



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

**“Modulación de proteínas antioxidantes por
radiación ionizante en distintos órganos de ratón”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

P R E S E N T A:
Manuel Alejandro Vázquez Vázquez

Directora de Tesis:

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, IIB,
UNAM

Comité tutorial:

Dra. María Isabel Gamboa de Buen, ICN, UNAM
M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos, IF, UNAM



posgrado en ciencias físicas
u n a m

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

En el séptimo mundo los peregrinos
del tiempo y del espacio se reúnen ya
de un cuerpo. Han alcanzado finalmente su
auténtico estatado espiritual. Son espíritus
disponibles a vivir la gran aventura de la Trinidad.
Al llegar al séptimo mundo se quedan en vosotros
el menor resto de vuestras limitaciones pasadas.
No seréis ya hombres sino ángeles.

<> En un histórico día, los nuevos ángeles serán
reunidos en el mar de cristal del séptimo mundo.
En los transportes cósmicos los conducirán a su destino
final siempre eterno: el Paraíso.
Entonces seréis definitivamente inmortales.
Pero nuestro camino hacia la Jala Nuclear de Luz
no habrá hecho sino empezar... En nuevos
y nuevos lugares y nuevos misterios os serán
<> amantados por la gracia del Padre amantísimo

Como acostumbraba decir el Maestro:
...quiero tener oídos, que oigan...



AGRADECIMIENTOS

A Ab-bâ, por regalarnos esta maravillosa aventura circular y ascensional llamada vida. Por darnos todo sin pedir nada a cambio. Gracias por cubrirnos con el manto de tu amor que trasciende a través del tiempo y el espacio. Que se haga tu voluntad en la Tierra y en los cielos.

A Micael de Nebadon, por escoger a nuestra precaria y convulsionada esfera como escenario de su última encarnación. Gracias por hacer vibrar de emoción nuestro espíritu al revelarnos el supremo mensaje de la paternidad de Ab-bâ y demostrarnos que la vida no hace sino comenzar aquí. Mil gracias, padre creador.

A las tres estrellas más brillantes de mi firmamento: Aida, Romina y Kamilah.

Aida, cielo no existen palabras que describan todo el amor que siento por ti. Eres mi gran amiga y compañera, he aprendido mucho de ti a lo largo de más de trece años y desde entonces has ido conmigo a todas partes. Admiro la influencia que ejerces en mi vida pues me transforma continuamente en una mejor persona. Gracias por el inolvidable día 'D', por regalarme la sublime experiencia de ser el Padre de dos hermosas muñequitas, por todos los maravillosos momentos, por ser mi fuente de inspiración, por ser los versos de mis poemas y la brújula de mi navío, gracias por compartir tu vida a mi lado. Te amo mi amor.

Romina y Kamilah, describir lo que me hicieron sentir la primera vez que las tuve en mis brazos sería una aproximación finita de algo infinito. Gracias por ser esas pequeñas y maravillosas personitas que pintan mi vida de mágicos y bellos colores. Su inigualable sonrisa, sus dulces miradas, cariño, amor incondicional y su increíble personalidad son realidades que únicamente puedo agradecer a los Cielos... Las amo con lokur@.

A mis padres terrenales: Isabel Vázquez y Alejandro Vázquez.

Mamá, gracias por toda tu dedicación en mis primeros pasos académicos, mi gusto por las matemáticas sin duda se fundamentan en tus lecciones. Gracias por

compartir gran parte de tu tiempo en mi formación; gracias por ser un gran ejemplo de fortaleza, de entrega incondicional, sinceridad, honestidad, respeto,...por ser un gran ejemplo de vida. Gracias por ser esa gran madre-amiga-cómplice a lo largo de toda mi vida. Gracias por todos los sacrificios que haz hecho por tus hijos. Te amo Mamá.

Papá, gracias por haberme dirigido hacia la senda de la autonomía, la confianza, la humildad y la honestidad. Gracias por haber confiado en mí y convertíste en mi mejor amigo. No hay forma de agradecer tus sabios consejos y atenciones durante toda una vida. Gracias por ayudarme a dar los primeros pasos en el terreno de la comprensión de lo extraño e inusual, los cuales irremediablemente me condujeron a la búsqueda de la verdad.. Gracias por mostrarme la infinitud de lo que nos rodea. Te amo Papá.

A mis hermanos en la sangre: **Jonathan, Daniela y Edgar**. Gracias por ser mis entrañables amigos, gracias por todos los momentos que han compartido conmigo durante toda su vida. Por permitirme ser parte medular de su educación... lo que aprendí de ustedes me ha ayudado a ser un mejor Padre. Espero no haber sido un mal ejemplo para ustedes. Mil gracias. Los amo.

A mis tíos Graciela Meza y Ricardo Vázquez. Gracias por abrirme las puertas de su casa y permitirme ser parte integral de su familia durante más de 5 años. Gracias por todo el apoyo incondicional que me brindaron durante la mayor parte de mis estudios de licenciatura y maestría. Gracias por haber depositado su confianza en mí nuevamente, no tengo forma de agradecerles..

A mi comité tutorial: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. María Isabel Gamboa de Buen y M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos. Gracias por el enorme apoyo brindado durante tantos años, por ser un ejemplo de superación y profesionalismo, por sus enseñanzas y valiosos consejos, por su tiempo, amistad y sobre todo, por la incommensurable paciencia hacia el peor de sus alumnos. Muchísimas Gracias.

A la M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos, Dra. Alicia Ortega Aguilar y Dra. Adela Porterin Chacón por haber aceptado ser candidatas a formar parte de los miembros del jurado de este trabajo.

A los miembros del jurado de mi examen de grado: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. María Isabel Gamboa de Buen, Dra. Patricia Ostrosky Shejet, Dra. María Ester Brandan y Dra. Alicia Negrón Mendoza. Gracias por el tiempo que dedicaron en la revisión de este trabajo de tesis, por sus valiosos y enriquecedores comentarios. Gracias.

A mis compañeros de maestría: Fer, Suemi, Abrajam, Christian, Iván, Marcelino y Orlando. Gracias por todos los momentos compartidos a lo largo de poco más de dos años. Mucho éxito en sus carreras profesionales.

Ruthsita: En ti encontré a una de mis mejores amigas, gracias por todo lo que has hecho por mí, por tu apoyo, sinceridad y confianza, gracias!!

A Alfonso Gastelum por su amistad incondicional, apoyo y valiosos comentarios sobre el procesamiento y análisis de imágenes, los cuales fueron de ayuda en la realización de este trabajo.

A mis compañeros del lab por permitirme formar parte de su excelente grupo de trabajo. Gracias Wendy, Dany, Elsa, Caro, Celeste y César.

A Pavel Petrosyan por su ayuda y asesoramiento en el desarrollo experimental de este trabajo, por sus múltiples puntadas al estilo Armenio que hacían más amenas y alegres las jornadas en el lab.

A mi compañera de trabajo: Méd. Ana Luisa Centeno Carrillo. Gracias por tu apoyo y amistad sincera, la cual sé que perdurará por los tiempos de los tiempos. Gracias por tomar en cuenta mis malos consejos.

A mis profesores de Posgrado, por su excelente cátedra y dedicación a sus estudiantes. Es extraordinario que la UNAM cuente con personal tan profesional como ustedes. Gracias Dra. María Ester Brandan, Dra. Alicia Ortega, Dra.

María Eugenia Gonsebatt, Dra. María Isabel Gamboa, M. en C. Ana Elena Buenfil, Dra. Hortensia González, Ing. Fernando Hurbé, Dr. Armando Mansilla, Dr. Luis Benítez, M. en C. César Ruiz, Dr. Arnulfo Martínez, Dr. Luis Alberto Medina y al Dr. Jorge A. Márquez.

A l. l. 2551457 por la influir en mi sed de conocimiento y la interminable búsqueda de la verdad. Estoy más cerca de encontrar los significados de 153-634-135-153.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindar a sus estudiantes la oportunidad de tener una educación gratuita y de calidad mundial. Por ser mi tercera casa desde mi ingreso al posgrado.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Ciencias Nucleares y al Instituto de Física por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos para desarrollar el presente trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado durante la duración de mis estudios de Posgrado.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por el soporte financiero concedido en 2008 para la compra de material y asistencia a congresos.

Al Proyecto PAPIIT M28 por el financiamiento otorgado para la compra de animales y reactivos.

ÍNDICE

Abreviaturas	III
Resumen	IV
Abstract	V
Introducción	1
Capítulo I: Física de la interacción de la radiación con la materia y fundamentos de dosimetría	3
1.1 Física atómica y Radiación	3
1.1.1 Descubrimiento de los rayos X	3
1.2 Radiación	5
1.3 Descripción de campos de radiación ionizante	6
1.3.1 Fluencia	7
1.3.2 Densidad de flujo (o tasa de fluencia)	7
1.3.3 Fluencia de energía	7
1.3.4 Densidad de flujo de energía (o tasa de fluencia de energía)	8
1.4 Descripción de un haz de fotones	8
1.4.1 Kerma	9
1.4.2 Componentes del Kerma	10
1.5 Dosis absorbida	11
1.5.1 Equilibrio de Partícula Cargada	12
1.6 Transferencia lineal de energía (LET)	12
1.7 Interacción de rayos γ con la materia	13
1.7.1 Efecto Compton	14
1.7.2 Efecto fotoeléctrico	16
1.7.3 Producción de Pares	16
1.8 Fundamentos de dosimetría	18
1.8.1 Dosímetro Fricke (Sulfato Ferroso en medio ácido)	18
1.8.2 Dosímetros Termoluminiscentes	20
1.8.3 Características de los dosímetros Termoluminiscentes LiF:Mg:Ti (TLD-100)	21
1.8.4 Película de Tinte Radiocrómico (PTR)	23
1.8.4.1 Dosimetría de las PTR	26
Capítulo II: ADN, daño producido por radiación ionizante, mecanismos de reparación celular y sistemas de defensa antioxidante.	28
2.1 Estructura del ADN	28
2.2 Función del ADN: transmisión de la información	30
2.3 Síntesis de proteínas	30
2.3.1 ARN	31
2.3.2 Síntesis de ARNm	32
2.3.3 Síntesis de una proteína a partir del ARNm	33
2.4 Ciclo Celular y daño provocado por radiación	34
2.4.1 Radiosensibilidad	36
2.4.2 Acción directa e indirecta de la radiación	36
2.4.3 Producción de Radicales Libres	37
2.4.4 Radicales libres de oxígeno	38
2.4.5 Reactividad de los radicales libres de Oxígeno	39

2.4.6 Estrés oxidante y especies reactivas del Oxígeno	41
2.5 Respuesta celular ante la radiación ionizante	41
2.6 Mecanismos de Reparación Celular	42
2.7 Sistemas de defensa antioxidante	44
2.7.1 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos	44
2.7.2 El Sistema Tiorredoxina (Trx)	45
2.7.3 El Sistema GSH/Grx	46
Capítulo III: Objetivos	48
3.1 Planteamiento del estudio	48
3.1.1 Hipótesis	48
3.1.2 Objetivos	48
Capítulo IV: Materiales y métodos	49
4.1 Calibración del irradiador GammaCell 200	49
4.2 Determinación de la tasa de dosis del irradiador GammaCell 200	50
4.2.1 Dosis de tránsito	51
4.3 Distribución de dosis en el irradiador GammaCell 200	53
4.4 Irradiación de los roedores	56
4.5 Protocolo de extracción de ARN	57
4.6 Integridad y pureza del ARN extraído	58
4.7 Síntesis de ADNc	59
4.8 PCR	59
Capítulo V: Resultados	62
5.1 Viabilidad del ARN	62
5.2 Niveles de expresión de ARNm	63
5.2.1 Niveles de expresión de ARNm en hígado	65
5.2.2 Niveles de expresión de ARNm en riñón	66
5.2.3 Niveles de expresión de ARNm en cerebro	67
5.2.4 Niveles de expresión de ARNm en pulmón	69
5.2.5 Niveles de expresión de ARNm de γ -GCS en los órganos de interés	70
5.2.6 Niveles de expresión de ARNm de Trx1 en los órganos de interés	71
5.2.7 Niveles de expresión de ARNm de Grx1 en los órganos de interés	72
Capítulo VI: Discusión y Conclusiones	73
Apéndice 0: Técnicas de biología molecular empleadas	78
0.1 ADN polimerasas	78
0.2 ARN polimerasas	79
0.3 Transcriptasas Inversas	79
0.4 Síntesis de ADNc	80
0.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	80
0.6 Electroforesis en Gel	82
Referencias Bibliográficas	84

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalasa
DO	Densidad óptica
DSB	Rompimientos de doble cadena
EPC	Equilibrio de Partícula Cargada
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasas
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutarredoxina
GS	Glutación sintetasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-Transferasas
γ -GCS	Gamma-glutamyl-cisteín-sintetasa
Nrf2	Factor 2 relacionado a NF-E2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PTR	Película de tinte radiocrómico
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR	Transcripción inversa de PCR
SOD	Súper óxido dismutasa
SSB	Rompimientos únicos de cadena
TL	Termoluminiscente
TLD	Dosímetro TL
Trx	Tiorredoxina

RESUMEN

La radiación ionizante es un agente ubicuo mutágeno ambiental y cancerígeno ampliamente utilizado en terapia contra el cáncer. Los efectos de la radiación ionizante son el producto final de una serie de eventos provocados por el paso de la radiación a través de la materia viva. Los efectos biológicos de la radiación han sido más intensamente investigados que cualquier otro agente ambiental, sin embargo, poco se sabe acerca de la inducción de eventos de señalización celular y expresión génica específica por exposición a la radiación.

El propósito de este trabajo fue el de determinar los niveles de expresión del ARNm de las proteínas γ -glutamyl-cistein-sintetasa (γ -GCS), Tiorredoxina (Trx1) y Glutarredoxina (Grx1) en el cerebro, los pulmones, los riñones y el hígado de ratones machos de la cepa BALB/c tras ser expuestos a radiación gamma a cuerpo entero.

Los roedores fueron anesteciados con pentobarbital ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) e irradiados con una fuente de ^{60}Co (GammaCell 200) a dosis entre 0.5 y 4 Gy a una tasa dosis de $0.475 \pm 0.002 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$. La tasa y distribución de dosis fueron determinadas mediante solución Fricke y película de tinte radiocrómico HD-810, respectivamente.

El ARN celular total fue extraído mediante el uso del protocolo general del Trizol. El ARN obtenido fue sometido a transcripción inversa y posterior amplificación (RT-PCR) para cada gen de interés así como para el gen de control interno GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Los resultados revelaron una relación entre la inducción de la transcripción de las proteínas de estudio y la dosis absorbida, además de que se presentaron respuestas antioxidantes órgano-específicas, aunque tal correlaciones fueron encontradas principalmente a la dosis más alta. La transcripción de γ -GCS, Trx1 y Grx1 se indujo significativamente en todos los órganos de interés. El hígado, los pulmones y los riñones mostraron la mayor inducción de γ -GCS, Trx1 y Grx1, respectivamente.

Se sabe que los sistemas Trx y Glutación/Grx poseen funciones y mecanismos de regulación en común, no obstante, la diferencia entre los niveles de transcripción de Trx1 y Grx1 sugiere una diferencia funcional entre ellos y plantea una forma de modulación diferente entre ambos sistemas.



ABSTRACT



Ionizing radiation is a ubiquitous environmental mutagen and carcinogen widely used in cancer therapy. The effects of ionizing radiation on living matter are the final product of a series of events which are set in motion by the passage of radiation through the medium. The biological effects of radiation have been investigated more thoroughly than any other environmental agent, however little is known about the induction of cellular signaling events and specific gene expression after radiation exposure.

The aim of this study was to determine the mRNA expression levels of the proteins γ -Glutamyl-cysteine synthetase (γ -GCS), thioredoxin (Trx1) and glutaredoxin (Grx1) in samples from brain, lung, kidney, and liver from male BALB/c mice after whole body gamma irradiation.

Mice were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and irradiated with a ^{60}Co source (GammaCell 200) at doses ranging from 0.5 to 4 Gy at a dose rate of $0.475 \pm 0.002 \text{ Gymin}^{-1}$. The dose rate and dose distribution were determined using Fricke chemical dosimeter and GafChromic HD-810 film, respectively.

Total cellular RNA was isolated from cells using Trizol reagent protocol. The RNA obtained was reverse transcribed and then amplified (RT-PCR) for each target genes as well as for the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH). The PCR products were visualized on agarose gels stained with ethidium bromide.

The results revealed a dose-related induction of transcription for the proteins tested and showed organ-specific antioxidant responses although the strength of the association was found at the higher dose. The transcription of γ -GCS, Trx1 and Grx1 was significantly induced in all of the organs examined. The liver, lung and kidneys exhibited the highest induction of γ -GCS, Trx1 and Grx1, respectively.

It's well known that the Trx and Glutathione/Grx systems possess overlapping functions and regulation mechanisms, but the difference between Trx1 and Grx1 transcription levels suggests a functional dissimilarity between them and proposes a different way of modulation among these systems.



Algunos de los hitos más importantes en la historia de la Medicina son sin duda los descubrimientos de los rayos X y de los elementos radiactivos. La presentación de nuevas radiaciones a finales del siglo XIX, relacionadas con estos descubrimientos, estuvo acompañada de una rápida incorporación a la medicina, primero en su forma diagnóstica y muy pronto en la terapéutica. Como en tantas otras veces en la historia de la medicina, las radiaciones ionizantes se emplearon inicialmente de forma empírica, sin el conocimiento profundo y científico de las mismas. La historia temprana del empleo de estas radiaciones se ensombreció con las graves lesiones que se produjeron por el desconocimiento de sus efectos, por lo que se inició el estudio de sus efectos en los seres vivos. Posteriormente se descubrió que la exposición de las células germinales afectaba a los descendientes.

Han transcurrido más de cien años de manejo y aprovechamiento de las radiaciones ionizantes, durante los cuales se ha mantenido el interés por estudiar esos efectos, las aplicaciones médicas, bélicas y en energía han estimulado fuertemente dichos estudios y puede decirse que existe mayor información sobre las repercusiones en la salud debidas a la radiación, que las asociadas con cualquier otro agente nocivo o peligroso.

La acción de las radiaciones ionizantes sobre la célula viva puede considerarse siempre lesiva. Sin embargo, al igual que ocurre con otros agentes ambientales, su toxicidad depende de la dosis. En dosis elevadas, cualquier agente físico o químico externo a la célula resulta nocivo, e incluso letal. Los procesos que conducen a la muerte celular después de una irradiación con radiación ionizante son muy complejos y aún se encuentran lejos de una completa comprensión. Estos procesos involucran un amplio estudio científico, comenzando con la absorción física de energía y finalizando con importantes alteraciones a nivel biológico.

La radiación ionizante al incidir sobre la materia viva puede producir efectos directos e indirectos, los primeros ocurren cuando la radiación afecta directamente a macromoléculas biológicas vitales, tales como el ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN), las proteínas, las enzimas, etc., produciéndoles excitación o ionización en sus átomos que dan como resultado reacciones químicas anormales, como rupturas de la molécula de ADN que pueden causar aberraciones cromosómicas que inhabiliten la reproducción celular o a cambios en la información genética que pueden afectar el funcionamiento celular normal. Por otra parte, los efectos indirectos son provocados por reacciones químicas no deseadas y la generación de compuestos dañinos (iones, radicales libres, especies reactivas del oxígeno, etc.) para la célula producto de la interacción de la radiación con el medio celular que pueden alterar la capacidad reproductiva de la célula, así como afectar a otros productos químicos intra y extracelulares.

A pesar de que la molécula de ADN es considerada como el blanco principal de las radiaciones por las importantes consecuencias biológicas que pueden derivarse de la interacción, la acción de las partículas ionizantes con otras estructuras celulares posee una relevancia a menudo no contemplada. La importancia de la acción sobre el medio reside en que, debido a que en la célula

hay más cantidad de agua que de cualquier otro componente, la probabilidad de lesiones mediadas por la acción indirecta de la radiación es mucho mayor que la de lesiones directamente provocadas sobre biomoléculas clave. Además, la modificación molecular radioinducida puede producirse lejos del lugar de interacción con la radiación, ya que los radicales libres pueden difundirse en el medio como mínimo hasta distancias de 40 Å, pues su vida media es del orden de 10^{-5} s [Dubner, et al., 1995].

Los estudios en cultivos celulares han proporcionado resultados que amplían la visión acerca de los mecanismos moleculares y celulares relacionados con la respuesta ante la radiación ionizante. Cuanto más evolucionado es el organismo, más complejos resultan los sistemas de defensa ante agresiones externas que poseen sus células. Directamente relacionados con estos sistemas se encuentran genes responsables del control del ciclo celular, de la detección y reparación del daño en el genoma y de la expresión de proteínas relacionadas con los sistemas de defensa antioxidante. La mayor parte de los estudios en radiobiología se basan en curvas de supervivencia de líneas celulares específicas como función de la dosis administrada. Por supervivencia celular se entiende la habilidad de una célula para continuar dividiéndose indefinidamente después de tratamiento, lo cual no necesariamente significa que la célula sobreviviente se encuentre intacta, además de ignorar la respuesta sistémica del organismo irradiado.

Por lo expuesto anteriormente, una cuantificación más detallada del daño provocado por radiación ionizante implicaría el estudio del papel que desempeñan los sistemas de defensa celular, ya que la inducción de proteínas como consecuencia de la radiación recibida proporciona una interpretación inmediata del papel que juega el metabolismo en la lesión por radiación. Así mismo, es importante tener en cuenta la respuesta celular específica de cada órgano irradiado tomando en consideración al individuo como un conjunto y no como líneas celulares independientes sin interrelación alguna. El objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar la expresión a nivel de ARN mensajero de las proteínas antioxidantes Glutarredoxina, Tiorredoxina y la enzima γ -Glutamyl-cistein sintetasa, en hígado, riñón, cerebro y pulmón de ratones de la cepa BALB/c, como función de la dosis suministrada a cuerpo entero mediante radiación gamma emitida por una fuente de ^{60}Co .

En el capítulo I, se lleva a cabo una revisión de la interacción de la radiación con la materia, conceptos básicos de dosimetría y una introducción sobre sistemas dosimétricos empleados en este trabajo. En el capítulo II se describe la estructura del ADN, daño celular producido por radiación y un breve análisis de los mecanismos de defensa que posee la célula para contrarrestar los efectos provocados por la radiación ionizante. En el capítulo III se plantea el problema por resolver en este trabajo de tesis. En el capítulo IV se describen los materiales y métodos utilizados. En los capítulos V y VI se presentan los resultados, la discusión y las conclusiones correspondientes y finalmente, en el apéndice 0 se describen algunas técnicas de biología molecular relacionadas con este trabajo de investigación.

FÍSICA DE LA INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON LA MATERIA Y FUNDAMENTOS DE DOSIMETRÍA

En este capítulo se discuten conceptos relacionados con la descripción de los campos de la radiación ionizante, las nociones básicas de la interacción de la radiación con la materia y una introducción sobre los dosímetros Fricke y Termoluminiscentes.

1.1 Física atómica y Radiación

A finales del siglo XIX el entendimiento del ser humano sobre los fenómenos físicos parecía descansar sobre bases firmes. Las tres leyes de Newton aportaron conocimiento sobre el movimiento de los objetos así como de su interacción al ejercer fuerzas unos sobre otros intercambiando energía y momento. El movimiento de los planetas y cuerpos celestes fue explicado por la ley de gravitación de Newton y para entonces, la mecánica clásica tenía 200 años de antigüedad y la experiencia había demostrado que funcionaba bien.

A principios de dicho siglo, las ideas de Dalton revelaron la naturaleza atómica de la materia y en la década de 1860-1870 Mendeleiev propuso el sistema periódico de los elementos químicos. La aparentemente vasta variedad de materia en el mundo fue reducida conceptualmente a la existencia de un número finito de elementos químicos, cada uno constituido por idénticas unidades denominadas átomos. Cada elemento emitía y absorbía su propia luz característica, la cual pudo analizarse en un espectrofotómetro y establecerse como una ‘marca’ precisa del elemento.

Maxwell propuso un conjunto de ecuaciones diferenciales que explicaban el conocido fenómeno electromagnético y predijo que una carga eléctrica acelerada debía radiar energía electromagnética. En 1888, las ondas electromagnéticas fueron generadas y detectadas por Hertz confirmando admirablemente la teoría de Maxwell. Cerca del final del siglo XIX la percepción del hombre de la naturaleza del espacio, tiempo, materia y energía parecía ser fundamentalmente correcta. Mientras la investigación en Física continuaba, las leyes básicas del universo fueron consideradas como conocidas. Muy pocas voces predijeron la llegada a la costa del conocimiento, de una ola revolucionaria en Física que transformaría nuestra percepción del universo en algo inimaginable a principios del siglo XX.

1.1.1 Descubrimiento de los rayos X

El totalmente inesperado descubrimiento de los rayos X por Röntgen el 8 de Noviembre de 1895 en Wuerzburg, Alemania representa un parteaguas en la historia de la radiación ionizante en la física moderna.

En el año de 1859 Julius Plücker descubrió que en los tubos de descarga al vacío aparecía una luminiscencia en la pared de vidrio que estaba enfrente del cátodo y, debido a que el ánodo estaba colocado en el otro lado del tubo, concluyó que esa aparición no era el resultado de la transmisión eléctrica del cátodo al ánodo, sino que la luminiscencia era causada por otro tipo de rayos a los

cuales llamó “rayos de luz negativa”. Diez años después, Johann Wilhelm Hittorf, alumno de Plücker, encontró que los campos magnéticos eran capaces de desviar esos rayos y, posteriormente, Eugen Goldstein demostró que había desviación de los rayos en un campo eléctrico y les dio el nombre de “rayos catódicos”.

Philipp Lenard, asistente de Heinrich Hertz, continuó los experimentos con los nuevos rayos. Así, en el año de 1893, Lenard reemplazó parte del tubo de vidrio donde llegaban los rayos catódicos con un pedazo de papel de aluminio muy fino (“ventana de Lenard”) y encontró que dichos rayos eran capaces de salir del tubo.

Röntgen, fascinado por los experimentos de Lenard, empezó a trabajar con los rayos catódicos en el verano de 1894. Röntgen observó que un papel impregnado con un reactivo químico, $\text{Ba}[\text{Pt}(\text{CN})_4]$, brillaba con los rayos que emanaban del tubo de descarga. Este fenómeno, que parecía no tener importancia, le dio a Röntgen la pauta para descubrir a los misteriosos rayos X. Cada vez que interrumpía el circuito del tubo, Röntgen observaba que el papel dejaba de brillar en forma instantánea y cuando volvía a cerrarlo el brillo retornaba inmediatamente. De aquí concluyó que este efecto no podía ser causado por los rayos catódicos, porque al salir de la ventana de Lenard los rayos sólo eran capaces de desplazarse unos centímetros en el aire y desaparecían, por lo que no podían alcanzar al papel que se encontraba lejos del tubo. Así que consideró que debía ser otro tipo de rayos, hasta ese tiempo desconocidos, el que provocaba tal fenómeno.

Finalmente, el 28 de diciembre de 1895 entregó un manuscrito de diez páginas con el título “*Sobre un nuevo tipo de rayos*” junto con una fotografía, la cual mostraba el esqueleto de la mano de su esposa, a la consideración del Secretario de la Sociedad Médico-Física de Würzburg, con la recomendación de publicarlo de inmediato en sus anales.

El 23 de enero de 1896 Röntgen hizo una demostración dramática en la Sociedad Médico-Física al tomar una radiografía de la mano del profesor Von Kölliker quien, profundamente emocionado, propuso llamar a los rayos X “rayos Röntgen”. Desde ese día en Alemania todavía se habla de “rayos Röntgen” aunque en otros países siguen siendo rayos X. En sus tres publicaciones (diciembre de 1895, marzo de 1896 y marzo de 1897) Röntgen se dedicó a informar sobre las propiedades de los recién descubiertos rayos X, demostrando que pueden penetrar metales u otros materiales duros, pueden compensar cargas eléctricas y que su absorción depende de los materiales que penetran. Además encontró que su intensidad disminuye con el cuadrado de la distancia y que los cátodos de platino son apropiados para generarlos.

Animados con el descubrimiento de los rayos catódicos y los rayos X, muchos físicos empezaron a experimentar con ellos. Así, mientras unos estudiaban sus propiedades, otros buscaban nuevos tipos de radiaciones, dando lugar a otros descubrimientos importantes como la radioactividad en 1896, en París, por Henri Becquerel. La aplicación de los rayos X en la medicina fue de un gran impacto, ya que gracias a ellos nació la radiografía como una herramienta de diagnóstico clínico. Fue así como desde 1896 fueron fundados algunos institutos dedicados a esta rama de la Medicina (la radiología). Sin embargo, los científicos también encontraron muy rápido los efectos laterales negativos que provocaba el empleo prolongado de los rayos X; por ejemplo, informaron que “*al igual que los*

rayos del sol, los rayos X tenían la propiedad de quemar la piel'' y poco a poco aprendieron a distinguir entre la aplicación útil y los riesgos que conlleva su uso.

1.2 Radiación

La radiación es el proceso de transmisión de ondas o partículas a través de algún medio o el vacío, el término también se emplea para las propias ondas o partículas. La radiación 'ionizante' se caracteriza generalmente por su habilidad para ionizar y excitar átomos de la materia con la cual interacciona. Puesto que la energía necesaria para expulsar un electrón de valencia es del orden de 4-25 eV [Attix, 1986], la radiación debe llevar energía cinética o energía cuántica, según sea el caso, superior a este intervalo de energía para ser llamada ionizante. Este criterio incluye radiación electromagnética con longitudes de onda superiores a 320 nm, donde se incluye gran parte de la banda de radiación ultravioleta ($\approx 10\text{-}400$ nm). Sin embargo, para propósitos prácticos esta radiación ionizante -UV- no es usualmente considerada en el contexto dosimétrico debido a su poca capacidad de penetración en la materia mientras que otros tipos de radiación ionizante son generalmente más penetrantes [Attix, 1986], no obstante, estudios científicos recientes sugieren que las altas exposiciones a la radiación de la banda UVA (315-400 nm) contribuye en la inducción de cáncer de piel. Por otra parte, a pesar de que la radiación de la banda UVA tiene una mayor penetración en la piel que la correspondiente a UVB (280-315 nm), el espectro de acción (relación entre una respuesta biológica y las longitudes de onda absorbidas) indica que es la radiación en el intervalo UVB la que es absorbida por el ADN, siendo el subsecuente daño a éste el factor clave en la iniciación del proceso carcinogénico en la piel [WHO, 2006].

Los tipos más importantes de radiación ionizante que interesan en este estudio son:

1.- Rayos γ : Radiación electromagnética emitida por un núcleo atómico o liberada en un proceso de aniquilación entre materia y antimateria. La energía cuántica de cualquier fotón electromagnético está dada por:

$$E_{\gamma} = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

donde $h = 6.626 \times 10^{-34}$ J s es la constante de Planck, ν es la frecuencia asociada al fotón, λ su longitud de onda y c la velocidad de la luz en el vacío. El intervalo práctico de las energías de los fotones emitidos por átomos radiactivos comprende desde 2.6 keV hasta 7.1 MeV (emitidos por ${}^{16}_7N$).

2.- Rayos X: Radiación electromagnética emitida por partículas cargadas (usualmente electrones) al cambiar de nivel de energía atómico (llamados rayos X característicos o de fluorescencia) o al disminuir su velocidad al interactuar con un campo de fuerza coulombiano (rayos X continuos o bremsstrahlung). Nótese que los fotones de rayos X y rayos γ de una energía dada poseen idénticas propiedades físicas, la diferencia entre ellos es únicamente su origen.

3.- Electrones rápidos: Si poseen carga positiva se denominan positrones. Si son emitidos por un núcleo atómico usualmente se denominan rayos β (positivos o negativos). Si son el resultado de una colisión con una partícula cargada se conocen como rayos δ . Los haces intensos continuos de electrones de energía mayor que 12 MeV son producidos en generadores Van de

Graaff, y los haces pulsados de electrones con energías mayores son producidos por aceleradores lineales, betatrones y microtrones.

4.- Partículas cargadas pesadas: Usualmente se obtienen por aceleración mediante un campo de fuerza coulombiano en un generador Van de Graaff, ciclotrones o aceleradores lineales de partículas pesadas. Algunas partículas son emitidas por algún núcleo radiactivo como las partículas alfa, protones, deuterones, tritones, piones y otros tipos de núcleos de átomos ligeros cargados.

5.- Neutrones: Partículas neutras obtenidas por reacciones nucleares [V.gr. reacciones (p,n) o fisión] ya que no pueden ser aceleradas electrostáticamente [Attix, 1986].

La radiación ionizante puede ser:

- a) **Radiación directamente ionizante:** Partículas cargadas que depositan su energía a la materia de forma directa mediante numerosas interacciones coulombianas a lo largo de su trayectoria.
- b) **Radiación indirectamente ionizante:** Partículas no cargadas (Rayos X, γ o neutrones) las cuales transfieren su energía inicialmente a partículas cargadas del material por el cual atraviesan, siendo éstas últimas las que depositan su energía en la materia.

Los sistemas biológicos son particularmente susceptibles al daño por radiación ionizante, tanto que la absorción de una cantidad de energía relativamente baja ($\approx 4 \text{ J kg}^{-1}$) en cuerpo entero puede causar la muerte, aun cuando esta cantidad de energía es la necesaria para elevar la temperatura corporal en 0.001°C [Attix, 1986]. Claramente, la habilidad de la radiación ionizante para impartir energía a átomos individuales, moléculas y células tiene profundos efectos consecuentes. Las concentraciones de energía absorbida, puntualmente localizadas, pueden provocar la muerte celular tanto directamente como a través de la formación de especies químicas altamente reactivas tales como los radicales libres (discutidos en la sección 2.4.3).

1.3 Descripción de campos de radiación ionizante

Si se considera un punto P en un campo de radiación ionizante y tratamos de contestar a la pregunta de ¿cuántos rayos (i.e., fotones o partículas) pasan por el punto P por unidad de tiempo?, la respuesta sería ninguno, puesto que un punto no posee área de sección transversal con la cual los rayos puedan colisionar. Debido a esto el primer paso para describir el campo en el punto P es asociar algún volumen diferente de cero a tal punto. El volumen más simple que se puede considerar es el de una esfera con centro en P como se muestra en la Figura 1.1, el cual tiene la ventaja de presentar la misma área de sección transversal a los rayos incidentes en cualquier dirección [Attix, 1986].

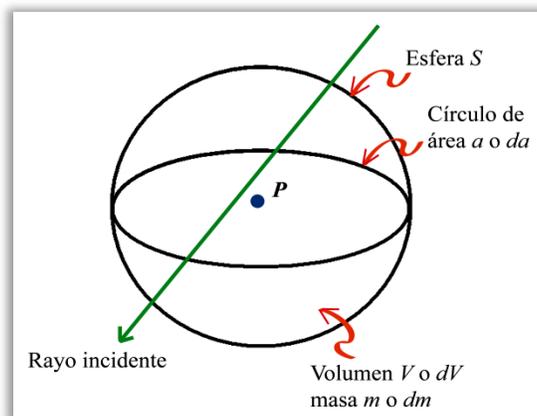


Figura 1.1 Caracterización de un campo de radiación en el punto P en términos de la radiación que atraviesa la superficie esférica S [Attix, 1986].

1.3.1 Fluencia

Basándose en la Figura 1.1, sea N_e el valor esperado del número de rayos que pasan por una esfera finita que rodee al punto P durante un intervalo de tiempo que va desde un tiempo inicial arbitrario t_0 hasta un tiempo t [Attix, 1986]. Si la esfera se reduce a un tamaño infinitesimal alrededor de P con un área transversal da se puede definir una magnitud denominada fluencia (Φ) como

$$\Phi = \frac{dN_e}{da} \quad [\text{m}^{-2} \text{ o } \text{cm}^{-2}] \quad [1.1]$$

1.3.2 Densidad de flujo (o tasa de fluencia)

La fluencia Φ está definida por la ecuación 1.1 para cualquier valor de t dentro del intervalo desde $t = t_0$ (donde $\Phi = 0$) hasta $t = t_{\text{máx}}$ (donde $\Phi = \Phi_{\text{máx}}$). Entonces para cualquier tiempo t dentro de este intervalo se puede definir la densidad de flujo o tasa de fluencia en P como

$$\varphi = \frac{d\Phi}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{dN_e}{da} \right) \quad [1.2]$$

donde $d\Phi$ es el incremento de fluencia durante el intervalo de tiempo infinitesimal dt al tiempo t . Las unidades usuales de la densidad de flujo son $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ o $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ [Attix, 1986].

1.3.3 Fluencia de energía

La magnitud descriptiva más simple de un campo de radiación que toma en cuenta las energías de los rayos individuales es la fluencia de energía Ψ , la cual suma la energía de todos los rayos incidentes. Sea R el valor esperado de la energía total (sin contar la energía de la masa en reposo) que llevan los N_e rayos que pasan por una esfera finita con centro en P durante un intervalo de tiempo $[t_0, t]$ [Attix, 1986]. Si la esfera se reduce a un tamaño infinitesimal alrededor de P se define una magnitud denominada fluencia de energía Ψ como

$$\Psi = \frac{dR}{da} \quad [\text{J m}^{-2} \text{ o } \text{erg cm}^{-2}] \quad [1.3]$$

En el caso particular en que solamente hay rayos monoenergéticos de energía E presentes, las ecuaciones 1.1 y 1.3 se relacionan por

$$R = EN_e \quad [1.4]$$

$$\Rightarrow \Psi = E\Phi \quad [1.5]$$

Las energías individuales de fotones y partículas están ordinariamente dadas en MeV o keV, las cuales pueden ser convertidas a ergs y joules mediante el uso de las siguientes equivalencias:

$$\begin{aligned} 1 \text{ MeV} &= 1.602 \times 10^{-6} \text{ erg} = 1.602 \times 10^{-13} \text{ J} \\ 1 \text{ erg} &= 10^{-7} \text{ J} = 6.24 \times 10^5 \text{ MeV} \\ 1 \text{ J} &= 6.24 \times 10^{12} \text{ MeV} = 10^7 \text{ erg} \end{aligned} \quad [1.6]$$

1.3.4 Densidad de flujo de energía (o tasa de fluencia de energía)

La fluencia de energía Ψ está definida para todos los valores de t desde $t = t_0$ (donde $\Psi = 0$) hasta $t = t_{m\acute{a}x}$ (donde $\Psi = \Psi_{m\acute{a}x}$). Entonces para cualquier tiempo t dentro de este intervalo se define la densidad de flujo de energía o tasa de fluencia de energía en el punto P como

$$\psi = \frac{d\psi}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{dR}{da} \right) \quad [1.7]$$

donde $d\psi$ es el incremento de la fluencia de energía durante el intervalo de tiempo infinitesimal dt al tiempo t [Attix, 1986]. Las unidades usuales de la densidad de flujo son $\text{Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$ o $\text{erg cm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

1.4 Descripción de un haz de fotones

El estudio racional de la dosimetría conlleva el estudio del concepto de atenuación exponencial, el cual es relevante para radiación ionizante no cargada (i.e., fotones y neutrones) que pierde su energía en relativamente pocas interacciones al contrario que las partículas cargadas, las cuales pierden su energía de manera gradual sufriendo muchas interacciones. Un fotón tiene una probabilidad significativa de pasar a través de una capa gruesa de materia sin perder energía (sin interactuar) mientras que una partícula cargada siempre pierde parte o toda su energía. Los fotones no tienen un alcance en la materia más allá del cual no puedan penetrar, por su parte, las partículas cargadas sí poseen alcance.

Consideremos un haz paralelo de N_0 fotones monoenergéticos que incide perpendicularmente sobre una placa de material de espesor L como se muestra en la Figura 1.2, suponiendo, para este caso ideal, que cada fotón incidente tiene dos posibilidades: es completamente absorbido en una sola interacción sin producir radiación secundaria o pasa a través de la placa sin cambios en su dirección y energía [Attix, 1986].

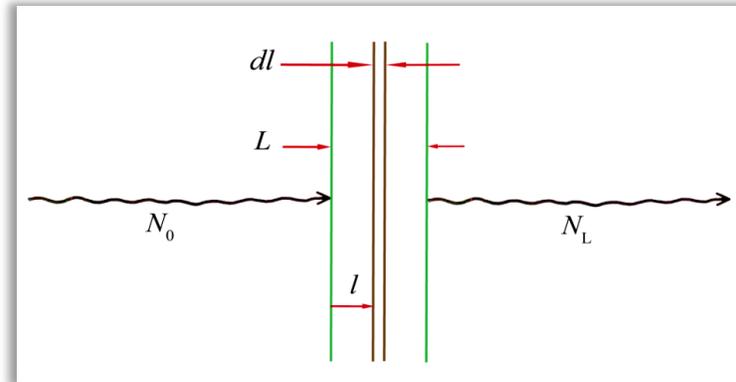


Figura 1.2 Atenuación exponencial simple [Attix, 1986]

Sea $\mu \cdot l$ la probabilidad de que un fotón interactúe en una unidad de espesor de material atravesado, entonces la probabilidad de que interactúe en un espesor infinitesimal dl es μdl . Si N fotones inciden sobre dl , el cambio dN debido a absorción es

$$dN = -\mu N dl \quad [1.8]$$

$$\Rightarrow N_L = N_0 e^{-\mu L} \quad [1.9]$$

donde N_L es el número de fotones que atraviesa la placa, μ se conoce como el coeficiente lineal de atenuación y está dado típicamente en unidades de cm^{-1} o m^{-1} y cuando éste se divide por la densidad ρ del medio atenuador se denomina coeficiente másico de atenuación μ/ρ (cm^2g^{-1} o m^2kg^{-1}) [Attix, 1986].

Magnitudes que describen la interacción de la radiación ionizante con la materia

1.4.1 Kerma

El Kerma K se define en términos de la magnitud estocástica denominada energía transferida ϵ_{tr} y la energía radiante R . La energía transferida en un volumen V es:

$$\epsilon_{tr} = (R_{in})_u - (R_{out})_u^{nonr} + \sum Q \quad [1.10]$$

donde $(R_{in})_u$ = energía radiante de partículas no cargadas que entran a V ,

$(R_{out})_u^{nonr}$ = energía radiante de partículas no cargadas que salen de V excepto la originada por pérdidas radiativas de energía cinética por partículas cargadas mientras están en V y

$\sum Q$ = energía neta derivada de masa en reposo en V .

Por pérdidas radiativas se entiende la conversión de energía cinética de partículas cargadas en energía de fotones como radiación de frenado (bremsstrahlung) o aniquilación en vuelo de positrones. En el último caso la energía cinética que lleva el positrón al instante de la aniquilación es considerada como pérdida radiativa. Por otra parte, la energía radiante se define como la energía de partículas (excluyendo la energía de la masa en reposo) emitida, transferida o recibida [Attix, 1986].

De la ecuación 1.10 se puede notar que la energía transferida es simplemente la energía cinética recibida por partículas cargadas en el volumen finito V , sin tener en cuenta dónde o cómo gasten dicha energía. Sin embargo, la energía cinética transferida de una partícula cargada a otra no está contemplada en ϵ_{tr} .

Ahora puede definirse el Kerma K en un punto de interés P en V como

$$K = \frac{d(\epsilon_{tr})_e}{dm} = \frac{d\epsilon_{tr}}{dm} \quad [1.11]$$

donde $(\epsilon_{tr})_e$ es el valor esperado de la energía transferida en un volumen finito V durante algún intervalo de tiempo arbitrario, $d(\epsilon_{tr})_e$ es la misma magnitud definida para un volumen infinitesimal dv en el punto interno P y dm es la masa de dV [Attix, 1986].

El Kerma es entonces el valor esperado de la energía transferida a partículas cargadas por unidad de masa en un punto de interés incluyendo pérdidas de energía radiativas pero excluyendo energía transmitida de una partícula cargada a otra.

El Kerma puede expresarse en unidades de erg g^{-1} , rad o J kg^{-1} . Esta última combinación de unidades se denomina gray (Gy) en honor a L. H. Gray, pionero en dosimetría. Aunque oficialmente ya no se utiliza, algunas personas siguen utilizando el rad como unidad, afortunadamente estas unidades están simplemente relacionadas por:

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1} = 10^2 \text{ rad} = 10^4 \text{ erg g}^{-1} \quad [1.12]$$

Para fotones monoenergéticos el Kerma en el punto P está relacionado con la fluencia de energía mediante el coeficiente másico de transferencia de energía $(\mu_{tr}/\rho)_{E,Z}$, el cual depende de la energía del fotón E y el número atómico Z del material en P :

$$K = \Psi \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad [1.13]$$

Aquí μ_{tr} es conocido como el coeficiente lineal de transferencia de energía [m^{-1} o cm^{-1}], ρ es la densidad [kg m^{-3} o g m^{-3}] y Ψ es la fluencia de energía en P [J m^{-2} o erg cm^{-2}].

1.4.2 Componentes del Kerma

El Kerma de fotones consiste en energía transferida a electrones y positrones por unidad de masa del medio. La energía cinética de un electrón puede transferirse de dos formas:

- 1.- Por interacciones Coulombianas con electrones atómicos del medio absorbente originando disipación local de energía, como ionización y excitación, en la trayectoria del electrón. Éstas son llamadas *interacciones de colisión*.
- 2.- Por interacciones radiativas con el campo de fuerza Coulombiano del núcleo atómico donde se emite radiación de frenado (bremsstrahlung). Los fotones emitidos son relativamente más penetrantes comparados con los electrones y llevan su energía cuántica lejos de la trayectoria de éstos [Attix, 1986].

Adicionalmente, un positrón pierde su energía cinética por aniquilación en vuelo, donde la energía cinética de la partícula en el instante de la aniquilación aparece como energía cuántica extra de los

fotones resultantes. Este también es un proceso que resulta en pérdida radiativa de la energía cinética de los electrones.

Puesto que el kerma incluye la energía transmitida a partículas cargadas que puede perderse a través de colisiones y por interacciones radiativas, el kerma puede entonces dividirse en dos componentes relacionadas con la forma en la que se pierde dicha energía: si se gasta en la producción de ionizaciones y excitaciones (K_c) o es transportada lejos por los fotones (K_r) [Attix, 1986]. Entonces:

$$K = K_c + K_r \quad [1.14]$$

donde los subíndices se refieren a **C**olisión e interacciones **R**adiativas, respectivamente.

Para fotones monoenergéticos, el kerma de colisión (K_c) está relacionado con la fluencia de energía Ψ mediante otro coeficiente dependiente de la energía y el medio absorbente $(\mu_{en}/\rho)_{E,Z}$ conocido como el coeficiente másico de absorción de energía, de forma que la ecuación análoga a la relación [1.13] es

$$K_c = \Psi \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad [1.15]$$

donde las unidades son iguales a las dadas en la ecuación 1.13.

1.5 Dosis absorbida

Para caracterizar el efecto de la radiación sobre materia viva o inanimada, se definen magnitudes relacionadas con la forma en que se absorbe la radiación. En general, cuando un cuerpo se encuentra en un campo de radiación electromagnética, una parte de esta radiación incidente sobre él se absorbe y otra parte lo atraviesa, el efecto producido depende de la cantidad de radiación absorbida.

La dosis absorbida D puede definirse en términos de la magnitud estocástica conocida como *energía impartida* ε . La energía impartida por la radiación ionizante a un material de masa m en un volumen finito V se define como:

$$\varepsilon = (R_{in})_u - (R_{out})_u + (R_{in})_c - (R_{out})_c + \sum Q \quad [1.16]$$

donde $(R_{in})_u$ y $\sum Q$ están definidas de igual forma que en la ecuación [1.10], $(R_{out})_u$ es la energía radiante de partículas no cargadas que salen de V , $(R_{in})_c$ es la energía radiante de las partículas cargadas que entran en V y $(R_{out})_c$ es la energía radiante de las partículas cargadas que abandonan V . La dosis absorbida D en un punto P en V puede definirse entonces como

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad [\text{J}\cdot\text{kg}^{-1} = \text{Gy}] \quad [1.17]$$

donde ε es el valor esperado de la energía impartida a la materia por unidad de masa en un punto [Attix, 1986]. Las unidades de la dosis absorbida son las mismas que las usadas para el kerma: $\text{erg}\cdot\text{g}^{-1}$, *rad* o Gy.

Debe notarse que D representa la energía por unidad de masa que permanece en la materia en P para producir cualquier efecto atribuible a la radiación. Algunos tipos de efectos son proporcionales

a D , mientras que otros dependen de D en formas más complicadas. La dosis absorbida es la magnitud más importante en dosimetría.

1.5.1 Equilibrio de Partícula Cargada

Una característica de la radiación indirectamente ionizante, es la de depositar su energía a través de un proceso de dos etapas. En la primera etapa se produce la interacción por la cual se transfiere energía a partículas secundarias cargadas y en la segunda etapa, estas partículas secundarias depositan energía en la materia. Por lo tanto, la contribución a la dosis absorbida a través de la interacción de radiación indirectamente ionizante en forma directa es insignificante. Si bien cada interacción inicial implica la transferencia, en un solo evento, de una gran cantidad de energía, son las partículas cargadas secundarias producidas las que imparten energía en una sucesión de eventos de ionización y excitación; fenómenos que en forma colectiva serán los causantes del efecto observado.

En dosimetría de la radiación, es muy importante llevar a cabo mediciones de dosis absorbida. Para tal efecto, resulta conveniente relacionar algunas magnitudes básicas cuando se satisfacen ciertas condiciones en la irradiación. Una de estas condiciones se conoce como equilibrio de partícula cargada (EPC), que tiene lugar en un volumen v cuando cada partícula cargada, de un tipo y energía dados, que sale de v es reemplazada por una partícula idéntica de la misma energía que entra a v , en términos de valores esperados.

Sea un medio homogéneo de volumen V que contiene un pequeño volumen v , donde las fronteras entre v y V se encuentren separadas al menos la distancia de penetración máxima de cualquier partícula cargada secundaria presente. Si se satisfacen las siguientes condiciones en V entonces existe EPC en el volumen v (en el límite no estocástico):

- La composición atómica del medio es homogénea.
- La densidad del medio es homogénea.
- Existe un campo uniforme de radiación indirectamente ionizante (la atenuación de fotones debe ser despreciable al pasar por el medio).
- No hay campos eléctricos o magnéticos inhomogéneos presentes.

Bajo estas condiciones y reduciendo v al volumen infinitesimal dv con masa dm en un punto de interés P , la dosis absorbida está dada por

$$D \stackrel{EPC}{=} K_c = \Psi \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad [1.18]$$

Esta es una relación muy importante ya que iguala la magnitud medible D con la magnitud calculable K_c [Attix, 1986].

1.6 Transferencia lineal de energía (LET)

El depósito de energía por partículas cargadas en un medio absorbente es importante para cuantificar la dosis y su efectividad biológica, debido a que para una dosis dada, los efectos biológicos dependen del tipo de partícula que haya depositado dicha dosis. Como una medida de la tasa de absorción de energía se emplea la magnitud denominada transferencia lineal de energía (LET, por las siglas en inglés de Linear Energy Transfer) definida como

$$L = - \left[\frac{dE}{dl} \right] \quad [\text{keV } \mu\text{m}^{-1}] \quad [1.19]$$

donde dE es la energía promedio impartida localmente al medio absorbente por una partícula cargada de energía específica al atravesar una distancia dl . Para un tipo dado de partícula cargada, a mayor energía menor LET y por consiguiente menor efectividad biológica [Hall, 1994].

1.7 Interacción de rayos γ con la materia

Existen 5 tipos de interacción de los rayos γ con la materia:

- 1.- Efecto Compton
- 2.- Efecto fotoeléctrico
- 3.- Producción de pares
- 4.- Dispersión Rayleigh
- 5.- Interacciones fotonucleares

Las primeras tres interacciones son las más importantes pues dan como resultado la transferencia de energía a electrones, los cuales impartirán esa energía a la materia mediante interacciones coulombianas a lo largo de su trayectoria. En la dispersión Rayleigh el fotón es dispersado ligeramente a un ángulo pequeño sin pérdida de energía. Las interacciones fotonucleares son significativas únicamente a energías mayores que unos pocos MeV, produciendo neutrones a través de una reacción (γ, n) con la consecuente radioactivación del medio irradiado.

El coeficiente másico total de atenuación para interacciones de rayos γ , despreciando interacciones fotonucleares puede escribirse, en unidades de cm^2g^{-1} o m^2kg^{-1} , como

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{\tau}{\rho} + \frac{\sigma}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} + \frac{\sigma_R}{\rho} \quad [1.20]$$

donde τ/ρ es la contribución del efecto fotoeléctrico, σ/ρ la correspondiente al efecto Compton, κ/ρ a producción de pares y σ_R/ρ a dispersión Rayleigh.

La importancia relativa del efecto Compton, el fotoeléctrico y la producción de pares depende de la energía del fotón ($E_\gamma = h\nu$) y del número atómico Z del medio de absorción. La Figura 1.3 indica las regiones de Z y E_γ en las cuales predomina cada interacción. Las curvas muestran donde dos tipos de interacción son igualmente probables.

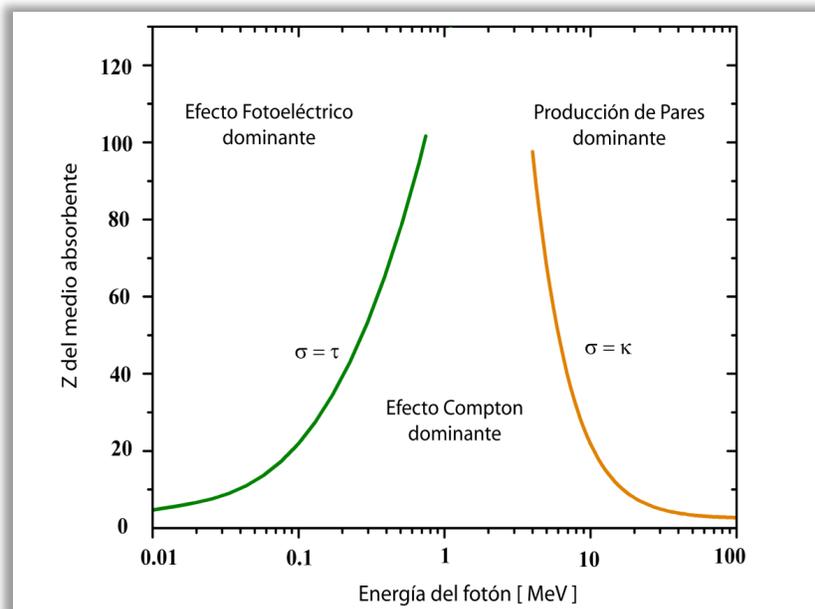


Figura 1.3 Importancia relativa de las tres interacciones más importantes de rayos- γ . Las curvas muestran los valores de Z y E_γ para los cuales dos tipos de efecto son igualmente probables [Attix, 1986].

1.7.1 Efecto Compton

El efecto Compton predomina a energías intermedias, con un intervalo amplio de energía que va desde los 20 keV hasta los 30 MeV, disminuyendo fuertemente su probabilidad de interacción al aumentar el número atómico del medio absorbente. Para describir el efecto Compton se supone que el electrón involucrado está inicialmente en reposo y no ligado. Aunque estas suposiciones no son rigurosas, ya que los electrones ocupan varios niveles de energía atómicos además de encontrarse en movimiento y estar ligados al núcleo atómico, los errores resultantes no causan consecuencias en aplicaciones de dosimetría debido a que el efecto fotoeléctrico domina en las condiciones de Z alta y $h\nu$ baja, donde los efectos de ligadura son más importantes [Attix, 1986].

La dispersión Compton ocurre cuando un fotón de energía $h\nu$ interactúa con un electrón (en reposo y no ligado), parte de la energía del fotón se transfiere al electrón y el resto sale en forma de otro fotón (denominado fotón Compton). Como resultado de la interacción, el fotón Compton sale con un ángulo ϕ y energía $h\nu'$, mientras que el electrón es dispersado a un ángulo θ y con energía cinética T (Figura 1.4).

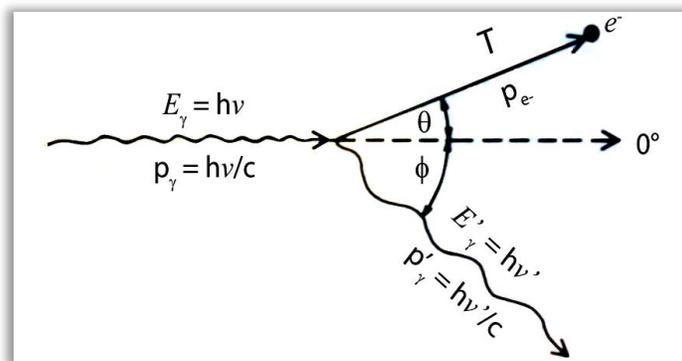


Figura 1.4 Cinemática del Efecto Compton [Attix, 1986].

La conservación de la energía y del momento lineal aplicada a la cinemática del efecto Compton da como resultado tres ecuaciones que proveen una descripción completa del proceso:

$$h\nu = 1.022 \text{ MeV} + T^- + T^+ \quad [1.21]$$

$$T = h\nu - h\nu' \quad [1.22]$$

$$\cot \theta = \left(1 + \frac{h\nu}{m_0c^2} \right) \tan \left(\frac{\phi}{2} \right) \quad [1.23]$$

donde m_0c^2 es la energía de la masa en reposo del electrón (0.511 MeV) y $h\nu$, $h\nu'$ y T están expresadas en MeV [Attix, 1986].

De las relaciones anteriores se obtiene que la energía cinética máxima del electrón $T_{\text{máx}}$ ocurre en una colisión frontal ($\theta = 0^\circ$) con un fotón de energía final $h\nu'_{\text{mín}}$:

$$h\nu'_{\text{mín}} = \frac{h\nu}{1 + 2h\nu / m_0c^2} \quad [1.24]$$

$$T_{\text{máx}} = h\nu - h\nu'_{\text{mín}} = \frac{2(h\nu)^2}{2h\nu + m_0c^2} \quad [1.25]$$

La energía $h\nu'$ de los fotones retrodispersados ($\phi = 180^\circ$) tiende a 0.2555 MeV para fotones incidentes de altas energías, mientras que $T_{\text{máx}}$ tiende a $h\nu - 0.2555 \text{ MeV}$.

La probabilidad de que un fotón sea dispersado por efecto Compton por unidad de distancia (σ) fue obtenida por O. Klein y Y. Nishina en 1928 aplicando la teoría de dinámica cuántica relativista de Dirac. El coeficiente másico de atenuación para el efecto Compton obtenido fue

$$\frac{\sigma}{\rho} = \frac{N_A Z}{A} {}_e\sigma \quad [1.26]$$

donde N_A = número de Avogadro ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$),

Z = número de electrones por átomo de un elemento o por molécula de un compuesto,

A = peso molecular del elemento o compuesto (número de gramos por mol de material),

ρ = densidad del material y

${}_e\sigma$ = sección eficaz electrónica de Klein-Nishina de un fotón dispersado a un ángulo ϕ .

La sección eficaz σ es independiente del número atómico ($\sigma \propto Z^0$), por lo que la relación [1.26] es aproximadamente independiente de Z . Esto se debe a que el intervalo de valores del cociente Z/A está entre 0.5 y 0.4, tendiendo a disminuir gradualmente conforme aumenta Z . La única excepción es el hidrógeno para el cual $Z/A = 1$. Como Z/A es prácticamente constante, se tiene que el coeficiente másico de atenuación Compton es aproximadamente independiente de Z , por lo que es básicamente el mismo para todos los materiales [Attix, 1986].

1.7.2 Efecto fotoeléctrico

El efecto fotoeléctrico es la interacción más importante entre fotones de baja energía y la materia. Ocurre cuando un fotón incidente de energía $h\nu$ interacciona con un electrón de las capas internas de un átomo con energía de ligadura E_b (el efecto fotoeléctrico no puede llevarse a cabo a menos que $h\nu > E_b$). El fotón es totalmente absorbido en la interacción (Figura 1.5).

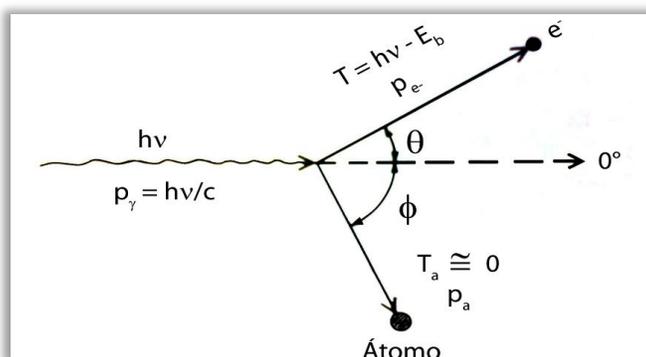


Figura 1.5 Cinemática del efecto fotoeléctrico [Attix, 1986].

La energía cinética que adquiere el electrón es independiente de su ángulo de dispersión θ y está dada por:

$$T = h\nu - E_b - T_a \quad [1.27]$$

$$T = h\nu - E_b \quad [1.28]$$

La energía cinética T_a transferida al átomo en retroceso es aproximadamente cero y se desprecia. Ya que el fotón es totalmente absorbido, no hay fotón dispersado como en el efecto Compton, que ayude a la conservación del momento. En el efecto fotoeléctrico ese papel es asumido por el átomo en retroceso cuyo momento p_a no debe despreciarse.

El coeficiente másico de atenuación para el efecto fotoeléctrico cumple la proporcionalidad:

$$\frac{\tau}{\rho} \propto \left(\frac{Z}{h\nu} \right)^3 \quad [1.29]$$

Esta relación muestra el gran dominio del efecto fotoeléctrico a bajas energías de fotones incidentes, especialmente para medios absorbentes de elevado número atómico [Attix, 1986].

1.7.3 Producción de pares

La producción de pares es un proceso en el cual un fotón interacciona con un campo de fuerza coulombiano, usualmente el cercano a un núcleo atómico. El fotón desaparece cediendo su energía

en la creación de un electrón y un positrón. Este fenómeno es un ejemplo de la materialización de la energía predicho por la teoría de la relatividad especial ($E = mc^2$) y está descrito exactamente por la electrodinámica cuántica. Si bien este proceso usualmente se lleva a cabo en las cercanías de un núcleo atómico, también puede tener lugar, aunque con menor probabilidad, en el campo de un electrón. A este proceso se le conoce como ‘producción de tripletes’ debido a que el electrón que provee el campo de fuerza coulombiano adquiere una energía cinética significativa en la conservación del momento [Attix, 1986].

Se requiere un mínimo de energía superior a $2m_0c^2 = 1.022 \text{ MeV}$ para que este evento pueda ocurrir y el remanente de energía se comparte como energía cinética entre ambas partículas. La Figura 1.6 ilustra esquemáticamente el evento de producción de pares en el campo del núcleo.

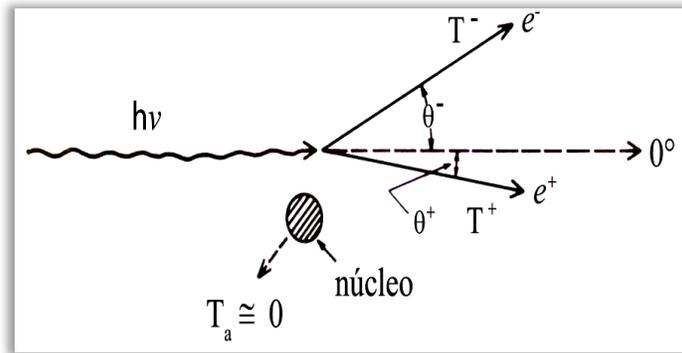


Figura 1.6 Producción de Pares [Attix, 1986]

El fotón incidente con energía $h\nu$ cede su energía cuántica en la creación de un par electrón-positrón con energías cinéticas T^- y T^+ . La conservación de la energía, ignorando la energía cinética impartida al núcleo es simplemente:

$$\begin{aligned} h\nu &= 2m_0c^2 + T^- + T^+ \\ h\nu &= 1.022 \text{ MeV} + T^- + T^+ \end{aligned} \quad [1.30]$$

El electrón y el positrón no necesariamente reciben la misma energía cinética, su energía promedio está dada por:

$$\bar{T} = \frac{h\nu - 1.022 \text{ MeV}}{2} \quad [1.31]$$

Para valores de $h\nu$ arriba de la energía umbral $2m_0c^2$, los pares se dirigen fuertemente hacia delante. El ángulo promedio relativo a la dirección del fotón incidente es aproximadamente:

$$\bar{\theta} \cong \frac{m_0c^2}{T} \quad [\text{radianes}] \quad [1.32]$$

De la teoría de Bethe y Heitler se obtiene que el coeficiente másico de atenuación para la producción de pares en el campo del núcleo es proporcional a

$$\frac{\kappa}{\rho} \propto Z^2 \left(\frac{N_A}{A} \right) \quad [1.33]$$

Nuevamente, como en el efecto Compton, Z/A es prácticamente constante y entonces se tiene que

$$\frac{\kappa}{\rho} \propto Z \quad [1.34]$$

1.8 Fundamentos de Dosimetría

La dosimetría de la radiación (o simplemente dosimetría) trata de la medición de la dosis absorbida resultado de la interacción de la radiación ionizante con la materia. Se refiere a la determinación (i.e., por medición o cálculo) de las magnitudes tales como la exposición, el kerma, la fluencia, la energía impartida, etc. A menudo se mide una sola magnitud (usualmente la dosis absorbida) y se derivan otras a partir de esta medición mediante cálculos basados en relaciones previamente establecidas.

La radiación ionizante no es perceptible por los sentidos, en consecuencia, el ser humano depende completamente de la instrumentación para la detección y medición de la radiación. Un dosímetro puede definirse generalmente como un dispositivo capaz de proporcionar una lectura r como una medida de la dosis absorbida D_g depositada en un volumen sensible V por radiación ionizante. Si la dosis no es homogénea en V entonces r es una medición de algún tipo de valor medio $\overline{D_g}$. Idealmente r es proporcional a $\overline{D_g}$ y cada elemento de volumen de V tiene la misma influencia en el valor de r , en cuyo caso $\overline{D_g}$ es simplemente la dosis promedio en V . Esta idealización es a menudo, aunque no siempre, una buena aproximación en la práctica con los dosímetros.

La mayoría de los dosímetros exhiben algún grado de no linealidad de r en función de la dosis sobre, al menos, una parte de su intervalo de dosis, o puede haber un acoplamiento pobre entre la señal que mide la dosis y el aparato de lectura. En general, uno no está interesado en medir la dosis absorbida en un dosímetro como un fin, sino como un medio para determinar la dosis (o una magnitud relacionada) en otro medio en el cual no se pueden hacer medidas directas. La interpretación de una lectura de un dosímetro en términos de la magnitud deseada es el problema central en dosimetría, lo cual usualmente es más difícil que la propia medición. En algunos casos el dosímetro puede ser calibrado directamente en términos de la magnitud deseada (por ejemplo, exposición o dosis al tejido), pero la calibración en general depende de la energía a menos que el dosímetro simule, en gran medida, al material de referencia [Attix, 1986].

1.8.1 Dosímetro Fricke (Sulfato Ferroso en medio ácido)

El sistema dosimétrico de Sulfato Ferroso conocido como dosímetro Fricke en honor al Dr. Hugo Fricke [Fricke y Morse, 1927; Fricke y Hart, 1966] está reconocido como patrón secundario de referencia para dosimetría de altas dosis [ICRU, 1969; IAEA, 1985] y es ampliamente usado en dosimetría para los procesos por irradiación con fines de calibración. Es un dosímetro químico en solución acuosa ácida y se basa en la oxidación de los iones ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) por la acción de la radiación en presencia de oxígeno molecular. Es razonablemente estable antes y después de la irradiación y es equivalente, con muy buena aproximación, al agua y a los tejidos biológicos ligeros en cuanto a densidad, número atómico y propiedades de absorción fotónica y electrónica, i.e., son equivalentes en cuanto a la dosis absorbida. El sistema tiene muy buena señal

de respuesta siendo la concentración de iones férricos producidos prácticamente proporcional a la dosis absorbida, pero en un intervalo limitado de valores de dosis de 40 a 400 Gy.

La medición se hace habitualmente por métodos espectrofotométricos, disponiéndose de una relación funcional bien establecida entre el incremento en la absorbancia, medido a una temperatura dada y la dosis absorbida. Puesto que los dosímetros acuosos usualmente consisten en soluciones diluidas, generalmente se supone que la radiación interacciona con el agua produciendo productos primarios químicamente activos. Estos productos, incluyendo radicales libres como $H\cdot$ y $OH\cdot$ así como productos moleculares tales como el H_2 y H_2O_2 están distribuidos heterogéneamente cerca de la trayectoria de las partículas cargadas.

El campo de los productos medidos se expresa como el 'valor G' el cual es el número de entidades químicas producidas, destruidas o modificadas por el gasto de 100 eV de energía absorbida:

$$G(x) = \frac{\Delta n}{\Delta E} 100 \quad [1.35]$$

donde Δn es el número de moléculas del producto x formado por unidad de volumen y ΔE es la cantidad de energía (en eV) absorbida por unidad de volumen. Para la solución Fricke se sabe que el valor G para la producción de iones férricos $G(Fe^{3+})$ es de $1.607 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ [Attix, 1986] ($15.5 \pm 0.2 \text{ moléculas} \cdot (100 \text{ eV})^{-1}$ [ICRU, 1969]) para rayos gamma del ^{60}Co .

La solución estándar Fricke está compuesta por sulfato ferroso amoniacal $(Fe(NH_4)_2(SO_4)6N_2O)$ a 0.001 M, NaCl a 0.001 M, y H_2SO_4 a 0.4 M, disueltos en agua tridestilada.

Por su sencillez y precisión, el método estándar para determinar la dosis absorbida en este dosímetro está dado en términos del cambio en la densidad óptica de una solución irradiada con respecto a otra sin irradiar. La razón de la intensidad luminosa transmitida a través de una muestra irradiada y una no irradiada es

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\Delta(DO)} \quad [1.36]$$

donde $\Delta(DO)$ es el incremento en la densidad óptica. La medición de $\Delta(DO)$ con un espectrofotómetro es rápida y precisa, además de poder obtener mediciones de pequeñas cantidades de Fe^{3+} . La absorción es medida a una longitud de onda de 304 nm ya que a esta longitud la absorción debida a los iones Fe^{2+} es menos del 0.05% de la absorción de los iones Fe^{3+} .

La dosis absorbida promedio se calcula mediante

$$\overline{D} = \frac{\Delta(DO)}{\epsilon l G(Fe^{3+}) \rho} \quad [1.37]$$

donde ϵ = coeficiente de extinción molar para el Fe^{3+} ($2187 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 304 nm y 25°C),

l = grosor de la muestra (1cm),

$G(Fe^{3+}) = 1.607 \times 10^{-6} \text{ molJ}^{-1}$ para rayos γ de ^{60}Co y

ρ = densidad de la solución Fricke (1.024 kgL^{-1} a 25°C).

Sustituyendo estos valores en la ecuación 1.37 se tiene

$$\overline{D} = 278 \cdot \Delta(DO) \quad [1.38]$$

1.8.2 Dosímetros Termoluminiscentes (TLD)

La luminiscencia se define como la desexcitación de un átomo o molécula a través de la emisión de fotones. El término luminiscencia abarca diferentes efectos específicos muy similares, cada uno de los cuales es descrito por la adición de diferentes prefijos al vocablo luminiscencia. El prefijo describe generalmente, aunque no de forma absoluta, el origen de la excitación. Ejemplos de esta nomenclatura son: Fotoluminiscencia (excitación debida a fotones de baja energía), quimioluminiscencia (excitación derivada de una reacción química), electroluminiscencia (excitación por campos eléctricos), radioluminiscencia (excitación por radiación ionizante), sonoluminiscencia (el material se excita con ultrasonidos), etc.

La termoluminiscencia, fluorescencia y fosforescencia son formas particulares de luminiscencia que no están relacionadas con los medios de excitación sino con el período de tiempo después del cual ocurre la emisión de fotones. El proceso luminiscente involucra la transferencia de energía a electrones llevándolos a un mayor nivel energético. Cuando los electrones excitados regresan rápidamente a su estado base mediante la emisión de radiación (del orden de 10 ns), el proceso se denomina fluorescencia. Por el contrario, cuando existen ‘trampas’ para electrones en el material (estados metaestables), el tiempo que les lleva a los electrones regresar a su estado base es relativamente mayor (más de 100 ms), este proceso se conoce como fosforescencia.

La transición de electrones directamente desde un estado metaestable al estado base está prohibida. Los estados metaestables representan trampas para electrones y éstos requieren energía para abandonar las trampas hacia estados excitados. Esta energía puede obtenerse en forma de radiación óptica (fotoestimulación) o como estimulación térmica. La probabilidad de escape p de un electrón desde un estado metaestable a un estado excitado está gobernada por la ecuación de Boltzmann:

$$p = s e^{-(\Delta E/kT)} \quad [1.39]$$

donde s es el factor de frecuencia, ΔE es la diferencia de energía entre los estados base y metaestable (comúnmente denominada ‘profundidad de la trampa’), k es la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

Al elevar la temperatura, la probabilidad de escape de un electrón aumenta, lo cual acelera el proceso fosforescente. A este proceso se le denomina termoluminiscencia. El espectro de emisión termoluminiscente de un material depende de la especie de los átomos luminiscentes presentes. Dado que existen diversas fuentes posibles de excitación que producen termoluminiscencia, se usará este término para describir a la emisión originada por la absorción de radiación ionizante de acuerdo con la práctica común.

La producción de termoluminiscencia en un material por radiación ionizante puede dividirse en dos fases:

- i) ionización y captura de electrones
- ii) recombinación entre huecos y electrones con emisión de luz.

La Figura 1.7 ilustra la configuración de bandas de energía para cada etapa.

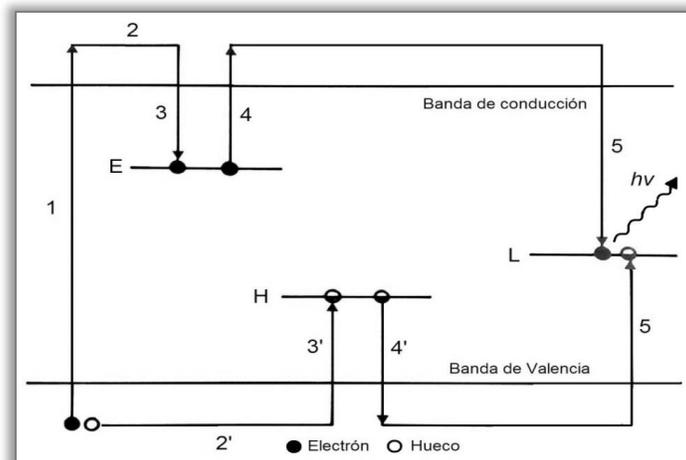


Figura 1.7 Modelo de bandas de energía para Termoluminiscencia [Shani, 1991]

En primer lugar la radiación ionizante es absorbida en el material y se liberan electrones. Lo cual es equivalente a transferir electrones de la banda de valencia a la banda de conducción (paso 1). Estos electrones tienen libertad de movimiento a través del cristal (paso 2), pero si están presentes trampas, tales como E, los electrones son capturados (paso 3). La producción de electrones libres está asociada con la producción de huecos libres positivos los cuales pueden migrar, en términos energéticos, vía la banda de valencia (paso 2'). Los huecos producidos pueden ser capturados en trampas para huecos tales como H (paso 3'). La mayoría de estos huecos capturados son térmicamente inestables y pueden decaer rápidamente a temperatura ambiente (paso 4').

Los electrones capturados pueden permanecer en sus trampas hasta que adquieran suficiente energía para escapar, esta energía se determina por dos factores principales: la profundidad de las trampas y la temperatura del material. Si se eleva la temperatura del material, los electrones atrapados pueden adquirir suficiente energía térmica para liberarse (paso 4). Los electrones liberados pueden recombinarse con huecos en los llamados 'centros de luminiscencia' tales como L, y el exceso de energía se emite en forma de un fotón luminoso (paso 5) [Shani, 1991].

Ya que una sola trampa para electrones puede contener n electrones, conforme se aumenta la temperatura del cristal se empieza a emitir una cantidad de luz que aumenta hasta un valor máximo y después disminuye, por el relativo agotamiento de los electrones que ocupaban las trampas a esa profundidad. Si se traza una curva de la cantidad de luz emitida en función de la temperatura (curva de brillo) se tendrán uno o más picos, según el número de trampas de diferente profundidad que existan en el cristal. La cantidad total de luz emitida (área bajo la curva), será proporcional a la dosis recibida por el cristal.

1.8.3 Características de los dosímetros Termoluminiscentes LiF:Mg:Ti (TLD-100)

Los dosímetros termoluminiscentes LiF:Mg:Ti, comercialmente conocidos como TLD-100, están constituidos de fluoruro de Litio (LiF) e impurezas de magnesio en una proporción de 300 partes por millón (ppm) y de titanio en una proporción de 10 a 20 ppm [McKinlay, 1981]. Son ampliamente utilizados en aplicaciones médicas ya que pueden ser colocados en pequeñas cavidades sin que se perturbe el campo de radiación. En una buena aproximación son equivalentes

a tejido ($Z_{\text{tejido}}=7.4$), tienen buena precisión y exactitud, alta sensibilidad y pueden ser reutilizados. Sus características más importantes se mencionan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1 Características de los TLD-100 [Attix, 1986; McKinlay, 1981]

<i>Densidad</i>	2.64 g cm^{-3}
<i>Número atómico efectivo</i>	8.2
<i>Espectro de emisión TL</i>	Intervalo: 350-600 nm, Máximo: 400nm
<i>Temperatura del pico principal a $40^\circ \text{ C min}^{-1}$</i>	215°C
<i>Intervalo útil de exposición y dosis</i>	$m\text{R} - 10^5 \text{R}$ $5 \times 10^{-5} - 10^3 \text{ Gy}$
<i>Desvanecimiento</i>	$<5\%/12 \text{ semanas}$

La respuesta de los TLD se ve afectada por su historial previo en campos de radiación y térmicos por lo que para remover estos efectos se llevan a cabo dos tratamientos térmicos. El primero consiste en hornear el TLD a 400°C durante una hora, dejar enfriar a temperatura ambiente y el segundo en un horneado final a 100°C por dos horas de acuerdo con el protocolo de horneado propuesto por I. Gamboa en 1996 [Gamboa de Buen, 1996].

Un lote de dosímetros termoluminiscentes puede presentar una falta de uniformidad en su sensibilidad (luz emitida por unidad de dosis recibida), por lo que su uso requiere una adecuada caracterización para minimizar las variaciones en la lectura. Esta caracterización consiste en la comparación de la respuesta individual de cada dosímetro con la respuesta promedio del lote tras ser expuestos previamente a un campo de radiación conocido. El análisis estadístico del lote permite seleccionar a aquellos dosímetros cuyas respuestas se encuentren dentro de un cierto intervalo de confianza, que en nuestro caso fue de $\bar{x} \pm \sigma$ (donde \bar{x} es el promedio del lote y σ su desviación estándar).

En la Figura 1.8 se muestra el diagrama esquemático de un lector TL típico. Se coloca el cristal dentro de la plancheta que se calienta gradualmente mediante una corriente eléctrica, la rapidez de calentamiento puede ajustarse mediante un sistema de control; conforme aumenta la temperatura, las trampas se desexcitan y la luz emitida se capta en un tubo fotomultiplicador que después pasa por un filtro que elimina la radiación infrarroja emitida por la plancheta. La señal del fototubo se amplifica y se envía a un lector, el cual acumula la carga eléctrica y da una lectura total (área bajo la curva) trazando además la curva de brillo.

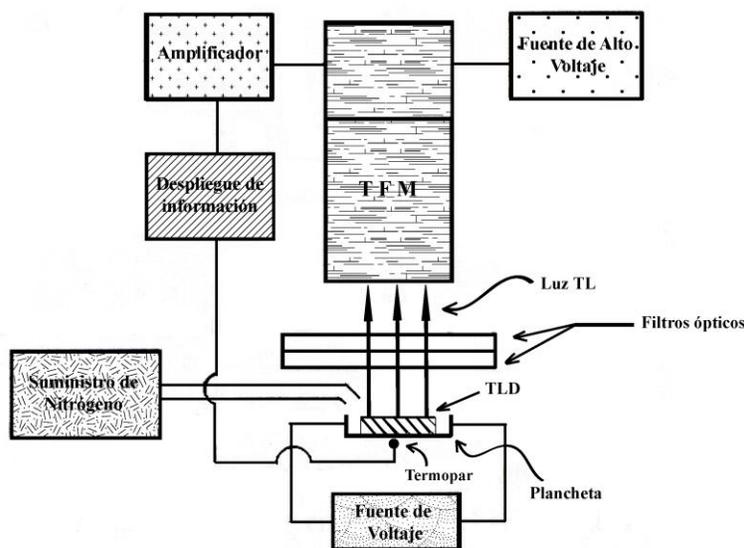


Figura 1.8 Esquema de un lector TL

1.8.4 Película de Tinte Radiocrómico (PTR)

Por definición, una reacción radiocrómica es la coloración directa de un medio por la absorción de radiación, la cual no requiere ninguna amplificación ni revelado térmico, óptico o químico. Este tipo de reacciones fueron observadas y documentadas por primera vez por el francés J. N. Niepce en 1826, mientras que el concepto de película de tinte radiocrómico fue propuesto por primera vez en 1965 [Stevens, *et al.*, 1996]. Desde entonces, estudios detallados han sido desarrollados por McLaughlin, *et al.*, (1998), así como por otros investigadores para determinar las propiedades dosimétricas de diferentes formas de medios radiocrómicos, donde gran parte de este desarrollo ha sido llevado a cabo por el NIST (National Institute of Standards and Technology). Con la reciente mejoría de exactitud y precisión en la fabricación de películas así como su resistencia y facilidad de uso, se ha hecho cada vez más popular el uso de los dosímetros radiocrómicos en aplicaciones médicas y de investigación.

En los últimos 15 años, el uso de las películas de tinte radiocrómico (PTR) se ha extendido rápidamente en el ámbito médico debido a la amplia comercialización que han tenido. Actualmente, diferentes tipos de dosímetros radiocrómicos en forma de películas delgadas películas gruesas, geles y soluciones líquidas son utilizados en dosimetría de la radiación ionizante en un amplio intervalo de dosis absorbida ($10^{-2} - 10^6$ Gy) y rapidez de dosis absorbida (hasta 10^{12} Gy s^{-1}).

Las PTR son dosímetros constituidos por una base de plástico a la que se le agrega un precursor de tinte que genera color al ser irradiado. En el presente trabajo se emplearon películas de tinte radiocrómico GafChromic® HD-810 creadas por ISP Technology, las cuales están compuestas por láminas de monómeros cristalinos sensibles a la radiación, distribuidos en un sustrato, sobre una lámina firme de poliéster para dar soporte (Figura 1.9).

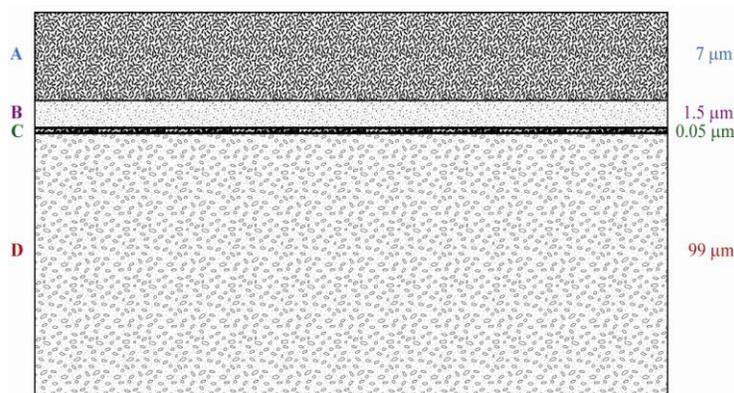


Figura 1.9 Configuración de la película de tinte radiocrómico HD-810. A Capa sensible. B Capa adhesiva. C Capa conductiva. D Base de poliéster claro. [McLaughlin, *et al.*, 1998]

Las PTR GafChromic® HD-810 son translúcidas antes de ser irradiadas, adquiriendo una coloración azul que se torna progresivamente más oscura a medida que aumenta la cantidad de energía impartida en el volumen expuesto de la película como consecuencia de las reacciones químicas poliméricas. Estas reacciones se traducen en un cambio en la densidad óptica que es proporcional a la cantidad de energía absorbida.

La composición aproximada de los constituyentes químicos de la HD-810 se muestra en la tabla 1.2. Las propiedades de absorción de la radiación de los dosímetros de película de tinte radiocrómico pueden ser ajustadas mediante el cambio en su composición así como para simular el material de interés donde se desea conocer la dosis (tejido, hueso, etc.).

Tabla 1.2 Composición aproximada de las películas GafChromic® [McLaughlin, *et al.*, 1998]

Capa	Elemento	Porcentaje
<i>Base de Poliéster</i>	C	45 %
	H	36 %
	O	19 %
<i>Sensible</i>	C	31 %
	H	56 %
	N	5 %
	O	8 %
<i>Adhesiva</i>	C	33 %
	H	50 %
	O	17 %
<i>Conductiva</i>	Óxido de indio-estaño	

Cuando el componente activo de la película HD-810 es expuesto a radiación, reacciona para formar un polímero azul con una absorción máxima cercana a los 670 nm, tal como se muestra en el espectro de absorción de la Figura 1.10.

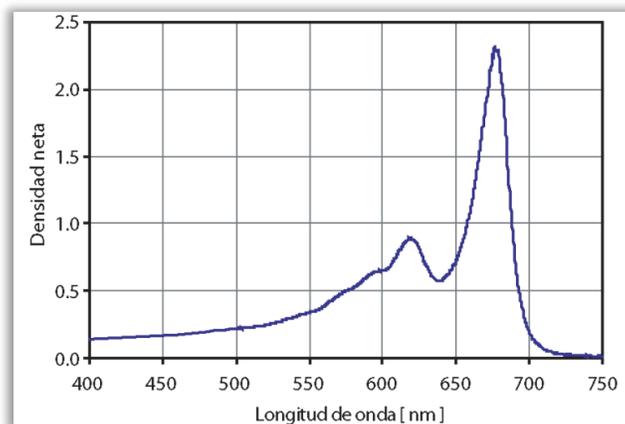


Figura 1.10 Espectro de absorción característico de las películas GafChromic®. La densidad neta es el cambio de densidad óptica debido a la dosis absorbida.
[ISP Product Brochure, <http://online1.ispcorp.com>]

Algunas de las características de las películas GafChromic® HD-810 se muestran en la tabla 1.3.

Tabla 1.3 Características de las película GafChromic® HD-810 [McLaughlin, *et al.*, 1998]

<i>Tamaño estándar</i>	20 x 25 cm
<i>Intervalo de dosis útil</i>	50 – 2500 Gy
<i>Espesor Nominal</i>	107 μm
<i>Capa sensible</i>	$7 \pm 1 \mu\text{m}$
<i>Número atómico efectivo</i>	6.0 – 6.5
<i>Resolución espacial</i>	Mayor que 1200 líneas mm^{-1}
<i>Tiempo de estabilización del color después de la irradiación</i>	24 h
<i>Efecto por dosis fraccionadas</i>	< 1%
<i>Efecto por tasa de dosis</i>	< 5%
<i>Efecto por humedad</i>	< 2%

Se ha estudiado la respuesta de las películas radiocrómicas con respecto a la energía de los fotones. Esta dependencia con la energía puede afectar las propiedades dosimétricas de la película cuando se desea analizar un espectro de radiación de energías desconocidas. El bajo número atómico de la mayoría de las PTR comerciales hace que su respuesta sea menos dependiente de la energía que la respuesta de las películas radiográficas hechas con halogenuro de plata, la cual presenta una gran dependencia con la energía debido a la elevada densidad de los materiales que las componen.

Muench, *et al.*, (1991), demostraron que la respuesta de la GafChromic® HD-810 disminuye cerca de 30% cuando la energía efectiva de los fotones disminuye de 1710 keV a 28 keV tal como se puede observar en la Figura 1.11 A y B.

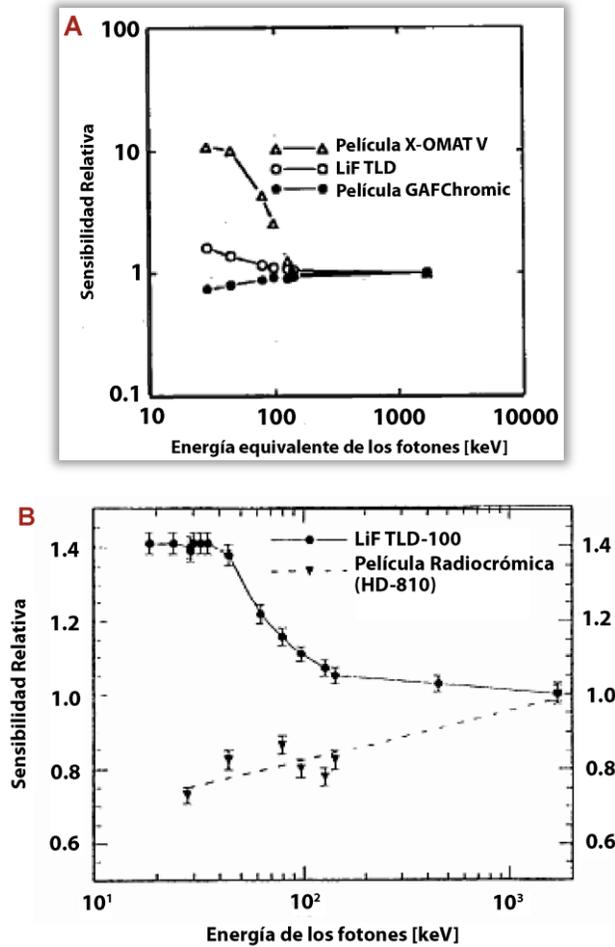


Figura 1.11 Respuesta de las películas HD-810 en función de la energía efectiva de los fotones. **A** En escala logarítmica [modificada de Muench, *et al.*, 1991] **B** En escala lineal [modificada de McLaughlin, *et al.*, 1998]

1.8.4.1 Dosimetría de las PTR

Para llevar a cabo el análisis cuantitativo de la dosis, se mide el cambio en la densidad óptica de la PTR mediante un densitómetro, un espectrofotómetro o un escáner de transmisión o reflexión. La densidad óptica (DO) se obtiene mediante la relación

$$DO = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad [1.40]$$

donde I_0 es la intensidad de la luz medida en ausencia de la película e I es la intensidad de luz transmitida a través de la película en dirección perpendicular al plano que ésta forma.

En el caso del densitómetro y el espectrofotómetro, la respuesta (R) de la película se define como:

$$R = DO_{\text{película irradiada}} - DO_{\text{película sin irradiar}} \quad [1.41]$$

donde las densidades ópticas se miden a una longitud de onda dada, generalmente a aquella para la cual la absorción es máxima. Cabe señalar que cuando se comparan respuestas entre diferentes películas, las cuales usualmente poseen espesores diferentes, la respuesta se normaliza por el espesor de la película.

Cuando se emplea un escáner de transmisión o reflexión, la respuesta se define de la siguiente manera:

$$R = \log_{10} \left(\frac{TC_{si}}{TC_i} \right) \quad [1.42]$$

donde TC_{si} es el tono de color (rojo, verde o azul) de la película sin irradiar y TC_i es el tono de la película irradiada.

Con propósitos dosimétricos, Porfirio Díaz A. (2005) llevó a cabo un análisis mediante el cual obtuvo las curvas de calibración (respuesta en función de la dosis) de las películas GafChromic® HD-810 para cada tono de color (rojo, verde y azul). En el presente trabajo se utilizó la curva de calibración correspondiente al tono rojo obtenida en dicho análisis (Figura 1.12).

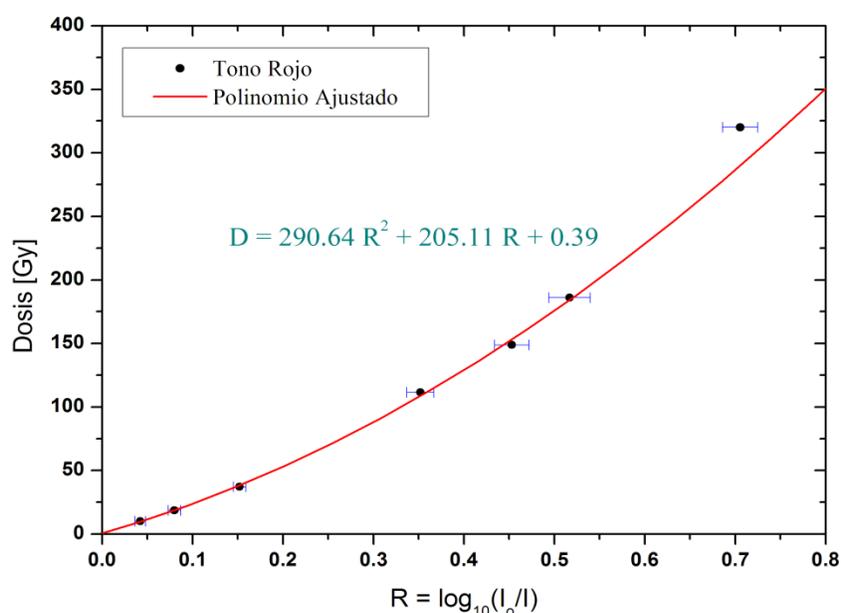


Figura 1.12 Curva de calibración de la película GafChromic HD-810 correspondiente al tono rojo, en un intervalo de dosis de 0 a 320 Gy [Díaz, 2005].

Se escogió esta curva en particular por que ofrece un intervalo de respuesta mayor en comparación con los tonos verde y azul, lo cual permite obtener una respuesta con mejor precisión en el intervalo de dosis de 0 a 320 Gy.

Para llevar a cabo los cálculos de distribución de dosis se empleó el polinomio de segundo orden obtenido por Porfirio Díaz del ajuste de sus datos experimentales:

$$D = 290.64 \left[\log_{10} \left(\frac{TC_{si}}{TC_i} \right) \right]^2 + 205.11 \left[\log_{10} \left(\frac{TC_{si}}{TC_i} \right) \right] + 0.39 \quad [1.43]$$

$$D = 290.64R^2 + 205.11R + 0.39$$

ADN, DAÑO PRODUCIDO POR RADIACIÓN IONIZANTE, MECANISMOS DE REPARACIÓN CELULAR Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.

En este capítulo se describe de forma introductoria la estructura y funcionalidad del ADN, el daño celular ocasionado por radiación ionizante, algunos mecanismos de reparación celular y sistemas de defensa antioxidante.

2.1 Estructura del ADN

El material genético de todos los organismos vivos está formado solamente por 6 componentes. Estos son: una molécula de azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y cuatro bases nitrogenadas diferentes (adenina, guanina, citosina y timina). La unidad básica de la molécula de ADN se denomina nucleótido, o más precisamente desoxinucleótido. Éste está constituido por una desoxirribosa con un grupo fosfato unido en un carbono y una de las bases nitrogenadas unidas a otro (Figura 2.1). Los átomos de carbono de la porción desoxirribosa del nucleótido se enumeran siempre de igual manera, por lo que la base nitrogenada siempre está unida al carbono 1, y el grupo fosfato siempre en el carbono 5 [Kreuzer y Massey, 2001].

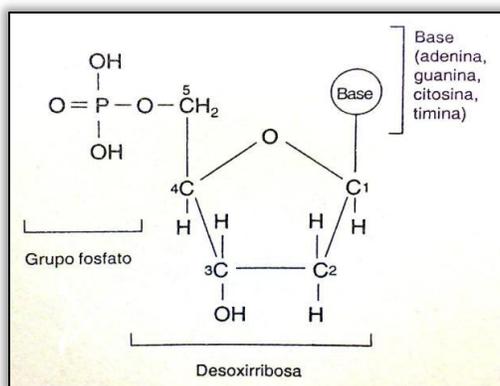


Figura 2.1 Nucleótido. Los átomos de carbono del azúcar desoxirribosa se enumeran de acuerdo con la convención química [Kreuzer y Massey, 2001].

En una molécula de ADN, millones de estos nucleótidos forman una cadena uniendo el grupo fosfato del carbono 5 de una molécula de desoxirribosa con el carbono 3 de otra molécula de desoxirribosa, originándose una molécula de agua libre al producirse esta unión. La Figura 2.2 muestra un ejemplo de la unión de 3 nucleótidos. Las uniones formadas entre las moléculas de desoxirribosa por el puente de fosfato se denominan uniones fosfodiéster. Los extremos de la molécula de la Figura 2.2 se marcan como 5' y 3' según el átomo de carbono que podría formar la próxima unión en la cadena a partir de ese extremo.

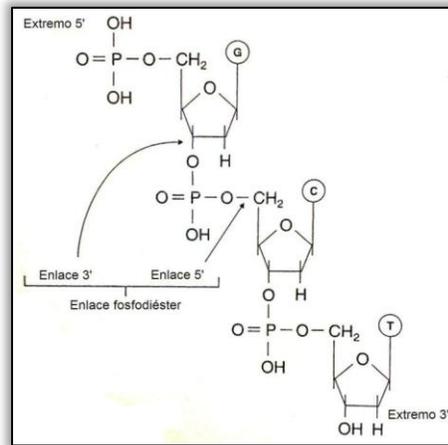


Figura 2.2 Un trinucleótido [Kreuzer y Massey, 2001].

El esqueleto azúcar-fosfato del ADN es un importante elemento estructural, pero toda la información está contenida en las cuatro bases. La clave para la transmisión de información genética reside en una característica especial de la molécula de doble cadena de ADN: la adenina y la timina siempre están unidas a través de un par de puentes de hidrógeno formando un par químicamente estable; y lo mismo sucede con la guanina y la citosina, unidas por tres puentes de hidrógeno (Figura 2.3).

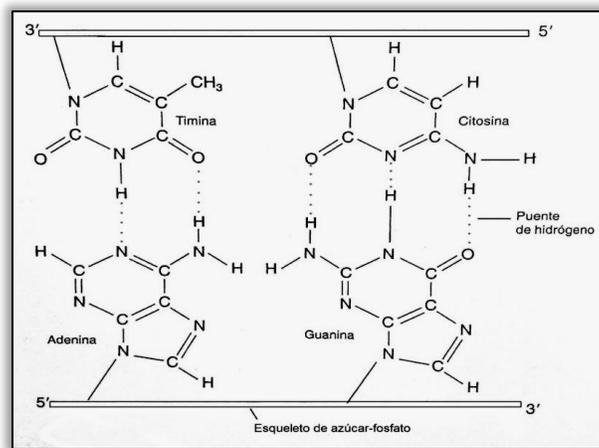


Figura 2.3 Pares de bases complementarias al ADN [Kreuzer y Massey, 2001].

En una molécula de ADN, dos esqueletos azúcar-fosfato se unen a lo largo, uno dispuesto del extremo 5' al extremo 3' (5'-3') y el otro en sentido opuesto (3'-5'). Las bases que están unidas a una cadena se aparean con sus bases complementarias unidas a la cadena opuesta (Figura 2.3). Así el orden de las bases específicas de una cadena está perfectamente reflejado en el orden de las bases complementarias de la otra. Conociendo la secuencia de bases de una cadena se puede deducir la secuencia de bases de la cadena complementaria.

Dado que la secuencia de nucleótidos de una cadena describe implícitamente la secuencia de la cadena complementaria, una molécula o región de ADN a menudo se representa en sentido 5'-3' [Kreuzer y Massey, 2001].

2.2 Función del ADN: transmisión de la información

Para que el ADN dirija el desarrollo de los organismos vivos, la información debe ser convertida en proteínas. Una proteína es una cadena de aminoácidos. Los aminoácidos son pequeñas moléculas orgánicas formadas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Todas las proteínas se forman a partir de 20 tipos diferentes de aminoácidos los cuales se unen entre sí en orden variable para formar cadenas lineales llamadas péptidos o cadenas peptídicas.

Las proteínas celulares están generalmente formadas por más de una cadena de péptidos y adquieren estructuras tridimensionales complejas, lo que les permite interactuar o unirse a otras moléculas y realizar sus funciones. Existen bajo una asombrosa variedad de formas y una amplia diversidad de funciones.

Cuando los aminoácidos se unen para formar una cadena proteica, esta cadena inmediatamente se pliega sobre sí misma para adoptar una forma determinada que es la más estable energéticamente. Esta forma estable está determinada por las interacciones de los aminoácidos individuales que forman la proteína. Por lo tanto, la identidad de cada aminoácido y el orden en el cual aparecen en la cadena determinan la forma tridimensional final de la molécula. Consecuentemente, el orden de los aminoácidos en la cadena es extremadamente importante para la función de la proteína.

El ADN determina la secuencia de aminoácidos para formar proteínas, cada aminoácido está representado por una secuencia de tres pares de bases de ADN. Estos tripletes de bases se denominan codones. El orden de los codones en una secuencia de ADN se refleja en el orden de los aminoácidos que forman la cadena proteica (Figura 2.4). El segmento completo de ADN necesario para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína individual es un gen. El conjunto de genes de un organismo se denomina genoma [Kreuzer y Massey, 2001].

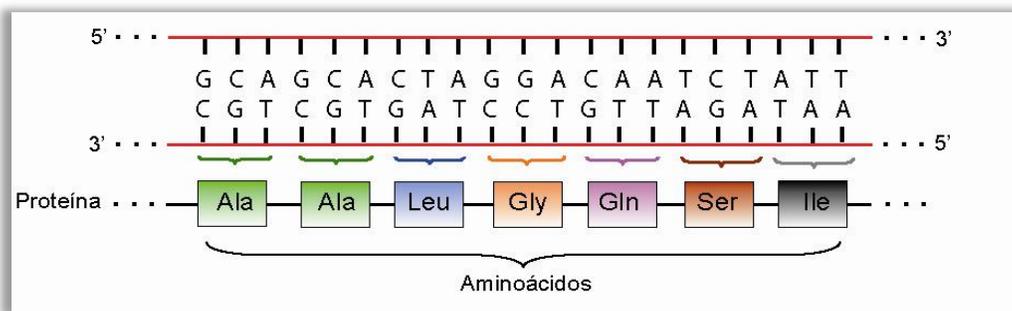


Figura 2.4 La secuencia de bases del ADN determina la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

2.3 Síntesis de proteínas

El proceso mediante el cual se producen las proteínas a partir del código genético consta de varias etapas. El ADN es el depositario de información mientras que la síntesis de las proteínas tiene lugar

en sitios especiales de la célula llamados ribosomas, por lo tanto, el primer paso en la síntesis de proteínas es transmitir la información desde el ADN a los ribosomas. Para realizar este paso, existen enzimas celulares que sintetizan una copia de trabajo de un gen para llevar su código genético a los ribosomas. Esta copia de trabajo se llama ARN mensajero (ARNm), que transporta hasta los ribosomas el código genético para una proteína.

En el segundo paso de la síntesis de proteínas, los codones en el ARNm deben ser apareados con el aminoácido correcto. Este paso es realizado por un segundo tipo de ARN denominado ARN de transferencia (ARNt). Finalmente, los aminoácidos deben unirse para formar la cadena proteica, y el ribosoma (formado por proteínas y ARN) desempeña esta función. Cuando la cadena proteica está completa, una señal genética de terminación o 'stop' le informa al ribosoma que libere la proteína en la célula [Kreuzer y Massey, 2001].

2.3.1 ARN

La síntesis de proteínas requiere un tipo especial de molécula de ácido nucleico: el ARN. Al igual que el ADN, el ARN está formado por nucleótidos compuestos por un azúcar, un fosfato y una de cuatro bases orgánicas diferentes. Sin embargo, existen tres diferencias importantes entre ADN y ARN, dos de ellas son químicas y la restante es estructural. Las diferencias químicas son que (1) en lugar del azúcar desoxirribosa, el ARN contiene el azúcar ribosa, y (2) en lugar de la base timina, el ARN contiene la base uracilo (Figura 2.5).

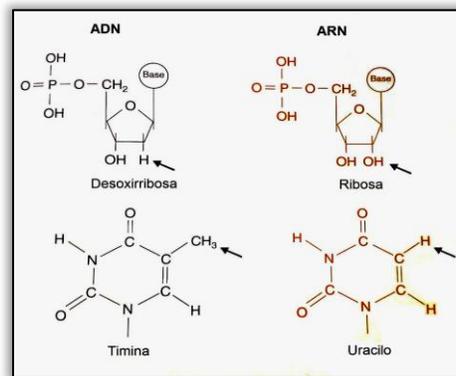


Figura 2.5 Diferencias químicas entre ADN y ARN [Kreuzer y Massey, 2001].

El esqueleto azúcar-fosfato del ARN está unido de manera similar al del ADN, y las bases se unen al carbono 1, al igual que en el ADN. La diferencia estructural importante es que aunque las bases de ARN pueden formar también pares complementarios, el ARN está formado por una sola cadena de esqueleto azúcar-fosfato y bases, por lo que no se presenta en forma de doble hélice (Figura 2.6). Esta estructura de cadena simple del ARN es la ideal para realizar su función de transferencia de información [Kreuzer y Massey, 2001].

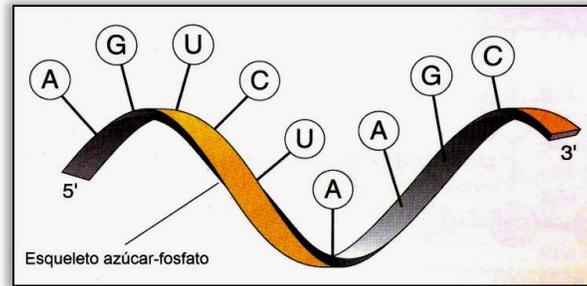


Figura 2.6 Molécula de ARN [Kreuzer y Massey, 2001].

2.3.2 Síntesis de ARNm

El primer paso para la síntesis de proteínas es la formación de ARNm. Este proceso se asemeja a la replicación de ADN en muchos aspectos: primero, la doble hélice debe separarse para dejar al descubierto la información contenida en el o los genes. Después, la enzima ARN polimerasa une los nucleótidos complementarios (que contienen azúcar ribosa, dado que es ARN) que se aparean con las bases expuestas. Durante la síntesis de ARN, la base uracilo sustituye a la timina y se aparea con la adenina. Finalmente, el nuevo ARNm contiene una secuencia de bases exactamente complementaria a la hebra molde de ADN.

El proceso que emplea un ADN molde para crear una molécula de ARNm complementario se denomina *transcripción* (Figura 2.7). Las moléculas de ARNt y ARN ribosomal (ARNr) también están codificadas en el ADN y son sintetizadas por transcripción, pero a diferencia del ARNm, no se traducen a proteínas.

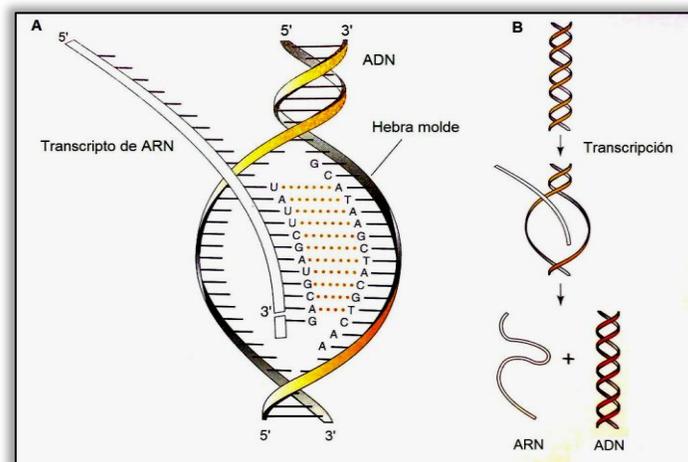


Figura 2.7 Transcripción. (A) El apareamiento de bases de un ribonucleótido entrante y el molde de ADN dirige la formación de una molécula de ARNm complementaria. El ADN molde se cierra detrás del sitio de síntesis del ARN, liberando la nueva molécula de ARN. (B) En la transcripción, una hebra de ADN individual se utiliza como molde. El transcripto de ARN es liberado, dejando intacta la molécula de ADN [Kreuzer y Massey, 2001].

La ARN polimerasa desempeña una tarea muy interesante ya que no solamente debe seleccionar a los nucleótidos complementarios adecuados y unirlos entre sí (como lo hace la ADN polimerasa), sino también debe ‘decidir’ dónde comienza un gen. Una hélice de ADN puede contener miles o

millones de pares de bases, y la ARN polimerasa debe determinar exactamente dónde comenzar y dónde terminar la síntesis de ARN de manera tal que se transcriba un gen completo. La forma en la que la ARN polimerasa reconoce el inicio y fin de la síntesis del ARN radica en la secuencia de bases del ADN, pues existen ‘señales de tráfico’ especiales. Una señal muy importante se denomina ‘promotor’, que consiste en una secuencia de bases de ADN que indica a la ARN polimerasa el lugar de inicio de la síntesis de ARN, y de igual forma los ‘terminadores’ indican a la ARN polimerasa dónde debe concluir dicha síntesis.

Junto o cerca de la secuencia promotora se encuentran secuencias de ADN denominadas ‘moduladoras’ o elementos de respuesta, que son sitios en donde se unen proteínas que funcionan como factores de transcripción. Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión génica, en muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Estas proteínas se unen a secuencias del ADN en el sitio de inicio de la transcripción o al complejo de transcripción promoviendo o inhibiendo la actividad del complejo. Los factores de transcripción conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales. El conjunto de estos factores en una célula dibuja una red transcripcional cuyas conexiones determinan el conjunto de genes que se expresan en un determinado momento.

Las redes de señalización intracelular están íntimamente relacionadas con las redes transcripcionales. La activación de complejas cascadas de señalización intracelular desemboca, en muchos casos, en la activación o supresión de uno o varios factores de transcripción que van a orquestar una respuesta determinando el patrón de genes expresados por la célula. Una fina regulación de los factores de transcripción es fundamental para el correcto funcionamiento de la maquinaria celular [Kreuzer y Massey, 2001].

2.3.3 Síntesis de una proteína a partir del ARNm

Después de que se ha completado la transcripción, el ARNm se dirige al ribosoma, el sitio específico de la síntesis de proteínas. El ribosoma reconoce al ARNm y lo sostiene de una manera adecuada para que sus codones puedan ser leídos correctamente con la finalidad de traducir a aminoácidos el código de bases del ADN expresado en el ARNm. Las moléculas encargadas de descifrar el código molecular son otro tipo de ARN: el ARNt (ARN de transferencia).

Las moléculas de ARNt se pliegan sobre sí mismas. En la punta de uno de sus lóbulos se encuentra una secuencia de tres bases que se denomina ‘anticodón’ (Figura 2.8). Este anticodón se aparea exactamente con uno de los codones de la cadena sencilla de ARNm, empleando las reglas del apareamiento de bases complementarias. En el otro extremo de la molécula de ARNt se encuentra el aminoácido correspondiente a su anticodón, las enzimas llamadas aminoacil sintetasas se encargan de esta unión. Como resultado, cuando el anticodón del ARNt se aparea con el codón correspondiente en el ARNm, el aminoácido específico queda colocado correctamente en el ribosoma.

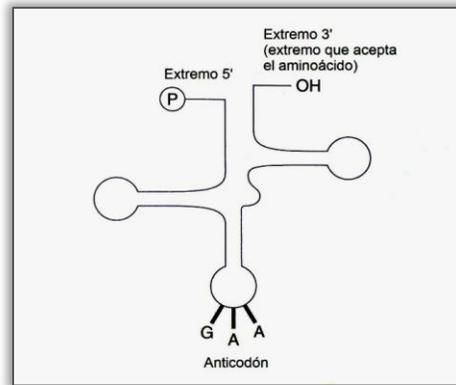


Figura 2.8 Molécula de ARNt. El apareamiento de bases complementarias entre diferentes porciones de la molécula de ARNt mantiene la forma de la molécula [Kreuzer y Massey, 2001].

El ribosoma mantiene a la molécula de ARNm para que se aparee con un codón complementario a la vez, uno a uno, y por orden. Como el ARNt lleva unido el aminoácido correcto, el ribosoma une este aminoácido a la cadena proteica naciente. Una vez que el aminoácido se une a la proteína, la molécula de ARNt se separa y se libera del complejo ARNm-ribosoma (Figura 2.9). Este proceso, en el cual la secuencia de bases del ARNm es traducida a una secuencia de aminoácidos se denomina ‘traducción’ [Kreuzer y Massey, 2001].

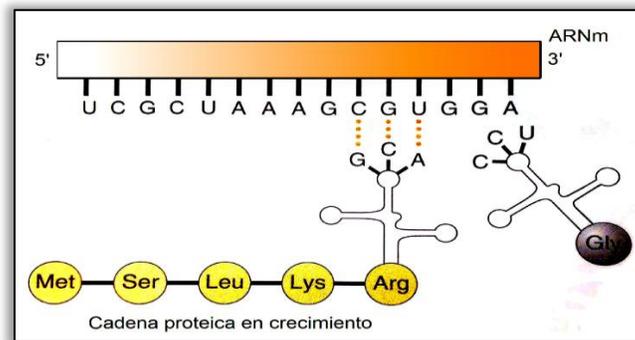


Figura 2.9 Traducción. El apareamiento de bases complementarias entre los anticodones de la molécula de ARNt y los codones del ARNm dirigen la formación de la cadena de los aminoácidos [Kreuzer y Massey, 2001].

2.4 Ciclo Celular y daño provocado por radiación

El ciclo celular es una secuencia de etapas o fases que atraviesa una célula entre una división y la siguiente. En los organismos eucariotas, la división celular por mitosis es un proceso complejo que requiere no sólo la replicación del patrimonio genético de la célula madre y su posterior distribución a las células hijas, sino también la duplicación de todos los componentes intracelulares que serán necesarios para la constitución de una nueva célula.

El ciclo celular comprende cuatro períodos denominados G1, S, G2 y M, los cuales se muestran en la Figura 2.10.

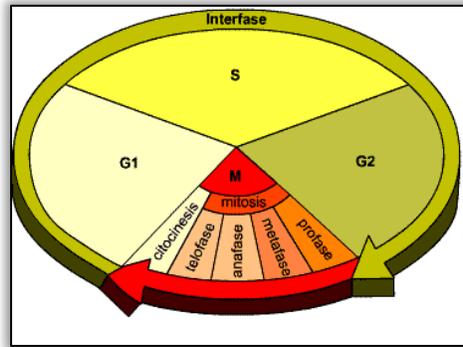


Figura 2.10 Etapas del ciclo celular.

La fase G1 (del inglés *gap*, intervalo) es la primera fase del ciclo celular, en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. Después de la mitosis la célula posee un bajo contenido de ATP resultante del gasto experimentado en el ciclo anterior, por lo que en este período se produce la acumulación del ATP necesario y el incremento de tamaño celular. Es el período que más variación de tiempo presenta, pudiendo durar días, meses o años. Las células que no se dividen nuevamente (como las nerviosas o del músculo esquelético) pasan toda su vida en este período, que en estos casos se denomina G0, ya que las células se retiran del ciclo celular.

La fase S (Síntesis) es la fase del ciclo en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio.

La fase G2 es la fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN. Debido a que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía, la fase G2 representa un nuevo período de crecimiento y de adquisición de ATP. En esta fase la célula comprueba que se ha completado correctamente la replicación del ADN y se produce la síntesis de los componentes necesarios para la mitosis. Esta fase termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis.

La fase M (mitosis) se divide en varias etapas: durante el periodo de *profase*, los cromosomas se condensan debido a la mayor compactación del ADN. Durante la *metafase* las cromátidas hermanas producidas por la replicación del ADN en la fase S se alinean en el centro de la célula permaneciendo adheridas a la altura del centrómero y de múltiples puntos a lo largo de toda su longitud. En la *anafase*, las cromátidas hermanas se separan y se desplazan hacia polos opuestos del huso mitótico, con lo que una de las dos cromátidas hermanas se distribuye a cada célula hija. Finalmente, en la *telofase* (última fase de la mitosis) los cromosomas segregados se descondensan y se produce la división física del citoplasma en dos células hijas, proceso denominado citocinesis. Después de la división, las células regresan a la fase G₁ y el ciclo celular se completa.

Para todos los organismos es esencial que las diferentes fases del ciclo celular estén correctamente coordinadas, es decir, las fases deben seguir un orden estricto y cada una de ellas debe completarse antes de que se inicie la siguiente. Los errores que surgen durante la coordinación del proceso

pueden conducir a alteraciones cromosómicas importantes, como por ejemplo a la pérdida de cromosomas completos o parte de ellos, o a la distribución inadecuada del material genético en las dos células hijas. Por tanto, el control del ciclo celular eucariota es muy estricto y está regulado por proteínas denominadas proteínas cinasas (o proteínas quinasas), cuya función es la de activar determinadas proteínas por fosforilación. A su vez, las concentraciones de estas enzimas se encuentran reguladas por otras proteínas, llamadas ciclinas, que aumentan y disminuyen durante el ciclo celular. Por tanto, estos complejos proteicos se denominan proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK) y sólo son activos si están constituidos por una subunidad ciclina y una subunidad catalítica proteína cinasa, ya que las ciclinas son las enzimas que determinan qué proteínas serán fosforiladas por el complejo CDK-ciclina, y de esta manera regulan el avance de la célula a través del ciclo celular.

2.4.1 Radiosensibilidad

A pesar de que la interacción entre radiación y materia viva está relativamente bien caracterizada a escala molecular, los efectos sobre la célula en su conjunto resultan más complicados de explicar. Dichos efectos emergen de las consecuencias de las lesiones producidas sobre los constituyentes celulares. La combinación de procesos desencadenados por la radiación al interactuar con el material genético, las proteínas y otros componentes de la célula dan lugar a la respuesta global de ésta.

Esta respuesta es muy variable en función del tipo celular y las características de la radiación (dosis, tasa de dosis, energía). A la mayor o menor afectación celular de los diferentes tipos celulares presentes en el organismo al ser irradiados se la llama radiosensibilidad. La radiosensibilidad depende del tipo celular, y está fuertemente relacionada con la actividad mitótica. No obstante, para un determinado tipo de célula, la respuesta a la radiación puede verse modificada por factores químicos (presencia de compuestos radiosensibilizantes/radioprotectores) o biológicos (fase del ciclo celular y eficacia de los mecanismos de reparación).

En 1906, dos científicos franceses, Bergonié y Tribondeau, observaron que la radiosensibilidad era una función del estado metabólico del tejido que se irradiaba y formularon una teoría. Ésta se conoce como la ley de Bergonié y Tribondeau y se ha verificado en numerosas ocasiones. Básicamente, la ley establece lo siguiente:

- Las células madre son radiosensibles; las células maduras son radiorresistentes.
- Los tejidos y órganos más jóvenes son radiosensibles.
- Los tejidos con una actividad metabólica elevada son radiosensibles.
- Una gran tasa de proliferación celular y una gran tasa de crecimiento de tejidos originan un crecimiento de la radiosensibilidad [Bushong, 2010].

2.4.2 Acción directa e indirecta de la radiación

Cuando la radiación interactúa con la materia pierde su energía ionizando, excitando y disociando las moléculas que componen el material atravesado. A escala atómica y molecular estos son los fenómenos que ocurren independientemente de que la materia que sufre la acción de las radiaciones sea inerte o viva. Pero en este último caso, las modificaciones sufridas por los átomos y moléculas

que componen la célula viva tienen importantes consecuencias a nivel biológico. Una macromolécula ionizada modificará su actividad química, perdiendo o alterando su funcionalidad específica. Cuando sea excitada podrá volver a su estado original emitiendo fotones o rompiendo enlaces covalentes, lo cual puede suponer un daño biológico. En este sentido, el blanco más importante de la célula es el ADN, molécula que contiene la información biológica esencial para el correcto funcionamiento de la célula. Al daño inmediato de las macromoléculas fundamentales por interacción con la radiación se conoce como *acción directa de la radiación*.

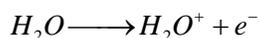
El principal componente del medio que compone el citoplasma, en el que se encuentran suspendidas las estructuras celulares, es el agua. A consecuencia de la acción de las partículas ionizantes sobre este componente se producen radicales libres. Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones no apareados en sus orbitales externos. Un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Así mismo también pueden formarse radicales libres cuando un enlace covalente se rompe y cada electrón de la pareja compartida permanece en un átomo (fisión homolítica). Como consecuencia de poseer electrones no apareados, estas especies químicas son extremadamente reactivas y tienen por tanto una vida media corta (10^{-5} s). Cuando dos radicales se encuentran se combinan formando un enlace químico al compartir dichos electrones. La reactividad de los radicales libres varía muchísimo, existiendo unos pocos que proceden de sustancias orgánicas complejas que son muy estables y no se recombinan con facilidad. Sin embargo, esto es la excepción más bien que la regla y la mayoría de los radicales libres, formados por la radiación, son altamente reactivos.

Los radicales libres son capaces de difundir lo suficiente para alcanzar y dañar a los blancos críticos, así como iniciar reacciones químicas no deseadas o participar en la producción de compuestos tóxicos para la célula. Esta es la llamada *acción indirecta de la radiación*.

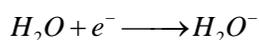
2.4.3 Producción de Radicales Libres

En la célula no irradiada, la producción de radicales procedentes del oxígeno se debe mayoritariamente al proceso de respiración llevado a cabo en las mitocondrias. Como producto de desecho de esta respiración celular se producen aniones superóxido que se pueden combinar con dos iones hidrógeno (H^+) para dar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), altamente oxidante. De los radicales derivados del oxígeno, el más reactivo es el grupo hidroxilo ($OH\bullet$), siendo el principal agente atacante del ADN [Dubner, *et al.*, 1997].

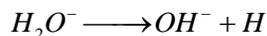
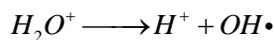
El mecanismo de generación de radicales libres en medio acuoso por la radiación es el siguiente. La absorción por parte del agua de la energía procedente de la radiación provoca la salida de un electrón y la formación de un ión positivo, como indica la reacción:



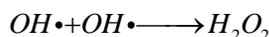
El electrón es capturado por otra molécula de agua, con lo que se forma otro ión, que en este caso será negativo:



Los iones H_2O^+ y H_2O^- son muy inestables y se descomponen con facilidad siempre que en el medio estén presentes moléculas de agua no ionizadas, con la consiguiente formación de otros iones y radicales libres:



Los iones H^+ y OH^- pueden combinarse y producir una nueva molécula de agua o reaccionar químicamente y afectar a las macromoléculas presentes. La probabilidad de que se recombinen es superior a la de que reaccionen y produzcan un daño celular. No obstante, su alta reactividad y movilidad en el medio hace que su acción se propague a través de éste, pudiendo provocar lesiones en lugares distantes de su origen. También la unión de radicales entre sí puede provocar otro tipo de moléculas tóxicas para la célula, tal es el caso del peróxido de hidrógeno, como por ejemplo en la reacción:



La importancia de la acción sobre el medio reside en que, debido a que en la célula hay más cantidad de agua que de cualquier otro componente la probabilidad de lesiones mediadas por estos mecanismos es mucho mayor que la de lesiones directamente provocadas sobre las biomoléculas clave. Además, la modificación molecular radioinducida puede producirse lejos del lugar de interacción con la radiación, ya que los radicales libres pueden difundirse en el medio como mínimo hasta distancias de 40Å [Dubner, *et al.*, 1995].

Además de la molécula de ADN, otros componentes celulares pueden ser dañados con importantes consecuencias para la célula. Las ionizaciones pueden producir cambios en los lípidos de la membrana celular, alterando su permeabilidad. Asimismo, la radiación puede desregular la actividad enzimática y desnaturalizar proteínas por cambio en su estructura. Las dosis altas de radiación llegan a causar la muerte celular inmediata por fallo mitocondrial al desorganizarse las crestas mitocondriales y la cadena de fosforilación oxidativa [Biete, 1990].

2.4.4 Radicales libres de oxígeno

La molécula de oxígeno, como tal, puede ser calificada de birradical puesto que tiene dos electrones no apareados. Sin embargo, la reactividad de esta molécula es más baja de la que cabría esperar debido a que los espines de estos dos electrones presentan direcciones paralelas. Para que el oxígeno pudiese oxidar un átomo o molécula que no fuese radical libre aceptando un par de electrones, éstos deberían ser de espines paralelos [Cadenas, 1989; Jamieson, 1989]. Según el principio de exclusión de Pauli, los espines de los electrones de un orbital atómico o molecular nunca tienen direcciones paralelas, por tanto, para que el oxígeno molecular aumentase su reactividad habría de invertirse el espín de uno de los electrones de sus orbitales externos, o bien, sufrir una reducción secuencial y univalente produciendo radicales libres de oxígeno.

La inversión de los electrones de los orbitales externos del oxígeno molecular origina dos formas de oxígeno singulete: el oxígeno singulete δ que, debido a su larga vida media, es el de mayor importancia biológica, y el oxígeno singulete σ , más reactivo que el anterior pero de corta vida media porque rápidamente decae al estado δ [Cadenas, 1989; Webster y Nunn, 1988]. Cuando un único electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el ión radical superóxido ($\cdot O_2^-$). Ésta es

una especie química muy reactiva pero inestable en soluciones acuosas, ya que reacciona consigo misma mediante una reacción de dismutación [Cadenas, 1989; Fridovich, 1983].

Si son dos electrones los que se incorporan a la molécula de oxígeno se forma el ión peróxido (O_2^{2-}), cuya forma protonada es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este compuesto es peligroso para las células porque es un potente oxidante que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y del que se puede originar el ya mencionado radical hidroxilo. [Pryor y Church, 1991]. La reducción del oxígeno molecular por tres electrones da lugar al citado radical hidroxilo. Esta especie es una de las más reactivas que se conocen y, por tanto, presenta una vida media y un radio de acción muy cortos (microsegundos y angstroms, respectivamente). Así, un radical hidroxilo formado en la mitocondria será improbable que, por sí mismo, tenga un efecto directo en otras partes de la célula [Pryor, 1986].

2.4.5 Reactividad de los radicales libres de Oxígeno

La mayoría de los radicales libres de interés biológico suelen ser extremadamente reactivos e inestables, y aunque su vida media es muy corta, cuando reaccionan con un compuesto no radical pueden formarse otros radicales libres, de manera que es posible que se creen reacciones en cadena y den lugar a efectos biológicos lejos del sistema que originó el primer radical. Un ejemplo lo constituye la peroxidación de lípidos [Harman, 1992; Webster y Nunn, 1988]. Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las reacciones de los radicales libres. A continuación, se describen los daños que pueden sufrir estas moléculas debido a los radicales libres.

1.- Proteínas. Las proteínas son modificadas de diferente manera por las especies reactivas de oxígeno. Los radicales libres de oxígeno, por ejemplo, pueden reaccionar directamente con el ligando metálico de muchas metaloproteínas. Se ha comprobado que el hierro de la oxihemoglobina puede reaccionar con el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno para formar metahemoglobina [Freeman y Grapo, 1982]. Otra importante hemoproteína citoplasmática, la catalasa, es inhibida por el $\bullet O_2^-$, que la convierte en sus formas inactivas ferroxí y ferrilo [Kono y Fridovich, 1982]. Debido a la reactividad de los radicales libres con las moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptofano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones de sus aminoácidos mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado que enzimas dependientes de dichos aminoácidos para desarrollar su actividad, sufren también alteraciones en su estructura proteica, que dan lugar a entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares [Freeman y Grapo, 1982; Gebicki S. y Gebicki J. M., 1993; Stadtman, 1992; Webster y Nunn, 1988; Wolpp, *et al.*, 1986].

Los enlaces peptídicos también son susceptibles de ser atacados por los radicales libres. Estos enlaces pueden romperse tras la oxidación de residuos de prolina por radicales hidroxilo o superóxido [Wolff y Dean, 1986]. Finalmente, la reacción de los radicales libres con las proteínas también puede generar subproductos que amplificarían el daño inicial.

2.- Lípidos. Los radicales libres hidroxilo y el oxígeno singulete pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos. [Aikens y Dix, 1991; Choe, *et al.*, 1995; Halliwell y Gutteridge, 1989]. Este proceso de peroxidación lipídica comienza cuando el radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metílenos de la cadena carbonada para formar un radical libre lipídico. Los ácidos grasos poliinsaturados de membrana son especialmente susceptibles de ser atacados por radicales libres, puesto que contienen grupos metílenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando el radical lipídico se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose un dieno conjugado que puede reaccionar con el O₂ y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado adyacente para formar, de nuevo, un radical libre lipídico y un hidroperóxido [Rice-Evans y Burdon, 1993].

El radical lipídico se combina con otra molécula de oxígeno y así se establece una cadena de propagación del daño oxidante. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, si entra en contacto con iones metálicos de transición, producirá más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y, por tanto, su funcionalidad se ve alterada [Rice-Evans y Burdon, 1993]. Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis [Blake, *et al.*, 1987; Pryor y Church, 1991]. Estos productos pueden también alterar la actividad fosfolipasa e inducir la liberación de ácido araquidónico y la subsiguiente formación de prostaglandinas y distintos endoperóxidos [Sevanian, *et al.*, 1981]. El malondialdehído, que es otro producto final de la peroxidación de ácidos grasos con tres o más dobles enlaces, puede causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana [Nielsen, 1981; Valenzuela, 1991]. Así pues, las propiedades de las membranas aún resultan más dañadas.

3.- Ácidos nucleicos. El daño a los ácidos nucleicos se produce por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el OH•. [Harman, 1992; Randerath, *et al.*, 1992; Higuchi y Linn, 1995]. Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de hebras del ADN, lo cual puede generar aberraciones cromosómicas. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se producen mutaciones, aberraciones cromosómicas, o bien la célula muere [Cerutti, 1985; Demple, 1990].

4.- Carbohidratos. Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical OH• para producir sustancias reactivas [Blake, *et al.*, 1987; Sies, 1985]. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso fragmentándose a unidades más sencillas. Greenwald y Moy (1980) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

2.4.6 Estrés oxidante y especies reactivas del Oxígeno

A excepción de aquellos organismos llamados anaerobios, que están adaptados para vivir en ausencia de oxígeno, los microorganismos, los animales y las plantas aerobias requieren oxígeno para obtener energía química (ATP) esencial para la vida. Sin embargo, los organismos aerobios se enfrentan con la paradójica situación de que el oxígeno, indispensable para su supervivencia, es al mismo tiempo un agente tóxico [Halliwell y Gutteridge, 1989; Scandalios, 2005].

La toxicidad del oxígeno es consecuencia de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, 'Reactive Oxygen Species'). En 1954, Rebeca Gerschman, postuló que la mayor parte del daño producido en organismos vivos por el oxígeno a altas presiones se debía a la formación de radicales libres del oxígeno [Gerschman, *et al.*, 1954; Gilbert, 1981]. Esta hipótesis fue muy controvertida, hasta que en 1968, McCord y Fridovich descubrieron la superóxido dismutasa, enzima que cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, demostrando así la existencia de dichas especies [McCord y Fridovich, 1969].

Las ROS se generan como resultado del metabolismo intracelular normal, fundamentalmente en las mitocondrias y los peroxisomas, así como a partir de una gran variedad de sistemas citosólicos enzimáticos. Además, numerosos agentes externos son capaces de generar la formación de ROS en el organismo tales como radiación UV, radiación ionizante y los agentes tóxicos ambientales. Un complejo sistema de defensa enzimático y no enzimático actúa regulando los niveles de ROS en el organismo para mantener un estado de equilibrio en la célula. Esto es posible porque la síntesis de las proteínas involucradas en la respuesta antioxidante está modulada por los niveles de ROS, de manera que cuando éstos aumentan se estimula su síntesis.

De forma similar, cuando existe un incremento de los niveles de ROS, tanto por un aumento de su concentración como por una disminución en los mecanismos de defensa, se pierde el balance entre la aparición de especies nocivas y la capacidad de la célula de evitar acumulación, originándose una situación conocida como estrés oxidante [Sies, 1985]. En estas condiciones, las ROS reaccionan con las macromoléculas de las células modificando su estructura y su función, dando lugar a alteraciones que pueden desembocar en muerte celular.

2.5 Respuesta celular ante la radiación ionizante

Con base en diversos análisis de factores físicos (dosis absorbida, energía de la radiación, LET, rapidez de dosis, etc.) y biológicos (respuesta celular, experimentación con animales, estudios epidemiológicos, etc), el UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) concluyó que para radiación de baja LET (Rayos X, rayos gamma, electrones) se consideran bajas dosis de radiación aquellas menores que 0.2 Gy, dosis intermedias aquellas entre 0.2 y 2.0 Gy y dosis altas a las mayores que 2.0 Gy [UNSCEAR, 1986 y UNSCEAR, 2000].

En el intervalo de dosis bajas ($D < 0.2$ Gy), una insignificante cantidad de células (o núcleos celulares) presentarán más de un evento de absorción de energía, de modo que la respuesta celular estará dominada por absorciones individuales actuando de forma independiente y por tanto, se esperaría que aumentase linealmente con la dosis y ser independiente de la tasa de dosis.

En el intervalo de dosis intermedias ($0.2 \text{ Gy} \leq D \leq 2.0 \text{ Gy}$) hay numerosos eventos de absorción de energía por célula. Con base en datos experimentales, cuando se presenta un número considerable de eventos de absorción por célula, la menor dosis a la cual se obtiene un efecto significativo se encuentra usualmente cercana al valor límite de esta región ($\sim 2.0 \text{ Gy}$). La acción de un solo evento de absorción en este intervalo de dosis supondría que los procesos metabólicos relevantes para la célula no se ven afectados de ninguna forma por eventos adicionales teniendo como resultado el mismo daño biológico. Bajo esta suposición, es común la interpolación lineal desde esta región hacia dosis bajas para deducir la efectividad de la radiación en dicho intervalo de dosis, no obstante, esta suposición es inválida tal como ha sido demostrado por estudios radiobiológicos, en su mayoría con células *in vitro* y también de animales expuestos a distintas tasas de dosis.

En el intervalo de dosis altas ($D > 2.0 \text{ Gy}$) se presenta una gran cantidad de eventos de absorción de energía por célula, los cuales se traducen en una respuesta no lineal con curvaturas en la gráfica de dosis-respuesta. Las formas más simples de relaciones dosis-respuesta que han sido observadas experimentalmente pueden ser comúnmente ajustadas con polinomios con coeficientes correspondientes a dosis y tasa de dosis. A altas dosis se requiere de un coeficiente distinto que cuantifique los efectos por muerte celular.

En el intervalo de dosis intermedias-altas ($D > 1 \text{ Gy}$) las lesiones radioinducidas dan lugar a respuestas bien caracterizadas. Estas son:

- **Muerte en interfase.** Es una muerte celular que se produce antes de que la célula entre en mitosis. Está relacionada con una disminución en la capacidad de producción de energía por parte de las mitocondrias y con lesiones graves de las membranas plasmáticas. El resultado es la lisis o ruptura celular. Puede ocurrir en cualquier célula, pero es más frecuente en las más radiosensibles.
- **Retraso mitótico.** Es un retraso de la evolución normal hacia la mitosis que suele dar lugar a una sobrecarga mitótica en el período postirradiación ya que llegarán a la mitosis las células que les corresponde en evolución normal, más aquellas que se habían retrasado. Este retraso es dependiente de la dosis, de la fase del ciclo en que se encuentra la célula y del tipo celular. La radiación actúa como sincronizador celular deteniendo momentáneamente a todas las células en fases menos sensibles del ciclo.
- **Fallo reproductivo.** Consiste en la pérdida de viabilidad celular, es decir, la célula pierde su capacidad para dividirse repetidamente, muriendo al cabo de pocas divisiones. Para fines radiobiológicos, las células no viables son consideradas como células muertas [Gil, 1994].

2.6 Mecanismos de Reparación Celular

Existen mecanismos de detección y reparación de los daños que pueden afectar al material genético. La eficacia de estos mecanismos es muy alta [Cleaver, 1994]. Esto significa que la mayoría de las modificaciones que sufre el genoma son corregidas y no tienen consecuencias para la célula. Sin embargo, en determinadas ocasiones no se consigue reparar el daño al ADN, lo que suele conducir a la muerte celular. Las principales razones que influyen en la falta de reparación son la cantidad de lesiones producidas, que puede llegar a saturar la acción de los sistemas reparadores, y la calidad de las mismas. En algunas ocasiones, el proceso de eliminación de las lesiones del ADN conduce a una

restauración de la estructura de la doble hélice, pero sin recuperar la información que contenía originalmente. Esta situación supone un mal menor para la célula, pero puede tener importantes repercusiones para el organismo completo [Friedberg, *et al.*, 1995].

Puede ocurrir que el proceso de reparación de lesiones en el ADN lleve consigo la restitución de su estructura de doble hélice apta para proseguir con los procesos de replicación y transcripción, es decir, compatible con la vida, pero a costa de flexibilizar la fidelidad con que habitualmente se mantiene la información genética. En estos casos pueden aparecer consecuencias letales o mutagénicas para la célula que se manifiestan en plazos variables.

Los daños producidos sobre bases o la pérdida de éstas, darán lugar a mutaciones puntuales del tipo de las sustituciones de bases (transiciones o transversiones) o a pequeñas inserciones o deleciones de pocas bases. La consecuencia de estos cambios sobre las proteínas codificadas será la sustitución de algún aminoácido con la consiguiente alteración de su funcionalidad.

Cuando la mutación puntual ocurre en un punto preciso de un gen relacionado con el cáncer (oncogén, supresor o reparador) podría en principio iniciar un proceso canceroso. Igualmente, mutaciones que afectan a sitios de regulación de otros genes tendrán consecuencias diversas.

En el caso de algunos productos químicos ha sido posible establecer con claridad cuál es el tipo de lesión preferente que producen en el ADN, así como el tipo de mutación mayoritaria a que ésta da lugar [Walker, 1995]. Así, puede establecerse una relación directa y completa entre exposición, lesión y mutación. Sin embargo, actualmente no se dispone del conocimiento suficiente para estimar este tipo de relación en el caso de las radiaciones ionizantes. El tipo de lesiones producidas por la radiación es muy variado y muchas de ellas son comunes a otros agentes mutagénicos, e incluso a mecanismos endógenos de la célula. Por eso resulta muy difícil asignar inequívocamente un tipo determinado de lesión a la radiación.

Las bases nitrogenadas se aparean según el principio de complementariedad de Watson y Crick, es decir, A con T (adenina con timina) y C con G (citosina con guanina). Cuando una base nitrogenada se modifica por unión con un hidrógeno se denomina base tautómera (A^* , T^* , G^* , C^*). La radiación ionizante es capaz de inducir la creación de bases tautómeras, dando lugar a un cambio en la secuencia de bases y por tanto, produciendo una mutación. Estas bases modificadas no se combinan normalmente según el principio de complementariedad, sino que lo hacen de forma anómala (A^* con C , C^* con A , T^* con G , T con G^*).

El conocimiento actual del genoma [Crollius, *et al.*, 2000] y los resultados experimentales disponibles hasta el momento son insuficientes para establecer con precisión cuál sería la frecuencia media de mutación inducida por una determinada dosis de radiación. Si además se deseara caracterizar estas mutaciones habría que incorporar otros factores muy importantes, como la capacidad de reparación del ADN, la respuesta general al estrés celular y la diversidad de tipos celulares existentes.

2.7 Sistemas de defensa antioxidante

Para protegerse contra el daño causado por el estrés oxidante, las células poseen sistemas de defensa antioxidantes. Estos sistemas son muy variados y actúan a distintos niveles y en diferentes momentos.

Una sustancia antioxidante es aquella que, a concentraciones relativamente bajas con respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de dicho sustrato [Halliwell y Gutteridge, 1989]. Según su momento de actuación en el organismo, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios.

- **Primarios.** Son aquellos que impiden la formación de radicales libres.
- **Secundarios.** Interrumpen la reacción de la propagación de los radicales libres por inactivación (V.gr. ácido ascórbico y α -tocoferol) o desplazan a los radicales libres (V.gr. glutatión, carotenoides y la mayoría de las enzimas antioxidantes).
- **Terciarios.** Reparán el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que han sido degradadas.

Dentro de los sistemas antioxidantes, se puede hablar de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Sistemas antioxidantes

<i>Tipo</i>	<i>Ubicación celular</i>
<i>Enzimáticos</i>	
Superóxido dismutasas (SOD)	Mitocondria (MnSOD) Citosol (Cu-Zn SOD)
GSH peroxidasas	Citosol y Mitocondria
Catalasas	Citosol y Mitocondria
<i>No enzimáticos</i>	
Vitamina E (α -tocoferol)	Membrana celular
Vitamina C (ácido ascórbico)	Citosol
GSH	Citosol y mitocondria
Tiorredoxina	Citosol y Mitocondria
Glutarredoxina	Citosol y Mitocondria
Ácido lipoico	Citosol, mitocondria y membranas celulares
Carotenoides	Membrana Celular
Ubiquinonas	Membrana Celular

2.7.1 Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Las células disponen de enzimas específicas para la neutralización de las distintas especies reactivas como la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , existen distintas formas, dependiendo del metal del centro catalítico: I_2Zn , Cu -SOD citosólica, la Mn-SOD mitocondrial y la EC-SOD extracelular [Fridovich, 1975]. La catalasa (CAT) que cataliza la descomposición del H_2O_2 a H_2O , está presente en la mayoría de las células eucariotas, localizándose a nivel de peroxisomas. Las glutatión-peroxidasas (GPx) y las glutatión S-transferasas (GST) que reducen hidroperóxidos a alcoholes. Los mecanismos no enzimáticos comprenden moléculas como el glutatión (GSH), el ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno o provitamina A, vitamina E (α -tocoferol), proteínas transportadoras de metales como la cupreína y ferritina además

de otras proteínas como tiorredoxina, glutarredoxina, etc. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario.

2.7.2 El Sistema Tiorredoxina (Trx)

Este sistema antioxidante está compuesto por tres proteínas: la tiorredoxina y las enzimas tiorredoxina reductasa y tiorredoxina peroxidada [Halliwell y Gutteridge, 1989]. La proteína Trx fue descubierta como donadora de hidrógeno a la ribonucleótido reductasa (enzima que provee desoxirribonucleótidos en la replicación de ADN) en *E. coli* [Holmgren, 1989]. En mamíferos se han descrito dos isoformas, la Trx1, citosólica y nuclear, y la Trx2, mitocondrial. La Trx1 es cofactor (molécula colaboradora en las acciones enzimáticas) de las peroxirredoxinas, encargadas de la reducción del peróxido de hidrógeno [Watson, *et al.*, 2004]. Igualmente, está involucrada en la síntesis y reparación de ADN (Figura 2.11), es cofactor de las metionina sulfóxido reductasas y de las sulfato reductasas [Powis y Montfort, 2001] y es la responsable de mantener un ambiente reductor en el núcleo, lo que permite que factores de transcripción se unan al ADN [Watson, *et al.*, 2004].

En condiciones basales, cerca del 95% de la Trx1 citoplasmática y nuclear se encuentra en estado reducido [Nkabyo, *et al.*, 2002; Watson y Jones, 2003]; además, puesto que su concentración es mucho menor que la del glutatión, se ha postulado que su principal función se encuentra en procesos de señalización celular [Watson, *et al.*, 2004]. Por otra parte, estudios realizados por Nkabyo y colaboradores [2002], así como por Trotter y Grant [2003] muestran que el estado redox del glutatión y de la Trx se regulan de manera independiente, puesto que Trx se mantiene reducida aún bajo condiciones en que el GSH ha sido consumido y oxidado; aunque también se ha demostrado que la Trx1 puede ser glutationilada, inhibiendo su actividad, lo cual hace suponer una conexión entre ambos reductores [Casagrande, *et al.*, 2002]. La Trx es una óxidoreductasa que cataliza la reducción de puentes disulfuro, por lo que juega un papel importante en la regulación del estado redox de los tioles de las proteínas [Sen, 1998]. La forma oxidada de la proteína es reducida directamente por la NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y la tiorredoxina reductasa.

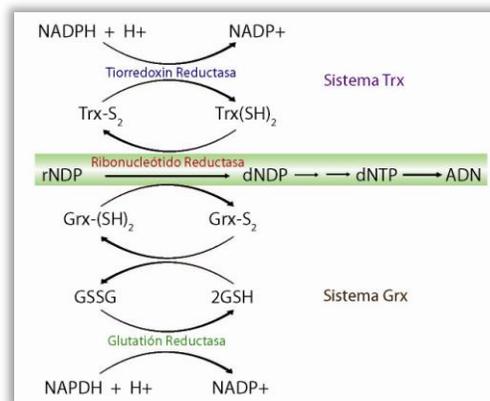


Figura 2.11 Papel de los sistemas Trx y Grx como donadores de hidrógeno a la ribonucleótido reductasa reduciendo ribonucleósido difosfatos (rNDP) a desoxirribonucleósido difosfatos (dNDP), éstos últimos dan lugar a los desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP), precursores del ADN, a partir de la acción de la nucleósido difosfato quinasa.

2.7.3 El Sistema GSH/Grx

El sistema glutatión constituye la principal defensa contra daño oxidante. Este sistema está formado por el glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG), las enzimas necesarias para su síntesis y reutilización, tales como la γ -glutamil-cisteín-sintetasa (γ -GCS), glutatión sintetasa (GS), glutatión reductasa (GR) y γ -glutamil-transpeptidasa (γ -GGT) y las enzimas necesarias para su uso en el metabolismo y en los mecanismos de defensa ante daño oxidante producido por radicales libres, tales como las GST y las GPx.

El glutatión (GSH) es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina (γ -glutamil-cisteinilglicina; Figura 2.12). Es el tiol más abundante presente en los organismos vivos y, predominantemente, en células eucariotas donde se encuentra a concentraciones entre 0.2 – 10 mM [Meister y Anderson, 1983; Anderson, 1998]. Interviene en numerosos procesos celulares y su funcionalidad se debe al grupo tiol (-SH) de la cisteína.

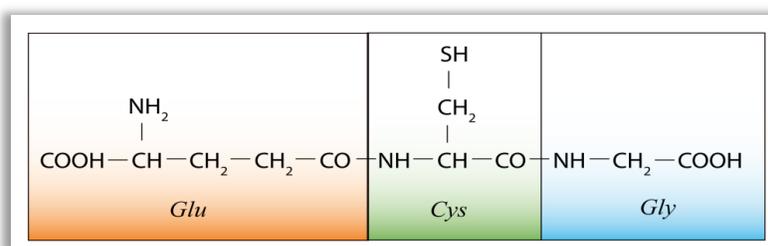


Figura 2.12 Estructura del Glutatión

El GSH actúa directamente como antioxidante, o como cofactor de diversas enzimas, protegiendo el ADN, proteínas y otras biomoléculas frente a la acción de las ROS. Interviene en procesos metabólicos como la comunicación intermolecular o el transporte de metales, y participa en la regulación del estado redox de las proteínas durante los procesos de degradación y plegamiento [Anderson, 1998; Fang *et al.*, 2002; Pastore, *et al.*, 2003]. El GSH interviene también en diversos procesos de detoxificación frente a compuestos electrofílicos o metales pesados y es, además, un reservorio de cisteína para la célula [Eiskens *et al.*, 1991; Fang *et al.*, 2002].

En el citosol, el glutatión se mantiene en su estado reducido (GSH) mediante la acción constante de la GR, la cual cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) mediante la enzima NADPH. El 90% del glutatión de la célula se encuentra en su forma reducida, mientras que el 10% restante corresponde a su estado oxidado. La relación GSH/GSSG es un indicador sensible de estrés oxidante, ya que cuando las células son expuestas a niveles crecientes de estrés oxidante, el GSSG se acumula y el cociente GSH/GSSG disminuye.

También es posible encontrar complejos de GSH con proteínas, evento denominado glutationilación, el cual es un mecanismo de protección contra la oxidación irreversible del grupo sulfhidrilo en proteínas y como reserva de GSH ante un estrés oxidante, además de jugar un papel clave en la regulación celular ya que las proteínas glutationiladas son inactivadas.

La síntesis de GSH es catalizada y mediada por dos procesos enzimáticos dependientes de ATP, en el primero participa la enzima γ -glutamil cistein sintetasa (γ -GCS), la cual une a la cisteína y la

glicina mediante una reacción dependiente de ATP. En el segundo paso actúa la glutatión sintetasa (GS) que añade glicina al dipéptido γ -glutamil-cisteína [Meister y Tate, 1976] para formar GSH. La deficiencia de estas enzimas es muy rara, pero en ambos casos los niveles de GSH se encontrarían disminuidos, por lo que fundamentalmente se produciría un cuadro de anemia hemolítica de intensidad variable [Larsson y Zetterstrom, 1974].

La proteína Glutarredoxina (Grx) fue descubierta como donadora de hidrógeno a la ribonucleótido reductasa en *E. coli* con cepas carentes de Trx [Holmgren, 1989]. La secuencia de Grx muestra que está formada por 85 aminoácidos, incluyendo el sitio activo que tiene una secuencia de Cys-Pro-Tyr-Cys que se encuentra altamente conservada, localizada en la posición 11 y 14 de la molécula y dando como resultado un peso de 10 kDa en *E. coli*. Grx es una oxidoreductasa implicada en la protección y reparación de los grupos tiol [Starke, *et al.*, 1997; Holmgren, 1989]. La Grx establece un ciclo con el glutatión y la glutatión reductasa y se ha especulado la posibilidad de que el glutatión oxidado pueda ser reducido también por la glutarredoxina [Starke, *et al.*, 1997]. Aunque la Grx y la Trx parecen tener una misma función, parece ser que la afinidad por los sustratos es diferente, de forma que ambas complementan en la reparación de los grupos tiol [Yoshitake, *et al.*, 1994], además de que la Grx es reducida por la glutatión-reductasa en lugar de una reductasa específica como en el caso de la Trx. En mamíferos se conocen dos isoformas de Grx, la Grx1, citosólica, que además de su función en el mecanismo de glutationilación, está involucrada en la síntesis de ADN (Figura 2.11), en la regulación de factores de transcripción y en procesos apoptóticos [Holmgren, *et al.*, 2005] y la Grx2, mitocondrial, que protege del daño provocado por la cadena fosforilativa [Holmgren, *et al.*, 2005].



CAPÍTULO III



OBJETIVOS

En este capítulo se establece el tema de investigación y se describen brevemente los objetivos de este trabajo.

3.1 Planteamiento del estudio

A pesar de que la molécula de ADN es considerada como el blanco principal de las radiaciones por las importantes consecuencias biológicas que pueden derivarse de la interacción, la acción de la radiación ionizante como generadora de radicales libres de oxígeno posee una relevancia a menudo no contemplada.

La presencia de radicales libres induce en los tejidos una respuesta antioxidante que en los organismos expuestos a radiación ionizante se ha estudiado poco. Sin embargo, es posible intentar caracterizar a nivel transcripcional las enzimas y proteínas antioxidantes que resultan ser moduladas por el efecto de la radiación ionizante de manera sistémica y que podrían ejercer protección contra la acción indirecta de la radiación, proporcionando una interpretación inmediata del papel que juega el metabolismo en las lesiones producidas por radiación.

3.1.1 Hipótesis

La radiación ionizante induce la transcripción de las proteínas Glutarredoxina, Tiorredoxina y de γ -Glutamyl-cisteín-sintetasa en ratones sometidos a irradiación de cuerpo entero.

3.1.2 Objetivos

Objetivo general.

Evaluar los niveles de expresión de ARNm de las proteínas Glutarredoxina (Grx1), Tiorredoxina (Trx1) y γ -Glutamyl-cisteín-sintetasa (γ -GCS) como función de la dosis a cuerpo entero suministrada a ratones de la cepa BALB/c.

Objetivos Particulares.

- ❖ Determinar la tasa de dosis del irradiador GammaCell 200 del Instituto de Ciencias Nucleares.
- ❖ Determinar la dosis de tránsito de los roedores dentro del irradiador.
- ❖ Determinar la distribución de dosis en el irradiador GammaCell 200.
- ❖ Determinar la dosis de pentobarbital a emplearse para sedar a los roedores durante la irradiación.
- ❖ Llevar a cabo la disección de los roedores.
- ❖ Aplicar un protocolo de extracción de ARN a los órganos de interés.
- ❖ Analizar la expresión de ARNm de las proteínas Grx1, Trx1 y γ -GCS como función de la dosis absorbida.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se hace una descripción de los materiales y métodos empleados en el desarrollo de este trabajo de investigación.

4.1 Calibración del irradiador GammaCell 200

La irradiación de los roedores se llevó a cabo en el irradiador GammaCell 200, propiedad del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Este irradiador está formado por 24 fuentes de ^{60}Co , las cuales decaen por β^- a ^{60}Ni . En dicho decaimiento se produce radiación β^- de 0.31 MeV (99.923%) y 1.48 MeV (0.057%) de energía cinética máxima, así como radiación γ de 1.17 MeV (~100%) y de 1.33 MeV (~100%) con una energía promedio de 1.25 MeV. El esquema de decaimiento del ^{60}Co se muestra en la Figura 4.1.

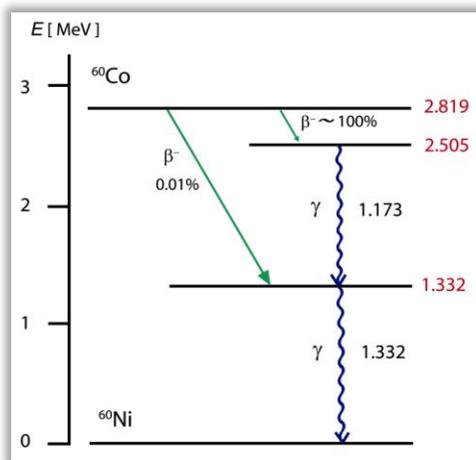


Figura 4.1 Esquema de decaimiento correspondiente al ^{60}Co .

Las fuentes del irradiador tienen forma de lápiz de 13.97 cm de altura y están encapsuladas en un blindaje de acero inoxidable y rodean concéntricamente a las muestras por irradiar, que descienden dentro de un émbolo de acero inoxidable de 8.89 cm de diámetro y 13.97 cm de altura. La Figura 4.2 muestra un diagrama esquemático de la vista lateral del irradiador. La calibración del irradiador se llevó a cabo mediante el uso del dosímetro Fricke en la posición de irradiación de los roedores.

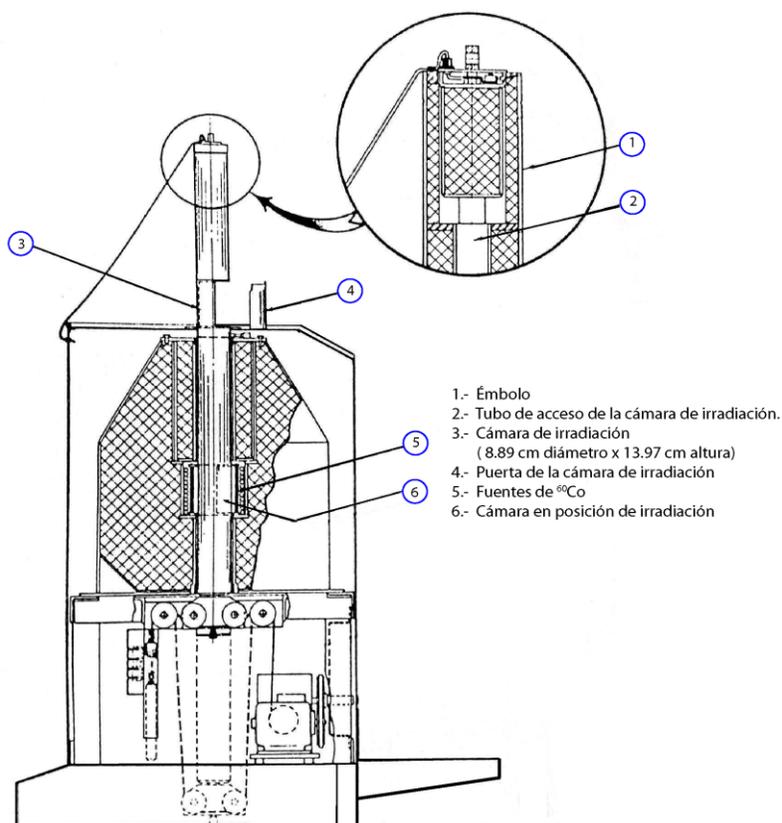


Figura 4.2 Diagrama esquemático del GammaCell 200 (vista lateral).

4.2 Determinación de la tasa de dosis del irradiador GammaCell 200

La tasa de dosis del irradiador GammaCell 200 se determinó con el dosímetro Fricke descrito en la sección 1.8.1. Las muestras de esta solución con un volumen aproximado de 4.7 mL, fueron irradiadas durante 90 y 149 min dentro de un recipiente cilíndrico de Pyrex de 1 cm de diámetro interno, 1.3 cm de diámetro externo y 10 cm de altura, el cilindro se llenó con solución Fricke hasta una altura de 6 cm. Su absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV visible modelo Cary-100 a una longitud de onda de 304 nm. Los resultados obtenidos, empleando la relación [1.38], se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Calibración de GammaCell 200 mediante solución Fricke.

Tiempo de irradiación [min]	$\Delta(DO)$	Dosis Promedio [Gy]
0	0 ± 0.00007	0 ± 0.02
90.00 ± 0.05	0.15563 ± 0.00007	43.27 ± 0.02
149.26 ± 0.05	0.25393 ± 0.00007	70.59 ± 0.02

Para obtener la tasa de dosis del GammaCell 200 se trazó una gráfica con los datos de la tabla 4.1. La Figura 4.3 muestra la gráfica de la dosis promedio como función del tiempo de irradiación.

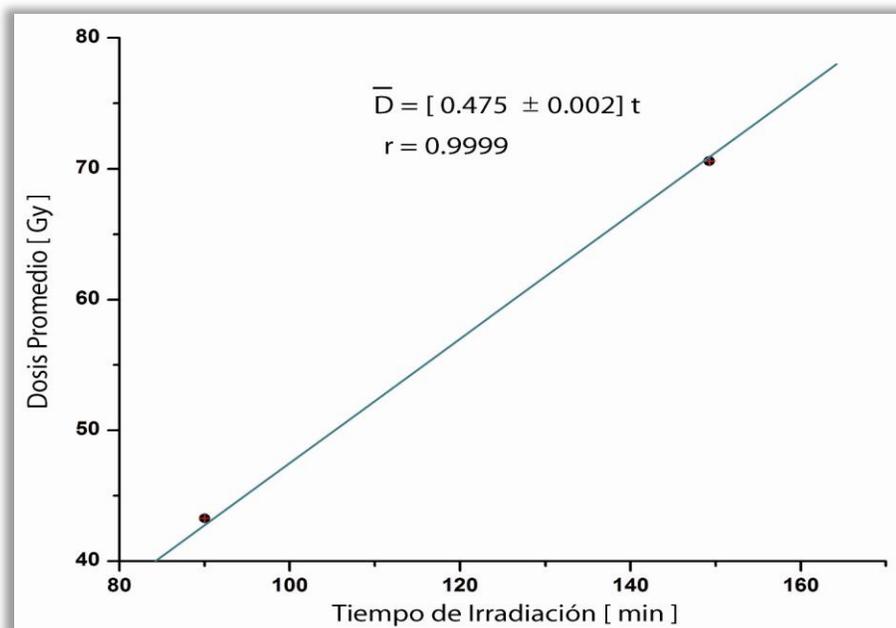


Figura 4.3 Calibración del GammaCell 200 empleando solución Fricke.

Del ajuste correspondiente se obtuvo que la tasa de dosis absorbida promedio en el centro del GammaCell y a tres centímetros de altura tenía una magnitud de $0.475 \pm 0.002 \text{ Gy min}^{-1}$ el 26 de Septiembre de 2007.

4.2.1 Dosis de tránsito

El tránsito de los roedores por el GammaCell durante la irradiación involucra una dosis adicional debida al descenso y ascenso del émbolo hasta el lugar donde se encuentran las fuentes de ^{60}Co . Para determinar esta dosis se emplearon dosímetros termoluminiscentes TLD-100 marca Harshaw Bicon en presentación de prisma rectangular de dimensiones 3mm x 3mm x 0.9 mm preparados de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) **Preparación de los dosímetros.** Horneado a 400°C durante 1 hora seguido de enfriamiento a temperatura ambiente. Finalmente se hornearon a 100°C durante 2 horas.
- 2) **Caracterización de los dosímetros.** Se irradió un lote de dosímetros, 24 horas después de hornearse, con partículas beta emitidas por una fuente calibrada de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ a una dosis de 0.36 Gy. De éstos se seleccionaron 12 cuyas respuestas fluctuaran como máximo en una desviación estándar del promedio del lote y posteriormente, se llevó a cabo la identificación de cada dosímetro (No. de dosímetro).
- 3) **Irradiación.** Los dosímetros fueron irradiados a diferentes tiempos en el GammaCell a una tasa de dosis de $0.475 \pm 0.002 \text{ Gy min}^{-1}$. Éstos fueron colocados en un contenedor de lucita con paredes de 4 mm de espesor para asegurar equilibrio de partícula cargada a una altura de 3 cm sobre la base de la cámara de irradiación. El

tiempo D+A corresponde al tiempo que le toma descender y ascender al émbolo del irradiador. Los resultados se muestran en la tabla 4.2.

4) *Lectura.* Se llevó a cabo en un equipo Thermo Fisher Scientific, Harshaw 3500 propiedad del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN, UNAM).

Tabla 4.2 Tiempo de irradiación, dosis y señal TL de los dosímetros empleados para determinar la dosis de descenso y ascenso del émbolo del GammaCell 200.

No. de TLD	Tiempo de irradiación [min]	Dosis Promedio [Gy]	Señal TL [nC]	Señal TL _{promedio} [nC]	Señal TL _{neto} [nC]
1	(D+A) ± 0.05	----	99.15	98.5 ± 0.6	----
2	(D+A) ± 0.05	----	97.89		
3	0.5 ± 0.05	0.24 ± 0.02	701.8	692 ± 10	594 ± 10
4	0.5 ± 0.05	0.24 ± 0.02	681.3		
5	0.99 ± 0.05	0.47 ± 0.02	1289	1240 ± 49	1142 ± 49
6	0.99 ± 0.05	0.47 ± 0.02	1191		
7	1.5 ± 0.05	0.71 ± 0.02	1778	1793 ± 16	1695 ± 16
8	1.5 ± 0.05	0.71 ± 0.02	1809		
9	1.99 ± 0.05	0.95 ± 0.02	2550	2497 ± 53	2399 ± 53
10	1.99 ± 0.05	0.95 ± 0.02	2444		
11	3 ± 0.05	1.43 ± 0.02	3659	3634 ± 25	3536 ± 25
12	3 ± 0.05	1.43 ± 0.02	3610		

La señal TL (3ª columna, tabla 4.2) se obtuvo bajo los siguientes parámetros:

- Voltaje de operación del tubo fotomultiplicador: 730 V
- Tasa de calentamiento: 10°C s⁻¹
- Intervalo de temperatura de adquisición de la señal: [30°C, 330°C]
- Tiempo de lectura: 30 s

Esta señal se debe al tiempo de irradiación más el tiempo de descenso y ascenso del émbolo. Para determinar la dosis debida al tránsito de los roedores en el GammaCell, se restó el promedio de la señal TL (D+A) al promedio de la señal medida (4ª columna, tabla 4.2) para obtener la señal TL_{neto} (5ª columna, tabla 4.2).

La Figura 4.4 muestra la gráfica de la señal TL_{neto} como función de la dosis absorbida promedio. La pendiente de la gráfica corresponde al factor de proporcionalidad entre señal TL_{neto} (STL_{neto}) y dosis.

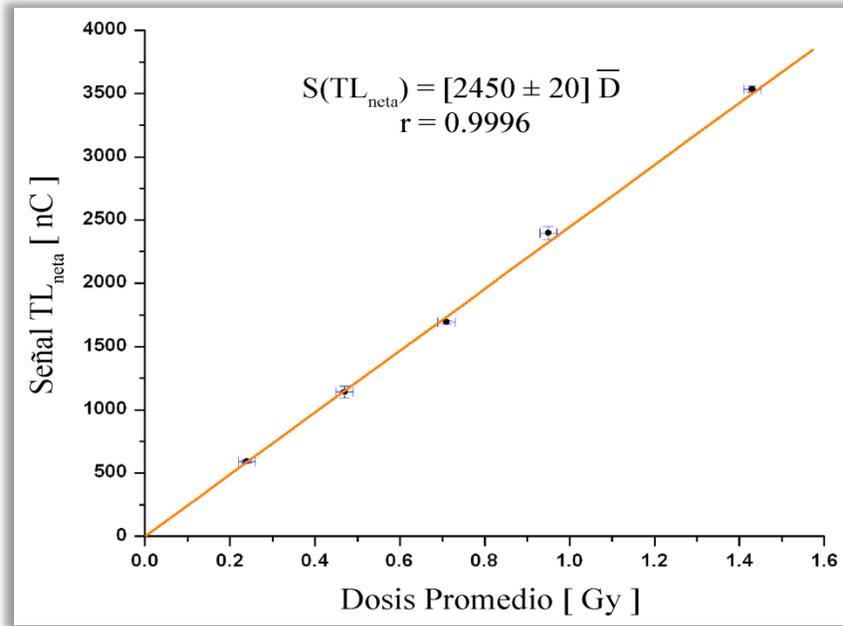


Figura 4.4 Señal TL_{neto} (nC) de dosímetros TLD-100 como función de la dosis.

La relación obtenida del ajuste de los datos es

$$S_{TL_{neto}} \text{ (nC)} = [2450 \pm 20] \bar{D} \text{ (Gy)} \quad [4.1]$$

De los datos de la tabla 4.2, se tiene que la señal TL promedio (D+A) es de 98.5 ± 0.6 nC. Empleando este valor y la relación [4.1] se tiene que la dosis absorbida promedio debida al ascenso y descenso del émbolo del GammaCell, a 3 cm de altura, tenía un valor de

$$\bar{D}_{(D+A)} = 0.0403 \pm 0.0004 \text{ Gy} \quad [4.2]$$

el 27 de Septiembre de 2007.

4.3 Distribución de dosis en el irradiador GammaCell 200

Para determinar la distribución de dosis en el irradiador GammaCell 200 se emplearon películas de tinte radiocrómico GafChromic[®] HD-810 fabricadas por ISP Technology. Se cortó un rectángulo de película de aproximadamente 12 x 1.8 cm y un círculo de 8.8 cm de diámetro los cuales fueron irradiados a una tasa de dosis de 0.475 ± 0.002 Gy min⁻¹. Para obtener el tono de color de la película sin irradiar se recortó un rectángulo de 2.1 x 1.8 cm. Las imágenes digitalizadas de las películas se muestran en la Figura 4.5.

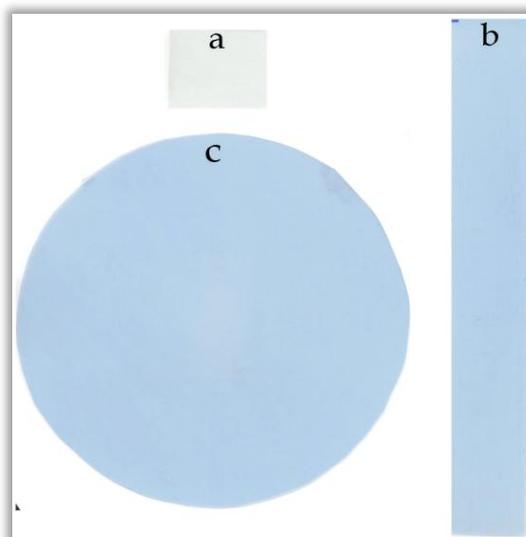


Figura 4.5 Imágenes digitalizadas de las películas GafChromic® HD-810 empleadas en la determinación de la distribución de dosis. **a** Película sin irradiar. Películas irradiadas: **b** Rectángulo de 12x1.8 cm y **c** Círculo de 8.8 cm de diámetro.

Para determinar la distribución de dosis en el centro del GammaCell y a lo largo del eje vertical de la cámara de irradiación, se irradió la PTR cortada en forma de rectángulo entre dos placas de lucita de 6 mm de espesor para garantizar condiciones de equilibrio de partícula cargada. La distribución de dosis en la dirección radial fue analizada mediante el uso de la película circular. Las películas se digitalizaron empleando un escáner de reflexión marca Microtek ScanMaker modelo E3, propiedad del Instituto de Física de la UNAM.

La digitalización consiste en la descomposición de la imagen en una matriz de $m \times n$ elementos denominados píxeles, donde cada uno de éstos tiene un valor proporcional a su nivel de gris. Las imágenes se adquirieron con el software ScanWizard Pro 6.51 a color (8 bits) con una resolución espacial de 300 dpi en formato TIF y separadas en cada una de sus componentes, roja, verde, y azul, con el programa ImageJ® 1.38x. Las dimensiones de las imágenes digitalizadas **a**, **b** y **c**, mostradas en la Figura 4.5, son: 278x224, 1444x204 y 1044x1057 píxeles, respectivamente.

Con el programa ImageJ® 1.38x se obtuvo un valor promedio en escala de grises de la componente roja de la película sin irradiar (TC_{si}) de 228 ± 1 . Para calcular la respuesta de las películas se empleó la relación [1.42] en cada uno de los valores (i, j) de las matrices correspondientes a las imágenes digitalizadas de las películas irradiadas. Para obtener los valores de dosis absorbida en las películas, se utilizó la ecuación [1.43] en cada valor matricial de las imágenes de respuesta. Las imágenes resultantes se muestran en la Figura 4.6. Para llevar a cabo estos cálculos se empleó el programa OriginPro 7.5.

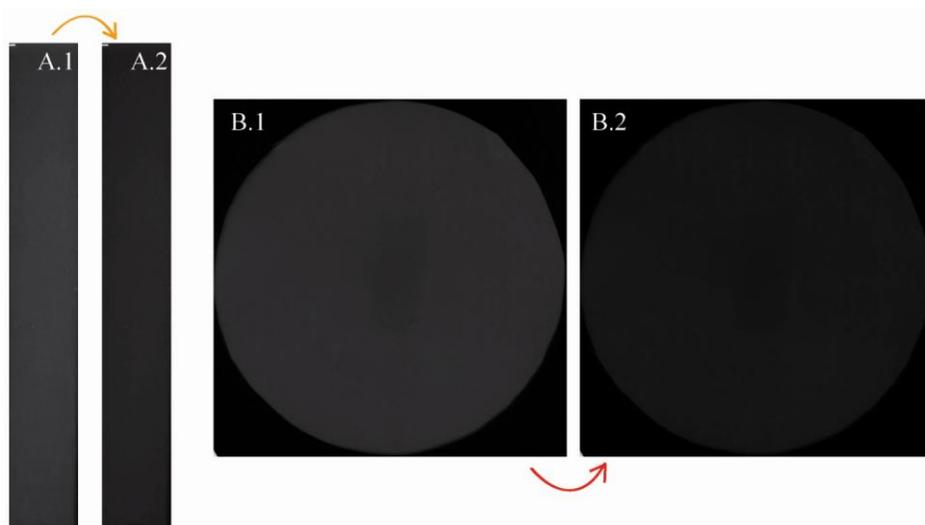


Figura 4.6 Imágenes correspondientes a la respuesta y dosis de las películas GafChromic® HD-810 empleadas. **A1** Imagen de respuesta de la película rectangular. **A2** Imagen de valores de dosis de la película rectangular. **B1** Imagen de respuesta de la película circular. **B2** Imagen de valores de dosis de la película circular.

La distribución de dosis dentro del GammaCell se obtuvo a partir del análisis de las imágenes de valores de dosis rectangular y circular. Se promediaron cerca de 200 valores de la película rectangular por cada uno de los 1444 pixeles de la longitud de la película para obtener la distribución de dosis en el centro del GammaCell y a lo largo del eje vertical de la cámara de irradiación. La distribución obtenida se muestra en la Figura 4.7

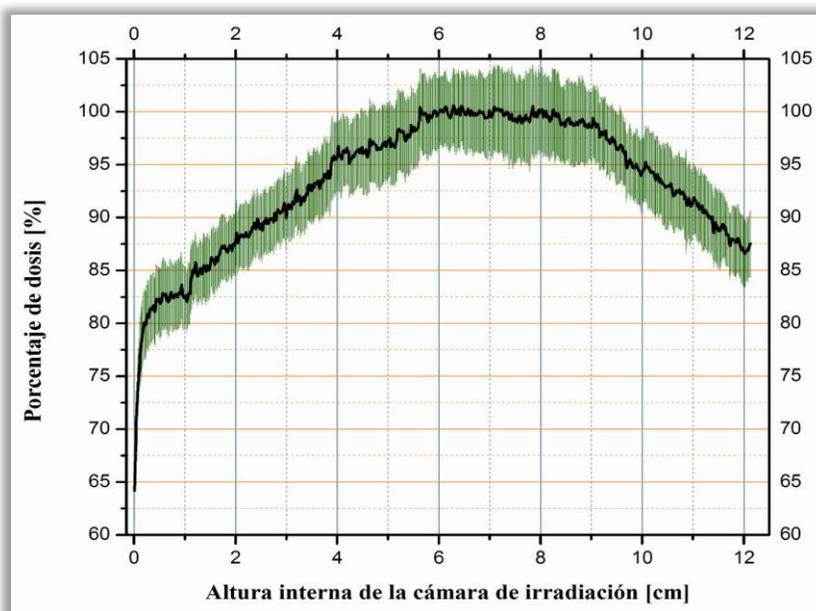


Figura 4.7 Distribución de dosis en el centro del GammaCell a lo largo del eje vertical de la cámara de irradiación. Se muestra el promedio \pm una desviación estándar.

La distribución de dosis en la dirección radial del GammaCell se obtuvo al promediar 284 valores por cada uno de los 1057 pixeles del diámetro de la película circular. La distribución de dosis obtenida se muestra en la Figura 4.8.

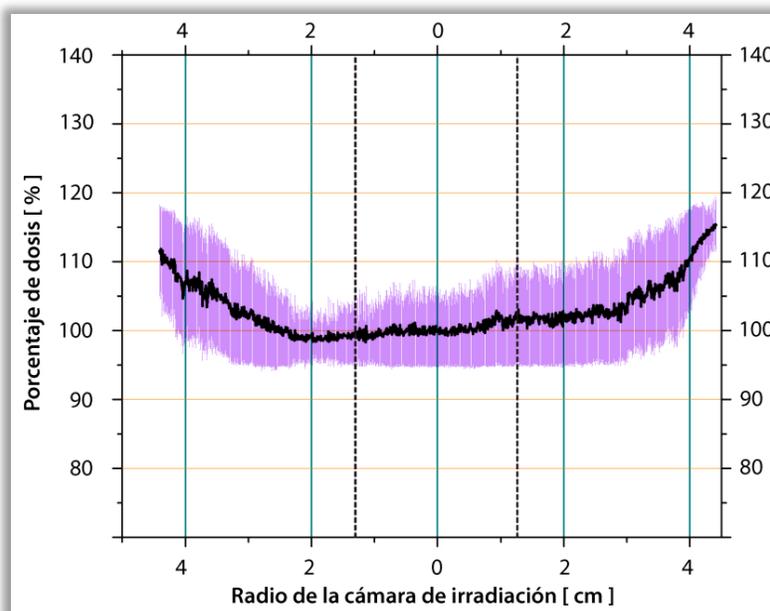


Figura 4.8 Distribución de dosis en la dirección radial del GammaCell. Se muestra el promedio \pm una desviación estándar. Las líneas punteadas corresponden a la posición de los roedores dentro del GammaCell.

4.4 Irradiación de los roedores

El Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB, UNAM), establece en su código ético para personal académico [Hudson, *et al.*, 2005] los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio, por lo que fue necesario someter el protocolo de investigación al consentimiento de la comisión de bioética para la investigación en animales.

El protocolo fue aprobado bajo los siguientes lineamientos:

Animal: Ratones machos de la cepa BALB/c de 4 a 5 semanas de edad y entre 20-30 g de peso.

Tamaño mínimo de la muestra por dosis: 4 roedores

Sedante: Pentobarbital

Dosis: 100 mg kg⁻¹

Vía: Intraperitoneal (IP)

Frecuencia: Dosis única

Método de eutanasia: Dislocación cervical

Categoría del experimento según el daño que causan a los animales: Categoría B (experimentos que causan dolor o estrés leve, o dolor de poca duración -eutanasia-).

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* y mantenidos en períodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se les inyectó Pentobarbital vía IP a una dosis de 100 mg kg⁻¹ disuelto en NaCl al 0.9%.

Una vez anestesiados, los roedores fueron trasladados al Instituto de Ciencias Nucleares para llevar a cabo la irradiación. Para mantenerlos inmobilizados en el centro del GammaCell y para que la irradiación fuese lo más uniforme posible, fue diseñado un soporte de madera sobre el que se acoplaba un cilindro de cartón que mantenía al ratón erguido, inmóvil y en el centro del irradiador (Figura 4.9).

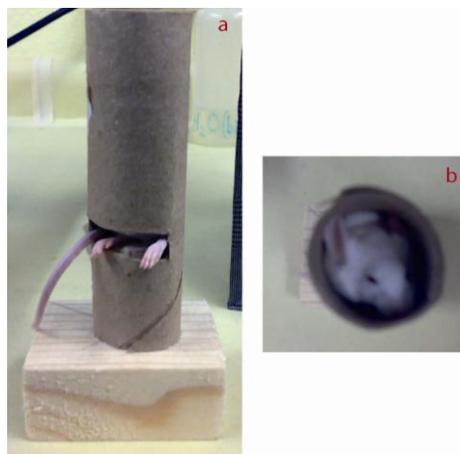


Figura 4.9 Soporte diseñado para llevar a cabo las irradiaciones de los roedores dentro del GammaCell. A. Vista frontal, B. Vista superior.

Los roedores de control (0 Gy) fueron sedados y sometidos al mismo estrés que el resto de sus compañeros provocado por su manipulación, suministro de pentobarbital y traslado desde el IIB al ICN, aunque a diferencia del resto, no fueron introducidos al interior del GammaCell.

De las distribuciones de dosis obtenidas (radial y en el eje vertical de la cámara de irradiación) y con base en las mediciones anatómicas de los roedores, las dosis de irradiación promedio a los diferentes órganos de estudio se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3 Dosis de irradiación promedio a los órganos de interés.

Órgano	Dosis 1 [Gy]	Dosis 2 [Gy]	Dosis 3 [Gy]	Dosis 4 [Gy]
Riñón	0	0.53 ± 0.04	1.05 ± 0.02	4.00 ± 0.2
Hígado	0	0.54 ± 0.06	1.07 ± 0.06	4.09 ± 0.2
Pulmón	0	0.57 ± 0.05	1.12 ± 0.08	4.2 ± 0.3
Cerebro	0	0.58 ± 0.04	1.16 ± 0.07	4.4 ± 0.2

Después de la irradiación, los ratones fueron llevados al Instituto de Investigaciones Biomédicas y sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron el pulmón, el cerebro, el riñón y el hígado de cada ratón, se lavaron con NaCl al 0.9% a 4°C para eliminar el exceso de sangre y finalmente se almacenaron a -70°C para su uso posterior.

4.5 Protocolo de extracción de ARN

La extracción de ARN de los tejidos se llevó a cabo conforme al protocolo general del Trizol[®] Reagent, Invitrogen[®] [Chomczynski y Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993]. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina para la lisis de las células y la

separación de la muestra en dos fases, acuosa y orgánica, seguida de la extracción y precipitación del ARN total.

La cantidad de ARN por obtener mediante este proceso, por mg de tejido extraído, se muestra en la tabla 4.4.

Tabla 4.4 Cantidad esperada de ARN por mg de tejido extraído.

Tejido	ARN
Hígado	6 – 10 μg
Riñón	3 – 4 μg
Pulmón	1.5 – 2 μg
Cerebro	1 – 1.5 μg

Los pasos en la extracción de ARN son los siguientes:

- i. El tejido extraído se homogeniza en 1 ml de Trizol seguido de incubación a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugación a 12,000g durante 10 minutos a 4°C.
- ii. Se desecha el pellet resultante y al sobrenadante se le agregan 0.2 ml de cloroformo. Se mezcla vigorosamente por 15 segundos, se incuba a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos y se centrifuga a 12,000 x g a 4°C.
- iii. Se transfiere la fase acuosa (fase incolora) a un nuevo tubo. El ARN se precipita mezclando esta fase con 0.5 μl de isopropanol. La muestra se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifuga por 10 minutos a 12,000 x g a 4°C.
- iv. Finalizada la centrifugación, el ARN es visible en el tubo. Se retira el supernadante, se lava el pellet con 1 ml de etanol al 75% y se centrifuga 5 minutos a 7500 x g a 4°C.
- v. Después de la centrifugación, se retira el supernadante. Se deja secar el pellet y se le agregan 100 μl de agua libre de RNasas [5 Prime[®] Molecular Biology Grade Water RNase/DNase/Protease free] (enzimas que degradan el ARN). Se incuba a 50°C durante 10 min y finalmente se almacena a -70°C.

4.6 Integridad y pureza del ARN extraído

Para llevar a cabo la técnica RT-PCR (Apéndice 0) es necesaria la comprobación de la integridad y pureza del ARN extraído para asegurar una adecuada amplificación. Para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometieron las muestras a electroforesis horizontal a 80 V durante 30 minutos en gel de agarosa al 1.0% en solución amortiguadora TAE 1x. El tñido se llevó a cabo mediante bromuro de etidio (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$). El ARN se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260 nm. La radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al bromuro de etidio, que a su vez, reemite la radiación a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. De las fotografías obtenidas se observan la integridad de las bandas 18S y 28S de ARNm para descartar la presencia de contaminación.

La pureza del ARN se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260} y A_{280}) de muestras de 2 μl de ARN. El cociente A_{260}/A_{280} indica la pureza del ARN. El valor comúnmente aceptado para ARN es de 2.0, sin embargo, la absorbancia de los ácidos nucleicos a

estas longitudes de onda depende de la fuerza iónica y el pH del medio en el que se encuentre disuelto el ARN. Este efecto es independiente del método de purificación.

Un extenso estudio de los efectos del pH y fuerza iónica desarrollado por Wilfinger, *et al.*, 1997, muestra que el cambio en la relación de absorbancias, A_{260}/A_{280} , se debe principalmente a la disminución en la absorbancia a 280 nm cuando la fuerza iónica y/o el pH aumentan. Aunque valores elevados de la razón A_{260}/A_{280} no indican una buena purificación de ARN, valores bajos (menores que 1.7) sí indican que el ARN está contaminado y su uso puede no ser conveniente para algunas aplicaciones.

4.7 Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetiza del ARN total obtenido por medio de la transcripción reversa. Las moléculas de ARNm funcionan como molde creando el ADNc basado en la correspondencia de bases ARN con las bases ADN complementarias. Los oligonucleótidos dT actúan como cebadores y los dinucleótidos trifosfato funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa.

La síntesis de ADNc se realiza en 2 fases:

Fase 1.

Se prepara la muestra con los siguientes elementos

- 1) 2.0 μ g de ARN
- 2) 2 μ l de Primer oligo dT
- 3) Agua libre de RNasas (completar el volumen de la reacción a 18 μ l)

En esta fase, la reacción se somete a un ciclo de desnaturalización a 70°C por 5 minutos en un termociclador. Transcurrido este tiempo el microtubo que contiene la reacción se coloca en hielo para que los oligo dT se unan al ARN.

Fase 2.

Se agregan a la muestra:

- 1) 1 μ l de dinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM
- 2) 5 μ l de solución amortiguadora 5x
- 3) 1 μ l de retrotranscriptasa del virus de leucemia murina (M-MLV RT, Promega®)

La mezcla se somete a un ciclo de síntesis de ADNc a 37°C por 50 minutos y a un ciclo final de desnaturalización de la enzima a 50°C por 5 minutos en el termociclador. Una vez concluidos los ciclos, el ADNc se almacena a 4°C.

4.8 PCR

Para llevar a cabo los ensayos de PCR se emplearon oligonucleótidos específicos para cada uno de los genes de interés. En la tabla 4.5 se muestra la secuencia de oligonucleótidos y la temperatura de alineamiento empleados en la determinación de niveles de expresión de ARNm, así como el tamaño esperado del producto de amplificación.

Tabla 4.5 Secuencia de oligonucleótidos y condiciones empleadas en la determinación de niveles de expresión de ARNm para distintos genes de interés.

<i>Gen</i>	<i>Oligonucleótidos Secuencia (5'- 3')</i>	<i>T_m [°C]</i>	<i>Tamaño Producto PCR</i>
<i>GAPDH</i>	<i>TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT T (F) CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC C (R)</i>	60	940 pb
<i>γ- GCS</i>	<i>AGG AGC TTC GGG ACT GTA TT (F) TGG GCT TCA ATG TCA GGG AT (R)</i>	55	650 pb
<i>Trx1</i>	<i>CGT GGT GGA CTT CTC TGC TAC GTG GTG (F) GGT CGG CAT GCA TTT GAC TTC ACA GTC (R)</i>	60	160 pb
<i>Grx1</i>	<i>TGC AGA AAG ACC CAA GAA ATC CTC AGT CA (F) TGG AGA TTA GAT CAC TGC ATC CGC CTA TG (R)</i>	60	190 pb

El número de ciclos empleado en la amplificación de los segmentos de ADN correspondientes a *Trx1*, *Grx1*, *γ-GCS* y *GAPDH* para cada uno de los órganos de estudio se muestran en la tabla 4.6. Este número de ciclos se determinó a partir de la parte lineal de las curvas de amplificación obtenidas para cada proteína y órgano de interés.

Tabla 4.6 Número de ciclos empleados en PCR.

<i>Gen</i>	<i>Órgano</i>	<i>No. de ciclos</i>	<i>Gen</i>	<i>Órgano</i>	<i>No. de ciclos</i>
<i>γ-GCS</i>	<i>Hígado</i>	24	<i>Trx1</i>	<i>Hígado</i>	21
	<i>Riñón</i>	24		<i>Riñón</i>	20
	<i>Cerebro</i>	24		<i>Cerebro</i>	22
	<i>Pulmón</i>	28		<i>Pulmón</i>	20
<i>Grx1</i>	<i>Hígado</i>	22	<i>GAPDH</i>	<i>Hígado</i>	26
	<i>Riñón</i>	24		<i>Riñón</i>	26
	<i>Cerebro</i>	24		<i>Cerebro</i>	26
	<i>Pulmón</i>	25		<i>Pulmón</i>	26

Los ensayos de PCR fueron realizados con los siguientes reactivos:

- 1.- 1 µl de ADNc
- 2.- 1 µl de dNTPs 2 mM
- 3.- 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) 5 mM
- 4.- 0.8 µl de MgCl₂ (25 mM)
- 5.- 2 µl de solución amortiguadora (5x)
- 6.- 3 µl de agua libre de RNasas
- 7.- 0.2 µl de Platinum[®] Taq Polymerase de Invitrogen

La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones:

- I. 5 minutos, 94°C (desnaturalización inicial)
- II. Ciclos de
 - 30 segundos, 94°C (desnaturalización)
 - 30 segundos, T_m (alineamiento)
 - 30 segundos¹ y 1 minuto², 72°C (extensión)

III. 5 minutos, 72°C (extensión final)

¹ Para Trx1 y Grx1.

² Para GAPDH y γ - GCS.

Después de la amplificación, los productos obtenidos del PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa horizontal al 2.0%. Para la preparación y electroforesis del gel se emplearon los siguientes reactivos y equipo:

1. Solución amortiguadora de corrida TAE 1x
2. Agarosa
3. Cámara de electroforesis con peine previamente lavados con agua destilada.

Al gel se le aplicaron 80 V durante 40 minutos (para Grx1 y Trx1) y 50 minutos (para GAPDH y γ -GCS). El teñido se llevó a cabo mediante bromuro de etidio ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$). La imagen, en escala de grises de 16 bits, de los productos amplificados por PCR se obtuvo con un fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System (Kodak[®]), mostrado en la Figura 4.10, para su posterior análisis densitométrico con el programa ImageJ[®] 1.38x.



Figura 4.10 Fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System (Kodak[®]), propiedad del Instituto de Ciencias Biomédicas UNAM, utilizado para obtener las imágenes de los productos amplificados por PCR.

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los niveles de expresión de ARNm de las proteínas Grx1, Trx1 y la enzima γ -GCS en hígado, riñón, pulmón y cerebro de ratones de la cepa BALB/c tras irradiarlos con rayos gamma de 1.25 MeV (energía promedio) a cuerpo entero a diferentes dosis. Como referencia se emplearon los niveles de ARNm correspondientes a la enzima Gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa (GAPDH).

5.1 Viabilidad del ARN

La extracción de ARN por medio del método del Trizol[®] permitió obtener ARN de hígado, pulmón, riñón y cerebro de roedores en condiciones óptimas y con baja contaminación de ADN. La integridad del ARN extraído puede observarse a partir de la fotografía tomada al gel de agarosa (1%) tras someter las muestras de ARN a electroforesis horizontal. La Figura 5.1 muestra estas fotografías donde se pueden observar las bandas del 28S y 18S ribosomal.

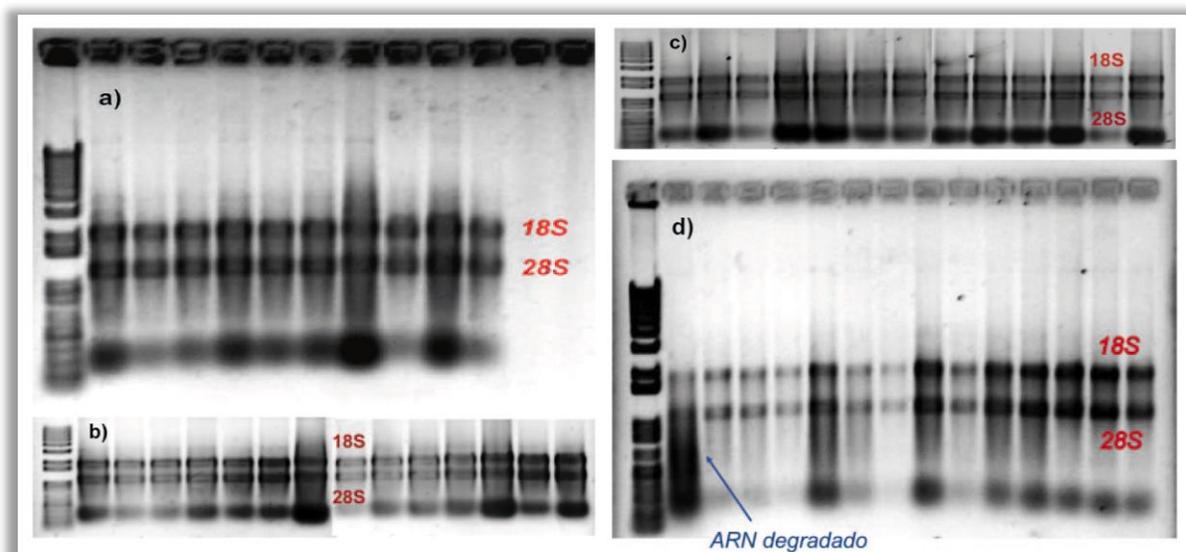


Figura 5.1 Viabilidad del ARN extraído de los diferentes órganos de estudio: a) hígados, b) riñones, c) cerebros y d) pulmones.

Cuando el ARN se encuentra contaminado se observa en el gel de agarosa una mancha como la señalada en la figura 5.1 d), que corresponde a proteínas de bajo peso molecular. Para estas muestras se repitió la extracción hasta observar la integridad del ARN.

La pureza del ARN se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 midiendo la absorbancia de muestras de 2 μ l de ARN, a 260 y 280 nm (A_{260} y A_{280}). Como blanco comparativo se empleó agua destilada. La tabla 5.1 muestra el cociente de las absorbancias obtenidas A_{260}/A_{280} .

Tabla 5.1 Cociente de las absorbancias de las muestras de ARN extraído. Las entradas H, R, C y P corresponden a hígado, riñón, cerebro y pulmón respectivamente. Los subíndices i,j se refieren a la dosis (Gy) y al número de control del roedor irradiado, respectivamente.

Muestra	A₂₆₀/A₂₈₀	Muestra	A₂₆₀/A₂₈₀	Muestra	A₂₆₀/A₂₈₀	Muestra	A₂₆₀/A₂₈₀
H _{0,1}	1.96	R _{0,1}	1.98	C _{0,1}	1.91	P _{0,1}	1.81
H _{0,2}	1.93	R _{0,2}	1.96	C _{0,2}	1.84	P _{0,2}	1.87
H _{0,3}	1.95	R _{0,3}	1.9	C _{0,3}	1.92	P _{0,3}	1.9
H _{0,4}	1.89	R _{0,4}	1.98	C _{0,4}	1.86	P _{0,4}	1.93
H _{0,5,1}	1.91	R _{0,5,1}	1.95	C _{0,5,1}	1.91	P _{0,5,1}	1.9
H _{0,5,2}	1.94	R _{0,5,2}	1.97	C _{0,5,2}	1.88	P _{0,5,2}	1.9
H _{0,5,3}	1.91	R _{0,5,3}	1.91	C _{0,5,3}	1.9	P _{0,5,3}	1.97
H _{0,5,4}	1.95	R _{0,5,4}	1.97	C _{0,5,4}	1.89	P _{0,5,4}	1.84
H _{1,1}	1.97	R _{1,1}	1.88	C _{1,1}	1.86	P _{1,1}	1.94
H _{1,2}	1.9	R _{1,2}	1.89	C _{1,2}	1.87	P _{1,2}	1.9
H _{1,3}	1.97	R _{1,3}	1.94	C _{1,3}	1.85	P _{1,3}	1.87
H _{1,4}	1.96	R _{1,4}	1.86	C _{1,4}	1.89	P _{1,4}	1.9
H _{4,1}	1.96	R _{4,1}	1.98	C _{4,1}	1.86	P _{4,1}	1.79
H _{4,2}	2.00	R _{4,2}	1.94	C _{4,2}	1.81	P _{4,2}	1.88
H _{4,3}	1.95	R _{4,3}	1.91	C _{4,3}	1.94	P _{4,3}	1.83
H _{4,4}	1.98	R _{4,4}	1.9	C _{4,4}	1.90	P _{4,4}	1.85

Nótese que el cociente A_{260}/A_{280} varía entre 1.8 y 2.0; esto indica un buen estado de pureza del ARN ya que se considera que valores por debajo de 1.7 implican contaminación en la muestra.

5.2 Niveles de expresión de ARNm

Después de llevar a cabo la técnica RT-PCR al ARNm extraído del hígado, riñón, cerebro y pulmón de ratones de la cepa BALB/c, tras irradiarlos con rayos gamma de 1.25 MeV de energía promedio a cuerpo entero a diferentes dosis, los productos obtenidos por PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa horizontal teñido posteriormente con bromuro de etidio ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Las imágenes de los productos amplificados por PCR correspondientes a la enzima γ -GCS y las proteínas Trx1 y Grx1 en los órganos de interés, se obtuvieron con un fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System (Kodak[®]) para su análisis densitométrico con el programa ImageJ[®] 1.38x. Todos los análisis se realizaron con imágenes de 16 bits normalizadas, es decir, imágenes con el nivel de gris mínimo igual a cero. Algunas de las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 5.2.

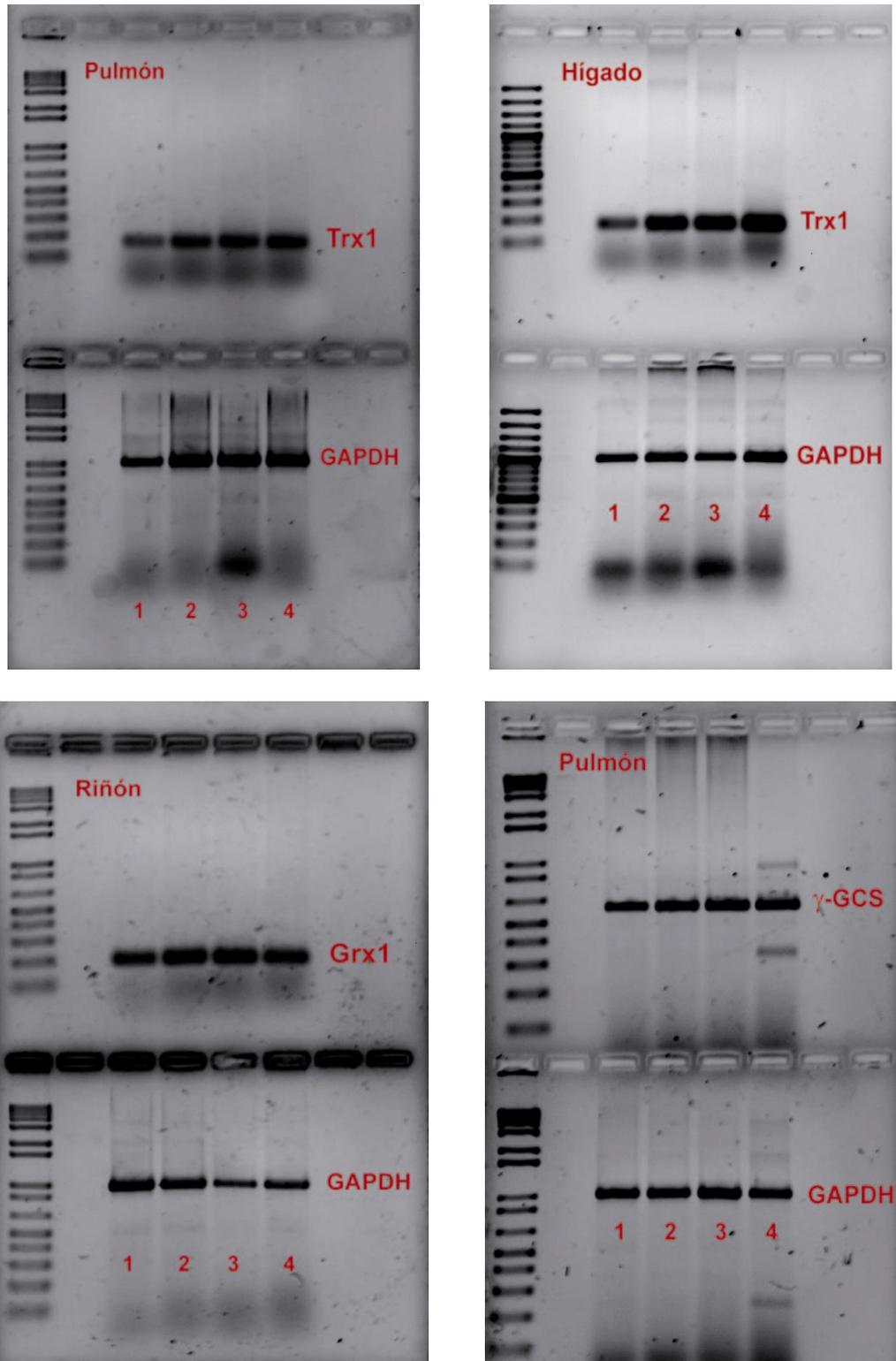


Figura 5.2 Muestra de las imágenes de los productos amplificados mediante PCR obtenidas con un fotodocumentador Gel Logic 200, Imaging System (Kodak®). Los números 1, 2, 3 y 4 se refieren a la dosis administrada: 0 Gy, 0.53 ± 0.04 Gy, 1.05 ± 0.02 Gy y 4.00 ± 0.01 Gy, respectivamente.

Para determinar los niveles de expresión de las proteínas de interés en cada órgano de estudio, se utilizó la enzima GAPDH como control interno. La actividad de esta enzima está relacionada con la regulación de la glucólisis y se encuentra codificada como un solo gen funcional en el ser humano, ratón, gallina y rata, el cual se halla altamente conservado en estas especies. Se ha reportado que los niveles de expresión de este gen permanecen constantes durante el crecimiento celular y en las diferentes fases del ciclo celular. Por estas razones, GAPDH es ampliamente utilizada como control interno en diversas técnicas de cuantificación de ARNm [Bathia, *et al.*, 1994].

Para analizar el cambio en la expresión del ARNm de las proteínas Trx1, Grx1 y γ -GCS, se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía (One-Way ANOVA) con la prueba de Holm-Sidak para comparación múltiple de promedios a diferentes dosis. El manejo estadístico se realizó con el programa SigmaStat versión 3.11, Systat Software, Inc.

5.2.1 Niveles de expresión de ARNm en Hígado.

Los cambios en la expresión de ARNm en el hígado de ratones BALB/c se muestran en la Figura 5.3, los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

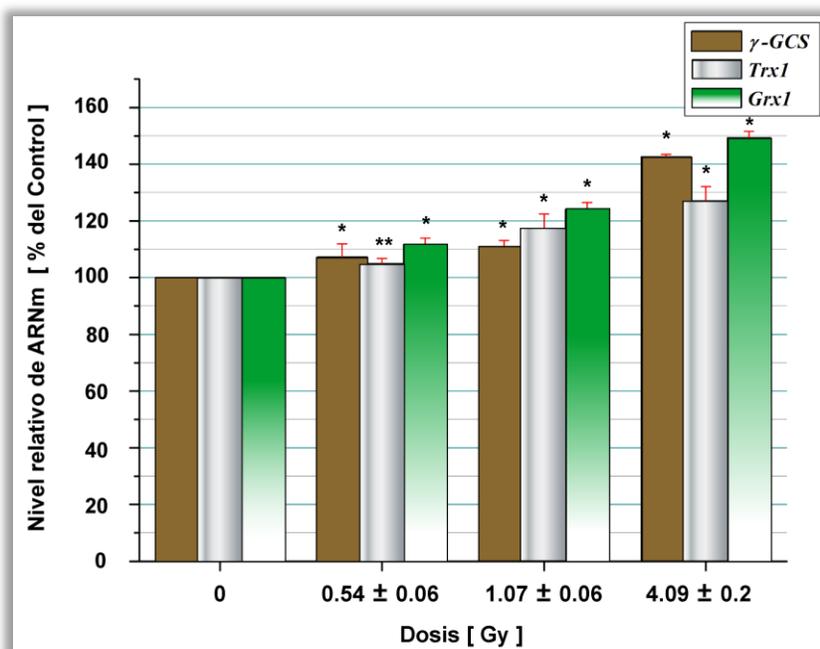


Figura 5.3 Niveles de expresión de ARNm de las proteínas γ -GCS, Trx1 y Grx1 con respecto al control (GAPDH) en **hígado** de ratones BALB/c irradiados con rayos γ a diferentes dosis.
* $p < 0.001$, ** $p = 0.05$

De acuerdo con el análisis estadístico, la hipótesis nula (H_0) supone inicialmente que los promedios del nivel relativo de ARNm a diferentes dosis es el mismo: $\mu_{\text{Control}} = \mu_{0.54 \pm 0.06 \text{ Gy}} = \mu_{1.07 \pm 0.06 \text{ Gy}} = \mu_{4.09 \pm 0.2 \text{ Gy}}$. Dicha hipótesis tiene la finalidad de establecer estadísticamente si existen cambios ‘significativos’ en los niveles de expresión. En el caso del hígado, se rechazó la hipótesis con un nivel de significancia para $\alpha = 0.1\%$, $p < 0.001$ para todas las dosis con respecto al control, excepto para Trx1 a 0.54 ± 0.06 Gy ($p = 0.05$) y entre diferentes dosis a excepción de γ -GCS a 0.54 ± 0.06 Gy y 1.07 ± 0.06 Gy ($p = 0.16$).

Los resultados establecen una clara inducción de ARNm de las proteínas Trx1, Grx1 y γ -GCS en hígado de ratón debida a radiación indirectamente ionizante (rayos γ) tras 50 ± 10 min de haber llevado a cabo la irradiación a cuerpo entero. Esto indica que dichas proteínas forman parte de los complejos mecanismos de defensa celular ante los efectos causados por radiación.

Los resultados muestran un incremento en la transcripción de los genes que codifican las proteínas evaluadas al aumentar la dosis, lo cual era de esperarse ya que el grado de daño celular provocado por radiación ionizante es proporcional a la dosis absorbida, por lo que las células responden con un mayor incremento en la síntesis o activación de proteínas que coadyuven en la defensa antioxidante.

Se encontró que la relación entre la expresión de γ -GCS y la dosis es lineal ($r=0.9961$), mientras que la expresión de las otras proteínas de estudio aumenta con la dosis, además se puede observar un aumento en la expresión de γ -GCS de 31.5% de 1.07 ± 0.06 a 4.09 ± 0.2 Gy siendo de 25.3% y 10.2% para Grx y Trx respectivamente. Es interesante encontrar una considerable expresión de γ -GCS en hígado pues este órgano es el que mayor concentración de GSH contiene (10 mM). Esto indica la necesidad de la producción *de novo* de GSH con la finalidad de contrarrestar los efectos tóxicos provocados por la radiación ionizante, manifestando así el importante papel que juega el GSH en la defensa celular.

Otra situación interesante se presenta en la diferencia de expresión de mensajeros entre Grx y Trx, siendo mayor la transcripción de Grx. Si bien los sistemas Trx y GSH/Grx son complementarios, también presentan actividades superpuestas que proveen una redundancia parcial en sus funciones, por lo que la diferencia de expresión revela la preferencia de las células hepáticas en la producción de Grx. Esto podría explicarse parcialmente por la habilidad de Grx para catalizar reacciones no sólo mediante mecanismo ditiol (como en el caso de Trx) sino también vía monotiol, siendo este último mecanismo indispensable para la reducción de proteínas glutationiladas.

5.2.2 Niveles de expresión de ARNm en Riñón.

Los cambios en la expresión de ARNm en el riñón de ratones BALB/c se muestran en la Figura 5.4, los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

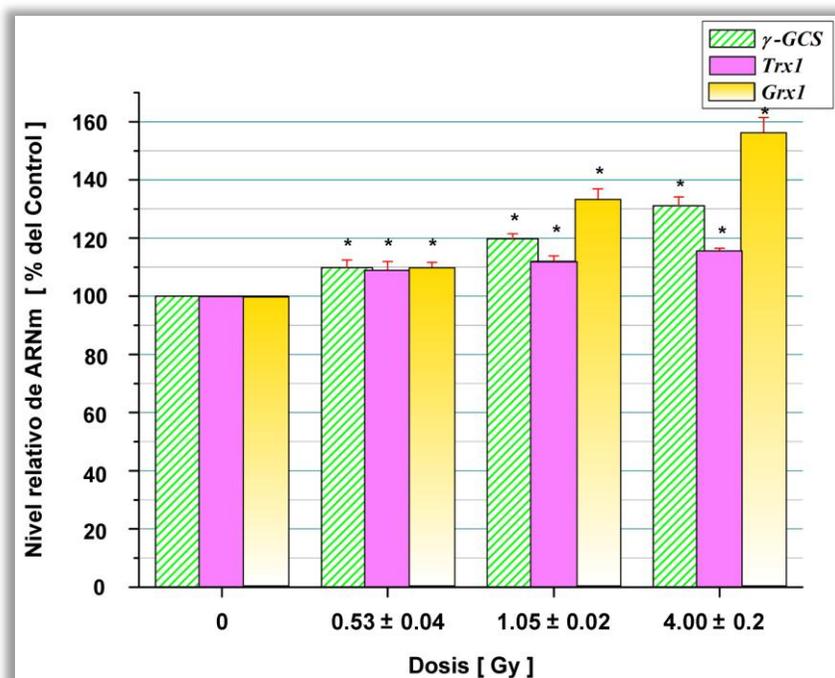


Figura 5.4 Niveles de expresión de ARNm de las proteínas γ -GCS, Trx1 y Grx1 con respecto al control (GAPDH) en **riñón** de ratones BALB/c irradiados con rayos gamma a cuerpo entero a diferentes dosis. * $p < 0.001$.

Con base en el análisis estadístico llevado a cabo, se rechazó H_0 con un nivel de significancia para $\alpha = 0.1\%$, $p < 0.001$, para todas las dosis con respecto al control y entre diferentes dosis para cada proteína de estudio a excepción de Trx1 a 0.53 ± 0.04 y 1.05 ± 0.02 Gy ($p = 0.02$) así como entre 1.05 ± 0.02 y 4.00 ± 0.2 ($p = 0.02$).

De la Figura 5.4 se observa un aumento en el nivel relativo de ARNm al aumentar la dosis. En el caso de Trx1 no se aprecia un cambio significativo a diferentes dosis salvo la comparación con respecto al control.

Los resultados muestran una mayor expresión de Grx1 con respecto a la expresión de las otras proteínas, lo cual es bastante interesante y probablemente se deba a la participación de Grx1 en la deglutationilación de proteínas clave, pues el reservorio de Trx1 es micromolar mientras que para GSH es milimolar. Esta diferencia hace a Trx1 más adecuada para señalamientos redox y al sistema GSH/Grx más idóneo para detoxificación.

Al igual que en hígado, la necesidad de la síntesis *de novo* de GSH indica la importancia de este tiol, en las células renales, bajo condiciones de estrés oxidante, pues su producción es indicativo de la gran acumulación de GSSG y probablemente, de la saturación de la Glutación Reductasa (GR).

5.2.3 Niveles de expresión de ARNm en Cerebro.

Los cambios en la expresión de ARNm en el cerebro de ratones BALB/c se muestran en la Figura 5.5, los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

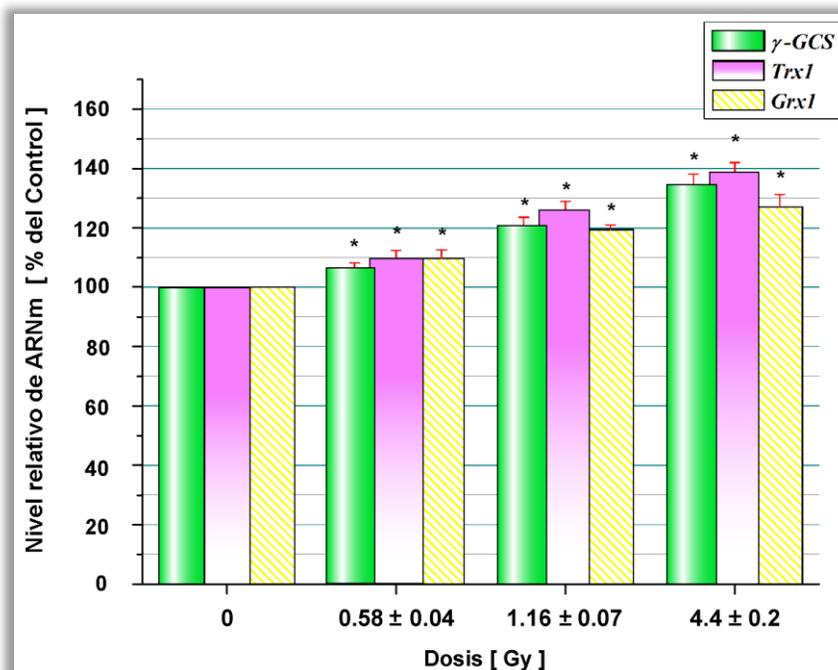


Figura 5.5 Niveles de expresión de ARNm de las proteínas γ -GCS, Trx1 y Grx1 con respecto al control (GAPDH) en **cerebro** de ratones BALB/c irradiados con rayos gamma a cuerpo entero a diferentes dosis. * $p < 0.001$.

Con base en el análisis estadístico llevado a cabo, se rechazó H_0 con un nivel de significancia para $\alpha = 0.1\%$, $p < 0.001$, para todas las dosis con respecto al control y entre diferentes dosis para cada proteína de estudio.

Nuevamente, los resultados muestran un aumento en el nivel relativo de ARNm al aumentar la dosis. En este caso, ya se puede apreciar una expresión órgano-específica de las proteínas de estudio, pues a diferencia de hígado y riñón, en cerebro los niveles de expresión de Trx1 están por arriba de Grx1. Este resultado es interesante pues se debe tener en consideración que por la alta demanda metabólica, el cerebro es especialmente vulnerable al daño por ROS ya que consume aproximadamente el 20% del oxígeno del cuerpo, está enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados que son rápidamente peroxidables, contiene altos niveles de hierro y ascorbato que son catalizadores clave para la peroxidación de lípidos y posee solamente una capacidad antioxidante moderada la cual le confiere mayor susceptibilidad por daño oxidante.

Posiblemente la diferencia en la expresión entre Trx1 y Grx1 se deba a que Trx1 es más eficiente que Grx1 para reducir puentes disulfuro (producidos ampliamente durante condiciones de estrés oxidante), debido en parte al bajo potencial redox de Trx1 (-270 mV) respecto al potencial de Grx1 (-233 mV) [Koháryová M. y Kollárová M., 2008], además de que Trx1 juega un papel importante en la regulación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1.

Los resultados muestran además la necesidad de síntesis *de novo* de GSH, al igual que en hígado y riñón, indicativo del importante papel que juega este tiol ante el estrés oxidante generado por radiación ionizante.

5.2.4 Niveles de expresión de ARNm en Pulmón.

Los cambios en la expresión de ARNm en el pulmón de ratones BALB/c se muestran en la Figura 5.6, los valores corresponden a la media \pm desviación estándar.

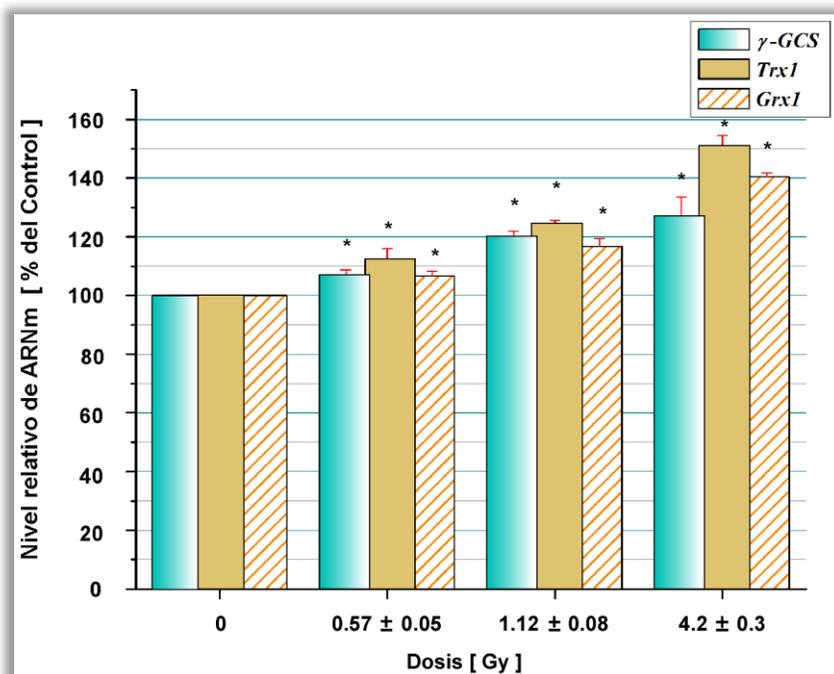


Figura 5.6 Niveles de expresión de ARNm de las proteínas γ -GCS, Trx1 y Grx1 con respecto al control (GAPDH) en **pulmón** de ratones BALB/c irradiados con rayos gamma a cuerpo entero a diferentes dosis. * $p < 0.001$.

Con base en el análisis estadístico llevado a cabo, se rechazó H_0 con un nivel de significancia para $\alpha = 0.1\%$, $p < 0.001$, para todas las dosis con respecto al control y entre diferentes dosis para cada proteína de estudio.

Los resultados demuestran la inducción de ARNm de las proteínas de estudio y el aumento en su expresión al aumentar la dosis absorbida. Al igual que en los casos anteriores, es a dosis mayores donde se nota la diferencia de expresión entre las tres proteínas de estudio. En el caso del pulmón puede observarse la similitud en la inducción de ARNm a 0.57 y 1.12 Gy, no obstante, es a 4.2 Gy donde se observa el contraste entre Trx1, Grx1 y γ -GCS. Esto es un reflejo del papel que juegan estas proteínas en diferentes tejidos cuando son sometidos a altos niveles de estrés oxidante.

A 4.2 Gy puede observarse una diferencia en la expresión de Trx1 y Grx1 del 10.7% y del 24.5% entre Trx1 y γ -GCS. Posiblemente esta diferencia pueda explicarse por el aumento en la concentración de GSSG y la consecuente disminución del cociente GSH/GSSG, lo cual conlleva el aumento en la actividad de la GR así como de la transcripción de γ -GCS. Además de que el daño

inducido por radiación, la generación de radicales libres y de ROS inducen una gran cantidad de procesos de señalización celular donde Trx1 participa activando factores de transcripción e inhibiendo procesos apoptóticos.

5.2.5 Niveles de expresión de ARNm de γ -GCS en los órganos de interés.

Para identificar la posible respuesta órgano-específica en la inducción de ARNm de las proteínas de estudio, se graficaron los niveles de expresión de cada proteína como función de la dosis para cada órgano de interés. La Figura 5.7 muestra estos niveles para el caso de la proteína γ -GCS.

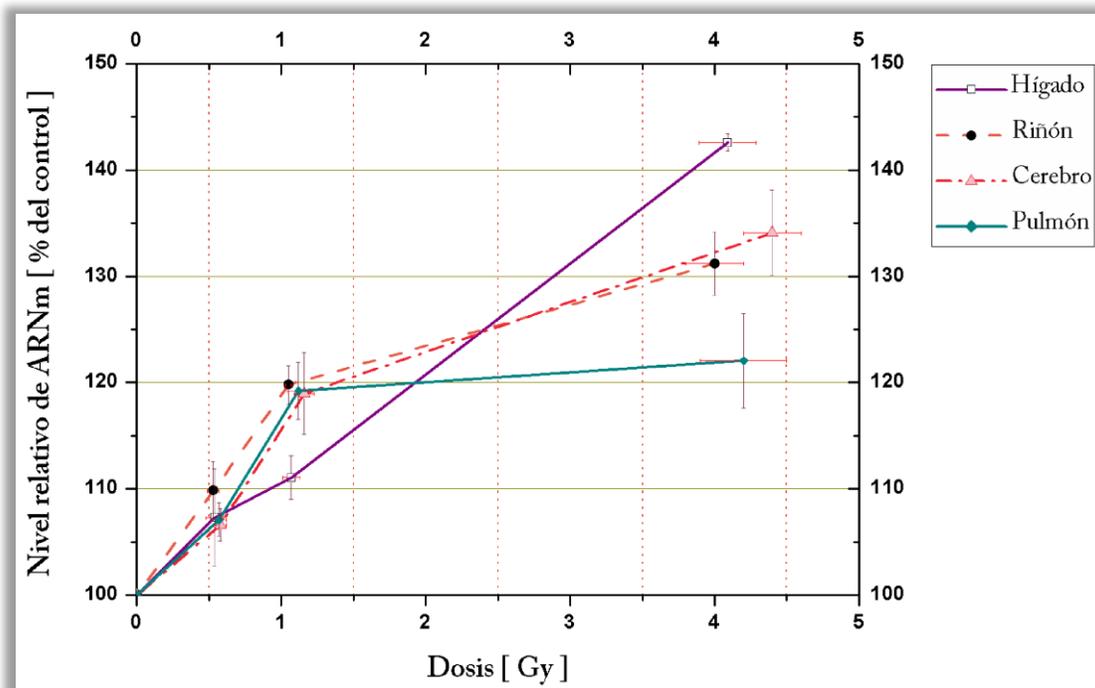


Figura 5.7 Niveles de expresión de ARNm de γ -GCS con respecto al control (GAPDH) en todos los órganos de interés de ratones BALB/c irradiados con rayos gamma a cuerpo entero a diferentes dosis.

En la Figura 5.7 se observa la expresión de la proteína γ -GCS en cada órgano de interés, como ya se había mencionado anteriormente, en el caso del hígado la relación entre dicha expresión y la dosis es lineal ($r=0.9961$) en el intervalo de dosis de estudio, mientras que en los demás casos se observó un aumento en los niveles relativos de ARNm al aumentar la dosis absorbida. La mayor inducción de transcripción de γ -GCS en hígado refleja la necesidad de producción *de novo* de GSH, ya que éste es el órgano con mayor contenido de GSH y es único desde dos puntos de vista en cuanto a su biosíntesis, el primero se debe a la habilidad única de los hepatocitos de convertir metionina en cisteína a través de la vía de transulfuración, y el segundo implica la velocidad de biosíntesis de GSH en el hepatocito la cual es equilibrada por su velocidad de exportación al plasma sanguíneo, bilis y mitocondria mediante diferentes sistemas de transporte [Fernández-Checa, *et al.*, 1992]. Los niveles de transcripción de γ -GCS obtenidos en riñón, cerebro y pulmón son indicativos del papel tan importante que desempeña el GSH en la defensa celular ante los efectos producidos por radiación ionizante. El pulmón es el órgano que presentó menor nivel de expresión de γ -GCS,

aunque solo 10% por debajo de riñón y cerebro, hecho probablemente relacionado con el consumo de GSH exportado por el hígado, siendo el pulmón uno de los mayores consumidores de este tiol.

5.2.6 Niveles de expresión de ARNm de *Trx1* en los órganos de interés.

La Figura 5.8 muestra los niveles de expresión de *Trx1* en función de la dosis para cada órgano de interés.

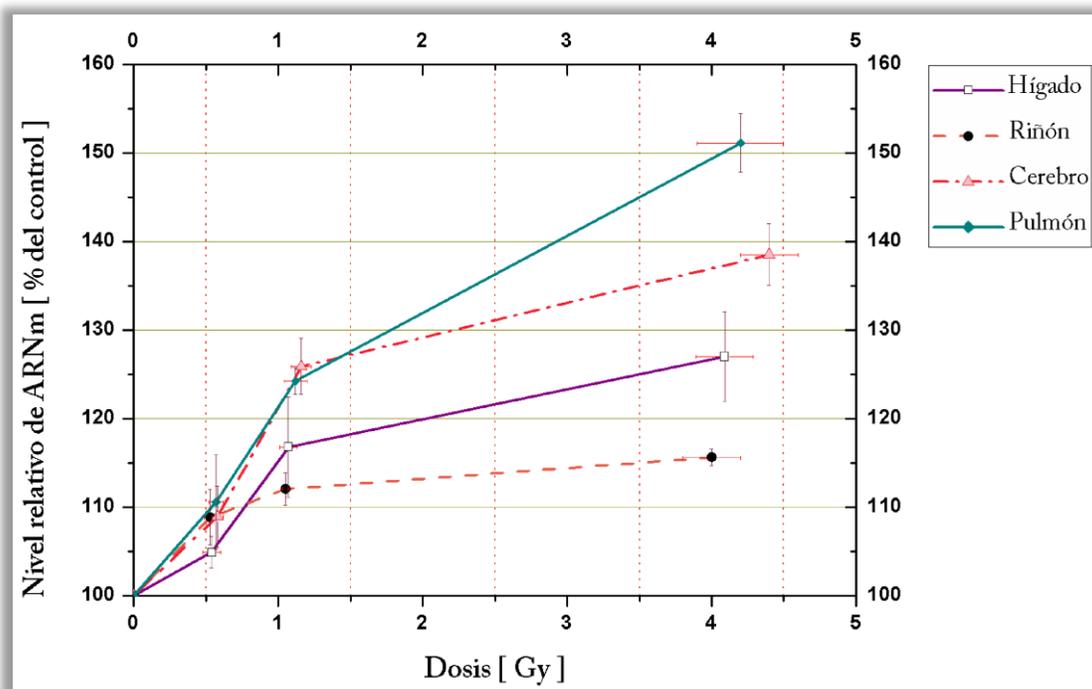


Figura 5.8 Niveles de expresión de ARNm de *Trx1* con respecto al control (GAPDH) en todos los órganos de interés de ratones BALB/c irradiados con rayos gamma a cuerpo entero a diferentes dosis.

En el caso de *Trx1*, los resultados sugieren una respuesta órgano-específica en cuanto a la transcripción de esta proteína, aunque tal afirmación requeriría un estudio más detallado. Destacan los altos niveles de expresión en pulmón, efecto inequívoco del papel que juega *Trx1* en la protección contra los efectos producidos por radiación. Tales niveles pudieron alcanzarse debido a la participación de *Trx1* como cofactor, agente reductor y su asociación con otras proteínas, actividades que parecen poseer un efecto relevante en la respuesta celular ante radiación ionizante. Como cofactor de peroxirredoxinas, *Trx1* juega un papel directo al reducir especies oxidantes, como peróxido de hidrógeno. Como cofactor de la ribonucleótido reductasa y la metionina sulfóxido reductasa, *Trx1* contribuye en la reparación de ADN y en la reducción de constituyentes celulares oxidados [Powis y Montfort, 2001]. Además, la forma reducida de *Trx1* inhibe la actividad de ASK1, cinasa reguladora de la señal de apoptosis [Saitoh, *et al.*, 1998] y finalmente, como agente reductor, *Trx1* cataliza la reducción de puentes disulfuro y grupos de metionina sulfóxido en proteínas. El efecto neto de la reducción de proteínas mediada por *Trx1* podría ser el de tratar de restaurar las funciones celulares normales.

5.2.7 Niveles de expresión de ARNm de Grx1 en los órganos de interés.

La Figura 5.9 muestra los niveles de expresión de Trx1 en función de la dosis para cada órgano de interés.

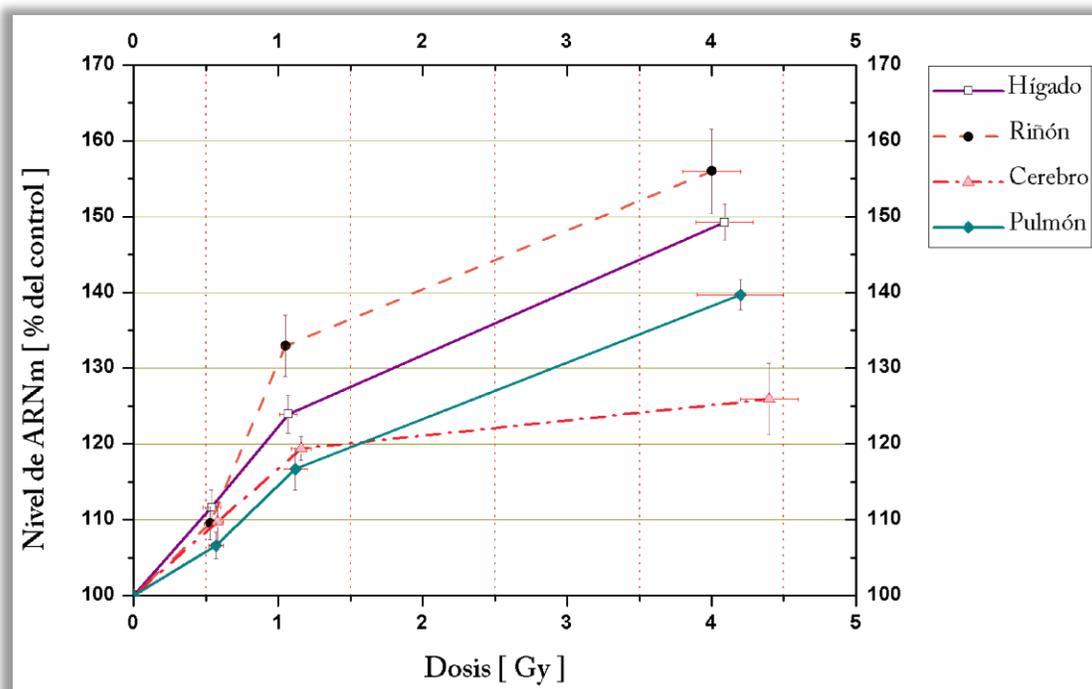


Figura 5.9 Niveles de expresión de ARNm de Grx1 con respecto al control (GAPDH) en todos los órganos de interés de ratones BALB/c irradiados con rayos gamma a cuerpo entero a diferentes dosis.

En el caso de Grx1, los resultados muestran la interrelación del sistema GSH/Grx1 a través de la transcripción de γ -GCS y Grx1, obteniendo una mayor expresión de Grx1 con respecto a γ -GCS en todos los órganos de estudio a excepción de cerebro, hecho que demuestra la rápida mediación del GSH ante el daño producido por radiación y la ulterior necesidad de su producción al disminuir el cociente de concentración GSH/GSSG.

Parte de los altos niveles de expresión de Grx1 alcanzados en riñón, hígado y pulmón podrían explicarse por la habilidad de esta proteína para catalizar reacciones vía mecanismo monotiol y no solo ditiol como Trx1. Este mecanismo es necesario en la reducción de los complejos GSH-Proteínas (glutacionilación), proceso de gran importancia biológica ya que protege contra la oxidación irreversible del grupo sulfhidrilo en proteínas y sirve como reservorio de GSH durante estrés oxidante, además de jugar un papel clave en la modulación de los intermediarios implicados en los procesos de señalización, pues las proteínas glutacioniladas son inactivadas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La radiación ionizante difiere de muchos otros agentes físicos o químicos por el hecho de que actúa sin distinción sobre todas las moléculas de una determinada muestra. Esta acción indiscriminada conduce a una desconcertante variedad de reacciones que ocurren en las células irradiadas. Usualmente, los efectos producidos por la radiación sobre determinadas moléculas, como el ADN, son descritos como la suma de dos procesos: por acción directa, que reúne los efectos de la energía depositada directamente en las moléculas blanco y mediante acción indirecta, que involucra los efectos de las especies reactivas formadas y que se difunden del lugar de su creación hasta reaccionar con alguna molécula blanco.

Altas concentraciones de especies reactivas son perjudiciales para la célula debido a que pueden reaccionar con biomoléculas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas e inactivar su función. Uno de los radicales libres más reactivo es el hidroxilo $\text{OH}\cdot$, un poderoso oxidante que, aunque de difusión celular limitada, puede dañar la mayoría de los compuestos orgánicos [Czapski, 1984]. Este radical puede atacar directamente los lípidos de membrana e iniciar su peroxidación, proceso que tiene como consecuencia la disminución en la fluidez de la membrana y, con ello, la alteración de sus propiedades e interacción con proteínas. Además, durante este proceso de peroxidación se generan productos de degradación, como los aldehídos, altamente reactivos que pueden dañar otras moléculas. Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que forman parte de las proteínas son susceptibles de ser atacadas por el radical hidroxilo, aunque algunas son más vulnerables que otras como es el caso de las cadenas laterales de la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína. En consecuencia, la exposición de proteínas a radicales libres conduce a modificaciones estructurales que pueden acompañarse de una fragmentación química, un incremento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y a la pérdida de la función biológica.

Sin embargo, uno de los blancos más importantes del $\text{OH}\cdot$ es el ADN. La importancia biológica de los ácidos nucleicos obliga a considerar como un efecto de gran repercusión el que se presenten modificaciones o deleciones de las bases de la molécula de ADN causadas por la presencia de radicales libres. La interacción de radicales libres con el ADN causa cambios conformacionales, alteración de bases, pérdida de nucleótidos, rompimientos únicos de cadena (SSB) o rompimientos de doble cadena (DSB), aductos entre la base nitrogenada y el azúcar, y uniones covalentes con proteínas con las que está interaccionando. Todas estas modificaciones pueden resultar en mutagénesis o en un bloqueo del proceso de replicación del ADN [Sies, 1993; Sies y Menck, 1992]. Las modificaciones de las bases se deben, en gran parte, a los metales de transición, fundamentalmente al ión ferroso (Fe^{2+}), que se encuentra unido al ADN y que, en presencia del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), genera el hidroxilo, el cual puede atacar tanto purinas como pirimidinas, además de generar SSB y DSB.

Otro radical perjudicial para la célula es el superóxido ($\bullet O_2^-$). El efecto más nocivo de éste es el de inactivar ciertas enzimas con centros de hierro-sulfuro (Fe-S) debido a su tendencia a ser electrostáticamente atraído al átomo de hierro de estos centros catalíticos. Tras la unión, el $\bullet O_2^-$ oxida de forma univalente el centro Fe-S, que en su forma oxidada es inestable y se degrada [Flint, *et al.*, 1993]. El hierro liberado de estos centros Fe-S dañados puede inducir mutagénesis, por lo que la producción de $\bullet O_2^-$ está también relacionada con una alta tasa de mutación [Farr, *et al.*, 1986].

El peróxido de hidrógeno, aunque es menos reactivo que el $\bullet O_2^-$ y el $OH\bullet$, puede, debido a su elevada capacidad de difusión, reaccionar con gran cantidad de biomoléculas e inactivar su función, puede oxidar las cadenas laterales de los aminoácidos e inducir la introducción de grupos carbonilo [Stadtman y Levine, 2003] y al igual que el $\bullet O_2^-$, puede oxidar directamente enzimas con grupos hierro-sulfuro [Flint, *et al.*, 1993]. Generalmente, estas modificaciones conllevan una alteración en la estructura de la proteína que conduce a la pérdida de función o actividad; sin embargo, también se han descrito modificaciones reversibles inducidas por H_2O_2 que no suponen pérdida de función. El H_2O_2 puede oxidar de forma irreversible el grupo tiol (R-SH) de los residuos de cisteína generándose estados altos de oxidación como sulfínicos y sulfónicos que producen la inactivación de la proteína; sin embargo, esta oxidación también puede ser reversible por la formación de grupos sulfénicos que pueden reducirse de nuevo al grupo tiol (R-SH) o bien reaccionar con otras cisteínas cercanas y formar puentes disulfuro intermoleculares. Esta reversibilidad en la oxidación permite modular actividades enzimáticas o regular la actividad de proteínas que actúan como sensores de ROS, mientras que los estados de oxidación sulfínicos y sulfónicos no pueden ser reducidos a cisteína.

En situaciones de estrés oxidante, el cual ocurre cuando la producción de ROS sobrepasa la capacidad de los mecanismos celulares de defensa antioxidante basales para neutralizar estas especies tóxicas, se activan en la célula rutas de activación mediante la transmisión de señales moleculares a través de factores de transcripción específicos que aumentan la expresión de genes que codifican para proteínas antioxidantes. Esta respuesta específica a estrés oxidante tiene como función disminuir los niveles de ROS así como reparar los daños producidos por ellos.

Está muy bien documentado que la radiación ionizante produce cambios en el material que atraviesa mediante la producción de iones, radicales libres y estados excitados. En general, estas especies son muy reactivas, sus valores de constantes de rapidez de reacción de segundo orden son altos y su vida media intracelular es muy corta debido a la presencia de elevadas concentraciones moleculares. Además de existir evidencia que sugiere que la presencia de radicales libres induce la activación de sistemas protectores.

Para investigar la respuesta órgano específica inducida por la radiación ionizante en los sistemas Trx y GSH/Grx, se irradiaron roedores de la cepa BALB/c a cuerpo entero en un irradiador GammaCell 200 con rayos gamma de 1.25 MeV a diferentes dosis entre 0.5 y 4 Gy consideradas intermedia y alta, respectivamente. La tasa de dosis del irradiador se determinó empleando solución Fricke, la dosis de tránsito de los roedores dentro del GammaCell se estimó mediante el uso de dosímetros termoluminiscentes y la distribución de dosis (axial y radial) se estimó con película de tinte radiocrómico.

La transcripción de los genes de proteínas con actividad antioxidante como Trx1, Grx1 y γ -GCS en cuatro órganos de interés: el hígado, el riñón, el pulmón y el cerebro, se determinó mediante la técnica RT-PCR empleando la transcripción del gen de la enzima *GAPDH* como control interno.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación indican que las proteínas Trx1, Grx1 y γ -GCS forman parte de los sistemas de defensa antioxidante ante los efectos producidos por la radiación ionizante, ya que este agente exógeno indujo la transcripción de los genes que codifican para dichas proteínas. Tal transcripción es resultado de toda una compleja red de señalización celular desencadenada tanto por los efectos directos como indirectos de la radiación.

El análisis de resultados reveló una correlación clara entre los niveles de expresión de ARNm de las proteínas de estudio y la dosis absorbida, encontrándose un aumento de dichos niveles al aumentar la dosis absorbida. Por otra parte, los distintos niveles de expresión de ARNm sugieren una respuesta órgano-específica de las proteínas de estudio, aunque la afirmación de tal conjetura requerirá de un estudio más detallado utilizando para ello un intervalo de dosis más amplio tomando en consideración la dosis letal $LD_{50/30}$ (dosis de radiación necesaria para acabar con la mitad de una población de individuos en un periodo de 30 días) utilizando roedores de la misma cepa y edad, pues se ha comprobado que el valor de la $LD_{50/30}$ depende de ambos factores [Grahm y Hamilton, 1956; Calcutt, *et al.*, 1970].

Se sabe que los sistemas Trx y GSH/Grx tienen funciones y mecanismos de regulación en común, no obstante, la diferencia entre los niveles de transcripción de Trx1 y Grx1 sienta la base para suponer una disimilitud funcional entre ambos sistemas bajo condiciones de estrés oxidante, además de evidenciar la participación de distintos factores de transcripción para llevar a cabo la síntesis de éstas. En el caso de hígado y riñón, la expresión de Grx1 es mayor que la de Trx1 en el intervalo de dosis de estudio, pero la diferencia es más notable al aumentar la dosis absorbida. Este comportamiento probablemente se encuentre relacionado con la concentración de GSH en el hígado y el riñón, pues tal reservorio brindaría un aumento en la eficiencia del sistema GSH/Grx, justificaría el aumento en la transcripción de Grx1 y plantearía la importancia del papel que juega este sistema bajo condiciones de estrés oxidante.

En cuanto al cerebro y el pulmón la situación es diferente, ya que la transcripción de Trx1 sobrepasa a la de Grx1, aunque solo en un 10% en la situación de mayor estrés oxidante. Este resultado también destaca la importancia del sistema GSH/Grx, siendo GSH de vital importancia en cerebro, ya que este órgano parece especialmente susceptible al ataque de especies reactivas ya que sus células utilizan el 20% del oxígeno consumido por el cuerpo a pesar de que ocupa solo el 2% del peso corporal [Clarke y Sokoloff, 1999]. La generación de ROS durante la irradiación da mayor vulnerabilidad al cerebro debido a que es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados, los cuales son el blanco de la peroxidación lipídica. Además, el cerebro posee una actividad entre baja y moderada de súper óxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa comparada con el riñón o el hígado [Cooper, 1997]. Todo lo anterior hace suponer una vulnerabilidad muy comprometida del cerebro en condiciones de estrés oxidante, no obstante éste posee un efectivo sistema de defensa antioxidante donde posiblemente el glutatión desempeñe un papel sustancial al reaccionar con sustancias tóxicas, tanto espontánea como enzimáticamente por medio de glutatión S-transferasas

para formar conjugados de GSH excretables; participando como transporte y reservorio de cisteína, regulación de apoptosis [Hall, 1999] y como modulador de señalamientos celulares mediante glutationilación de cisteínas clave, localizadas en el sitio activo de las regiones reguladoras de proteínas como cinasas, fosfatasas y factores de transcripción o por medio de la modulación de vías de señalización de transducción sensitivas a ROS mediante cambios en el estado redox intracelular.

La importancia del rol que desempeña GSH en el cerebro queda de manifiesto por la transcripción de γ -GCS alcanzando niveles de tan sólo 10% por debajo del hígado (en las condiciones de mayor estrés oxidante), siendo éste el órgano central para el metabolismo de GSH y es su principal exportador vía circulación inter-órganos (se cree que el 20% del GSH sintetizado *de novo* en el hígado es exportado desde los hepatocitos de rata, [Sies y Wendel, 1978]). Por todo lo anterior, destaca el hecho de que en el cerebro y el pulmón se hayan alcanzado altos niveles de transcripción de Trx1 en comparación con el hígado y el riñón, situación que podría deberse al bajo potencial redox de Trx1 lo cual le confiere el título de mejor reductor ditiol en el citosol, además de actuar como cofactor de peroxirredoxinas, de la ribonucleótido reductasa y la metionina sulfóxido reductasa, también contribuye en la reparación de ADN, juega un papel crucial en la regulación del estado redox intracelular al reducir cuantiosos sustratos proteicos y participa en la regulación de factores de transcripción y de apoptosis. Además de que Trx1 es excelente reductor de puentes disulfuro de proteínas, llevando a cabo esta reacción mucho más rápidamente, por varios órdenes de magnitud, que el GSH [González y Muñoz, 2003]

Finalmente, existe evidencia que señala a Nrf2 como participe en la modulación de γ -GCS y Trx, no obstante, los hallazgos de este trabajo sugieren que la transcripción de Grx es modulada de manera diferente, involucrando a otros factores u otras vías que sería importante conocer.

Gran parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido novedosos e interesantes, han aportado información sobre los complejos sistemas de defensa antioxidante en los diferentes órganos de estudio, no obstante, una clara comprensión de lo que ocurre en el universo celular después de sufrir los efectos de la radiación ionizante se atisba aún lejana. Este trabajo pretende hacer aportaciones que sean capaces de promover nuevas investigaciones en este mismo contexto.

Perspectivas futuras.

- ❖ Debido al traslado de los roedores después de la irradiación del ICN al IIB, el tiempo transcurrido hasta llevar a cabo la extracción de órganos fue de 50 ± 10 min. Un estudio posterior requerirá el análisis de la modulación del ARNm a intervalos de tiempo mayores para observar el comportamiento temporal de los niveles de expresión tras la irradiación.
- ❖ Al comprobar que la transcripción de las proteínas Trx1, Grx1 y γ -GCS es inducida por radiación ionizante, se podría analizar la expresión de proteínas relacionadas con éstas, tales como las glutatión S-transferasas, glutatión peroxidasas, tioredoxin-reductasa, GR, SOD, CAT, así como el contenido de GSH y GSSG intracelular en los diferentes órganos de estudio. El análisis de la cantidad de GSH, GSSG y la expresión de las proteínas citadas, brindaría mayor información sobre la funcionalidad y especificidad de los mecanismos de defensa oxidante ante los efectos producidos por un agente externo como lo es la radiación ionizante.
- ❖ La técnica de biología molecular RT-PCR, empleada en la experimentación de este trabajo, únicamente proporciona datos semi-cuantitativos, por lo que en futuros proyectos se sugiere el uso de alguna técnica cuantitativa como PCR en tiempo real.
- ❖ Se plantea llevar a cabo un análisis profundo de las posibles proteínas a emplear como control interno en PCR cuya expresión no se altere por la radiación ionizante, pues en este ensayo se trabajó bajo la hipótesis de que GAPDH no se modulaba por este agente exógeno; una posibilidad podría ser la proteína β -actina.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EMPLEADAS

El siglo XX fue testigo de una explosión de conocimiento en el área de la Biología Molecular. Este nuevo conocimiento ha demostrado de manera más clara que toda la vida en la Tierra está muy relacionada: todos los organismos vivos emplean ADN y ARN para almacenar y transferir información genética, y todos emplean el mismo código genético para fabricar sus proteínas. A medida que aumentó el conocimiento sobre la manera de trabajar de la maquinaria hereditaria, los científicos comenzaron a preguntarse si el material genético y el proceso de expresión podían ser manipulados. Estas interrogantes provocarían el surgimiento de técnicas basadas en la aplicación de los agentes naturales para la manipulación del ADN: las enzimas.

0.1 ADN polimerasas

Las ADN polimerasas son enzimas que copian ADN. Sintetizan una nueva cadena individual que es complementaria a la cadena molde de la molécula parental, por adición de nuevos nucleótidos al extremo 3' de la cadena naciente. Para sintetizar nuevo ADN, las ADN polimerasas requieren obligatoriamente de una hebra molde y una secuencia iniciadora (cebador o *primer*). Un cebador es una secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico, de manera que su extremo 3' quede disponible para ser el punto de inicio de la nueva cadena de ADN. La primera base del ADN naciente se une por medio de una unión fosfodiéster al extremo 3' del cebador, y es complementaria a la base de la cadena molde. La síntesis avanza a medida que se añaden más bases a la nueva cadena (Figura 0.1).

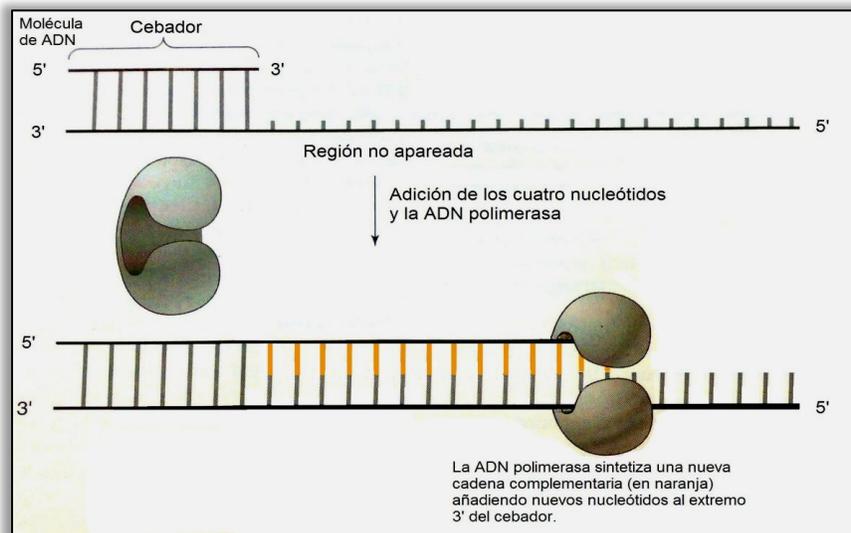


Figura 0.1 Actividad de la ADN polimerasa.

Las ADN polimerasas han sido purificadas de una amplia variedad de organismos. Un grupo de estos organismos cuyas ADN polimerasas han adquirido gran importancia en los laboratorios son las bacterias que viven a muy altas temperaturas (como los manantiales calientes y las emisiones

termales del fondo del océano). Dado que sus ambientes naturales son muy calientes, estas ADN polimerasas funcionan a muy altas temperaturas. Los científicos actualmente emplean estas polimerasas resistentes al calor para copiar fragmentos de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

0.2 ARN polimerasas

Las ARN polimerasas son las enzimas que leen una secuencia de ADN y sintetizan una molécula de ARN complementaria. La ARN polimerasa requiere una secuencia de bases especial en el molde de ADN, denominada promotor, como señal del sitio de inicio de la transcripción pero no necesita un cebador (Figura 0.2). Al igual que las ADN polimerasas, las ARN polimerasas han sido purificadas de una gran variedad de organismos, dado que todos los organismos deben transcribir sus genes.

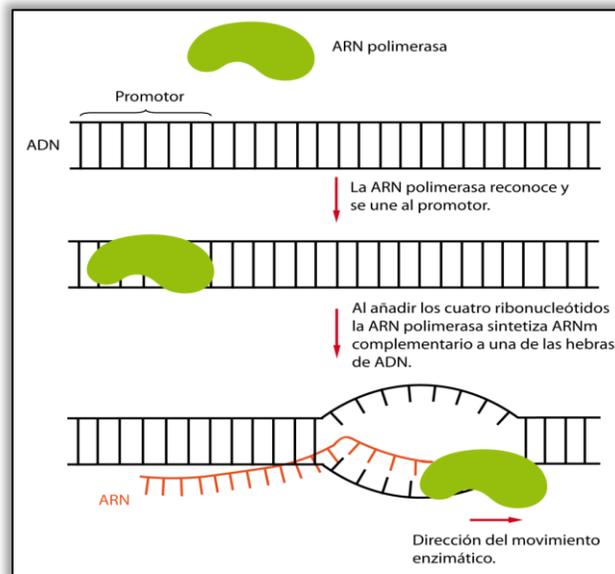


Figura 0.2 Actividad de la ARN polimerasa.

0.3 Transcriptasas Inversas

Como sugiere su nombre, las transcriptasas inversas leen una secuencia de ARN y sintetizan una secuencia de ADN complementario (a menudo abreviado ADNc o cDNA; Figura 0.3). Estas enzimas están producidas por retrovirus que convierten su genoma de ARN en una secuencia de ADN cuando infectan una célula hospedadora. Las transcriptasas inversas han permitido a los científicos sintetizar genes como ADN, a partir de un ARNm. Esta habilidad es útil para tratar genes eucariotas, dado que los genes originales a menudo están divididos en pequeñas piezas separadas por intrones (regiones de ADN no codificante) en el cromosoma. El ARNm de estos genes ha sido sometido a *splicing* o procesado en la célula eucariota, los intrones han sido eliminados, dejando solamente la secuencia codificante. La transcriptasa inversa puede convertir este ARNm en un gen, sin necesidad de procesarlo, por que estará formado por la secuencia codificante de la proteína.

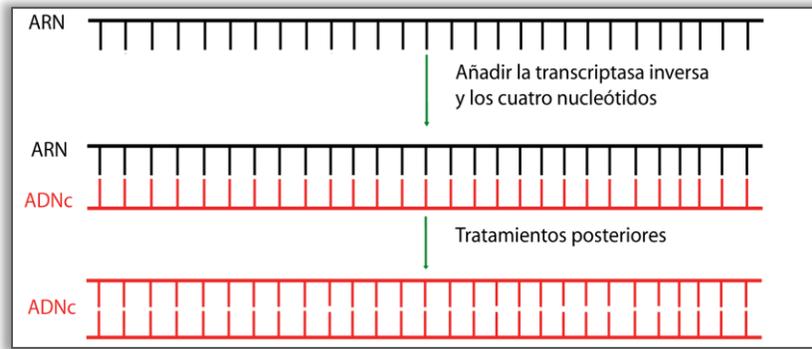


Figura 0.3 Actividad de la transcriptasa inversa

0.4 Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm (sin secuencias intrónicas) utilizando la enzima transcriptasa inversa. Esta enzima trabaja sobre un molde de cadena simple de ARN, creando el ADN complementario basado en la correspondencia de bases. Se ha encontrado que el ARNm de células eucariotas posee una cola de Adeninas en el extremo 3', de forma que oligonucleótidos dT se unen a estas bases y actúan como cebadores de la transcriptasa inversa.

0.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En 1985, se introdujo una nueva técnica que cambió por completo el panorama científico. Esta técnica esencialmente permitió a los científicos generar un ilimitado número de copias de fragmentos de ADN específicos. Fue inventada por Kary Mullis, un científico de la industria biotecnológica. La esencia de la idea de Mullis consiste en poder disponer de una reacción en un tubo de ensayo en la cual la ADN polimerasa duplique una molécula de ADN individual en dos moléculas, luego se dupliquen a cuatro, luego en 8, etc., hasta contar con un número de 2^x copias de la molécula original, donde x es el número de ronda de síntesis final. Esta nueva técnica se denominó Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*). Las investigaciones de Mullis se basan en las características de las enzimas ADN polimerasas y procesos de hibridación. La hibridación es un proceso también conocido como *annealing* o renaturalización, en el cual dos hebras de ADN de cadena sencilla con una secuencia de bases complementarias se unen para formar una molécula de ADN de doble cadena correctamente apareada.

La técnica PCR se divide en una serie de pasos descritos a continuación:

I.- Inicialización y Desnaturalización. Para iniciar la reacción en cadena, un gran número de cebadores específicos se mezclan con la molécula molde en un tubo de ensayo conteniendo solución amortiguadora (sustancia que mantiene la mezcla al pH correcto) y desoxinucleótidos trifosfato. Esta mezcla se calienta a alta temperatura para que las dos hebras de la molécula parental se desnaturalicen o separen (Figura 0.4).



Figura 0.4 Desnaturalización de una hebra de ADN.

II.- Alineamiento. Tras la desnaturalización, se deja que la mezcla se enfríe. Teóricamente, las dos hebras de ADN parental podrían alinearse y volver a formar pares de bases. Sin embargo, existen tantas moléculas de cebadores en la mezcla que éstos, al ser moléculas más cortas que las hebras de ADN, encuentran primero sus secuencias complementarias en las hebras parentales, antes de que dos hebras complementarias puedan aparearse completamente. Así es que una molécula de cebador hibrida a cada una de las hebras parentales. Para ello es necesario bajar la temperatura a T_m (temperatura de alineamiento o melting temperature) durante cierto tiempo, permitiendo así el alineamiento (Figura 0.5).

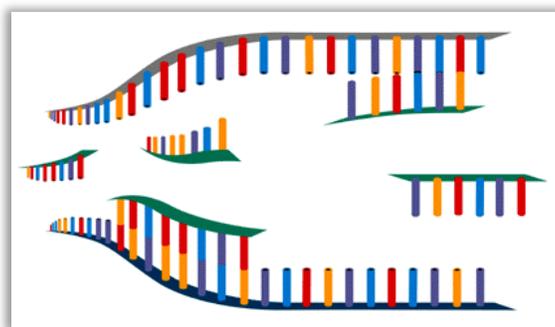


Figura 0.5 Fase de alineamiento.

III.- Extensión. Seguidamente se añade la ADN polimerasa. Los cebadores hibridan a las moléculas molde de cadena simple y permiten a la ADN polimerasa comenzar la síntesis de ADN, añadiendo el desoxirribonucleótido correcto al extremo 3' del cebador formando nuevas cadenas complementarias (Figura 0.6). Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 72°C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla básica: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto, por lo que cada enzima empleada tendrá tiempos de extensión diferentes.



Figura 0.6 Extensión.

IV.- Elongación Final. Etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 72°C durante 5 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado.

Después de un corto tiempo, la mezcla se calienta otra vez, con lo cual las dos hebras de la nueva molécula de ADN se desnaturalizan, originando cadenas simples y se repite nuevamente el proceso. Este proceso de desnaturalización, alineamiento y extensión de ADN es repetido una y otra vez, a menudo unas 25 ó 30 veces, originando un alto número de moléculas.

Inicialmente, las primeras PCR se llevaban a cabo con ADN polimerasas de *E. coli*, la cual se inactivaba a las altas temperaturas de desnaturalización. Por lo tanto se debía añadir más enzima al inicio de cada paso de síntesis. Sin embargo, algunos organismos que habitan en manantiales calientes y fuentes termales oceánicas, poseen ADN polimerasas que no se inactivan a las temperaturas de desnaturalización del ADN. La PCR moderna es llevada a cabo con ADN polimerasas termorresistentes, por lo que la enzima puede ser añadida una única vez al inicio de los ciclos de replicación.

0.6 Electroforesis en Gel

En el curso de la mayoría de manipulaciones de ADN es deseable tener una visión de los segmentos de ADN con los que se está trabajando. El método estándar empleado para separar fragmentos de ADN es la electroforesis en gel de agarosa. Otros geles fabricados con materiales alternativos son muy útiles en algunas circunstancias. La agarosa es un polisacárido que se disuelve en agua hirviendo y luego se transforma en gel a medida que se enfría. El ADN se introduce en pequeños pocillos en el gel, éste se coloca en una celda con una solución de agua y sales y luego se aplica una corriente eléctrica a través del gel. Debido a que el ADN está cargado negativamente (por sus grupos fosfato), es atraído hacia el electrodo positivo del campo electroforético (Figura 0.7).

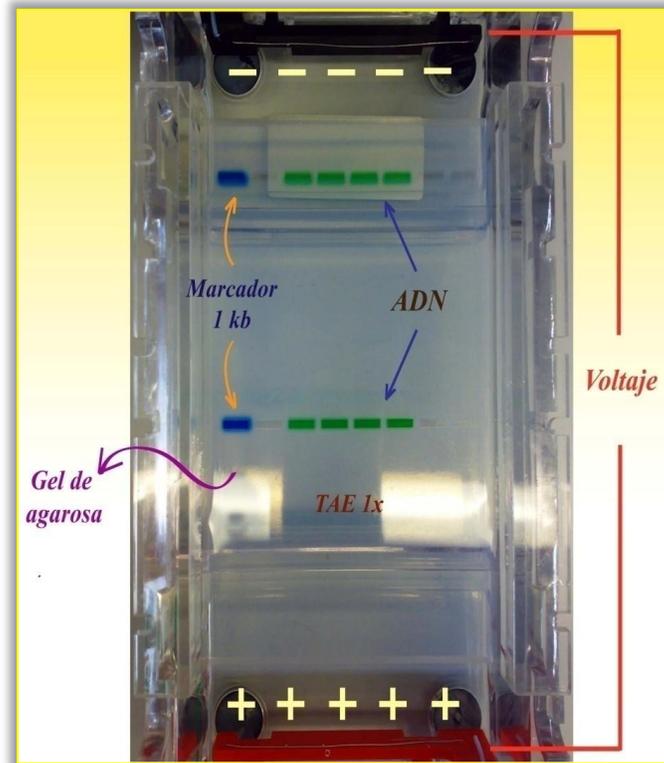


Figura 0.7 Electroforesis en Gel

Todo el ADN colocado en el gel migra hacia el polo positivo, pero el material del gel hace que las moléculas de ADN más grandes se muevan más lentamente que las pequeñas, por lo que durante el mismo período de tiempo, los fragmentos de ADN más pequeños migrarán más rápidamente que un fragmento más grande, de hecho, la velocidad de migración de fragmentos de ADN a través de la agarosa es inversamente proporcional al \log_{10} de sus pesos moleculares. Después de un tiempo, la corriente eléctrica se interrumpe, y el gel completo se coloca en una solución colorante de ADN. Después de la tinción el ADN puede ser observado. El patrón se podrá ver como una serie de bandas en el gel, y cada una de estas bandas correspondiente a un determinado tamaño de fragmento de ADN. Puede haber millones de moléculas en cada banda, pero todas del mismo tamaño o peso molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aikens, J., Dix, T.A. 1991. Peroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol. Chem.* 266(23):15091-15098

Anderson, M. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem-Biol Interac.* 111-112: 1-14

Attix, F. 1986. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. John Wiley & Sons, U.S.A.

Bathia, P., Taylor, W.R., Greenberg, A.H., Wright, J.A. 1994. Comparison of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-Ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for Northern Blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Analytical Biochemistry.* 216:223-226.

Biete, A. 1990. Radioterapia en el tratamiento del cáncer. Ed. Doyma.

Blake, D.R., Rallen, R.E., Lunec, J. 1987. Free radicals in biological systems a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.* 45:371-385.

Bushong, S.C. 2010. Manual de Radiología para técnicos. Elsevier, España. 704 pp.

Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 51:79-110.

Calcutt, G., Ting, S.M., Preece, A.W. 1970. Tissue NAD levels and the response to irradiation or cytotoxic drugs. *Br. J. Cancer* 24: 380-388.

Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., Ghezzi, P. 2002. Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and the thioredoxin systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 9:9745-9749.

Cerutti, P.A. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science.* 227:375-381.

Choe, M., Jackson, C., Yu, B.P. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radical Biol Med.* 18:977-984.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162:156.

Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15:532-537.

Clarke, D.D. y Sokoloff, L. 1999. Circulation and energy metabolism of the brain. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* (Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. & Uhler, M.D., eds), pp. 637-669. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Cleaver, J. 1994. It was a very good year for DNA repair. *Cell.* 76:1-4.

Cooper, A.J.L. 1997. Glutathione in the brain: disorders of glutathione metabolism. In *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* (Rosenberg, R.N., Prusiner, S.B., DiMauro, S., Barchi, R.L. & Kunk, L.M., eds), pp. 1195-1230. Butterworth-Heinemann, Boston.

Crollius, H.R., Jaillon, O., Bernot, A., Dasilva, C., Bouneau, L., Fischer, C., Fizames, C., Wincker, P., Brottier, P., Quétier, F., Saurin, W., Weissenbach, J. 2000. Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using *Tetraodon nigroviridis* DNA sequence. *Nature* 25, 2, 235-238.

Czapski, G. 1984. Reaction of OH. *Methods Enzymol* 105, 209-215.

Demple, B. 1990. Oxidative DNA damage: repair and inducible cellular responses. *Mutat Environ.* 340A:155-167

Díaz, A.P. 2005. Dosimetría de una fuente de ¹⁹²Ir usada en braquiterapia de alta tasa de dosis. Tesis de Maestría en Ciencias Físicas. PCF UNAM.

Dubner, D., Gisone, P., Jaitovich, I., Perez, M. 1995. Free radicals production and estimation of oxidative stress related to gamma irradiation. *Biological Trace Elements research*, v. 47, p. 265-270.

Dubner, D., Gisone, P., Michelin, S., Pérez, M. 1997. Radiación, óxido nítrico y muerte celular. IAEA-CN-67/55

Eiskens, M.T., Jaspers, C.H., Penninckx, M.J. 1991. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 137; 637-644.

Fang, Y.Z., Yang, S., Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 18; 872-879.

Farr, S. B., D'Ari, R., Touati, D. 1986. Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83, 8268-8272.

Fernández-Checa, J., Lu, S. C., Ookhtens, M., DeLeve, L., Runnegar, M., Yoshida, H., Saiki, H., Kannan, R., Garcia-Ruiz, C., Kuhlenkamp, J. F., Kaplowitz, N. 1992. The Regulation of Hepatic Glutathione. In *Hepatic Anion Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology* (Tavoloni, N., and Berk, P. D., eds) pp. 363–395, Marcel Dekker, New York.

Flint, D.H., Tuminello, J.F., Emptage, M.H. 1993. The Inactivation of Fe-S Cluster Containing Hydro-lyases by Superoxide*. *Journal of Biological Chemistry.* 268, 22369-22376.

Freeman, B.A. y Grapo J.D. 1982. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-426

Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 44: 147-59.

Fridovich, I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 23; 239-57.

Fricke, H. y Hart, E.J. 1966. *Chemical Dosimetry, Radiation Dosimetry.* Academic Press, New York.

- Fricke, H. y Morse. 1927.** S., Am. J. Röntgenol. Radium Ther. Nucl. Med. 18, p430.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. 1995.** DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.
- Gamboa de Buen, M.I. 1996.** “Medida de la respuesta termoluminiscente (eficiencia y supralinealidad) de Li:Mg,Ti expuesto a radiación altamente ionizante”. Tesis de doctorado en Ciencias Físicas. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Gebicki S. y Gebicki J.M. 1993.** Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. Biochem J. 289:743-749
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., Fenn W.O. 1954.** Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. Science. 119, 623-626.
- Grahn, D. y Hamilton, F.K. 1956.** Genetic variation in the acute lethal response of four inbred mouse strains to whole body X-irradiation. Radiation Research 4: 189-198.
- Gil, M. 1994.** Manual de oncología clínica. Ed. Mosby- Doyma.
- Gilbert, D.L. 1981.** Oxygen and living processes. An Interdisciplinary approach. Springer-Verlag, NY.
- González, S.L., Muñoz, C.R. 2003.** El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. REB 22 (1): 2-10.
- Hall, A.G. 1999.** The role of glutathione in the regulation of apoptosis. Eur. J. Clin. Invest. 29, 238-245.
- Hall, E.J. 1994.** Radiobiology for the Radiologist. Fourth edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.
- Halliwell, B. y Gutteridge J.M. 1989.** Free Radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press.
- Harman, D. 1992.** Role of the free radicals in aging and disease. Ann NY Acad. Sci. USA. 673:126-141.
- Higuchi, Y., Linn, S. 1995.** Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondrial or cells. J Biol Chem. 270:7950-7956
- Holmgren, A. 1989.** Thioredoxin and glutaredoxin systems. J. Biol. Chem. 264; 13963-13966.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M.E., Hundemann, C., Lillig, C.H. 2005.** Thiol Redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. Biochemical Society Transactions. 33:1375-1377.
- Hudson, R., Lacleste, J.P., Lomelí, C., Mancilla, R., Morales, M., Ostrosky P., Rojas, E. 2005.** Código ético para el Personal Académico del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

IAEA. 1985. High-dose Dosimetry, Proceedings of Symposium, Vienna, 1984, IAEA STI/PUB/671 (Vienna: International Atomic Energy Agency). .

ICRU. 1969. Radiation Dosimetry: X Rays and Gamma Rays with Maximum Photon Energies Between 0.6 and 50 MeV, ICRU Report 14 .

Jamieson, D. 1989. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad. Biol. Med.*

Koháryová, M. y Kollárová, M. 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *Geo. Physiol. Biophys.* 27, 71-84.

Kono, Y. y Fridovich, I. 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257: 5751-5761.

Kreuzer, H. y Massey, A. 2001. AND Recombinante y Biotecnología, Guía para estudiantes. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).

Larsson, A. y Zetterstrom, R. 1974. Pyroglutamic aciduria (5-oxoprolinuria), and inborn error in glutathione metabolism. *Pediatr Res* 8:852.

McCord, J.M. y Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244; 6094-6055.

McKinlay, A.F. 1981. Thermoluminescence Dosimetry. Adam Hilger Ltd, Bristol. Great Britain.

McLaughlin, W.L., Niroomand-Rad, A., Blackwell, C.R., Coursey, B.M., Gall, K.P., Galvin, J. M., Meigooni, A.S., Nath, R., Rodgers, J.E., Soares, C.G. 1998. Radiochromic film dosimetry: Recommendations of AAPM Radiation Therapy Committee Task Group 55. *Medical Physics*, 25. 2093-2115.

Meister, A. y Tate, S.S. 1976. Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. *Ann Rev Biochem* 45:559.

Meister, A. y Anderson, M.E. 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52; 711-60.

Muench, P.T., Meigooni, A.S., Nath, R., McLaughlin, W.L. 1991. Photon energy dependence of the sensitivity of radiochromic film compared to silver halide film and lithium fluoride TLDs. *Med. Phys.* 18, 769-775.

Nielsen, H. 1981. Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein III. Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids* 16 (4): 215-222.

Nkabyo, Y.S., Ziegler, T.R., Gu, L.H., Watson, W.H., Jones, D.P. 2002. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colonic epithelial (Caco-2) cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283:1352-1359.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chem. Acta.* 333; 19-39.

Powis, G. y Montfort, W.R. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:261-195.

Pryor, W.A. 1986. Oxy-radicals and related species: their formation, life-times, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48; 657-67.

Pryor, W.A. y Church, D.P. 1991. Aldehydes, hydrogen peroxide, and organic radical as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad Biol Chem* 11; 41-46.

Randerath, K., Reddy, R., Danna, T.P., Watson, W.P., Crane, A.E., Randerath, E. 1992. Formation of ribonucleotides in DNA modified by oxidative damage in vitro and in vivo. Characterization by ³²P-postlabeling. *Mutat. Res.*275:355-366.

Rice-Evans, C. y Burdon, R. 1993. Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in lipid Research.* 37:37-110

Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, H., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. 1998. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK1). *EMBO J.* 17, 2596–2606.

Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: Molecular overproduction by selenite of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazil J. Med. Biol. Res.* 38; 995-1014

Sen, C.K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55; 1747-1758.

Sevanian, A., Stein, R., Mead, J.F. 1981. Metabolism of epoxidized phosphatidylcholine by phospholipase A2 and epoxide hydrolase. 16:781-788.

Shani, G. 1991. Radiation Dosimetry Instrumentation and Methods. CRC Press.

Sies, H. y Wendel, A. (1978) Glutathione, functions in liver and kidney. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York.

Sies, H. 1985. Oxidative Stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, ed. Sies, H., pp. 1-8. Academic Press, London.

Sies, H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Research* 299, 183-191.

Sies, H. y Menck, C.F. 1992. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research* 275, 367-375.

Stadtman, E.R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science.* 23:162-165.

Stadtman, E.R. y Levine, R.L. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25, 207-218.

Starke, D.W., Chen, Y., Bapna, C.P., Lesnefsky, E.J., Mieyal, J.J. 1997. Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 23; 373-384.

Stevens, M.A., Turner, J.R., Hugtenburg, R.P., Butler, P.H. 1996. High –resolution dosimetry using radiochromic film and a document scanner. *Phys. Med. Biol.* 41. 2357.

Trotter, E.W., Grant, C.M. 2003. Nonreciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO Reports* 4:184-188.

UNSCEAR 1986 Report. Genetic and somatic effects of ionizing radiation. Annex B: Dose-response relationships for radiation-induced cancer.

UNSCEAR 2000 Report Vol. II. Sources and effects of ionizing radiation. Annex G: Biological effects at low radiation doses.

Valenzuela, A. 1991. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *48(4): 301-309.*

Walker, G. 1995. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *E. Coli*. *Microbiol. Rev.* 48, 60-93.

Watson, W.H., Jones, D.P. 2003. Oxidation of nuclear thioredoxin during oxidative stress. *FEBS Lett.* 544:144-147.

Watson, W.H., Yang, X., Choi, Y.E., Jones, D.P., Kehrer, J.P. 2004. Thioredoxin and its role in Toxicology. *Review. Tox. Scien.* 78:3-14.

Webster, N.R. y Nunn, J.F. 1988. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *British Journal of Anaesthesia.* 60: 98-108.

WHO. 2006. Environmental Burden of Disease Series, No. 13. Solar Ultraviolet radiation, World Health Organization.

Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P. 1997. *Biotechniques* 22(3): 474-481.

Wolff, S.P. y Dean, R.T. 1986. Fragmentation of protein by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.* 2234:399-403.

Wolpp, S.P., Garner A., Dean, R.T. 1986. Free radicals lipids and protein degradation. *Trends Biochem. Sci.* 11:27-31

Yoshitake, S., Nanri, H., Fernando M.R., Minakami, S. 1994. Possible differences in the regenerative roles placed by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J. Biochem.* 116(1); 42-46.