



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS
INSTITUTO DE FÍSICA

INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS CON EFECTO ANTIOXIDANTE (Trx1, NGF y Nrf2)
EN RATONES MACHOS BALB/C EXPUESTOS A RAYOS X

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

IVONE EDITH SALAS LÓPEZ

TUTORA DE TESIS

DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. GUERDA MASSILLON JACQUES LOUIS
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

DRA. MERCEDES RODRÍGUEZ VILLAFUERTE
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2016



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.

*A mis dos queridas grandes amigas
Mariana y Martha.
Gracias por su apoyo, aún en la distancia.*

AGRADECIMIENTOS

A esta gran universidad, a ti UNAM. Gracias por contribuir a mi formación académica con una educación gratuita, y a todos aquellos que han luchado por que siga así.

A cada uno de esos hermosos ratoncitos que sin la intención de querer, con su vida permitieron la elaboración del presente trabajo. ¡Sin ustedes muchachos, no hubiera sido posible!

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt por dirigir y apoyar este trabajo. Gracias por recibirme en su laboratorio y permitirme aprender un poco de lo fascinante que es la Biología.

A la Dra. Guerda Massillon por su apoyo en la planificación y equipo necesario para realizar las irradiaciones.

Al comité tutor, la Dra. Gonsebatt, la Dra. Massillon y la Dra. Mercedes Villafuerte, por su asesoría y apoyo a lo largo de la Maestría.

Al comité sinodal, la Dra. Ana María Salazar, la Dra. Amanada García, el Dr. Miguel Ángel Ávila, el Dr. Carlos Villarreal y nuevamente a la Dra. Gonsebatt, por sus acertadas correcciones que permitieron mejorar este trabajo.

A la Dra. María Ester Brandan por su apoyo y guía en esta Maestría.

Al Dr. Jorge Limón por compartir conmigo muchos de sus conocimientos y asesoría en las técnicas de Biología Molecular. ¡Larga vida al Metal!

Al M.C. Eduardo López por su disposición y apoyo en las irradiaciones.

Al Dr. Arnulfo Martínez por su tan amable colaboración en la adquisición de radiografías de mis ratoncitos, una de las cuales se incluye acá.

A Jaziel Soto. Gracias por todo tu apoyo, por tu preocupación y tu ayuda. Gracias por soportarme casi dos años como roomie.

A mi querida amiga Guillermina Vázquez. Gracias por tu apoyo querida Guille, por estar al pendiente de mi persona y estudios. Gracias por ser mi familia en esta revoltosa ciudad.

Gracias por tu compañía en la embriaguez y sobriedad.

A Stevan Herrera y Lalo Madrid por su linda amistad.

A mi amiga y compañera de laboratorio, Janikua Mora. Gracias por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

Al grandulón de Julio Prieto. Gracias por tu linda persona que comparte todo, todos los días. Gracias por tu buena vibra.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por su apoyo económico que me permitió asistir a congresos y compra de material de laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico (No. 370128) para realizar mis estudios de Maestría.

RESUMEN

Se diseñó un modelo murino de irradiación a cuerpo entero con rayos-X para estudiar el curso temporal post-irradiación de la inducción, a nivel transcripcional (cantidad de RNA mensajero), de proteínas con acción antioxidante como Nrf2, Trx1 y NGF, en órganos con diferente radiosensibilidad. Ratones Balb/C de 5 a 7 semanas de edad, sedados, fueron irradiados a cuerpo entero con un haz de rayos-X de 160 kV (filtros adicionales de 5.2324 mm de Al y 0.25 mm de Cu) hasta impartir una dosis de 0.538 ± 0.002 Gy en la superficie de entrada del haz, a una tasa de kerma en aire de $1.683 \times 10^{-3} \pm 6.522 \times 10^{-6}$ (k=1) Gy/s. A las 2, 4, 6 y 24 h posteriores a la irradiación fueron sacrificados. En cada tiempo se tuvieron ratones no irradiados como caso control. El experimento fue repetido cuatro veces. Se recolectaron cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones, de los cuales se aisló RNA celular usando TRIzol® Reagent, y con el cual se sintetizó cDNA en una reacción de retrotranscripción usando la retrotranscriptasa del M-MLV (Promega®). El nivel de RNA mensajero (mRNA) de las proteínas antioxidantes en cada órgano fue estimado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real. SYBR® Green fue utilizado como especie química fluorescente en esta última técnica. El nivel de mRNA se estimó de manera absoluta a través del cálculo de número de copias de cDNA, ya que los niveles de mRNA de genes comúnmente sugeridos como con-

troles endógenos, GAPDH y β -Actina, no se observaron cambios en el tiempo ni entre los órganos estudiados, ante nuestro tratamiento. Por medio de la prueba estadística *t* de Student para un nivel de significancia de 0.05, se comparó el número de copias de cDNA de los irradiados y los control. Se encontró que la expresión génica del factor de transcripción Nrf2 se indujo en todos los órganos a las 2 h, siendo estadísticamente significativo en hígado ($p=0.002$). A esa misma hora post-irradiación, la expresión génica de Trx1 y NGF, quienes se encuentran cascada a bajo de Nrf2, también fue inducida en órganos como cerebro, hígado y riñón. En este último órgano, la inducción de NGF fue estadísticamente significativa ($p=0.0435$), sin embargo, debido a la falta de optimización de la PCR-tiempo real en tal caso (NGF en riñón a las 2 h), se reserva la confiabilidad del resultado. Observamos que Trx1 en cerebro, presentó una alta transcripción a las 6 h ($p=0.0085$) y fue seguida horas después (a las 24 h) por una supresión significativa ($p=0.0495$). Se analizó la cantidad de copias de cDNA de ratones no irradiados (controles) en función de la radiosensibilidad de los órganos (cerebro, hígado, corazón, pulmón y riñón, en orden de menor a mayor radiosensibilidad). Particularmente en el caso Nrf2, a las 24 h transcurridas de su manipulación, se observó que la cantidad mRNA es inversa a la radiosensibilidad de los órganos estudiados: A mayor cantidad de mRNA de Nrf2, el órgano es menos radiosensible y conforme la cantidad disminuye, el órgano es más radiosensible, siendo el pulmón una excepción a esto. Dicha excepción puede deberse a procesos evolutivos de adaptación ante la gran cantidad de O_2 al que los pulmones se han visto expuestos. No se observó una relación similar para los niveles mRNA de las otras proteínas antioxidantes.

ABSTRACT

A whole-body irradiation murine model with X-rays was carried out to study the induction post-irradiation time course at a transcriptional level (amount of mRNA), of antioxidant proteins such as Nrf2, Trx1 and NGE, in organs with different radiosensitivity. Five to seven-weeks-old Balb/C sedated mice were whole-body irradiated with a 160 kV X-ray beam (additional filters: 5.2324 mm of Al and 0.25 mm of Cu) until imparting 0.538 ± 0.002 Gy on the beam entrance surface, at an air kerma rate of $1.683 \times 10^{-3} \pm 6.522 \times 10^{-6}$ (k=1) Gy/s. 2, 4, 6 and 24 hours after irradiation, mice were sacrificed (unirradiation mice were used as control in every case). The experiment was repeated four times. The brain, heart, lungs, kidneys and liver were collected and then were isolated cellular RNA using TRIzol® Reagent. Later, cDNA was synthesized in a reverse transcription reaction using M-MLV's retrotranscriptase (Promega®). The amount of mRNA corresponding to the antioxidant proteins in each organ, was estimated using the real-time PCR technique. SYBR® Green was used as DNA-binding dye in the latter technique. The amount of mRNA was calculated absolutely as the number of copies because the amount of mRNA of genes commonly suggested like housekeeping genes, GAPDH and β -Actin, weren't observed stable either in the time or between organs, to our treatment. By means of Student's *t* test with a 0.05 significance level, the number of copies of irradiated and control ones was compared. We

observed that the gene expression from transcription factor Nrf2 was induced in all organs at 2 hours, being statistically significant the increase in liver ($p=0.002$). At the same post-irradiation time, gene expression from Trx1 and NGF, which are cascade below Nrf2, were induced in organs like brain, liver and kidney. In the latter organ, the increase was statistically significant ($p=0.0435$), nevertheless, due to lack of optimization of real-time PCR in this case (NGF in kidney at 2 h), the reliability of this result is reserved. Trx1 in brain, was highly transcribed at the 6 h ($p=0.0085$) followed by a suppression statistically significant ($p=0.0495$). The amount of copies of cDNA from control mice in function of organ radiosensitivity (brain, liver, heart, lung and kidney, in order from lowest to highest radiosensitivity) was analyzed. Particularly Nrf2 at 24 hours after handling, the amount of mRNA observed is inverse to the radiosensitivity of the organ studied: The greater amount of mRNA of Nrf2, the organ is less radiosensitive, and as the amount decreases, the organ is more radiosensitive, but the lung was an exception to this. This exception may be due to evolutionary processes to adapt to the large amount of O_2 to which the lungs have been exposed. A similar relationship for mRNA levels from the other antioxidant proteins wasn't observed.

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción y antecedentes	1
1.1.	Efectos de la radiación ionizante en la célula	1
1.2.	Antioxidantes	5
1.3.	Neurotropinas	10
1.4.	Radiosensibilidad	11
2	Justificación del proyecto, objetivos e hipótesis	15
2.1.	Justificación	15
2.2.	Objetivos	16
2.3.	Hipótesis	16
3	Materiales y métodos	18
3.1.	Modelo experimental	18
3.2.	Manipulación e irradiación de ratones	19
3.3.	Cálculos de dosis absorbida	21
3.4.	Manejo de incertidumbres	26
3.5.	Cuantificación de niveles de mRNA	28
4	Resultados	57
4.1.	Expresión génica de Nrf2, Trx1 y NGE	57

4.2. Radiosensibilidad y cantidad de mRNA en los órganos	58
5 Discusión	62
6 Conclusiones	66
Bibliografía	68
Apéndices	75
A Radiación Ionizante	I
A.1. Producción de rayos-X	II
A.2. Descripción de los campos de radiación (cantidades no-estocásticas)	XIII
A.3. Cantidades para la descripción de la interacción de la RI con la materia . . .	XVIII
B Medidas de ratón macho Balb/C	XXIV
C Protocolo para la Extracción de RNA con TRIzol® Reagent	XXVIII
D Síntesis de la primera hebra de DNA complementario (retrotranscripción)	XXX
D.1. Protocolo para la síntesis de la primera hebra de cDNA	XXXI
E Replicación del DNA	XXXII
E.1. SYBR® Green	XXXIII
E.2. Protocolo para PCR- <i>tiempo real</i> con SYBR® Green	XXXVI

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	11
F Resultados de pruebas de pureza, integridad y cuantificación, realizadas a RNA celular extraído.	XXXVII
G Curvas estándar obtenidas	XLI
H Resultados de pruebas estadísticas.	LXVII
I Curso temporal del número de copias de cDNA de proteínas antioxidantes: Nrf2, Trx1 y NGF.	LXXIX

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1. Efectos de la radiación ionizante en la célula

Los sistemas biológicos presentes en la tierra se encuentran sometidos a una constante irradiación por fuentes naturales presentes en la tierra (principalmente gas radón, ^{222}Rn [1]) como por radiación cósmica (actividad solar[1]). Según el Comité de las Naciones Unidas Sobre los Efectos de la Radiación Atómica (UNSCEAR, por sus siglas en inglés) en su reporte de 1988[2], el equivalente de dosis efectiva anual impartido por fuentes naturales en un adulto es 2.4 mSv, lo que equivaldría a una dosis absorbida de 2.4 mGy/año si se considerada ser impartida por fotones.

A partir del siglo pasado comenzó el conocimiento de los efectos dañinos en sistemas biológicos sometidos a una alta dosis de radiación ionizante (RI), como lo sucedido debido a las lamentables detonaciones de bombas atómicas ocurridas en Hiroshima y Nagasaki en Japón, y el accidente ocurrido en Chernobyl en Ucrania. Sin embargo, al día de hoy

los efectos por bajas dosis de RI (<500 mSv[3]) no son bien conocidos. Se han mencionado diferentes posibles extrapolaciones de los riesgos por bajas dosis de radiación a partir de los riesgos observados a las dosis más altas. En la Figura 1.1 se presenta un esquema de las diferentes extrapolaciones[3]. Hasta ahora, la relación dosis-respuesta lineal (curva a) se postula a ser la más indicada. El Consejo Nacional de Protección y Medición de Radiación (NCRP por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, en su reporte 136[4](y revisado por la ref. [3]) concluyó que “aunque otras relaciones dosis-respuesta de los efectos mutagénicos y cancerígenos por bajos niveles de radiación no pueden ser excluidas, sin alternativa la relación dosis-respuesta que parece ser la más plausible es el modelo lineal sin umbral, en las bases del presente conocimiento científico”. Sin embargo, la linealidad no podría ser sostenida si se toma en cuenta la influencia mutua de células radio-dañadas, tanto sinérgicamente o antagónicamente. Efectos por radiación de cooperación multicelular que han sido observados a la fecha, como el efecto “espectador”(bystander effect) e inestabilidad retrasada, muestran saturación a bajas dosis, por lo que la linealidad podría estar subestimando la relación dosis-respuesta (curva b). Los escenarios en los cuales la relación lineal sobrestima los riesgos por baja dosis corresponderían al umbral y la respuestas hormética (curvas d y e). Un umbral en la dosis (curva d) implica que existe alguna dosis por debajo de la cual, el riesgo del comienzo de algún efecto en particular es cero. Una respuesta hormética (curva e) ocurriría si una dosis impartida de radiación redujera el pasado incidente de algún efecto borrable. La relación de dosis-efecto de curvatura ascendente (pendiente creciente) (curva c) ha sido un modelo usado para aproximar modelos

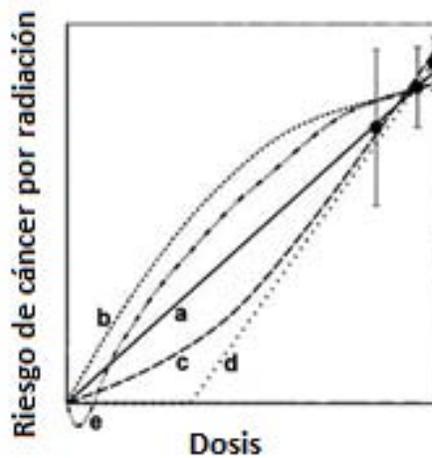


Figura 1.1. Representación esquemática de diferentes extrapolaciones posibles de riesgos por radiación a muy bajas dosis, todos de los cuales, en principio, pueden ser consistentes con datos epidemiológicos de las más altas dosis. Curva **a**, extrapolación lineal; curva **b**, curvatura descendente (pendiente decreciente); curva **c**, curvatura ascendente (pendiente creciente); curva **d**, umbral; curva **e**, hormesis. Figura adaptada de la referencia [3].

lineales-cuadráticos (por ejemplo, es una buena descripción para la leucemia radioinducida en humanos[3]) y relaciones similares, o para modelar la competición entre procesos recombinables diferentes.

1.1.1. Especies reactivas de oxígeno (ERO)

La RI, tanto partículas (electrones, partículas α , neutrones, deuterones) como fotones (rayos-X, rayos- γ), pueden ionizar macromoléculas del ambiente celular como lípidos de la membrana y proteínas, pero el principal blanco es el ácido desoxirribonucleico o DNA, por sus siglas en inglés. Además, cuando la RI interacciona con el agua presente en el ambiente celular, se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) que se difunden y pueden, finalmente, dañar los blancos celulares críticos. El primer caso es referido co-

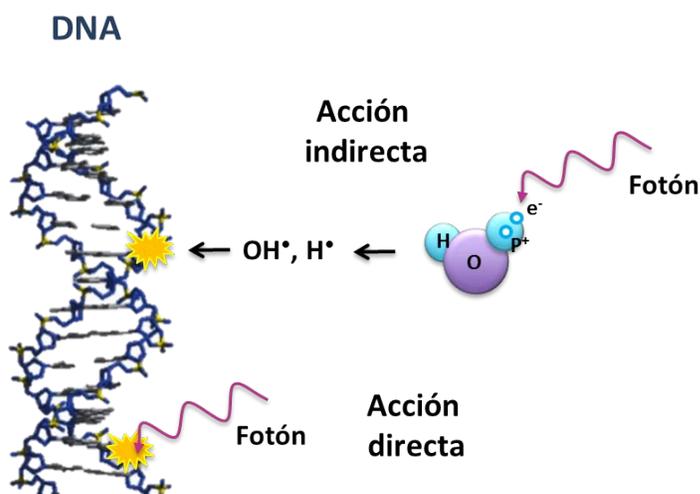


Figura 1.2. Interacción de la radiación ionizante en el ambiente microcelular. *Acción Directa:* La radiación (fotón) puede ionizar directamente átomos que forman parte de una molécula funcional (DNA). *Acción Indirecta:* La radiación puede ionizar el agua (hidrólisis) presente en el ambiente celular y producir ERO (OH^\bullet , H^\bullet) que se difunden y finalmente llegan a dañar moléculas vitales.

mo acción directa y el segundo como acción indirecta, siendo este último el que llega a contribuir hasta como un 70 % del daño total causado a la célula[5]. La Figura 1.2 presenta una ilustración de estos dos tipos de daño. Las ERO generadas pueden ser o no radicales libres. Un **radical libre** es cualquier especie química capaz de existir independientemente (de ahí el término de libre) que contiene uno o más electrones sin aparear[6]. Es usual un \bullet como super-índice al final de la fórmula para denotarlos. ERO es un término colectivo usado para incluir no sólo los radicales de oxígeno ($\text{O}_2^{\bullet-}$ y OH^\bullet) sino también algunos no-radicales derivados del O_2 . En la Tabla 1.1 se enlistan las principales ERO que se generan en una célula. El término reactivo, es relativo, ya que ni $\text{O}_2^{\bullet-}$ ni OH^\bullet es reactivo en soluciones acuosas.

Cuando el daño causado a la célula por la RI es excesivo, el resultado más frecuente es la muerte programada (apoptosis) o la muerte por necrosis. Si el daño es menor, la cé-

Tabla 1.1. Especies reactivas del oxígeno[6].

Radicales		No-radicales	
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	OH^{\bullet}	Ácido hipocloroso	$HOCl$
Peroxilo	RO_2^{\bullet}	Ozono	O_3
Alcoxilo	RO^{\bullet}	Oxígeno singlete	$^1\Delta g$
Hidroperoxilo	HO_2^{\bullet}	Peroxinitrito	$ONOO^-$

lula puede iniciar respuestas de reparación o de supervivencia. Se cree que la respuesta ante ERO (respuesta antioxidante) es un mecanismo de supervivencia desarrollada por las células durante años de adaptación evolutiva como un sistema de protección contra la toxicidad del O_2 presente en la atmósfera y las ERO producidas en el ciclo de respiración de organismos multicelulares [7]. Al día de hoy, se sabe que muchas de las ERO juegan un papel importante en las vías de señalización que favorecen el crecimiento y diferenciación de estructuras celulares o la respuesta inmune. Sin embargo un exceso de ERO puede ser perjudicial. Son los sistemas antioxidantes los que permiten a las células mantener una homeostasis ante las ERO producidas.

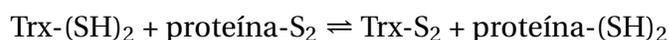
1.2. Antioxidantes

Halliwell [6] comenta lo difícil de definir un antioxidante, sin embargo ofrece la siguiente definición: “Un antioxidante es cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones comparado con las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación del sustrato”. El término ‘sustrato oxidable’ incluye cualquier tipo de molécula encontrada *in vivo*. Los principales tipos de antioxidantes con los

que cuenta una célula se describen en la Tabla 1.2.

1.2.1. Tiorredoxina

La tiorredoxina (Trx) es una proteína pequeña (~12000 daltons) encontrada en todos los organismos, procariontes y eucariontes. Es ampliamente distribuido en células de mamíferos, principalmente concentrada en el retículo endoplásmico, pero algunas veces es encontrada en la membrana celular[6]. Puede existir en su forma reducida o ditiolica (Trx-(SH)₂) y en su forma oxidada (Trx-S₂). La Trx tiene un rol antioxidante ya que puede pasar de su estado reducido a oxidado (reacción redox) con múltiples proteínas según la siguiente reacción:

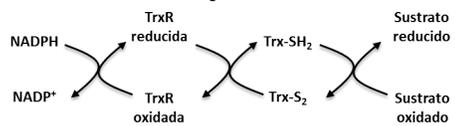
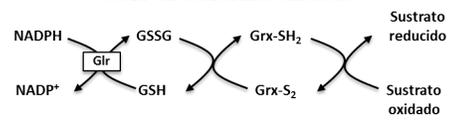


La Trx se une a su proteína blanco y, a través de la formación de un disulfuro mixto, reduce el puente disulfuro de la proteína mientras oxida sus dos grupos cisteína-SH a una cistina (disulfuro). La oxidación de la Trx puede ser revertida *in vivo* por la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR)(ver Tabla 1.2).

En mamíferos se han identificado dos genes que codifican para la tiorredoxina: La Trx1 que se localiza en el citosol y la mitocondrial o Trx2. Estas proteínas son reducidas por las Trx reductasas en el citosol (TrxR1) y mitocondrial (TrxR2).

1.2. ANTIOXIDANTES

Tabla 1.2. Principales antioxidantes con los que cuenta una célula[8][9][10][11].

Grupo	Antioxidante	Sustrato	Mecanismo de acción
Enzimas antioxidantes	SOD	$O_2^{\bullet -}$	Cataliza la conversión del $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 : $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$
	CAT	H_2O_2	Lleva a cabo la conversión de 2 moléculas de H_2O_2 en agua y O_2 : $2H_2O_2 + O_2 \xrightarrow{CAT} O_2 + 2H_2O$ Se considera que esta enzima es responsable de remover el H_2O_2 cuando se encuentra en altas concentraciones.
	GPx	H_2O_2 y peróxidos	La GPx emplea al glutatión reducido (GSH) como donador de electrones para remover el H_2O_2 , lo que resulta en la producción de glutatión oxidado (GSSG): $GAPDH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + H_2O$ Es el sistema de remoción de H_2O_2 más importante en las células humanas.
Proteínas antioxidantes no catalíticas	Trxs: Tiorredoxina Reductasa (TR) y Tiorredoxina (Trx)	Grupos tiol, puentes disulfuro de proteínas oxidadas.	Lleva a cabo la conversión de 2 moléculas de H_2O_2 en agua y O_2 . Pueden fungir como sensores del potencial redox celular y también pueden actuar como donadores de electrones para reducir los puentes disulfuro oxidados de las proteínas. La TrxR transfiere electrones procedentes del NADPH para reducir a las Trxs. Una vez reducidas las Trxs participan en reacciones de transferencia de electrones a través de la oxidación reversible de las dos cisteínas del centro activo mediante un ciclo bioquímico: 
	Grxs: GSH y glutatión reductasa(Glr)	Puentes disulfuro entre los grupos tiol de las proteínas, puentes disulfuro mixtos que se forman entre grupos tiol de proteínas y la molécula de GSH.	Los electrones se transfieren desde NADPH a las Grxs a través del GSH, y la Glr se encarga de restablecer el GSH en su forma oxidada: 
Antioxidantes de bajo peso molecular	GSH (dentro de este grupo, es considerado el principal antioxidante intracelular)	OH^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} , $HOCl$ y $ONOO^-$	En su forma oxidada (GSSG), dos moléculas de GSH se encuentran unidas a través de un puente disulfuro debido a la oxidación de los grupos $-SH$ de la forma reducida (GSH). El cociente $2GSH/GSSG$ funge como un estimador del potencial redox o potencial reductor, que representa una medida de la energía potencial de reducción u oxidación dentro de las células. El GSH puede reducir de manera directa varios tipos de EROs (OH^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} , $HOCl$ y $ONOO^-$) a través de la donación de electrones, o bien como cofactor de la GPx.
Antioxidantes naturales (ingesta)	Vitaminas A, C y E	Radicales libres	Actúan como "removedores" de radicales libres, lo que promueve la inhibición de aberraciones cromosómicas y micronúcleos en linfocitos. La vitamina E Induce la formación de dos citocinas que estimulan la formación de plaquetas.

1.2.2. Síntesis de Proteínas y Factores de Transcripción

El DNA contiene la información necesaria para el funcionamiento de la mayoría de los organismos. Es un polímero de nucleótidos el cual está codificada la secuencia de aminoácidos para las moléculas funcionales de la células (proteínas). En ésta, las regiones que codifican para proteínas son llamadas genes.

Las proteínas están constituidas por largas cadenas de aminoácidos. Estas macromoléculas son las responsables del funcionamiento y la comunicación celular. Algunas proteínas se expresan todo el tiempo, a las cuales se les denomina “constitutivas”, y otras en momentos específicos por lo que se les denomina “inducibles”. Para su síntesis, es necesario activar su gen y así la secuencia del gen es copiada (transcrita) en un ácido ribonucleico (RNA mensajero) el cual es trasladado fuera del núcleo hacia los ribosomas donde será traducido en un ensamble de aminoácido (síntesis de la proteína). La activación del gen consiste en la convergencia de todo un complejo proteico y enzimático que permite el desenrollamiento específico de la zona que se transcribirá, la separación de las dos hebras de DNA (para poder transcribir), que facilitará el acoplamiento de la DNA polimerasa, que ensamblará al mRNA. De esta manera entonces, la síntesis de mRNA se puede tomar como una medida de la activación de un gen. Dicha activación se inicia por la unión de ciertas proteínas a una secuencia específica del gen en cuestión. Esta unión es la que desencadena las señales de reclutamiento proteico que permitirán la transcripción. Por lo anterior, las proteínas que inician el mecanismo de transcripción son denominadas factores de transcripción. En el caso de genes que transcriben para proteínas con acción

antioxidante, las secuencias específicas a las que se unen los factores de transcripción en un gen son denominadas Elementos de Respuesta Antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés).

1.2.3. ARE, Nrf2 y Trx1

La transcripción de genes que contienen la secuencia ARE, está mediada principalmente por el factor de transcripción nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). Se ha reportado que la vía de señalización de Nrf2 incluye la modulación de la transcripción de Trx1[12], además de estar sustentado con la evidencia de que el gen que transcribe para Trx1 contiene la secuencia ARE[13].

1.2.4. Regulación de Nrf2

La vía de señalización de respuesta ante el estrés oxidante por excelencia es la vía de Keap1-Nrf2. En términos generales, se sabe que la actividad del factor Nrf2 se encuentra reprimida por su unión a Keap1 y al citoesqueleto, lo que lleva a Nrf2 a la degradación por el proteosoma. En caso de estrés oxidante en el citoplasma, las cisteínas de Keap1 pueden ser oxidadas y esto libera a Nrf2, quien transloca al núcleo y activa genes que transcriben para proteínas con acción antioxidante[14]. Esto último, con el fin de combatir el estrés oxidante que desencadenó dicha vía.

1.3. Neurotropinas

Las neurotropinas (NT) son un grupo de factores de crecimiento involucrados en casi todos los aspectos del funcionamiento y desarrollo del sistema nervioso central. Por ejemplo, se tiene evidencia de que las NT se encuentran involucradas en la modulación de proliferación, sobrevivencia, diferenciación y regeneración neuronal[15][16][17], entre otros aspectos.

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es uno de los 4 tipos de NT encontrados en todos los grupos de vertebrados (brain-derived neurotrophic factor, BDNF, neurotrophin, NT3, y neurotrophin 4, NT4, son las otras tres). Existe evidencia de que esta NT se encuentra involucrada en la modulación de la respuesta antioxidante. En nuestro grupo de trabajo se demostró que diversos promotores de estrés oxidante (arsénico inorgánico, butionil sulfoximina y acetaminofén) modulan de manera positiva la transcripción de NGF en el hígado y que induce incrementos en los niveles de mRNA de proteínas antioxidantes tales como la Trx a través de un mecanismo autócrino que involucra a la vía de señalización NGF/TrkA/PI3k/Akt[18]. Por otro lado, en modelos *in vitro* en los que se emplearon células PC12, se ha evidenciado que Nrf2 es capaz de modular la expresión de *Ngfb* (gen que transcribe para NGF) cuando las células son tratadas con ácido carnósico[19] y que, a su vez NGF también participa en la regulación de la actividad de Nrf2 a través de la vía TrkA[20].

1.4. Radiosensibilidad

La radiosensibilidad es un término general aplicado a células, tejidos e individuos. Clásicamente, la radiosensibilidad celular es una medida del grado de respuesta de una célula a la radiación, indicando con una gran respuesta alta radiosensibilidad[21]. La radiosensibilidad es comúnmente caracterizada por una dosis estimada para producir en promedio un evento por célula o por la respuesta a una dosis fija de radiación. El evento suele referirse a la lesión que ocasione la letalidad (destrucción de la integridad reproductiva o apoptosis). La radiosensibilidad puede variar en diferentes tipos celulares, de un sólo individuo, y puede existir también una variación en la radiosensibilidad en un solo tipo celular entre diferentes individuos. Adicionalmente, factores externos pueden contribuir a la radiosensibilidad celular, entre ellos la tasa de consumo de oxígeno de las células. Se ha demostrado que en condiciones de hipoxia, la sobrevivencia de cierto tipo celular es mayor (hasta tres veces) comparada bajo oxígeno[5].

Algunos tejidos son radiosensibles debido a que la vida media de su población celular es muy corta, por ejemplo las glándulas salivales y algunos linfocitos. Algunos otros tejidos son más radiorresistentes y tolerantes a radiación debido a su organización estructural, por ejemplo si una pequeña parte de un pulmón es destruida por una alta dosis de radiación, la función pulmonar puede ser mantenida por el tejido sano restante, pero si una pequeña sección de la médula espinal es dañada ésto puede llevar a la parálisis. Los individuos también varían en radiosensibilidad y ésto puede ser asociado con la radiosensibilidad celular y con la inestabilidad genómica.

La radiosensibilidad de un tejido, órgano o de todo el cuerpo puede ser descrita por la curva dosis-respuesta para lesiones especificadas en una población o individuos. Las lesiones pueden ser niveles de disfunción del tejido u órgano (morbilidad) o mortalidad después de la irradiación a cuerpo completo. A menudo hay una dosis umbral (cero incidencia hasta esa dosis, usada para propósitos de protección) o dosis de tolerancia (incidencia de cerca del 1 % o algún porcentaje más, en la práctica de radioterapia), seguido por un incremento en incidencia conforme incrementa la dosis hasta formar una curva sigmoideal dosis-incidencia la cual asíntota al 100 % de incidencia a altas dosis.

La radiosensibilidad con respecto a inducción de cáncer es usualmente expresado como un riesgo (incidencia) por gray (Gy) o por sievert (Sv), sin asumir una dosis umbral. La edad y el sexo pueden afectar al riesgo o la radio-asociación de cáncer. Varias líneas de evidencia indican que individuos en la población varían en su sensibilidad a la radiación y en algunos casos ésta puede ser extremada, por ejemplo[21]:

- a) Diferencias entre grupos de edad y sexo en estudios epidemiológicos de incidencia de cáncer.
- b) Condiciones genéticas pro-cáncer observadas en la población humana como es el síndrome Gorlin y el síndrome de Li-Fraumeni.
- c) Estudios de variación en la radiosensibilidad celular humana en la población normal.
- d) La existencia de síndromes de radiosensibilidad humana como es la ataxia telangiectasia.

- e) Observaciones de variación en la severidad de daño en tejido normal seguido de radioterapia en humanos.
- f) Los modelos animales que muestran variación en la radiosensibilidad aguda y susceptibilidad a enfermedades radioinducidas.

Publicaciones de Emami y revisiones del grupo The Quantitative Analysis of Normal Tissue Effects in the Clinic (QUANTEC) [22] sobre la tolerancia del tejido normal por fracciones estándar (1.8-2 Gy/sesión, cinco sesiones por semana[22]), las restricciones para la dosis de radiación máxima que pueden recibir los órganos analizados en el presente trabajo para no causar una lesión (criterio de valoración) son las siguientes:

- Para cerebro la restricción es una dosis <60 Gy para una incidencia <3% para necrosis tumoral.
- Cuando el hígado recibe una dosis promedio ≤ 30 Gy, se encontró que una tasa <5% presentó enfermedades en el hígado radio-inducidas (que típicamente ocurren 2 semanas a 3 meses después de la radioterapia).
- En el caso del corazón, la pericarditis y mortalidad cardíaca a largo plazo son las dos toxicidades cardíacas más relevantes. Se reporta una tasa de pericarditis <15% cuando la dosis al pericardio promedio fue <26 Gy.
- En pulmón, una dosis promedio de 20 Gy mostró 20% de riesgo para neumonitis radio-inducida.

- Cuando una dosis promedio al riñón es <18 Gy, se estimó un riesgo de lesión <5 %.

Basados en lo anterior podemos decir entonces que, el orden de radiosensibilidad de menor a mayor de los órganos de nuestro interés es: Cerebro, hígado, corazón, pulmón y riñón.

JUSTIFICACION DEL PROYECTO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Justificación

Como se expuso en el capítulo anterior, la exposición de los sistemas biológicos a RI produce ERO (de forma directa, esto quiere decir que no involucra metabolismo o desechos para su asimilación y/o acción en la célula) y éstas activan vías de señalización en la célula con la finalidad de combatir el estrés oxidante ocasionado y mantener la integridad celular. La radiosensibilidad propia de diferentes órganos podría influir en el tiempo en que se induce la transcripción de cada una de las proteínas antioxidantes. Por lo anterior, en el presente trabajo proponemos el estudio del curso temporal de los niveles de mRNA de proteínas antioxidantes como Trx1, Nrf2 y NGE, en órganos de diferente radiosensibilidad como cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones, de ratones machos Balb/C, posterior a la exposición a cuerpo entero de rayos-X a una dosis relativamente bajas (<0.5 Gy). Esto podría ayudar a comprender un poco más el papel de dichas proteínas en distintos órganos de diferente radiosensibilidad, y en general, a entender mecanismos

celulares ante dosis bajas de radiación ionizante.

2.2. Objetivos

Objetivo general: Determinar el curso temporal de los niveles de mRNA de proteínas antioxidantes como Trx1, NGF y Nrf2, posteriores a la exposición de rayos-X a cuerpo entero a una dosis bajas (<0.5 Gy) en ratones machos Balb/C, en distintos órganos de diferente radiosensibilidad como cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones, para conocer si ante dicha irradiación, existe una relación órgano- y/o tiempo- dependiente con la expresión génica de las proteínas antioxidantes.

Objetivos particulares:

- Estimar la dosis que reciben los órganos cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones de ratones machos Balb/C irradiados a cuerpo entero con un haz de rayos-X.
- Evaluar el curso temporal (2, 4, 6 y 24 horas) de los niveles de mRNA de Trx1, Nrf2 y NGF, en los distintos órganos.
- Determinar si existe una relación órgano y/o tiempo -dependiente con la expresión génica de las proteínas antioxidantes.
- Analizar los niveles de mRNA de las proteínas antioxidantes en función de la radiosensibilidad de los órganos.

2.3. Hipótesis

La exposición de ratones machos Balb/C a rayos-X a cuerpo entero a una dosis relativamente baja (<0.5 Gy), induce la transcripción de Trx1, NFG y Nrf2, en órganos como

cerebro, corazón, hígado, pulmón y riñones, y ésta es inversa a su radiosensibilidad. El tiempo post-irradiación al cual se observa una inducción estadísticamente significativa, corresponde al tiempo en que se agotan las reservas de mRNA de las proteínas antioxidantes estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Modelo experimental

Los modelos murinos son ampliamente utilizados en la investigación científica debido a la similitud con el metabolismo humano y su fácil manipulación. En nuestra investigación se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/C para estudiar la expresión génica (nivel de mRNA) de Nrf2, Trx1 y NGE, proteínas con acción antioxidante. El protocolo de esta investigación cumple con la normatividad mexicana para el uso de animales según las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999)” de la “Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)” publicada en Agosto, 2001[23]; y con la autorización de la comisión de Ética para el uso de animales de laboratorios del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM.

3.2. Manipulación e irradiación de ratones

Ratones de entre 5 y 7 semanas de edad, previamente sedados, se irradiaron a cuerpo entero con un haz de rayos-X de 160 kV (filtros adicionales de 5.2324 mm de Al y 0.25 mm de Cu) a una tasa de kerma en aire de $1.683 \times 10^{-3} \pm 6.522 \times 10^{-6}$ (k=1) Gy/s en un campo homogéneo de 8.2 cm de diámetro (tamaño de campo suficiente para cubrir completamente al ratón). El kerma en aire en el plano donde se colocó al ratón (entrada del haz), fue de 0.500 ± 0.002 Gy (ver Figura 3.1). La sedación se realizó con pentobarbital¹ a una dosis de 75 μ g/g de peso, administrado vía intraperitoneal. Para su irradiación, el ratón fue montado verticalmente en un soporte y colocado a una distancia de 0.61 m de la fuente de rayos-X (distancia a la cual se obtiene el tamaño de campo y tasa de kerma en aire antes mencionados) y centrado en el campo. La Figura 3.1 muestra un esquema del arreglo de irradiación utilizado y en la Figura 3.2 se presentan algunas fotografías. Posterior a la irradiación, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical a cuatro diferentes tiempos: 2, 4, 6 y 24 h. En cada caso se tuvo un ratón control, el cual recibió el mismo trato excepto la exposición a rayos-X. El experimento se repitió cuatro veces (n=4). De cada animal se obtuvo el cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70 °C para posterior extracción de RNA celular. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del IIB, irradiados en la Sala de Irradiación del Instituto de Física y los procedimientos posteriores se llevaron a cabo en el

¹Anestésico barbitúrico (droga inyectable que parece interactuar con receptores específicos en el sistema nervioso central inhibiendo la transmisión de impulsos nerviosos), los cuales pueden ser usados para producir todos los niveles de depresión clínica, desde hipnosis hasta coma [24].

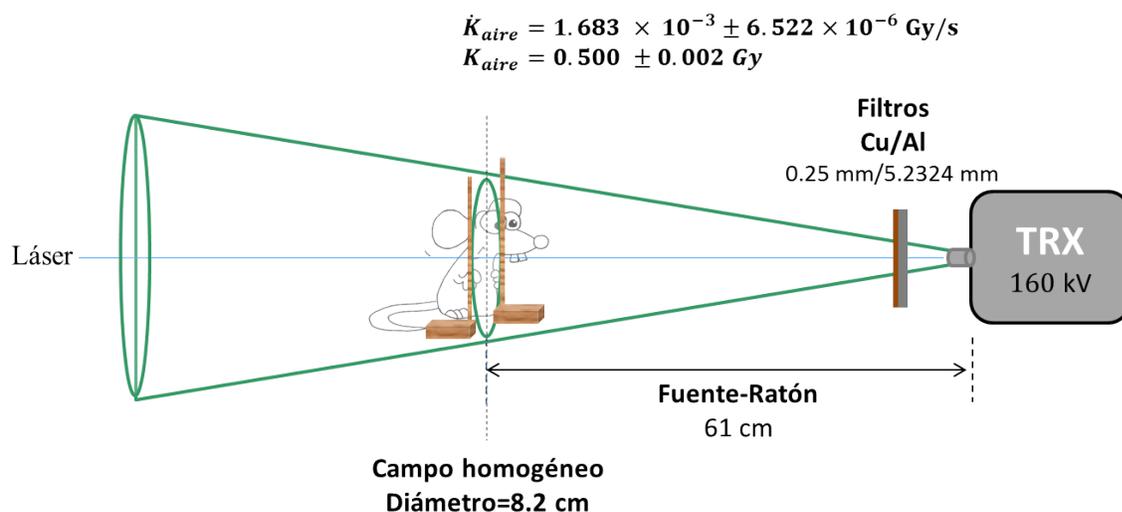


Figura 3.1. Esquema del arreglo de irradiación.

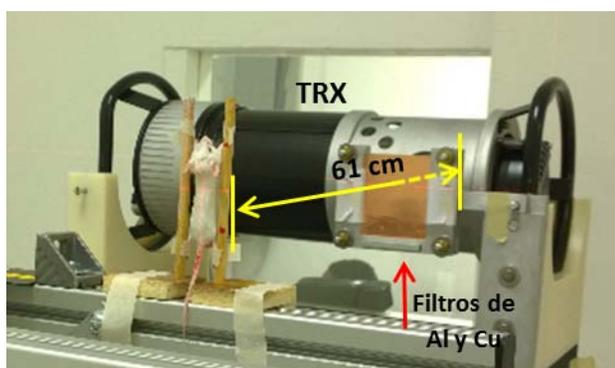
Tabla 3.1. Especificaciones del tubo de rayos-X YXLON modelo Y.SMART 583 160E/1.5 (usado en la irradiación de ratones).

Alto voltaje		Tamaño de mancha focal	
Rango de ajuste	10-160 kV	Acc. EN12543	3.0 mm
Incrementos de ajuste	1 kV/paso	Acc. IEC 336	1.5
Corriente de tubo		Ángulo del haz	
Rango de ajuste	2.0-6.0 mA	Filtración inherente	40° × 55°
Incremento de ajuste	0.1 mA/paso	Enfriamiento de ánodo	1 mm BE
			aire

Laboratorio de Toxicología Ambiental y Medicina Genómica del IIB. El tubo de rayos-X (TRX) empleado fue un YXLON modelo Y.SMART 583 160E/1.5 (fecha de manufacturación 10/2011 y núm. de serie 81485) y los haces fueron previamente caracterizados[25]. Algunas de las especificaciones de este TRX se describen en la Tabla 3.1.



(a) Vista frontal y lateral.



(b) Colocación del ratón a 61 cm de la fuente de rayos-X.

Figura 3.2. Fotografías de la irradiación de un ratón Balb/C. El ratón fue montado en un soporte que lo mantuvo vertical y perpendicular al haz de rayos-X.

3.3. Cálculos de dosis absorbida

La dosis absorbida a una profundidad x se puede calcular como[26]:

$$D_{tejido,Q} = K_{aire} \cdot f_a \left(\frac{\bar{\mu}_{en}}{\rho} \right)_{tejido}^{aire} = K_{aire} \cdot f_a \frac{\int_0^{E_{m\acute{a}x}} \left(\frac{\mu_{en}(E)}{\rho} \right)_{tejido} E \cdot \Phi(E) dE}{\int_0^{E_{m\acute{a}x}} \left(\frac{\mu_{en}(E)}{\rho} \right)_{aire} E \cdot \Phi(E) dE} \quad (3.1)$$

donde:

$$f_a = \frac{\int_{x=0}^{x_{m\acute{a}x}} C_a(x) dx}{\int_{x=0}^{x_{m\acute{a}x}} dx} = \frac{1}{x_{m\acute{a}x}} \frac{\int_{x=0}^{x_{m\acute{a}x}} \int_0^{E_{m\acute{a}x}} \Phi(E) \left(\frac{\mu_{en}(E)}{\rho} \right)_{tejido} e^{-\left(\frac{\mu(E)}{\rho} \right)_{tejido} \rho x} E dE dx}{\int_0^{E_{m\acute{a}x}} \Phi(E) \left(\frac{\mu_{en}(E)}{\rho} \right)_{tejido} E dE} \quad (3.2)$$

donde K_{aire} es el Kerma en aire medido, f_a es el factor de corrección que toma en cuenta la energía promedio depositada dentro del tejido debido a la atenuación del haz de rayos-X;

$C_a(x)$ es el cociente de la dosis en el tejido para un dado grosor x y la dosis en la superficie del tejido; $\Phi(E)$ es la fluencia de rayos-X de energía E según su espectro; $\mu_{en}(E)/\rho$ y $\mu(E)/\rho$ son los coeficientes másicos de absorción de energía y de atenuación, respectivamente.

Con el fin de estimar la dosis absorbida por los órganos de interés, se calculó la dosis absorbida en profundidad según la ecuación anterior (ec. 3.1) y se realizaron mediciones de las dimensiones y ubicación de cada órgano (éstos últimos datos se presentan en el Apéndice B) para así estimar la dosis absorbida promedio por órgano. Los valores de los término requerido en la ecuación 3.1 se obtuvieron de la siguiente manera:

Se obtuvo el espectro de energía de los rayos-X con el programa SpekCalc GUI versión 11 (Fig. 3.3(a)) con los parámetros de entrada presentados en la Tabla 3.2. Este programa permite calcular el espectro de energía de los rayos-X emitidos por un ánodo de tungsteno ingresando el voltaje al que se opera, el ángulo de inclinación del ánodo y los espesores de materiales/elementos como aire, berilio, aluminio, cobre, estaño, tungsteno, tantalio y agua, que atenúan al haz. La propuesta teórica fue desarrollada por Gavin Poludniowski y Phil Evans del Instituto de Investigaciones en Cáncer (Londres, UK)[27] [28]. El espectro que se obtiene puede ser ajustado a un determinado TRX y amperaje en que se opera. Por default, el espectro es calculado a un metro de la fuente de rayos-X. La validez de los cálculos que realiza el programa SpekCalc no ha sido probada para valores de ángulos del ánodo (θ) mayores a 30° . Sin embargo, para nuestro caso en que se calculó para 40° , encontramos concordancia entre los resultados del programa y los valores calculados a partir de mediciones realizadas a nuestro haz[25] (ver Tabla 3.2). La diferencia (respecto

Tabla 3.2. Parámetros de entrada y valores obtenidos con el programa SpekCalc GUI versión 11 para obtener el espectro de rayos-X.

Datos de entrada	Energía Pico (T0)	160 keV	
	Energía mínima (hvMin)	16 keV	
	Ancho del Bin Dhv	1 keV	
	Ángulo (th)	40°	
	Espesor de Aire (t_Air)	1000 mm	
	Espesor de Berilio (t_Be)	1 mm	
	Espesor de Aluminio (t_Al)	5.2324 mm	
	Espesor de Cobre (t_Cu)	0.254 mm	
	Espesor de estaño, tungsteno, tantalio y agua (t_Sn, t_W, t_Ta, t_Wa)	0 mm	
	Nf (default)	0.68	
	P (default)	0.33	
	Datos de obtenidos	1era. CHR (Al)	10.3 mm
		2da. CHR (Al)	11.8 mm
1CHR/2CHR (Al)		0.868	
1era. CHR (Cu)		0.700 mm	
2da. CHR (Cu)		1.18 mm	
1CHR/2CHR (Cu)		0.591	
Energía promedio		75.6 keV	
Energía efectiva (Al)		65.1 keV	
Energía efectiva (Cu)		68.9 keV	
Salida Bremsstrahlung		74.74 μ Gy/mAs a 1 m	
Salida Característicos	11.47 μ Gy/mAs a 1 m		
Valores de mediciones [20]	Energía efectiva	67.39 \pm 0.73 keV	
	1era. CHR (Al)	10.17 \pm 0.11 mm	
	Función de atenuación	$a(1 + d)^b$ donde $a = 4102.68811 \pm 35.17886$ $b = -2.01533 \pm 0.00195$	

a el valor extremo del intervalo de incertidumbre de nuestros valores) para la 1era. capa hemirreductora de aluminio (1era. CHR Al) fue del 0.2% (10.3 mm y 10.28 mm, valor de SpekCalc y nuestro valor respectivamente) y 4.17% para la energía efectiva (65.276 keV y 68.12 keV, valor de SpekCalc y nuestro valor respectivamente).

A partir del espectro obtenido, se calculó de la fluencia de fotones ($\Phi(E)$) ajustando el espectro para 6 mA en 1 cm² y corrigiéndolo por el cambio de distancia (de 1.00 m a 0.61

m, distancia a la cual se calcula el espectro de rayos-X y distancia a la cual se colocan los ratones, respectivamente) (Fig. 3.3(b)). Ésto último, según la función de atenuación del haz (ver Tabla 3.2) previamente determinada en su caracterización[25].

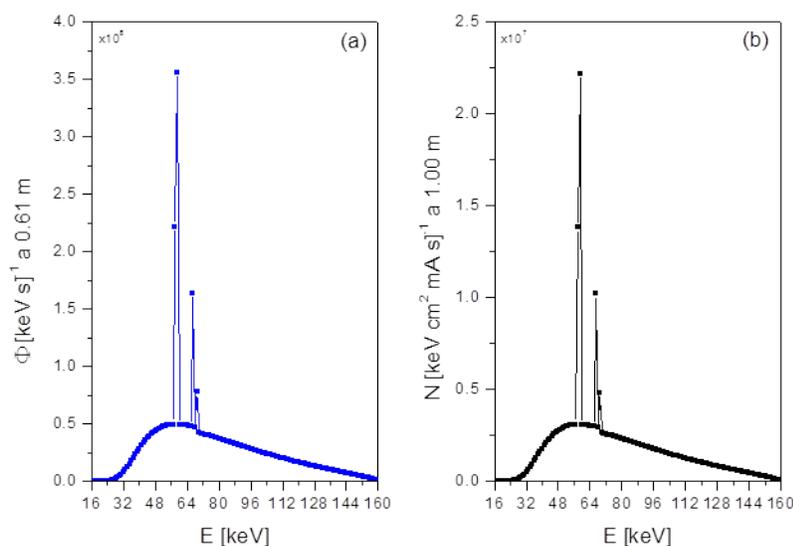


Figura 3.3. Espectro de fluencia de fotones (a) calculado a partir del espectro de energía de rayos-X (b) que se obtuvo con el programa SpeckCalc GUI versión 11 con los parámetros de entrada indicados en la Tabla 3.2.

Los valores de $\mu_{en}(E)/\rho$ y $\mu(E)/\rho$ (con E tomando los valores de energía del espectro) se interpolaron (Tabla 3.3) de datos para dichos coeficientes disponibles en la base de datos *X-Ray Attenuation and Absorption for Materials of Dosimetric Interest (XAAMDI)* del sitio web del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés)[29] (Tabla A.2 del Apéndice A).

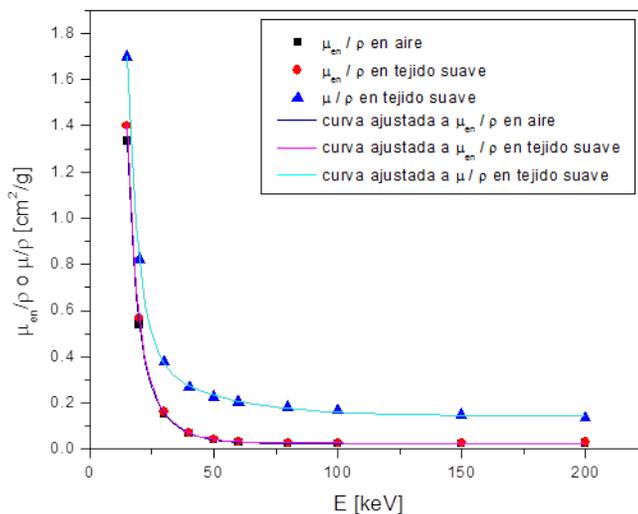


Figura 3.4. Gráfica de los coeficientes másicos de absorción de energía y de atenuación de las energías de 15 a 200 keV, disponibles en la base de datos XAAMD del NIST. Los símbolos corresponden al valor consultado y la línea a la curva ajustada según el caso.

Los valores obtenidos del cálculo de dosis absorbidas en profundidad se presentan en la Tabla 3.4a. Como se mencionó anteriormente, con los resultados de este cálculo, las dimensiones y ubicación aproximadas de cada órgano, se estimó la dosis promedio recibida por órgano de nuestro interés (Tabla 3.4b). El hígado fue el órgano que más dosis recibió (0.500 ± 0.000 Gy), seguido por corazón (0.485 ± 0.001 Gy), pulmón (0.482 ± 0.001 Gy), cerebro (0.425 ± 0.001 Gy) y finalmente riñón (0.409 ± 0.001 Gy). A manera de ilustración, en esta misma Tabla 3.4 se incluye una radiografía tomada a un ratón macho Balb/C montado en el soporte de irradiación, sobre la cual se sobrepone la gráfica de dosis absorbida en función de la profundidad.

Tabla 3.3. Parámetros de las curvas ajustadas a los valores de los coeficientes máscicos de absorción ($\mu_{en}(E)/\rho$) y atenuación ($\mu(E)/\rho$) (ver Tabla A.2 y Figura 3.4). La incertidumbre de estos valores es $\pm 1\%$.

Forma de la curva: $\mu_i(E)/\rho = A1 * e^{-E/t1} + A2 * e^{-E/t2} + y0$

Coefficiente máscico	Parámetro	Valor	Error estándar
$\mu_{en}(E)/\rho$ en Aire	R^2	0.99999	
	y0	0.0246	0.0007
	A1	2.3015	0.3620
	t1	10.0545	0.4428
	A2	49.5128	5.1225
	t2	3.6269	0.1425
$\mu_{en}(E)/\rho$ en Tejido suave	R^2	0.99999	
	y0	0.0269	0.0008
	A1	2.5190	0.4430
	t1	9.9080	0.4818
	A2	52.8925	6.3134
	t2	3.6008	0.1621
$\mu(E)/\rho$ en Tejido suave	R^2	0.99970	
	y0	0.1440	0.0065
	A1	0.4706	0.1015
	t1	29.9125	5.0008
	A2	30.3307	3.2927
	t2	4.7264	0.2014

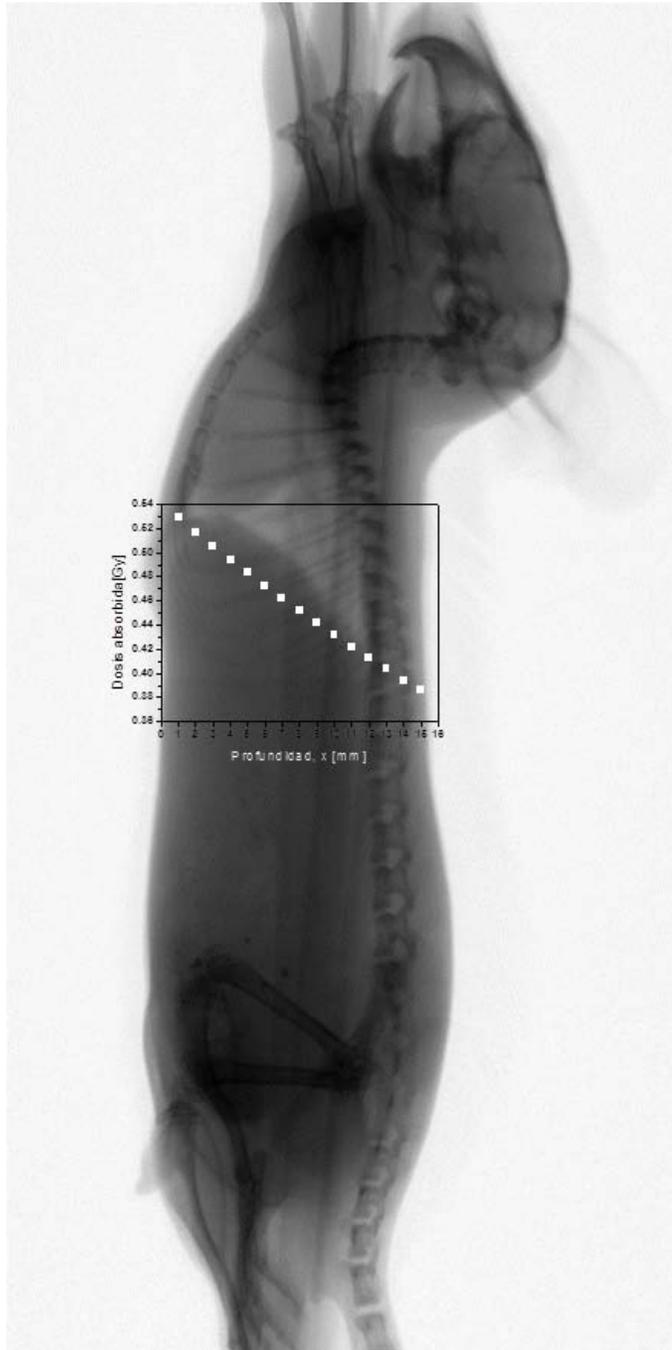
3.4. Manejo de incertidumbres

Los cálculos de incertidumbres se realizaron conforme a la ley de propagación de incertidumbres: Para una función $f_j(\vec{x})$ donde $\vec{x} = x_1, x_2, \dots, x_n$ son los parámetros experimentales considerados independientes y que tienen asociados un error de medida $\Delta x_i = \sigma(x_i)$, la incertidumbre propagada es dada por

$$\sigma(f) = \Delta f(x_1, \dots, x_n) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\left. \frac{\partial f_j}{\partial x_i} \right|_{\vec{x}} \right)^2 \sigma^2(x_i)} \quad (3.3)$$

si consideramos que los errores en la medida $\Delta x_i = \sigma(x_i)$ son pequeños en comparación con el valor medido $\vec{x} = \tilde{x}_1, \tilde{x}_2, \dots, \tilde{x}_n$.

Tabla 3.4. Radiografía de un ratón macho Balb/C montado en el soporte de irradiación (imagen a la izquierda). La gráfica sobre la imagen muestra la dosis absorbida calculada en profundidad y sus valores se indican en (a). (b) presenta la dosis promedio estimada por órgano. La imagen fue adquirida en uno de los laboratorios de dosimetría del Instituto de Física-UNAM, por el Dr. Arnulfo Martínez.



(a)

Profundidad [mm]	Dosis [Gy]
1	0.529±0.002
2	0.517±0.002
3	0.506±0.002
4	0.494±0.002
5	0.483±0.002
6	0.472±0.002
7	0.462±0.002
8	0.452±0.002
9	0.442±0.002
10	0.432±0.002
11	0.422±0.002
12	0.413±0.002
13	0.404±0.002
14	0.394±0.002
15	0.386±0.002

(b)

Órgano	Dosis promedio [Gy]
Cerebro	0.425±0.001
Corazón	0.485±0.001
Pulmón	0.489±0.001
Hígado	0.500±0.001
Riñón	0.409±0.001

3.5. Cuantificación de niveles de mRNA

Una de las técnicas que permite estimar la cantidad de mRNA de una determinada secuencia es la *Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real* (PCR-*tiempo real*, misma que se describe más adelante en la sección 3.5.3) con una previa reacción de retrotranscripción, esto es, copiar el mRNA a DNA (DNA complementario, cDNA) ya que la enzima Polimerasa sólo actúa sobre DNA. La metodología seguida para cuantificar los niveles de mRNA de las proteínas Nrf2, Trx1 y NGF en cada órgano recolectado fue, extraer RNA celular de una muestra de órgano, realizarle una reacción de retrotranscripción para obtener cDNA, y posteriormente una PCR-*tiempo real* específica para la secuencia del cDNA de los mRNA de las proteínas de interés. La Figura 3.5 muestra un esquema que generaliza la metodología realizada. Las siguientes secciones describen con detalle lo realizado y en Apéndices se incluyen los protocolos seguidos.

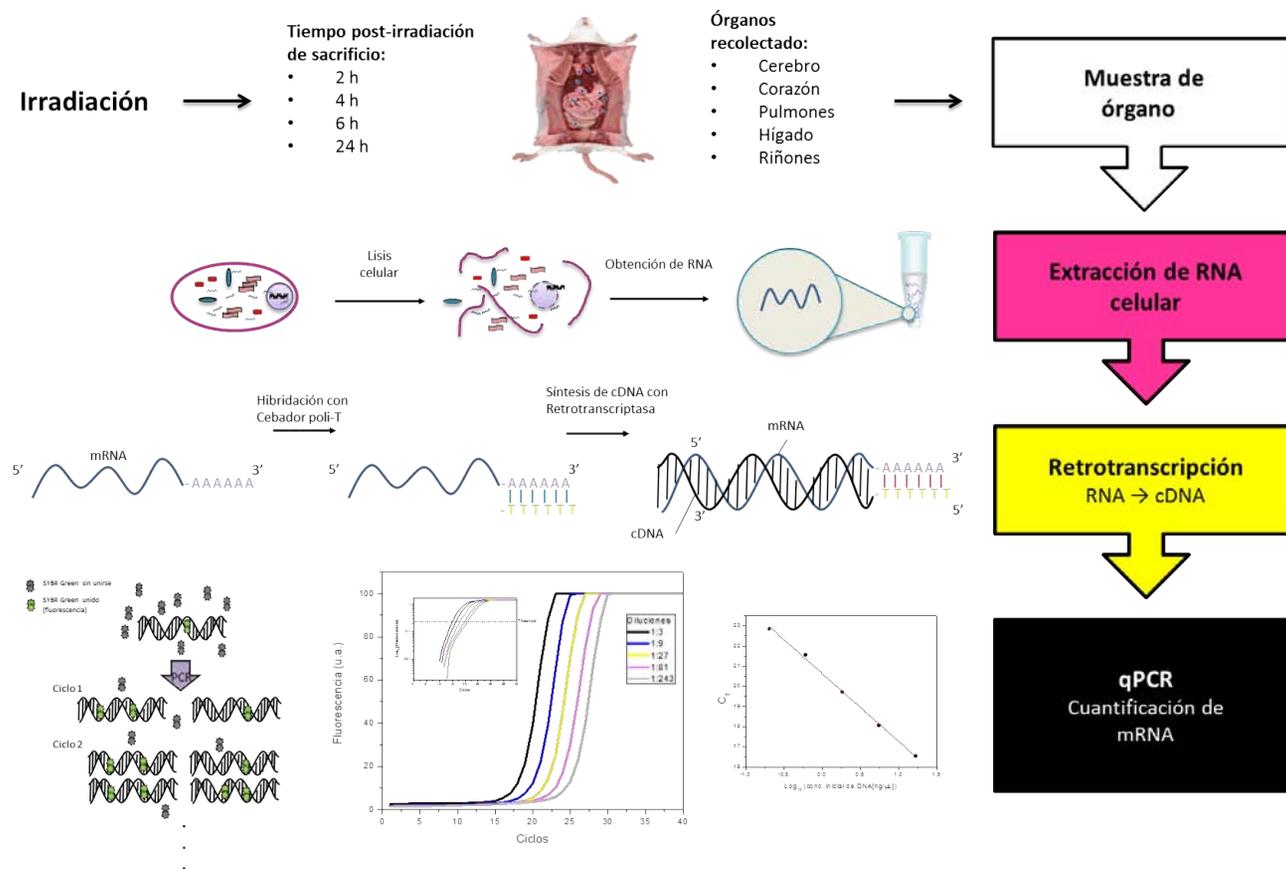


Figura 3.5. Esquema de la metodología llevada a cabo para cuantificar el mRNA de los genes de interés. cDNA: DNA complementario; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. La imagen de SYBR Green es basada en figura de la referencia [30].

3.5.1. Extracción de RNA celular

Se tomó una muestra (50-100 mg) de cada órgano recolectado y se extrajo el RNA celular utilizando Trizol® Reagent. El protocolo seguido se describe en el Apéndice C.

Pruebas al RNA celular extraído: Cuantificación, Pureza e Integridad

Se realizaron pruebas de pureza e integridad al RNA celular extraídos. Los resultados de estas pruebas dan información sobre la calidad del material genético con la cual, se determina si la muestra puede ser usada en posteriores técnicas, como la PCR- *tiempo real*.

La cuantificación del RNA en cada muestra es necesaria para realizar la reacción de retrotranscripción. Los ácidos nucleicos son comúnmente cuantificados por medio de la medición de la absorción de radiación ultravioleta (UV) empleando un espectrofotómetro. Se conoce que los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y proteínas tienen absorbancia máxima a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, respectivamente. El cociente de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A_{260}/A_{280}) es usado para determinar la pureza del RNA. Generalmente un cociente de ~ 2.0 es aceptado como RNA “puro” [31][32]. En nuestro caso, la cuantificación y medición de A_{260}/A_{280} del RNA extraído se realizó con un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 utilizando agua libre de RNAsas (misma en que se re-suspendió el RNA) como blanco comparativo.

Para determinar la integridad del RNA, una porción de cada muestra fue sometida a electroforesis horizontal en un gel de agarosa (1.2% de concentración y se utilizó TAE 1× como solución amortiguadora) durante 45 minutos a 80 V. Para observar el material genético se realizó un procedimiento comúnmente seguido para esto en laboratorios de genó-

mica, el cual consiste en sumergir el gel de agarosa en bromuro de etidio y posteriormente fotografiarlo utilizando una lámpara de luz ultravioleta. El bromuro de etidio se intercala entre las bases del RNA. Al ser expuestos a radiación UV, el RNA absorbe la energía del UV y la transfiere al bromuro de etidio quien reemite radiación a 590 nm (región rojo-naranja del espectro visible) que puede ser captada por una cámara fotográfica. Por lo anterior, se utilizó bromuro de etidio al 0.01 %, un equipo Gel Logic 200, Imaging System (Kodak®) y una lámpara de luz ultravioleta de 260 nm. La determinación de la integridad de una muestra a través de esta prueba se basa en la observación de las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (rRNA), 18S y 28S. El rRNA es el RNA más abundante en la célula, lo cual lo hace el más fácil de analizar. En esta prueba se infiere que si el rRNA se encuentra íntegro (clara observación de las bandas 18S y 28S) entonces el resto de los RNAs (como el mRNA) también lo están.

Los resultados de estas pruebas se presentan en el Apéndice F.

3.5.2. Retrotranscripción

La retrotranscripción es la reacción donde se sintetiza DNA complementario (cDNA, por sus siglas en inglés) a un RNA. Esta reacción es llevada a cabo por una DNA polimerasa (transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, RT) la cual poseen muchos virus (retrovirus). En el laboratorio se puede llevar a cabo esta misma reacción de manera artificial dando las condiciones para que se lleve a cabo por medio de cambios térmicos, en una reacción donde se incluye el RNA molde, la enzima RT, los desoxirribonucleósidos tri-fosfato (*dNTP*: *dATP*, *dTTP*, *dCTP* y *dGTP*) y el cebador (iniciador de una reacción).

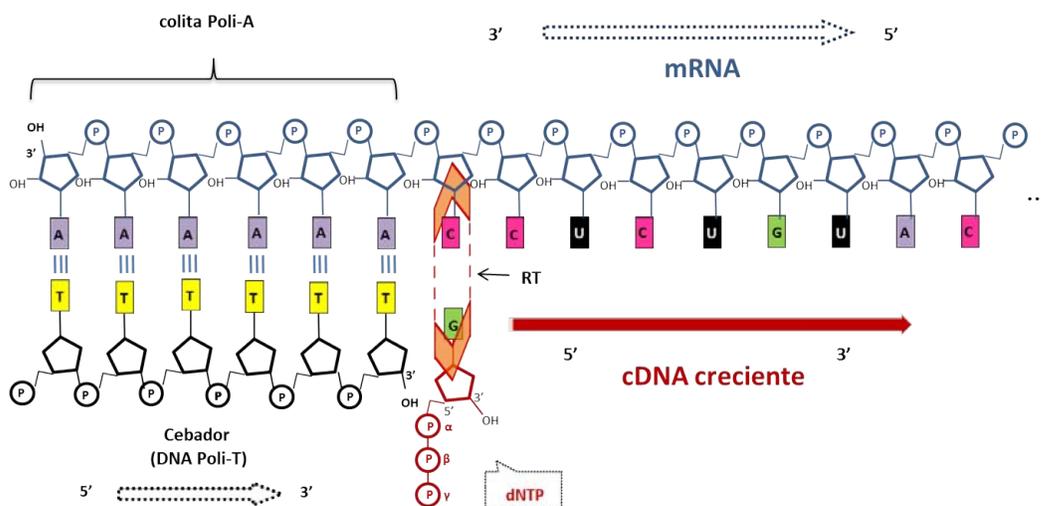


Figura 3.6. Esquema de la retrotranscripción. RT=retrotranscriptasa. Basado en figuras de la referencia [33].

Uno de los objetivos de llevar a cabo la retrotranscripción es, por ejemplo, cuantificar mRNA de algún gen de interés combinándola con la técnica de PCR. La unión de estas dos técnicas, la retrotranscripción y la posterior PCR, resulta tener una ventaja para la cuantificación de mRNAs: La mayoría de mRNA que serán traducidos en proteínas contienen secuencias de adeninas en el extremo 3' (colita de poli-A). Si en la reacción de retrotranscripción se dispone de polímero de DNA de timina (poli-T)(cebador), éstos hibridarán con la colita poli-A de los mRNA y proveerán un extremo libre de OH (3'-OH) que permite a la RT comenzar a sintetizar (elongar) la cadena de cDNA (ver Figura 3.6).

El RNA celular extraído que cumplió las pruebas de pureza e integridad, se utilizó para sintetizar cDNA con la RT del virus de leucemia murina (M-MLV, por sus siglas en inglés) de Promega siguiendo el protocolo descrito en el Apéndice D en un termociclador Multi-Gene Opti Max® (Labnet International Inc., EUA).

3.5.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La replicación es el proceso de duplicar el DNA y que lleva a cabo la célula en la fase S² del ciclo celular. La DNA polimerasa es la enzima ensambladora de la nueva cadena de DNA (en el Apéndice E.0.1 se habla sobre el mecanismo molecular de esta reacción). En el laboratorio, esta misma reacción es reproducida n veces para un mismo segmento de interés (replicación en “cadena”) con el fin de generar un gran número (2^n) de copias de ese segmento (ver Figura 3.7) que facilite su detección y estudio. Esta reacción es entonces llamada *Reacción en Cadena de la Polimerasa* y es una de las técnicas en investigaciones biológicas-molecular más utilizadas en los últimos años, ya que puede ser adaptada según se desee analizar los resultados cualitativa (presencia o ausencia de una secuencia de DNA) o cuantitativamente (cantidad de copias de DNA).

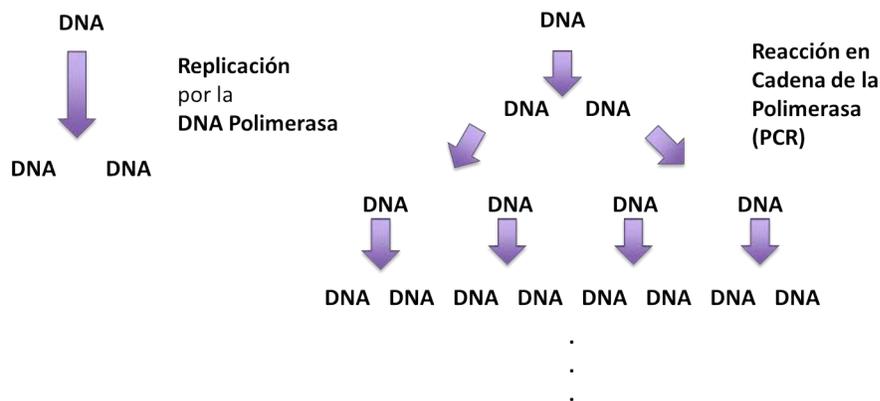


Figura 3.7. Réplica de DNA llevado a cabo por la enzima DNA polimerasa. La reacción en cadena de ésta enzima (PCR) produce 2^n copias de DNA. n =número de veces que se repite la reacción.

PCR-tiempo real

²S de Síntesis. Es la fase donde la célula duplica (sintetiza) todo su material genético y proteínas para dar paso a la mitosis, fase donde se divide en dos células hijas que portan la misma información.

La PCR-*tiempo real* consiste en detectar la acumulación del producto amplificado (amplificación) conforme progresa la reacción (número de ciclos), *i.e.*, en “tiempo real”. La Figura 3.8 presenta una gráfica típica de una curva obtenida por PCR-*tiempo real*. En la curva se pueden distinguir dos fases: La fase exponencial y la fase meseta (no-exponencial). Durante la primera fase, la cantidad del producto de la PCR es, idealmente, el doble en cada ciclo (se cumple 2^n). Conforme la reacción avanza, los componentes (*dNTP*) son consumidos y la reacción se ve limitada (alcanza la meseta). Para la detección y medición del amplificación, en la reacción se incluye una molécula que se vuelve fluorescente al hibridar con la doble hebra de DNA (por ej., el SYBR® Green(ver Apéndice E.1)), y en principio, la cantidad de fluorescencia que se detecte es proporcional a la cantidad de DNA presente en ese momento. En estos casos, la reacción es llevada a cabo en un termociclador especializado equipado con detectores de fluorescencia, que permite monitorear el progreso de la reacción.

El análisis de la PCR-*tiempo real* consiste en determina el ciclo en que la fluorescencia comienza a ser detectable (cruza el umbral (**Threshold**³)). A ese número de ciclos se le denomina **valor** C_T . Debido a que el valor C_T es medido dentro de la fase exponencial, éste puede ser usado para calcular con precisión la cantidad de plantilla al inicio de la reacción. Por ejemplo, en una reacción en la que estén presentes una gran cantidad de plantillas, se requerirán pocos ciclos para llegar al umbral de detección, o dicho de otra manera, se tendrá un temprano valor C_T (bajo valor C_T). De manera contraria, para una reacción que posee pocas plantillas de inicio el valor C_T será tardío (alto valor C_T). Por lo

³se usará el término en inglés para mantener consistencia con la literatura

tanto, la cuantificación de muestra se basa en el valor C_T .

En nuestro caso, se estandarizó la técnica PCR-*tiempo real* utilizando SYBR® Green como especie química fluorescente y cebadores específicos para amplificar la secuencia correspondiente al cDNA del mRNA de Nrf2, Trx1 y NGE, en cada órgano estudiado.

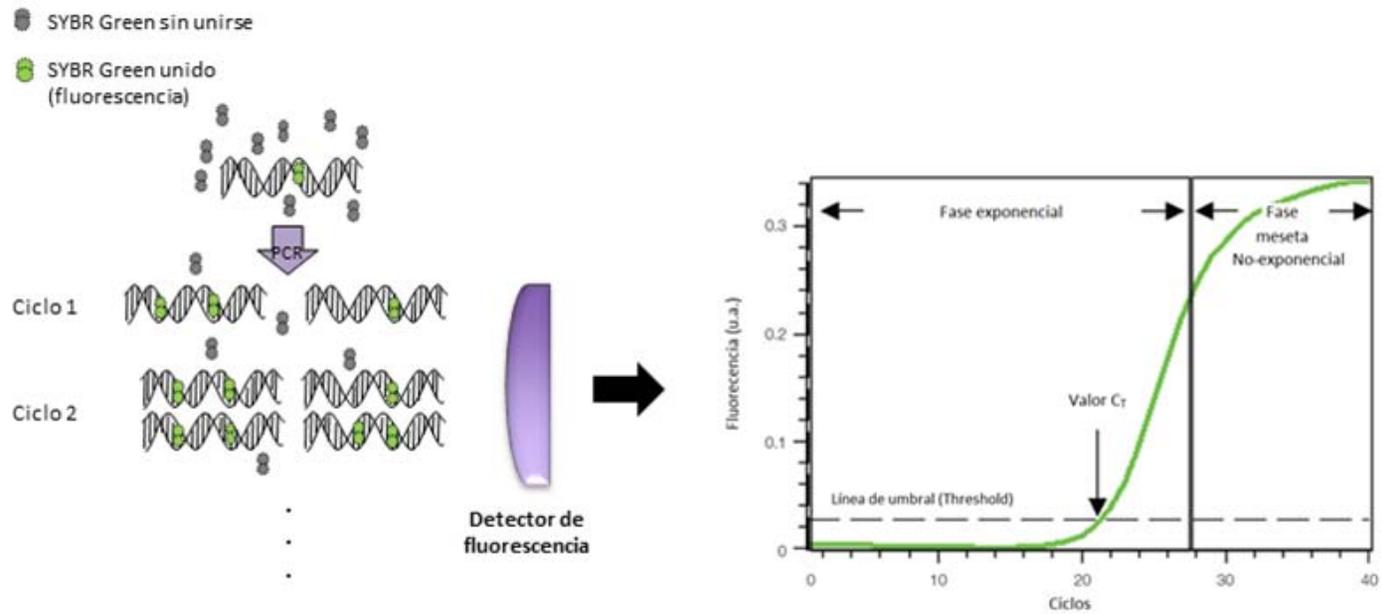


Figura 3.8. Gráfica típica de amplificación (curva de fluorescencia) obtenida por PCR-*tiempo real*. Fase exponencial: La cantidad del producto de PCR es aproximadamente el doble en cada ciclo. Fase No-exponencial (meseta). Adaptación de la referencia[30].

3.5.3.1. Optimización de parámetros en la PCR-*tiempo real*

La PCR-*tiempo real* provee alta sensible y confiabilidad, siempre y cuando se optimicen los parámetros de reacción como son: Diseño de cebadores y su concentración en la reacción, cantidad de muestra molde, temperaturas y duración de ciclado. Se sabe que un ensayo PCR-*tiempo real* está optimizado si se tiene [30]:

- Curva estándar lineal ⁴ ($R^2 > 0.980$ ó $R > |-0.990|$).
- Alta eficiencia de amplificación (0.9-1.05).
- Consistencia en reacciones replicadas.

Cebadores (oligos)

En este caso, el cebador es un fragmento pequeño de RNA (oligonucleótidos ⁵, coloquialmente referidos como “oligos”) que se unen por complementaridad al segmento DNA blanco y permite comenzar la replicación. Éste aporta el 3'-OH que permite a la DNA polimerasa reconocer la región de replicación y comenzar a ensamblar la nueva hebra de DNA (en el Apéndice E se describe más sobre el mecanismo molecular). Entonces, para replicar un segmento específico (por ejemplo el correspondiente al mRNA de Nrf2) en la PCR, se provén los oligos con las secuencias que complementan el inicio y final de la región deseada. El oligo que complementa la hebra de DNA en el sentido 5'→3' se le denomina en-sentido⁶ (F, del inglés forward) y anti-sentido al oligo que complementa a la hebra en

⁴en una escala semi-log

⁵con el prefijo oligo, del griego *oligo* (“poco”), se refiere entonces a pocos nucleótidos (cincuenta o menos).

⁶por convención, la dirección 5'→3' se toma como referencia debido a que es la dirección en que la DNA polimerasa elonga la nueva hebra de DNA.

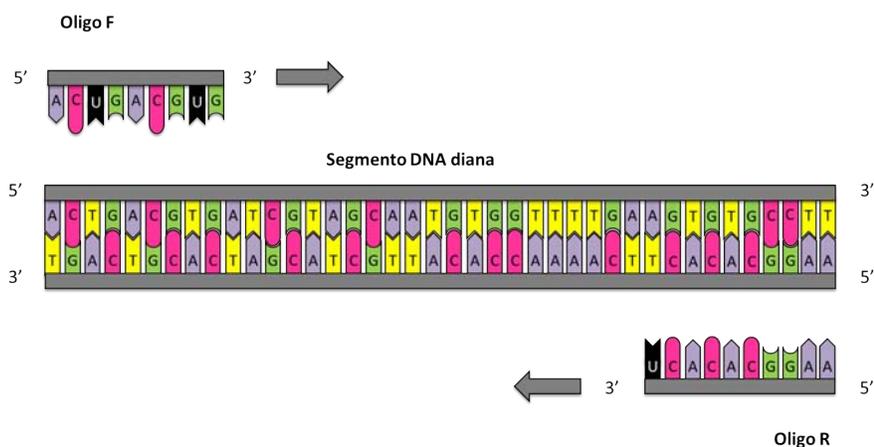


Figura 3.9. Esquema de la complementariedad de los oligos en-sentido (F) y anti-sentido (R) a una región DNA blanco (segmento que será amplificado en la PCR).

el sentido 3'→5' (R, del inglés reverse) (ver Figura 3.9).

Para determinar la **concentración óptima** de oligos F y R en la PCR-*tiempo real* (mínima o tardía formación de dímeros) para los mRNA de los genes de interés (NGF, Nrf2, Trx1, β -Actina y GAPDH; los dos últimos como opciones a control endógeno) en cada órgano, se probaron combinaciones de tres diferentes concentraciones (5, 3 y 1 μ M) de oligos F y R (Figura 3.10). El protocolo de las PCR-*tiempo real* realizadas se especifica en el Apéndice E. Las secuencias de nucleótidos de F y R se obtuvieron de trabajos previos [8] [34]. En el caso de NGF y β -Actina, las secuencias fueron diseñadas utilizando el programa Oligo7. La información de cada oligo se presenta en la Tabla 3.5. Las combinaciones de oligos F y R encontradas como óptimas se presentan en la Tabla 3.6. Estas combinaciones de concentraciones fueron las utilizadas en las subsiguientes PCR-*tiempo real* según el caso.

		Oligo R		
		5 μ M	3 μ M	1 μ M
Oligo F	5 μ M	F5R5	F5R3	F5R1
	3 μ M	F3R5	F3R3	F3R1
	1 μ M	F1R5	F1R3	F1R1

Figura 3.10. Matriz de oligos. Combinaciones de tres diferentes concentraciones (5, 3 y 1 μ M) de oligos forward y reverse.

Tabla 3.5. Secuencia de nucleótidos de los oligos F y R utilizados en la PCR-*tiempo real* para los mRNA de las proteínas de interés.

Proteína	ID	Oligo: Secuencia de nucleótidos 5' \rightarrow 3'	Longitud del segmento amplificado
			[pb]
NGF	NM_013609.3	F: GAA CAT GCT GTG CCT CAA GCC R: CCA GTA TAG AAA GCT GCG TCC TT	180
Nrf2	NM_010902	F: CAC CAG TGG ATC CGC CAG CTA R: TAT CCA GGG CAA GCG ACT CA	133
Trx1	NM_011660	F: CGT GGT GGA CTT CTC TGC TAC R: GGT CGG CAT GCA TTT GAC TTC	160
GAPDH	NM_001289726	F: ACC ACC AAC TGC TTA GCG CC R: CAG CTC TGG GAT GAC CTT GC	216
β -Actina	NM_007393.3	F: CCA GGT CAT CAC TAT TGG CAA CGA G R: TCT TTA CGG ATG TCA ACG TCA CAC T	133

Tabla 3.6. Combinación de concentraciones de oligos F y R, encontrada como óptima de entre las combinaciones probadas (ver la figura 3.10) en cada caso (proteína y órgano).

Proteína	Órgano				
	CEREBRO	CORAZÓN	PULMÓN	HÍGADO	RIÑÓN
NGF	F3R5	F3R5	F3R3	F3R3	F3R3
Nrf2	F3R3	F5R3	F3R3	F5R3	F5R3
Trx1	F5R5	F3R5	F5R3	F3R3	F5R3
GAPDH	F1R3	F1R3	F5R3	F1R3	F1R5
β -Actina	F1R1	F3R3	F5R3	F3R3	F1R3

Curvas estándar

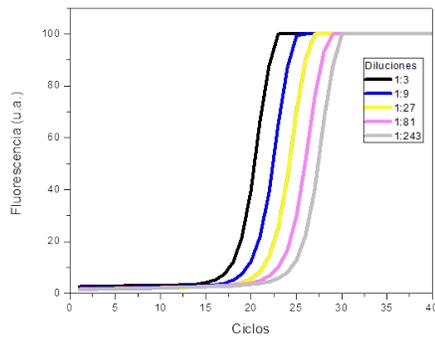
La curva estándar de una secuencia DNA blanco se obtiene como una curva ajustada a la gráfica de valores C_T en función del logaritmo base 10 de la concentración inicial de

DNA, de diluciones seriales (Figura 3.11c). La ecuación de la curva ajustada puede servir para interpolar la concentración de DNA blanco desconocida en alguna muestra, según el valor C_T de su PCR-*tiempo real*. La Figura 3.12 muestra un ejemplo de cómo se realizaron las diluciones seriales 1:3. La Figura 3.11a muestra un ejemplo de la curva de la señal de fluorescencia que se obtienen y en la Figura 3.11b se grafica el valor de su logaritmo base 10, donde se puede apreciar el establecimiento del threshold para conocer los valores C_T de cada dilución. Las diluciones seriales deben ser al menos cinco (cinco puntos para ajustar la curva) y realizar réplicas técnicas (al menos tres) para verificar la consistencia. Las concentraciones máxima y mínima definen el rango dinámico de la curva estándar. A partir de su pendiente (m), la eficiencia de amplificación del segmento de DNA blanco (E) es calculada según la ecuación[35]:

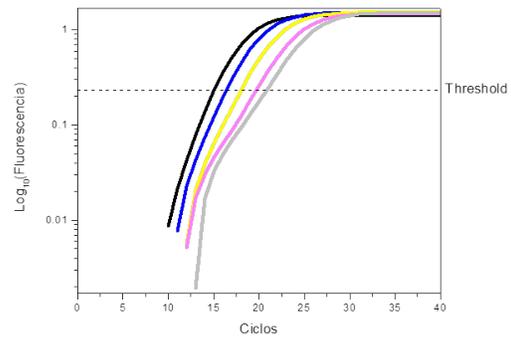
$$E = 10^{-1/m} - 1. \quad (3.4)$$

Curva de desnaturalización (o referida en inglés como curva *Melting*)

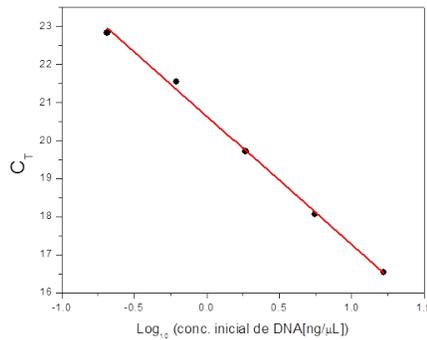
Como parte de control de calidad de la PCR-*tiempo real*, al finalizar los ciclos de la reacción, el producto (amplicón) puede someterse a una rampa de temperatura (rampa Melt) con fin de conocer la especificidad de la reacción. Conforme se aumenta la temperatura, el amplicón se desnaturaliza y la señal de fluorescencia disminuye. Al graficar el cambio de la fluorescencia respecto al cambio de la temperatura (dF/dT) en función de la temperatura, se obtiene información acerca del tamaño del segmento amplificado. En caso de que se tenga un sólo tamaño de DNA amplificado (alta especificidad), se observará un sólo pico (curva gaussiana). De lo contrario, se observará más de un pico que indican la



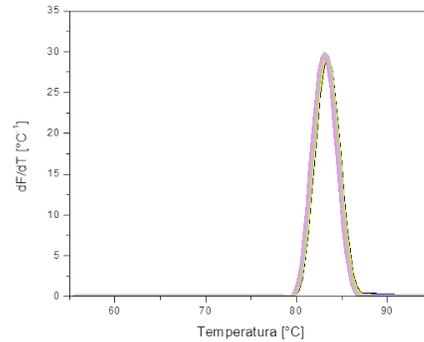
(a) Curva de la señal de fluorescencia o simplemente **curva de fluorescencia**, de cinco diluciones seriales 1:3.



(b) Logaritmo de la señal de fluorescencia y establecimiento del **Threshold** para conocer los valores C_T .



(c) Gráfica del valor C_T en función del logaritmo base 10 de la concentración inicial de cDNA. La **curva estándar** corresponde a la curva ajustada (línea roja).



(d) **Curva melting**. Gráfica del cambio de la señal de fluorescencia respecto al cambio en la temperatura (dF/dT) en función de la temperatura de la rampa Melt.

Figura 3.11. Gráficas de PCR-*tiempo real* para obtener la curva estándar de un segmento específico de DNA.

presencia de segmentos de DNA de diversos tamaños (baja especificidad). La Figura 3.11d muestran curva Melting de la que se podría concluir alta especificidad.

Para estandarizar la técnica PCR-*tiempo real* para el cDNA de los mRNA de interés, se obtuvo una curva estándar en cada órgano, usando la combinación óptima de concentraciones de oligos F y R (Tabla 3.6). En el caso del hígado se utilizaron diluciones seriales

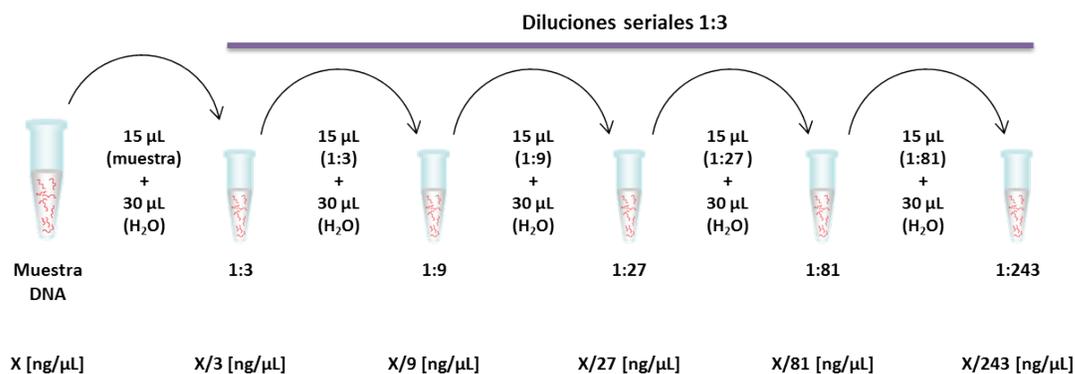


Figura 3.12. Ejemplo de diluciones seriales 1:3.

1:5 (1:5, 1:25, 1:125, 1:625 y 1:3125) y 1:3 (1:3, 1:9, 1:27, 1:81 y 1:243) para el resto de los órganos. Todas las PCR-*tiempo real* se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el Apéndice E.2. El establecimiento del threshold en cada caso, se hizo utilizando el software del equipo usado (Rotor-Gene® Q, Software 1.7, Núm. de serie 120870). En el Apéndice G se presentan las gráficas de todas las curvas estándar obtenidas y la Tabla 3.7 resume su información: R , R^2 , pendiente (m), ordenada al origen (b), E y el valor del threshold. Los casos de NGF (marcados con †), excepto en corazón, no cumplieron con algún criterio (R^2 y/o E) para considerar a la PCR-*tiempo real* optimizada. El caso de Trx1 en riñón tampoco se consideró optimizada ya que no cumplió el criterio de eficiencia. Entonces, para los casos antes mencionados se reserva su confiabilidad.

Tabla 3.7. Datos de las curvas estándar obtenidas.

Órgano	Proteína	R^2	R	m	b	E	Threshold
CEREBRO	NGF†	0.99507	0.99753	-3.057	30.074	1.12	0.52980
	Nrf2	0.99829	0.99915	-3.165	16.490	1.07	0.44200
	Trx1	0.99762	0.99881	-3.336	20.596	0.99	0.44200
	GAPDH	0.99891	0.99945	-3.287	16.192	1.01	0.16980
	β -Actina	0.99586	0.99793	-3.247	19.566	1.03	0.16980
CORAZÓN	NGF	0.98733	0.99365	-3.218	29.400	1.05	0.52980
	Nrf2	0.99371	0.99685	-3.142	26.354	1.08	0.57430
	Trx1	0.99714	0.99857	-3.250	21.477	1.03	0.57430
	GAPDH	0.99678	0.99839	-3.282	18.296	1.02	0.57430
	β -Actina	0.99847	0.99923	-3.255	16.571	1.03	0.04640
PULMÓN	NGF†	0.6511	0.80691	-1.045	26.821	8.06	0.05696
	Nrf2	0.99852	0.99926	-3.317	20.701	1.00	0.14000
	Trx1	0.99834	0.99917	-3.412	18.070	0.96	0.14000
	GAPDH	0.99975	0.99975	-3.438	17.454	0.95	0.14000
	β -Actina	0.99962	0.99981	-3.441	15.249	0.95	0.14000
HÍGADO	NGF†	0.92270	0.96057	-2.292	25.522	1.73	0.05696
	Nrf2	0.99325	0.99662	-3.234	24.785	1.04	0.45110
	Trx1	0.99742	0.99871	-3.262	18.605	1.03	0.45110
	GAPDH	0.99809	0.99904	-3.298	18.332	1.01	0.45110
	β -Actina	0.99859	0.9993	-3.329	20.393	1.00	0.45110
RIÑÓN	NGF†	0.95999	0.97979	-3.071	26.773	1.12	0.05696
	Nrf2	0.99824	0.99912	-3.267	21.494	1.02	0.11800
	Trx1†	0.99726	0.99863	-3.063	15.481	1.12	0.11800
	GAPDH	0.99688	0.99844	-3.377	14.368	0.98	0.10087
	β -Actina	0.99898	0.99949	-3.524	17.172	0.92	0.10087

m: Pendiente, *b*: Ordenada al origen.

†No cumplió con las condiciones de qPCR óptima (ver sección 3.5.3.1).

3.5.3.2. PCR-tiempo real de muestras

Se realizaron PCR-tiempo real con cada una de las muestras obtenidas, para los mRNA de los genes de interés. En cada experimento se incluyó una reacción de alguna de las diluciones usadas en su correspondiente curva estándar. Esto último permite mantener un control estandarizado en la reacción (el valor C_T no debe variar $\pm 5\%$) y posteriormente interpolar en la curva estándar la concentración de cDNA. Se hicieron dos réplicas técnicas para cada muestra y la dilución del cDNA fue 1:5 para las muestras de hígado y 1:3 para las muestras de los órganos restantes.

El nivel de mRNA de una determinada proteína pueden calcularse relativa al nivel de otra (diciendo cuántas veces aumentó/disminuyó), siempre y cuando el nivel de ese mRNA no se vea alterado por el tratamiento, i.e., sea un control endógeno. De otra manera, la cuantificación absoluta es otra opción. Consiste en calcular el número de copias de cDNA de la secuencia en cuestión presentes en una muestras. De esta manera, el efecto de un tratamiento en una expresión génica se determina a través de la comparación del número de copias encontradas en tratados y controles.

Genes propuestos como control endógeno: GAPDH y β -Actina

La función esencial conocida hasta ahora de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es como enzima importante en la vía glucolítica[36]. En cuanto a β -Actina, como esencial para la estructura y cinética del citoesqueleto[36]. El nivel de β -Actina y/o GAPDH ha sido sugerido por algunos[30][37][38][39] como control endógeno, siempre con la recomendación de que se valide su estabilidad ante el tratamiento que se desea evaluar. Para determinar si los niveles de mRNA de GAPDH y/o de β -Actina podían ser considerados controles endógenos en nuestros experimentos, se aplicó el método $\Delta C'_T$ a los valores C_T obtenidos en sus PCR-*tiempo real*. El **método** $\Delta C'_T$ fue propuesto por Schmittgen y Livak [40] para determinar el efecto de un tratamiento experimental en la expresión de un candidato a gen control. Parte de lo siguiente:

La cantidad de producto amplificado en la fase exponencial de la PCR-*tiempo real* puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$X_n = X_0 \cdot (1 + E_X)^n \quad (3.5)$$

donde X_n es el número de moléculas de DNA blanco al ciclo n de la reacción, X_0 es el número de moléculas de DNA blanco inicial y E_X es la eficiencia de amplificación del blanco. Entonces la cantidad de moléculas blanco en el valor C_T sería

$$X_T = X_0 \cdot (1 + E_X)^{C_T} = K_T \quad (3.6)$$

donde K_T una cantidad constante necesaria para llegar al Threshold.

Planteando ecuaciones análogas para el número de moléculas de DNA blanco en una muestra tratada y otra control, $X_{T,t}$ y $X_{T,c}$, respectivamente como

$$X_{T,t} = X_{0,t} \cdot (1 + E_X)^{C_{T,t}} = K_T \quad (3.7)$$

y

$$X_{T,c} = X_{0,c} \cdot (1 + E_X)^{C_{T,c}} = K_T \quad (3.8)$$

podemos conocer la cantidad inicial de DNA blanco en cada una, $X_{0,t}$ y $X_{0,c}$, a partir de sus respectivos valores $C_{T,t}$ y $C_{T,c}$ (reacomodando las dos anteriores):

$$X_{0,t} = K_T \cdot (1 + E_X)^{-C_{T,t}} \quad (3.9)$$

y

$$X_{0,c} = K_T \cdot (1 + E_X)^{-C_{T,c}}. \quad (3.10)$$

Si normalizamos la expresión de DNA blanco respecto al control, dividiendo $X_{0,t}$ por $X_{0,c}$, obtenemos

$$X_N = \frac{X_{0,t}}{X_{0,c}} = \frac{K_T \cdot (1 + E_X)^{-C_{T,t}}}{K_T \cdot (1 + E_X)^{-C_{T,c}}} = (1 + E_X)^{-\Delta C_T} \quad (3.11)$$

donde $\Delta C'_T = C_{T,t} - C_{T,c}$ es la diferencia de los valores C_T obtenido en la qPCR de la muestra tratada y control.

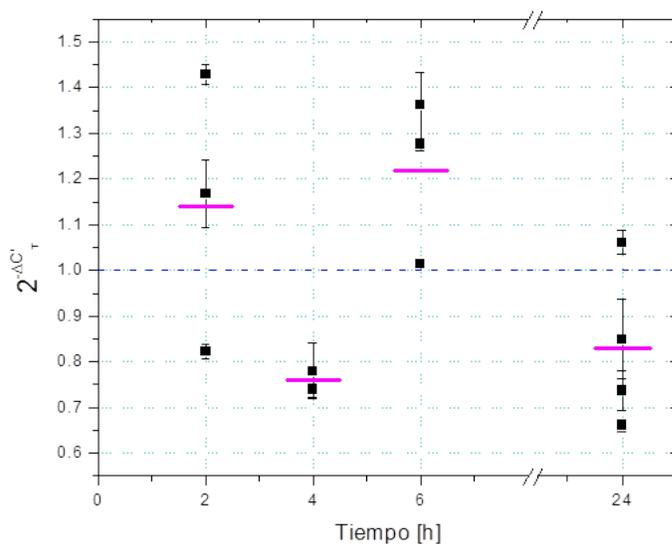
Para qPCR propiamente optimizadas, E_X es cercana a uno y entonces podemos simplificar la expresión anterior como

$$X_N = 2^{-\Delta C'_T} \quad (3.12)$$

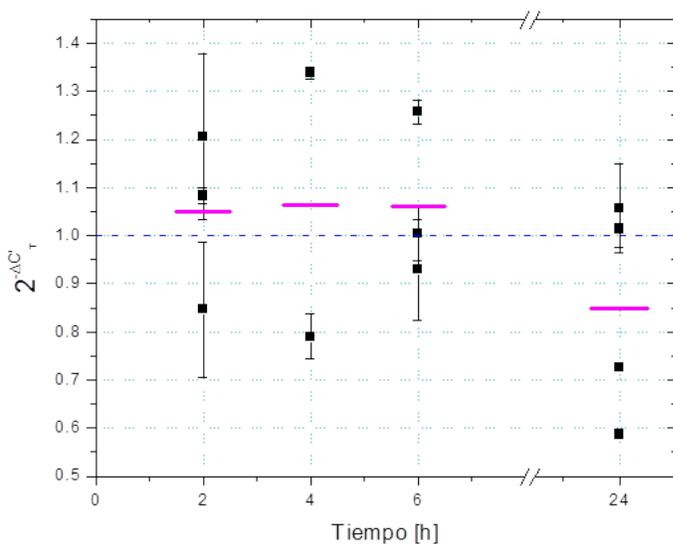
En caso de que la expresión de DNA blanco no se vea afectado por el tratamiento experimental, los valores $C_{T,t}$ y $C_{T,c}$ serían idealmente iguales y, entonces, $2^{-\Delta C'_T}$ igual a 1.

El curso temporal de $2^{-\Delta C'_T}$ para GAPDH y β -Actina se presentan en las Figuras 3.13 - 3.16. A estos valores se les aplicó la prueba estadística de Kolmogórov-Smornov (prueba de normalidad, ver sección 3.5.4). Los resultados obtenidos se incluyen en el Apéndice H, Tabla H.1. Todos los casos tuvieron una $p > 0.05$, entonces se puede considerar que provienen de una población con distribución normal y, por lo tanto, están completamente caracterizados por su media y desviación estándar, y pueden ser analizados por éstos. En las muestras de hígado no se evaluaron estos genes y en riñón sólo se hizo para β -Actina ya que en los primeros órganos analizados se observó gran variabilidad en la expresión, i.e., la expresión génica de GAPDH y β -Actina no fue estable ante el tratamiento. Por ejemplo, la media \pm desv. estándar de $2^{-\Delta C'_T}$ de GAPDH en cerebro fue 1.14 ± 0.30 , 0.76 ± 0.03 , 1.22 ± 0.18 y 0.83 ± 0.17 , para 2, 4, 6 y 24 h, respectivamente (ver Tabla H.1). Esto es una variabilidad de hasta -24% (caso de 4 h). La media \pm desv. estándar de $2^{-\Delta C'_T}$ de β -Actina en corazón fue 0.76 ± 0.21 , 0.95 ± 0.24 , 1.03 ± 0.09 y 1.18 ± 0.79 , para 2, 4, 6 y 24 h, respectivamente, varian-

do -24% a las 2 h. Por lo tanto, estos genes no se consideraron controles endógenos y la cuantificación de la expresión génica de las proteínas de interés no se calculó en relación a éstos, se tuvo que recurrir al cálculo absoluto de copias de cDNA.

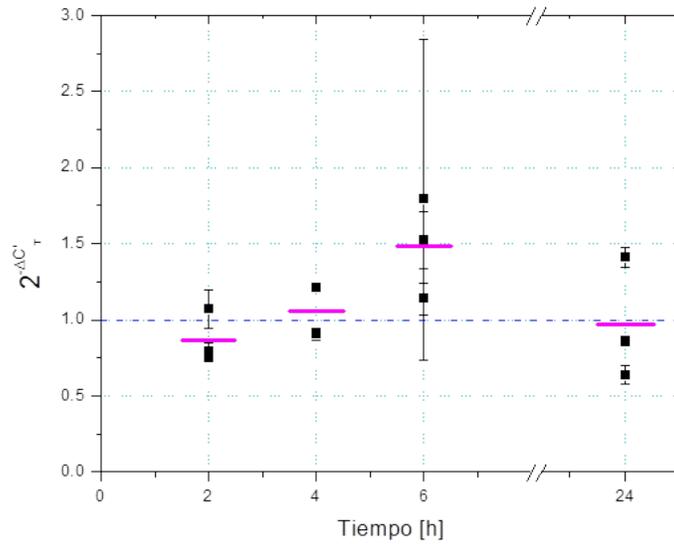


(a) GAPDH.

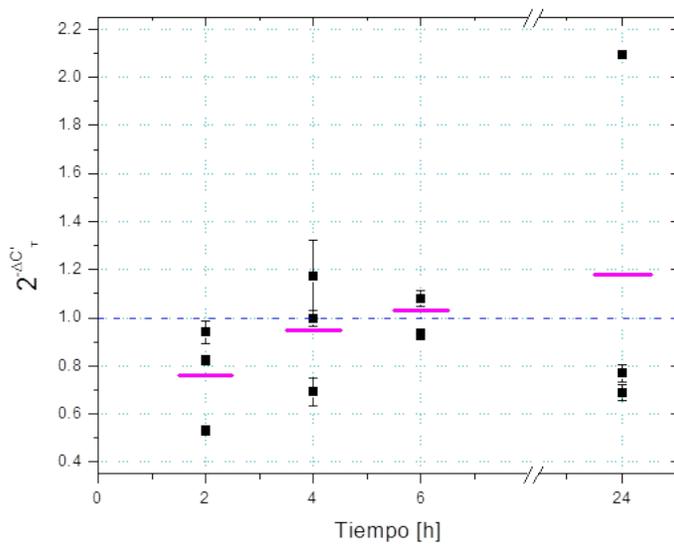


(b) β -Actina

Figura 3.13. Curso temporal del cambio (método $\Delta C'_T$) en la expresión de mRNA de genes propuestos como control endógeno ante irradiación, en **cerebro**. Se resalta con una línea horizontal de guiones el valor $2^{-\Delta C'_T} = 1$. Los símbolos corresponden al valor $2^{-\Delta C'_T}$ y la barra vertical en éstos, a la desviación estándar de las dos réplicas técnicas. La barra horizontal (magenta) corresponde a la media de los $2^{-\Delta C'_T}$ por hora.

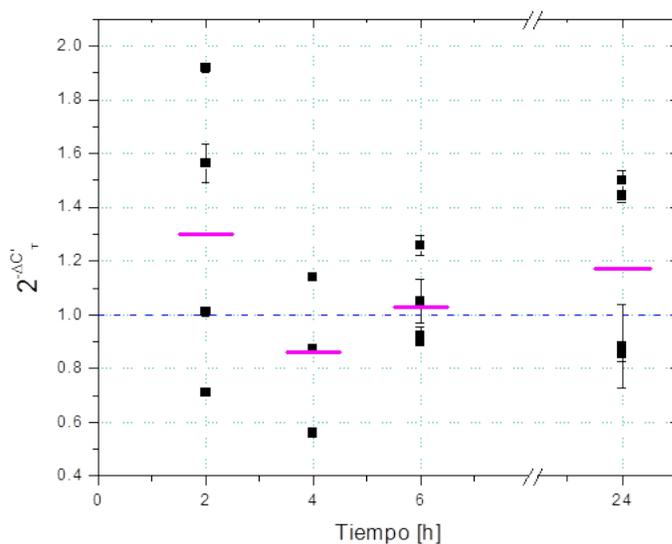


(a) GAPDH.

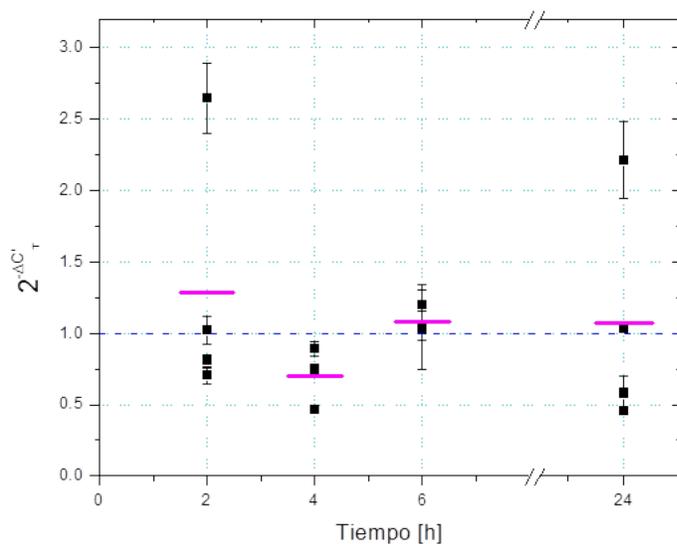


(b) β -Actina

Figura 3.14. Curso temporal del cambio (método $\Delta C'_T$) en la expresión de mRNA de genes propuestos como control endógeno ante irradiación, en **corazón**. Se resalta con una línea horizontal de guiones el valor $2^{-\Delta C'_T} = 1$. Los símbolos corresponden al valor $2^{-\Delta C'_T}$ y la barra vertical en éstos, a la desviación estándar de las dos réplicas técnicas. La barra horizontal (magenta) corresponde a la media de los $2^{-\Delta C'_T}$ por hora.



(a) GAPDH.



(b) β -Actina

Figura 3.15. Curso temporal del cambio (método $\Delta C'_T$) en la expresión de mRNA de genes propuestos como control endógeno ante irradiación, en **pulmón**. Se resalta con una línea horizontal de guiones el valor $2^{-\Delta C'_T} = 1$. Los símbolos corresponden al valor $2^{-\Delta C'_T}$ y la barra vertical en éstos, a la desviación estándar de las dos réplicas técnicas. La barra horizontal (magenta) corresponde a la media de los $2^{-\Delta C'_T}$ por hora.

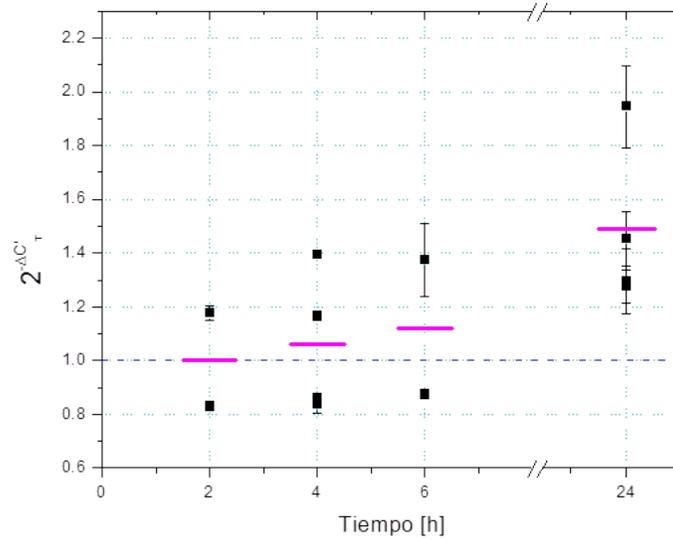


Figura 3.16. Curso temporal del cambio (método $\Delta C'_T$) en la expresión de mRNA de β -Actina propuesta como control endógeno ante irradiación, en riñón. Se resalta con una línea horizontal de guiones el valor $2^{-\Delta C'_T} = 1$. Los símbolos corresponden al valor $2^{-\Delta C'_T}$ y la barra vertical en éstos, a la desviación estándar de las dos réplicas técnicas. La barra horizontal (magenta) corresponde a la media de los $2^{-\Delta C'_T}$ por hora.

Número de copias de cDNA

Se calculó el número de copias de cDNA de los mRNA de Nrf2, Trx1 y NGE, en las muestras de irradiados y controles según la ecuación[41]:

$$DNA(copias) = \frac{6.02 \times 10^{23} (copias/mol) \times cantidad\ de\ DNA\ (g)}{longitud\ de\ DNA\ (pb) \times 660(g/mol/pb)} \quad (3.13)$$

donde la cantidad de DNA en g se obtuvo de la curva estándar, la longitud de DNA corresponde al tamaño del segmento de DNA amplificado (DNA blanco) en par de bases (pb) y 660 es el peso en Da de los nucleótidos por pb.

3.5.4. Tratamiento estadístico

Para determinar si la irradiación aumentó los niveles de mRNA de Nrf2, Trx1 y NGF en cada caso (proteína antioxidante, órgano y tiempo post-irradiación), se comparó el número de copias de cDNA obtenidas en las muestras de ratones irradiados vs ratones controles, aplicando la prueba t de Student cuando las muestras tuvieron varianzas iguales (determinado por la prueba de Levene) o la prueba t' (método Welch) cuando no, usando el software SPSS V 20 (IBM®, EUA). Estas pruebas comparan las medias de dos grupos independientes y según resulte el valor de significancia (α) se decide si las medias son diferentes o no.

Los supuestos de la **prueba t de Student** para dos muestras independientes que deben cumplirse y, por lo tanto, para que los resultados obtenidos sean válidos, son los siguientes:

1. Las observaciones de la muestra A son independientes de las de B.
2. Las observaciones deben ser extraídas de poblaciones normalmente distribuidas⁷ (supuesto de normalidad).
3. Las varianzas poblacionales, desconocidas, son iguales.
4. El nivel de medición de la variable a contrastar es métrica, es decir, la escala debe ser de intervalo o razón.

⁷La distribución normal es la distribución de una variable aleatoria x que tiene la forma: $f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-1/2|(x-\mu)/\sigma|^2}$, donde μ es la media y σ es la desviación estándar de la distribución. Conocida por su forma de campana.

La hipótesis nula H_0 que se somete a prueba es: Las medias de ambas muestras son iguales. Y la hipótesis alternativa H_1 es: Las medias de las muestras son diferentes.

Según lo anterior, podemos plantear lo siguiente para nuestro caso:

- Dos muestras independientes (grupos): Irradiados y controles.
- Variable a contrastar (datos): Número de copias de cDNA.
- Casos: 5 Órgano, 4 genes, 4 tiempos post-irradiación.

Hipótesis:

- H_0 : Las medias de los datos del número de copias de cDNA, según el caso, de ratones irradiados vs ratones controles, son iguales.
- H_1 : La media de los datos del número de copias de cDNA de ratones irradiados es mayor que la media de los ratones control, según el caso (hipótesis unidireccional).

Decisión:

Si el valor de significancia unilateral obtenido en la prueba t (o t') es $>\alpha = 0.05$, entonces aceptamos la H_0 y concluimos que los niveles de mRNA de los irradiados no tuvieron un aumento estadísticamente significativo. De otra manera, si la significancia unilateral es $<\alpha = 0.05$ entonces aceptamos la H_1 y concluimos que los niveles de mRNA si tuvieron un aumento significativo estadísticamente.

Verificación de supuestos:

Dado que los individuos del grupo irradiados son distintos de los del grupo control y su

asignación, previo al tratamiento, completamente aleatoria, entonces se cumple el supuesto de independencia y aleatoriedad de los datos.

Para verificar el supuesto de normalidad, se aplicó la **prueba de Kolmogórov-Smirnov de una muestra**⁸ a los datos del número de copias de cDNA de ratones irradiados y controles, en cada caso. Esta prueba está interesada en el grado de acuerdo entre la distribución de un conjunto de valores muestrales (observaciones puntuales (datos)) y alguna distribución teórica específica (en este caso, normal). Esta prueba permite determinar si las puntuaciones en una muestra pueden razonablemente provenir de una población que tiene la distribución teórica[42]. Si el valor p resultante en esta prueba es >0.05 , entonces se acepta el supuesto de normalidad (H_0 de esta prueba). Si $p < 0.05$, entonces no se puede suponer que los datos provienen de poblaciones normales (H_1 de esta prueba).

Una vez confirmada la normalidad de los datos, debemos demostrar que las varianzas muestrales⁹ de los grupos son iguales. Esto lo permite la **prueba de Levene**, y el supuesto para su validez es también el de normalidad. Entonces, se acepta el supuesto de varianzas iguales si el valor de p de la prueba de Levene es >0.05 (se acepta la H_0 de esta prueba). Si es <0.05 , entonces suponemos varianzas distintas (H_1 de esta prueba).

En el caso de no satisfacer el supuesto de igualdad de las varianzas, Welch (1947) verificó que las distribuciones pueden aproximarse a una t de Student reajustando las ecuaciones

⁸Con muestras pequeñas, esta prueba es exacta, mientras que la prueba de la bondad de ajuste ji cuadrada es sólo aproximadamente (asintóticamente) exacta. En tales casos, la preferencia debe darse a la prueba de Kolmogoróv-Smirnov[42].

⁹Una vez satisfecho el supuesto de normalidad, esto es, que las mediciones provienen de una población que tiene una distribución normal, entonces la varianza y media muestrales, σ_0^2 y μ_0 respectivamente, tienden a la varianza y media poblacionales, σ^2 y μ respectivamente. Y entonces el supuesto No.3 se puede satisfacer o no, sometiendo a prueba la igualdad de las varianzas muestrales.

para determinar los grados de libertad dependientes de las varianzas muestrales (**método de Welch, t'**) (esas ecuaciones no se presentan aquí). El software SPSS realiza automáticamente la prueba Levene una vez que se le ha indicado que aplique la prueba t , y muestra los resultados de t y t' . Entonces se toma el resultado de t o t' según el resultado de Levene. Por defecto, el valor de significancia mostrado en los resultados de la prueba t o t' en el software SPSS corresponden al bidireccional. Por lo que si se desea el unidireccional, éste se obtiene al dividir por dos el valor del bidireccional.

El diagrama mostrado en la Figura 3.17, resume las decisiones tomadas con el fin de cumplir los supuestos de cada prueba estadística aplicadas a los datos de número de copias de cDNA, con el fin de llegar a responder la pregunta en cuestión: ¿La irradiación aumenta los niveles de mRNA de los genes de interés, en los órganos estudiados, a los tiempos post-irradiación manejados?. La opción de aplicar la **prueba de Kolmogórov-Smirnov para dos muestras**¹⁰ no fue utilizada, ya que en todos los casos los datos cumplieron con el supuesto de normalidad. Sin embargo, ésta fue la opción a considerar en caso de que no fuera así.

¹⁰Su prueba unidireccional se utiliza para decidir si los datos en la población de donde fue extraído una de las muestras, son estocásticamente mayores que los valores de la población de donde se extrajo la otra muestra, es decir, para probar la predicción de que las puntuaciones de un grupo experimental serán mayores que los correspondientes a un grupo control [42].

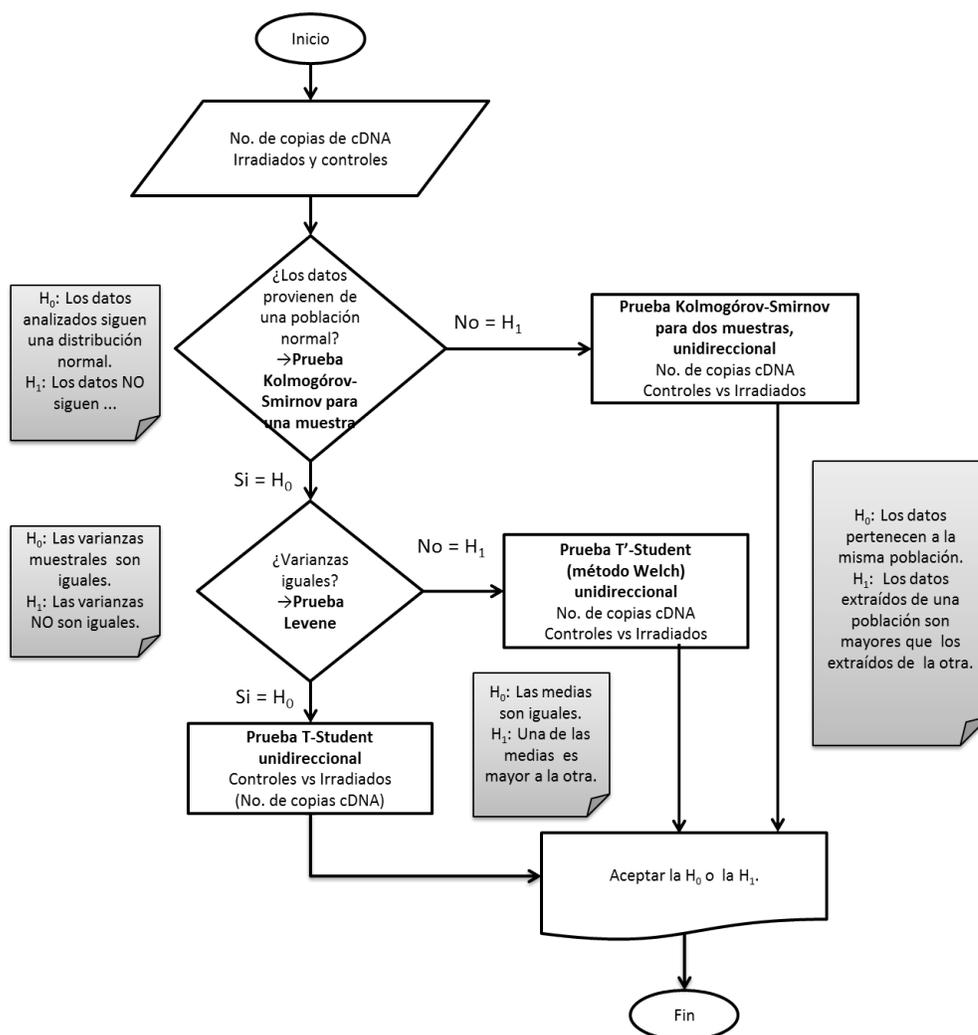


Figura 3.17. Diagrama de decisiones según los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas a los datos de número de copias de cDNA, para determinar si los niveles de mRNA de los genes de interés en cada caso, tuvieron un aumento significativo estadísticamente.

RESULTADOS

4.1. Expresión génica de Nrf2, Trx1 y NGF.

Al aplicar la prueba estadística de Kolmogórov-Smirnov al número de copias de cDNA obtenido para cada secuencia de mRNA (de Nrf2, Trx1 y NGF), se encontró que todos los casos provienen de una distribución normal y, entonces pueden ser analizados por su media y desviación típica. En el Apéndice H, las Tablas H.2-H.6 presentan dichos resultados. Los resultados de las pruebas estadísticas de Levene y t o t' de Student aplicada al número de copias de cDNA de irradiados y controles se incluyen en el Apéndice H, Tablas H.7-H.11. En el Apéndice I se encuentra el curso temporal del número de copias de cDNA de ambos grupos de ratones según el órgano, y de manera resumida la Tabla 4.1 indica si la expresión génica fue inducida (↑) o suprimida (↓). Los casos que tuvieron significancia estadística en la prueba t o t' de Student se marcan con asteriscos: * para $p < \alpha = 0.05$ o ** para $p < \alpha = 0.01$. A pesar de que se observaba una tendencia a la inducción, sólo se tuvieron cuatro casos donde fue estadísticamente significativa: Trx1 en cerebro a las 6 h post-irradiación ($p=0.0085$), Nrf2 en hígado a las 2 h y 24 h ($p=0.002$ y $p=0.012$, respecti-

vamente), y NGF en riñón a las 2 h ($p=0.0435$). Se tuvo un caso donde la supresión de la expresión génica fue estadísticamente significativa, esto es, la disminución del número de copias del grupo tratado fue significativa: Trx1 a las 24 h post-irradiación ($p=0.0495$).

Tabla 4.1. Curso temporal de la expresión génica de proteínas antioxidantes.

Órgano (Dosis promedio)	P. Antioxidante	Tiempo post-irradiación			
		2 h	4 h	6 h	24 h
CEREBRO (0.425±0.001 Gy)	Nrf2	↑	↓	↑	↓
	Trx1	↑	↑	↑**	↓*
	NGF	↑	↓	↓	↓
CORAZÓN (0.485±0.001 Gy)	Nrf2	↑	=	↑	↓
	Trx1	↓	↓	↓	↓
	NGF	↓	↑	↑	↓
PULMÓN (0.482±0.001 Gy)	Nrf2	↑	↓	↓	↓
	Trx1	↓	↓	↑	↑
	NGF	↓	↑	=	↑
HÍGADO (0.500±0.000 Gy)	Nrf2	↑**	↑	↓	↑*
	Trx1	↑	↑	=	↑
	NGF	↑	↑	↓	↓
RIÑÓN (0.409±0.001 Gy)	Nrf2	↑	↑	↓	↑
	Trx1	↑	=	↓	↓
	NGF	↑*	↑	↑	↑

*Se indica * para $p < \alpha = 0.05$ o ** para $p < \alpha = 0.01$ en la prueba estadística t o t' de Student (ver Apéndice H).*

4.2. Radiosensibilidad y cantidad de mRNA en los órganos

Con el fin de observar la cantidad de copias de cDNA de cada uno de los mRNA estudiados según la radiosensibilidad del órgano, se graficó el número de copias de cDNA (media±desv. estándar) sólo de los ratones controles, en función de la radiosensibilidad del órgano. Las Figuras 4.1-4.3 presentan estas gráficas. En Nrf2 a las 24 h transcurridas (Fig. 4.1), se observa que la cantidad de copias de cDNA en los órganos menos radiosensibles (por ej. cerebro) es mayor y disminuye conforme el órgano es más radiosensible (por ej. riñón), excepto para el pulmón. En los otros casos, Trx1 y NGF (Figs. 4.2 y 4.3, respecti-

vamente), no se observa en el tiempo una relación similar entre la cantidad de copias y la radiosensibilidad del órgano.

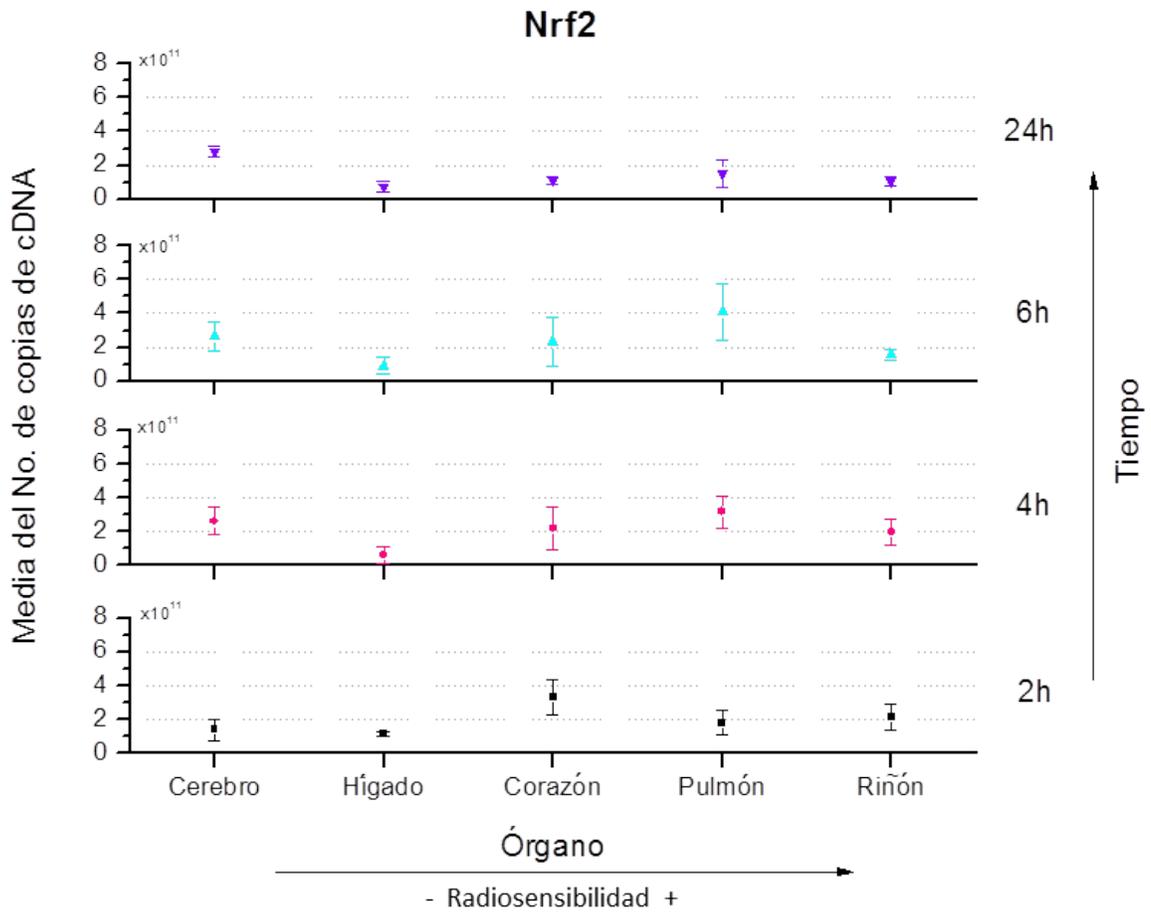


Figura 4.1. Número de copias de cDNA del mRNA de Nrf2 en los diferentes órganos (ordenados de menor a mayor radiosensibilidad) de los ratones control, a las diferentes horas post-manipulación. El símbolo corresponde al valor de la media y la barra en éstos a la desviación estándar.

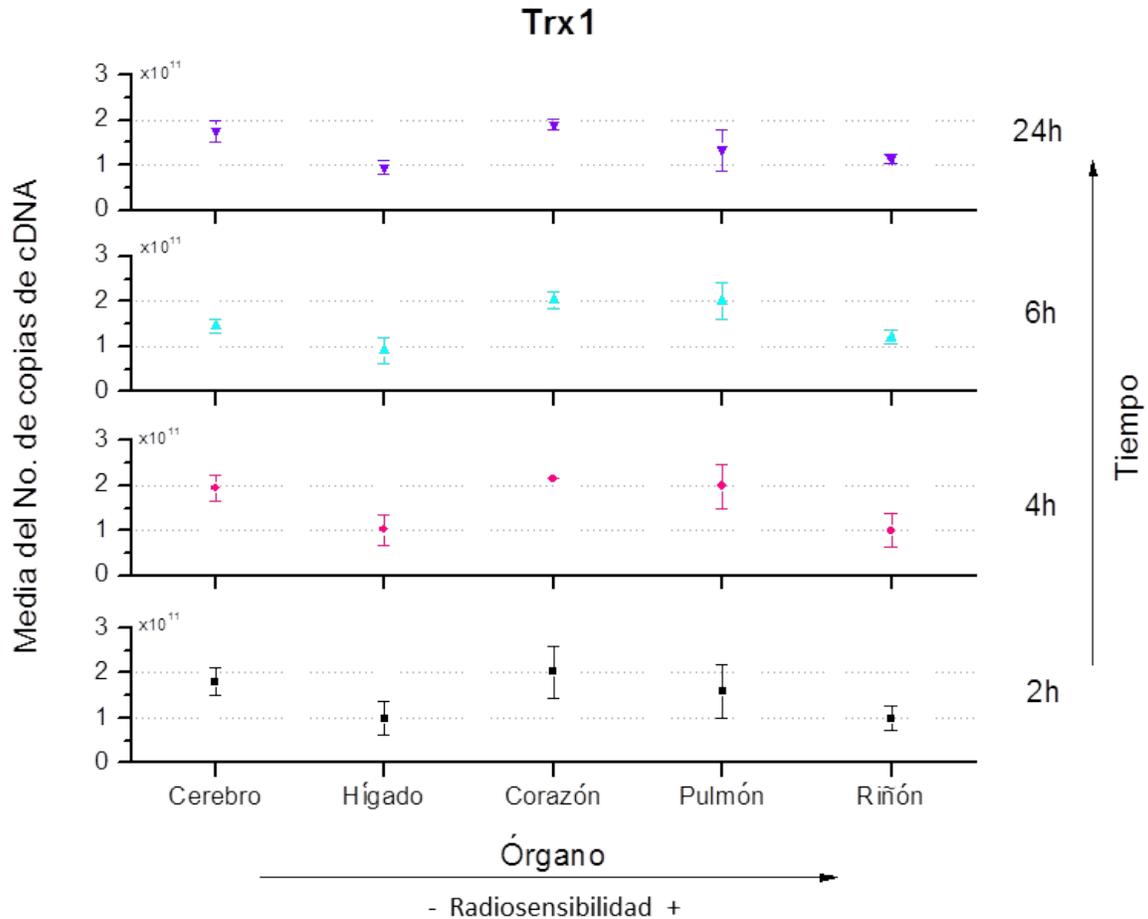


Figura 4.2. Número de copias de cDNA del mRNA de Trx1 en los diferentes órganos (ordenados de menor a mayor radiosensibilidad) de los ratones control, a las diferentes horas post-manipulación. El símbolo corresponde al valor de la media y la barra en éstos a la desviación estándar.

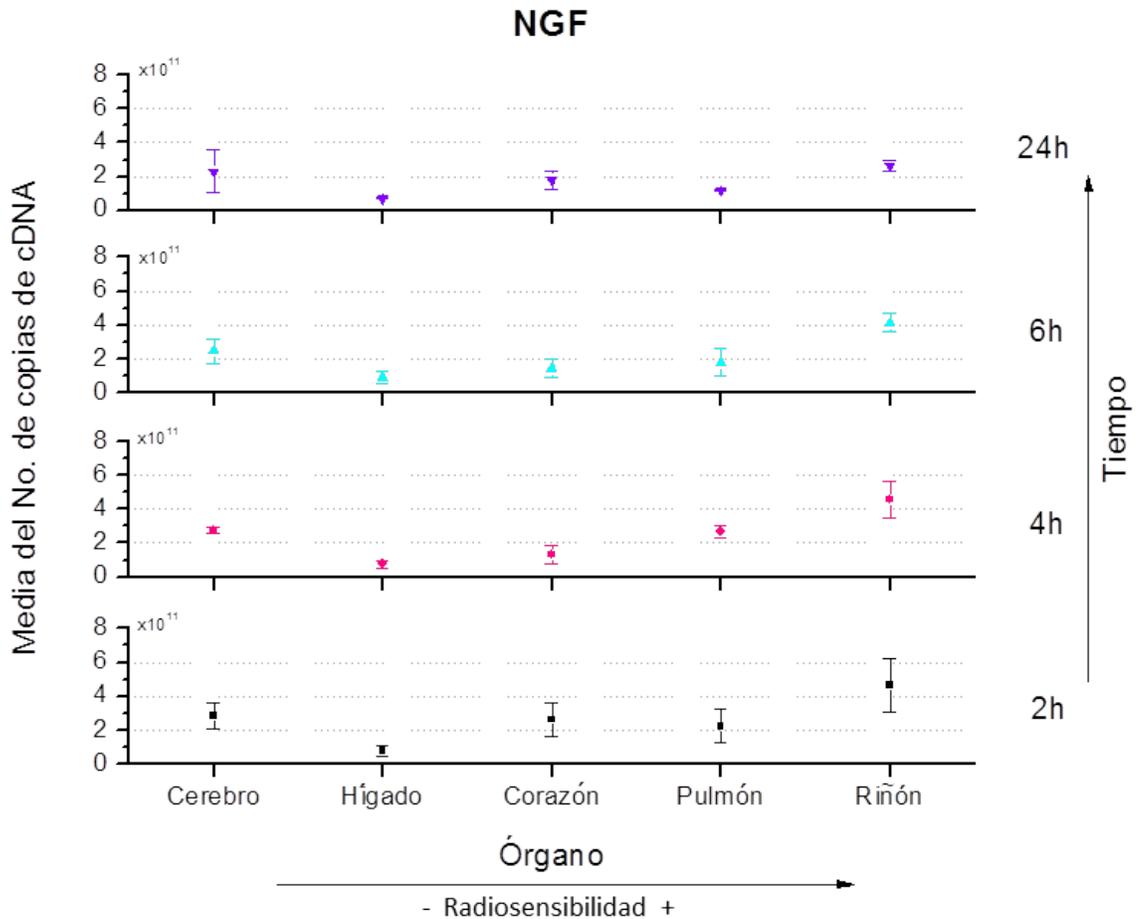


Figura 4.3. Número de copias de cDNA del mRNA de NGF en los diferentes órganos (ordenados de menor a mayor radiosensibilidad) de los ratones control, a las diferentes horas post-manipulación. El símbolo corresponde al valor de la media y la barra en éstos a la desviación estándar.

DISCUSIÓN

Con el fin de caracterizar mejor la expresión génica de las proteínas antioxidantes de nuestro interés según la dosis que recibió cada órgano, se estimó la dosis absorbida promedio por órgano. Los valores encontrados de dosis resultaron cercanos. Esto es debido a que el tamaño corporal de los ratones Balb/C es pequeño (aproximadamente 10 mm de profundidad, ver Apéndice B), y por lo tanto, la absorción de dosis en profundidad entre un órgano y otro es similar.

La observación de una gran variabilidad en los niveles de mRNA de genes propuestos como controles endógenos, β -Actina y GAPDH, ante nuestro tratamiento (exposición a rayos-X a una dosis <0.50 Gy), no permitió la cuantificación relativa de la expresión génica de las proteínas antioxidantes Nrf2, Trx1 y NGE. Por ejemplo, un cambio de -0.24 (valor de la media de $2^{-\Delta C'_T}=0.76$) se observó en la expresión génica de GAPDH y β -Actina, en cerebro a las 4 h y en corazón a las 2 h post-irradiación, respectivamente. La variación de la expresión génica de estas proteínas ya ha sido observada antes. Por ejemplo, GAPDH no se observó estable en la comparación de células mononucleares de sangre periférica y sangre

completa de individuos sanos y aquellos como tuberculosis[43]. Incluso entre distintos tejidos de un mismo individuo, se ha observado que GAPDH presenta variabilidad[44]. Algo similar a lo que observamos aquí, tanto para GAPDH como para β -Actina, en los distintos órganos y en el tiempo. Por otro lado, Banda et al.[38] observan variaciones al irradiar con rayos-X a diferentes dosis (<0.4 Gy), una línea celular de linfocitos humanos y una línea celular de células T con leucemia (Jurkat), sin embargo concluyen que las variaciones de los niveles de mRNA de GAPDH y β -Actina en dichas líneas celulares ante su tratamiento, no fueron estadísticamente significativas.

Los resultados de la cuantificación absoluta de la expresión génica de las proteínas antioxidantes en nuestro modelo experimental mostraron ser inducidas por la exposición a rayos-X, aunque no siempre fue así. Uno de los casos (Trx1 en cerebro a las 24 h post-irradiación) se vio significativamente suprimida, precedida de una alta inducción (a las 6 h). Esto puede entenderse de la siguiente manera: 6 h posteriores a la irradiación fue necesaria una gran transcripción de Trx1 (con el fin de neutralizar el estrés oxidante causado por las ERO generadas) lo que llevó a una gran abundancia de su mRNA en la célula, y tiempo después fue necesario parar su transcripción (supresión de transcripción). Entonces, es así como observamos a las 24 h una supresión significativa.

El factor de transcripción estudiado, Nrf2, se vio inducido en todos los órganos estudiados en la primera hora post-irradiación (2 h), siendo estadísticamente significativo en hígado (tómese en cuenta que fue el órgano que más dosis recibió). Como se comentó al comienzo de este trabajo, se sabe que Nrf2 es un factor de transcripción para Trx1 y NGF,

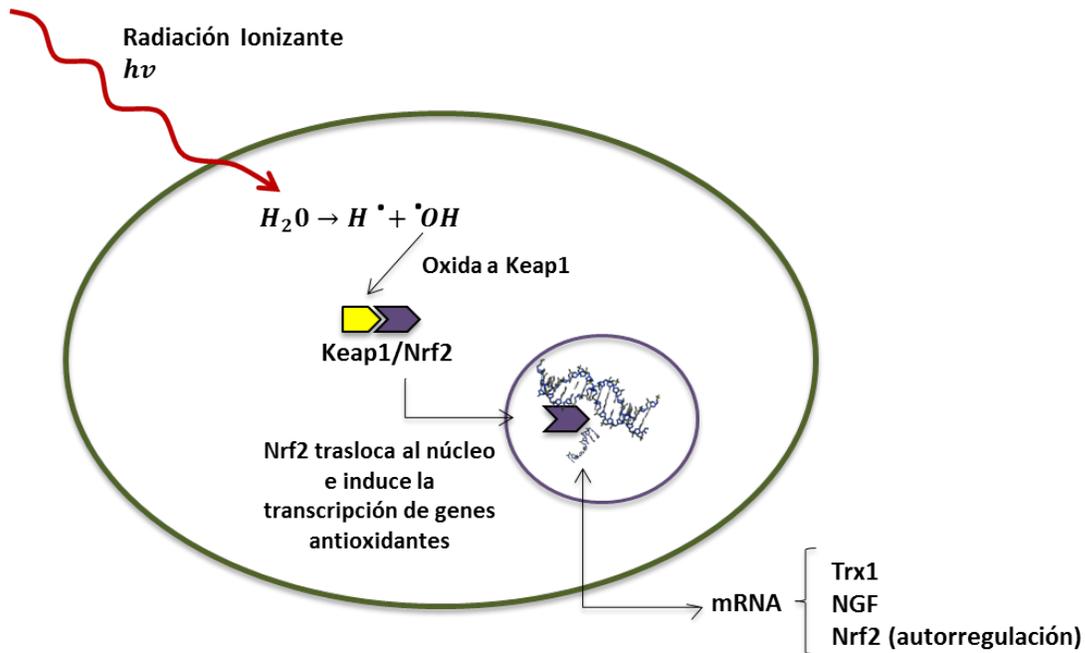


Figura 5.1. Diagrama para ilustrar el mecanismo de acción de la vía de Keap1/Nrf2 para combatir el estrés oxidante causado por la exposición a radiación ionizante. La radiación ioniza moléculas de agua del microambiente celular produciendo el radical hidroxilo, quien oxida a Keap1 del complejo Keap1/Nrf2. Ésto libera a Nrf2, quien trasloca al núcleo para inducir la transcripción (mRNA) de proteínas antioxidantes como Trx1, NGF y ella misma (autorregulación).

entre otras proteínas antioxidantes. Si se observa un incremento en su expresión génica (de Nrf2), entonces se podría esperar también un aumento en la expresión génica de estas proteínas antioxidantes (Trx1 y NGF), como lo muestra el mecanismo propuesto en la Figura 5.1. Ésto se observó en cerebro, hígado y riñón, pero no para corazón y pulmón. Lo anterior puede deberse a que la ruta para neutralizar las ERO seguida por las células de estos órganos es otra, y no predominantemente la de Nrf2. Otra posibilidad más es que, la cantidad de Trx1 y NGF en las primeras horas post-irradiación es suficiente para combatir el estrés oxidante causado y que se agotan a las horas que encontramos un aumento estadísticamente significativo (6 h para Trx1 en cerebro y 2 h para NGF en riñón), enviando la

señal biológica para su síntesis *de novo* (i.e., su transcripción). Si fuera lo anterior, dichas horas post-irradiación indicarían el tiempo que tarda el tejido en reparar el daño causado por la dosis de rayos-X.

Según lo observado en el análisis de la cantidad de copias de cDNA de los mRNA de las proteínas antioxidantes en órganos de ratones no irradiados (controles), particularmente en el caso de Nrf2 a las 24 h transcurridas, se puede sugerir que existe una relación entre la cantidad presente de su mRNA y la radiosensibilidad de los órganos estudiados: A mayor cantidad de mRNA de Nrf2, el órgano es menos radiosensible y conforme la cantidad disminuye, el órgano es más radiosensible, siendo el pulmón una excepción a esto. Dicha excepción puede deberse a procesos evolutivos de adaptación ante la gran cantidad de O₂ al que los pulmones se han visto expuestos. Se puede entender que dicha relación entre cantidad de mRNA y radiosensibilidad del órgano se da para Nrf2, ya que es el factor de transcripción de muchas proteínas antioxidantes; y que no necesariamente se da para Trx1 y NGE, quienes se encuentran cascada a bajo de Nrf2.

Lo realizado para el NGF en este estudio es de destacar ya que su inducción por RI no ha sido ampliamente caracterizada. Esta neurotropina se induce por agentes que consumen el antioxidante glutatión o que inhiben su síntesis o por actividades que promueven el estrés oxidante como el ejercicio físico.

CONCLUSIONES

Ante el tratamiento de exposición a cuerpo entero a rayos-X a una dosis <0.50 Gy, los niveles de mRNA de GAPDH y β -Actina comúnmente sugeridos como controles endógenos, no se observaron estables en el tiempo ni entre los diferentes órganos.

Los resultados obtenidos en nuestro modelo indican una inducción temprana de la expresión génica del factor de transcripción Nrf2, en órganos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y riñón, ante el daño causado por una baja dosis (<0.50 Gy) de radiación ionizante (rayos-X). Sin embargo, sólo en el hígado se observó una inducción estadísticamente significativa (órgano que más dosis recibió en nuestra irradiación a cuerpo entero). 2 h posteriores a la irradiación observamos que la inducción de la transcripción de este factor coincide con la también inducción de la transcripción de Trx1 y NGF, quienes se encuentran cascada a bajo de este factor, en cerebro, hígado y riñón.

Una inducción de la transcripción de Trx1 y NGF estadísticamente significativa, se dio en diferentes tiempos post-irradiación en los distintos órganos estudiados. Lo que podría indicar el tiempo en que se agotan las reservas de estas proteínas antioxidantes ante la

reparación del daño causado por la RI (6 h para Trx1 en cerebro y 2 h para NGF en riñón).

También observamos que en el caso de Trx1 en cerebro, una alta transcripción es horas después seguida por una supresión significativa, sugiriendo una acumulación de su mRNA en el citoplasma.

Observamos en ratones no irradiados y 24 h posteriores a su manipulación que, la cantidad de mRNA de Nrf2 es inversamente proporcional a la radiosensibilidad de los órganos estudiados, siendo el pulmón una excepción, probablemente por una cuestión de adaptación evolutiva ante el gran estrés oxidante al que siempre se ha visto expuesto dicho órgano, siendo necesaria una gran cantidad de este factor de transcripción aunque el órgano sea radiosensible. No se observó una relación similar para las otras proteínas antioxidantes estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D. J. Dowsett, P. A. Kenny, and R. E. Johnston, “Radiation Protection: Radiobiology and risk estimation,” in *Physics of Diagnostic Imaging*, ch. 21, pp. 526–542, Taylor and Francis Group, 2 ed., 2006.
- [2] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, *Sources, effects and risks of ionizing radiation*. 1988.
- [3] D. J. Brenner, R. Doll, D. T. Goodhead, E. J. Hall, C. E. Land, J. B. Little, J. H. Lubin, D. L. Preston, R. J. Preston, J. S. Puskin, E. Ron, R. K. Sachs, J. M. Samet, R. B. Setlow, and M. Zaider, “Cancer risk attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, pp. 13761–13766, 2003.
- [4] K. Becker, “Evaluation of the Linear-Nonthreshold Dose-Response Model for Ionizing Radiation,” *Health Physics*, vol. 82, no. 2, pp. 257–258, 2002.
- [5] R. Hirayama, A. Ito, M. Noguchi, Y. Matsumoto, A. Uzawa, G. Kobashi, R. Okayasu, and Y. Furusawa, “OH radicals from the indirect actions of X-rays induce cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect.,” *Radiation research*, vol. 180, no. 5, pp. 514–23, 2013.

- [6] B. Halliwell and J. M. C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, 3era. ed., 1999.
- [7] H. K. Bryan, A. Olayanju, C. E. Goldring, and B. K. Park, “The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 85, no. 6, pp. 705–717, 2013.
- [8] L. A. Albarrán Ponce, “Tesis de licenciatura: Modulación de la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) por radiación ionizante en diferentes tejidos de ratón,” 2014.
- [9] U. D. E. Lleida, “LAS GLUTAREDOXINAS MONOTIÓLICAS COMO REGULADORAS REDOX DE PROTEÍNAS : ESTUDIOS FUNCIONALES Y EVOLUTIVOS EN *Saccharomyces cerevisiae*,” *Director*, 2005.
- [10] V. S. Kuntic, M. B. Stankovic, Z. B. Vujic, J. S. Brboric, and S. M. Uskokovic-Markovic, “Radioprotectors - the evergreen topic,” *Chemistry & biodiversity*, vol. 10, no. 10, pp. 1791–1803, 2013.
- [11] A. Miranda Vizuete, *Tesis Doctoral: EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA AUSENCIA DE TIORREDOXINA Y GLUTARREDOXINA EN Escherichia coli*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba Departamento de Genética, 1994.
- [12] J.-Y. Im, K. W. Lee, J.-M. Woo, E. Junn, and M. M. Mouradian, “DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway,” *Human Molecular Genetics*, vol. 21, pp. 3013–3024, 2012.

- [13] Y. Kim, H. Masutani, Y. Yamaguchi, and K. Itoh, "Activation of the Thioredoxin Gen by Nrf2. A Differential Regulation of the Antioxidant Responsive Element by a Switch of its Binding Factors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 18399–18406, 2001.
- [14] M. K. Fainstein, "Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo," *Revista de Educación Bioquímica*, vol. 26, pp. 18–25, 2007.
- [15] B. Lu, P. T. Pang, and N. H. Woo, "The yin and yang of neurotrophin action.," *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 6, no. 8, pp. 603–614, 2005.
- [16] G. R. Lewin and Y.-a. Barde, "Physiology of the neurotrophins," *Annual review of neuroscience*, vol. 19, pp. 289–317, 1996.
- [17] E. J. Huang and L. F. Reichardt, "Neurotrophins: roles in neuronal development and function.," *Annual review of neuroscience*, vol. 24, pp. 677–736, 2001.
- [18] C. Valdovinos-Flores and M. E. Gonsebatt, "Nerve growth factor exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic and acetaminophen," *Free Radical Research*, vol. 47, pp. 404–412, 2013.
- [19] J. Mimura, K. Kosaka, A. Maruyama, T. Satoh, N. Harada, H. Yoshida, M. Yamamoto, and K. Itoh, "Nrf2 regulates NGF mRNA induction by carnosic acid in T98G glioblastoma cells and normal human astrocytes," *The Journal of Biochemistry*, vol. 150, pp. 209–217, 2011.

- [20] K. Kosaka, J. Mimura, K. Itoh, T. Satoh, Y. Shimojo, C. Kitajama, A. Maruya, M. Yamamoto, and T. Shirasawa, "Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnosic acid in PC12h cells," *The Journal of Biochemistry*, vol. 147, pp. 73–81, 2009.
- [21] Advisory Group on Ionising Radiation, *Human Radiosensitivity (RCE-21)*. 2013.
- [22] B. Emami, "Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Radiation," *Reports of Radiotherapy and Oncology*, vol. 1, no. 1, pp. 36–48, 2013.
- [23] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
- [24] B. C. Suckow MA, Danneman P, *The Laboratory Mouse*. 2001.
- [25] C. Jimenez-Beltran, "Tesis de licenciatura: Caracterización de tubo de rayos X YXLON 160E-1.5," 2015.
- [26] G. Massillon-JL, A. Cabrera-Santiago, R. Minniti, M. O'Brien, and C. G. Soares, "Influence of phantom materials on the energy dependence of LiF:Mg,Ti thermoluminescent dosimeters exposed to 20-300 kV narrow x-ray spectra, 137 Cs and 60 Co photons," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 59, no. 15, pp. 4149–4166, 2014.
- [27] G. Poludniowski, G. Landry, F. DeBlois, P. M. Evans, and F. Verhaegen, "SpekCalc: a program to calculate photon spectra from tungsten anode x-ray tubes.," *Physics in medicine and biology*, vol. 54, no. 19, pp. N433–N438, 2009.

- [28] G. G. Poludniowski, "Calculation of x-ray spectra emerging from an x-ray tube. Part II. X-ray production and filtration in x-ray targets.," *Medical physics*, vol. 34, no. 6, pp. 2175–2186, 2007.
- [29] NIST, "National Institute of Standards and Technology."
- [30] Bio-Rad, "Real-Time PCR Applications Guide," *Bio-Rad Laboratories, Inc.*, vol. Bulletin 5, pp. 56–57, 2006.
- [31] M. Ayubi, "Biomedical Genomics."
- [32] Thermo Fisher Scientific. NanoDrop Products, "T042-TECHNICAL BULLETIN. NanoDrop Spectrophotometers. Assessment of Nucleic Acid Purity," tech. rep., Wilmington, Delaware (E.U.A.).
- [33] J. Luque and A. Herráez, "Biología Molecular e Ingeniería Genética," 2006.
- [34] M. R. Miranda Fajardo, "Tesis de Maestría: Modulación de la Respuesta Antioxidante Debido a Radiación Ionizante en un Modelo Murino," 2013.
- [35] R. Rasmussen, "Quantification on the LightCycler," in *Rapid Cycle Real-Time PCR*, pp. 21–34, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001.
- [36] O. Thellin, W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, a. Igout, and E. Heinen, "Housekeeping genes as internal standards: use and limits," *Journal of Biotechnology*, vol. 75, no. 2-3, pp. 291–295, 1999.
- [37] A. Technologies, "Critical Factors for Successful Real-Time PCR," p. 64, 2011.

- [38] M. Banda, A. Bommineni, R. a. Thomas, L. S. Luckinbill, and J. D. Tucker, "Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR," *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 649, no. 1-2, pp. 126–134, 2008.
- [39] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [40] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.," *Nature protocols*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, 2008.
- [41] C. Lee, J. Kim, S. G. Shin, and S. Hwang, "Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli," *Journal of Biotechnology*, vol. 123, pp. 273–280, 2006.
- [42] S. Siegel and N. J. Castellan, *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. Trillas, 4a. ed., 1998.
- [43] K. Dheda, J. F. Huggett, S. a. Bustin, M. a. Johnson, G. Rook, and A. Zumla, "Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR," *BioTechniques*, vol. 37, no. 1, pp. 112–119, 2004.

- [44] R. D. Barber, D. W. Harmer, R. a. Coleman, and B. J. Clark, “GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.,” *Physiological genomics*, vol. 21, no. 3, pp. 389–395, 2005.
- [45] F. H. Attix, *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. 1986.
- [46] “International Commission on Radiation Units & Measurements, Inc.,” 2016.
- [47] International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU), “Radiation quantities and units. Report 19,” tech. rep., 7910 Woodmont Avenue Suite 400 Bethesda, MD 20841-3095 USA, 1971.
- [48] F. M. Khan, “Production of X-ray,” in *The Physics of Radiation Therapy*, ch. 3, p. 531, Lippincott Williams & Wilkins, 4 ed., 2010.
- [49] Duke University, “Carl E. Ravin Advanced Imaging Laboratories.”
- [50] K. Rengarajan, S. M. Cristol, M. Mehta, and J. M. Nickerson, “Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores.,” *Molecular vision*, vol. 8, no. September, pp. 416–421, 2002.
- [51] a. I. Dragan, R. Pavlovic, J. B. McGivney, J. R. Casas-Finet, E. S. Bishop, R. J. Strouse, M. a. Schenerman, and C. D. Geddes, “SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA,” 2012.

- [52] H. Zipper, “Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications,” *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. 12, pp. e103–e103, 2004.
- [53] I. Wikimedia Foundation, “Wikipedia.”



RADIACIÓN IONIZANTE

La RI es generalmente caracterizada por su habilidad de excitar e ionizar átomos de la materia con la que interactúa. La energía necesaria para causar que un electrón de valencia escape de un átomo es de 4-25 eV[45], la radiación que lleva energía cinética o cuántica mayor a esta es llamada “ionizante”. Por ejemplo, de la relación cuántica de la energía de la radiación electromagnética

$$E_{\gamma} = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1.2398 \text{ keV} \cdot \text{nm}}{\lambda} \quad (\text{A.1})$$

donde $h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J s} = 4.136 \times 10^{-18} \text{ keV} \cdot \text{s}$, es la constante de Planck y $c = 2.998 \times 10^{17} \text{ nm/s}$, es la velocidad de la luz en el vacío; la RI incluiría a la radiación electromagnética con longitud de onda desde 320 nm, lo cual incluye la mayoría de la banda de radiación ultravioleta (~10-400 nm). Sin embargo, por su poca penetrabilidad en la materia comparada con otro tipo de radiación que es más penetrante, este tipo de radiación no se considera en el estudio de la RI (física radiológica). Los tipos de RI que pueden ser considerados se describen en la tabla A.1.

La Comisión Internacional de Unidades Radiológicas (ICRU[46] por sus siglas en inglés) ha recomendado cierta terminología referente a la RI, la cual enfatiza las mayores diferencias entre la interacción de radiación cargada y la no-cargada con la materia[47](revisado por [45]):

1. Radiación directamente ionizante: Partículas cargadas rápidas, las cuales liberan su energía en la materia directamente, a través de muchas pequeñas interacciones por fuerza Coloumbiana a lo largo de su trayecto.
2. Radiación indirectamente ionizante: Rayos -X o $-\gamma$ o neutrones (i.e. partículas no-cargadas), los cuales primero transfieren su energía a partículas cargadas de la materia a través de su paso en relativamente pocas pero grandes interacciones. El resultado son partículas cargadas rápidas que en su momento liberan la energía a la materia como las anteriores.

A.1. Producción de rayos-X

Los rayos-X fueron descubiertos por Roentgen en 1895 mientras estudiaba los rayos catódicos (corriente de electrones) en un tubo de descarga de gas. Observó que otro tipo de radiación fue producida (presuntamente por la interacción de los electrones con el vidrio de las paredes del tubo) y podía ser detectada fuera del tubo. Esta radiación podía penetrar sustancias opacas, producir fluorescencia, oscurecer una placa fotográfica, e ionizar un gas. Él llamó a esta nueva radiación rayos “X”. Posteriores descubrimientos históricos sobre los rayos-X permitieron entender su naturaleza y otras propiedades. Sin

Tabla A.1. Tipos de RI[45].

RI	Descripción
Rayos-γ	Radiación electromagnética emitida por un núcleo o en una reacciones de aniquilación entre materia y antimateria.
Rayos-X	Radiación electromagnética emitida por partículas cargadas (usualmente electrones) en cambios de niveles energéticos de un átomo (llamados rayos de fluorescencia o característicos) o en la desaceleración en un campo de fuerza Coulombiana (rayos-X bremsstrahlung o continuos).
Electrones rápidos	Si son de carga positiva, son llamados positrones. Si son emitidos por un núcleo son referidos como rayos- β (positivos o negativos). Si son el resultados de la colisión de una partícula cargada son referidos como rayos- δ .
Partículas cargadas pesadas	<ul style="list-style-type: none"> •Protón. Núcleo del hidrógeno. •Deuterón. Núcleo del deutrio, constituido por un protón y un neutrón unidos por la fuerza nuclear. •Tritón. Un protón y dos neutrones unidos por la fuerza nuclear. •Partículas alfa. Núcleo del helio (dos protones y dos neutrones). •Otras partículas cargadas pesadas constituidas por los núcleos de átomos más pesados, tanto despojadas por completo de sus electrones o con algunos de ellos. •Piones: Mesones π negativos producidos por la interacción de electrones o protones con núcleos blanco.
Neutrones	Partículas neutras obtenidas de reacciones nucleares (por ej. (p, n) o fisión).

embargo, su clasificación de onda electromagnética mejoró enormemente nuestro entendimiento sobre este tipo de RI.

A.1.1. Tubo de rayos-X (TRX)

Un esquema típico de un TRX es presentado en la Figura A.1. El tubo consiste en una burbuja de vidrio que ha sido evacuada a alto vacío. Una de sus terminales es un cátodo (electrodo negativo) y la otra un ánodo (electrodo positivo), pero herméticamente sellado en el tubo. El cátodo es un filamento de Tungsteno que cuando es calentado emite electrones (emisión termoiónica). El ánodo consiste en una barra de Cobre delgada en la cual en uno de sus extremos es colocada una pequeña pieza de Tungsteno como blanco.

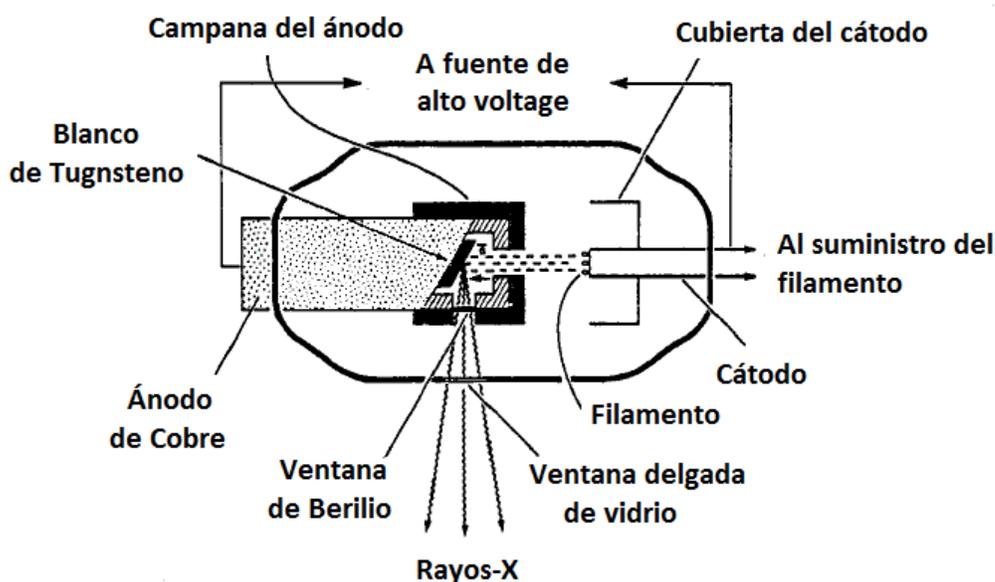


Figura A.1. Diagrama esquemático de un TRX de terapia con ánodo encapsulado. Adaptación de una de las figura de la ref. [48].

Cuando un alto voltaje es aplicado entre el ánodo y el cátodo, los electrones emitidos por el filamento son acelerados hacia el ánodo y logran conseguir altas velocidades antes de chocar con el blanco. Los rayos-X son producidos por la brusca deflexión o aceleración de los electrones causada por la fuerza de atracción de los núcleos de Tungsteno. El haz de rayos-X emerge a través de una ventana delgada de vidrio en el tubo cerrado. En algunos tubos son usadas ventanas de Berilio para reducir la inherente filtración del haz de rayos-X.

A.1.2. Física de la producción de rayos-X

Hay dos diferentes mecanismos por los cuales los rayos-X son producidos. Uno da lugar a los rayos-X bremsstrahlung y el otro a rayos-X característicos.

a) Bremsstrahlung

El proceso de bremsstrahlung es el resultado de “colisiones”(interacciones) radiativas entre un electrón a alta velocidad y un núcleo. El electrón, mientras pasa cerca de un núcleo, puede ser desviado de su camino por la acción de fuerzas Coulombianas de atracción y perder energía como bremsstrahlung. De acuerdo a la teoría de Maxwell de la radiación electromagnética, como el electrón, con su asociado campo electromagnético, pasa en la vecindad de un núcleo, éste sufre un repentino desvío y aceleración. Como resultado, una parte o toda su energía es disociada desde éste y propagada en el espacio como radiación electromagnética. La Figura A.2 ilustra el mecanismo de bremsstrahlung.

Debido a que los electrones pueden tener una o más interacciones bremsstrahlung en la materia y una interacción puede resultar en una pérdida parcial o completa de la energía del electrón, los fotones bremsstrahlung resultantes dependen de la energía de los electrones incidentes. Para electrones con energías por debajo de los 100 keV, los rayos-X son emitidos más o menos iguales, en todas direcciones. Conforme la energía cinética de los electrones es incrementada, la dirección de emisión de rayos-X se incrementa hacia adelante.

La energía energía perdida por átomo por electrón depende del cuadrado del número atómico (Z^2). Entonces la probabilidad de la producción de bremsstrahlung varía con el Z^2 del material del blanco. Sin embargo la eficiencia de la producción de rayos-X dependerá de Z y del voltaje aplicado al tubo[48]: $eficiencia = 9 \times 10^{-10} ZV$; donde V es el voltaje aplicado al tubo en volts.

b) Rayos-X Característicos

Los electrones incidentes en el blanco también producen rayos-X característicos. El mecanismo de producción es ilustrado en la Figura A.3. Un electrón con energía cinética E_0 , puede interaccionar con los átomos del blanco expulsando un electrón orbital, como un electrón K, L o M, dejando al átomo ionizado. El electrón original se alejará de la colisión con energía $E_0 - \Delta E$, donde ΔE es la energía cedida al electrón orbital. Una parte de ΔE es gastada en vencer la energía de enlace del electrón orbital y el resto es llevada por el electrón expulsado. Cuando una vacante es generada en una órbita, un electrón orbital exterior caerá para llenar la vacante. Al hacer esto, la energía extra por estar en un orbital menor, es radiada en forma de radiación electromagnética. Ésta es llamada radiación característica (i.e., característica del átomo en el blanco y de las capas entre las cuales sucede la transición). Con blancos de alto número atómico y las transiciones que involucran las capas más interiores como son K, L, M y N, la radiación característica emitida es de energía suficientemente alta para ser considerada en la parte de rayos-X del espectro electromagnético.

A diferencia de bremsstrahlung, la radiación característica es emitida a energías discretas. Si la transición involucró un electrón descendiente de la órbita L o de la K, entonces el fotón emitido tendrá energía $h\nu = E_K - E_L$, donde E_K y E_L son las energías de enlace de las capas K y L, respectivamente.

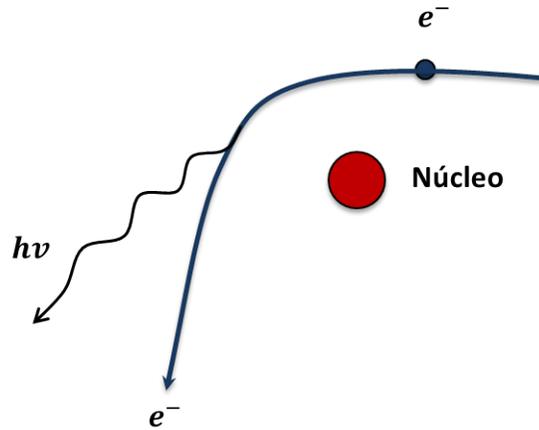


Figura A.2. Ilustración del proceso de bremsstrahlung (basada en una de las figura de la ref. [48]).

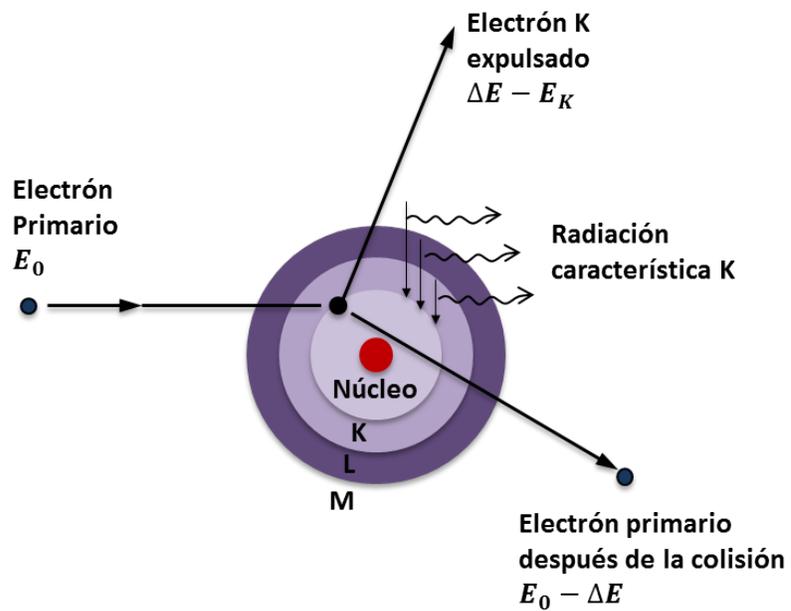


Figura A.3. Diagrama para explicar la producción de radiación característica (basado en una de las figura de la ref. [48]).

A.1.3. Espectro de energía de rayos-X

Los rayos-X producidos por una máquina son heterogéneos en energía. El espectro de energía muestra una continua distribución de energía por los fotones de bremsstrahlung superpuesta a radiación característica de energía discreta. Una distribución espectral típica es mostrada en la Figura A.4. Como se comentó anteriormente, la energía máxima posible que un fotón bremsstrahlung puede tener es igual a la energía del electrón incidente. La energía máxima en kiloelectron-volts (keV) es numéricamente igual al voltaje pico aplicado en kilovolt (kVp).

El espectro de energía sin filtrar es modificado considerablemente por los fotones que experimentan filtración inherente (absorción en el blanco, las paredes de vidrio del tubo, o la ventana delgada de Berilio). Suelen adicionarse filtros como placas externas al tubo. Debe ser notado que la filtración afecta principalmente la parte inicial de baja energía del espectro y no afecta significativamente a la distribución de fotones de alta energía. El propósito del filtrado adicional es enriquecer el haz con los fotones de energías más altas por la absorción del componente de energías más bajas del espectro. Conforme la filtración es incrementada, el haz transmitido endurece (i.e., éste consigue una energía promedio más alta y por lo tanto mayor poder de penetrabilidad). Debido a que el haz de rayos-X tiene una distribución de energías, la cual depende del voltaje como de la filtración, esto dificulta caracterizar la calidad del haz en términos de su energía, poder de penetrabilidad, o el grado de endurecimiento del haz. Una cantidad definida como capa hemirreductora (CHR) (half-value layer, HVL, en inglés), ha sido definida para describir la calidad de un

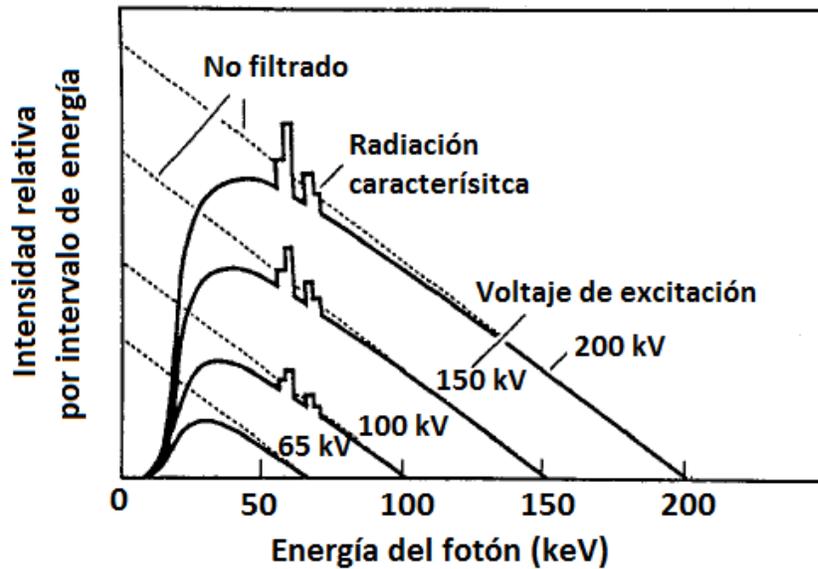


Figura A.4. Distribución espectral de rayos-X calculada para un blanco de Tungsteno delgado. Las curvas de punteadas son por no filtrado y las curvas sólidas son por una filtración de 1 mm de aluminio. Figura adaptada de una de las figuras de la ref. [48]).

haz de rayos-X.

A.1.4. Atenuación de un haz de fotones

Supongamos el arreglo experimental ilustrado en la Figura A.5 diseñado para medir la característica atenuación de un haz de fotones. Un colimado haz de fotones monoenergético incide en un absorbedor de variable grosor. Un detector es colocado a una distancia fija de la fuente y suficientemente lejos del absorbedor que sólo los fotones primarios (esos fotones que pasaron a través del absorbedor sin interactuar) son medidos por el detector. Cualquier fotón dispersado por el absorbedor se supone que no es medido en este arreglo. Entonces, si un fotón interactúa con un átomo, éste es completamente absorbido o dispersado lejos del detector. Bajo estas condiciones, la reducción en el número de fotones (dN) es proporcional a el número de fotones incidentes (N) y al grosor del ab-

sorbedor (dx):

$$dN \propto N dx \quad (\text{A.2})$$

o

$$dN = -\mu N dx \quad (\text{A.3})$$

donde μ es la constante de proporcionalidad, llamada coeficiente de atenuación. El signo menos indica que el número de fotones decrece conforme el grosor del absorbedor incrementa. La ecuación anterior puede ser escrita en términos de intensidad (I):

$$dI = -\mu I dx \quad (\text{A.4})$$

o

$$\frac{dI}{I} = -\mu dx. \quad (\text{A.5})$$

Si el grosor x es expresado como una longitud, entonces μ es llamada coeficiente de atenuación lineal. Por ejemplo, si el grosor es medido en centímetros, las unidades de μ son $1/\text{cm}$, o cm^{-1} . La ecuación diferencial A.5 es resuelta como:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (\text{A.6})$$

donde $I(x)$ es la intensidad transmitida por un grosor x e I_0 es la intensidad incidente en el absorbedor.

La **CHR** es definida como el grosor de un absorbedor requerida para atenuar la intensidad del haz a la mitad de su valor original. Esto significa que cuando $x = \text{CHR}$, $I/I_0 = 1/2$, por definición.

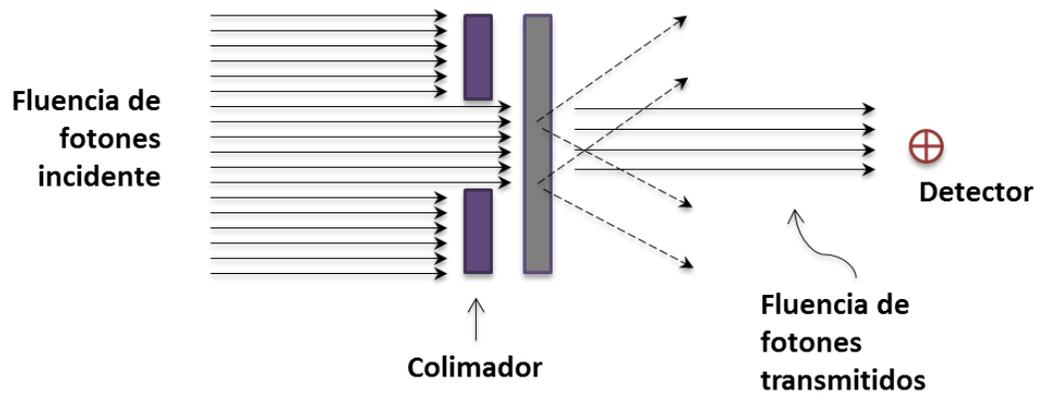


Figura A.5. Diagrama para ilustrar un arreglo experimental para estudiar la atenuación de un haz colimado a través de un absorbedor. Mediciones hechas bajo “buena geometría” (i.e., los fotones dispersados no son detectados). Figura basado en una de las figura de la ref. [48].

Como se mencionó previamente, la atenuación exponencial es estrictamente aplicada a haces monoenergéticos. El espectro de un haz de rayos-X generado, sin embargo, consta de un espectro de energías. La atenuación de tal haz ya no es completamente exponencial. Entonces, se toma en cuenta la segunda CHR que es la que reduce el haz al 50% de su intensidad después de que ha sido transmitido por su primera CHR. En general, para haces heterogéneos, la primer CHR es menor que las subsiguientes CHRs. Conforme el grosor de filtrado incrementa, la energía promedio del haz transmitido incrementa o el haz se vuelve cada vez más duro.

A.1.5. Coeficientes

a) Coeficiente de atenuación

Este coeficiente es dependiente de la energía de los fotones y de la naturaleza del material con el que interactúan. Debido a que la atenuación producida por un grosor x depende del número de electrones presentes en ese grosor, μ es dependiente de la

densidad del material. Entonces, al dividir μ por la densidad ρ , el resultante coeficiente (μ/ρ) será independiente de la densidad; μ/ρ es conocido como el coeficiente de atenuación másico. Este coeficiente de atenuación másico tiene unidades de cm^{-2}/g . El proceso de atenuación o el coeficiente de atenuación representa la fracción de fotones removidos por unidad de grosor. Los fotones que interaccionan transferirán parte de su energía al material resultando ser en parte o en su totalidad, absorbida.

b) Coeficiente de transferencia de energía

Cuando un fotón interacciona con los electrones en el material, una parte o toda su energía es convertida en energía cinética de electrones. Si sólo una parte de la energía de los fotones es dada a los electrones, el fotón mismo es dispersado con energía reducida. El fotón dispersado puede otra vez interaccionar con una parcial o completa transferencia de energía a los electrones. Entonces, un fotón puede experimentar una o múltiples interacciones en las cuales la energía perdida es convertida en energía cinética de electrones. Si consideramos un haz de fotones atravesando un material, la fracción de energía transferida del fotón en energía cinética de partículas cargadas por unidad de grosor del absorbedor es dada por el coeficiente de transferencia de energía (μ_{tr}). Este coeficiente es relacionado con μ según lo siguiente:

$$\mu_{tr} = \frac{\bar{E}_{tr}}{h\nu} \mu \quad (\text{A.7})$$

donde \bar{E}_{tr} es el promedio de la energía transferida a partículas cargadas como energía cinética por interacción. El coeficiente de transferencia de energía es dado por μ_{tr}/ρ .

c) Coeficiente de absorción de energía

La mayoría del conjunto de los electrones en movimiento por los fotones pierden su energía por colisiones inelásticas (ionización y excitación) con electrones atómicos de la materia. Unos pocos, dependiendo del número atómico de la materia, perderán energía por interacciones bremsstrahlung con el núcleo. La energía de bremsstrahlung es radiada fuera del volumen local como rayos-X y no se incluye en el cálculo de la energía absorbida localmente. El coeficiente de absorción de energía (μ_{en}) es definido como el producto del coeficiente de transferencia de energía y $(1 - g)$ donde g es la fracción de energía de partículas cargadas secundarias que es perdida por bremsstrahlung en la materia.

$$\mu_{en} = \mu_{tr}(1 - g) \quad (\text{A.8})$$

Como antes, el coeficiente de absorción de energía es dado por μ_{en}/ρ .

A manera de ejemplo, en la Tabla A.2 se presentan valores de los coeficientes $\mu(E)/\rho$ y $\mu_{en}(E)/\rho$ para tejido blando y aire, disponibles en la base de datos *X-Ray Attenuation and Absorption for Materials of Dosimetric Interest (XAAMDI)* del sitio web del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés)[29] (Tabla A.2).

A.2. Descripción de los campos de radiación (cantidades no-estocásticas)

Una **cantidad no-estocástica** puede, en principio, ser predecida por cálculos. Esta es, en general, una función puntual definida por volúmenes infinitesimales; de aquí que sea

Tabla A.2. Valores de los coeficientes másicos de absorción ($\mu_{en}(E)/\rho$) y atenuación ($\mu(E)/\rho$) para las energías de rayos-X de 15-200 keV en aire y tejido suave (ICRU-44), de la base de datos XAAMDI del NIST. La incertidumbre de estos valores es $\pm 1\%$.

$E = h\nu$ [keV] Energía del fotón	$\mu_{en}(E)/\rho$ [cm ² /g]	$\mu_{en}(E)/\rho$ [cm ² /g]	$\mu(E)/\rho$ [cm ² /g]
	Aire	Tejido blando	
15	1.3340	1.4020	1.6990
20	0.5389	0.5663	0.8230
30	0.1537	0.1616	0.3790
40	0.0683	0.0722	0.2688
50	0.0410	0.0436	0.2264
60	0.0304	0.0326	0.2048
80	0.0241	0.0262	0.1823
100	0.0233	0.0255	0.1693
150	0.0250	0.0275	0.1492
200	0.0267	0.0294	0.1358

una función continua y diferenciable del espacio y tiempo, y uno puede hablar de su gradiente espacial y su tasa de cambio en el tiempo. Su valor es igual a, o basado en, el valor esperado de una cantidad estocástica relacionada, si ésta existe. Por otro lado, las **cantidades estocásticas** se caracterizan por su valor aleatorio y entonces no pueden ser predecidas. Sin embargo, la probabilidad de cualquier valor en particular, puede ser determinado por una distribución de probabilidad. Está definida sólo en un dominio finito (i.e. no-infinitesimal). Sus valores varían discontinuamente en el espacio y tiempo, por lo que no tiene sentido hablar de su gradiente o tasa de cambio. En principio, sus valores pueden ser medidos con un pequeño error arbitrario. El valor esperado N_e de una cantidad estocástica es el promedio \bar{N} de sus valores medidos N conforme el número de observaciones n^* se aproxima a ∞ . Esto es, $\bar{N} \rightarrow N_e$ cuando $n^* \rightarrow \infty$.

En el contexto de la RI, las cantidades no-estocásticas para describir a los campos de radiación y su interacción con la materia están relacionadas con cantidades estocásticas,

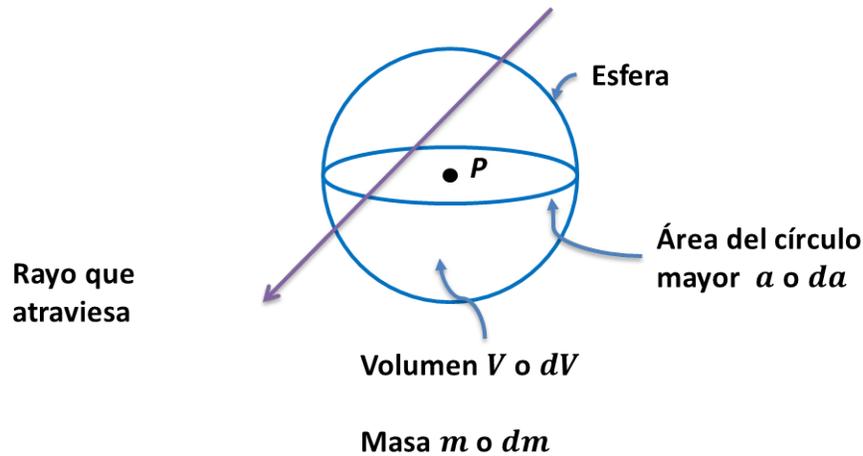


Figura A.6. Esfera que rodea al punto P de de volumen V (o infinitesimal dV), masa m (o infinitesimal dm) con área a (o infinitesimal da) de su círculo mayor. Basada en figura de la ref. [45].

ya que la naturaleza de la RI es estocástica. El número de rayos observados en repetidas mediciones (asumiendo una eficiencia de detección fija en el intervalo de tiempo, y no cambios sistemáticos del campo vs. tiempo), seguirá una distribución de Poisson (revisado por la ref. [45]). Para un gran número de eventos ésta puede ser aproximada por una distribución normal (Gausiana). Si N_e es el valor esperado del número de rayos detectados por medición, la desviación estándar de una simple medición aleatoria N relativa a N_e es igual a $\sigma = \sqrt{N_e} \cong \sqrt{\bar{N}}$. Entonces, el conocimiento de N_e por el valor promedio \bar{N} puede ser aproximado tan cercanamente a N_e como se desee, según el número de mediciones n^* , i.e., lo que anteriormente se dijo, $\bar{N} \rightarrow N_e$ cuando $n^* \rightarrow \infty$.

1. Fluencia.

Si N_e es el valor esperado del número de rayos que pasan por una esfera finita que rodea al punto P (ver Fig. A.6) durante un intervalo de tiempo transcurrido desde un

tiempo inicial arbitrario t_0 a un tiempo más tarde t . Si la esfera es reducida infinitesimal en P con un círculo de área máxima da , podemos definir la cantidad *fluencia*, Φ , como el cociente de la diferencial de N_e por da :

$$\Phi = \frac{dN_e}{da} \quad (\text{A.9})$$

con unidades usuales de m^{-2} o cm^{-2} .

2. Densidad de flujo.

Como Φ puede ser definida por A.9, para todos los valores de t dentro del intervalo desde $t = t_0$ (para el cual $\Phi = 0$) hasta $t = t_{max}$ (para el cual $\Phi = \Phi_{max}$); podemos definir la *densidad de flujo* o la *tasa de flujo* en el punto P como

$$\varphi = \frac{d\Phi}{dt} \quad (\text{A.10})$$

donde $d\Phi$ es el incremento de flujo durante el intervalo de tiempo infinitesimal dt al tiempo t , con unidades usuales de $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Determinada la función de densidad de flujo $\varphi(t)$, la fluencia puede ser determinada por su forma integral

$$\Phi(t_0, t_1) = \int_{t_0}^{t_1} \varphi(t) dt. \quad (\text{A.11})$$

3. Fluencia de energía.

Ésta es la cantidad más simple que describe a un campo y que toma en cuenta la energía de los rayos individualmente, y para la cual las energías de todos los rayos son sumadas. Sea \mathfrak{R} el valor esperado del total de energía (excluye la energía de masa en reposo) llevada por todos los N_e rayos que pasan por la esfera finita que rodea

el punto P durante un intervalo de tiempo (mencionado en densidad de flujo). Definimos la fluencia de energía, Ψ , como el cociente del diferencial de \mathfrak{R} por da como

$$\Psi = \frac{d\mathfrak{R}}{da} \quad (\text{A.12})$$

con unidades usuales de J m^{-2} o erg cm^{-2} .

4. Densidad de flujo de energía (o tasa de fluencia de energía).

Con los mismos argumentos en que se definió a la densidad de flujo ϕ , con $\Psi = 0$ cuando $t = t_0$ y $\Psi = \Psi_{max}$ cuando $t = t_{max}$, podemos definir la densidad de flujo de energía o tasa de fluencia de energía en el punto P como

$$\psi = \frac{d\Psi}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{d\mathfrak{R}}{da} \right) \quad (\text{A.13})$$

con unidades usuales de $\text{J m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o $\text{erg cm}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5. Espectro de energía.

Las distribuciones diferenciales de densidad de flujo, fluencia, densidad de flujo de energía, o fluencia de energía son las más comúnmente empleadas. Por ejemplo, se podría medir, en principio, la densidad de flujo a cualquier tiempo t en el punto P como una función de la energía cinética o cuántica E y de los ángulos polares de incidencia θ y β , y obtener el diferencial de densidad de flujo $\phi'(\theta, \beta, E)$ (con unidades usuales de $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{sr}^{-1} \text{keV}^{-1}$). Cuando E es la variable elegida en la distribución diferencial, la distribución resultante es llamada *espectro de energía* de la cantidad.

En el ejemplo mencionado sería entonces, el espectro de energía de la densidad

de flujo sobre todas las direcciones denotado como $\varphi'(E)$, con unidades típicas de $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{keV}^{-1}$ o $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1} \text{keV}^{-1}$, del cual se obtendría la densidad de flujo como

$$\varphi(E) = \int_0^{E_{max}} \varphi'(t) dE.$$

A.3. Cantidades para la descripción de la interacción de la RI con la materia

1. Kerma.

Esta cantidad no-estocástica sólo es relevante para campos de radiación indirectamente ionizante. El *kerma* es el valor esperado de la energía transferida a partículas cargadas por unidad de masa en un punto de interés, incluyendo energía radiativa perdida pero excluyendo energía pasada de una partícula cargada a otra[45]. Para un punto de interés P en V (Fig. A.6), podemos definir el kerma K como

$$K = \frac{d(\epsilon_{tr})_e}{dm} \equiv \frac{d\epsilon_{tr}}{dm} \quad (\text{A.14})$$

donde $(\epsilon_{tr})_e$ es el valor esperado de la energía transferida en V durante un intervalo de tiempo. La *energía transferida* ϵ_{tr} en V es:

$$\epsilon_{tr} = (R_{in})_u - (R_{out})_u^{nonr} + \Sigma Q \quad (\text{A.15})$$

donde $(R_{in})_u$ =energía radiante de partículas no cargadas entrando en V ,

$(R_{out})_u^{nonr}$ =energía radiante de partículas no cargadas dejando V , excepto aquellas que fueron originadas por pérdidas radiativas de energía cinética por partículas cargadas mientras estaban en V , y

ΣQ =energía neta derivada de la masa en reposo en V (conversión de masa a energía

($m \rightarrow E$) positiva, de $E \rightarrow m$ negativa).

Por pérdidas radiativas, se refiere a conversión de energía cinética de partículas cargadas a energía de fotón, ya sea por producción de rayos-X bremsstrahlung o aniquilación en vuelo de positrones.

La *energía radiativa* R es definida como la energía de partículas (excluyendo la energía de reposo) emitida, transferida, o recibida[45].

La *tasa de kerma* en el punto P en un tiempo t es dada por

$$\dot{K} = \frac{dK}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{d\epsilon_{tr}}{dm} \right) \quad (\text{A.16})$$

con unidades de J/kg s u otras equivalentes.

La energía que transfieren los rayos-X o γ a los electrones de la materia puede darse de dos maneras:

- a) Interacciones por fuerza Coulombiana con los electrones de la materia absorbente, resultando en la disipación local de energía como ionización y excitación en o cerca de la trayectoria de los electrones.
- b) Interacciones radiativas con los campos de fuerza Coulombiana del núcleo atómico, donde rayos-X son emitidos por la desaceleración de los electrones (rayos-X de bremsstrahlung).

Debido a que el kerma incluye la energía cinética recibida por las partículas cargadas y ésta es destinada a ser gastada por los electrones en colisiones o interacciones de

tipo radiativas, entonces podemos subdividir al kerma en dos partes como la energía que es gastada cerca del trayecto de los electrones en ionizaciones y excitaciones (denominándolo kerma de colisiones, K_c) y como la energía que es llevada lejos por rayos-X de bremsstrahlung (kerma radiativo, K_r):

$$K = K_c + K_r. \quad (\text{A.17})$$

donde el K_c es dado por

$$K_c = \frac{d\epsilon_{tr}^n}{dm} \quad (\text{A.18})$$

donde ϵ_{tr}^n es denominado como la *energía transferida neta*, el cual puede ser definido para un volumen V como

$$\epsilon_{tr}^n = (R_{in})_u - (R_{out})_u^{nonr} - R'_u + \Sigma Q = \epsilon_{tr} - R'_u \quad (\text{A.19})$$

donde R'_u es la energía radiante emitida como pérdidas radiativas por las partículas cargadas las cuales son originadas en V , sin importar donde ocurran el evento de pérdida. El K_r no necesita ser definido, ya que puede ser calculado como la diferencia entre el K y el K_c en la ec. A.17.

2. Dosis absorbida.

Esta cantidad es relevante para todos los tipos de campos de radiación, tanto como para directamente ionizante como indirectamente ionizantes. Además, es la cantidad más importante en física radiológica.

La definición de dosis absorbida puede enunciarse de la siguiente manera: *La dosis absorbida D es el valor esperado de la energía impartida a la materia por unidad de*

masa en un punto[45]. Podemos definir la dosis absorbida D en un punto de interés P en V (Fig. A.6) como[45]

$$D = \frac{d\epsilon}{dm} \quad (\text{A.20})$$

donde la energía impartida ϵ por RI a la materia de masa m en V es definida como[45]

$$\epsilon = (R_{in})_u - (R_{out})_u + (R_{in})_c - (R_{out})_c + \Sigma Q \quad (\text{A.21})$$

donde $(R_{in})_u$ y ΣQ son definidas de la misma manera que en la ecuación A.15, $(R_{out})_u$ es la energía radiante de toda la radiación no-cargada saliendo de V , $(R_{in})_c$ y $(R_{out})_c$ son la energía radiante de las partículas cargadas entrando y saliendo a/de V , respectivamente.

La tasa de dosis absorbida en el punto P en un tiempo t es dada por

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{d\epsilon}{dm} \right) \quad (\text{A.22})$$

con las mismas unidades de la tasa de kerma (J/kg s u otras equivalentes).

Estas cantidades que hemos definido con el fin de cuantificar la interacción de la RI con la materia, en particular el K_c y D , pueden ser igualadas bajo el concepto de **equilibrio de partícula cargada (EPC)**. Se dice que existe EPC para un volumen v si por cada partícula cargada de un tipo y energía que dejan v ésta es remplazada por una partícula idéntica de la misma energía que entra, en términos de valores esperados[45], i.e.,

$$(\bar{R}_{in})_c = (\bar{R}_{out})_c \quad (\text{A.23})$$

. Sustituyendo esta condición en la ec. A.21, ésta se vuelve

$$\bar{\epsilon} = (\bar{R}_{in})_u - (\bar{R}_{out})_u + \overline{\Sigma Q} \quad (\text{A.24})$$

Sustituyendo ahora la ec. anterior en la ec. A.19, vemos que la condición de EPC nos lleva a

$$\bar{\epsilon}_{tr}^n = \bar{\epsilon} + (\bar{R}_{out})_u - (\bar{R}_{out})_u^{nonr} - \bar{R}_u^r \quad (\text{A.25})$$

Bajo la misma condición podemos asumir que cualquier interacción radiativa de alguna partícula cargada después de abandonar ν puede ser reemplazada por una interacción idéntica dentro de ν , como en la Fig. A.7 se ilustra, entonces

$$(\bar{R}_{out})_u = (\bar{R}_{out})_u^{nonr} + \bar{R}_u^r \quad (\text{A.26})$$

siempre que el volumen ν sea pequeño que permita escapar los fotones de pérdidas radiativas (como se muestra en la Fig. A.7). La ec. A.25 puede ser simplificada por el caso de la ec. A.26 como

$$\bar{\epsilon} = \bar{\epsilon}_{tr}^n. \quad (\text{A.27})$$

Reduciendo el volumen ν a el volumen infinitesimal $d\nu$, que contiene la masa dm rodeando al punto de interés P , podemos escribir

$$\frac{d\bar{\epsilon}}{dm} = \frac{d\bar{\epsilon}_{tr}^n}{dm} \quad (\text{A.28})$$

y de aquí que

$$D \stackrel{EPC}{=} K_c \quad (\text{A.29})$$

donde el EPC sobre el símbolo de igualdad enfatiza la dependencia con la condición.

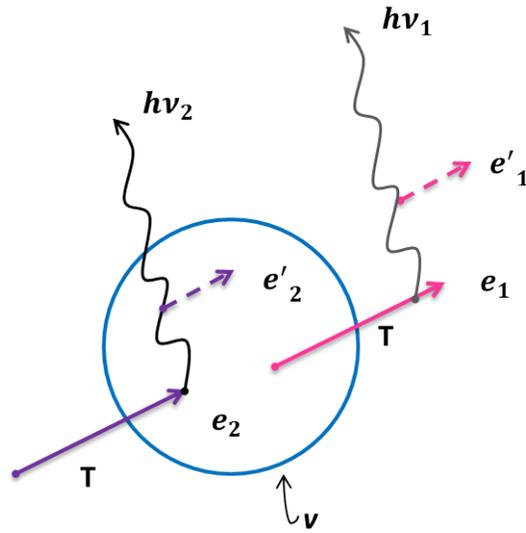


Figura A.7. Ilustración de las ecs. A.26 y A.27. El EPC existe (en el límite no estocástico) porque el electrón e_2 que entra al volumen ν con una energía cinética T es igual a la llevada fuera por el electrón e_1 . Si e_1 emite un rayo-X $h\nu_1$, e_2 también emitirá un rayo-X idéntico $h\nu_2$ (en promedio). Si $h\nu_2$ escapa de ν , entonces $(\bar{R}_{out})_u = h\nu_2 = h\nu_1 = \bar{R}_u^r$ ya que $(\bar{R}_{out})_u^{nonr} = 0$, la ec. A.26 es satisfecha. Sin embargo, si $h\nu_2$ es absorbido dentro de ν , produciendo un electrón secundario e'_2 , entonces $(\bar{R}_{out})_u = 0$ pero las \bar{R}_u^r aún son iguales a $h\nu_1$ y $(\bar{R}_{out})_u^{nonr} = 0$ como el caso anterior, entonces la ec. A.26 no es satisfecha. Entonces, la ec. A.27 es sólo válida para pequeños volúmenes que permiten escapar las pérdidas radiativas. Figura basada en figura de la ref. [45].



MEDIDAS DE RATÓN MACHO BALB/C

En las siguientes figuras se presentan los resultados de las mediciones realizadas a un ratón macho Balb/C de 6 semanas de edad con un peso de 20.80 g. Los valores corresponden a milímetros.

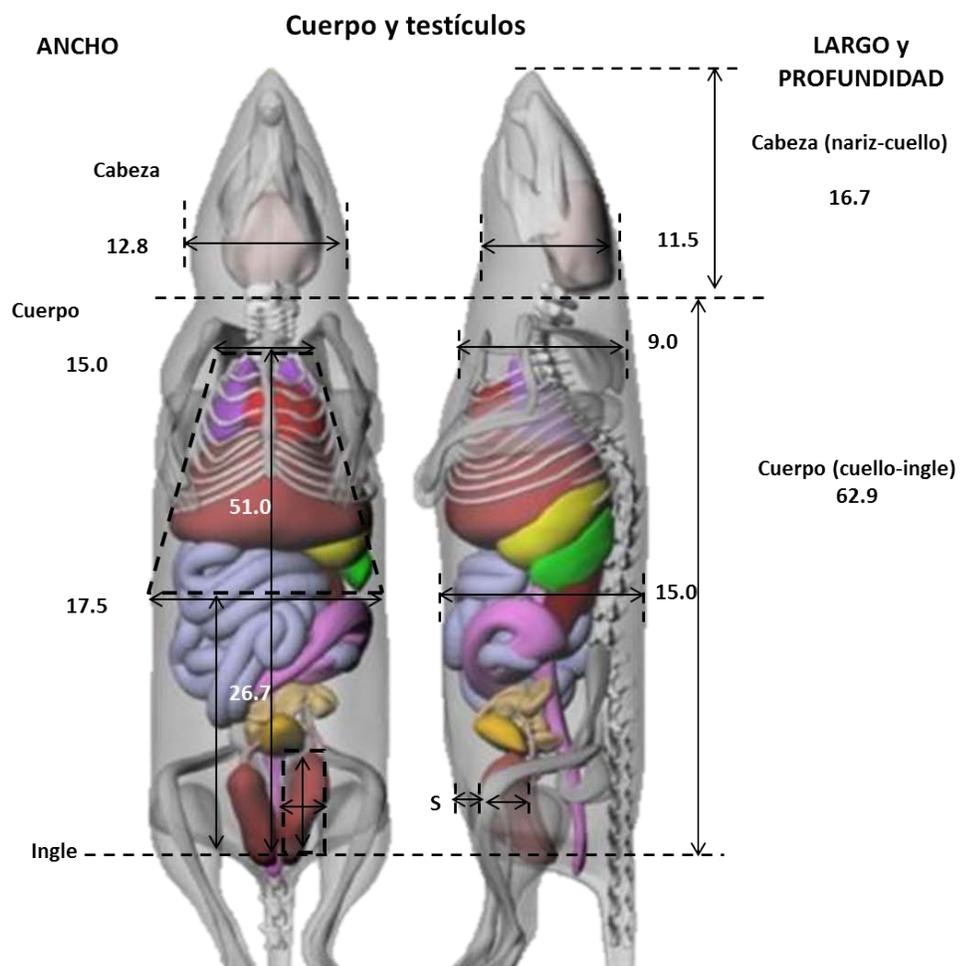


Figura B.1. Medidas en mm de un ratón macho Balb/C: Cuerpo y testículos. La imagen corresponde a un maniquí de ratón virtual del Carl E. Ravin Advanced Imaging Laboratories[49].

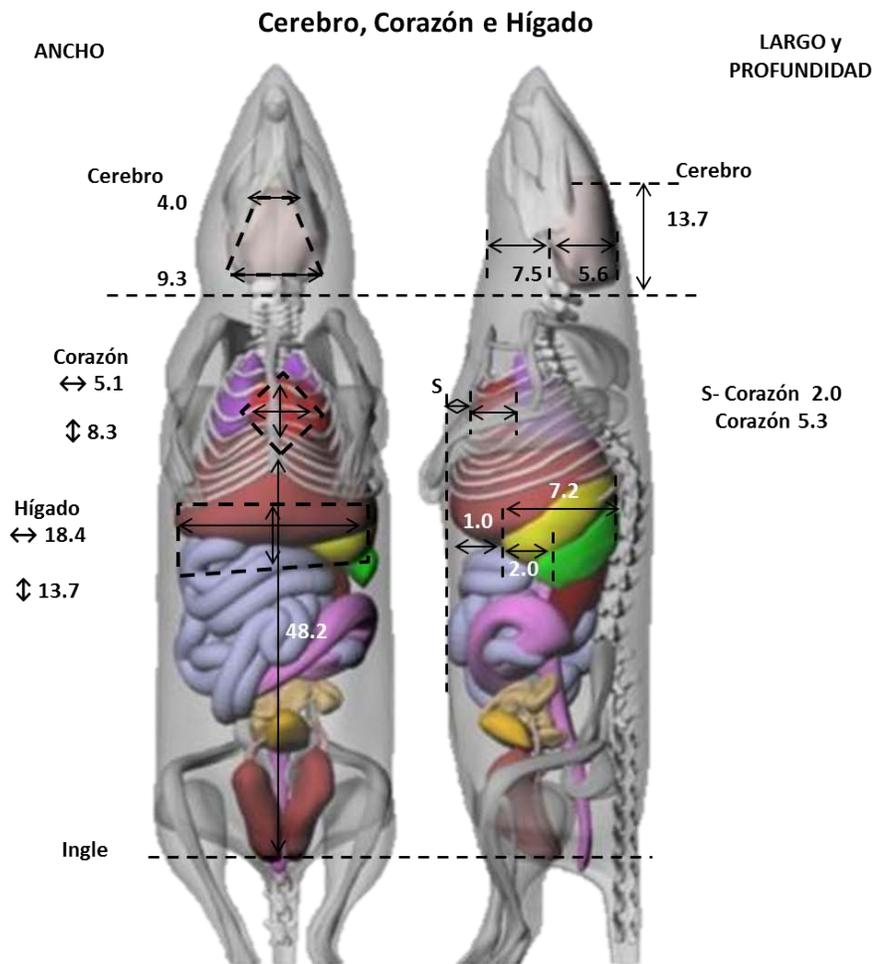


Figura B.2. Medidas en mm de un ratón machoo Balb/C: Cerebro, corazón e hígado.La imagen corresponde a un maniquí de ratón virtual del Carl E. Ravin Advanced Imaging Laboratories[49]

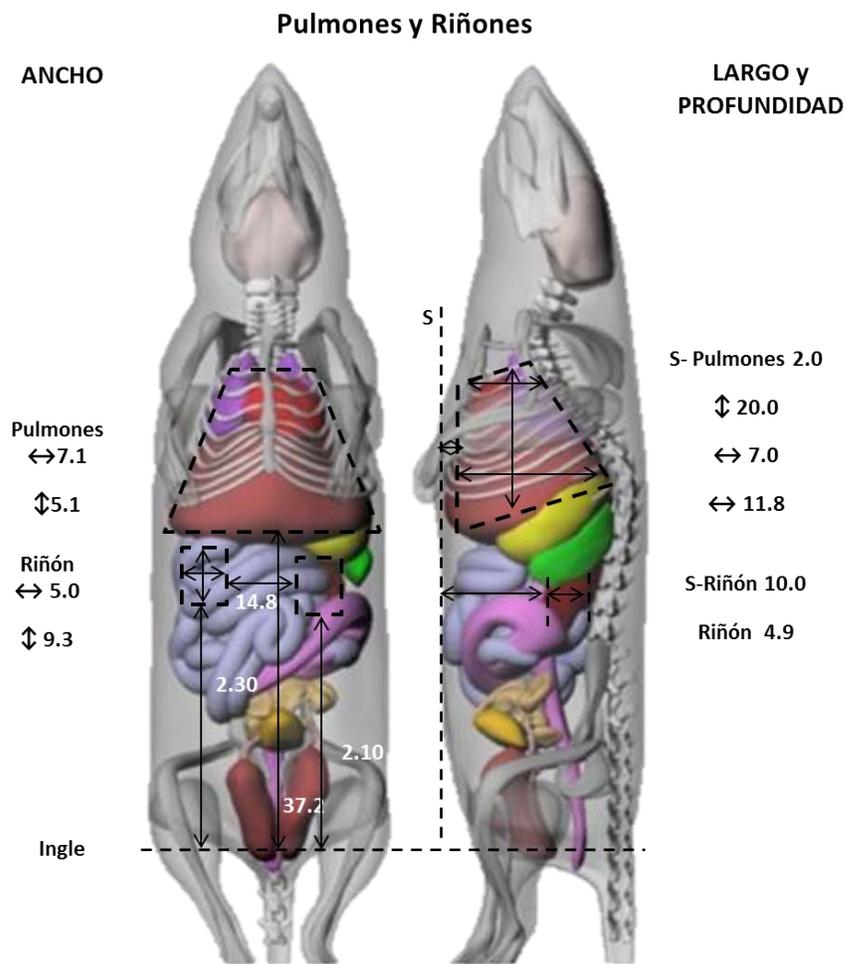


Figura B.3. Medidas en mm de un ratón macho Balb/C: Pulmones y riñones. La imagen corresponde a un maniquí de ratón virtual del Carl E. Ravin Advanced Imaging Laboratories[49]



PROTOCOLO PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIZOL® REAGENT

Una ligera variación al protocolo propuesto por el fabricante.

Homogenización. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocó una muestras del órgano y se agregó 0.5 mL de TRIZOL®. Se homogenizó con motor y puntas de teflón. Se agregaron otros 0.5 mL de TRIZOL® y se centrifugó a 12 000 g por 15 minutos a 4 °C (las subsiguientes centrifugaciones se realizaron a éstas mismas condiciones). Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo, dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

Separación de Fases. Se agregaron 200 μ L de cloroformo y se mezcló empleando vortex durante, al menos, 12 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó. Precipitación de RNA. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se agregan 0.5 mL de isopropanol y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó.

Lavado de RNA. El sobrenadante se removió y se trabajó con la pastilla (RNA). Se agregó 1 mL de etanol al 75 % y se agitó por medio de vortex. Se centrifugó. Este lavado se repitió dos veces.

Re-suspensión de RNA. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire. Según el tamaño de la pastilla, se resuspendió entre 30 y 200 μ L de agua libre de RNAsas. Se mezcló con micropipeta y se transfirió a un tubo de 600 μ L. Se incubó a 55 °C.

Almacenamiento. Se tomaron entre 2 y 5 μ L de la muestra para realizarle pruebas de pureza e integridad. El resto de la muestra se almacenó a -70 °C.

SÍNTESIS DE LA PRIMERA HEBRA DE DNA COMPLEMENTARIO (RETROTRANSCRIPCIÓN)

La retrotranscripción es la reacción donde se sintetiza DNA complementario (cDNA, por sus siglas en inglés) a una molécula de RNA. Esta reacción es llevada a cabo por una DNA polimerasa (transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, RT) la cual poseen muchos virus (retrovirus). Una vez que el retrovirus entra a una célula, retrotranscribe su RNA (RNA viral) y obtiene cDNA, mismo que se inserta en el DNA celular, y así la célula termina sintetizando las proteínas que el retrovirus mantenía codificadas en su RNA.

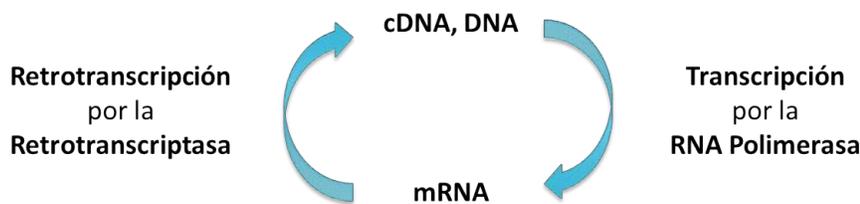


Figura D.1. Transcripción y retrotranscripción, llevadas a cabo por las enzimas RNA polimerasa y la retrotranscriptasa, respectivamente. Al transcribir se obtiene mRNA, y al retrotranscribir cDNA.

D.1. Protocolo para la síntesis de la primera hebra de cDNA

En un termociclador MultiGene® Opti Max se llevó a cabo la siguiente reacción (una ligera variación de lo propuesto por el fabricante):

1. A 2 μg de RNA disueltos en 29 μL de agua libre de RNAsas, se agregó 1 μL de Oligo 15 (dT) y 1 μL de Hexámeros, ambos a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se incubó a 70 °C por 15 minutos.
2. Se agregaron 5 μL de Buffer de reacción 5X de RT M-MLV (proveído por el fabricante), 5 μL de dNTPs a 10 mM y 1 μL de la enzima RT M-MLV (40 μL de volumen final).
3. Las muestras se sometieron a un ciclo térmico que consistió en: 37 °C durante 60 min, 15 min a 55.5 °C y 4 °C para finalizar.
4. Las muestras se almacenaron a -20 °C.

Reactivos	I ×
Oligo 15 (dT)	1 μL
Hexámeros	1 μL
RNA molde	X μL para 2 μg
Agua libre de RNAsas	Completar para 29 μL
<i>Incubación</i>	
Buffer 5× de RT M-MLV	5 μL
dNTPs a 10 mM	5 μL
Enzima RT M-MLV	1 μL
Volumen total	40 μL
<i>Ciclo térmico</i>	
<i>Almacenamiento</i>	



REPLICACIÓN DEL DNA

Durante el proceso de replicación de DNA en la fase S del ciclo celular, la enzima ensambladora de la nueva cadena de DNA es la llamada DNA polimerasa. A grandes rasgos, la DNA polimerasa va uniendo de forma complementaria (Adenina a Timina, Citosina a Guanina (y viceversa): $A \leftrightarrow T$ y $C \leftrightarrow G$) y antiparalela (5' a 3'), nucleótidos a la cadena progenitora (molde), formándose así una cadena hija.

E.0.1. Mecanismo molecular de replicación

El inicio de la replicación comienza con la unión del cebador a la región diana del DNA, el cual provee un extremo 3'-OH libre que permite a la DNA polimerasa comenzar a ensamblar la nueva hebra de DNA. En la reacción se encuentran circundantes los cuatro desoxirribonucleósidos tri-fosfato (*dNTP*): *dATP*, *dUTP*, *dCTP* y *dGTP*, y cada cual es “tomado” por la polimerasa según se complementa a la hebra molde. La unión de cada *dNTP* entrante, y por lo tanto la creciente hebra, es por medio de la transferencia de un de los tres fosfato (el más cercano a la desoxirribosa, fosfato α) del *dNTP* entrante al grupo 3'-OH del *dNTP* anterior (o inicialmente, al del cebador), liberando los dos restantes (difosfato

inorgánico, PP_i). Esta unión es referida como puente fosfodiéster entre el fosfato α del $dNTP$ entrante y el grupo $3'-OH$ de la hebra creciente[33]. Un esquema de lo descrito anteriormente se presenta en la Figura E.1. La reacción puede ser resumida con la siguiente ecuación[33]:

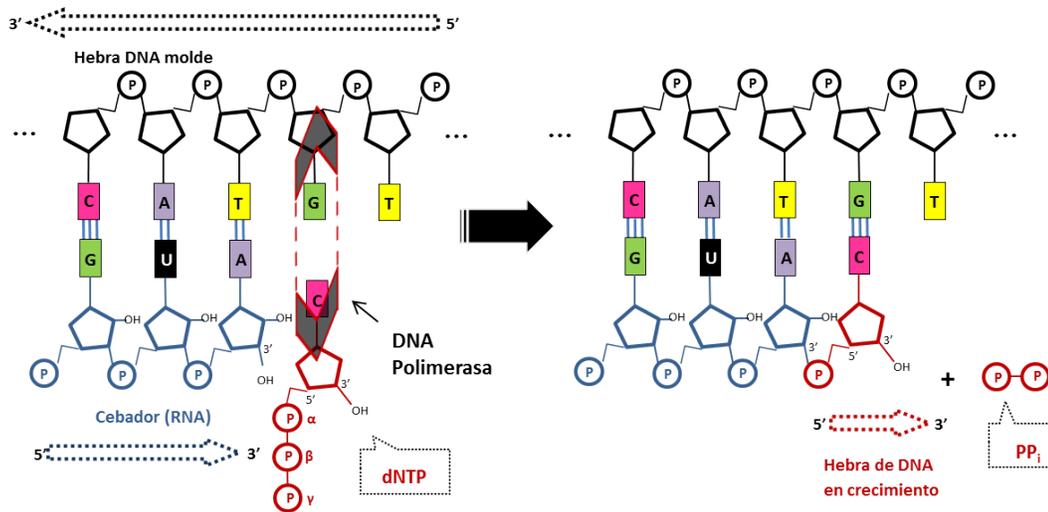
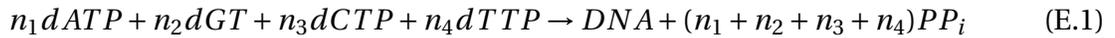


Figura E.1. Esquema de la réplica de una hebra de DNA llevado acabo por la enzima DNA polimerasa. Basado en figuras de la referencia [33].

E.1. SYBR® Green

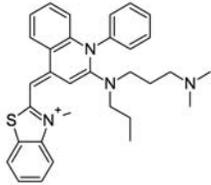
El SYBR® Green (SG) es un fluoróforo¹[50] comúnmente usado en la PCR-*tiempo real* para monitorear la amplificación de la secuencia blanco. La Tabla E.1 presenta algunas de sus características químicas. El SG muestra fluorescencia intrínseca en su estado libre, sin

¹o fluoróforo: Es un grupo funcional de la molécula que absorbe energía de una longitud de onda específica y la vuelve a emitir en otra determinada longitud de onda mayor.

embargo cuando se une a la doble hebra de DNA (dsDNA por sus siglas en inglés), de manera no específica a alguna secuencia, la fluorescencia se ve drásticamente incrementada (>1000 veces)[51]. El complejo SG-dsDNA presenta su máxima absorción a ~494 nm y su emisión de fluorescencia característica a ~524 nm[52].

Según Dragan *et al.*[51], la interacción del SG con el DNA se da de tres diferentes maneras (complejo de estabilización): Intercalación entre los pb, interacción electrostática y contacto extendido con el surco menor del DNA. El grupo amino cargado positivamente del brazo elongado del SG no forma contacto electrostático con los fosfatos del DNA, sino que el brazo se hunde en el fondo del surco menor, ésto debido a que su interacción dentro del surco es energéticamente más favorable que el contacto coulumbiano con los grupos fosfato del DNA. Estiman que la contribución energética (10 kJ/ml) del brazo a la energía de Gibbs de la asociación SG-dsDNA es al menos 30% del total de energía de enlace. El tamaño del sitio de enlace de SG-dsDNA es en promedio 3.5 pb ($\approx 11.5 \text{ \AA}$), el cual es significantivamente mayor que si se esperara ser por intercalación. Esta longitud es comparable a la longitud de los brazos del SG en una conformación extendida (ver Fig. E.2). Entonces, sugieren que el tamaño del sitio de enlace es controlado por los brazos, los cuales se extienden a lo largo del surco menor por aproximadamente 3-4 pb.

Tabla E.1. Características químicas del SG[52].

Estructura*	Fórmula	Masa molecular [a.m.u.]
	C ₃₂ H ₃₇ N ₄ S	509.273±0.005
Nombre de UIPAC:	[2-[N-(3-dimetilaminopropil)-N-propilamino]-4]-[2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2)-metiliden]-1-fenil-quinilinium] ⁺	

*Imagen de la referencia [53].

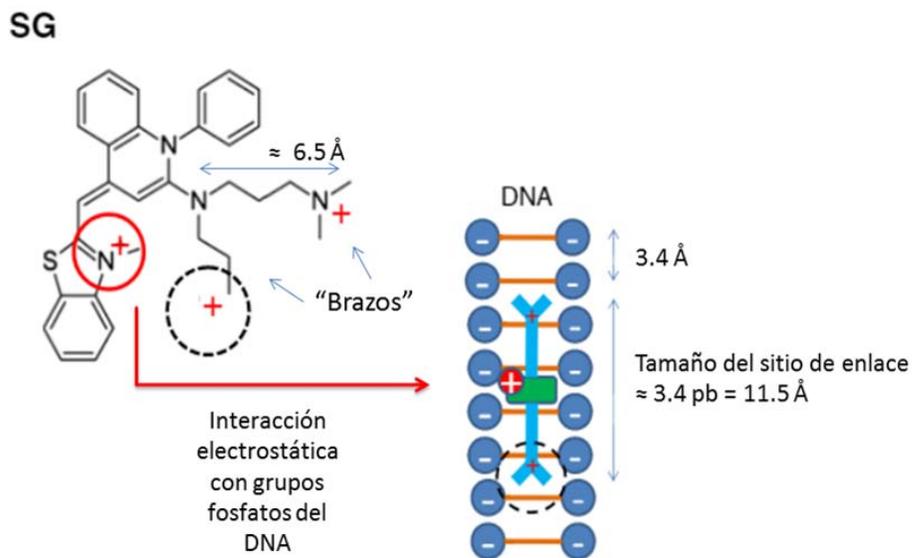


Figura E.2. Modelo del complejo SG-DNA según Dragan *et al.* (Dragan2012): El brazo más largo (≈6.5 Å) del SG se hunde en el fondo del surco menor. La contribución energética (10 kJ/ml) del brazo más largo a la energía de Gibbs de la asociación SG-DNA, es al menos 30% del total de energía de enlace. El tamaño del sitio de enlace de SG-DNA es en promedio 3.4 pb (≈11.5 Å). Esta longitud es comparable a la longitud de los brazos del SG en una conformación extendida. Figura adaptada de la referencia[51].

E.2. Protocolo para PCR-*tiempo real* con SYBR® Green

En un termociclador Rotor-Gene® Q de QIAGEN (núm. de serie 02314225) se llevó a cabo la siguiente reacción (una ligera variación de lo propuesto por el fabricante):

Reactivos	1 ×
SYBR® Green (Invitrogen)	5 µL
Oligo F	1 µL
Oligo R	1 µL
cDNA diluído	3 µL
Volumen total	10 µL
<i>Ciclos térmicos</i>	

Donde las especificaciones térmicas fueron:

Hold: 95 °C por 3 min.

Cycling: 95 °C por 1 min, 63 °C por 10 s, 72 °C por 12 s, 40 ciclos.

Melt: Rampa de 55 °C a 95 °C; incremento de 1 °C cada paso; espera de 90 s previo a la

Melt condicionada al primer incremento; espera de 5 s posterior a cada paso.



RESULTADOS DE PRUEBAS DE PUREZA, INTEGRIDAD Y CUANTIFICACIÓN, REALIZADAS A RNA CELULAR EXTRAÍDO.

La Tabla F1 muestran los valores obtenidos del cociente A260/280 de cada muestra de RNA, medido en un espectrofotómetro Nanodrop®ND-1000. Para considerar que la muestra de RNA es pura, el valor A260/280 debe encontrarse entre 1.85 y 2.0. La integridad de las muestras de RNA fue determinada cualitativamente (observación clara de las bandas 28S y 18S, correspondientes al rRNA) por medio de la técnica de electroforesis horizontal. A manera de ejemplo, la Figura F.1 muestra una de la fotografía tomadas a uno de los geles de agarosa en el cual se colocaron 15 muestras de RNA y una escalera de DNA de 100 pb, sometidas previamente a electroforesis horizontal. Los 15 pozos de izquierda a derecha corresponden a las muestras y la última columna de la derecha a la escalera de DNA. En la fotografía (F.1) se pueden observar claramente las bandas 28S y 18S, indicando buena integridad del material genético. La Tabla F.2 muestra la concentración de RNA (ng de RNA/ μ L de agua) de cada muestra. Esta medición es indispensable para la posterior

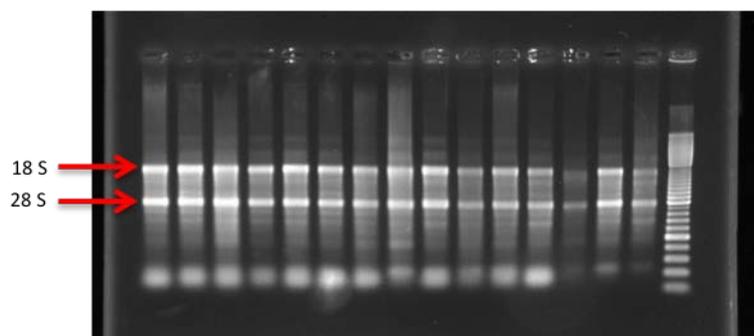


Figura F.1. Fotografía de un gel de agarosa con 15 muestras de RNA (de izquierda a derecha) y una escalera de DNA de 100 pb (última a la derecha), sometidas a electroforesis horizontal (80 V durante 45 min.). Las flechas indican las bandas 18S y 28S, las cuales pueden observarse claramente. Ésto último es un indicador de la integridad del material genético.

síntesis de cDNA (ver D). Las muestras que no pasaron la prueba de pureza o de integridad aparecen tachadas en dichas tablas. Para las que no se logró obtener la extracción de RNA se muestra un †.

Tabla F.1. Valores del cociente de absorbancia a 260 nm y 280 nm (A60/280) de cada una de las muestras de RNA extraído de diferentes órganos de ratones Balb/C expuestos a RX (RX) o no (C), sacrificados a diferentes tiempos pos-irradiación. Las mediciones se realizaron en el espectrofotómetro Nanodrop®ND-1000 y se utilizó agua libre de RNAsas como blanco comparativo.

t	n	CEREBRO		CORAZÓN		PULMÓN		HÍGADO		RIÑÓN	
		RX	C	RX	C	RX	C	RX	C	RX	C
2 h	1	1.89	2.00	1.99	1.96	1.85	1.89	1.95	1.94	1.97	1.95
	2	1.96	1.94	1.77	1.92	1.89	1.94	1.99	1.58	2.01	1.76
	3	1.78	1.92	1.95	1.94	1.94	1.93	1.74	1.62	1.93	1.50
	4	1.97	1.89	1.94	1.98	1.89	1.87	1.92	1.92	1.91	1.90
4 h	1	1.91	2.00	1.95	1.97	1.89	1.88	1.98	1.84	1.94	1.93
	2	1.90	†	1.82	†	1.88	1.92	1.99	1.49	2.00	2.01
	3	1.96	1.97	1.97	1.92	1.71	1.91	1.83	1.82	1.95	1.95
	4	1.92	1.95	1.92	1.96	1.94	1.94	1.93	1.86	1.95	1.95
6 h	1	1.98	2.00	1.99	1.98	1.96	1.97	1.79	1.91	1.95	1.96
	2	1.99	2.02	†	1.81	1.84	1.85	1.93	†	1.99	1.99
	3	1.94	1.95	1.88	1.95	1.82	1.97	1.96	1.97	2.00	1.93
	4	1.96	1.94	1.90	1.95	1.96	1.91	1.94	1.94	1.93	1.94
24 h	1	1.84	1.95	1.89	1.99	1.96	1.97	1.94	1.84	1.93	1.98
	2	1.94	1.95	1.87	1.88	1.89	1.92	1.93	1.94	1.93	1.93
	3	1.97	1.99	1.94	1.95	1.96	1.76	1.96	2.00	1.94	1.95
	4	1.98	1.96	1.94	1.96	1.84	1.83	1.96	1.95	1.96	1.89

n = Número de experimento; *t* = Tiempo de sacrificio post-irradiación; †Muestra no obtenida. Las muestras tachadas no cumplieron el criterio de pureza o integridad.

Tabla F.2. Concentración de RNA celular ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de cada una de las muestras de órganos de ratones machos Balb/C irradiados (RX) o no (C), sacrificados a diferentes tiempos pos-irradiación. El RNA fue extraído utilizando Trizol® Reagent (ver Apéndice C). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 y se utilizó agua libre de RNAsas como blanco comparativo.

t	n	CEREBRO		CORAZÓN		PULMÓN		HÍGADO		RIÑÓN	
		RX	C	RX	C	RX	C	RX	C	RX	C
2 h	1	474.49	893.95	1856.97	733.20	294.24	248.35	2060.99	2731.23	1869.04	2257.23
	2	634.44	3039.78	71.97	3369.07	383.79	2774.98	1777.17	4220.61	1999.73	3904.23
	3	282.06	884.93	1796.99	1119.87	2117.56	1232.26	3904.97	4090.17	1450.44	4247.83
	4	1894.69	998.24	1136.11	1309.76	911.32	627.59	2933.89	2560.59	2456.84	3164.84
4 h	1	477.19	653.98	777.79	1004.29	422.29	378.64	826.21	3509.70	1912.31	3065.17
	2	386.82	†	189.78	†	222.14	727.34	2231.08	4125.94	1945.25	2156.48
	3	2367.02	2093.39	1465.40	855.90	115.52	687.06	3712.03	3542.32	2614.67	1918.90
	4	721.35	815.81	596.50	1320.97	1636.13	1614.79	2783.65	3512.74	2248.74	2000.01
6 h	1	1507.37	1248.65	694.33	1377.87	1574.83	809.02	3891.40	3031.40	2218.90	2375.13
	2	574.52	1433.22	†	168.05	216.75	220.97	1052.75	†	1476.88	1547.15
	3	648.80	797.30	472.30	550.60	192.17	797.65	581.76	2588.76	2346.13	3329.55
	4	2006.53	1240.89	745.25	1065.38	1492.36	886.16	2324.14	2193.49	1539.78	2764.95
24 h	1	289.80	944.10	526.80	1080.60	1042.40	2039.24	3082.85	3812.42	2988.61	2106.40
	2	1243.62	1284.34	826.02	669.24	828.69	833.50	2374.89	2199.82	2045.35	2496.00
	3	1292.50	1500.00	1066.74	620.40	1830.99	143.53	2691.50	2683.20	756.38	2774.77
	4	1912.60	1170.18	637.70	760.80	238.64	427.96	2408.72	3155.93	1212.61	3399.55

n = Número de experimento; *t* = Tiempo de sacrificio post-irradiación; † Muestra no obtenida.

Las muestras tachadas no cumplieron el criterio de pureza o integridad.

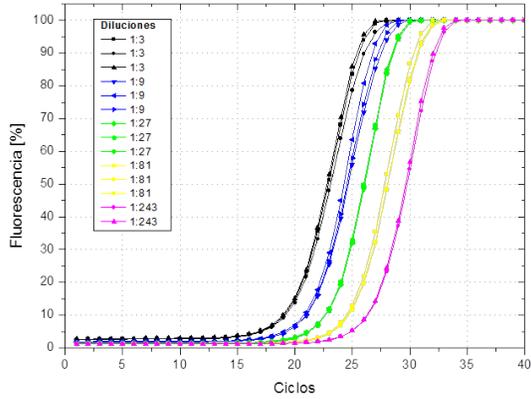


CURVAS ESTÁNDAR OBTENIDAS

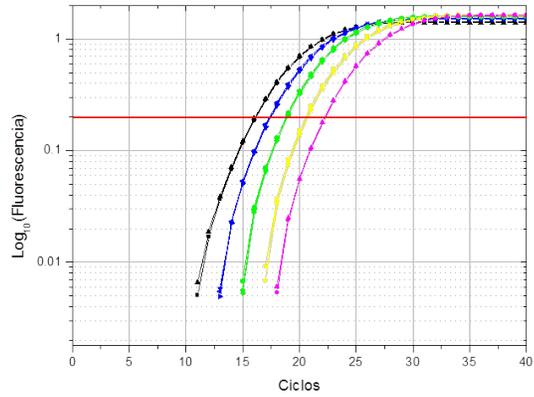
Gráficas de qPCR realizadas para obtener la curva estándar del mRNA de los genes β -Actina, GAPDH, Nrf2, Trx1, NFG y xCT, en los órganos como cerebro, corazón, pulmones, hígado y riñones, de ratones macho balb/C.

Se incluyen las gráficas de:

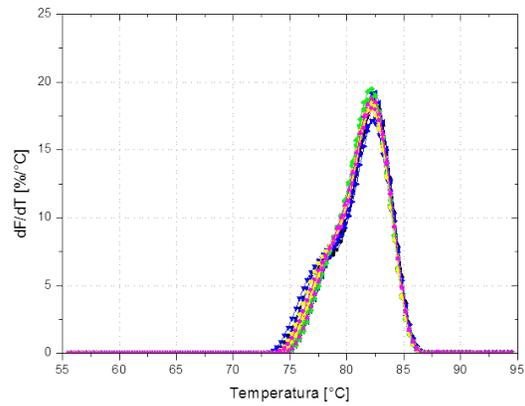
- Curvas de fluorescencia de cinco diluciones seriales de cDNA del mRNA,
- Establecimiento del Threshold en la gráfica semi-log de las curvas de fluorescencia,
- Curvas Melting, y
- Valores C_T en función del logaritmo (base 10) de la concentración inicial de cDNA para obtener la curva estándar.



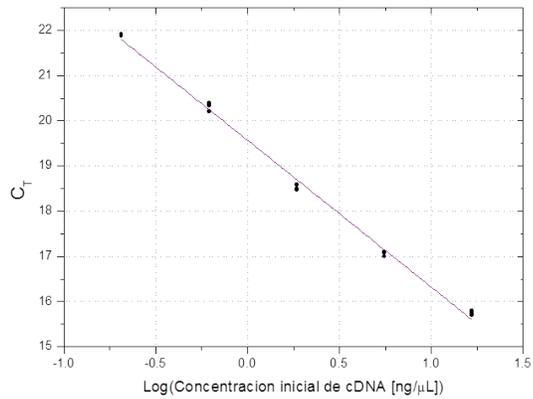
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

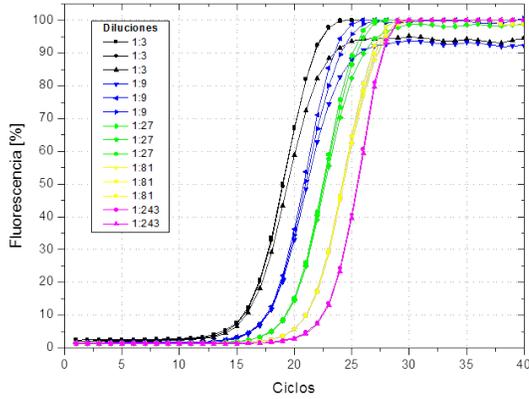


(c) Curvas Melting.

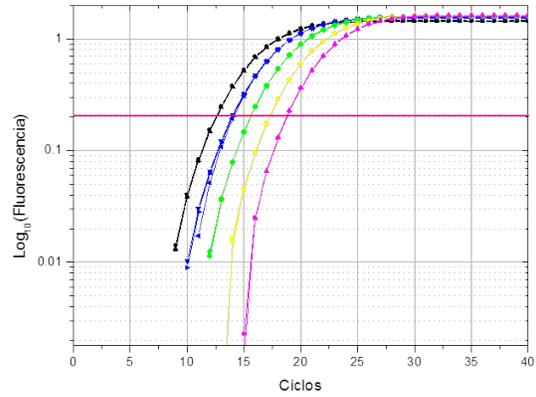


(d) Curva estándar.

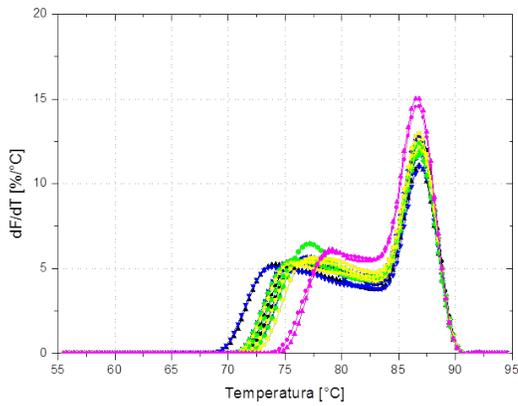
Figura G.1. Obtención de la curva estándar para el mRNA de β -Actina en cerebro.



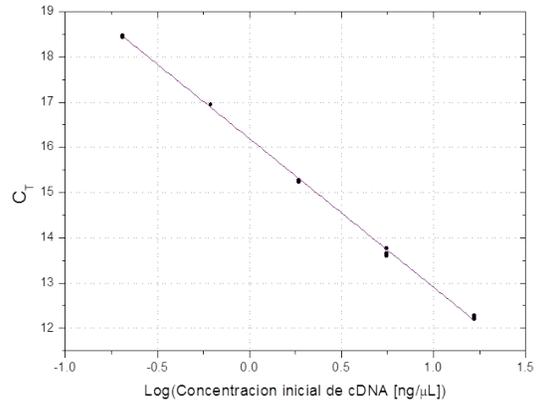
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

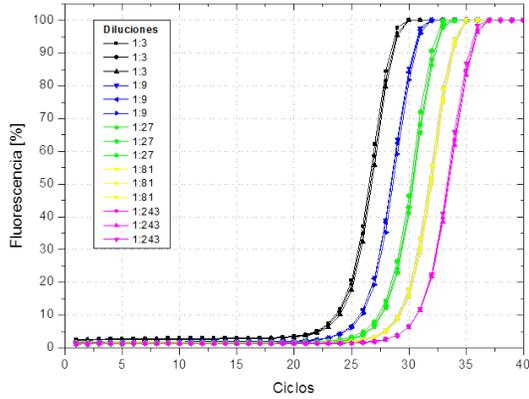


(c) Curvas Melting.

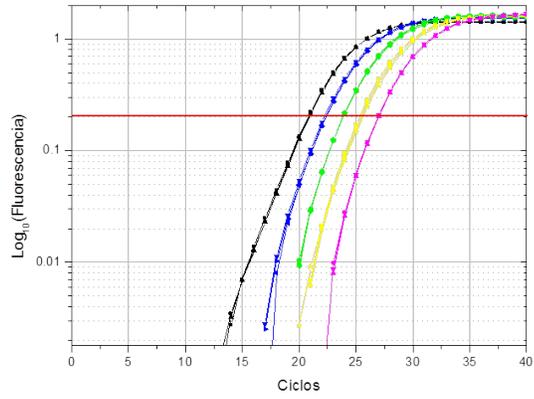


(d) Curva estándar.

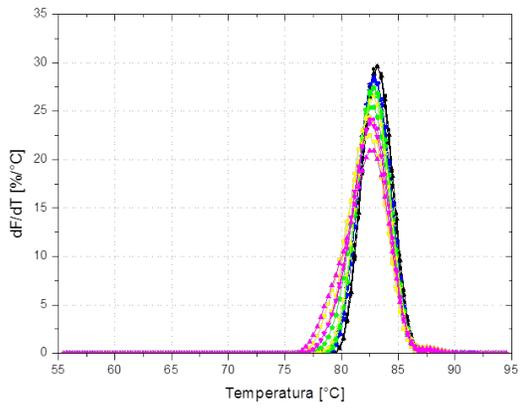
Figura G.2. Obtención de la curva estándar para el mRNA de GAPDH en cerebro.



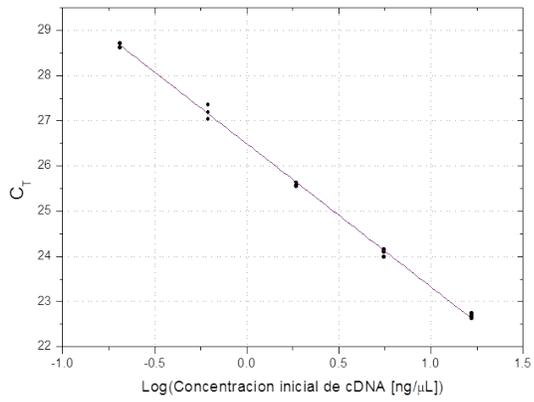
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

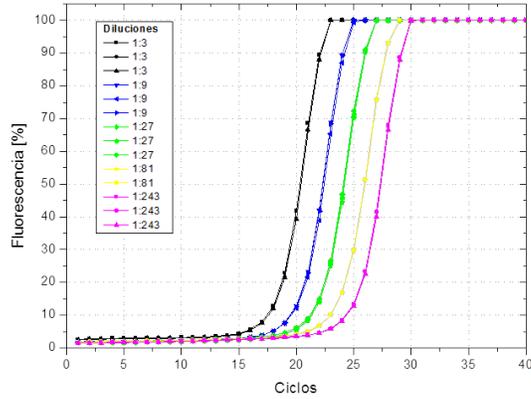


(c) Curvas Melting.

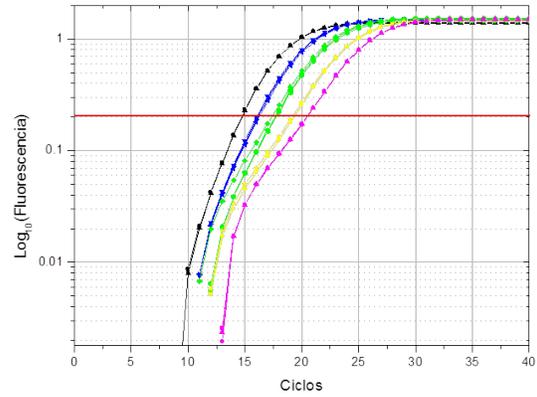


(d) Curva estándar.

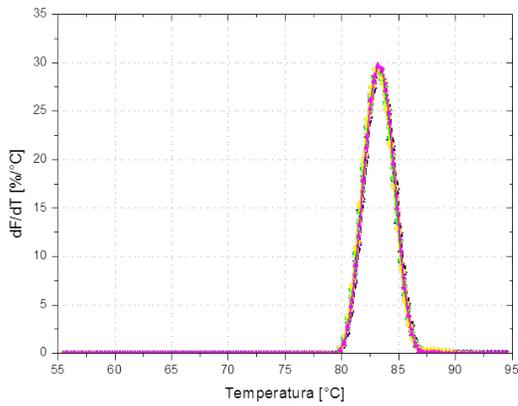
Figura G.3. Obtención de la curva estándar para el mRNA de Nrf2 en cerebro.



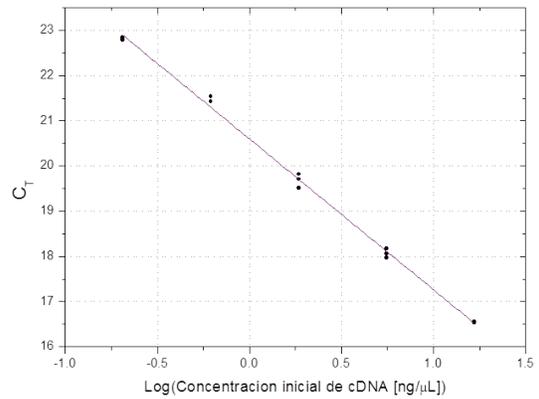
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

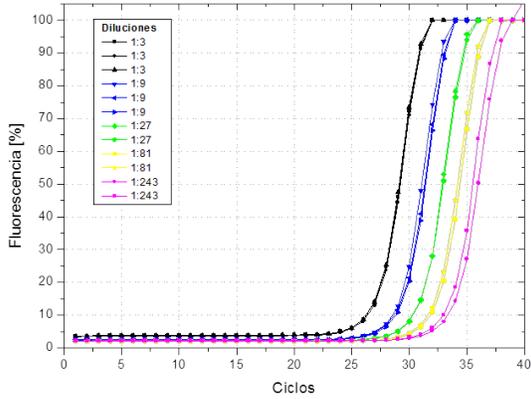


(c) Curvas Melting.

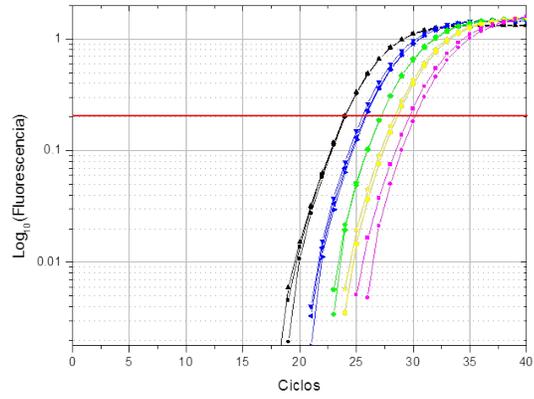


(d) Curva estándar.

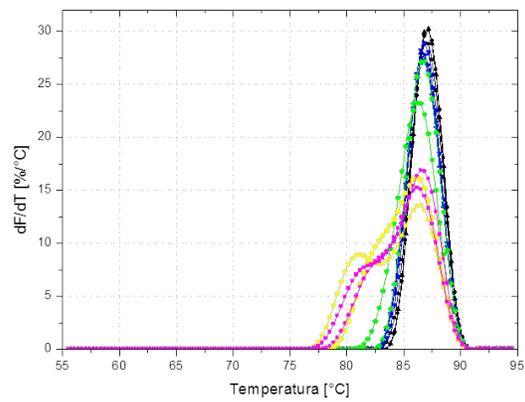
Figura G.4. Obtención de la curva estándar para el mRNA de Trx1 en cerebro.



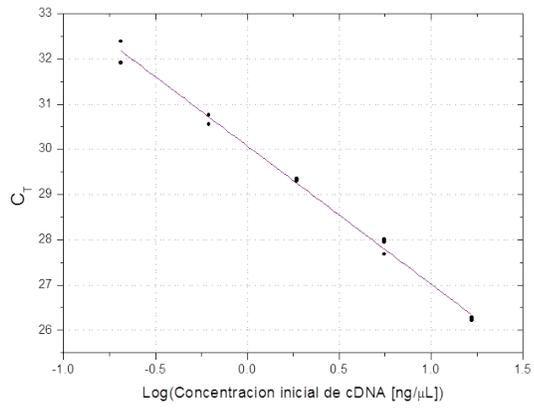
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

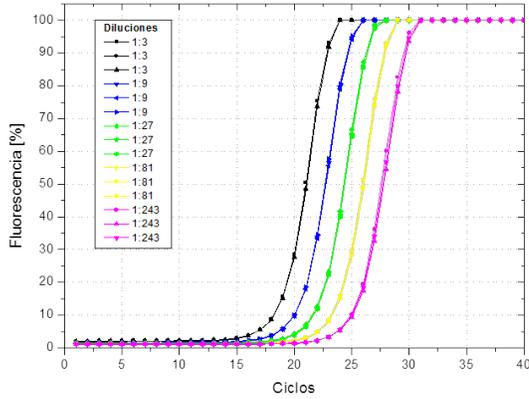


(c) Curvas Melting.

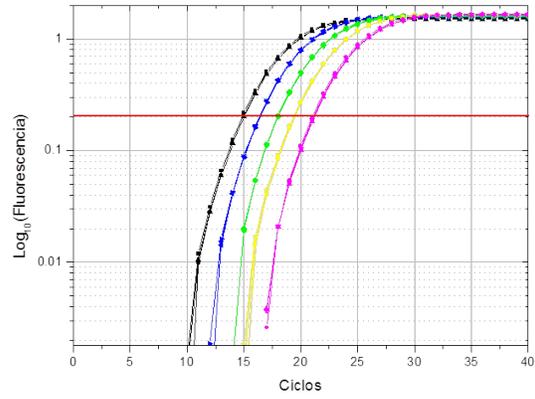


(d) Curva estándar.

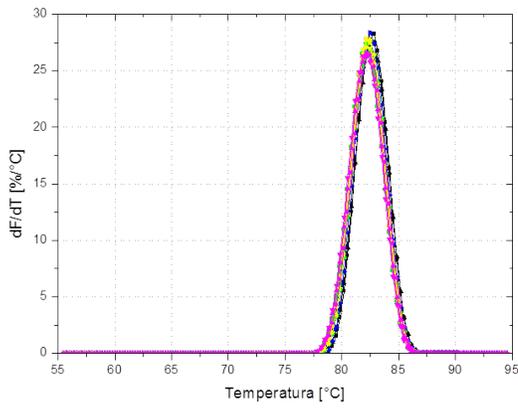
Figura G.5. Obtención de la curva estándar para el mRNA de NGF en cerebro.



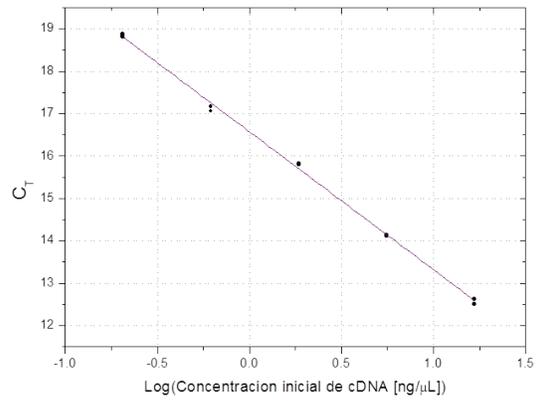
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

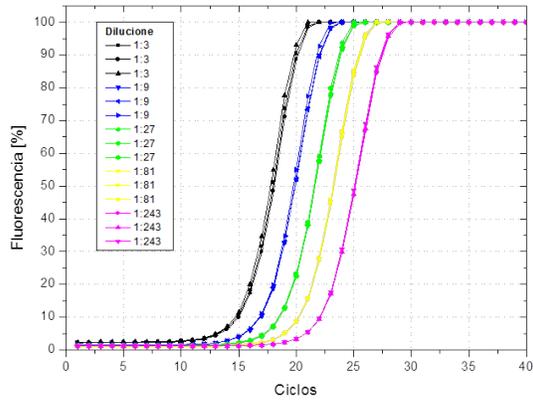


(c) Curvas Melting.

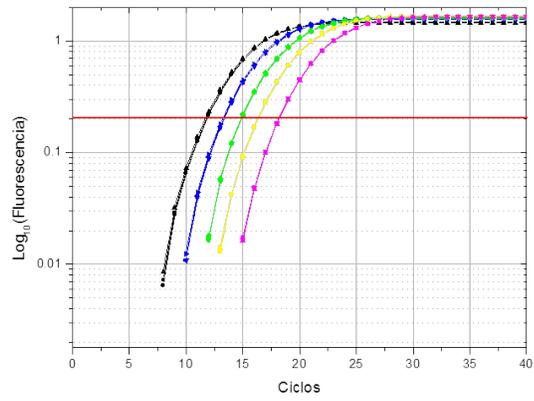


(d) Curva estándar.

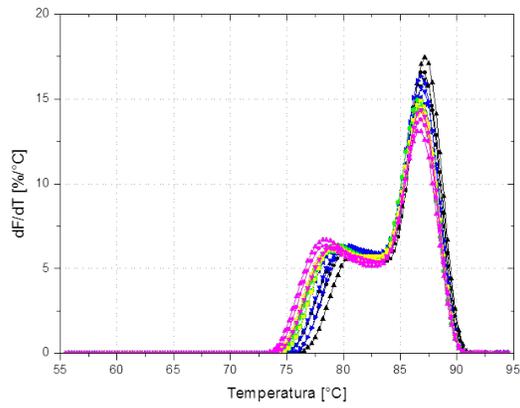
Figura G.6. Obtención de la curva estándar para el mRNA de β -Actina en corazón.



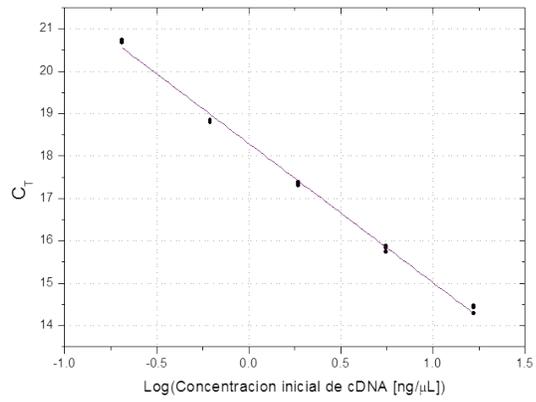
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

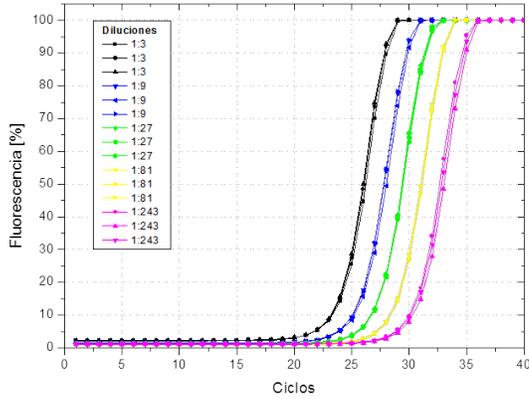


(c) Curvas Melting.

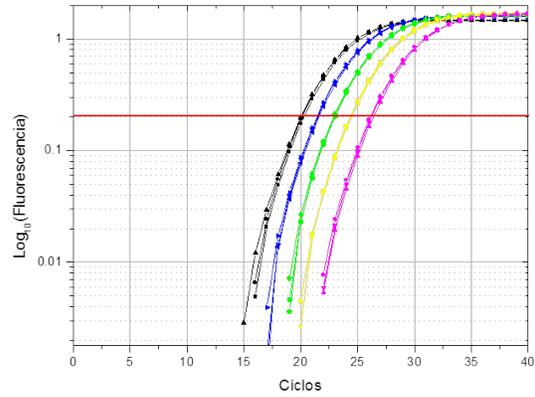


(d) Curva estándar.

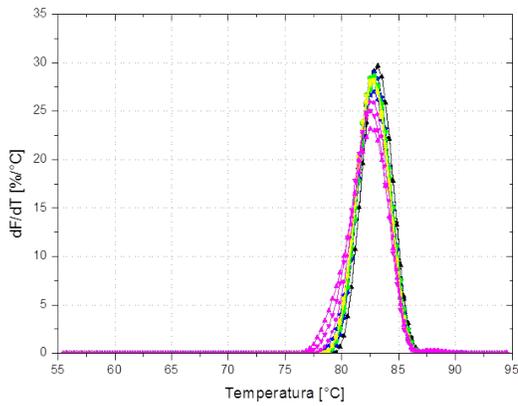
Figura G.7. Obtención de la curva estándar para el mRNA de GAPDH en corazón.



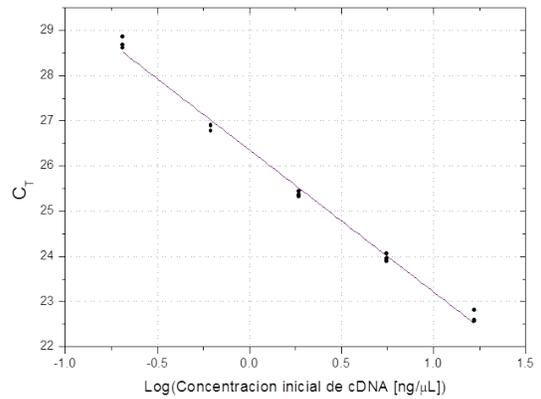
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

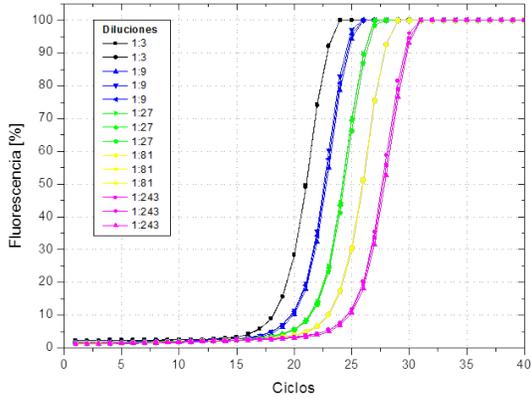


(c) Curvas Melting.

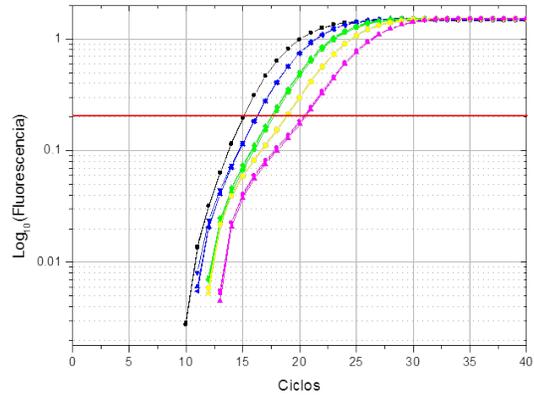


(d) Curva estándar.

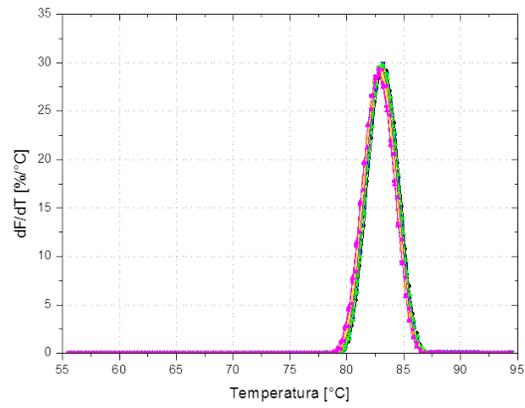
Figura G.8. Obtención de la curva estándar para el mRNA de Nrf2 en corazón.



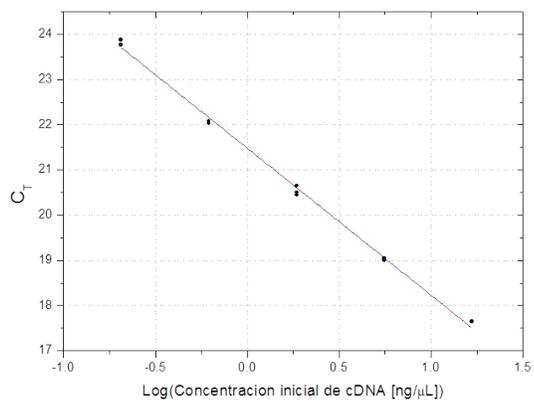
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

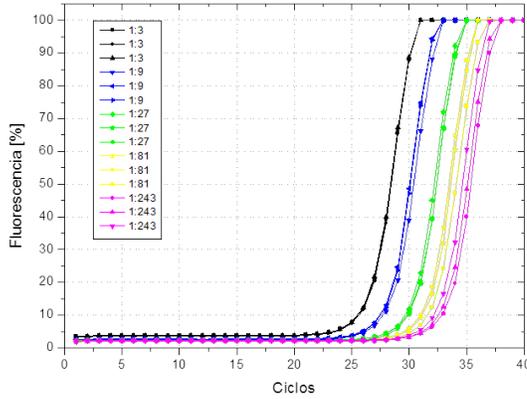


(c) Curvas Melting.

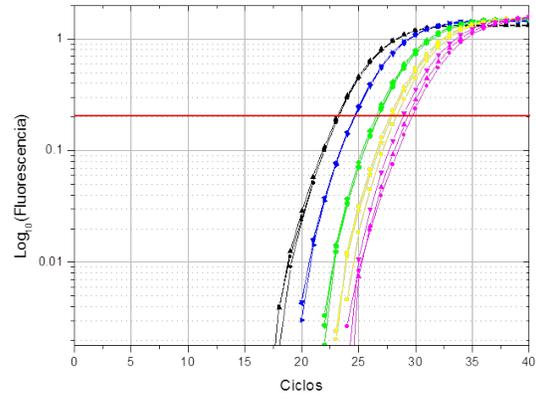


(d) Curva estándar.

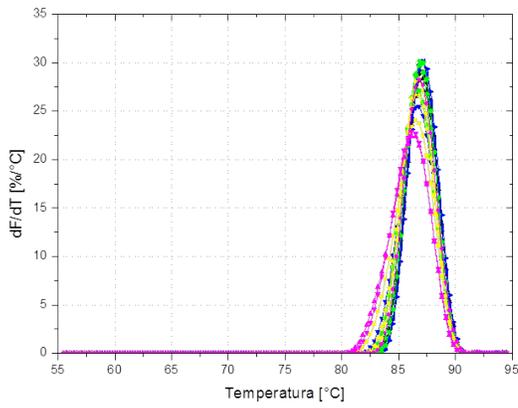
Figura G.9. Obtención de la curva estándar para el mRNA de Trx1 en corazón.



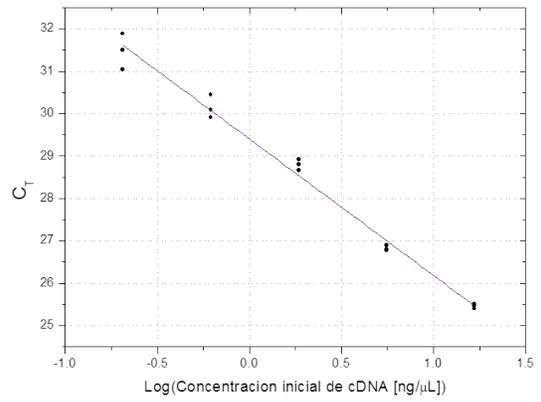
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

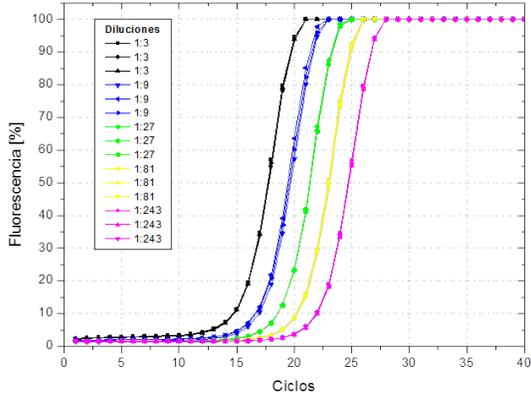


(c) Curvas Melting.

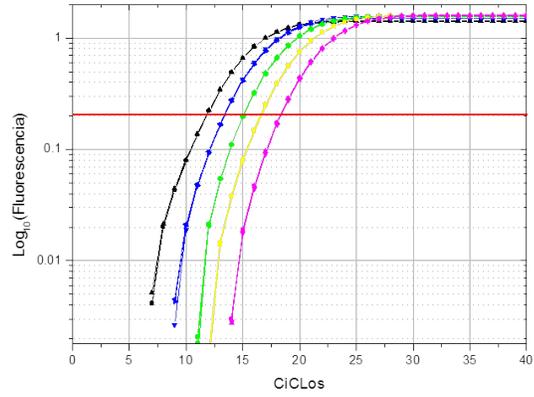


(d) Curva estándar.

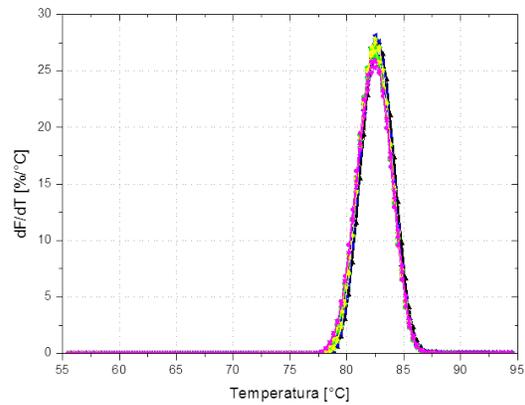
Figura G.10. Obtención de la curva estándar para el mRNA de NGF en corazón.



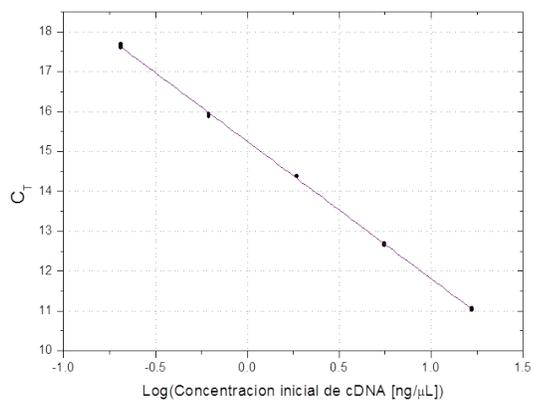
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).



(c) Curvas melting.



(d) Curva estándar.

Figura G.11. Obtención de curva estándar para mRNA de β -Actina en pulmón.

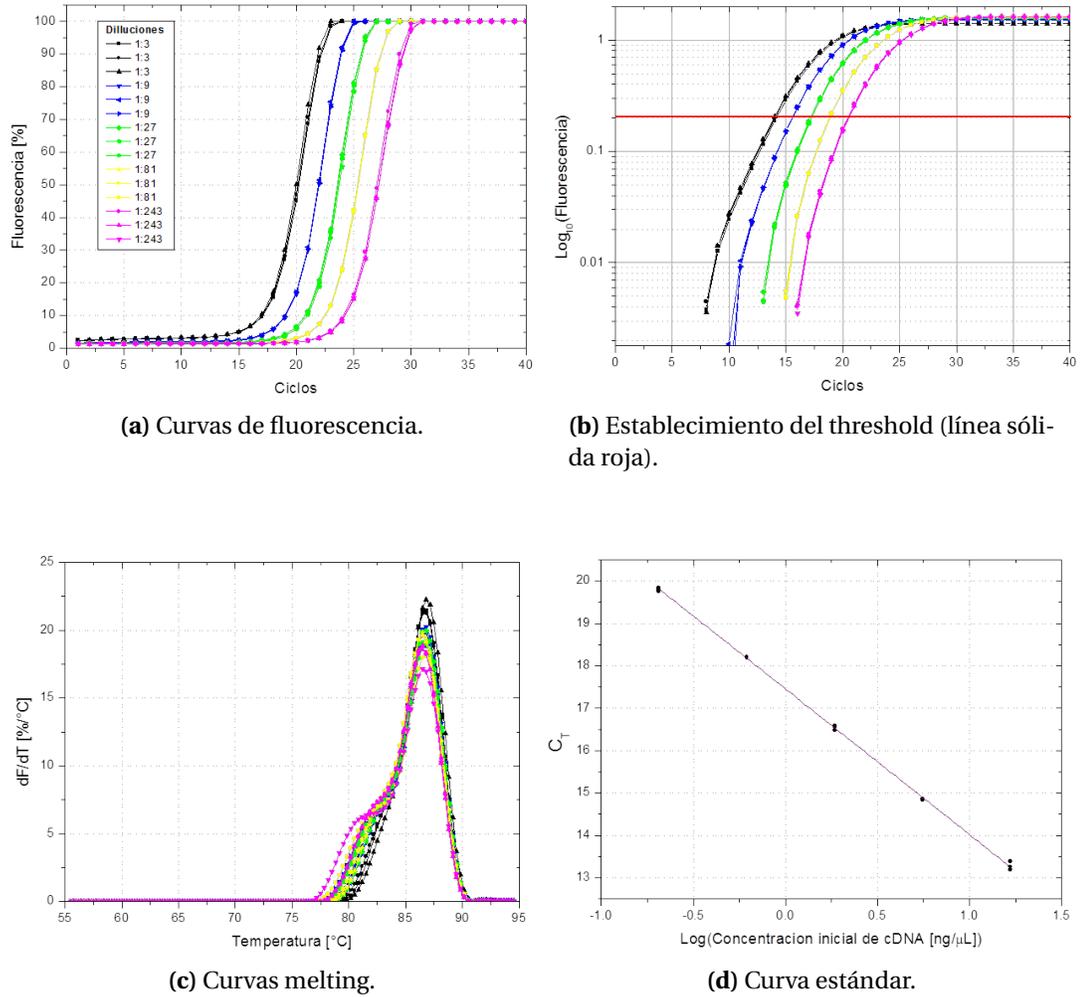
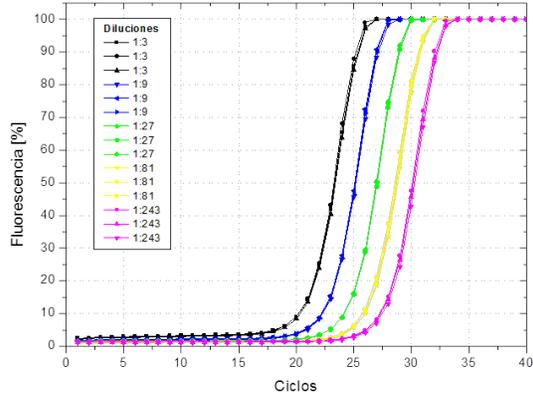
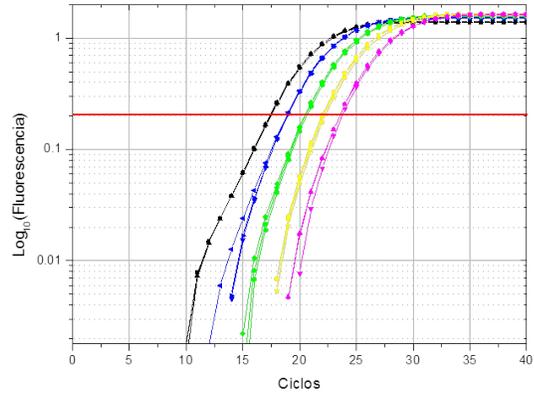


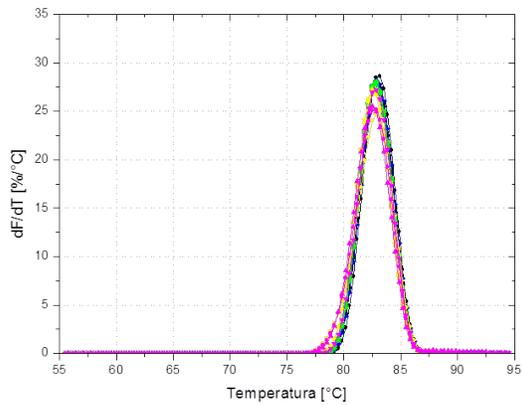
Figura G.12. Obtención de curva estándar para mRNA de GAPDH en pulmón.



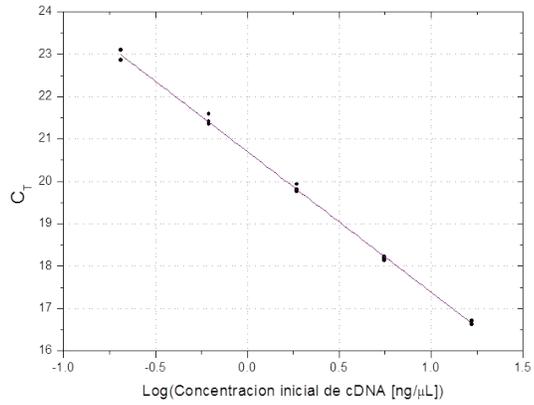
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).



(c) Curvas melting.



(d) Curva estándar.

Figura G.13. Obtención de curva estándar para mRNA de Nrf2 en pulmón.

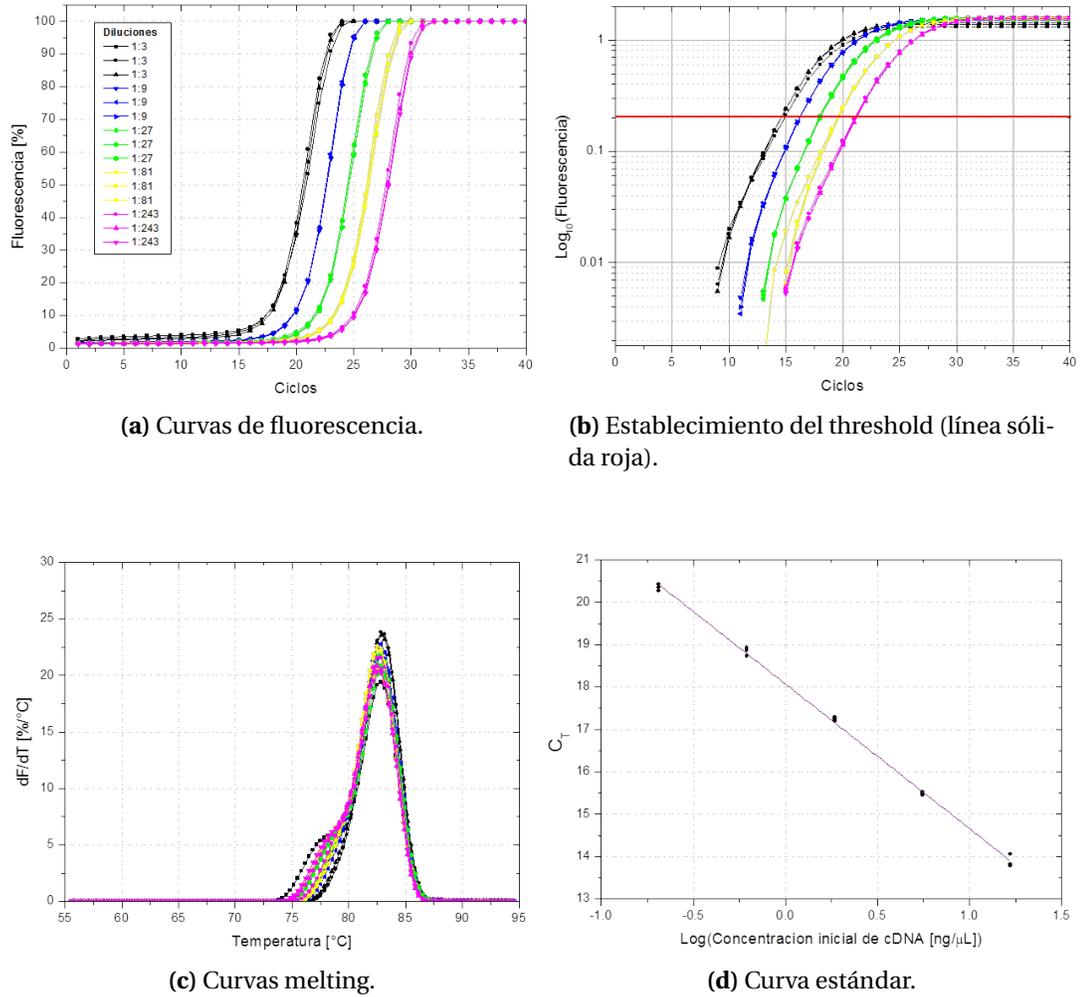
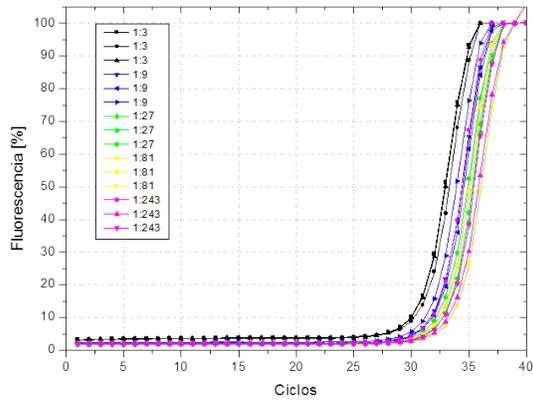
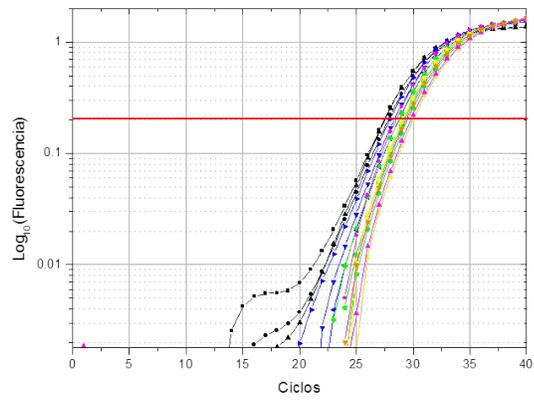


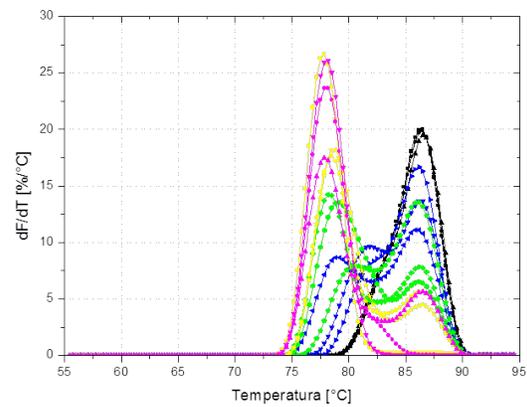
Figura G.14. Obtención de curva estándar para mRNA de Trx1 en pulmón.



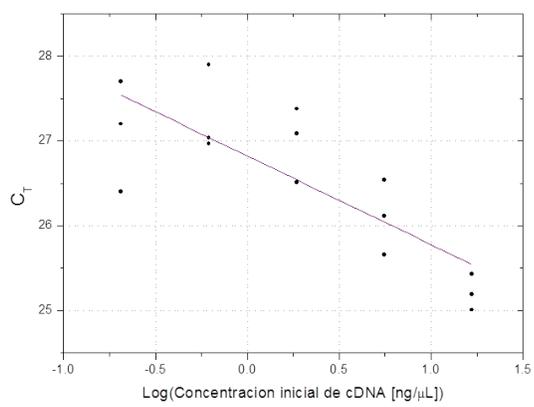
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).



(c) Curvas melting.



(d) Curva estándar.

Figura G.15. Obtención de curva estándar para mRNA de NGF en pulmón.

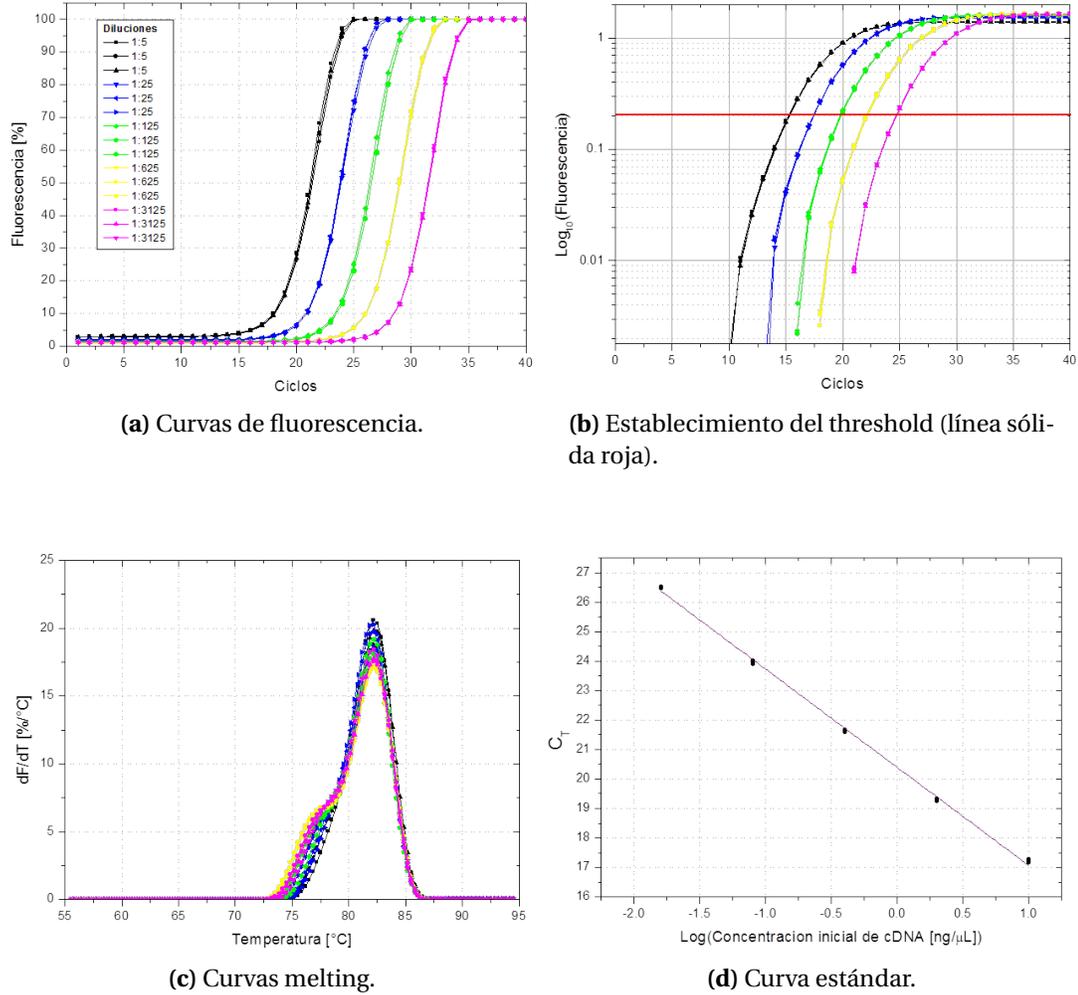
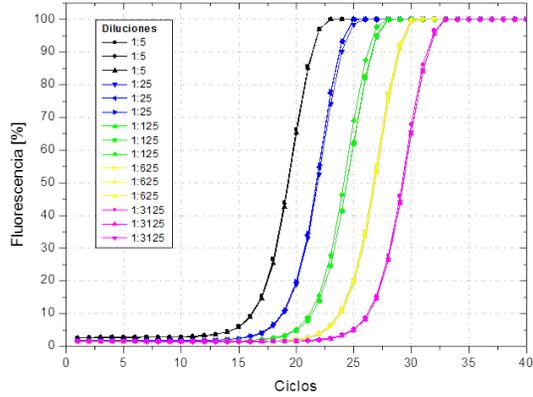
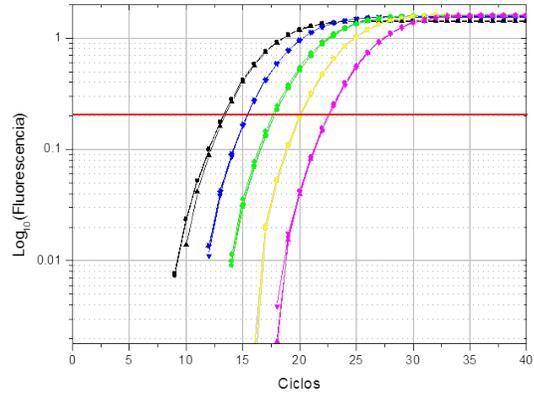


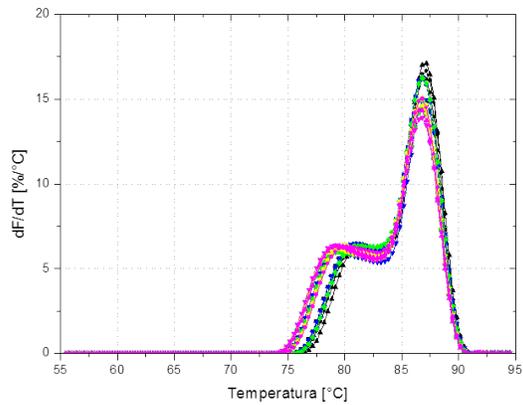
Figura G.16. Obtención de curva estándar para mRNA de β -Actina en hígado.



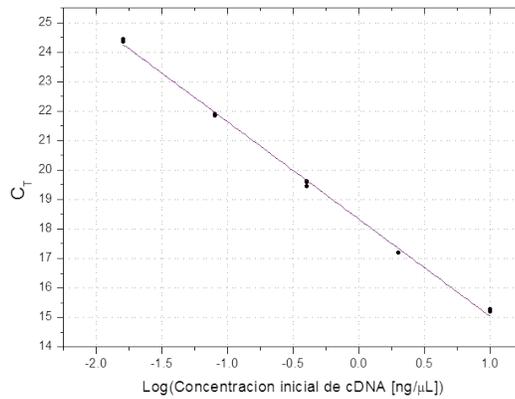
(a) Curva de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

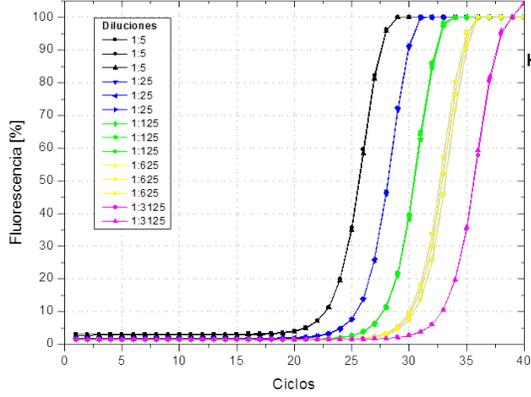


(c) Curvas melting.

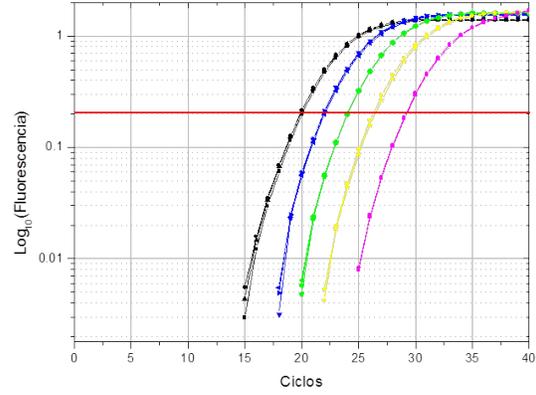


(d) Curva estándar.

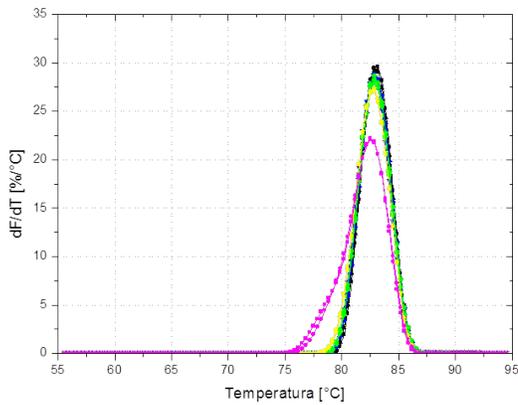
Figura G.17. Obtención de curva estándar para mRNA de GAPDH en hígado.



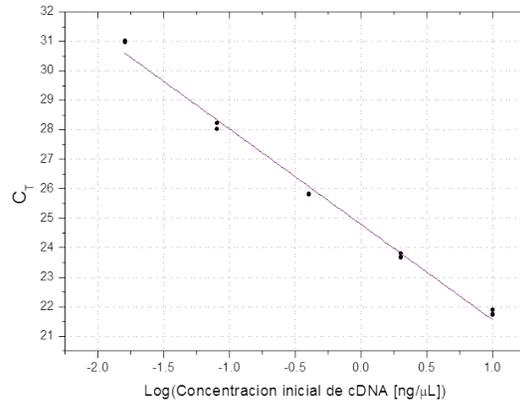
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

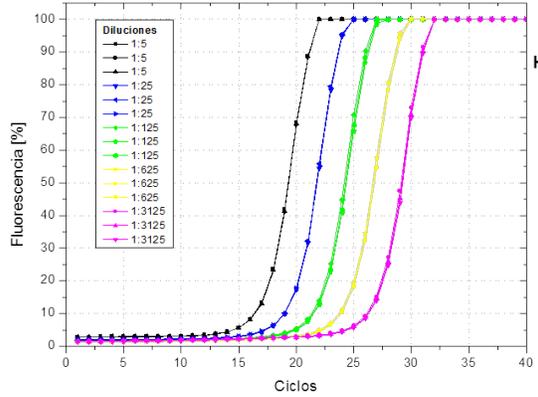


(c) Curvas melting.

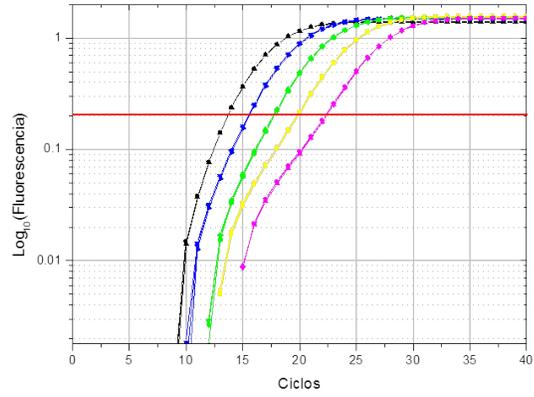


(d) Curva estándar.

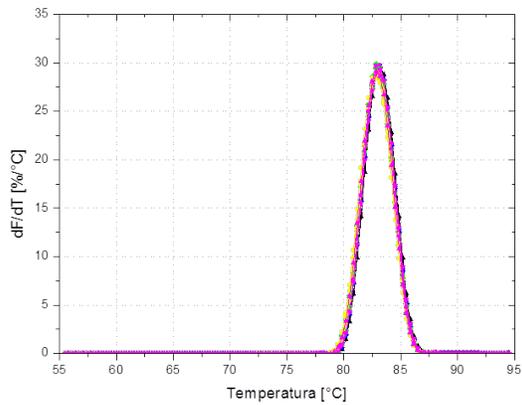
Figura G.18. Obtención de curva estándar para mRNA de Nrf2 en hígado.



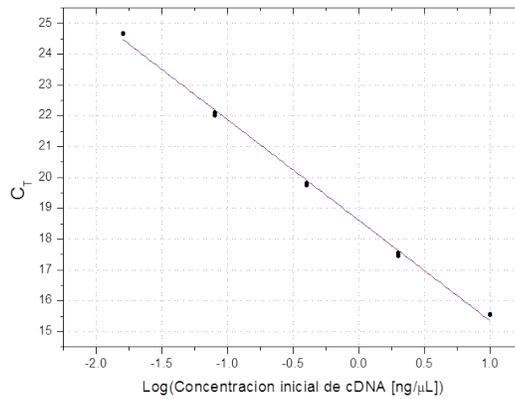
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

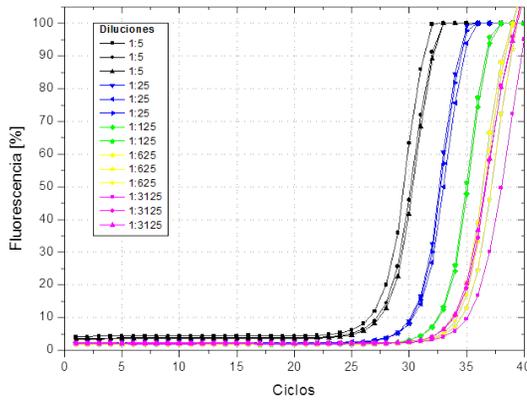


(c) Curvas melting.

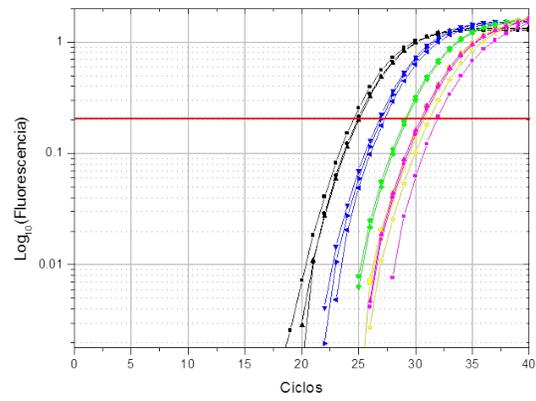


(d) Curva estándar.

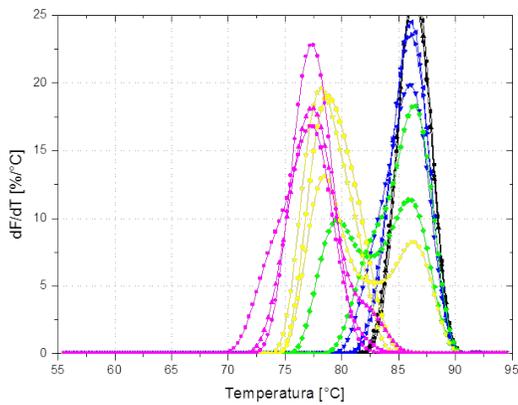
Figura G.19. Obtención de curva estándar para mRNA de Trx1 en hígado.



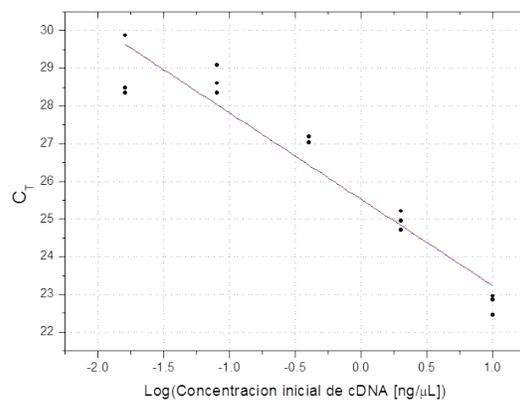
(a) Curvas de fluorescencia.



(b) Establecimiento del threshold (línea sólida roja).

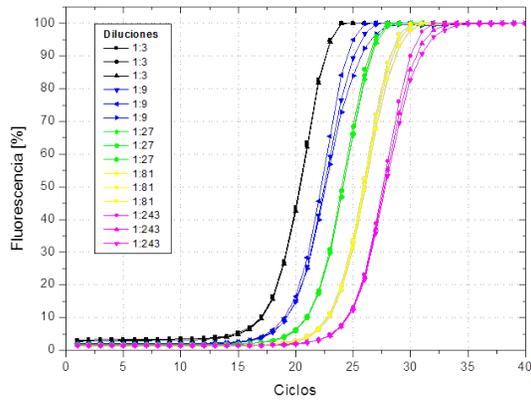


(c) Curvas melting.

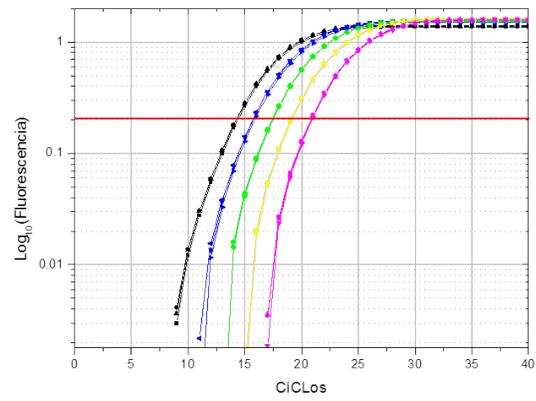


(d) Curva estándar.

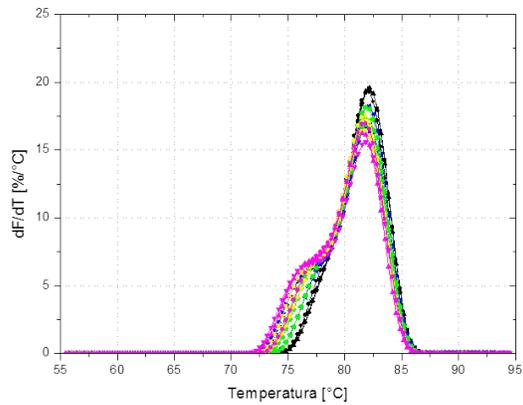
Figura G.20. Obtención de curva estándar para mRNA de NGF en hígado.



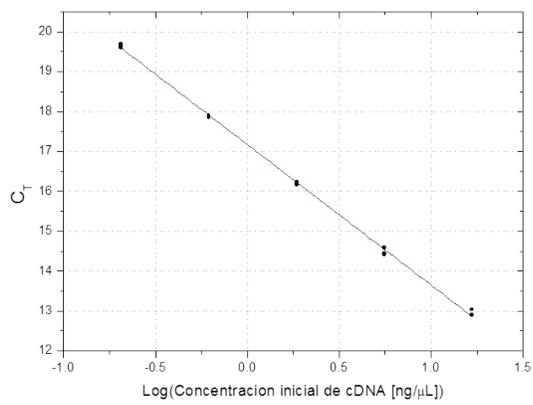
(a) Curva de Fluorescencia de cinco diluciones seriales de cDNA.



(b) Logaritmo de la señal de fluorescencia y establecimiento del threshold

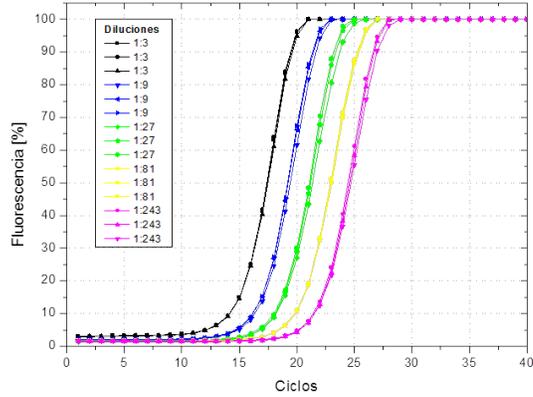


(c) Curva melting.

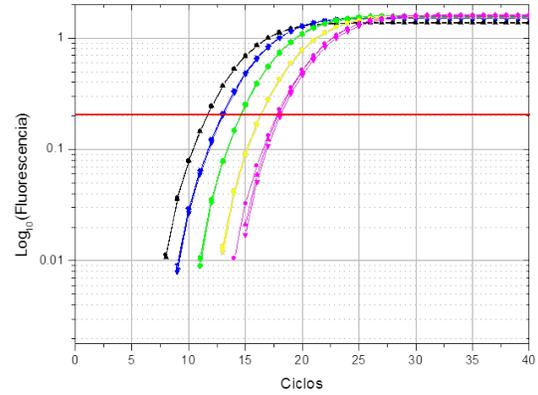


(d) Curva estándar.

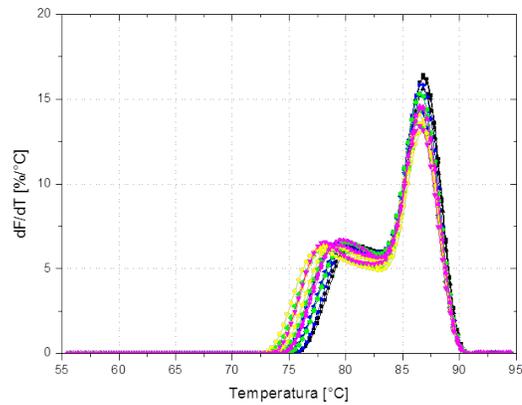
Figura G.21. Obtención de curva estándar para mRNA de β -Actinan en riñón.



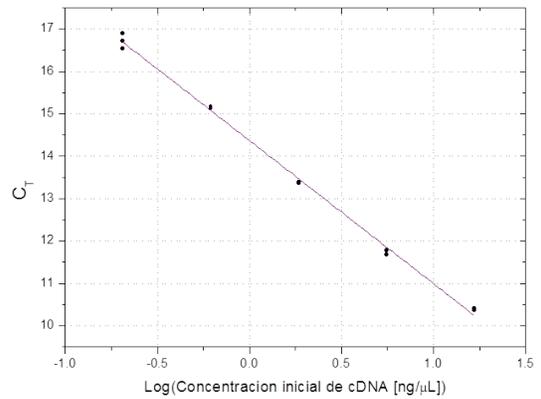
(a) Curva de Fluorescencia de cinco diluciones seriales de cDNA.



(b) Logaritmo de la señal de fluorescencia y establecimiento del threshold

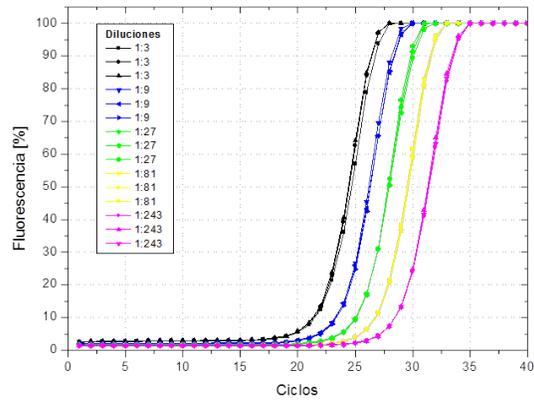


(c) Curva melting.

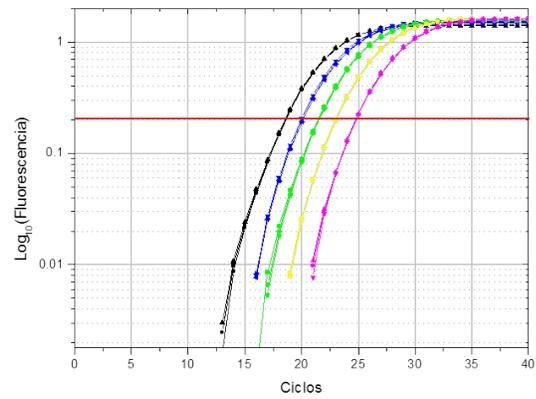


(d) Curva estándar.

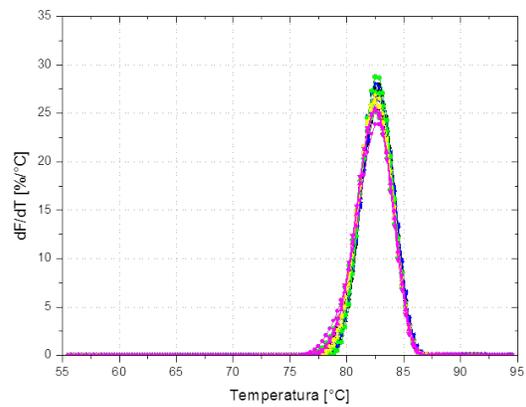
Figura G.22. Obtención de curva estándar para mRNA de GAPDH en riñón.



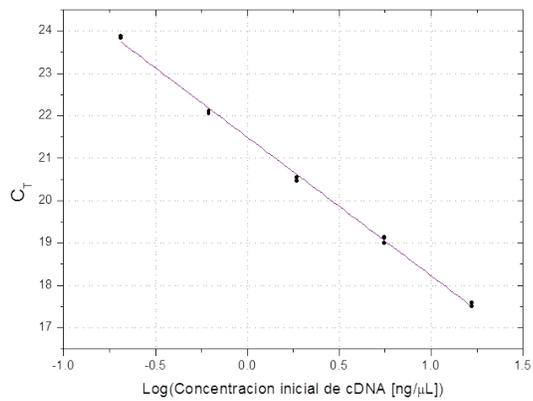
(a) Curva de Fluorescencia de cinco diluciones seriales de cDNA.



(b) Logaritmo de la señal de fluorescencia y establecimiento del threshold

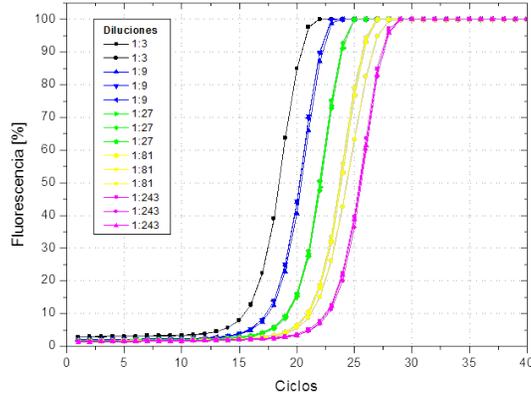


(c) Curva melting.

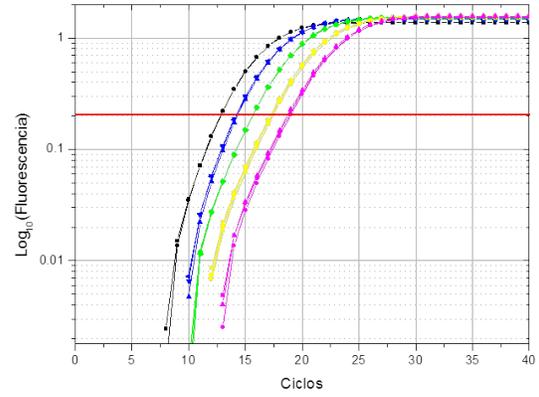


(d) Curva estándar.

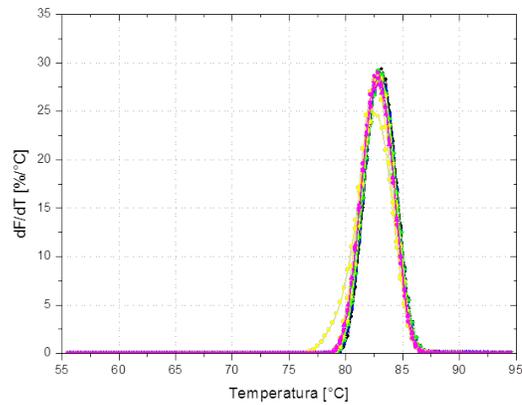
Figura G.23. Obtención de curva estándar para mRNA de Nrf2 en riñón.



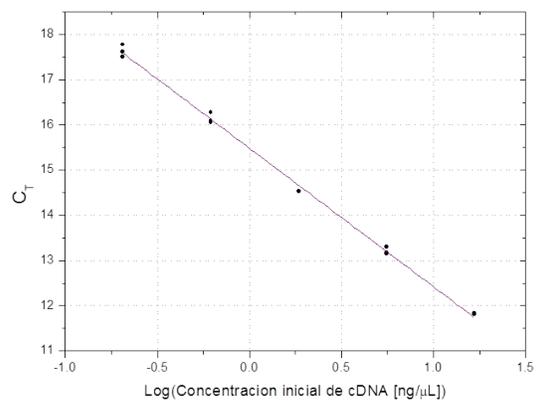
(a) Curva de Fluorescencia de cinco diluciones seriales de cDNA.



(b) Logaritmo de la señal de fluorescencia y establecimiento del threshold

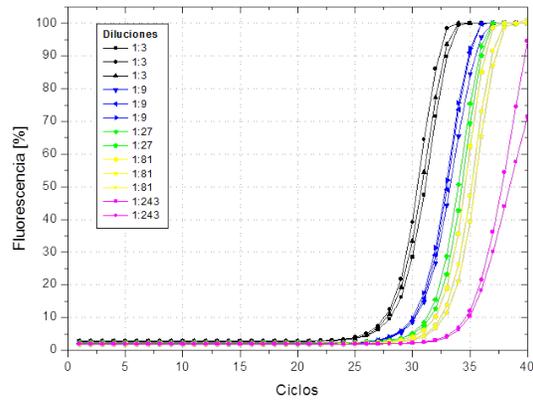


(c) Curva melting.

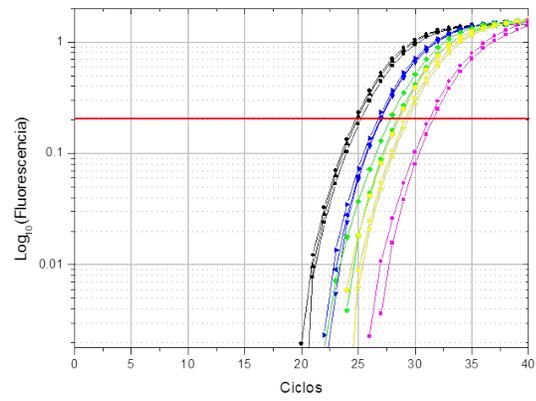


(d) Curva estándar.

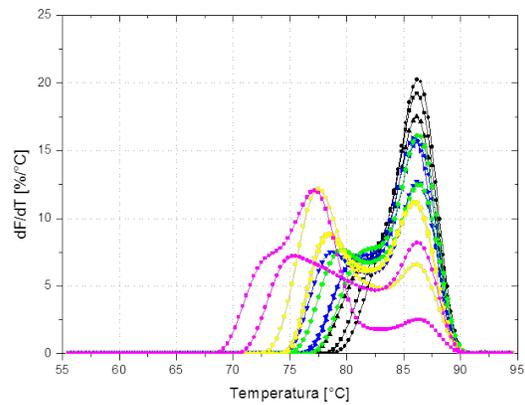
Figura G.24. Obtención de curva estándar para mRNA de Trx1 en riñón.



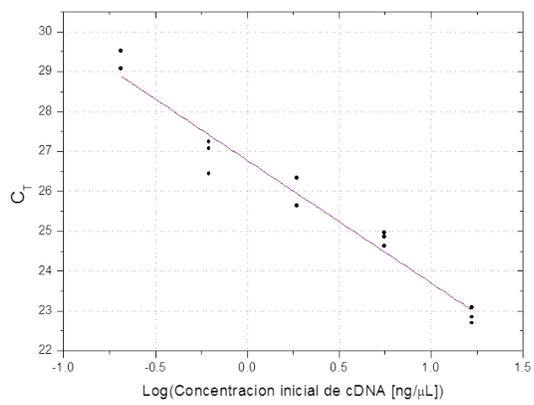
(a) Curva de Fluorescencia de cinco diluciones seriales de cDNA.



(b) Logaritmo de la señal de fluorescencia y establecimiento del threshold



(c) Curva melting.



(d) Curva estándar.

Figura G.25. Obtención de curva estándar para mRNA de NGF en riñón.



RESULTADOS DE PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

Tabla H.1. Prueba estadística a los valores de $2^{-\Delta C'_T}$ para el supuesto de normalidad.

Prueba estadística		Hipótesis					
Kolmogórov-Smornov		H_0 :La distribución de No. de copias de cDNA es normal.					
$\alpha = 0.05$		H_1 :La distribución de No. de copias de cDNA NO es normal.					
Caso		p	Decisión	Media	Desviación típica	n	
Proteína	Órgano	t					
β -Actina	CEREBRO	2h	0.992	H_0	1.05	0.18	3
		4h	0.999	H_0	1.06	0.39	2
		6h	0.945	H_0	1.06	0.17	3
		24h	0.932	H_0	0.85	0.23	4
	CORAZÓN	2h	0.978	H_0	0.76	0.21	3
		4h	0.995	H_0	0.95	0.24	3
		6h	0.787	H_0	1.03	0.09	3
		24h	0.814	H_0	1.18	0.79	3
	PULMÓN	2h	0.651	H_0	1.29	0.91	4
		4h	0.991	H_0	0.70	0.22	3
		6h	0.666	H_0	1.08	0.08	4
		24h	0.937	H_0	1.07	0.80	4
RIÑÓN	2h	0.999	H_0	1.00	0.24	2	
	4h	0.915	H_0	1.06	0.27	4	
	6h	0.999	H_0	1.12	0.35	2	
	24h	0.866	H_0	1.49	0.31	4	
GAPDH	CEREBRO	2h	1.000	H_0	1.14	0.30	3
		4h	0.999	H_0	0.76	0.03	2
		6h	0.960	H_0	1.22	0.18	3
		24h	0.998	H_0	0.83	0.17	4
	CORAZÓN	2h	0.883	H_0	0.87	0.18	3
		4h	0.999	H_0	1.06	0.22	2
		6h	0.999	H_0	1.48	0.33	3
		24h	0.978	H_0	0.97	0.40	3
	PULMÓN	2h	0.996	H_0	1.30	0.54	4
		4h	1.000	H_0	0.86	0.29	3
		6h	0.969	H_0	1.03	0.16	4
		24h	0.880	H_0	1.17	0.35	4

Tabla H.2. Prueba estadística para el supuesto de normalidad.

Prueba estadística Kolmogórov-Smornov $\alpha = 0.05$			Hipótesis H_0 :La distribución de No. de copias de cDNA es normal. H_1 :La distribución de No. de copias de cDNA NO es normal.						
Órgano	Caso		Grupo	p	Decisión	Media $\times 10^{11}$	Desviación típica $\times 10^{11}$	n	
	P. Antioxidante	t							
CEREBRO	NGF	2h	Control	0.994	H_0	2.870	0.769	4	
			Irradiado	0.894	H_0	3.788	1.727	4	
		4h	Control	0.968	H_0	2.763	0.215	3	
			Irradiado	0.989	H_0	1.897	1.265	3	
		6h	Control	0.964	H_0	2.456	0.702	4	
			Irradiado	0.999	H_0	1.920	0.246	3	
		24h	Control	1.000	H_0	2.293	1.267	4	
			Irradiado	0.994	H_0	1.990	0.937	4	
		Nrf2	2h	Control	0.967	H_0	1.392	0.604	4
				Irradiado	0.983	H_0	1.459	0.558	4
			4h	Control	0.954	H_0	2.611	0.811	3
				Irradiado	0.982	H_0	1.596	0.604	3
	6h		Control	0.887	H_0	2.615	0.859	4	
			Irradiado	0.935	H_0	2.651	0.457	3	
	24h	Control	0.982	H_0	2.820	0.329	4		
		Irradiado	0.903	H_0	2.353	0.630	4		
	Trx1	2h	Control	0.732	H_0	1.796	0.306	4	
			Irradiado	0.933	H_0	1.845	0.487	4	
		4h	Control	0.991	H_0	1.953	0.290	3	
			Irradiado	0.873	H_0	2.127	0.607	3	
		6h	Control	0.923	H_0	1.455	0.155	4	
			Irradiado	0.860	H_0	1.856	0.144	3	
		24h	Control	1.000	H_0	1.755	0.230	4	
			Irradiado	0.801	H_0	1.328	0.373	4	

Tabla H.3. Prueba estadística para el supuesto de normalidad.

Prueba estadística Kolmogórov-Smornov $\alpha = 0.05$			Hipótesis H_0 :La distribución de No. de copias de cDNA es normal. H_1 :La distribución de No. de copias de cDNA NO es normal.						
Órgano	Caso		Grupo	p	Decisión	Media $\times 10^{11}$	Desviación típica $\times 10^{11}$	n	
	P. Antioxidante	t							
CORAZÓN	NGF	2h	Control	0.991	H_0	2.616	0.980	4	
			Irradiado	0.965	H_0	2.338	0.849	3	
		4h	Control	0.997	H_0	1.301	0.520	3	
			Irradiado	0.964	H_0	1.555	0.761	4	
		6h	Control	0.925	H_0	1.453	0.530	4	
			Irradiado	0.990	H_0	1.693	0.433	3	
		24h	Control	0.986	H_0	1.773	0.539	3	
			Irradiado	0.902	H_0	1.345	0.588	4	
		Nrf2	2h	Control	0.983	H_0	3.299	1.060	4
				Irradiado	0.991	H_0	3.373	1.375	3
			4h	Control	0.973	H_0	2.200	1.255	3
				Irradiado	0.991	H_0	2.200	1.154	4
	6h		Control	0.997	H_0	2.325	1.412	4	
			Irradiado	0.926	H_0	3.513	0.986	3	
	24h	Control	0.975	H_0	1.081	0.242	3		
		Irradiado	0.849	H_0	0.793	0.240	4		
	Trx1	2h	Control	0.997	H_0	2.019	0.572	4	
			Irradiado	0.845	H_0	1.974	0.424	3	
		4h	Control	0.999	H_0	2.152	0.004	2	
			Irradiado	1.000	H_0	1.986	0.259	3	
		6h	Control	1.000	H_0	2.022	0.174	4	
			Irradiado	0.968	H_0	1.890	0.356	3	
		24h	Control	0.852	H_0	1.895	0.120	3	
			Irradiado	0.969	H_0	1.605	0.233	4	

Tabla H.4. Prueba estadística para el supuesto de normalidad.

Prueba estadística Kolmogórov-Smornov $\alpha = 0.05$			Hipótesis H_0 :La distribución de No. de copias de cDNA es normal. H_1 :La distribución de No. de copias de cDNA NO es normal.						
Órgano	Caso		Grupo	p	Decisión	Media $\times 10^{11}$	Desviación típica $\times 10^{11}$	n	
	P. Antioxidante	t							
PULMÓN	NGF	2h	Control	0.946	H_0	2.249	1.015	4	
			Irradiado	0.979	H_0	2.135	0.439	4	
		4h	Control	0.492	H_0	2.669	0.387	4	
			Irradiado	0.999	H_0	3.093	1.283	2	
		6h	Control	0.525	H_0	1.775	0.792	4	
			Irradiado	0.999	H_0	1.781	0.511	4	
		24h	Control	0.858	H_0	1.198	0.089	4	
			Irradiado	0.903	H_0	1.481	0.480	4	
		Nrf2	2h	Control	0.636	H_0	1.815	0.756	4
				Irradiado	0.995	H_0	2.263	1.342	4
			4h	Control	0.999	H_0	3.181	0.926	4
				Irradiado	0.976	H_0	2.529	0.304	3
	6h		Control	0.997	H_0	4.069	1.674	4	
			Irradiado	0.961	H_0	3.011	0.520	4	
	24h	Control	0.977	H_0	1.506	0.830	4		
		Irradiado	0.937	H_0	1.392	0.269	4		
	Trx1	2h	Control	0.776	H_0	1.593	0.604	4	
			Irradiado	0.871	H_0	1.581	0.413	4	
		4h	Control	0.992	H_0	1.992	0.491	4	
			Irradiado	1.000	H_0	1.566	0.094	3	
		6h	Control	0.868	H_0	2.018	0.410	4	
			Irradiado	0.902	H_0	2.059	0.244	4	
	24h	Control	0.999	H_0	1.340	0.455	4		
		Irradiado	0.998	H_0	1.448	0.201	4		

Tabla H.5. Prueba estadística para el supuesto de normalidad.

Prueba estadística Kolmogórov-Smornov $\alpha = 0.05$			Hipótesis H_0 :La distribución de No. de copias de cDNA es normal. H_1 :La distribución de No. de copias de cDNA NO es normal.						
Órgano	Caso		Grupo	p	Decisión	Media $\times 10^{11}$	Desviación típica $\times 10^{11}$	n	
	P. Antioxidante	t							
HÍGADO	NGF	2h	Control	0.999	H_0	0.757	0.312	2	
			Irradiado	0.941	H_0	0.989	0.373	3	
		4h	Control	0.795	H_0	0.771	0.207	3	
			Irradiado	0.949	H_0	0.986	0.314	4	
		6h	Control	0.842	H_0	0.888	0.368	3	
			Irradiado	1.000	H_0	0.622	0.303	3	
		24h	Control	0.906	H_0	0.714	0.057	4	
			Irradiado	0.976	H_0	0.652	0.216	4	
		Nrf2	2h	Control	0.999	H_0	1.160	0.169	2
				Irradiado	0.992	H_0	1.971	0.073	3
			4h	Control	0.892	H_0	0.623	0.484	3
				Irradiado	0.479	H_0	1.136	0.284	4
	6h		Control	0.953	H_0	0.884	0.495	3	
			Irradiado	0.923	H_0	0.602	0.173	3	
	24h		Control	0.807	H_0	0.723	0.311	4	
			Irradiado	0.699	H_0	1.398	0.325	4	
	Trx1		2h	Control	0.999	H_0	0.986	0.373	2
				Irradiado	1.000	H_0	1.239	0.223	3
			4h	Control	0.914	H_0	1.013	0.332	3
				Irradiado	0.426	H_0	0.901	0.279	4
		6h	Control	0.868	H_0	0.914	0.445	3	
			Irradiado	0.994	H_0	0.914	0.481	3	
		24h	Control	0.910	H_0	0.961	0.155	4	
			Irradiado	0.948	H_0	1.006	0.159	4	

Tabla H.6. Prueba estadística para el supuesto de normalidad.

Prueba estadística Kolmogórov-Smornov $\alpha = 0.05$			Hipótesis H_0 :La distribución de No. de copias de cDNA es normal. H_1 :La distribución de No. de copias de cDNA NO es normal.						
Órgano	Caso		Grupo	p	Decisión	Media $\times 10^{11}$	Desviación típica $\times 10^{11}$	n	
	P. Antioxidante	t							
RIÑÓN	NGF	2h	Control	0.932	H_0	4.627	1.586	4	
			Irradiado	1.000	H_0	7.605	2.148	3	
		4h	Control	0.459	H_0	4.556	1.066	4	
			Irradiado	0.970	H_0	4.984	1.065	3	
		6h	Control	0.793	H_0	4.133	0.555	4	
			Irradiado	0.874	H_0	4.266	2.015	4	
		24h	Control	0.997	H_0	2.619	0.309	4	
			Irradiado	0.866	H_0	4.056	1.977	4	
		Nrf2	2h	Control	0.991	H_0	2.154	0.771	4
				Irradiado	0.993	H_0	2.270	0.710	3
			4h	Control	0.935	H_0	1.976	0.790	4
				Irradiado	0.915	H_0	2.161	0.155	4
	6h		Control	0.911	H_0	1.535	0.336	3	
			Irradiado	0.984	H_0	1.505	0.360	4	
	24h		Control	0.952	H_0	1.068	0.298	4	
			Irradiado	0.975	H_0	1.555	0.538	4	
	Trx1		2h	Control	0.960	H_0	0.995	0.269	4
				Irradiado	0.803	H_0	1.152	0.173	3
			4h	Control	0.984	H_0	0.997	0.372	4
				Irradiado	0.997	H_0	0.966	0.182	4
		6h	Control	0.975	H_0	1.202	0.153	3	
			Irradiado	0.923	H_0	0.944	0.253	4	
		24h	Control	0.903	H_0	1.143	0.092	4	
			Irradiado	0.993	H_0	1.130	0.299	4	

Tabla H.7. Prueba de Levene resolver el supuesto de varianzas iguales y prueba *t* o *t'* para comprar las medias del No. de copias de cDNA de ratones irradiados vs ratones controles. Para esta última prueba, en los casos en que $p < \alpha = 0.05$, \Rightarrow se marcó * en su gráfica de No. de copias de cDNA, y ** para los casos en que $p < \alpha = 0.01$.

			Prueba estadística	Hipótesis	Prueba estadística		Hipótesis	
			Levene	H_0 : Varianzas iguales.	<i>t</i>	<i>t'</i>	H_0 : Las media del No. de copias de cDNA son iguales.	
			$\alpha = 0.05$	H_1 : Varianzas diferentes.	$\alpha = 0.05$		H_1 : Una de las medias del No. de copias de cDNA es mayor que la otra.	
Órgano	Caso P. Antioxidante	t	p	Decisión	p(unidireccional)		Decisión	
CEREBRO	NGF	2h	0.002	H_1	0.1845		H_0	
		4h	0.084	H_0	0.1535		H_0	
		6h	0.014	H_1	0.1155		H_0	
		24h	0.594	H_0	0.3570		H_0	
	Nrf2	2h	0.948		H_0	0.4380		H_0
		4h	0.534		H_0	0.0785		H_0
		6h	0.055		H_0	0.4755		H_0
		24h	0.373		H_0	0.1190		H_0
	Trx1	2h	0.351		H_0	0.4350		H_0
		4h	0.155		H_0	0.3380		H_0
		6h	0.963		H_0	0.0085		$H_1 \Rightarrow **$
		24h	0.498		H_0	0.0495		$H_1 \Rightarrow *$

Tabla H.8. Prueba de Levene resolver el supuesto de varianzas iguales y prueba t o t' para comparar las medias del No. de copias de cDNA de ratones irradiados vs ratones controles.

			Prueba estadística	Hipótesis	Prueba estadística		Hipótesis
			Levene	H_0 : Varianzas iguales.	T	T'	H_0 : Las media del No. de copias de cDNA son iguales.
			$\alpha = 0.05$	H_1 : Varianzas diferentes.	$\alpha = 0.05$		H_1 : Una de las medias del No. de copias de cDNA es mayor que la otra.
Órgano	Caso P. Antioxidante	t	p	Decisión	p(unidireccional)		Decisión
CORAZÓN	NGF	2h	0.965	H_0	0.3560		H_0
		4h	0.684	H_0	0.3215		H_0
		6h	0.251	H_0	0.2760		H_0
		24h	0.905	H_0	0.1850		H_0
	Nrf2	2h	0.593	H_0	0.4690		H_0
		4h	0.786	H_0	0.4935		H_0
		6h	0.302	H_0	0.1360		H_0
		24h	0.607	H_0	0.0890		H_0
	Trx1	2h	0.701	H_0	0.4570		H_0
		4h	0.201	H_0	0.2260		H_0
		6h	0.186	H_0	0.2690		H_0
		24h	0.042	H_1		0.0585	H_0

Tabla H.9. Prueba de Levene resolver el supuesto de varianzas iguales y prueba T o T' para comparar las medias del No. de copias de cDNA de ratones irradiados vs ratones controles.

			Prueba estadística		Hipótesis		Prueba estadística		Hipótesis	
			Levene		H_0 : Varianzas iguales.		T	T'	H_0 : Las media del No. de copias de cDNA son iguales.	
			$\alpha = 0.05$		H_1 : Varianzas diferentes.		$\alpha = 0.05$		H_1 : Una de las medias del No. de copias de cDNA es mayor que la otra.	
Órgano	Caso P. Antioxidante	t	p	Decisión		p(unidireccional)		Decisión		
PULMÓN	NGF	2h	0.290	H_0		0.4215		H_0		
		4h	0.013	H_1			0.3610	H_0		
		6h	0.440	H_0		0.4945		H_0		
		24h	0.015	H_1			0.1625	H_0		
	Nrf2	2h	0.408	H_0		0.2910		H_0		
		4h	0.279	H_0		0.1510		H_0		
		6h	0.094	H_0		0.1365		H_0		
		24h	0.149	H_0		0.4015		H_0		
	Trx1	2h	0.533	H_0		0.4870		H_0		
		4h	0.196	H_0		0.1035		H_0		
		6h	0.057	H_0		0.4360		H_0		
		24h	0.092	H_0		0.3390		H_0		

Tabla H.10. Prueba de Levene resolver el supuesto de varianzas iguales y prueba T o T' para comprar las medias del No. de copias de cDNA de ratones irradiados vs ratones controles. Para esta última prueba, en los casos en que p fue $< \alpha = 0.05$, \Rightarrow se marcó * en su gráfica de No. de copias de cDNA, y ** para los casos en que p fue $< \alpha = 0.01$.

			Prueba estadística	Hipótesis	Prueba estadística	Hipótesis
			Levene	H_0 : Varianzas iguales.	T	T'
			$\alpha = 0.05$	H_1 : Varianzas diferentes.	$\alpha = 0.05$	H_0 : Las media del No. de copias de cDNA son iguales. H_1 : Una de las medias del No. de copias de cDNA es mayor que la otra.
Órgano	Caso P. Antioxidante	t	p	Decisión	p(unidireccional)	Decisión
HÍGADO	NGF	2h	0.615	H_0	0.2615	H_0
		4h	0.631	H_0	0.1775	H_0
		6h	0.564	H_0	0.1940	H_0
		24h	0.070	H_0	0.3015	H_0
	Nrf2	2h	0.077	H_0	0.0020	$H_1 \Rightarrow **$
		4h	0.246	H_0	0.0670	H_0
		6h	0.114	H_0	0.2020	H_0
		24h	0.881	H_0	0.0120	$H_1 \Rightarrow *$
	Trx1	2h	0.313	H_0	0.1995	H_0
		4h	0.694	H_0	0.3235	H_0
		6h	0.967	H_0	0.4995	H_0
		24h	0.962	H_0	0.3490	H_0

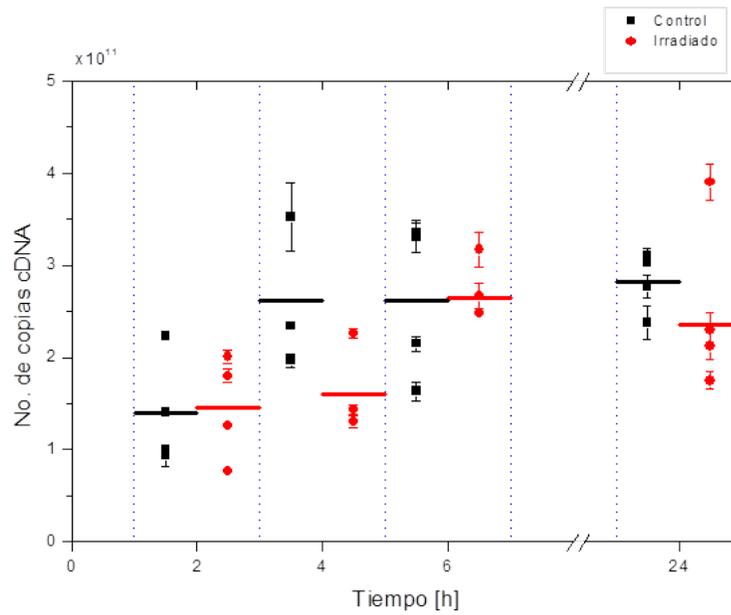
Tabla H.11. Prueba de Levene resolver el supuesto de varianzas iguales y prueba T o T' para comprar las medias del No. de copias de cDNA de ratones irradiados vs ratones controles. Para esta última prueba, en los casos en que p fue $< \alpha = 0.05$, \Rightarrow se marcó * en su gráfica de No. de copias de cDNA.

			Prueba estadística	Hipótesis	Prueba estadística		Hipótesis
			Levene	H_0 : Varianzas iguales.	T	T'	H_0 : Las media del No. de copias de cDNA son iguales.
			$\alpha = 0.05$	H_1 : Varianzas diferentes.	$\alpha = 0.05$		H_1 : Una de las medias del No. de copias de cDNA es mayor que la otra.
Órgano	Caso P. Antioxidante	t	p	Decisión	p(unidireccional)		Decisión
RIÑÓN	NGF	2h	0.841	H_0	0.0435		$H_1 \Rightarrow *$
		4h	0.986	H_0	0.3105		H_0
		6h	0.118	H_0	0.4515		H_0
		24h	0.000	H_1		0.1210	H_0
	Nrf2	2h	0.964	H_0	0.4235		H_0
		4h	0.008	H_1		0.3375	H_0
		6h	0.604	H_0	0.4565		H_0
		24h	0.385	H_0	0.0825		H_0
	Trx1	2h	0.570	H_0	0.2110		H_0
		4h	0.048	H_1		0.4430	H_0
		6h	0.118	H_0	0.0915		H_0
		24h	0.167	H_0	0.4670		H_0

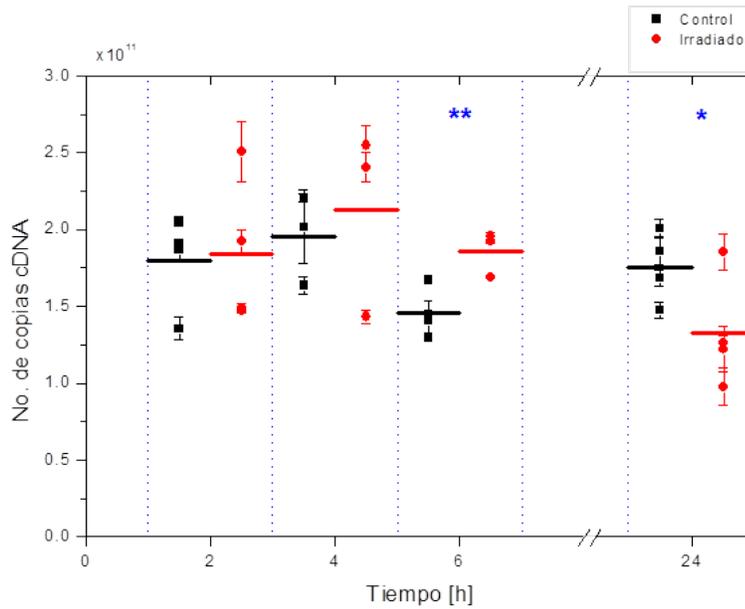


**CURSO TEMPORAL DEL NÚMERO DE COPIAS
DE cDNA DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES:
NRF2, TRX1 Y NGF.**

APÉNDICE I. CURSO TEMPORAL DEL NÚMERO DE COPIAS DE CDNA DE PROTEÍNAS ANTIOXIDANTES: NRF2, TRX1 Y NGE

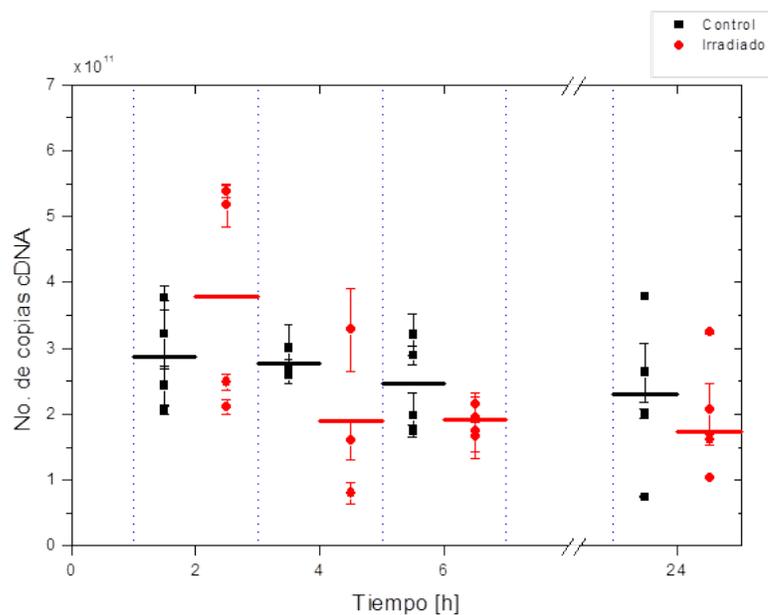


(a) CEREBRO, Nrf2.



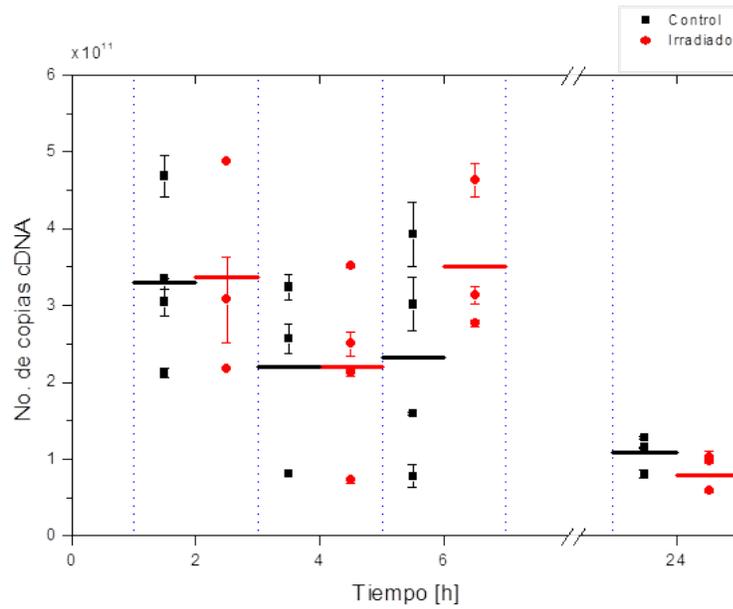
(b) CEREBRO, Trx1.

Figura I.1. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en cerebro de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de las réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.2).

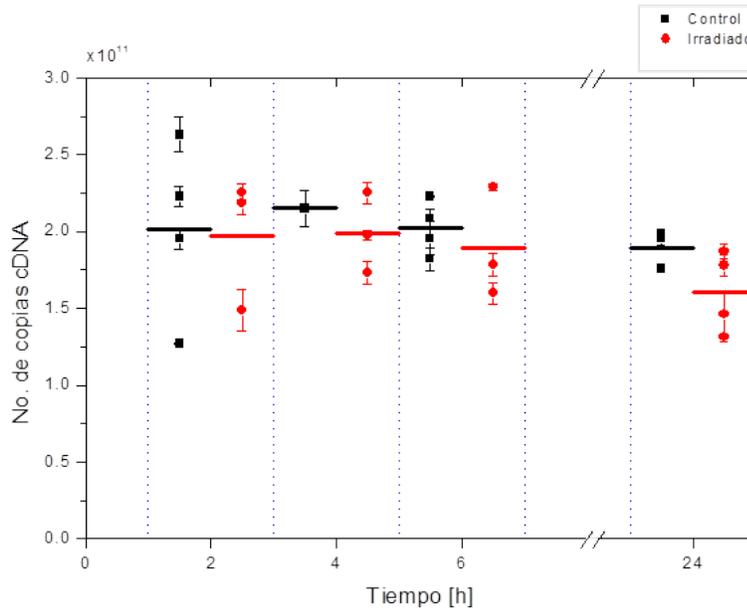


(a) CEREBRO, NGF.

Figura I.2. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en cerebro de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste a la desviación estándar de las dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.2).

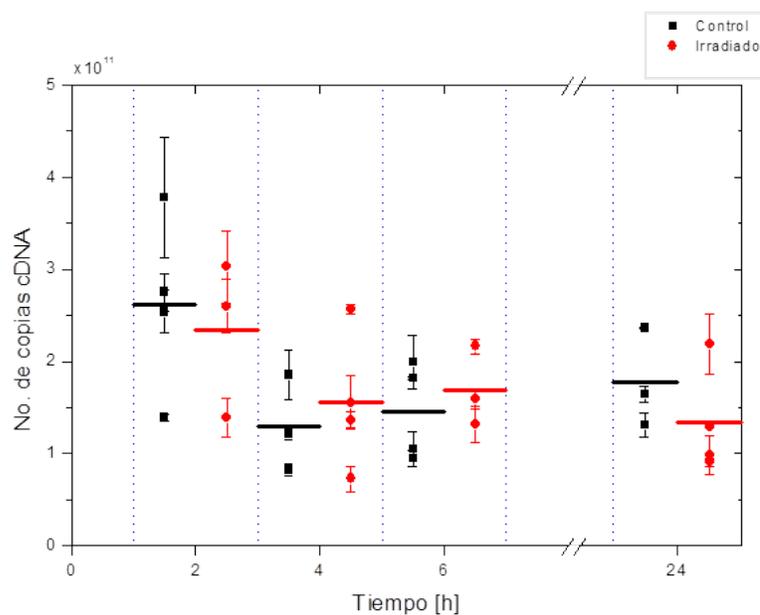


(a) CORAZÓN, Nrf2.



(b) CORAZÓN, Trx1.

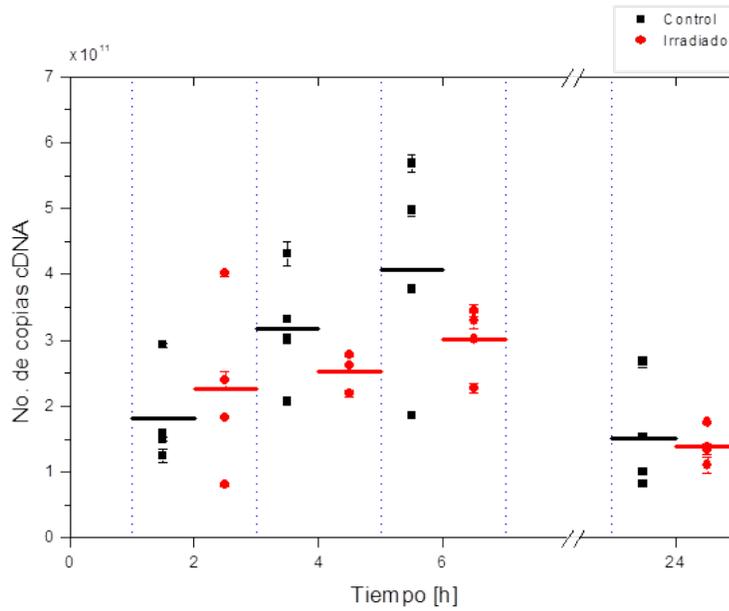
Figura I.3. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en corazón de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.3).



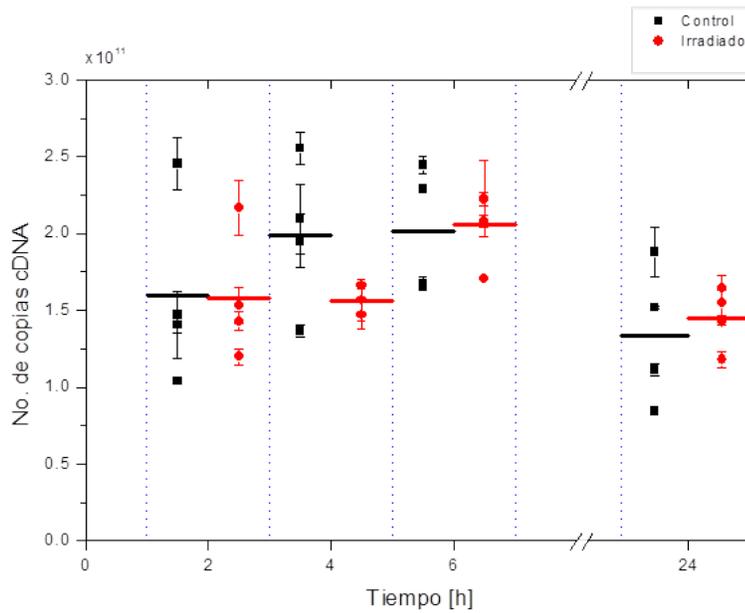
(a) CORAZÓN, NGF.

Figura I.4. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en corazón de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.3).

APÉNDICE I. CURSO TEMPORAL DEL NÚMERO DE COPIAS DE CDNA DE PROTEÍNAS
ANTIOXIDANTES: NRF2, TRX1 Y NGE

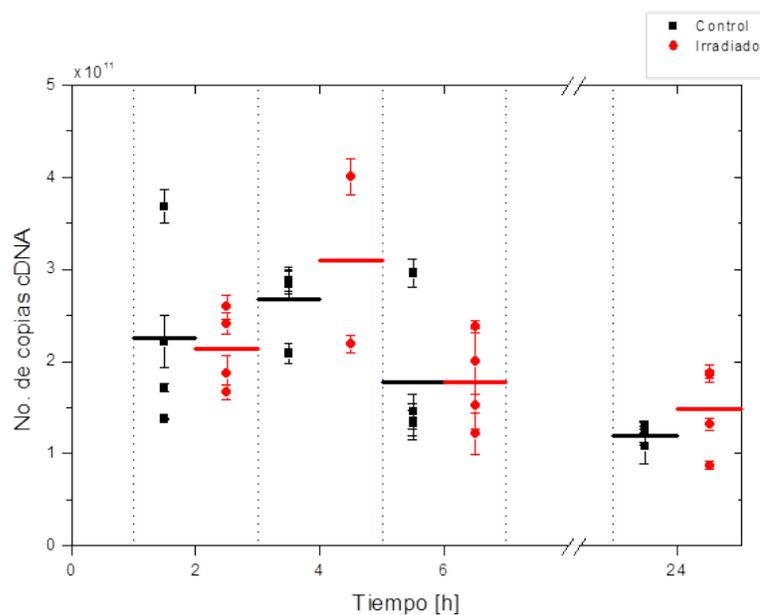


(a) PULMÓN, Nrf2.



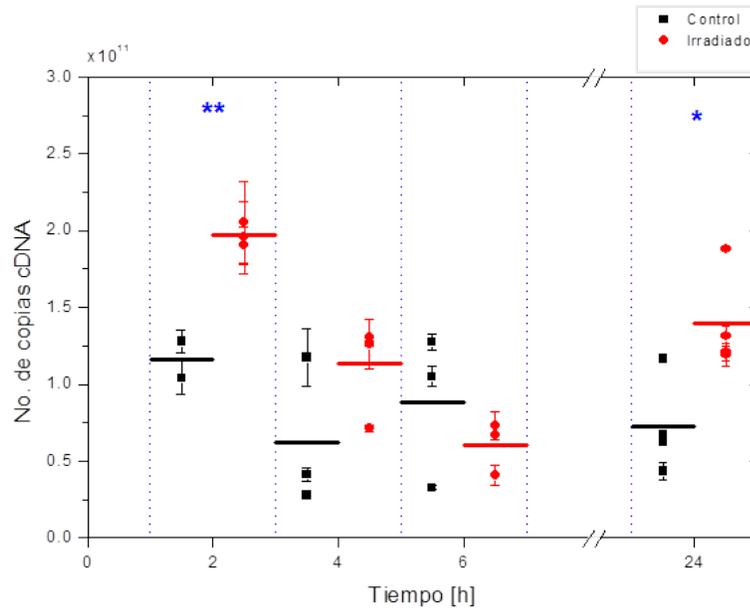
(b) PULMÓN, Trx1.

Figura I.5. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en pulmón de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.4).

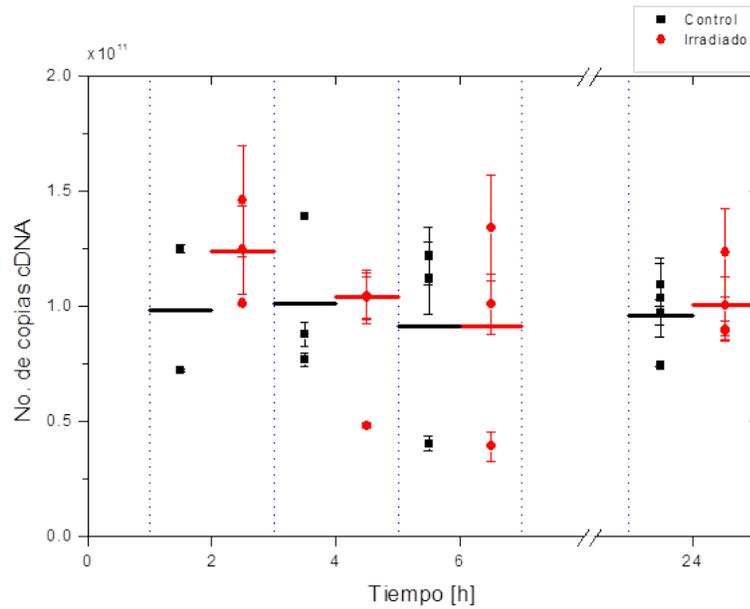


(a) PULMÓN, NGF.

Figura I.6. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en pulmón de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.4).

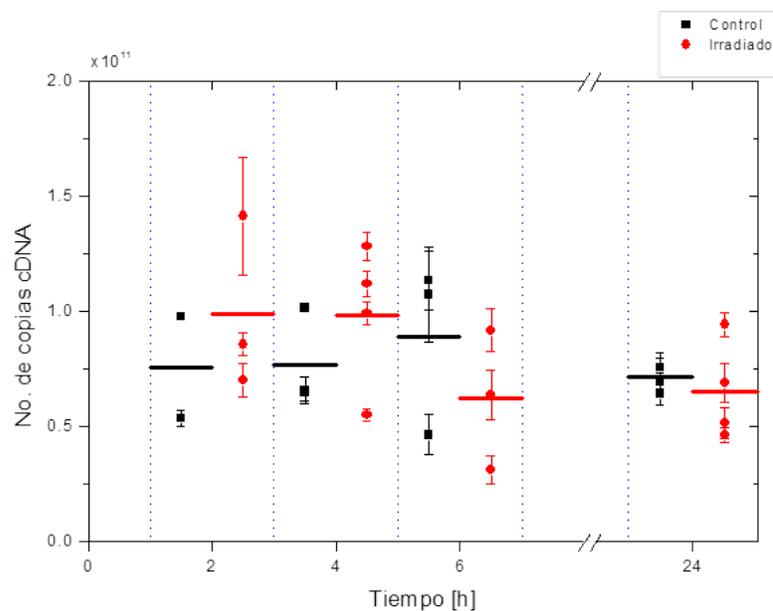


(a) HÍGADO, Nrf2.



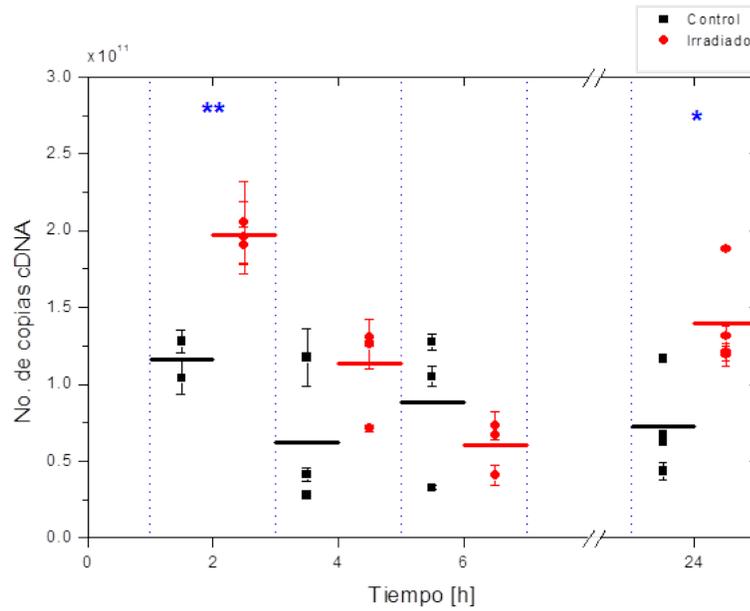
(b) HÍGADO, Trx1.

Figura I.7. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en hígado de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.5).

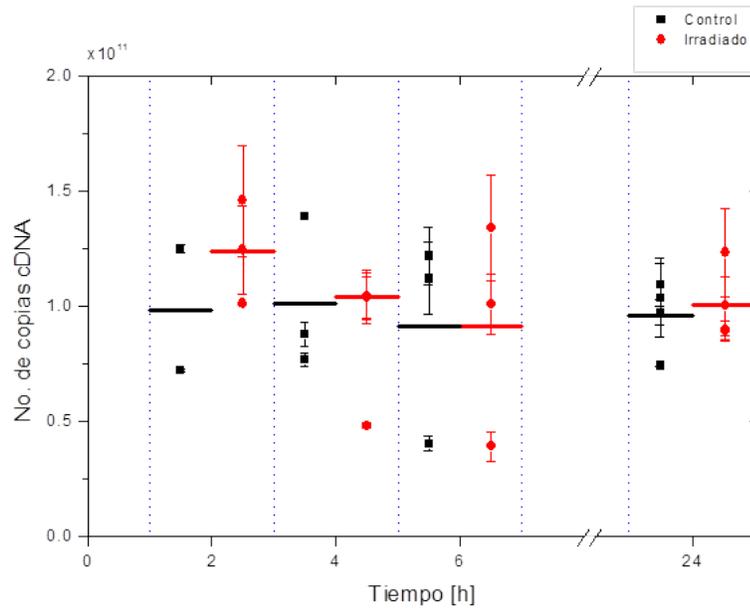


(a) HÍGADO, NGF.

Figura I.8. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en hígado de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.5).

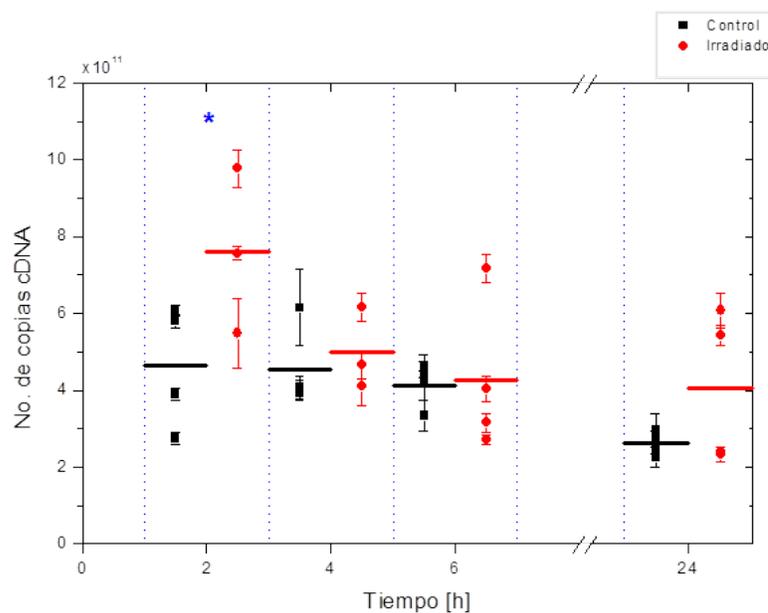


(a) RIÑÓN, Nrf2.



(b) RIÑÓN, Trx1.

Figura I.9. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en riñón de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste a la desviación estándar de las dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.6).



(a) RIÑÓN, NGF.

Figura I.10. Curso temporal post-irradiación del número de copias de cDNA del mRNA de los genes estudiados, en riñón de ratones irradiados y controles. El símbolo corresponde al valor y la barra vertical en éste, a la desviación estándar de dos réplicas técnicas. La barra horizontal es la media de los valores por hora (ver Tabla H.6).