado que el neutrón no tiene carga, y el protón es una partícula cargada, el número atómico "Z" aumenta en 1, debido a la carga adicional dada por el nuevo protón.

De manera análoga ocurre la reacción de emisión de  $\beta^+$ , en este caso ocurre en átomos cuyos núcleos tienen un exceso de protones. La reacción es muy similar a la  $\beta^-$ , sólo que en vez de desintegrarse un neutrón quien se desintegra es un protón, de acuerdo con la siguiente reacción:



En este caso " $e^+$ " denota a un positrón y " $\nu$ " a un neutrino

De nuevo, el número de masa " $A$ ", se conserva; sin embargo, como el protón es una partícula cargada y el neutrón no, por lo tanto el número atómico " $Z$ " disminuye en uno.

Cabe hacer notar que al darse estas reacciones dentro del núcleo éste queda generalmente con un exceso de energía, así que antes de llegar a un estado base emite radiación gamma.

De este modo en los elementos radiactivos que emiten radiación beta (y en algunos decaimientos alfa), ésta viene generalmente seguida de una emisión gamma.

### **Interacción de las partículas $\beta$ con la materia**

Los electrones, debido a su carga, sufren tres tipos principales de interacción al atravesar un medio electromagnético:

a) Colisiones inelásticas con electrones atómicos. Son el mecanismo predominante por el cual una partícula beta rápida pierde energía cinética en un medio absorbente. Como resultado de estas colisiones, uno o más electrones atómicos experimentan una transición a un estado excitado (excitación) o a un estado no ligado (ionización).

b) Colisiones elásticas con el núcleo y electrones atómicos. El electrón incidente es desviado sin radiar y sólo pierde la energía cinética necesaria para conservar el momento lineal.

c) Colisiones inelásticas con el núcleo atómico. En este caso el electrón es desviado y se emite un fotón (radiación de frenado), y las partículas participantes pierden una cantidad de energía cinética equivalente a la del fotón emitido. El tipo de interacción que predomine dependerá de la energía de los electrones.

Los electrones, a diferencia de las partículas pesadas, no tienen trayectorias rectas y bien definidas, sino zigzagueantes. Esto es, la trayectoria de cada electrón es azarosa, lo mismo que la longitud total de dicha trayectoria. Las variaciones que existen en la longitud se deben a que los electrones van chocando con electrones orbitales del material, y no se frenan hasta ceder toda su energía. [García, 1995]

## **RADIACIÓN INDIRECTAMENTE IONIZANTE**

La radiación indirectamente ionizante está constituida por los rayos X, rayos gamma o por neutrones, que a su paso a través de la materia primero transfieren su energía a partículas cargadas en unas pocas interacciones. El resultado son partículas cargadas rápidas que depositan su energía en la forma descrita por la radiación directamente ionizante [Attix, 1986].

Cabe mencionar que la diferencia entre los rayos X y los rayos gamma es tan solo el origen de cada uno de ellos. Sin embargo en ambos casos se trata de radiación electromagnética.

## **Rayos X**

Son producidos al frenar súbitamente partículas cargadas rápidas tales como electrones, que entonces liberan su energía en forma de rayos X. a este tipo de radiación se le denomina rayos X de frenado. Otra fuente de radiación son electrones excitados dentro del átomo que al bajar a una órbita más estable también liberan su energía en forma de rayos X. a estos últimos se les conoce como rayos X característicos; y puesto que los saltos electrónicos están cuantizados, los fotones o rayos X producidos por este mecanismo, como su nombre indica, tienen una longitud de onda característica; en cambio cuando un electrón es frenado, la cantidad de energía cinética perdida puede ser muy variable, por lo que los fotones que constituyen los rayos X de frenado tienen longitudes de onda dentro de todo un intervalo continuo.

## **Rayos gamma**

Los rayos gamma son producidos en procesos radiactivos, generalmente acompañando procesos de emisión de decaimientos alfa o beta. En estos procesos muchas veces los núcleos atómicos quedan con un exceso de energía que es liberado en forma de radiación electromagnética conocida como radiación gamma. También al aniquilarse una partícula con su antipartícula, por ejemplo un positrón con un electrón, éstos transforman su masa en energía en forma de radiación electromagnética que es clasificada también como radiación gamma.



## **INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA CON LA MATERIA**

Hay tres formas fundamentales de interacción de la radiación electromagnética con la materia:

### **Efecto fotoeléctrico**

Los fotones de baja energía que interactúan con la materia predominantemente lo hacen en la interacción conocida como efecto fotoeléctrico. En este tipo de interacción el fotón cede completamente su energía a los electrones. Para "sacar" a los electrones del átomo, es necesario primero romper la ligadura de los electrones al átomo, para lo cual se requiere de cierta cantidad de energía, llamada energía de amarre. Entonces primero el fotón cede energía al electrón para romper la energía de amarre y la energía restante del fotón queda en el electrón en forma de energía cinética.

### **Efecto Compton**

El efecto Compton se observa en energías del fotón incidente más altas que en el efecto fotoeléctrico (en el efecto fotoeléctrico las energías son del orden de keV, mientras que en el efecto Compton se habla de energías del orden de MeV). Es muy similar al efecto fotoeléctrico, con la diferencia de que en el fotoeléctrico sólo hay un electrón como remanente de la interacción, mientras que en el caso del efecto Compton, tenemos además de un electrón, a un fotón remanente de la interacción y en este caso el electrón no absorbe completamente la energía del fotón después de romper el amarre con el átomo (la energía de amarre en el efecto Compton, es mucho menor comparada con la del fotón incidente).

sino que sólo absorbe parte de la energía de éste. De la energía restante se forma otro fotón. así al inicio de la interacción tenemos un fotón, y al final tenemos un electrón y otro fotón con la energía del fotón inicial, menos la energía de amarre del electrón (aunque esta energía de amarre generalmente es despreciada) y la energía cinética que quedó en el electrón. Este efecto es el más importante en sistemas biológicos, para fotones que tengan la energía de los utilizados en nuestros experimentos (Ver Gammacell 200), los cuales serán descritos posteriormente, ya que en esos casos se da muy frecuentemente en átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.

Es importante mencionar que en el efecto fotoeléctrico la energía de amarre del electrón al átomo es muy importante para el análisis matemático; pero en el caso del efecto Compton esta energía de amarre generalmente se desprecia y se maneja la interacción del fotón como si fuera con un electrón libre, ignorando su ligadura con el núcleo atómico [Atix, 1986].

### **Producción de pares y tripletes**

La producción de pares implica la completa absorción de la energía de un fotón en el campo eléctrico de un núcleo atómico. entonces se forman dos partículas, un electrón y un positrón. Para que este proceso sea posible, es indispensable que el foton tenga al menos la energía equivalente a la masa de las partículas que resultan de este proceso, es decir, el electrón y el positrón (ambos tienen la misma masa). Por tanto se requiere de al menos el doble de la masa del electrón en reposo, es decir, la producción de pares no puede ocurrir para fotones que tengan menos energía de 1.02 MeV, que es dos veces la masa del electrón

en unidades de energía [Spinks, 1990]. La energía excedente del fotón de estos 1.02 MeV se reparte entre el positrón y el electrón en forma de energía cinética.

A veces los fotones de alta energía, interaccionan con el campo eléctrico de los electrones del átomo, y además de sacar a un electrón de su órbita, también de manera análoga a la anterior, se forma un par electrón-positrón. De este modo se obtienen tres partículas cargadas conocidas en este caso como tripletes. La formación de tripletes es mucho menos probable que la producción de pares.

## ATENUACIÓN DE LOS RAYOS GAMMA

### Coefficiente lineal de atenuación

Un fotón puede interaccionar con la materia a través de cualquiera de las maneras mencionadas anteriormente (producción de pares y tripletes, y efectos Compton y fotoeléctrico). Si esto ocurre, el fotón desaparece del haz original incidente. Debido a esto, la radiación electromagnética sufre a lo largo de su trayectoria en un medio, una atenuación de intensidad y no un cambio de energía. La intensidad (número de fotones por  $\text{cm}^2\text{s}$ ) de un haz monoenergético de fotones, cuya intensidad original es " $I_0$ ", después de atravesar un grosor " $x$ " es [Attix, 1986]:

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

Donde " $\mu$ " es el coeficiente lineal de atenuación para fotones de la energía en consideración, que atraviesan un material dado. El coeficiente lineal de atenuación representa una probabilidad de interacción de los fotones en el medio de interés.

El coeficiente lineal de atenuación puede ser determinado experimentalmente para un material dado interponiendo distintos espesores del material entre la fuente de radiación y un detector [Attix, 1986].

#### **Coeficiente másico de atenuación**

El coeficiente másico de atenuación ( $\mu/\rho$ ) está definido para la interacción de radiación indirectamente ionizante con un material determinado. Si "N" es el número de partículas incidentes sobre una capa de grosor "dl" y densidad "ρ" y "dN" es el número de partículas que sufren alguna interacción dentro de la capa, entonces el coeficiente másico de atenuación puede expresarse como:

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{1}{\rho N} \frac{dN}{dl}$$

#### **Coeficiente másico de transferencia de energía**

El coeficiente másico de transferencia de energía ( $\mu_{tr}/\rho$ ) está definido para un material determinado con el que interacciona la radiación indirectamente ionizante. Si "E" es la suma de energías (excluyendo las energías en reposo) de las partículas indirectamente ionizantes que inciden normalmente sobre una capa de grosor "dl" y densidad "ρ" y "dE<sub>tr</sub>" es la suma de las energías cinéticas de todas las partículas cargadas liberadas en esta capa, entonces éste coeficiente está definido como:

$$\frac{\mu_{ir}}{\rho} = \frac{1}{\rho} \frac{dE_{ir}}{dl}$$

### Coefficiente másico de absorción de energía

El coeficiente másico de absorción de energía ( $\mu_{en}/\rho$ ) está definido para un material determinado con el que interaccionan partículas indirectamente ionizantes.  $(\mu_{ir}/\rho)(1-G)$ , donde "G" es la proporción de la energía de partículas cargadas secundarias que se pierde como radiación de frenado (bremsstrahlung) en el material.

$$\frac{\mu_{en}}{\rho} = \frac{\mu_{ir}}{\rho} (1-G)$$

### RADIÓLISIS DEL AGUA

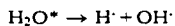
La radiólisis del agua es el estudio de la interacción de la radiación con el agua, y su importancia radica en que el agua es el disolvente universal de una inmensa cantidad de sustancias, que se irradian en solución. Los sistemas biológicos están constituidos en su mayor parte por agua (aproximadamente en un 70%). Gran cantidad de los cambios en el soluto disuelto en agua se debe al efecto indirecto del ataque de los productos de la descomposición radiolítica del agua. Dichos productos  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $e^-$  (productos radicales) y  $H_2O_2$ ,  $H_2$  (productos moleculares), reaccionan con el soluto y producen los cambios químicos observados (el producto molecular de la radiólisis del agua,  $H_2$ , normalmente tiene un papel muy pequeño en las subsecuentes reacciones químicas) [Spinks, 1990].

Cuando se irradian soluciones acuosas diluidas con radiaciones de baja LET, como gammas de  $^{60}Co$  o electrones rápidos, prácticamente toda la energía de la radiación absorbida se deposita en moléculas del agua y los cambios producidos en las soluciones son el resultado

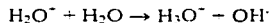
de la acción indirecta de los productos de la radiólisis del agua. La acción directa de la radiación generalmente no es importante en soluciones cuya concentración sea menor a alrededor de 100 mol/m<sup>3</sup> [Spinks, 1990]. A concentraciones superiores la acción directa puede ser significativa y hay evidencia de que a grandes concentraciones de los solutos puede haber reacción directa con los productos iniciales en que la radiación depositó su energía [Spinks, 1990]. Durante la radiólisis de soluciones acuosas diluidas, la mayor parte de la energía es absorbida por el agua para producir ionizaciones y excitaciones:



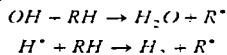
donde e<sup>-</sup> representa un electrón y H<sub>2</sub>O\* una molécula de agua en estado excitado. Estas moléculas sufren un fisión homolítica para producir átomos de hidrógeno (radicales hidrógeno) y radicales hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 2000).



Al mismo tiempo H<sub>2</sub>O<sup>-</sup> reacciona dando:



La interacción de alguno de estos radicales libres con una molécula biológica, que denotaremos por "RH", resulta en la formación de un radical libre orgánico y en la estabilización del radical inicial [Lorris, 1994]:



El radical R<sup>·</sup> Puede seguir interaccionando y ocasionando más daño químico.

## DOSIS ABSORBIDA

Es la cantidad de energía suministrada a un sistema debido a radiación ionizante, entre la cantidad de masa del sistema.

Desde el punto de vista formal, si el sistema no es homogéneo o tampoco lo es la radiación suministrada, conviene definir la **dosis absorbida** (D), como el cociente entre  $d\epsilon$  y  $dm$ , donde  $d\epsilon$  es el valor medio de la energía impartida por la radiación ionizante a una masa "dm" de materia en un elemento de volumen.

$$D = \frac{d\epsilon}{dm}$$

La unidad tradicional de dosis fue el rad, actualmente en el sistema internacional se usa el Gy:

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg} = 100 \text{ rad} = 100 \text{ cGy}$$

Ahora bien la fuente puede suministrar la energía en diferentes lapsos de tiempo, en un tiempo muy corto o muy largo. Es por ello que conviene saber qué tanta dosis está recibiendo el sistema por unidad de tiempo, y así se define la *tasa de dosis* " $\dot{D}$ ", en un punto determinado, y en un tiempo "t" como:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt}$$

## **DOSÍMETROS**

Un dosímetro es cualquier dispositivo o sistema que nos permita obtener la dosis o tasa de dosis de un campo de radiación ionizante.

Hay dos tipos de dosímetros: primarios y secundarios. Los dosímetros primarios miden el cambio de una propiedad física cuando son expuestos a la radiación. Los secundarios requieren de un dosímetro primario para su calibración, generalmente miden una propiedad química.

### **DOSÍMETRO FRICKE**

El dosímetro Fricke es un dosímetro integrador, es decir, al ser irradiado en un campo de radiación ionizante se puede determinar la dosis depositada en éste debido a la radiación. Se trata de un dosímetro químico porque la radiación produce cambios químicos y a partir de estos cambios se determina la dosis absorbida.

#### **Composición**

El dosímetro Fricke es una solución compuesta de 0.001 M de  $\text{FeSO}_4$  o de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ , 0.8 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 0.005 M  $\text{NaCl}$  preparada con agentes de alta pureza y agua tridestilada. La solución de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) gradualmente se oxida convirtiéndose en sulfato férrico [ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ] al paso del tiempo. Este proceso puede ser atenuado si se almacena en oscuridad y en refrigeración [Attix, 1986].

Al ser irradiada la solución Fricke, se estimula la producción de  $\text{Fe}^{3+}$  y por tanto se acelera el cambio de sulfato ferroso a sulfato férrico. Ello genera un cambio en la densidad óptica



de la solución, por lo que generalmente se utiliza un espectrofotómetro para medir este cambio de densidad óptica, recomendándose medir a una longitud de onda de 304 nm.

Primero se hace una medición del "fondo", es decir, la densidad óptica promedio de la solución sin irradiar. Después se miden las muestras irradiadas, la diferencia entre la densidad óptica de una muestra irradiada y el "fondo", es el cambio de densidad óptica de la solución debido a la radiación  $\Delta(\text{DO})$ . A 25°C, y habiendo usado como recipiente, para contener la solución al hacer la medición, celdas de 1cm de longitud de camino óptico para el espectrofotómetro, entonces la dosis absorbida por la solución es (en unidades Gy):

$$D = 278 \Delta(\text{DO}) \text{ Gy}$$

### **GAMMACELL 200 (INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES, UNAM)**

El irradiador Gammacell 200 es una fuente de rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$ . El 99% del  $^{60}\text{Co}$  emite al decaer partículas  $\beta$ , que cuentan con una energía máxima de 0.31 MeV, y energía promedio de 0.094 MeV; y decae en  $^{60}\text{Ni}$ , en estado excitado de 2.5 MeV, que para lograr llegar a su estado estable emite dos rayos  $\gamma$  consecutivos, de 1.17 MeV y 1.33 MeV, para el primero y segundo respectivamente [García, 1995].

La **tabla 1** muestra algunas características del  $^{60}\text{Co}$ .

**Tabla 1 [Shapiro, 1990] Algunas características del  $^{60}\text{Co}$**

Vida media (años)	5.3
Energía $\beta$ máxima (MeV)	0.31
Energía $\beta$ promedio (MeV)	0.094
Energía $\gamma$ (MeV)	1.17(100%) 1.33(100%)
Capa hemirreductora (para $\gamma$ )	
Plomo (cm)	1.1
Agua(cm)	11
Tasa de dosis de 100 fotones por $\text{cm}^2\text{s}$ ( $\mu\text{Gy/hr}$ )	0.45

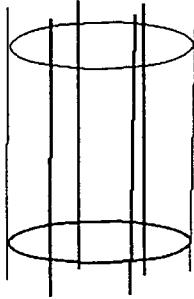
El  $^{60}\text{Co}$  se ubica dentro de un blindaje de plomo. Esta capa es suficiente para detener las partículas  $\beta$ . Los rayos  $\gamma$  también son atenuados, pero de manera exponencial (Ver parte anterior "coeficiente lineal de atenuación"). por lo que aunque los rayos gamma son atenuados, parte de esta radiación alcanza a traspasar el blindaje.

En un émbolo de acero inoxidable está localizada la cavidad para la irradiación: éste sube y baja por medio de un motor eléctrico, hasta la posición de la fuente. La cavidad es un cilindro de 8.8 cm de diámetro y 14 cm de altura. Las muestras que se deseen irradiar se colocan en este cilindro y son llevadas hasta la fuente, por el motor, para recibir la radiación  $\gamma$ , permaneciendo allí el tiempo deseado.

A las fuentes que están dentro del Gammacell 200 se les denomina lápices, por la forma similar a dicho instrumento de escritura. son de forma cilíndrica tienen una altura de 17.97 cm; cada lápiz contiene cinco pequeñas barras de  $^{60}\text{Co}$  encapsuladas individualmente con acero inoxidable y soldadas al lápiz [García, 1979]. En el Gammacell 200, 24 lápices están dentro del blindaje en una estructura cilíndrica concéntrica al cilindro que conforma la cavidad para la irradiación antes descrita, esta estructura de las fuentes se muestra en la figura # 1. aunque por simplicidad y no hacer confusa la figura dicha figura solo muestra 6 lápices la estructura es similar pero con 24 lápices.

**Figura 1**

**Estructura de las fuentes dentro del gammacell 200**

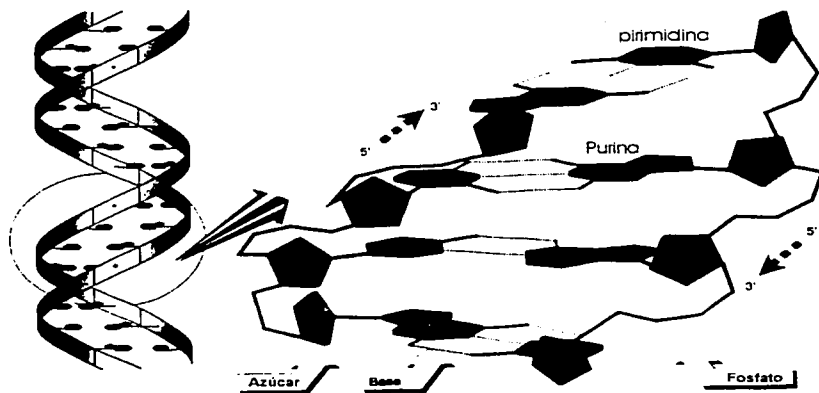


## CAPÍTULO II. ADN

### MOLÉCULA DE ADN

El ADN es una macromolécula con una estructura que recuerda la de una "escalera torcida" o de "doble hélice" (ver figura 2).

Figura 2. Molécula de ADN



Cada "escalón" está compuesto de bases nitrogenadas, que son 4 tipos de moléculas planas distintas: citocina, adenina, guanina y timina. Estas 4 bases se agrupan en pirimidinas (citocina y timina), que poseen un anillo heterocíclico de 6 miembros; mientras que a la

adenina y la guanina se les conoce como **purinas**, consisten en dos anillos heterocíclicos uno de 5 y otro de 6 miembros (**ver figura 2**).

Cada uno de estos "escalones" tiene en cada extremo un azúcar llamado desoxirribosa, y se van uniendo entre sí (para ir formando los lados de la escalera) mediante un grupo fosfato. Al conjunto que forma una base, su azúcar y uno o más fosfatos, se le llama nucleótido [Meza y Frixione, 1996].

El ADN de un virus tiene alrededor de 5000 pares de bases, mientras que el ADN humano 4500 millones [Meza y Frixione, 1996].

En contraste con otras moléculas como las enzimas o proteínas, cuyos componentes básicos son los aminoácidos y cuyo orden es determinante en la estructura y propiedades de la molécula, en el caso de la molécula de ADN, el orden o el número de cada una de las bases no influye en sus características o estructura general.

Las tres nociones que convergieron en la construcción del modelo de doble hélice las dieron Watson y Crick en 1953 [Lewin, 1997]:

- I) Los datos de difracción de rayos X muestran que la molécula de ADN tiene la forma de una hélice regular (hélice  $\alpha$ ) dando una vuelta completa en el sentido de las agujas del reloj cada 3.4 nm, con un diámetro de aproximadamente 2 nm. Puesto que la distancia entre nucleótidos adyacentes es 0.34 nm debe de haber entonces 10 nucleótidos por vuelta.
- II) La densidad del ADN sugiere que la hélice debe de contener dos cadenas de polinucleótidos. El diámetro constante de la molécula de ADN puede ser explicado si las bases en cada cadena "miran" hacia adentro de la doble cadena y están restringidas de tal modo que una purina es siempre opuesta a una pirimidina.

evadiendo pares purina-purina (demasiado grueso), o pirimidina-pirimidina (demasiado delgado). A esto se le llama complementaridad.

III) Independientemente de la cantidad de cada base presente, en la molécula de ADN la proporción de guanina es la misma que la de citosina, y del mismo modo la proporción de adenina es la misma que la de timina. La composición de cualquier ADN puede describirse por la proporción de sus bases citosina-guanina, con intervalos del 24% al 74 % para diferentes especies.

Actualmente se sabe que, en donde hay una citosina, siempre hay en su lado opuesto una guanina, y a su vez siempre de lado contrario de una adenina hay una timina.

En los organismos eucariontes, llamados así porque sus células contienen un núcleo, el ADN no está en el citoplasma, como en las bacterias, sino dentro del núcleo el cual a su vez está contenido dentro de la célula y por consiguiente es más pequeño. En este caso la molécula de ADN, cuya longitud es mayor que el ADN de las bacterias, tiene que compactarse muchísimo y esto se logra enredándose sobre otras moléculas, que son las proteínas llamadas histonas. Se forma así la unidad básica conocida como cromosomas. [Meza y Frixione, 1996].

Extendida la molécula de ADN (desenrollándola de las histonas y haciéndola lineal) se calcula que, puestas en fila, las moléculas de ADN de los 46 cromosomas de una sola célula humana miden aproximadamente un metro. Si se alinean las moléculas, de todas las células ( $10^{18}$ ) que contiene un solo ser humano, se cubriría el diámetro de sistema solar [Robert, 1981]. Por lo mismo resulta sumamente conveniente para los seres "empaquetar" o compactar el ADN de la mejor manera posible, para contener sus largas dimensiones. Los enlaces que se forman al unirse en el centro de la molécula dos bases, son puentes de

*Hidrógenos. Estos son relativamente fuertes, con respecto a los que forman las cadenas de desoxirribosa son los enlaces que se determinan enlaces insuficientemente los enlaces de los enlaces de la cadena de la desoxirribosa son fuertes y estables, en tanto que los enlaces entre las bases por lo que en principio podemos fácilmente dividir la molécula de ADN en las "secciones" por los enlaces. Sin embargo, que se divide tan fácilmente ya que aunque los enlaces son débiles, si por la cadena de ADN tan larga, poseer tantas bases, los enlaces aunque débiles son numerosos, y entonces le proporcionan gran estabilidad a la molécula y a su estructura en general. La estabilidad de la molécula depende tanto por la cantidad relativa de los enlaces por puente de hidrógeno, resulta en parte estabilizada para los puentes de hidrógeno que esto facilita el que ciertas enzimas puedan separar la molécula por la mitad de manera similar a una cremallera. Esto sucede generalmente en los procesos de replicación (mecanismo por el cual un ácido nucleico se copia a sí mismo, originando otro ácido con la misma secuencia de bases), (Salvat 1974).*

*Sin embargo, a pesar de que a grandes rasgos la molécula de ADN es estable, el metabolismo celular provoca la oxidación y pérdida de bases; por ejemplo, las purinas se pierden en condiciones fisiológicas, a una tasa de 10 000 por célula por día [Lindahl, 1979]. Por tanto para la supervivencia de las células y de los organismos, la célula cuenta con mecanismos de reparación que tienen la capacidad de revertir el daño que se produce en condiciones fisiológicas, por lo menos a la misma tasa o mayor (en caso de que por alguna razón el ADN sufra un daño mayor).*

*En condiciones experimentales es posible separar las hebras de la molécula de ADN, al romper los puentes hidrógeno entre las bases, dividiendo de este modo a la molécula de ADN en dos, a este proceso se le llama desnaturalización. Ello se logra generalmente por*



dos vías, aumentando la temperatura (cerca de los 100° C), o bien aumentando el pH del medio (arriba de 12 es suficiente para romper los enlaces de puente de hidrógeno de entre las bases) [Kohn, 1991]. La desnaturalización es un proceso reversible ya que al descender la temperatura o el pH (dependiendo de cuál haya sido el proceso que se siguió para la desnaturalización), el ADN tiende a unirse de nuevo y recobrar su estructura original. A este último proceso se le llama renaturalización.

### **INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON EL ADN**

Aunque hay muchos tipos de interacción, en el caso particular que a este trabajo ocupa, se mencionarán tres tipos.

#### **Rompimiento único de cadena (SSB)**

SSB es una abreviatura del inglés *single strand break* (rompimiento único de cadena). Éstos se originan cuando la radiación ionizante rompe los enlaces fosfodiéster, que como ya se mencionó, unen a la desoxirribosa (los lados de la "escalera" del ADN). El ADN entonces al ser desnaturalizado, va ser partido en dos por cada SSB que haya sido inducido.

#### **Rompimiento doble de cadena (DSB)**

DSB es una abreviatura del inglés *double strand break* (rompimiento doble de cadena). Éste puede verse como si fueran dos SSB, pero muy juntos uno respecto al otro y cada uno en un lado opuesto de la cadena de desoxirribosa (ver figura 2). De este modo lo que ocurre es que la molécula de ADN se divide en dos por cada DSB, pero a diferencia de la desnaturalización donde se corta a la molécula por las bases, en este caso se le corta por la

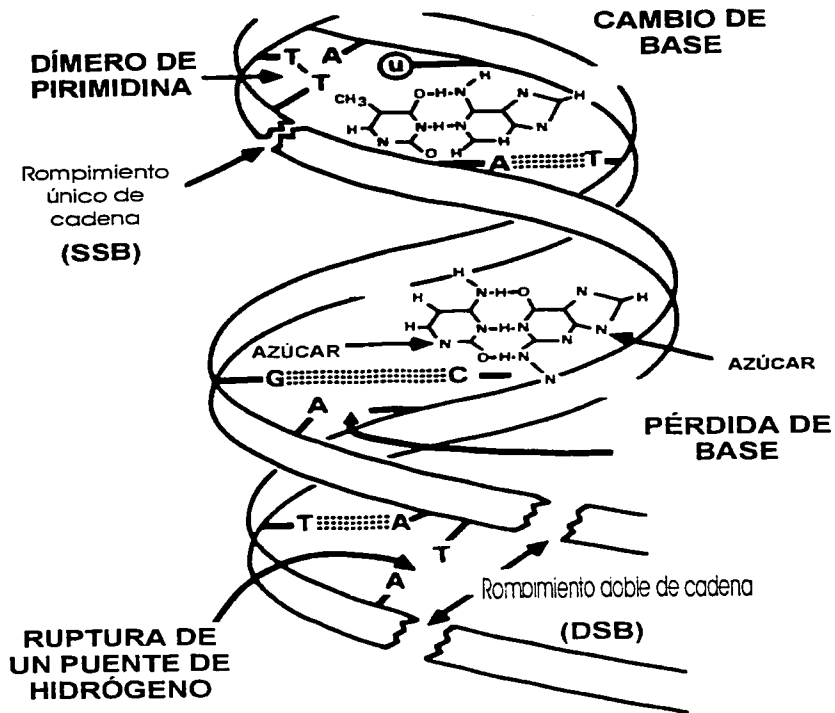
doble cadena de desoxirribosa. Al ser desnaturalizado el ADN, cada DSB puede considerarse como dos SSB.

### **Complejos ADN-proteína (DPC)**

DPC es una abreviatura del inglés *DNA protein complex* (complejos ADN-proteínas). Estos son un producto indirecto de la radiación ionizante. Ya que la radiación afecta, en este caso primero a las proteínas, éstas quedan afectadas por la radiación, y pueden reaccionar con el ADN, "pegándose" a éste, formándose los mencionados complejos ADN proteína o DPC.

La **figura 3** muestra algunos de los daños posibles a la molécula de ADN.

Figura 3. Diversos daños posibles a la molécula de ADN



### **CAPÍTULO III. ELUCIÓN ALCALINA**

#### **INTRODUCCIÓN AL MÉTODO DE ELUCIÓN ALCALINA DEL ADN**

La elución alcalina del ADN a través de un filtro se desarrolló por la observación de que la tasa de elución de trozos del ADN desnaturalizado por un pH alcalino, depende del tamaño de los trozos de la cadena de ADN [Kohn y Ewig, 1973]. Las células se colocan sobre un filtro y son lisadas (es decir se destruye su membrana celular) mediante una sustancia que contenga detergente. Esta solución se deja fluir arrastrando consigo la mayor parte de las proteínas y RNA contenidos en las células, pero la mayor parte del ADN contenido en la cromatina celular permanece en el filtro. Hasta este momento todo el método consiste en aislar el ADN celular de la mayor parte del contenido de la célula. El tamaño de las moléculas de ADN obtenidas puede ser del orden de 10000 pares de kilobases, mucho más largas que en cualquier otro método para aislar el ADN celular. Un filtro de 25 mm de diámetro tiene la capacidad de aislar de 1 a 4 millones de células, dependiendo del tipo de células de que se trate. Los resultados del ensayo son generalmente independientes del número de células hasta el punto en que el filtro sea ocluido [Kohn, 1991]. Un disolvente de elución entonces se bombea lentamente por el filtro y la tasa de elución de ADN se determinó, en nuestro caso, por fluorometría.

El disolvente de elución consiste en una base o solución amortiguadora ajustado al pH adecuado. En los ensayos de elución alcalina el pH debe de ser lo suficientemente alto

como para romper todos los enlaces de hidrógeno y desnaturalizar el ADN. Esto se logra arriba de un pH de 12 [Kohn, 1991]. En nuestro caso se usó un pH de 12.6.

### **EL PRINCIPIO DE LA ELUCIÓN ALCALINA**

Los ensayos de elución alcalina tienen su origen en estudios de células irradiadas con rayos X o rayos gamma, para producir esencialmente una distribución aleatoria de SSB [Kohn, 1976]. Una notoria propiedad de la elución alcalina de ADN es que, bajo condiciones experimentales apropiadas, con una desprotección apropiada y un pH lo suficientemente alto como para garantizar una desnaturalización completa, la elución de la molécula de ADN con SSB distribuidos al azar, lleva casi a una cinética de primer orden. En otras palabras, se ha encontrado que la fracción "r", de ADN remanente en el filtro (retención), después de "t" minutos puede aproximarse a:

$$\log_{10}(r) = -Kt \dots\dots\dots(1)$$

Esto nos dice que el logaritmo de la retención del ADN "r" en función del tiempo de elución "t", es casi lineal. Más aún, los experimentos muestran que la pendiente "K", es proporcional a la dosis de radiación o a la frecuencia de SSB [Kohn, 1991]. Esto es importante para poder estimar de una manera cuantitativa la dosis recibida por las células, especialmente en el manejo de accidentes radiactivos.

Experimentalmente se pudo demostrar que la pendiente "K", de elución es proporcional a la dosis de radiación o equivalente a la frecuencia de SSB distribuidos al azar en la cadena de ADN [Kohn, 1981]:

$$-K = \kappa p$$

Donde "p" es la frecuencia de SSB, y "κ" es una constante de proporcionalidad. Entonces:

$$\log_{10}(r) = -\kappa p l \dots\dots\dots(2)$$

"p" es también la probabilidad de que exista un SSB en una unidad dada de nucleótidos en una cadena sencilla de ADN. Se supone que la probabilidad de que ocurra un SSB es esencialmente la misma a lo largo de la cadena de ADN en las células irradiadas.

### IMPLICACIONES DEL PRINCIPIO DE ELUCIÓN ALCALINA

Podemos hacer las siguientes aseveraciones que tienen una base experimental [Kohn, 1991]:

1. Las cadenas celulares del ADN, una vez desnaturalizadas en el filtro, se comportan independientemente (no interfieren entre sí), y se adsorben al material del filtro.
2. La probabilidad de que una cadena dada fluya a través del filtro, en un momento dado (bajo condiciones experimentales fijas), depende solamente de la longitud de la cadena.
3. Los SSB inducidos por la radiación están esencialmente distribuidos al azar, y la frecuencia de rompimiento es proporcional a la dosis de radiación.
4. La elución alcalina del ADN después de la exposición de las células a la radiación ionizante, obedece inicialmente a una cinética exponencial y la aparente constante de tasa de primer orden es proporcional a la dosis de radiación (ecuación 2).

Las aseveraciones 1 y 2 implican la existencia de una función "E(n,t)" que define la probabilidad de que una cadena sencilla de ADN de una longitud "n" de nucleótidos, fluya por el filtro al tiempo "t".

Sea "w(n)" la distribución de la masa del ADN, como una función de la longitud de la cadena; entonces "w(n)" es la probabilidad de que un nucleótido, escogido al azar en el ADN celular, esté localizado en una cadena de una longitud de "n" nucleótidos. La tasa de elución (masa de ADN por unidad de tiempo) es entonces:

$$-\frac{dr(t)}{dt} = \int w(n)E(n,t)dn \dots\dots\dots(3)$$

Donde "r(t)" es la fracción del ADN remanente en el filtro al tiempo "t".

Por la aseveración 3 los rompimientos inducidos por la radiación están esencialmente distribuidos al azar en el ADN. La distribución de masa de ADN está entonces dada por:

$$w(n) = b^2 ne^{-bn} \dots\dots\dots(4)$$

Donde "b" es la frecuencia de rompimiento (por unidad de longitud de la cadena). Ésta es una fórmula deducida de la siguiente manera: Como ya se mencionó "w(n)" es la probabilidad de que un nucleótido, escogido al azar en el ADN celular, esté localizado en una cadena de una longitud de "n" nucleótidos. Una manera en que puede ocurrir que un nucleótido determinado se encuentre en una cadena de "n" nucleótidos, es que si un nucleótido dado es el primero en un segmento de longitud "n", requeriría primero de un rompimiento de un enlace de fosfodiéster justamente precediendo en un nucleótido dado (probabilidad igual a "b"); segundo, de la ausencia de rompimientos en los siguientes n-1 enlaces de fosfodiéster (donde la probabilidad es igual a (1-b)<sup>(n-1)</sup> que para una "n" grande y una "b" pequeña se aproxima a e<sup>-bn</sup>) y tercero, de una ruptura después del "n"-simo

nucleótido (probabilidad = b). La unión de los tres eventos y considerando que el nucleótido puede estar en la primera, segunda.... "n"-ésima posición (por lo que debemos de aplicar un factor n), nos lleva a la ecuación (3).

Las aseveraciones 3 y 4 son equivalentes a la fórmula:

$$\ln[r(t)] = -kbt \dots\dots\dots(5)$$

Que no es más que otra manera de escribir la ecuación (2); "k" es la constante de elución .

Derivando la ecuación (5) respecto al tiempo obtenemos la tasa de elución:

$$-\frac{dr(t)}{dt} = kbe^{-kt} \dots\dots\dots(6)$$

De este modo combinando las ecuaciones (3), (4) y (6) llegamos a la siguiente ecuación:

$$\int b^2 n e^{-bn} E(n,t) dn = kbe^{-kt}$$

Esto último puede ser rescrito como:

$$\int \left(\frac{n}{k}\right) E(n,t) e^{-bn} dn = \frac{e^{-kt}}{b}$$

Que es la transformada de Laplace de una función escalón, y E(n,t) vendría dada entonces como:

$$\begin{cases} E(n,t) = 0 \dots\dots \forall n < kt \\ E(n,t) = \frac{k}{n} \dots\dots \forall n > kt \end{cases} \dots\dots\dots(7)$$

O de modo equivalente:

$$\begin{cases} E(n,t) = \frac{k}{n} \dots\dots \forall t < \frac{n}{k} \\ E(n,t) = 0 \dots\dots \forall t > \frac{n}{k} \end{cases} \dots\dots\dots(7')$$



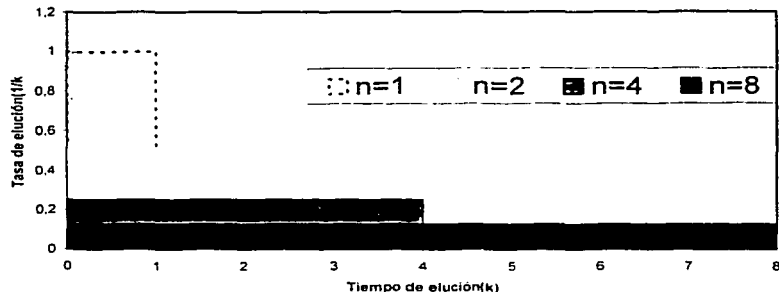
$E(n,t)$ , es la tasa de elución del ADN como función del tiempo  $t$ , para una población de todas las cadenas de una longitud " $n$ ", y está dada por una función escalón (ver gráfica 1).

Para una longitud " $n$ ". constante, el área bajo la curva es:

$$\int E(n,t) dt = \left(\frac{k}{n}\right) \left(\frac{n}{k}\right) = 1$$

Como es de esperarse cada segmento eventualmente fluirá por el filtro, por lo que el resultado de la integral es uno.

**Gráfica1(cinética de elución)**



Para el caso de una distribución de tamaño conocido de cadena sencilla,  $w(n)$ , la tasa de elución sería predicha por las ecuaciones (3) y (7):

$$-\frac{dr(t)}{dt} = k \int_1^{\infty} \frac{w(n)}{n} dn$$

La principal conclusión de este ejercicio es la descrita en las ecuaciones (7) o (7'), y es una consecuencia lógica de las cuatro aseveraciones mencionadas. La ecuación (7) describe el comportamiento de la elución de una población homogénea de cadenas sencillas de ADN

de longitud constante "n". Esto establece que la probabilidad es constante (igual a  $k/n$ ), desde el principio de la elución hasta un tiempo crítico,  $t_c = n/k$ , tiempo en el cual la probabilidad de elución de pronto cae a un valor igual a cero y permanece así para tiempos mayores. Para el tiempo crítico " $t_c$ ", todas las cadenas de longitud "n" deberán haber eluido. La elución comienza a una tasa ( $k/n$ ) que es inversamente proporcional al largo de la cadena, y continúa a esta tasa por un tiempo " $t_c$ ", que es proporcional al largo de la cadena (ver gráfica 1).

Lo deducido del comportamiento de la elución en principio parecería confuso, porque implica que sería probable que aún las cadenas largas fluyan inmediatamente después de que el solvente de elución comience a pasar por el filtro, y continuará así en cualquier tiempo posterior, hasta un tiempo crítico " $t_c$ ", que puede ser grande. Este comportamiento sugiere que el tiempo en que una cadena dada pasará a través del filtro, ya está determinado en el momento en que el solvente de elución comienza a fluir por el filtro. El tiempo en que la cadena fluirá podría estar determinado por la configuración inicial que la cadena tenga con respecto a los poros del filtro

## **MODELO FÍSICO DEL PASO DE LAS CADENAS DEL ADN A TRAVÉS DE UN FILTRO**

¿Qué modelo físico obedecería lo concluido en la gráfica 1 y la ecuación (7)? Una posibilidad pudiera ser la de una cadena colgando sobre un solo fulcro y deslizándose a una tasa constante de la dirección de su lado más largo (ver **figura 4 a**). El fulcro estaría inicialmente colocado al azar con respecto a la cadena. El resultado de la cinética de elución estaría de acuerdo con la ecuación (7) y la gráfica 1 [Kohn, 1991]. Sin embargo, una falla

de este modelo es que permite suponer una inducción mayor de cortes en las cadenas durante la elución de lo que se observa experimentalmente [Kohn, 1991]. Por ello, y dada la longitud de las cadenas del ADN y que el filtro en realidad es una "malla" o "red", más que un simple fulcro, un modelo más realista sería suponer las cadenas del ADN sobre muchos poros del filtro simultáneamente, con muchas porciones de la cadena penetrando entonces por los poros mientras fluye el solvente (ver figura 4 b).

Figura 4

Modelos de elución del ADN



### EL TEJIDO LINFOCITARIO EN LA DOSIMETRÍA DE LA RADIACIÓN

Aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  linfocitos circulan libremente en la sangre o se hallan en los espacios estructuralmente específicos de ciertos órganos, como los nódulos linfáticos, el timo, el bazo y la médula ósea. Una gran proporción de éstos se halla en circulación constante de los órganos linfáticos a los linfáticos eferentes, de allí al ducto torácico y a la circulación sanguínea, por lo que en teoría podrían recibir una tasa de radiación similar a la de cualquier otro tejido en caso de una irradiación accidental de cuerpo entero. Asimismo, poseen una radiosensibilidad relativamente uniforme ya que están sincronizados en un estado post-mitótico o  $G_0$ . Estas características generales, aunadas al hecho de que estas

células se pueden obtener con técnicas poco invasivas para el ser humano, han hecho que sea considerado como un tejido sustituto adecuado para la dosimetría de accidentes. Las alteraciones inducidas por la radiación en el ADN de los linfocitos (aberraciones cromosómicas), se han usado como una medida cuantitativa de la dosis de radiación en sistemas *in vitro*, así como en la estimación de la dosis en individuos expuestos. Para obtener la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducida por una dosis determinada, es necesario realizar cultivos celulares y analizar un promedio de 500-1000 metafases por cultivo/dosis. Esta metodología resulta laboriosa y tardada, por lo que la estimación de la dosis mediante la elución alcalina del ADN de linfocitos de sangre periférica, resultaría un modelo más directo y rápido.

## **CAPÍTULO IV. REPORTE EXPERIMENTAL**

### **HIPÓTESIS**

La pendiente del logaritmo de la retención de ADN, contra el tiempo, en una elución alcalina, será mayor mientras mayor sea la dosis absorbida por el ADN debido a la radiación ionizante. Esta pendiente será constante para una dosis dada y guardará una relación lineal, con la dosis suministrada.

A pesar de la complejidad de la composición sanguínea, supondremos que al ser irradiada absorberá igual energía que la que recibiría una solución de dosímetro Fricke, ya que en ambas soluciones su composición es esencialmente agua.

Suponemos que los filtros utilizados para la elución, no retienen otro tipo de sustancias que pudieran interferir en el experimento, tales como proteínas que pudieran haber sido afectadas por la radiación y adherirse al ADN (DPCs).

### **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de este trabajo es determinar la relación existente entre la pendiente de elución y la dosis de radiación, para lo cual necesitamos haber cumplido con los siguientes objetivos:

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar la tasa de dosis del Gammacell 200 del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.
2. Determinar la pendiente del logaritmo de la retención del ADN celular en función del tiempo en condiciones alcalinas. sin irradiar.
3. Determinar la pendiente del logaritmo de la retención del ADN celular en función del tiempo. después de irradiarlo 5 y 10 min en el Gammacell 200 del Instituto de Ciencias Nucleares.

## **MATERIAL**

El material empleado fue el siguiente:

1. Sangre entera de conejo como fuente de células que contienen al DNA.
2. Bomba peristáltica ( Ismatec mini-micro 3/6 ISM 855)
3. Tubos de Tygon (se emplearon tubos naranja-rojo que. según el fabricante tienen un diámetro interior de 0.19 mm. que acoplados a la bomba utilizada suministran una tasa de bombeo de aproximadamente 0.05 ml/min pudiendo variar de acuerdo con las condiciones en las que se realice el experimento).
4. Tubos tipo Eppendorf .
5. Potenciómetro para determinar pH (Corning 430, USA).
6. Fluorómetro marca Turner (Lab Line. USA).
7. Jeringa de 20 ml con porta filtros.
8. Filtros de policarbonato con poros de 5  $\mu$ m de diámetro aproximadamente (Millipore. EEUU) y portafiltro.

Las soluciones empleadas se muestran en la **tabla 2**. Éstas fueron aforadas en agua destilada, y el pH debe ser ajustado en las soluciones cuando está indicado.

**TABLA 2** Soluciones utilizadas

SOLUCIÓN	INGREDIENTE	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN
Erylyse	Cloruro de amonio	$\text{NH}_4\text{Cl}$	155 mM
	Bicarbonato de potasio	$\text{KHCO}_3$	10 mM
	EDTA (Y <sub>4</sub> )	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_4$	1 mM
Lisis (pH=10)	Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	2 M
	Tritón X-100		0.5%
	EDTA (Y <sub>4</sub> )	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_4$	10 mM
Lavado (pH=10)	EDTA (Y <sub>4</sub> )	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_4$	10 mM
Elución (pH=12.6)	Cloruro de sodio	$\text{NaCl}$	5 M
	EDTA (Y <sub>4</sub> )	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_4$	2 mM
Neutralizadora	Fosfato de potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 M
Hoechst		$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O} \cdot 3\text{HCl}$	2%

## PROCEDIMIENTO

Se obtuvo sangre por punción de una de las venas de la oreja de un conejo macho joven de la raza New Zeland mediante una jeringa heparinizada. Se determinó la proporción de linfocitos en la muestra de sangre y se obtuvieron valores promedio de  $4 \times 10^6$  linfocitos por ml. La sangre (1 ml) se colocó inmediatamente en un tubo Eppendorf en hielo para ser irradiada a la dosis deseada, excepto en el caso de los controles.

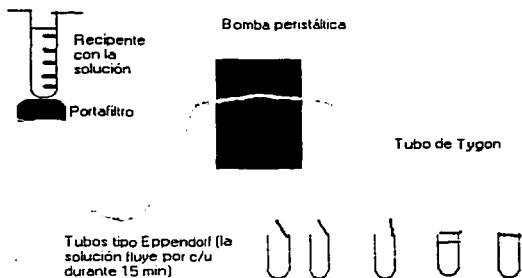
Después de irradiarse la sangre se mantuvo en hielo y se colocó en un tubo de 50 ml con 20 ml de solución de lisis, para destruir los eritrocitos. Se dejó reposar en hielo durante 15 min. A continuación se colocó la muestra en la jeringa con el portafiltro, que contiene el filtro de  $5 \mu\text{m}$  y se dejó escurrir el tiempo necesario hasta que la muestra celular se depositó en el filtro.

A continuación, se le adicionó la solución de lisis la cual fue drenada mediante una bomba peristáltica, que aseguró un flujo continuo y constante de la solución de lisis sobre las células. Después del lisado celular, se utilizó una solución de lavado que quitó los restos celulares, para finalmente agregar la solución de elución alcalina e iniciar la recolección de las fracciones que contienen los fragmentos del ADN. Fluyendo constantemente la solución, una fracción se colectó (tubo tipo eppendorf) durante 15 minutos, tiempo en el cual se sustituye para iniciar inmediatamente (sin que fluya la solución entre las fracciones y se derrame) la colecta de una siguiente fracción los próximos 15 minutos, y así sucesivamente repitiendo este procedimiento a lo largo de 4 o 5 horas. Ésta es la parte principal del experimento y se le llama **elución**, y su montaje se muestra en la **figura 5**. Todo el procedimiento se hace en refrigeración ( $3$  a  $4^\circ \text{C}$ ). Luego de eluir el ADN durante 4



a 5 horas, se colectó la solución sobrante junto con el filtro en donde quedan restos de ADN. A esta alícuota se le llamó **remanente**.

**Figura 5.- Montaje**



Las fracciones recolectadas, así como el remanente, se neutralizaron a un pH de 7 a 7.4 con la solución neutralizadora. A cada fracción de aproximadamente 0.5 a 0.7 ml se le adicionaron 12.5  $\mu$ l de una solución de Hoescht. Del remanente se tomaron 3 fracciones de 0.5 ml cada una, se neutralizaron y se les agregó un volumen similar de Hoescht. Las muestras se incubaron en la oscuridad durante 30 min y se leyeron en un fluorómetro. El Hoescht es un fluorocromo que se incorpora al ADN y se excita a 360 nm emitiendo, a un pH neutro, una fluorescencia en 420 nm que es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la solución. Como blanco se neutralizó, a pH de 7 a 7.4, una muestra de solución de elución a la que se le agregó el fluorocromo, en ausencia de ADN.

## CÁLCULO DE LA RETENCIÓN EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

Necesitamos determinar la cantidad relativa de ADN presente en el filtro, en cada instante del proceso de elución, con respecto a la cantidad inicial contenida en el filtro. A esta cantidad relativa de ADN presente en el filtro, en un instante dado, le llamamos **retención**.

La primera fracción, todavía podría contener residuos de sustancias anteriores a la solución de elución (lisis y lavado); por esto definimos nuestro 100% de ADN a estudiar, como el total contenido a partir de la segunda fracción, más el ADN contenido en el remanente. Las lecturas de fluorescencia fueron nuestro indicativo absoluto de la cantidad de ADN contenido en cada muestra. Dado que descartamos la primera fracción llamamos " $L_1$ " a la lectura de la segunda fracción, " $L_2$ " a la de la tercera, y así sucesivamente, de tal modo que si recogimos " $n+1$ " fracciones, entonces tuvimos en total " $n$ " datos o lecturas. Para determinar la cantidad de ADN presente en el líquido remanente (recuérdese que de este líquido se tomaron 3 muestras de 0.5 ml y cada una de ellas se midió con el fluorómetro), se promediaron las lecturas de los tres recipientes de esta muestra, y el promedio se multiplica por el cociente de la cantidad total de remanente entre 0.5 ml (ya que esta es la cantidad de solución de remanente tomada para cada una de las tres muestras de remanente); es decir, si por ejemplo el total de remanente (VR) fue 4, entonces, hay que multiplicar por 8 (o sea  $4/0.5$ ). Es decir si " $R_1$ ", " $R_2$ ", " $R_3$ " son las tres lecturas de los remanentes y "VR" el volumen total de remanente, entonces la cantidad que tomamos como absoluta de la medida de ADN, que queda como remanente " $RT$ " fue:

$$RT = \frac{R_1 + R_2 + R_3}{3} \cdot \frac{VR}{0.5ml}$$

Por la definición que dimos al principio, la cantidad total de ADN está dada por:

$$T = L_1 + L_2 + L_3 + \dots L_n + RT = \sum_{i=1}^n L_i + RT$$

Definimos como 1 (o como 100%), a la cantidad presente en el filtro justamente después de recoger la primera fracción, o sea al empezar a colectar la segunda fracción (recuérdese que la lectura de la segunda es "L<sub>1</sub>").

Al terminar de colectar la fracción correspondiente a la lectura "L<sub>1</sub>", pudimos estimar la cantidad relativa de ADN presente en el filtro, considerando que la cantidad absoluta inicial es "T", pero ahora a eso se le debió de restar "L<sub>1</sub>", que es una cantidad de ADN, que eluyó por el filtro (o sea que este último perdió); por lo que la cantidad relativa de ADN presente en el filtro en el instante de recoger la segunda fracción, fue dada por:

$$r_1 = \frac{T - L_1}{T}$$

Siguiendo la misma lógica, para la retención en el instante de recoger la muestra "L<sub>2</sub>", es:

$$r_2 = \frac{T - L_1 - L_2}{T}$$

De este modo para la "i"ésima lectura; la retención fue:

$$r_i = \frac{T - L_1 - L_2 - \dots - L_i}{T} = \frac{T - \sum_{j=1}^i L_j}{T}$$

Finalmente de estos datos se hace una regresión lineal a la siguiente fórmula, donde el logaritmo en este caso es en base 10:

$$\log(r) = -Kt$$

Donde "r" fue la retención del filtro al tiempo "t" de iniciada la elución, y "K" es la constante de elución (que según nuestra hipótesis es proporcional, a la dosis recibida).

### DOSIMETRÍA DEL GAMMACELL 200 (INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES, UNAM).

Primero se preparó medio litro de solución Fricke de sulfato ferroso. Aforando en medio litro de agua tridestilada se agregó lo indicado en la **tabla 3**.

**Tabla 3. Solución Fricke**

<b>Ingrediente (composición)</b>	<b>Cantidad</b> <b>(para aforar a 0.5 l de agua tridestilada)</b>
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.20 gr
NaCl	0.03 gr
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95.5~96.5%)	11 cm <sup>3</sup>

Dicha preparación se distribuyó en 10 recipientes. El primero permaneció sin irradiar y fue el que sirvió como "fondo" para determinar la diferencia de densidad óptica ( $\Delta DO$ ). Los siguientes 9 recipientes fueron sometidos a radiación gamma en el irradiador Gammacell 200 durante distintos tiempos. Fueron colocadas las muestras en el centro de la base del cilindro del irradiador Gammacell 200. Esto fue realizado el día 10 de mayo de 2000.

Después se determinó la diferencia de densidad óptica de cada uno de los recipientes irradiados, con respecto a la solución sin irradiar, a una longitud de onda de 304 nm.

A una temperatura de aproximadamente 25°C, la dosis en cGy, a partir de la diferencia de densidad óptica " $\Delta DO$ " del contenido de cada recipiente irradiado es:

$$D = 2.75 \times 10^4 (\Delta DO) \text{ cGy}$$

Y recordemos que para la tasa de dosis promedio, simplemente dividimos la dosis entre el tiempo de irradiación.

Los resultados de todo esto se muestran en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Dosimetría del Gammacell 200 (10 de mayo de 2000)

<b>Tiempo de irradiación</b> (min ±15s)	<b>Lectura</b> $\Delta DO \pm 0.001$	<b>Dosis</b> $D \pm 27.5$ (cGy)	<b>Tasa de dosis</b> (cGy/min)
30	0.106	2915	97.2±1.7
	0.113	3107.5	103.6±1.8
	0.109	2997.5	99.9±1.7
40	0.169	4647.5	116.2±1.4
	0.169	4647.5	116.2±1.4
	0.169	4647.5	116.2±1.4
70	0.274	7535	107.6±0.8
	0.262	7205	102.9±0.8
	0.262	7205	102.9±0.8

De los resultados de la **Tabla 4** tenemos que la tasa de dosis promedio viene dada por:

$$\bar{D} = (107 \pm 7) \text{ cGy} \cdot \text{min}$$

## RESULTADOS

Se realizó la elución alcalina en cuatro muestras de sangre sin irradiar para obtener los datos de la elución en ausencia de irradiación. En el irradiador Gammacell 200 tres muestras recibieron una irradiación de 5 minutos y otras tres muestras se irradiaron durante

10 minutos. De acuerdo a los cálculos realizados con la solución Fricke, la irradiación de 5 minutos equivalió a  $(534 \pm 37)$  cGy, mientras que las muestras expuestas durante 10 minutos recibieron una dosis equivalente a  $(1069 \pm 74)$  cGy. La **tabla 5** muestra los resultados de la retención del filtro en función del tiempo, para el control, mientras que en las **tablas 6 y 7** se presentan los datos obtenidos en las eluciones después de exponer las muestras de sangre durante 5 y 10 minutos, respectivamente. En algunos casos no fue posible realizar la elución durante mas de 3 horas por dificultades técnicas que tuvieron que ver fundamentalmente con la necesidad de coordinar el momento de la irradiación que se hacía fuera del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Este evento se denota con **nd** (no determinado) en las tablas arriba mencionadas.

**Tabla 5 Resultados de los experimentos de control**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Porcentaje de retención en el filtro</b>					<b>Desviación estándar</b>
	<b>Control 1</b>	<b>Control 2</b>	<b>Control 3</b>	<b>Control 4</b>	<b>Promedio</b>	
0	100.000	100.0	100.00	100.00	100	0.0
15	88.559	92.4	96.70	98.70	94	4.5
30	86.910	86.1	85.96	93.05	88	3.4
45	75.570	77.7	76.43	88.61	80	6.1
60	67.330	73.6	58.38	82.83	70	10.3
75	59.800	68.5	52.47	79.93	70	11.8
90	53.830	64.4	42.86	76.26	60	14.3
105	49.090	59.7	36.06	73.95	50	16.1
120	43.520	55.9	nd	69.32	60	12.9
135	39.400	52.3	nd	nd	46	9.1
150	34.550	nd	nd	nd		
165	29.910	nd	nd	nd		
180	25.790	nd	nd	nd		
195	22.800	nd	nd	nd		



**Tabla 6 Resultados de los experimentos con 5 minutos de exposición.**

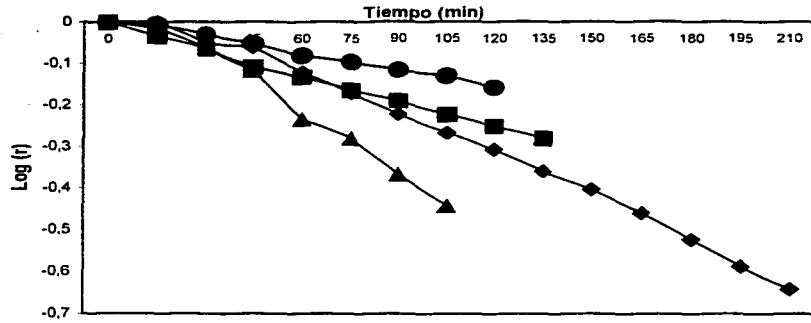
Tiempo (min)	Porcentaje de retención en el filtro				Desviación estándar
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Promedio	
0	100.000	100.00	100.000	100	0.0
15	85.280	97.24	91.107	91	6.0
30	68.062	91.02	82.602	80	12.0
45	59.959	85.5	74.998	70	13.0
60	48.750	79.66	65.976	60	15.0
75	42.336	76.24	53.475	60	17.0
90	33.964	70.72	49.480	50	18.0
105	27.819	66.51	47.418	50	19.0
120	27.144	62.12	45.614	40	17.0
135	23.093	58.19	40.974	40	18.0
150	19.784	54.22	40.587	40	17.0
165	17.961	nd	39.169	30	15.0
180	17.286	nd	36.721	30	13.7
195	15.260	nd	34.144	20	13.4
205	14.855	nd	31.118	20	11.5

**Tabla 7. Resultados a 10 minutos de irradiación.**

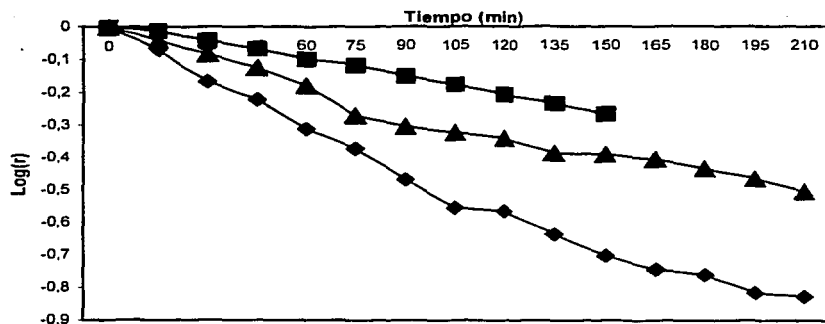
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Porcentaje de retención en el filtro</b>				<b>Desviación estándar</b>
	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>	<b>Experimento 3</b>	<b>Promedio</b>	
0	100.000	100.0	100.0	100	0.0
15	60.210	86.7	87	80	15.4
30	43.191	75.5	72.4	60	17.8
45	28.435	68.4	59.2	50	20.9
60	22.400	65.0	53.5	50	22.0
75	17.875	63.1	43.3	40	22.7
90	12.784	62.2	39.4	40	24.7
105	12.406	61.3	35.9	40	24.5
120	11.558	58.8	34.2	30	23.6
135	10.898	56.6	34.2	30	22.9
150	10.426	56.6	nd	30	32.7
165	9.813	56.3	nd	30	32.9
180	9.813	55.4	nd	30	32.2

Las gráficas 2, 3 y 4 muestran el logaritmo de la retención en función del tiempo, para el control, la elución con 5 min y 10 min de radiación respectivamente.

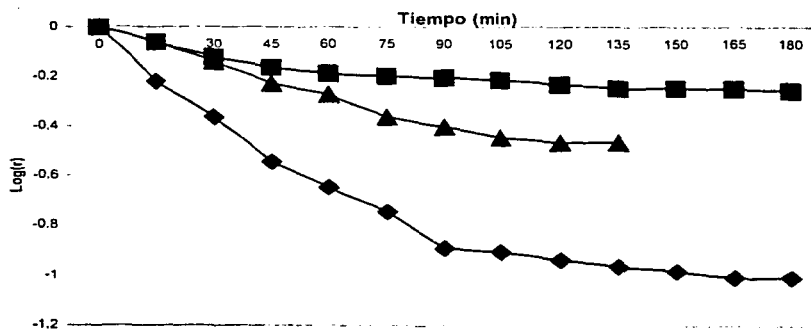
Gráfica 2. Controles



Gráfica 3. Elución con 5 min de irradiación

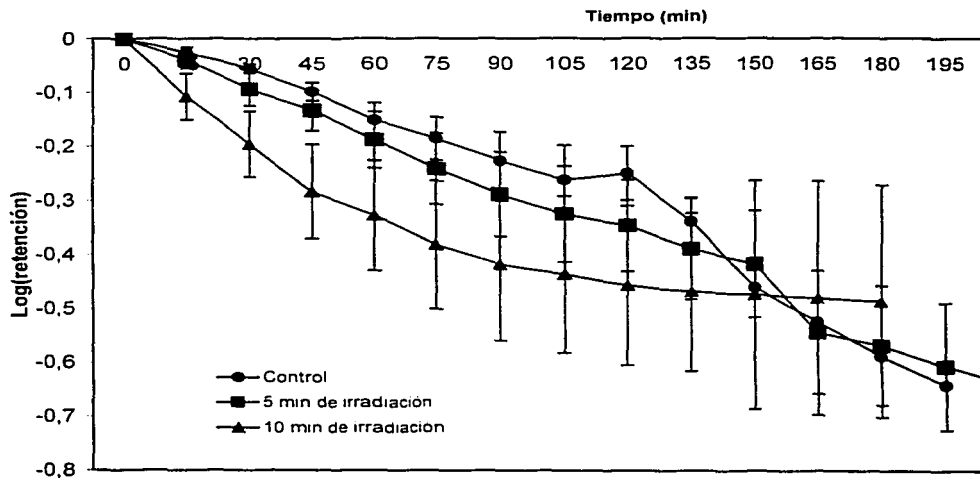


Gráfica 4. Elución con 10 min de irradiación



Podemos obtener el logaritmo de los promedios y graficarlos juntos para observar si hay una tendencia a una mayor pendiente de este logaritmo de la retención en función del tiempo de elución, debida al tiempo de irradiación en el Gammacell 200. La gráfica 5 muestra al logaritmo de los promedios en función del tiempo de elución.

**Gráfica 5.** Promedio de retenciones en función del tiempo



De cada uno de los 10 experimentos podemos hacer una regresión lineal del tiempo de elución en el eje X y del logaritmo de la retención del filtro en Y, es decir:

$$\log_{10}(r) = -Kt$$

Los datos de dichas regresiones los podemos consultar en la **tabla 8**

**Tabla 8.** Regresiones de los experimentos de elución

Irradiación (cGy)	Constante ( $\times 10^{-3} \text{min.}^{-1}$ )	Coefficiente de correlación	desviación estándar $\times 10^{-05}$
0	3.129	0.995	4.4368
	2.132	0.998	2.242
	3.876	0.974	20.82
	1.286	0.993	3.008
534 $\pm$ 37	4.471	0.984	10.14
	1.706	0.996	2.673
	2.624	0.9716	7.991
1070 $\pm$ 70	7.158	0.842	46.983
	1.809	0.741	13.804
	4.068	0.970	16.493

También podemos hacer una regresión de los resultados de la tabla anterior a la siguiente recta. de la constante de elución "K" en función de la dosis suministrada a la sangre "D":

$$K = Dm + b$$

Donde resulta al hacer la regresión que:

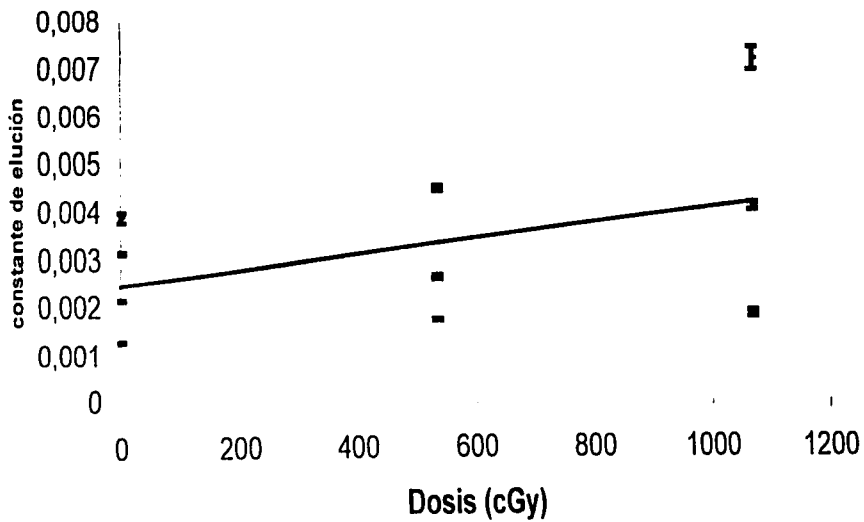
$$m = (1.6 \pm 1) \times 10^{-4} (\text{cGy min})^{-1}$$

$$b = (2.5 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$$

$$\text{Coeficiente de correlación} = 0.4216$$

La **gráfica 6** muestra dichos resultados.

Gráfica 6. Constante de elución en función de la dosis



## DISCUSIÓN

La evidencia experimental obtenida en este trabajo demostró la factibilidad de estudiar efectos biológicos de la radiación, específicamente a nivel del material genético, mediante un micrométodo de elución alcalina. Los resultados obtenidos muestran una menor retención de ADN en el filtro (mayor elución) a medida que aumenta la dosis de radiación. El logaritmo de la retención en función del tiempo (gráfica 2) mostró un componente lineal al inicio de la recolección de las fracciones, lo cual indicaría que inicialmente eluyen los fragmentos más pequeños y a tiempos posteriores la elución pierde su linealidad porque otros factores como el mayor tamaño de los fragmentos y/o su interacción con proteínas celulares modifican su paso por el filtro. Existe una importante dispersión en los valores de la constante de elución cuyas causas podrían atribuirse fundamentalmente a variaciones en las condiciones experimentales en las que se realizó cada elución. Por ejemplo, durante el tiempo que transcurre entre la irradiación y el inicio de la elución, las células pueden reparar parcial o totalmente el ADN dañado o iniciar un proceso de muerte celular que degrada el ADN en pequeños trozos de aproximadamente 180 a 200 pares de bases [Lewin, 1997]. La realización de un mayor número de ensayos o repeticiones disminuiría esta dispersión así como su automatización, ya que el empleo de colectores múltiples permitiría reducir las variaciones introducidas por la recolección manual de las fracciones. Ello haría factible coleccionar todas las muestras en intervalos de tiempo más precisos y bajo las mismas condiciones. Resulta importante destacar que el único tipo de daño cuantificado mediante la metodología empleada son los rompimientos de cadena sencilla y doble (SSB y DSB), por lo que la gráfica 3 representa la cantidad de este tipo de lesiones con respecto a la dosis. Para discriminar otro tipo de daño, se necesitan incorporar otras variables a la elución como



un aumento en su pH, que permitiría cuantificar los sitios apurínicos y apirimidínicos o la digestión del remanente con proteinasas para conocer la proporción del ADN unido a las proteínas.

La metodología empleada permite determinar los efectos de la radiación en pequeñas muestras de tejido (como por ejemplo tejidos sujetos a radioterapia) y se podría realizar también en homogenizados tisulares, en los cuales se quieran investigar o cuantificar los efectos de la radiación. Asimismo serviría para comparar los efectos de otros agentes genotóxicos con el daño inducido por la radiación en el ADN. Otro aspecto interesante de la metodología es su posibilidad de automatización, ya que tanto la recolección de muestras como la cuantificación del contenido de ADN y el análisis de los datos pueden automatizarse mediante el empleo de colectores de muestras y de programas de cómputo.

## CONCLUSIONES

El micrométodo de elución alcalina del ADN representa una opción potencial para conocer parte de los efectos de la radiación en esta macromolécula y estimar la cantidad de fragmentos de hebra sencilla y doble generados, mediante el análisis de la tasa de elución. A pesar de que en este trabajo la tasa de elución presentó valores muy dispersos que serían factibles de corregir mediante medidas como la mencionadas, este modelo permitiría generar curvas dosis-efecto para calcular la dosis recibida en individuos accidentalmente expuestos, así como verificar de una manera relativamente rápida y sencilla el daño efectivo en tejidos o tumores bajo radioterapia.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Attix F. H., 1986 Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. John Wiley and Sons, pag: 4, 38-40, 125-138, 421-422.

Bulbulian Silvia, 1987 La Radioactividad, La Ciencia Desde México, vol. 42, Fondo de Cultura Económica, pag: 42.

García Colín María Cristina, 1995. Aplicación de la dosimetría de luz UV de onda corta y radiación ionizante al estudio de un sistema biológico simple irradiado. Tesis de licenciatura: Facultad de Ciencias, UNAM, pag: 8.45-47.

García Cruz Luz María, 1979. Calibración de fuentes de  $^{60}\text{Co}$  de alta intensidad por medio de un dosímetro químico. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, pag: 97-100.

Halliwell B. and Gutteridge J.M. 2000. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, New York, pag. 45-46.

Kiefer, J., 1990. Biological Radiation Effects, Springer-Verlag.

Kohn K.W., Erickson L. C, Ewig R. A., Friedman C. A. 1976. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. Biochemistry 15 pag: 4629-4637.

Kohn K. W. and Ewig, R. A. 1973, Alkaline elution analysis. a new approach to the study of DNA single strand interruptions in cells. *Cancer Res.* 33 pag: 1849-1853.

Kohn K. W. 1981. DNA damage in mammalian cells. *Bioscience* 31 pag: 593-597.

Kohn, K.W. 1991. Principles and practice of DNA filter elution. Pergamon Press pag: 56-57, 69-74.

Lindahl, T.. 1979. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidic sites, and base excision-repair, *Prog. Nucleic Acid Res. Molec. Biol* 22 pag: 135-192.

Lewin, B. *Genes* VI, Oxford University Press, London, 1997. 4. pag: 79-80.

Lorris G. Cockerham, G. Andrew Mickley, Thomas L. Walden, Jr., and Bruce O. Stuart. "Principles and Methods of Toxicology". Chapter 13. "Ionising Radiation". edited by A. Wallace Hayes. Haven Press, Ltd., New York 1994, pag: 456

Meza, I. . Frixione, E. 1996. "Máquinas vivientes ¿Cómo se mueven las células?" *La ciencia desde México.* 143 Fondo de Cultura Económica, pag: 14-18

Robert, J.M., 1981. La herencia explicada a los padres. *Breviarios* 301. Fondo de cultura económica, pag: 43-44.