

00362



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

**“Inducción de entrecruzamientos  
ADN-proteína en linfocitos de mamífero  
producidos por radiación ionizante”**

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

P R E S E N T A:  
Jazmín Judith Roa Solís

Directoras de Tesis:

Dra. María Isabel Gamboa de Buen, ICN, UNAM  
Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte, IIB, UNAM

Comité tutorial:

Dra. Maria Ester Brandan Siqués, IF, UNAM  
Dra. María Isabel Gamboa de Buen, ICN, UNAM  
Dra. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte, IIB, UNAM

pcf

posgrado en ciencias físicas  
u n a m

2005

m. 347216



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*Dedico este trabajo a mis padres, a mis hermanos,  
Y a todas aquellas personas que han destinado su vida,  
para que otras puedan acceder a una mejor.*

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a las personas que formaron parte de mi Comité Tutorial; porque durante este tiempo fueron tutoras, guías y amigas, Dra. María Isabel Gamboa de Buen, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Dra. María Ester Brandan Siqués: Mil gracias por haber aceptado dirigir este trabajo de tesis de manera conjunta, por toda su ayuda, consejos, confianza, paciencia, y el tiempo dedicado a este proyecto.

A quienes aceptaron ser parte de mi Comité Sinodal, M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos, Dra. Patricia Ostrosky, Dra. Alicia Negrón. Mi agradecimiento por el esfuerzo y dedicación para que este trabajo resultara mejor y por que yo obtuviera un mejor entendimiento del tema.

A todos los profesores de la maestría, porque siempre dieron lo mejor en todas sus clases, en especial a los doctores Hugo Aréchiga y Rodolfo Díaz Perches, porque a través de su pasión por la biología y la medicina me motivaron a realizar un trabajo de radiobiología.

Al Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del IIBM por permitirme utilizar sus recursos para realizar el trabajo experimental. A todos los integrantes del laboratorio, en especial a los biólogos Jorge Limón, Wendy García, Danny Molina, M. en C. Patricia Suárez Guzmán, y MVZ Luis Serrano por su amistad y por apoyarme académica y técnicamente durante la realización de este trabajo.

Al Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM por permitirme utilizar sus instalaciones en la dosimetría, irradiación y por todas las facilidades como estudiante asociado.

A Octavio Valenzuela, Oscar Angeles, Eurídice Rioja, Mariana Hernández, Porfirio Díaz, Miguel Rodríguez, Héctor Galván, Miriam Rebolgar, Héctor Alva, Olinca Galván, Alfonso Gastelum y Adonay Marquina por todos los momentos que compartimos, por su apoyo y amistad.

A Martín, por los momentos compartidos.

A las personas que siempre me han recibido con una sonrisa: Ana Elena Buenfil, Fernando Iturbe, Rubén Alfaro, Mercedes Rodríguez, Arnulfo Martínez, César Ruiz, Bertha Milla, Tere, Marcela, Juan Morales, Karim López, José Manuel López, Roberto Hernández, Gerardo Pacheco y Sandrita.

A CONACYT, a DGEP y al PCF por el apoyo económico que me brindaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por albergarme durante todo este tiempo...

“Según vamos adquiriendo conocimiento,  
las cosas no se hacen más comprensibles,  
sino más misteriosas”  
- Albert Schweitzer -

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: German Rosa Solís

FECHA: 24 agosto 2005

FIRMA: [Firma]

## Introducción

i

## Capítulo I: Física de la interacción de la radiación con la materia

1.1	Radiación	1
1.2	Interacción de la radiación con la materia	2
1.2.1	Efecto Fotoeléctrico	3
1.2.2	Efecto Compton	4
1.2.3	Producción de Pares	5
1.3	Descripción del haz de fotones	7
1.3.1	Coeficientes lineales de atenuación ( $\mu$ ) y de absorción de energía ( $\mu_{en}$ )	7
1.3.2	Fluencia	8
1.3.3	Fluencia en energía	8
1.4	Conceptos de dosimetría	8
1.4.1	Depósito de energía: Dosis absorbida	9
1.4.2	Kerma	9
1.4.3	Equilibrio de partícula cargada	10
1.4.4	Transferencia Lineal de Energía (LET)	11
1.5	Dosímetro Fricke	11
1.6	Dosímetros Termoluminiscentes	13
1.6.1	Física del proceso termoluminiscente	14
1.6.2	Características de los dosímetros termoluminiscentes LiF: Mg,Ti (TLD-100)	15
1.7	Cuantificación de las moléculas contenidas en una muestra a través de su fluorescencia emitida: Uso del fluorómetro	17
1.8	Aplicación de las radiaciones ionizantes en seres vivos: Surgimiento de la radiobiología	18

## Capítulo II: ADN y daño producido por agentes tóxicos

2.1	Ciclo celular	21
2.2	Estructura del Acido Desoxirribunocleico (ADN)	23
2.3	Daño físico inicial producido por radiación ionizante	25
2.4	Daño celular por radiación ionizante	28
2.5	Rompimiento único de cadena (SSB)	29
2.6	Rompimiento doble de cadena (DSB)	30
2.7	Entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC)	31
2.7.1	Efecto de la cromatina	32

2.7.2	Efecto de la temperatura	33
2.7.3	Efecto de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	33
2.8	Cuantificación del daño celular por radiación: Curvas de Dosis-Respuesta	35
2.9	Reparación de las lesiones en el ADN	36
2.9.1	Reparación durante la división celular	36

### **Capítulo III : Metodología y Técnicas empleadas**

3.1	Planteamiento del problema	38
3.1.2	Hipótesis	39
3.1.3	Objetivos	39
3.2	Calibración del irradiador GammaCell 200	39
3.2.1	Determinación de la tasa de dosis del irradiador GammaCell 200	40
3.2.2	Determinación de la dosis de tránsito	41
3.3	Calibración del Fluorómetro	44
3.4	Obtención y conteo de la muestra	48
3.5	Irradiación de la muestra	48
3.6.	Protocolo para el aislamiento de los fragmentos de ADN entrecruzado con proteínas	49
3.7	Determinación del ADN entrecruzado con proteínas	50

### **Capítulo IV : Resultados**

4.1.1	Irradiación en normoxia	52
4.1.2	Irradiación en condiciones hipóxicas	55
4.2	Determinación de la viabilidad celular como función del burbujeo realizado a la muestra	58
4.3	Protocolo para determinar el grado de oxidación celular	59
	Resumen del Capítulo IV	63

### **Capítulo V : Discusión y Conclusiones**

<b>Referencias</b>	68
--------------------	----

<b>Apéndice</b>	72
-----------------	----

# Introducción

La utilización de la radiación con fines terapéuticos comenzó a principios del siglo XX. Desde entonces, una de las fuentes de radiación que son empleadas en los hospitales es la de  $^{60}\text{Co}$  que emite radiación  $\gamma$ . En la actualidad, gran parte de las terapias de tratamiento en pacientes con cáncer está basada en los resultados obtenidos de las curvas de dosis-respuesta para el tipo de célula por irradiar, su ciclo celular y las condiciones físicas y químicas que las rodean (presencia de oxígeno), así como del tipo de radiación por utilizar, por lo que resulta importante conocer el mecanismo de interacción de la radiación con los tejidos celulares.

Desde el punto de vista biológico, aunque los diferentes tipos de radiación (radiación electromagnética, electrones, partículas cargadas) tengan la misma energía inicial, éstos difieren en la manera en la cual la radiación deposita su energía en la materia y por lo tanto, en su efecto en la respuesta biológica.

El efecto biológico de la radiación está vinculado con el daño que ésta produce en el ADN. La acumulación de esas lesiones puede ocasionar el inicio de transformaciones a nivel celular tales como mutaciones puntuales, intercambio de cromátidas y/o aberraciones cromosómicas debido a la replicación o recombinación del daño inducido al ADN, por lo que resulta importante cuantificar y predecir dicho daño a través de la elaboración de curvas de dosis-respuesta.

Se han señalado diversos efectos de la interacción de la radiación (directa o indirectamente ionizante) con el ADN. Entre los más importantes están los rompimientos únicos de cadena (SSB), rompimientos dobles de cadena (DSB), formación de complejos ADN-proteína (DPC), formación de radicales libres y aberraciones cromosómicas, entre otros. Los rompimientos de cadena SSB y DSB son los más conocidos y, hasta el momento, están catalogados dentro de los más dañinos [Hall, 1994]. Los entrecruzamientos ADN-proteína son uniones de tipo covalente o iónicas entre ADN y proteínas. Se producen como consecuencia de la generación de especies reactivas o radicales libres que genera la radiación ionizante. Ocurren cuando las proteínas, que han sido peroxidizadas por radiación, generan radicales libres, los cuales forman entrecruzamientos entre las macromoléculas. Se ha reportado que la formación de este tipo de entrecruzamientos está relacionada con la formación de tumores, probablemente debido a la disrupción en la replicación del ADN y a la desactivación de los genes supresores de tumor como p53 [Recio, et al. 1992].

Se ha encontrado que las condiciones ambientales en las que esté inmersa la célula juegan un papel fundamental en la formación de DPC. Tales condiciones se refieren a la presencia (o ausencia) de oxígeno u otro gas, presencia de cierto tipo de acarreadores de iones, del tipo de proteínas involucradas, de las condiciones iónicas en las que se encuentre la célula, etc. [Zhang, et al. 1994].

La formación de DPC inducidos por radiación ionizante así como su mecanismo de entrecruzamiento se ha estudiado muy poco, sin embargo, como se mencionó anteriormente existen referencias [Chakrabarti, et al. 2001], [Ramírez, et al. 2000], [Zhitkovich, et al. 1998], [Shaham, et al 2003] que indican que los agentes carcinogénicos inducen DPC; tal es el caso de agentes químicos como el formaldehído, la  $\beta$ -naftoflavona, el cis-platino y la radiación ionizante. Así mismo, se ha obtenido que las células de mamíferos irradiadas con rayos  $\gamma$  forman aproximadamente la misma proporción de DPC y DSB [Xue, et al. 1994], [Distel, et al.2002].

Por lo anterior, una cuantificación más completa del daño al ADN deberá tomar en cuenta el efecto de las proteínas tanto desde el punto de vista de la ciencia básica como de su aplicación en tratamientos de radioterapia, donde la reparación de la célula determina el tratamiento.

El objetivo del trabajo que se presenta a continuación es estudiar la formación de DPC, como función de la dosis suministrada, en linfocitos de mamífero, irradiados por rayos  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$  bajo condiciones isotónicas (PBS) y en hipoxia.

En el capítulo I, se hace una revisión de la interacción de la radiación con la materia, así como de los conceptos de dosimetría.

En el capítulo II, se describe la estructura del ADN, los daños más relevantes producidos por la radiación, las reacciones químicas desencadenadas y el daño biológico del ADN.

Posteriormente, en el capítulo III se describe el problema, los materiales y los métodos empleados.

En los capítulos IV y V se presentan los resultados, discusión y conclusiones del trabajo de investigación.

# Capítulo I

## Física de la interacción de la radiación con la materia

En este capítulo se discuten algunos conceptos básicos de la interacción de la radiación con la materia y de dosimetría de la radiación. Así mismo, se hace una breve descripción tanto de los dosímetros termoluminiscentes y Fricke como de la física del funcionamiento del fluorómetro, utilizados en este trabajo.

### 1.1 Radiación

La radiación es el transporte de energía sin la intervención necesaria de un medio de transporte. Esto puede llevarse a cabo ya sea por ondas electromagnéticas o por partículas como electrones ( $e^-$ ), neutrones ( $n$ ) o iones. Existen muchas fuentes naturales y artificiales de radiación, de hecho, vivimos expuestos a ellas de manera cotidiana. Tal es el caso del sol, que es la fuente más importante de radiación ultravioleta (UV).

La ionización es un proceso en el que un átomo neutro adquiere una carga positiva o negativa. La radiación ionizante son partículas cargadas o no, con la capacidad de ionizar a un átomo a través de diferentes procesos. Está agrupada en radiación directamente ionizante y en radiación indirectamente ionizante.

Decimos que la radiación es directamente ionizante cuando la energía es depositada directamente por la partícula en el medio, tal es el caso de las partículas cargadas ( $e^-$ , partículas  $\alpha$ ). La radiación electromagnética como los rayos X y fotones  $\gamma$  depositan su energía a través de los electrones del medio con los que interactúan, por lo que se les llama radiación indirectamente ionizante.

Los rayos  $\gamma$ , son emitidos como parte de una desintegración nuclear, y acompañan por lo general a las emisiones de otras partículas, como las  $\alpha$  o  $\beta$ , en donde el radionúclido emisor deja, por lo general, al núcleo hija en un estado excitado. Cuando el núcleo se desexcita se emite radiación gamma. Tales fotones, tienen energías bien definidas y típicas del núcleo emisor.

Los elementos radiactivos se encuentran como componentes naturales en el medio ambiente, aunque también pueden ser producidos artificialmente con cualquier miembro de la tabla

periódica. Tal es el caso del  $^{60}\text{Co}$ , que es producido por la activación del  $^{59}\text{Co}$  con neutrones. El  $^{60}\text{Co}$  es un núcleo inestable que decae emitiendo partículas  $\beta^-$  y rayos  $\gamma$  con energía promedio de 1.25 MeV, debido a la conservación de la carga y energía durante la reacción.



Durante este proceso, más del 99% de los decaimientos beta son a un estado excitado del  $^{60}\text{Ni}$ , su desexcitación al estado base es a través de emisión de 2 rayos  $\gamma$  de 1.173 y 1.332 MeV [Khan, 2002]. Estos rayos  $\gamma$  son la fuente de radiación en las unidades de  $^{60}\text{Co}$ , como el GammaCell 200. El esquema de decaimiento se muestra en la figura 1.1.

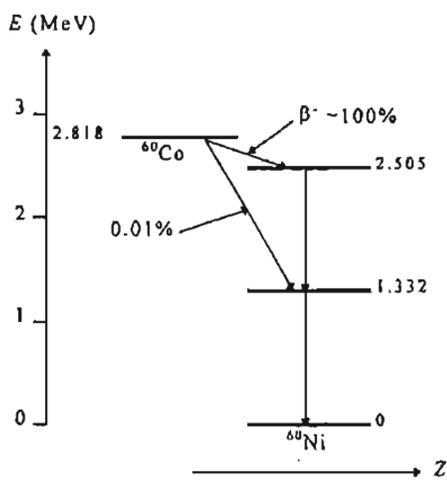


Figura 1.1. Diagrama de decaimiento del  $^{60}\text{Co}$

### 1.2 Interacción de la radiación con la materia

La interacción de la radiación con la materia ocasiona una serie de eventos tales como atenuación, absorción, ionización, dispersión, excitación, etc. La probabilidad de que ocurra principalmente un evento depende directamente de la energía del fotón incidente así como de la composición atómica del medio con el que interacciona. Existen cuatro tipos de interacciones importantes entre la radiación electromagnética y la materia: Dispersión de Rayleigh, Dispersión Compton, Efecto fotoeléctrico, Producción de pares [Attix, 1986]. En física médica los más importantes son los últimos tres; Compton y fotoeléctrico son procesos esencialmente de colisión, mientras que la producción de pares constituye la conversión de masa en energía.

### 1.2.1. Efecto fotoeléctrico

Es la interacción en la que el fotón le transfiere totalmente su energía a un electrón de las capas K o L del átomo. Ocurre predominantemente para fotones con baja energía en los que la energía de ligadura del electrón no puede ser despreciada y cuando el número atómico del material irradiado es grande. La energía cinética  $T$  del electrón corresponde a la diferencia en energía del fotón y la de ligadura del electrón  $E_B$ , y está descrita por la ecuación 1.2

$$T = h\nu - E_B \quad [1.2]$$

La vacancia dejada por el electrón en la capa debe de ser llenada por otro electrón orbital, emitiéndose así rayos X que son característicos de cada átomo. La figura 1.2 muestra el esquema del efecto fotoeléctrico.

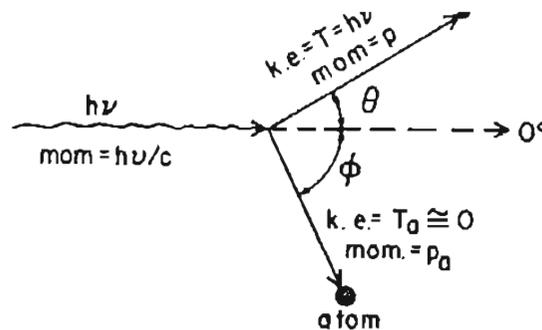


Figura 1.2. Cinemática del efecto fotoeléctrico [Attix, 1986].

El coeficiente másico de atenuación para el efecto fotoeléctrico está dado por la ecuación 1.3 [Attix, 1986].

$$\frac{\tau}{\rho} \propto \left( \frac{Z}{h\nu} \right)^3 \quad [1.3]$$

La ocurrencia del efecto fotoeléctrico es más probable cuando la energía del fotón incidente es igual o ligeramente mayor que la energía de ligadura del electrón, por lo que a medida que se incrementa la energía del fotón incidente con respecto a la energía de ligadura de la capa K del electrón, el efecto fotoeléctrico cede su lugar como efecto dominante al efecto Compton.

## 1.2.2 Efecto Compton

Es el caso especial de la colisión entre un fotón (masa en reposo cero) con un electrón atómico considerado libre (es decir, la energía del fotón es mucho mayor que la energía de ligadura del electrón). La dispersión Compton es el efecto dominante a energías intermedias, con un intervalo bastante amplio que va desde 20 keV hasta 30 MeV.

Ocurre cuando un fotón incidente interacciona con un electrón atómico considerado libre transfiriéndole parte de su energía. Como resultado de esta interacción, el electrón es sacado del átomo a un ángulo  $\theta$  y sale un nuevo fotón, con energía menor que la original a un ángulo  $\phi$ , denominado fotón dispersado. La figura 1.3 muestra el mecanismo del efecto Compton.

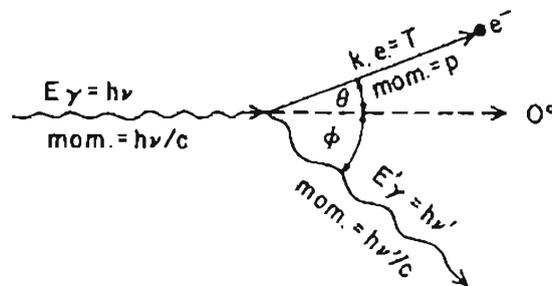


Figura 1.3. Mecanismo del efecto Compton.  
La línea recta representa al electrón, la ondulada al fotón [Attix, 1986].

Si la energía cinética del fotón incidente es  $h\nu$  y choca con el electrón cuya energía en reposo es  $m_0c^2$ , entonces, la energía cinética que éste adquiere después de la colisión es:

$$T = h\nu - m_0c^2 \quad [1.4]$$

En un tratamiento en el que consideramos al electrón y fotón como partículas y por conservación de energía y momento, se llega a las relaciones:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + (h\nu/m_0c^2)(1 - \cos \phi)} \quad [1.5]$$

$$T = h\nu - h\nu' \quad [1.6]$$

$$\cot \theta = \left( 1 + \frac{hv}{m_0 c^2} \right) \tan \left( \frac{\varphi}{2} \right) \quad [1.7]$$

donde  $hv$ ,  $hv'$  y  $T$  son las energías del fotón incidente, el fotón dispersado y electrón dispersado respectivamente.

De las relaciones 1.5 a 1.7 podemos observar que la máxima energía transferida al electrón ocurre cuando la colisión es frontal. Así mismo, puede observarse que siempre hay un fotón disperso, ya que el electrón no absorbe la energía total del fotón. Físicamente esto se debe a que tanto el momento como la energía se conservan.

A diferencia del efecto fotoeléctrico, la interacción Compton es independiente del número atómico del material absorbedor, ya que este efecto involucra esencialmente a los electrones de valencia del átomo con el que interacciona, por lo que el coeficiente másico de atenuación para el efecto Compton ( $\sigma/\rho$ ) es básicamente el mismo para todos los materiales, y está dado por la ecuación 1.8 [Attix, 1986]

$$\frac{\sigma}{\rho} = \frac{N_A Z}{A} \sigma_e \propto Z \quad [1.8]$$

donde  $\sigma_e$  es la sección eficaz de Klein - Nishina

### 1.2.3 Producción de Pares

Es un proceso de absorción que ocurre siempre y cuando la energía del fotón incidente sea superior a 1.022 MeV, ya que durante este proceso se crean un positrón y un electrón con masa en reposo de 0.511 MeV cada uno. Este evento toma lugar cuando un fotón interacciona con el campo electromagnético del núcleo cediendo toda su energía a la creación de pares, el remanente de energía es compartido por ambas partículas, como energía cinética. La figura 1.4 muestra el mecanismo de la producción de pares. La relación entre la energía cinética del positrón ( $T^+$ ) y la energía cinética del electrón ( $T^-$ ) está dada como la diferencia en energía del fotón incidente  $h\nu$  y la energía necesaria para crear el par electrón-positrón ( $2m_0c^2$ ). La ecuación 1.8 muestra la conservación de la energía durante el proceso de creación de pares.

$$T^+ + T^- = h\nu - 2m_0c^2 \quad [1.9]$$

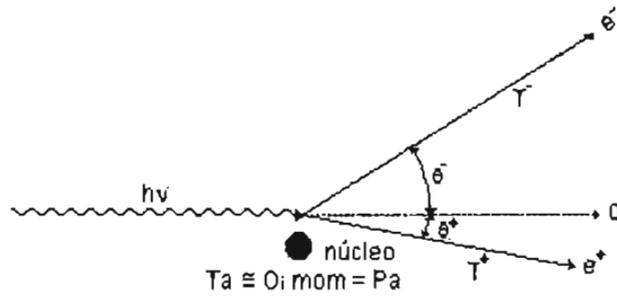


Figura 1.4. Producción de pares en el campo de fuerzas coulombianas de un núcleo atómico [Attix, 1986].

La probabilidad de que exista producción de pares depende tanto de la energía del fotón incidente como de la Z del material con el que interacciona. A mayor Z, y a mayor energía del fotón incidente, la probabilidad de interacción a través de la producción de pares se incrementa.

Las dos partículas creadas (electrón y positrón) no necesariamente reciben igual energía cinética, pero en promedio está dada como:

$$\bar{T} = \frac{h\nu - 1.022 \text{ MeV}}{2} \quad [1.10]$$

Puede ocurrir también la producción de pares, cuando el fotón interactúa con el campo de un electrón. En este caso se requiere que el fotón incidente tenga como mínimo una energía de  $4m_0c^2$ , ya que divide su energía entre el par  $e^+$  y  $e^-$  producidos y un electrón del átomo, por lo que la conservación de energía está dada por la relación 1.11

$$h\nu = 1.022 \text{ MeV} + T^+ + T_1^- + T_2^- \quad [1.11]$$

Por lo que la energía promedio de cada partícula es:

$$\bar{T} = \frac{h\nu - 1.022 \text{ MeV}}{3} \quad [1.12]$$

donde  $T^+$  es la energía cinética del positrón creado,  $T_1^-$  es la energía cinética del electrón creado y  $T_2^-$  es la energía cinética del electrón del átomo.

### 1.3 Descripción del haz de fotones [Attix, 1986], [Khan, 2002].

Un haz de fotones monoenergéticos es atenuado en forma exponencial a medida que atraviesa en un material. La atenuación corresponde a un promedio del número de fotones primarios incidentes en un medio absorbedor que no sufrieron ninguna interacción cuando atravesaron un espesor  $x$  de dicho medio. Así, para  $N_0$  fotones iniciales que atraviesan un espesor  $x$ , el número de fotones que ha alcanzado esa misma distancia sin haber sufrido una interacción es igual al número de fotones transmitidos,  $N(x)$  y está dado como:

$$N(x) = N_0 e^{-\mu x} \quad [1.13 a]$$

donde  $\mu$  es el coeficiente de atenuación, que depende de número atómico del medio y la energía del haz de fotones primario.

#### 1.3.1 Coeficientes lineales de atenuación ( $\mu$ ) y de absorción de energía ( $\mu_{en}$ )

A medida que los fotones penetran en la materia, éstos tienen una probabilidad de interacción, por alguno de los procesos mencionados, dependiendo de la energía del fotón incidente y de la composición del material. A la probabilidad por unidad de distancia recorrida por el fotón de que éste interactúe por uno u otro proceso se le conoce como coeficiente lineal de atenuación,  $\mu$ . Sin embargo, es más general referirse al coeficiente másico de atenuación  $\mu/\rho$ , debido a que esta cantidad relaciona la probabilidad de interacción con el número de electrones presentes en un espesor determinado.  $\mu$  depende de la densidad, por lo que al dividirlo por  $\rho$ , se obtiene la probabilidad de interacción independiente de la densidad.

Despreciando las interacciones fotonucleares, podemos decir que el coeficiente másico de atenuación para interacciones de rayos  $\gamma$ , por interacciones fotoeléctricas ( $\tau/\rho$ ), dispersión Compton ( $\sigma/\rho$ ), producción de pares ( $\kappa/\rho$ ), y dispersión de Rayleigh ( $\sigma_R/\rho$ ), está dado por la ecuación 1.13.

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{\tau}{\rho} + \frac{\sigma}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} + \frac{\sigma_R}{\rho} \quad [1.13 b]$$

El coeficiente másico de absorción de energía ( $\mu_{en}$ ) está definido como el producto del coeficiente de transferencia de energía ( $\mu_{tr}$ ) y  $(1-g)$ , donde  $\mu_{tr}$  corresponde a la fracción de energía de los fotones que fue convertida en energía cinética de las partículas cargadas, por

un espesor unitario de absorbedor, y  $g$  es la fracción de la energía de las partículas cargadas secundarias que no fue depositada en el medio y se transformó en radiación de frenado.  $\mu_{en}$  está dado por la ecuación 1.14.

$$\mu_{en} = \mu_{tr} (1-g) \quad [1.14]$$

En medios con bajo número atómico, como el tejido, las interacciones se deben principalmente a eventos de ionización, por lo que la producción de radiación de frenado es prácticamente despreciable y  $\mu_{en} = \mu_{tr}$ .

Desde el punto de vista biológico,  $\mu_{en}$  es una cantidad que permite la evaluación de la dosis absorbida en tejido, por lo que es de utilidad en radioterapia y radiobiología.

**1.3.2 Fluencia ( $\phi$ ):** Es el número de fotones  $dN$  que entran a una esfera imaginaria en una unidad de área de sección transversal  $da$ .

$$\phi = \frac{dN}{da} \quad [1.15]$$

Por lo que la tasa de fluencia es:

$$\dot{\phi} = \frac{d\phi}{dt} \quad [1.16]$$

**1.3.3 Fluencia en energía ( $\Psi$ ):** Es el cociente de la suma de todas las energías  $dE_{fi}$  de todos los fotones que entran a la esfera de sección transversal  $da$

$$\Psi = \frac{dE_{fi}}{da} \quad [1.17]$$

Para un haz monoenergético,  $dE_{fi}$  representa el número de fotones  $dN$  veces la energía  $h\nu$  que lleva cada fotón, y está dada por la ecuación 1.18.

$$dE_{fi} = dN \cdot h\nu \quad [1.18]$$

## 1.4 Conceptos de dosimetría [Attix, 1986], [Khan, 2002].

El efecto primario de la radiación indirectamente ionizante, como los fotones y neutrones, en la materia, es la transferencia de energía a los electrones del medio. Este efecto se debe primeramente a la ionización (o excitación) del medio, lo que produce una transferencia de energía a los componentes esenciales de la célula que conduce a su daño biológico.

Como ya hablamos señalado antes, no toda la energía que incide en el medio se queda ahí, parte se transmite y parte se absorbe, siendo esta última la que cobra relevancia desde el punto de vista dosimétrico.

#### 1.4.1 Depósito de energía: Dosis absorbida

La dosis  $D$  está definida para todos los tipos de radiación, ya sea directa o indirectamente ionizante, y corresponde al valor esperado de la energía absorbida en el medio, dividido por la masa  $dm$  del volumen.

$$D = \frac{\overline{dE_{abs}}}{dm} \quad [1.19]$$

La unidad de dosis es el gray (Gy), y equivale a 1 J/kg. Aunque oficialmente ya no se utiliza, algunas personas utilizan el rad como unidad de dosis, cuya equivalencia es:

$$1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g} = 0.01 \text{ Gy}$$

#### 1.4.2 Kerma

El Kerma (Kinetic Energy Release per Mass) es una cantidad no estocástica que sólo es relevante para campos de radiación indirectamente ionizantes tales como R-X, R- $\gamma$  o neutrones. Está vinculada con la energía cinética total transferida a las partículas secundarias, por elemento de masa. Existen dos formas en que un electrón rápido puede perder su energía:

- i) Por Interacciones con electrones atómicos del medio absorbedor a través de fuerzas coulombianas, las cuales son llamadas interacciones de colisión. Esta interacción produce ionización y excitación en la cercanía de la trayectoria del electrón.
- ii) Por interacciones radiativas con el campo coulombiano del núcleo atómico. En esta interacción, los electrones son desacelerados por lo que emiten rayos X de frenado o Bremsstrahlung.

Por lo anterior, el Kerma tiene dos componentes que relacionan la pérdida de energía de la partícula secundaria cargada, por unidad de masa, y son el Kerma de colisiones  $K_c$  y el Kerma de radiaciones,  $K_r$ , como lo indica la ecuación 1.20.

$$K = K_c + K_r \quad [1.20]$$

El primero corresponde a la primera etapa de transferencia de energía de radiación ionizante (fotones) a través de las pérdidas de energía debido a colisiones. El segundo, incluye cualquier energía que posteriormente pudiera perderse como radiación de frenado.

### 1.4.3 Equilibrio de Partícula Cargada (EPC)

En dosimetría de la radiación, es necesario garantizar que en el volumen a considerar, para cada partícula de un tipo y energía que sale de dicho volumen, existe otra partícula idéntica de la misma energía que entra. En tales condiciones decimos que existe un equilibrio de partícula cargada, EPC. El concepto de EPC es importante debido a que cada elemento de masa que constituye al volumen no se encuentra aislado, ya que de éste salen unas partículas y entran otras.

Una condición necesaria pero no suficiente ocurre si el elemento de masa es parte de un medio homogéneo a una profundidad mayor que el alcance de la partícula cargada con mayor energía. Bajo equilibrio de partícula cargada, Kerma y Dosis son iguales, siempre que la pérdida de energía por bremsstrahlung sea despreciable, es decir, que el Kerma de radiaciones  $K_r$  sea cero, por lo que la única componente del Kerma es el de colisiones  $K_c$ . La relación entre la Dosis y el Kerma está dada por la ecuación 1.21. Sus unidades de medición son  $\text{Jkg}^{-1}$ .

$$D \stackrel{\text{EPC}}{=} K_c = \psi \left( \frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad [1.21]$$

$K_c$  es el Kerma de colisiones, y corresponde a la energía transferida debida a las colisiones de los electrones secundarios con los del medio (ionización y excitación), mientras que el Kerma de radiaciones  $K_r$  es la energía que se llevan los fotones producidos por las partículas cargadas como bremsstrahlung.

### 1.4.4 Transferencia Lineal de Energía, LET

El depósito de energía por partículas cargadas en el medio es importante para cuantificar la dosis y su efectividad, desde el punto de vista biológico. Desde el punto de vista físico, la efectividad biológica de la radiación depende de la cantidad promedio de energía transferida por una partícula cargada cuando atraviesa una unidad de trayectoria a través de la materia y está dada en términos de su LET (Linear Energy Transfer), que se refiere a la tasa promedio

de energía perdida por las partículas cargadas en un medio, que varía con el tipo de radiación. Sus unidades son  $\text{MeV cm}^{-1}$ , y está dada como:

$$\text{LET} = - \left[ \frac{dE}{dx} \right] \quad [1.22]$$

### 1.5 Dosímetro Fricke [García, 1979], [Attix, 1986].

El dosímetro Fricke fue desarrollado por H. Fricke y E.J. Hart en 1927. Está formado por sulfato ferroso amoniacal  $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \bullet 6\text{N}_2\text{O}]$  al  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ , cloruro de sodio  $[\text{NaCl}]$  al  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ , y ácido sulfúrico  $[\text{H}_2\text{SO}_4]$  al 0.4 M, disueltos en agua tridestilada. Es un dosímetro absoluto que permite determinar la dosis absorbida depositada en su propio volumen sensible sin requerir una calibración previa en un campo de radiación conocido. En la concentración molar señalada, posee un intervalo útil de dosis que va de los 40 a 400 Gy, con una precisión entre 1 y 2% de error.

El mecanismo de funcionamiento del dosímetro Fricke es el siguiente: Cuando incide algún tipo de radiación en el dosímetro, se promueve la oxidación en la solución de sulfato ferroso amoniacal, y los iones ferrosos se transforman en férricos. Debido a que esta solución sufre una oxidación lenta a altas temperaturas (mayor que  $50^\circ\text{C}$ ) aun cuando no se ha irradiado, se recomienda que la solución sea almacenada en un intervalo de  $15$  a  $20^\circ\text{C}$ . La dosis absorbida se mide en términos del número de iones férricos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) formados, y es una medida indirecta del número de moléculas o radicales formados. Entre mayor sea la LET de la radiación incidente, mayor es la producción de iones férricos.

La energía de la radiación absorbida por la solución Fricke está dada en términos del número de iones férricos formados por cada 100 eV de energía absorbida y se representa por el valor G, dado por la ecuación 1.23.

$$G = \frac{\Delta n}{\Delta E} \times 100 \frac{1}{\text{eV}} \quad [1.23]$$

donde  $\Delta n$  es el número de moléculas o radicales formados por unidad de volumen y  $\Delta E$  es la cantidad de energía absorbida, expresada en eV por unidad de volumen.

Existen diversas técnicas para determinar la dosis absorbida en el dosímetro Fricke. Por su sencillez y precisión, una de las más utilizadas consiste en el empleo de un espectrofotómetro para medir el cambio en densidad óptica de una solución irradiada con respecto de otra sin irradiar, a una longitud de onda a la cual los iones férricos muestran la máxima absorción. Lo anterior es válido debido a que la concentración de los iones férricos producidos es proporcional a la absorbancia medida [García, 1979].

La Ley de Lambert-Beer expresa la linealidad de la absorbancia, como función de la concentración de iones férricos formados, mediante la relación:

$$n = \frac{\Delta A N_a V}{\epsilon d} \quad [1.24]$$

Donde  $n$  es el número de moléculas;  $N_a$  es el número de Avogadro;  $V$  es el volumen ocupado por la solución dosimétrica,  $d$  es la longitud de la trayectoria óptica,  $\Delta A$  es el cambio de la absorbancia (o cambio en la densidad óptica) en la muestra y  $\epsilon$  es la constante de extinción molar.

Dividiendo la relación 1.23 por la masa del sistema, y considerando que la dosis absorbida es  $\Delta E/m$ ,  $\rho = m/V$  y  $\Delta E$  la energía absorbida en eV por la solución Fricke, se obtiene la relación 1.25.

$$\frac{\Delta E}{m} = \frac{\Delta A N_a V}{\epsilon G d m} \times 100 = \frac{\Delta A N_a}{\epsilon G \rho d} \times 100 \quad [1.25]$$

Por lo anterior, y considerando que, para una fuente de  $^{60}\text{Co}$ , el valor de  $G$  es  $9.74 \times 10^{17} \text{ J}^{-1}$  [García, 1979], la dosis absorbida por la solución dosimétrica en Gy es:

$$D = \frac{\Delta A N_a}{\epsilon G \rho d} \quad [1.26]$$

La densidad óptica  $DO$  (también llamada absorbancia), está definida como el cociente de la cantidad de luz ( $I_o$ ) colectada sin la muestra, respecto de la que se colecta ( $I_t$ ) cuando está presente la muestra [Khan, 2002].

$$DO = \log_{10} \frac{I_o}{I_t} \quad [1.27]$$

$\Delta DO$  representa el cambio de la densidad óptica de una muestra que ha sido irradiada  $DO_i$  con respecto a una muestra sin irradiar  $DO_o$  bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, y está dado como:

$$\Delta DO = DO_i - DO_o \quad [1.28]$$

Para el intervalo de dosis útil en el dosímetro Fricke [40-400 Gy],  $\Delta DO$  tiene valores que van de  $\approx 0.14$  a 1.4 para una celda de 1 cm, medidos a una longitud de onda de 304 nm, que corresponde a la longitud de onda a la que los iones férricos tienen su máxima absorción y los iones ferrosos la mínima (o despreciable, es decir, cuando  $\epsilon$  ( $Fe^{2+}$ ) es mucho menor que  $\epsilon$  ( $Fe^{3+}$ )).

La dosis promedio absorbida por el dosímetro Fricke, como función de la densidad óptica, se obtiene a partir de la relación 1.26 y de los valores para las constantes  $G = 9.74 \times 10^{17} J^{-1}$ ,  $\rho = 1.024 \times 10^3 kg/m^3$ ,  $\epsilon$  ( $Fe^{3+}$ )  $_{25^\circ C} = 218.7 m^2 mol^{-1}$  y  $d = 0.01, m$  para un campo de radiación y con energía entre 0.5 a 16 MeV y  $\dot{D} \leq 2 \times 10^7 Gy / s$  [García, 1979].

$$\bar{D} = 278 (\Delta DO) Gy \quad [1.29]$$

## 1.6 Dosímetros termoluminiscentes [Attix, 1986], [Khan, 2002].

La termoluminiscencia es una propiedad que exhiben algunos cristales dieléctricos cuando han sido irradiados. Consiste en la emisión de luz visible mediante un estímulo térmico al cristal, debido a que éste almacenó una fracción de la energía del campo de radiación al que estuvo expuesto. La propiedad termoluminiscente en los cristales requiere que éstos contengan un "activador" a nivel de trazas, el cual aporta niveles adecuados de energía para que ocurra el proceso. Los activadores proveen dos tipos de centros que se deben a las imperfecciones en el plano del cristal. Uno de ellos son las trampas para electrones y "agujeros" los cuales capturan y mantienen a los portadores de carga en un potencial eléctrico por largos periodos de tiempo. El segundo tipo son los centros termoluminiscentes los cuales emiten luz cuando los electrones y los agujeros tienen una recombinación en dicho centro. Los materiales termoluminiscentes poseen un volumen sensible con una cantidad de masa  $\sim 1$  a

100 mg, en donde es depositada la energía de radiación y convertida en energía luminosa [Khan, 2002].

Los dosímetros TL deben ser calibrados previamente en un campo de radiación conocido. La respuesta de los materiales TLD es afectada por su historia previa en campos de radiación y térmicos. Para remover estos efectos, se realizan dos tratamientos térmicos. El primero consiste en hornear el dosímetro a 400 ° C durante una hora, dejar enfriar a temperatura ambiente y re-hornearlo a 100 ° C por dos horas.

### 1.6.1 Física del proceso termoluminiscente

Cuando la radiación ionizante incide en el material produce ionizaciones que llevan a los electrones a la banda de conducción dejando un hueco en la banda de valencia. Ambos portadores de carga pueden emigrar a través del cristal y caer en las “trampas” respectivas aportadas por el activador y que están ubicadas en la llamada región prohibida, pudiendo permanecer en ellas por un tiempo. El proceso termoluminiscente es un proceso estocástico (no determinista) en donde los portadores de carga tienen una probabilidad de escape y otra de recombinación.

Una vez que el cristal se calienta, el electrón adquiere suficiente energía para salir de la trampa, consiguiendo moverse y recombinarse con un hueco, en consecuencia se emite un fotón luminoso. A medida que la temperatura aumenta, los electrones adquieren la energía correspondiente a la profundidad de la trampa y son liberados, por lo que se empieza a emitir una cantidad de luz que va aumentando hasta un valor máximo y después disminuye, debido al agotamiento de los electrones que ocupaban las trampas con esa profundidad [Attix, 1986]. La figura 1.5 muestra el proceso de emisión termoluminiscente.

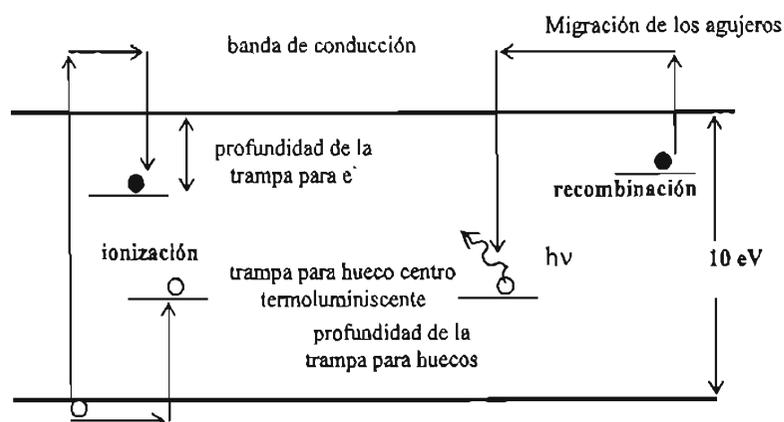


Figura 1.5. Diagrama de energía del proceso termoluminiscente [Attix, 1986].

Si se traza una curva de la cantidad de luz emitida (brillo) como función de la temperatura se tendrán uno o más picos, según el número de trampas de diferente profundidad que existan en el cristal. La cantidad de luz emitida (el área bajo la curva) será proporcional a la radiación recibida (dosis) por el cristal. La respuesta TL del dosímetro está definida como la señal TL por unidad de dosis absorbida en el fosforo.

### **1.6.2 Características de los dosímetros termoluminiscentes LiF: Mg,Ti (TLD-100)**

Los dosímetros termoluminiscentes (DTL) de LiF con imperfecciones de Mg o Ti son ampliamente utilizados en aplicaciones médicas ya que en una buena aproximación son equivalentes a tejido, debido a que tienen un número atómico muy similar (8.2 para el fluoruro de litio y 7.4 para el tejido suave). Ofrecen buena precisión y exactitud, alta sensibilidad, además de que pueden ser reutilizados.

Bajo EPC, el cociente de la dosis absorbida en los dos medios (tejido y LiF) es igual al cociente de sus coeficientes de absorción de energía. Además de EPC, se requiere que el número atómico de los dos medios (composición de pared y dosímetro) sean muy similares. Así mismo, las dimensiones del dosímetro deben ser más pequeñas que el alcance de los electrones que lo atraviesan, y el espesor de la pared debe ser lo suficientemente delgada para considerar que el dosímetro no perturba al campo de radiación. Típicamente se considera que tanto la pared del dosímetro como el volumen sensible no deben exceder el 1% del alcance de las partículas cargadas incidentes. Las características más importantes de los dosímetros TLD-100 se mencionan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características de los TLD-100 de acuerdo con el fabricante.

Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	2.64
Número atómico efectivo	8.2
Espectro de emisión TL (nm)	Intervalo: 350-600, Máximo: 400
Temperatura del pico principal a 10 ° C / s	215
Intervalo Lineal de Dosis:	10 <sup>-5</sup> ~ 5 Gy
Sensibilidad relativa:	1
Valor límite detectable	1.4x10 <sup>-5</sup> Gy
Dependencia con la energía	< 40%
Estabilidad en la información almacenada:	20 ° C: no hay un desvanecimiento detectable en un mes 50 ° C: 3% desvanecimiento en un mes
Efecto de la luz	Insensible a la luz del sol, a lámparas y luz incandescentes
Condiciones de lectura:	T < 50 ° C HR < 90%
Homogeneidad (1 SD):	~ 5%
Condiciones recomendadas de operación del equipo lector: Tasa de calentamiento 6 ~ 20 ° C/s Tasa de pre-calentado: 135 ° C por 5 ~ 10 s;	

Debido a que los dosímetros TLD no son homogéneos, siempre que se haga un estudio se debe seleccionar de un conjunto a aquellos que tengan una respuesta similar ante una dosis determinada. Esto permitirá eliminar del conjunto a aquellos cuya respuesta difiera en más del valor de la desviación estándar preestablecida. La figura 1.6 muestra el diagrama esquemático de un lector TL típico.

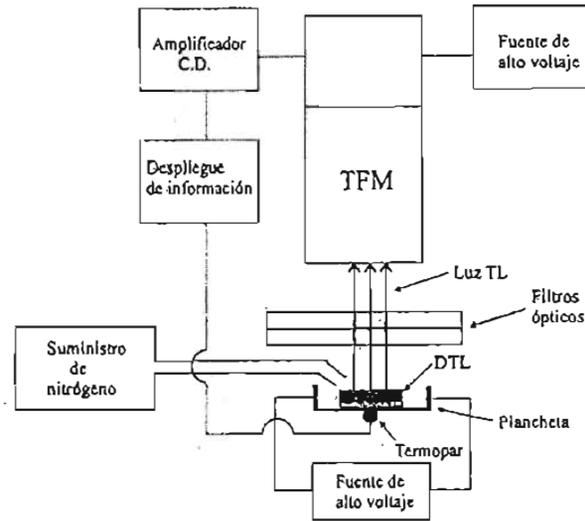


Figura 1.6 Diagrama esquemático de un lector TL típico [Attix, 1986].

La biología tuvo un gran auge en el siglo XX gracias a las técnicas y equipos utilizados en los experimentos de laboratorio, lo que permitió el surgimiento de la biología molecular, entre otras ramas. Una de las técnicas que ha sido ampliamente utilizada en los laboratorios donde se desea determinar la cantidad de moléculas contenidas en una muestra es a través de técnicas de fluorescencia, la cual involucra principios básicos de absorción y emisión de luz, así como de la capacidad de adherencia de ciertas sustancias fluorescentes a la molécula que se desea determinar en particular.

En la sección 1.7, se describe el mecanismo de funcionamiento de un fluorómetro, ya que constituye uno de los equipos utilizados en este trabajo.

### 1.7 Cuantificación de las moléculas contenidas en una muestra a través de su fluorescencia emitida: Uso del fluorómetro

El fluorómetro es un equipo que hace uso del fenómeno de fluorescencia para identificar y cuantificar moléculas a las que les han sido incorporadas ciertas sustancias fluorescentes. Cuando la luz incide en la molécula, y ésta absorbe energía, los electrones de la molécula se excitan y pasan de un estado de menor a uno de mayor energía. Debido a que todos los estados excitados son inestables, en algún momento ocurre la liberación de ese exceso de energía ya sea por el incremento de las vibraciones atómicas dentro de la molécula, o bien porque la molécula emita luz. A la emisión de luz de las moléculas que han sido estimuladas a

la longitud de onda donde ocurre la máxima absorción se le llama fluorescencia. La fluorescencia de una molécula ocurre con la absorción de luz a una longitud de onda específica para cada molécula y la emisión de luz con una longitud de onda menor. La diferencia entre la longitud de onda absorbida y la emitida,  $\Delta\lambda$ , depende de la cantidad de energía perdida en el proceso fluorescente.

El mecanismo de funcionamiento del fluorómetro es el siguiente: Una fuente de luz que tiene una emisión en un intervalo específico de longitud de onda (tal como una lámpara de xenón) tiene un colimador para formar un haz estrecho el cual es enviado a un filtro para remover la mayor parte de la luz que se encuentre fuera del intervalo de longitud de onda para una molécula fluorescente en particular.

El haz de luz filtrado pasa a través de la muestra líquida a determinar incidiendo en las moléculas fluorescentes de la muestra. La luz emitida por estas moléculas es desviada  $90^\circ$ , con respecto al haz de original, e incide en un fotodetector el cual genera una corriente que pasa por un amplificador y permite dar una medida relativa a la intensidad de la luz emitida.

Este instrumento fue un enorme descubrimiento en el análisis por fluorescencia, ya que permitió detectar moléculas fluorescentes a concentraciones por debajo del nivel visible por el ojo humano. Permite determinar la concentración de las moléculas fluorescentes en una solución. La curva de intensidad de fluorescencia como función de la concentración es lineal excepto a concentraciones altas ya que la luz de la lámpara resulta insuficiente para estimular a toda la muestra. La determinación de la curva de calibración para las moléculas específicas a determinar proporciona una alta precisión para el equipo, permitiendo una cuantificación de una parte en un billón.

## **1.8 Aplicación de las radiaciones ionizantes en seres vivos: Surgimiento de la Radiobiología**

La radiobiología es el estudio de la acción de las radiaciones ionizantes en los seres vivos, y surge como una consecuencia de las aplicaciones de la física de radiaciones en medicina. A grandes rasgos, podemos decir que los albores del siglo XX fueron el parte aguas en la historia del ser humano en la utilización de la radiación con aplicaciones médicas.

Por un lado, William Roentgen descubre los rayos X en 1895, y sólo dos meses después, Henri Becquerel anuncia que había encontrado unos rayos semejantes que provenían de sales de uranio, descubriendo así la radiactividad.

Por su naturaleza, los rayos X fueron la radiación ionizante a la que se le dió la mas pronta aplicaclón sin un estudio previo de su toxicidad. La observación de los efectos biológicos de la exposición a altas dosis de rayos X fue prácticamente inmediata. Se reportaron irritación en los ojos, calda del cabello, eritemas y en los casos con sobre exposición, se tuvieron amputaciones, y muertes.

A pesar de la cantidad de incidentes, la opinión que prevalecía entre los científicos era que las lesiones de la piel no estaban causadas por los rayos X, sino más bien por otros factores relacionados, como la luz ultravioleta, los rayos catódicos, la inducción eléctrica, la oxidación por ozono, o por fallas técnicas. Pero los reportes eran tan persistentes y tan numerosos que un físico estadounidense, Elihu Thomson, decidió verificar sobre sí mismo la acción de los rayos en los tejidos vivos. La conclusión de su estudio fue que cuando se irradiaba a la piel, esta mostraba enrojecimiento y sensación de dolor, pero después de dos semanas ocurría una regeneración del tejido.

Los rayos X sólo evidenciaban efectos benéficos para el diagnóstico y tratamiento, por lo que nadie podía imaglnar en ese momento que pudieran ser peligrosos o perjudiciales de alguna forma. Los efectos irreversibles y acumulativos de la radiación se descubrieron paulatinamente, y el precio de ese conocimiento fue el sufrimiento y la muerte de muchas personas.

Los efectos biológicos para una misma dosis depositada por el mismo tipo de radlación varían de forma considerable según el tipo de exposición y se deben a la muerte celular. Estos pueden hacerse visibles a las pocas horas, días o semanas de la exposición. Una exposición prolongada se tolera mejor y es más fácil de reparar, aunque la dosis de radiación sea elevada. No obstante, si la dosis es suficiente para causar trastornos graves, la recuperación será lenta, e incluso imposible. Una irradiación, aunque no mate a las células, puede producir alteraciones a largo plazo [Kathern and Zierner, 2002].

La irradiación de zonas concretas del cuerpo produce daños locales en los tejidos que dependerán del órgano en cuestión, de las características de la radiación y del

comportamiento bioquímico del material radiactivo. El tejido irradiado puede degenerar o destruirse, el efecto retardado más importante es el aumento estadístico de cáncer. En animales de experimentación se ha observado una reducción del tiempo de vida que aún no se ha demostrado en seres humanos.

El conocimiento de los efectos biológicos de las radiaciones produjo una revolución en la comunidad científica similar a la producida por el descubrimiento de los rayos X, se reglamentaron las dosis, las normas de higiene y seguridad de las instalaciones, los horarios de trabajo, etc.

Durante los años 50 se produjo un profundo cambio en las ideas en las que estaba basada la radioprotección médica, con la apreciación de la posibilidad de que pequeñas dosis podían producir efectos biológicos a largo plazo. El impulso primario de esta apreciación fue el temor por las consecuencias producidas por las pruebas de armas nucleares en Estados Unidos y la Unión Soviética [Kathern and Ziemer, 2002]. Por primera vez en la historia una gran proporción de la población mundial había sido expuesta repetidamente a bajas dosis de una radiación controlada por el hombre, y la posibilidad de que esta radiación pudiera producir un daño biológico diseminado emergió como preocupación principal por la salud pública. Varias fundaciones se dedicaron rápidamente a la investigación de los efectos biológicos producidos por las radiaciones ionizantes. Los experimentos "Megamouse" sobre material genético en los Laboratorios Nacionales de Oak Ridge, en los Estados Unidos, aportaron fuertes evidencias de que al menos algunos efectos de la radiación no necesitaban "umbral", es decir, que no había una dosis segura. Para la misma época, los primeros estudios en los sobrevivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki proveyeron nueva evidencia cuantitativa acerca de los efectos carcinogénicos de las radiaciones [Gálvez, 1995]. La noción de los graves efectos biológicos de los rayos X apareció paulatinamente y los que aprendieron a protegerse lo hicieron a costa de otros, cuya trágica ignorancia los llevó muchas veces a graves lesiones o a la muerte.

## Capítulo II

### Ciclo celular, ADN y el daño producido por radiación

En este capítulo se describen brevemente el ciclo celular y la estructura del ADN, así como los entornos físico y químico que influyen en su daño por radiación.

#### 2.1 Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto ordenado de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. El ciclo de una célula es análogo al de un ser vivo, "nace" mediante la división de una célula progenitora, crece, y se reproduce. Todo este proceso es lo que constituye un ciclo celular completo [Alberts et al. 1994].

El ciclo celular comprende cuatro períodos denominados G1, S, G2 y Mitosis, los cuales se muestran en la figura 2.1.

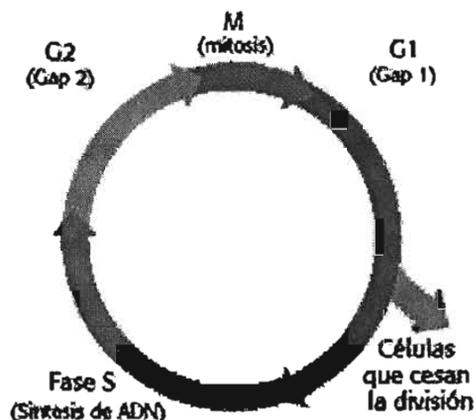


Figura 2.1. Diagrama de las fases del ciclo celular [Hall, 1994].

El período G1, llamado primera fase de crecimiento quiere decir "GAP 1" (Intervalo 1), se inicia con una célula hija que proviene de la división de la célula madre. En esta etapa, la célula aumenta de tamaño, se sintetiza nuevo material citoplásmico, sobre todo proteínas y ácido ribonucleico (ARN).

En el período S o de síntesis, tiene lugar la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Cuando acaba este período, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio.

El período G2, significa "GAP 2" (Intervalo 2) o segunda fase de crecimiento, en el cual se siguen sintetizando ARN y proteínas; el final de este período queda marcado por la aparición de cambios en la estructura celular, mismos que se hacen visibles con el microscopio y que nos indican el principio de la mitosis o división celular.

El estado M representa "mitosis", y es cuando ocurre la división nuclear más citocinesis, y produce dos células hijas idénticas durante la profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. El período de tiempo que transcurre entre dos mitosis, y que comprende los períodos G1, S, y G2, se denomina Interfase. La interfase frecuentemente se incluye en discusiones sobre mitosis, pero la interfase técnicamente no es parte de la mitosis, más bien incluye las etapas G1, S y G2 del ciclo celular.

**i) Interfase y mitosis.** La célula está ocupada en la actividad metabólica preparándose para la mitosis (las próximas cuatro fases que conducen e incluyen la división nuclear). Los cromosomas no se disciernen claramente en el núcleo, aunque pueda ser visible una mancha oscura llamada nucleolo. La célula puede contener un par de centriolos (o centros de organización de microtúbulos en los vegetales) los cuales son sitios de organización para los microtúbulos.

**ii) Profase.** La cromatina en el núcleo comienza a condensarse y se vuelve visible en el microscopio óptico, como cromosomas. El nucleolo desaparece. Los centriolos comienzan a moverse a polos opuestos de la célula y se extienden fibras desde los centrómeros. Algunas fibras cruzan la célula para formar el huso mitótico.

**iii) Prometafase.** La membrana nuclear se disuelve, marcando el comienzo de la prometafase. Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetócoros. Los microtúbulos se adhieren a los cinetócoros y los cromosomas comienzan a moverse.

**iv) Metafase.** Fibras del huso alinean los cromosomas a lo largo del medio del núcleo celular. Esta línea es referida como el plano ecuatorial de la metafase. Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.

v) **Anafase.** Los pares de cromosomas se separan en los cinetócoros y son empujados por las fibras que están unidas a los centrómeros hacia los polos de la célula, a lo largo del huso mitótico.

vi) **Telofase.** Las cromátidas llegan a los polos opuestos de la célula, y nuevas membranas se forman de los núcleos hijos. Los cromosomas se dispersan y ya no son visibles bajo el microscopio óptico. Las fibras del huso se dispersan, y la citocinesis o la partición de la célula pueden comenzar también durante esta etapa.

vii) **Citocinesis.** En células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo fibroso compuesto de una proteína llamada actina, alrededor del centro de la célula se contrae pellizcando la célula en dos células hijas, cada una con su núcleo. En células vegetales, la pared rígida requiere que una placa celular sea sintetizada entre las dos células hijas.

El cáncer es una enfermedad en la que se altera la fina regulación del ciclo celular, y el crecimiento normal y comportamiento de la célula se pierden. p53 es una proteína que funciona bloqueando el ciclo celular si el ADN está dañado. Si el daño es severo esta proteína puede causar apoptosis (muerte celular). Los niveles de p53 están incrementados en células dañadas. Esto otorga tiempo para reparar el ADN por bloqueo del ciclo celular [Kastan, 1997]. La mutación más frecuente asociada al desarrollo de cáncer, ocurre por la mutación de p53. Un caso extremo de esto es el síndrome de Li Fraumeni en que un defecto genético en p53 conduce a una alta frecuencia de cáncer en los individuos afectados.

El efecto letal de la radiación se produce al nivel del material genético, por lo que aquellas células cuyo ciclo celular es más corto y lo entran más frecuentemente en mitosis, tienen mayores posibilidades de sufrir alteraciones en el ADN, lo que facilita que sean destruidas por la radiación y, por lo tanto, son más radiosensibles [Hall, 1994].

## 2.2 Estructura del Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

El ADN es una macromolécula que se encuentra en los cromosomas de las células. Los cromosomas se encuentran en el núcleo de las células y representan la más larga estructura visible involucrada en la transferencia de la información genética. Están compuestos por pequeñas unidades estructurales de 10 nm de diámetro llamadas nucleosomas, las cuales contienen al ADN y a las histonas. La cromatina está organizada en cientos o miles de

unidades de kilobases formando una longitud llamada cromosoma. La figura 2.2 muestra gráficamente los elementos descritos.

La molécula de ADN es una doble hélice con dos cadenas antiparalelas de azúcares (anillo de furanosa (2-deoxirribosa)) y fosfatos, unidas por bases nitrogenadas, timina(T)- citosina(C) (bases pirimídicas) guanina(G) -adenina(A) (bases púricas), cuya secuencia específica determina las funciones de cada célula.

La posición 5' de uno de los anillos de furanosa está conectada a la posición de la siguiente a través de un fosfato (unión 5' 3') creando así una cadena de polinucleótidos. Los dos polinucleótidos antiparalelos se encuentran unidos a través de puentes de hidrógeno entre las bases. G se encuentra siempre apareado con C y A con T.

Estudios de difracción de rayos X indican que, bajo ciertas condiciones de fuerza iónica, el ADN se encuentra formando una hélice regular que completa una vuelta cada 3.4 nm con un diámetro de 2 nm. Este arreglo posee 10.5 pares de bases por vuelta.

El ADN y las histonas forman a los cromosomas en arreglos altamente compactos que se encuentran enrollados en las fibras de la cromatina. Este enrollamiento, permite incorporar  $3 \times 10^9$  pares de bases (A T C G) que de manera lineal medirían un metro, en un núcleo celular de  $10^{-5}$  m de diámetro.

El ADN se encuentra en el núcleo de la célula rodeado por proteínas. Las histonas son las proteínas más abundantes asociadas al ADN. Los 5 mayores tipos de histonas son H1, H2A, H2B, H3 y H4, las cuales tienen una carga positiva y grupos fosfato en el ADN.

Los cromosomas de eucariontes pueden visualizarse cuando se condensan durante la mitosis. Se piensa que cada uno de los cromosomas en las células eucariontes contiene una molécula larga de ADN. Debido a que en los cromosomas humanos, las moléculas de ADN tienen al menos 10 cm de longitud ( $2-3 \times 10^8$  pares de bases), resulta difícil manejarlo experimentalmente sin romperlo. Sin embargo, en eucariontes menores, cada cromosoma contiene una única molécula de ADN, lo que permite extraer al ADN [Wolffe, 1998]. La correspondencia entre el número de moléculas de ADN por célula y el número de cromosomas ha sido demostrada en las células de hongos.

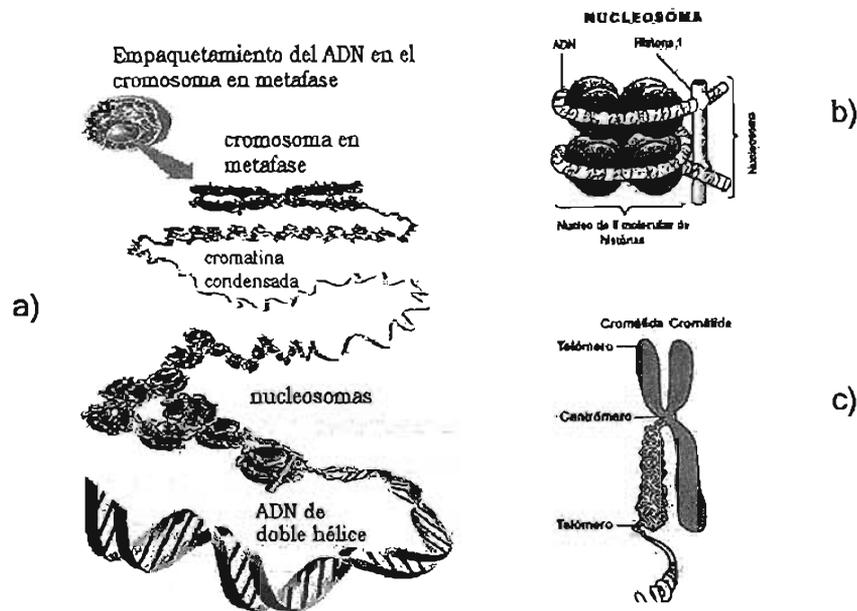


Figura 2.2. Conformación del ADN a) ADN formando cuentas de rosario con las histonas b) Estructura de los nucleosomas. c) Formación de los cromosomas a partir de los nucleosomas.

Los cromosomas no son visibles en células que no se dividen, aún con la ayuda de colorantes histológicos para el ADN. Sin embargo, los cromosomas se condensan durante la mitosis y meiosis lo que los hace visibles en el microscopio. Por lo anterior, la mayoría de los trabajos citogenéticos (i.e, estudios de la morfología de los cromosomas) han sido hechos con cromosomas condensados en metafase, los cuales son obtenidos de la división celular, ya sea en las células somáticas en mitosis o en los gametos divididos durante la meiosis.

En el momento en que ocurre la mitosis, las células ya han avanzado de la fase S del ciclo celular y han replicado su ADN, por lo que los cromosomas se hacen visibles durante la metafase. Cada cromosoma en metafase consiste de dos cromátidas hermanas, las cuales están unidas al centrómero. El número, tamaño y forma de los cromosomas en metafase constituyen el cariotipo, distintivo de cada especie.

### 2.3 Daño físico inicial producido por radiación ionizante

Desde el punto de vista físico, el daño biológico producido por radiación ionizante puede explicarse a través de la LET. La LET ofrece información sobre el depósito de energía de la partícula cargada secundaria (PC) generada por la interacción de los fotones con el medio, por unidad de longitud de trayectoria.

El conocimiento que tenemos sobre los mecanismos del daño biológico desencadenados por la interacción de la radiación con un medio celular se ha ido modificando en la medida que han

avanzado las simulaciones numéricas. En 1958, Flanders, afirmaba que los cúmulos de ionización se extendían sólo unos nm. De 1964 a 1980 Barendsen y Goodhead [Goodhead, 1989] hallaron que el daño crítico se debía a nubes ionizantes de 2-10 nm. En 1986 Goodhead y Thacker [Goodhead, 1989] encontraron que la radiación induce mutaciones y doble rompimiento de cadena (DSB), y que en general, el daño local ocurre de manera compleja en la naturaleza. Actualmente, las simulaciones Monte Carlo refuerzan la aparente importancia de que el daño molecular se debe a interacciones atómicas localizadas, y a que:

- ❖ El depósito de energía de la PC en el medio ocurre en trayectorias estructuradas.
- ❖ La mayor parte del ADN no recibe acción directa. Si recibe daño, la energía depositada puede ser pequeña o muy grande.
- ❖ En blancos pequeños, el depósito se debe principalmente a trayectorias individuales de la radiación.
- ❖ Radiaciones de alta y baja LET producen espectros diferentes del depósito local de la energía en el ADN y moléculas asociadas.
- ❖ La energía se deposita a través de ionizaciones aisladas por excitación del medio, principalmente al final de la trayectoria de los e<sup>-</sup> secundarios.
- ❖ ~30-50% del depósito de energía se debe a e<sup>-</sup> con una energía ≤ 5 keV.
- ❖ La producción de radicales OH<sup>\*</sup> resulta improbable a distancias grandes (~ nm) en células de mamíferos.

La formación de SSB, DSB o entrecruzamientos entre moléculas son daños bioquímicos al ADN consecuencia del daño físico producido por la radiación. Uno de los mayores retos al cuantificar y comparar estos efectos es que no estén enmascarados por el método utilizado en su medición. Independientemente del método, existen coincidencias en los resultados obtenidos experimentalmente tales como las diferencias significativas entre alta y baja LET, si la dosis es fraccionada o no, la tasa de dosis, grado de oxigenación, presencia de sensibilizadores y protectores de radiación, etc. Se ha observado que cuando la LET es muy alta, independientemente de otros factores mencionados, existe una mayor densidad de trayectorias, lo que ocasiona un daño celular más eficiente por lo que no hay influencia significativa de estos factores.

Una cuantificación aproximada del daño celular por cada Gy suministrado [Goodhead, 1989] es la siguiente:

- ❖ Daño a  $10^3$  células por ionización inicial directa
- ❖ Producción de  $10^3$  SSB
- ❖ Producción de  $10^2$  DSB
- ❖ Muerte de ~ 10 células después de que ocurre una reparación
- ❖ 0.2-1 eventos letales por célula

En el ser humano, 1 Gy es una dosis alta (con las consecuencias biológicas implicadas) y aunque la producción de SSB y DSB es grande, existe evidencia de que la completa integridad de sólo un pequeño porcentaje de ADN de la célula es puede garantizar la supervivencia de ésta.

Actualmente, existe cierta controversia en la teoría de las ionizaciones localizadas con respecto a estudios radio-químicos (Rq) [Goodhead, 1989], ya que:

- En Rq, se enfatiza el daño debido a los productos de la radiólisis.
- Algunos grupos de Rq afirman que la difusión de estos radicales es pequeña en el ambiente celular. Las células son muy eficientes en su reparación, pero no si hay daño más complejo que la formación de DSB y SSB.
- Menos del 2% de DSB son producto de 2 radicales  $\text{OH}^\bullet$ . Sin embargo, 50% de DSB se deben a  $\text{OH}^\bullet$  únicos [Ito, 1987].
- En las ionizaciones localizadas, se le da importancia a la formación de cúmulos de PC muy localizados, en distancias del orden de nm.
- Postula que existe un amplio espectro del daño físico que puede involucrar macromoléculas (ADN). Este espectro da la diferencia en las consecuencias químicas, bioquímicas y de reparación celular.
- Propone la clasificación del espectro de partículas secundarias en 4 tipos:
  - a) **Sparse.**- (Depósitos pequeños de energía por ionización y excitación).- Importante desde el punto de vista radio-químico. Pequeña relevancia biológica. Relacionado con SSB.
  - b) **Cúmulos moderados.**- Importante en baja LET. Asociado con DSB.
  - c) **Cúmulos grandes.**- Para radiación de alta LET. Asociado al daño con moléculas y estructuras adyacentes al ADN.
  - d) **Cúmulos enormes.**- Asociado a altas LET. Asociado al cambio de cromátidas, sin embargo, aún se desconoce mucho del daño.

## 2.4 Daño celular por radiación ionizante

El buen funcionamiento de todas las células que componen al individuo depende de la conformación correcta del ADN ya que éste contiene toda la información genética de la célula. En caso de sufrir alguna alteración en sus bases, la información celular se modifica y ocurren mutaciones que pueden ser letales.

La radiación ionizante, ioniza (directa o indirectamente) y excita los átomos del medio cuando interactúa con éste. Debido a que posee la suficiente energía para desplazar a los electrones atómicos puede romper las ligaduras que mantienen a las moléculas unidas, produciendo numerosos cambios químicos que, en el caso de las células, pueden ocasionar su muerte u otros efectos dañinos.

Cuando la radiación es absorbida por el material biológico, los átomos o moléculas en la célula (particularmente agua) pueden ser ionizados o excitados, iniciando así la cadena de eventos que producen cambios biológicos. Como resultado, la radiación provoca un daño molecular, que se traduce en daño bioquímico, formando radicales libres y agua ionizada ( $\text{H}_2\text{O}^+$ ), los cuales son capaces de difundirse lo suficiente para alcanzar y dañar el ADN. Este tipo de daño es señalado como de acción indirecta y puede ser modificado por la presencia de protectores o sensibilizadores en el medio, tales como el grado de compactación de la cromatina [Mee and Adelstein, 1981], [Chiu et al. 1992], [Okayasu and Iliakis, 1992], la temperatura [Al-Nabusi and Wheeler, 1997], el ciclo celular [Hortwell and Kastan, 1994], entre otros.

El ADN es el principal blanco de la radiación, y el daño que ésta le provoca se debe a las partículas cargadas que resultan de la interacción de la radiación con la materia así como por las especies químicas producidas [Hall, 1994]. La cadena de ADN es capaz de autorrepararse utilizando de manera temporal a una cadena complementaria. Sin embargo, el éxito de la reparación dependerá de que el número de rompimientos producidos no provoque muerte celular y de que no ocurra un error en la secuenciación que pueda ocasionar mutaciones y cáncer. Si ambas cadenas de ADN se rompen y los rompimientos están separados, ocurre la reparación, y decimos que el rompimiento fue rompimiento único de cadena. En contraste, si los rompimientos ocurren uno opuesto al otro o están separados por algunos pares de bases, decimos que el rompimiento fue DSB, lo que se traduce en aberraciones cromosómicas.

De acuerdo con la literatura [Hall, 1994], [Wolffe, 1998], los principales efectos biológicos de la radiación ionizante se deben a:

- ❖ Daño a las bases púricas y pirimidicas (generación de radicales libres)
- ❖ Daño a los azúcares
- ❖ Rompimientos únicos de cadena (SSD)
- ❖ Rompimientos dobles de cadena (DSB) formando aberraciones cromosómicas
- ❖ Formación de entrecruzamientos ADN- proteína (DPC)

La figura 2.3 muestra los principales daños al ADN que son producidos por agentes físicos o químicos.

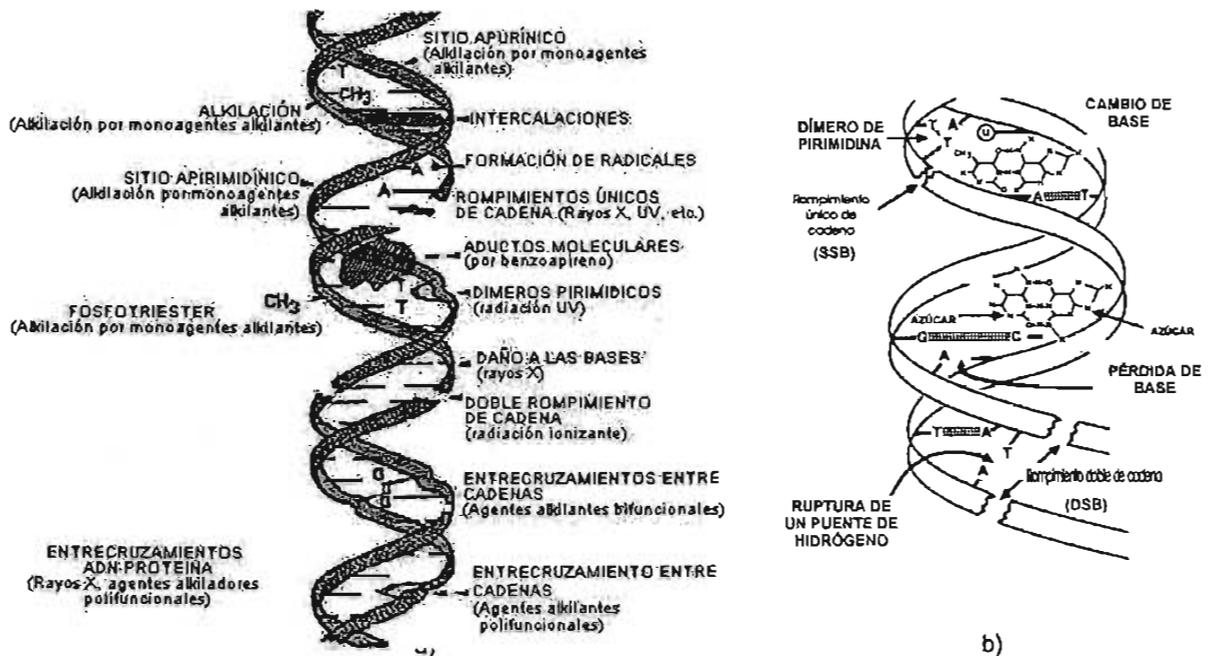


Figura 2.3. Principales daños producidos al ADN a) Por agentes químicos y físicos b) Por radiación ionizante [Wolffe, 1998].

## 2.5 Rompimiento único de cadena (SSB)

Es una de las lesiones más frecuentes producto de las radiaciones ionizantes. Ocurre por el rompimiento de la cadena de azúcares y fosfatos del ADN. Las consecuencias biológicas por SSB son pequeñas (siempre que no haya ocurrido muerte celular) debido a que la reparación celular ocurre en muy corto tiempo, ya que las bases utilizan temporalmente a la cadena opuesta [Hall, 1994].

La reparación celular del SSB depende de la naturaleza química de las lesiones y consiste en tres etapas principales. La primera, es básicamente una reacción enzimática que dura del orden de ms. La segunda tiene mayor duración y depende de la acción del ADN polimerasa

(es decir, de la enzima que cataliza la adición de las bases al ADN). En la tercera, cobran una gran importancia los nutrientes del medio celular, así como también la recombinación de las bases que pueda ocurrir.

Para determinar experimentalmente la cantidad de SSB se desnaturaliza y sedimenta el ADN en un medio alcalino, sin embargo esto también podría ocasionar rompimientos adicionales que no son detectados si la muestra fuese desnaturalizada a través de calor. A estos rompimientos latentes de los SSB se les llama sitios alcali-lábiles, los cuales producen daño a las bases del ADN, y corresponden aproximadamente al 30% de los SSB producidos [Kiefer, 1990].

### 2.6 Rompimiento doble de cadena (DSB)

Puede ser ocasionado por un único evento en el que se deposita toda la energía en la cadena de ADN o por la interacción entre dos SSB muy cercanos entre sí. Lo anterior puede observarse a partir de la ecuación lineal cuadrática, donde la parte lineal se debe al primer caso y la cuadrática al segundo.

La figura 2.4 muestra un diagrama esquemático del daño y reparación de los DSB y SSB, desde el punto de vista del efecto en las bases del ADN.

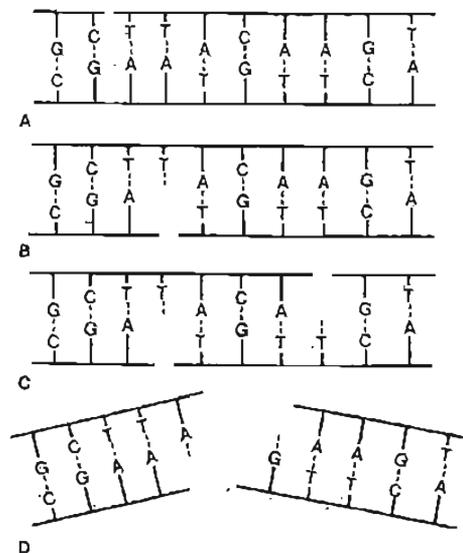


Figura 2.4. Diagrama bidimensional del rompimiento único y doble de cadena producido por radiación. A) ADN normal. B) Rompimiento reparado a través del uso temporal de la otra cadena. C) Rompimiento en ambas cadenas. La reparación será exitosa en la medida que los rompimientos no sean muy cercanos entre sí. D) DSB producido por dos rompimientos muy cercanos entre sí. [Hall, 1994].

## 2.7 Entrecruzamientos ADN-proteínas (DPC)

Los entrecruzamientos son un tipo de lesiones que no han sido investigados tan extensamente como los SSB o DSB. Pueden ocurrir entre el ADN-ADN, o el ADN con otros compuestos, siendo las proteínas los más importantes. La molécula de ADN interacciona normalmente con una gran cantidad de proteínas, tales como: Histonas, ADN polimerasas, factores de transcripción, enzimas de reparación, topoisomerasas, etc. El ADN puede formar entrecruzamientos de tipo ADN-ADN y ADN-proteína [Xue et al. 1994]. Los entrecruzamientos ADN-proteína (DPC) son uniones de tipo covalente o iónica entre ADN y proteínas que se observan como consecuencia de la generación de especies reactivas o radicales libres. Ocurren por la exposición de proteínas que han sido peroxidizadas por radiación, generando radicales libres los cuales forman entrecruzamientos entre las macromoléculas.

En general, se ha observado que las uniones que tienen un origen electrostático se rompen en soluciones con alta fuerza iónica, mientras que las interacciones débiles son susceptibles a los detergentes y fuerzas mecánicas. Para dilucidar el mecanismo de formación de DPC, se han realizado diversos experimentos. Para determinar el efecto de la fuerza iónica, se incubó BSA-OOH con pBR322 ADN en una solución salina de NaCl concentrada al 0.15 M. Los resultados mostraron que la sal previene el entrecruzamiento durante la incubación del ADN con una proteína peroxidizada, pero que era imposible disociar a las macromoléculas una vez que se había producido el entrecruzamiento [Gebicki and Gebicki, 1999].

Existe evidencia de que el nivel basal de DPC es inducido por factores ambientales y por el metabolismo de sus productos. Se ha observado que la acumulación de lesiones celulares en el cáncer de mama, en personas con este padecimiento, los niveles de DPC son significativamente elevados en comparación con personas sanas [Wu, 2002]. En otros modelos como el ratón también se observó que la cinética de formación de DPC era similar a la formación de tumores [Recio, 1992]. Lo anterior hace pensar que estos DPC son consecuencia de los cambios secundarios que acompañan el desarrollo de cáncer o su tratamiento, si estos DPC fueran causa de la carcinogénesis en mama. La figura 2.5 muestra este tipo de entrecruzamientos en una imagen tridimensional.

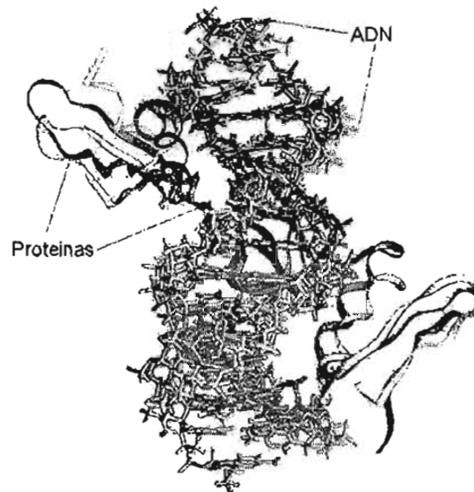


Figura 2.5. Imagen tomada con microscopio electrónico del ADN entrecruzado con proteínas (DPC) [Wolffe, 1998].

### 2.7.1 Efecto de la cromatina

El papel de las proteínas en la formación de DPC es un tema relativamente reciente y aún existe controversia con respecto a los resultados que se han obtenido en diferentes laboratorios. Algunos autores señalan que las proteínas de la cromatina pueden proteger al ADN de la radiación y que su grado de compactación es fundamental para producir menor o mayor daño por formación de DPC [Mee and Adelstein, 1981]. Se cree que una menor compactación de la cromatina ocasiona mayor radiosensibilidad del ADN y que el daño inducido por radiación es mayormente influenciado por la conformación de la cromatina, por lo que una cromatina más compacta es un pobre sustrato para la formación de DPC en comparación a la irradiación con una cromatina totalmente expandida. [Xue et al. 1994], [Chiu et al. 1992].

La cromatina totalmente expandida es 5 a 10 veces más susceptible a la inducción de DPC por radiación y que la cromatina en la interfase de las células vivas. Así mismo, una expansión del 60-70% de la cromatina induce la misma cantidad de DPC que el 20% de ADN celular. Se ha observado que en cromatina expandida, el nivel máximo de DPC inducido es 2 a 3 veces mayor de lo que se esperaría si únicamente fuera inducido ADN matricial para formar DPC, por lo tanto el ADN en las regiones distales de las vueltas de la cromatina debe formar DPC con histonas u otras proteínas no histonas.

La cromatina aislada es más sensible a la radiación y produce mayor cantidad de DPC. Se ha observado que la expansión de la cromatina produce una mayor cantidad de DPC comparada con la remoción de acarreadores de radicales intracelulares, por las siguientes razones:

- ❖ Existencia de una relación inversa entre la concentración de sustrato (buffer) en la que se encuentra suspendida la cromatina y la formación de DPC.
- ❖ Se ha observado que si se induce una cromatina más compacta  $\sim 10$  nm (de 30 nm de la expandida), en la presencia de una baja concentración de  $MgCl_2$ , se reduce la formación de DPC [Mee and Adelstein, 1981]. La formación de DPC inducidos por radiación parece tener una eficiencia máxima en la cromatina totalmente expandida, dado que la formación de DPC no puede ser estimulada por la adición de  $Cu^{2+}$ , el cual puede catalizar la producción de  $OH^\bullet$ .

### **2.7.2 Efecto de la temperatura**

Se ha visto que la temperatura no juega un papel importante en la formación de DPC ni durante ni después de la irradiación. Estudios en este sentido han indicado que por lo tanto, el principal evento en la producción de entrecruzamientos se debe a las reacciones de radicales libres [Al-Nabusi and Wheeler, 1997], y no así por el estrés oxidativo que produce la radiación, el cual puede transportar proteínas, produciendo daño, pues la mayor parte de éstas están involucradas en la reparación o estabilización de sitios específicos del ADN. Al ser transportadas estas proteínas, requieren unirse a la matriz nuclear [Al-Nabulsi, and Wheeler, 1997].

### **2.7.3 Efecto de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS)**

Los organismos aeróbicos, - como los mamíferos - forman especies reactivas del oxígeno, llamadas ROS. Los radicales libres y otras especies reactivas derivadas del oxígeno son productos que causan reacciones de reducción y oxidación (redox) con la potencialidad de generar daño biológico. Muchas de estas reacciones se originan por la exposición a agentes exógenos tales como drogas, toxinas, contaminantes, radiación, y de factores como nutrición y la edad, los cuales causan estrés oxidativo en los organismos.

Las rutas bioquímicas relacionadas con la formación de ROS y los efectos observables en células y tejidos no son claras. Se cree que el primer evento corresponde a la reacción de los derivados de los ROS de vida corta con biomoléculas, produciendo la oxidación de éstas. El producto puede ser un nuevo radical libre o una molécula reactiva que puede oxidarse y alterar a otras moléculas. El daño producido es determinante en la supervivencia y reproducción de las células que se encargan de la actividad biológica, apoptosis, transformación o muerte celular.

Hasta hace poco, se creía que las proteínas no eran blancos importantes para los ROS, por el contrario se pensaba que su papel principal en los eventos bioquímicos iniciados era el de proteger a las moléculas actuando como acarreadores de radicales, antioxidantes y atrapadores de metales. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las proteínas expuestas a ROS pueden adquirir hidroperóxidos y otros grupos reactivos [Halliwell, 1998], [Gutteridge and Quinlan, 1993]. Asimismo, se ha demostrado que muchas proteínas pueden ser peroxidadas por ROS fisiológicas importantes y que las proteínas hidroperoxidadas pueden oxidar algunos antioxidantes biológicos y que ellos pueden ser una fuente de radicales libres secundarios [Gebicki and Gebicki, 1999]. Estos hallazgos sugieren que una proteína hidroperoxidada puede formar uniones importantes en la cadena de daño iniciado por ROS bajo condiciones fisiológicas.

En la actualidad, existe controversia entre los radioquímicos, ya que hay dos corrientes, una que enfatiza el daño debido a los productos de la radiólisis y otra corriente que afirma que los productos peroxidantes, como los radicales  $\text{OH}^\bullet$ , no pueden viajar a grandes distancias, por lo que su difusión es pequeña en el ambiente celular, y no son los principales productores del daño por radiación [Mozumder, 1985].

De acuerdo con [Ito, 1987], menos del 2% de DSB son producto de 2 radicales  $\text{OH}^\bullet$ , sin embargo, 50% de los DSB se deben a  $\text{OH}^\bullet$  únicos, por lo que son las partículas cargadas y todos sus procesos en cascada, las que originan el principal daño.

## 2.8 Cuantificación del daño celular por radiación: Curvas de Dosis-Respuesta

Una cuantificación del daño celular por cada Gy suministrado indica que alrededor de  $10^3$  células sufren daño por ionización inicial directa, y que se producen  $10^3$  SSB y  $10^2$  DSB, así como 0.2 -1 eventos letales por célula. Sin embargo, aunque estos daños pudieran parecer inmensos, existe evidencia de que un pequeño porcentaje íntegro de ADN permite la supervivencia de la célula.

Los efectos biológicos de la radiación son descritos de manera cuantitativa en términos de la incidencia o severidad de un efecto dado, expresado como función de la dosis [Hall, 1994]. Para radiaciones de baja LET, las curvas dosis-respuesta tienen un comportamiento lineal para bajas dosis y un comportamiento lineal-cuadrático a medida que la dosis se incrementa. El efecto de E, como función de la dosis, está descrito por la ecuación 2.1 [Kiefer, 1990].

$$E(D) = \alpha D + \beta D^2 \quad [2.1]$$

$\alpha$  Y  $\beta$  son constantes cuyos valores dependen del efecto biológico bajo estudio, el tipo de radiación, la tasa de dosis y otros factores. Esta forma matemática de la respuesta, es comúnmente referida como la relación lineal-cuadrática. La componente lineal es una consecuencia de dos rompimientos ocasionados por una partícula cargada, mientras que la componente cuadrática es el resultado de dos rompimientos ocasionados por diferentes partículas cargadas. El término cociente  $\alpha/\beta$  corresponde a la probabilidad de que ocurra una interacción entre los rompimientos y es proporcional a la dosis que contribuyó a la muerte celular.

Se cree que los efectos biológicos principales (muerte celular y mutaciones) se deben a los productos de los eventos de ionización. La baja eficiencia dañina de la mayoría de las ionizaciones se debe a tres factores principales: procesos de atrapamiento de radicales libres, pequeño número de ionizaciones cercanas al ADN y procesos de reparación celular [Lawrence et al. 1980].

Se ha estimado que el daño celular producido por un Gray, en condiciones normales de oxígeno, puede causar una lesión letal por célula, tal como SSB y DSB. Otro tipo de lesiones que pueden producirse con energías tan bajas como 10-20 eV, son las rupturas simples, las cuales son causadas por intermediarios de radicales libres del agua y que modifican la unión

base-desoxirribosa. Las rupturas dobles son mas frecuentes, y se producen en diferentes pares de bases. Una dosis de R-X de 1 a 1,5 Gy provoca alrededor de 1000 rupturas simples y de 50 a 100 rupturas dobles [Kiefer, 1990]. Las bases pueden ser destruidas o modificadas químicamente, sobre todo sufren hidroxilaciones (hidroperoxidación de la timina). Las bases pirimídicas son mas sensibles que las púricas en el orden  $T > C \gg A > G$ . Las alteraciones a nivel de azúcares no son bien conocidas.

## **2.9 Reparación de las lesiones en el ADN**

La medición de la reparación se hace con curvas de supervivencia celular, sin embargo, éstas no cuantifican un daño integral ya que pueden producirse mutaciones génicas o aberraciones cromosómicas que no son contempladas con tales curvas.

Existen mecanismos de reparación que restauran al ADN íntegramente (escisión-resíntesis), aunque también se llevan a cabo reparaciones con faltas donde aumenta la frecuencia de mutaciones, incrementándose conforme aumenta la dosis y la tasa de dosis [Kiefer, 1990].

Los genes gobiernan la producción de enzimas reparadoras y pueden ir de simples a complejas, ejemplo de ello es la activación de p53. Existen sistemas de reparación constitutivos, que normalmente se encuentran en la célula, o bien inductivos, que aparecen cuando hay una lesión.

### **2.9.1 Reparación durante la división celular**

Cuando las células han sido irradiadas, se produce una disminución de la proporción de células en mitosis (disminuye el índice mitótico). La fase del ciclo celular que sufre un mayor retardo se observa en células irradiadas antes de la mitosis, en G<sub>2</sub>, y se debe al bloqueo de las células en condiciones no satisfactorias para la división o bien a que la síntesis de proteínas se hace más lenta.

La duración de esos retardos depende evidentemente del poder de los mecanismos de autorregulación y varía de un tejido al otro. Se ha observado que las células en las que el bloque pre-mitótico ha sido más largo tienen mayor probabilidad de morir, con respecto a aquellas en las que el bloque pre-mitótico es mas corto, y que las células no viables mueren en la mitosis. Las células en vías de degeneración pueden repararse dependiendo de la dosis

recibida. La reparación lenta ocurre con dosis bajas en tejidos de velocidad de proliferación lenta, y es probable que se reparen las lesiones [Yu, et al. 2000]. Sólo hay repoblación celular cuando las células nuevas toman el lugar de las células viejas que sufrieron muerte y fueron mandadas a apoptosis. La renovación celular es más rápida si la duración de la vida de las células diferenciadas es más corta. Así mismo, existe regulación de la proliferación en un tejido sano siempre que existe un equilibrio entre estimuladores e inhibidores.

## Capítulo III

### Metodología y Técnicas Empleadas

En este capítulo se plantea el tema de investigación y se describen los materiales y métodos empleados para resolverlo.

#### 3.1 Planteamiento del problema

El papel que juegan las proteínas contenidas en el núcleo de la célula, durante el proceso de irradiación, y el posterior daño biológico de la célula se han estudiado muy poco. Los tratamientos contra el cáncer utilizados en radioterapia, consisten primordialmente en el uso de radiación ionizante como rayos X o  $\gamma$ , y están basados en la respuesta biológica de las células por irradiar. Tal respuesta está determinada a partir de las curvas de supervivencia celular como función de la dosis suministrada.

Desde el punto de vista radiobiológico, el mayor daño al ADN debido a la radiación se debe a los dobles rompimientos de cadena que son consecuencia de la acción directa de la radiación. La dosis requerida para formar DSB es alta y tiene una muy baja probabilidad de ocurrencia por dosis ambiental debida al fondo natural de radiación.

El daño genético por entrecruzamiento (proteínas -proteína, ADN-proteína) se debe a las mutaciones producidas por el cambio en el orden de las bases A, T, C, G, ya que éste puede modificar la función celular. Lo anterior se debe a que, durante la replicación del ADN, es necesario que éste se desenrolle y copie a sí mismo, pero si durante este proceso, el ADN se encuentra unido a una proteína, no se puede replicar y se transmite una información incompleta e incorrecta que se refleja en cambios a nivel celular, que producen información que puede modificar la función celular ocasionando mutaciones. Se ha reportado evidencia de que, al igual que algunos agentes químicos como el As y el cisplatino, la radiación ionizante produce entrecruzamientos entre proteínas y el ADN [Ramírez et al., 2000], [Fornace and Little, 1997].

### 3.1.2. Hipótesis:

El entrecruzamiento entre el ADN y las partículas generadas por radiación ionizante en células de mamíferos irradiadas a dosis menores que 20 Gy, en condiciones isotónicas de la radiación muestran un comportamiento lineal con la dosis.

### 3.1.3. Objetivos:

#### Objetivo general.-

Estudiar la formación de DPC, como función de la dosis suministrada, en linfocitos de mamífero, irradiados por rayos  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$  bajo condiciones isotónicas (PBS) y en hipoxia.

#### Objetivos particulares.-

- ❖ Determinar la tasa de dosis del irradiador GammaCell del Instituto de Ciencias Nucleares.
- ❖ Determinar la dosis de tránsito de la muestra biológica a través del irradiador.
- ❖ Realizar la curva de calibración del fluorómetro.
- ❖ Encontrar la dependencia de la formación de entrecruzamientos como función de la dosis suministrada.

## 3.2 Calibración del irradiador GammaCell 200

La irradiación de las muestras celulares se llevó a cabo en el irradiador GammaCell 200 del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM. Dicho irradiador está formado por 24 fuentes de  $^{60}\text{Co}$ , las cuales emiten en un 99% radiación  $\beta^-$  y 1% de radiación  $\gamma$  con energía promedio de 1.25 MeV. Las fuentes de  $^{60}\text{Co}$  del irradiador GammaCell tienen 17.97 cm de altura y están encapsuladas en un blindaje de acero inoxidable. Rodean en forma concéntrica a la muestra la cual es llevada hasta el centro de dichas fuentes a través de un émbolo de acero inoxidable de 4.4 cm de radio y 14 cm de altura. La figura 3.1 muestra esquemáticamente el irradiador.

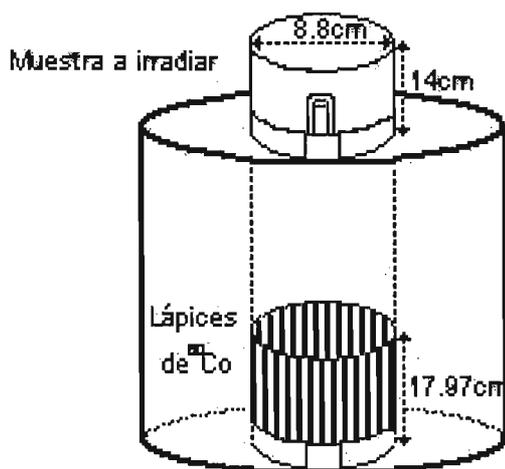


Figura 3.1. Diagrama esquemático del irradiador del GammaCell 200.

La calibración del irradiador consistió en determinar la tasa de dosis en la posición de irradiación, a partir de la dosis absorbida en el dosímetro químico conocido como Fricke, descrito en la sección 1.5.

### 3.2.1. Determinación de la tasa de dosis del irradiador GammaCell 200

La tasa de dosis del irradiador GammaCell 200 fue determinada con el dosímetro Fricke, descrito en la sección 1.5. Se irradiaron muestras de ésta solución durante 78, 130 y 275 minutos, leyendo su absorbancia en el espectrofotómetro UV visible marca CARY, a una longitud de onda de 304 nm. Los resultados de la irradiación se muestran en la tabla 3.1 y en la figura 3.2.

Tabla 3.1.  $\Delta DO$  y dosis obtenida con la solución Fricke.

Tiempo de irradiación (min)	$\Delta DO$	Dosis (Gy)
$0 \pm 0.01$	0	$0.0 \pm 0.001$
$78 \pm 0.01$	0.189	$52.54 \pm 0.01$
$130 \pm 0.01$	0.3161	$87.88 \pm 0.01$
$275 \pm 0.01$	0.6663	$185.23 \pm 0.01$

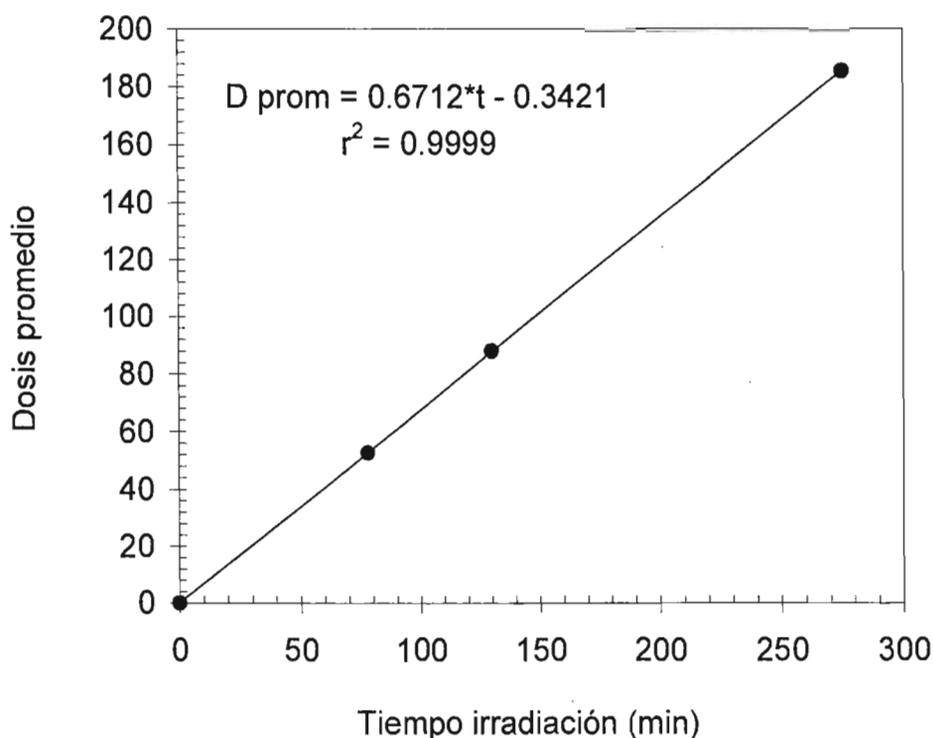


Figura 3.2. Curva de calibración para determinar la tasa de dosis en el irradiador GammaCell 200.

Por lo anterior, la tasa de dosis obtenida en el centro del irradiador GammaCell 200 es de  $0.67 \pm 0.03 \text{ Gy min}^{-1}$  (7 de diciembre 2004).

### 3.2.2 Determinación de la dosis de tránsito

El tránsito de la muestra por el irradiador hasta la altura donde se encuentran las fuentes de  $^{60}\text{Co}$  involucra una dosis adicional a la calculada, que se debe al tiempo de bajada y subida (B + S) a una tasa de dosis variable. Para tiempos de irradiación pequeños (< 1 minuto) esta dosis es una contribución importante y fue medida para el irradiador GammaCell 200 irradiando dosímetros TLD-100 durante diferentes tiempos siguiendo el protocolo que se enuncia a continuación:

- 1) **Preparación de los dosímetros.-** Horneado a  $400^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se hornearon a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

- 2) **Caracterización de los dosímetros.-** Del lote de dosímetros irradiados, se seleccionaron 16 cuya señal termoluminiscente a una dosis dada fuese más similar. Posteriormente, se realizó la identificación de cada dosímetro (No. de dosímetro).
- 3) **Irradiación.-** Los dosímetros fueron irradiados a diferentes tiempos, a una tasa de dosis de  $0.73 \pm 0.03 \text{ Gy min}^{-1}$  (marzo 2004). El tiempo B + S corresponde al tiempo que le toma bajar (B) y subir (S) al émbolo en el irradiador. Los resultados se muestran en la tabla 3.2.
- 4) **Lectura.-** Se realizó en un equipo Harshaw 3500.

Tabla 3.2. Tiempo de irradiación, dosis y señal termoluminiscente de los dosímetros utilizados para determinar la dosis debida al tránsito de la muestra en el irradiador.

No. de dosímetro	Tiempo de irradiación ( $\pm 0.001 \text{ min}$ )	Dosis (Gy) $\pm 4\%$	Señal TL (nC)	Señal TL - Señal(B+S) <sub>prom</sub> (nC)
2	B + S	—	130.1	—
3	B + S	—	124.4	—
6	0.25	0.2	527.2	384.6
8	0.25	0.2	518.5	375.9
9	0.5	0.4	945	802.4
10	0.5	0.4	900.7	758.1
15	1	0.7	1736	1593.4
16	1	0.7	1781	1638.4
18	1.5	1.1	2433	2290.4
19	1.5	1.1	2502	2359.4
23	3	2.2	5082	4939.4
24	3	2.2	4788	4645.4
25	5	3.7	8529	8386.4
27	5	3.7	8682	8539.4
31	B + S	—	152.9	—
32	B + S	—	163.1	—

La señal TL obtenida en las lecturas se debe al tiempo de irradiación del dosímetro más el tiempo de bajada y subida. Para determinar la dosis debida al tiempo de tránsito, se restó el promedio de la señal TL debida al tiempo (B+S) a la señal TL medida. Los valores obtenidos se muestran en la columna 5 como (Señal TL - Señal(S+B)<sub>prom</sub>).

La figura 3.3 muestra la gráfica de la señal TL como función de la dosis. La pendiente de la gráfica corresponde al factor de proporcionalidad para pasar de señal TL a dosis.

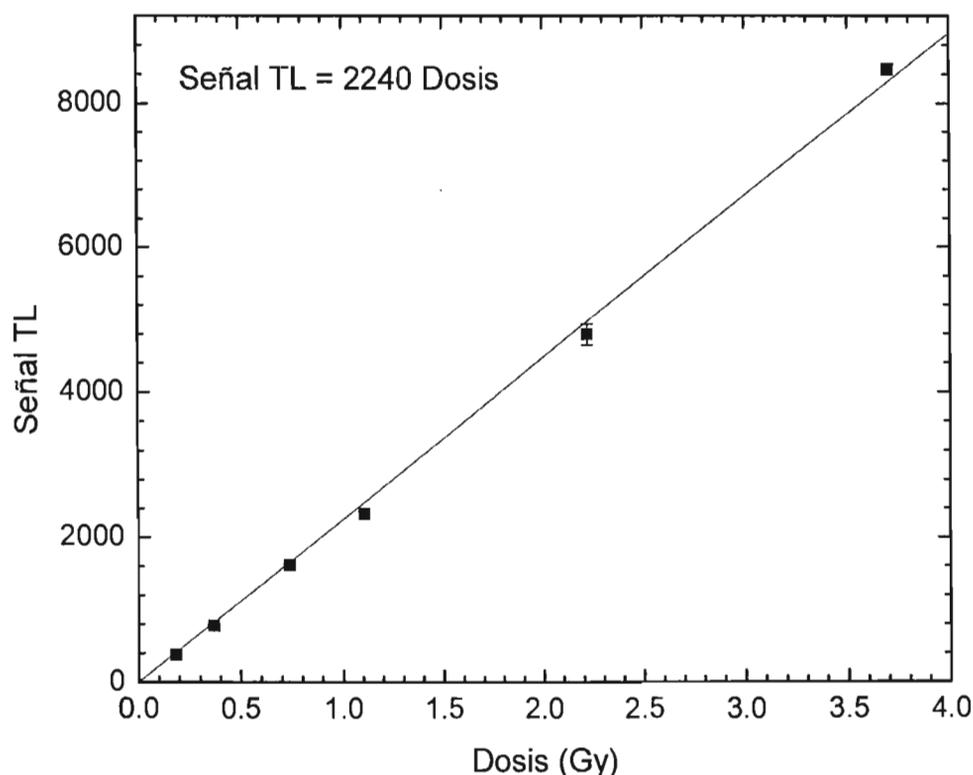


Figura 3.3. Señal TL (nC) de los dosímetros TLD-700 como función de la dosis.

La ecuación obtenida para la señal TL (nC), como función de la dosis, es:

$$\text{Señal TL} = 2240 \pm 30 \cdot \text{dosis}, \quad r^2 = 0.9997 \quad [3.1]$$

De la tabla 3.2, el promedio de la señal TL obtenida por la subida y bajada de la muestra en el irradiador (S+B) es de 142.63 nC, entonces, por [3.1], la dosis debida al tiempo de tránsito de la muestra es  $0.064 \pm 0.002$  Gy.

### 3.3. Calibración del fluorómetro

En este trabajo se utilizó un fluorómetro modelo 450 de Barnsted Termolyne Corporation. El fluorómetro digital es un instrumento altamente sensible que utiliza un circuito integrado analógico y un procesador digital de la señal. La energía de excitación es proporcionada por una lámpara de cuarzo-halógeno. La luz emitida por la lámpara es seleccionada por un filtro pasabandas e incide en la muestra, la cual absorbe una porción de su energía y, si hay fluorescencia, se emite luz con una energía cuya longitud onda es característica de la molécula observada. Si estas moléculas no son excitadas con su longitud de onda característica, éstas no absorben luz y no se produce fluorescencia en la molécula. La tolerancia de esta longitud de onda característica con respecto a otra que no lo sea es menor a los 50 nm. [M.U. 1999].

La señal es amplificada por un tubo fotomultiplicador (PMT) con bajo ruido cuya ganancia es típicamente  $25 \times 10^6$  veces. La salida de corriente del PMT es transformada a un voltaje y amplificada por una corriente. Este voltaje es integrado por un filtro que elimina la componente de ruido de la corriente alterna. La constante de integración de tiempo es seleccionada automáticamente por el interruptor de ganancia (Gain Switch). Este voltaje de corriente directa es escalado por el cero y el circuito span y convertido a una señal digital por el convertidor analógico a digital. La señal digital es desplegada en el panel en un arreglo de LED de tres dígitos. La imagen del fluorómetro utilizado en este trabajo se muestra en la figura 3.4.



Figura 3.4. Fluorómetro mod 450 de Barnsted Termolyne Co.

La tabla 3.3 especifica las características más importantes del fluorómetro dadas por el fabricante.

Tabla 3.3. Especificaciones del fluorómetro mod. 450 de Barnsted Termolyne utilizado.

Característica	Especificaciones
Lectura	Segmento de 3 1/2 dígitos
Intervalo de longitud de onda	Lámpara de halógeno (excitación 340-750 nm)
Sensibilidad	10 picogramos por ml (Isotiocyanato fluorescente); 15 ppm (Sulfato de Quinina Dihidratado)
Resolución	0.05% de escala completa
Linealidad	1% típicamente
Intervalo de temperatura	10 a 38 ° C en operación. Almacenamiento de 0 hasta 75 ° C
Humedad	< 95%

Para conocer la cantidad de ADN contenido en la muestra a través de su fluorescencia medida con el fluorómetro, fue necesario realizar una calibración previa en éste. El protocolo de calibración se enuncia a continuación:

- 1) Se preparó una solución STOCK de 1 mg de Hoescht 33385 en 1 ml de agua destilada y estéril. De esta solución, se tomaron 20 µl y se diluyeron con 980 µl de agua destilada para dar una concentración final de 20 ng/ml. El resto de la solución STOCK se guardó a 4 ° C en la oscuridad.
- 2) Se preparó una solución blanco con 1 ml de solución D y se añadieron 12.5 µl de la solución Hoescht.
- 3) Se empleó una muestra conocida de ADN de bovino, aforándose con solución D, tal como se muestra en la Tabla 3.4.
- 4) Para estimular la fluorescencia en las muestras se utilizaron 12.5 µl de la solución de Hoescht (20 ng/ml) por cada ml de solución. Se agitó la muestra en un vórtex durante 5 s y se dejó incubar en oscuridad por 10 minutos. Durante este tiempo, se procedió a:
  - i) Encender el fluorómetro dejándolo calentar 10 min aproximadamente

- ii) Abrir el span (girar perilla hasta el tope derecho)
- iii) Ajustar a cero con ganancia 1
- iv) Calibrar a cero el fluorómetro utilizando el blanco, siempre con el tubo en la misma dirección. Tomar la lectura del fluorómetro cuando el valor de éste permanezca constante durante la medición.
- v) Enjuagar el tubo con agua destilada y colocar la muestra por medir, con orden de mayor a menor concentración de ADN (recomendación del fabricante).
- vi) Se realizaron 3 medidas por cada muestra en diferentes días.

La tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos de la fluorescencia, como función de la concentración de ADN utilizado en cada muestra.

Tabla 3.4. Concentración de ADN y valor de fluorescencia obtenido durante la calibración del fluorómetro. La incertidumbre corresponde a la desviación estándar del promedio.

ng ADN/ml	Fluorescencia			
	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
0	0	0	0	0 ± 0
100	0	32	13	15 ± 9
200	26	35	27	29 ± 3
500	71	71	79	74 ± 3
1000	132	131	137	133 ± 2
2000	249	276	271	265 ± 8
5000	602	648	645	630 ± 20

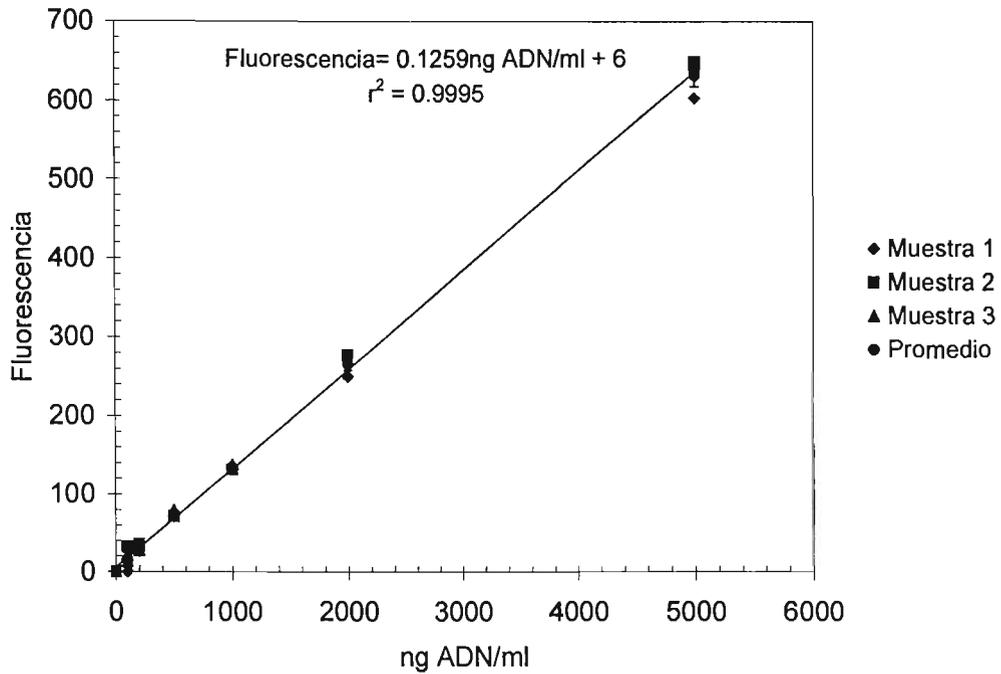


Figura 3.5. Curva de calibración del fluorómetro utilizado en este trabajo.

A partir de la curva de calibración obtenida, se realizó una inversión de los ejes para determinar la cantidad de ADN contenida en la muestra a partir de su fluorescencia medida, tal como se muestra en la figura 3.6.

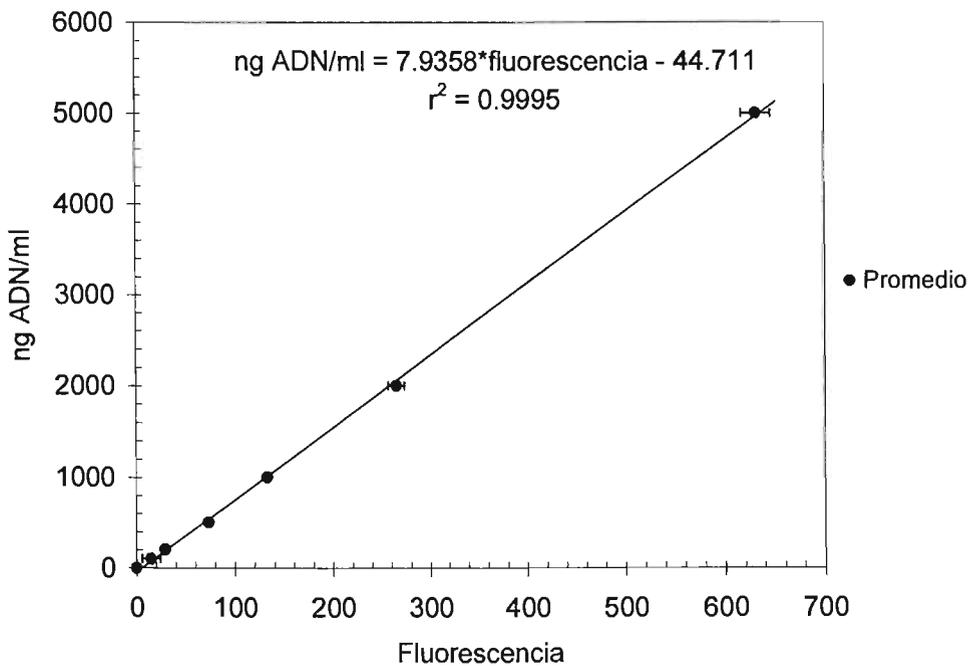


Figura 3.6. Concentración de ADN vs fluorescencia promedio.

### 3.4 Obtención y conteo de la muestra

Se extrajo sangre fresca de la vena de un conejo, puncionando las orejas con una aguja calibre 21. De forma previa, la jeringa fue heparinizada para evitar que la sangre coagulara.

Para aislar los linfocitos del resto (plasma y eritrocitos), se realizó el siguiente protocolo:

- 1) En un tubo de centrifuga de 15 ml, se colocaron 3 ml de Lymphoprep, posteriormente se vaciaron 5 ml de sangre fresca por las paredes del tubo (utilizando una jeringa) cuidando de no romper la tensión superficial entre las dos sustancias.
- 2) Separación por densidades: Los tubos fueron centrifugados a 1800 rpm durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se formó un gradiente de densidades: la parte superior corresponde al plasma sanguíneo, la central a los linfocitos, la inferior a los eritrocitos.
- 3) Lavado: Los linfocitos fueron colocados en otro tubo nuevo y estéril con un volumen de solución PBS (isotónica) similar al de los linfocitos obtenidos. Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos para que los linfocitos formaran por fuerza centrífuga un botón en la parte inferior del tubo. Se realizaron 2 lavados.
- 4) Conteo de linfocitos: Transcurridos los dos lavados, se resuspendió el botón formado con 1 ml de solución PBS y se contó el número de células vivas. Para ello se mezclaron 10  $\mu$ l azul tripán con 10  $\mu$ l de las células contenidas en 1 ml de PBS. La mezcla fue colocada en una cámara de Neubauer. El conteo se realizó con un microscopio electrónico con objetivo 10 X.
- 5) Una vez contado el número de células, se separó la mezcla en alícuotas con 2 a 3  $\times$  10<sup>6</sup> células. Los linfocitos fueron colocados en tubos eppendorf de 2 ml con la mínima cantidad de PBS.
- 6) A las muestras irradiadas en condiciones hipóxicas, se les suministró gas de N<sub>2</sub> durante 5 minutos para eliminar el oxígeno contenido en la muestra.
- 7) Los tubos fueron colocados en hielo y transportados de manera inmediata al ICN para su irradiación.

### 3.5. Irradiación de la muestra

Las muestras fueron irradiadas bajo EPC con rayos  $\gamma$  provenientes de una fuente de <sup>60</sup>Co a una  $\dot{D} = 0.67 \pm 0.03$  Gy/min. Para ello, se colocaron los tubos en el centro de la base del irradiador y a una altura de 3 cm. Inmediatamente después de haber transcurrido el tiempo de irradiación, se añadió a las muestras 500  $\mu$ l de solución A (ver Apéndice) para romper la

membrana de éstas. Para evitar reparación celular, posterior a su lisado fueron colocadas en hielo y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo mínimo de 8 h antes de recibir el tratamiento de desproteinización (DPC).

### **3.6. Protocolo para el aislamiento de los fragmentos de ADN entrecruzado con proteínas**

Una vez que las muestras reposaron cuando menos 8 h, les fueron quitadas las proteínas entrecruzadas siguiendo el protocolo que se enuncia a continuación [Costa, M. et al. 1996]. Los componentes de las Soluciones A, B, C y D son enlistados en el Apéndice.

- 1) Descongelar la(s) muestra(s) a  $37^{\circ}\text{C}$
- 2) Tomar una alícuota de  $40\ \mu\text{l}$  para ADN total (es decir, ADN entrecruzado con proteínas, ADN sin proteínas y ADN que no está unido covalentemente a proteínas). Una vez que se separó la muestra para ADN total se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$ , al resto de la muestra ( $\sim 450$  a  $550\ \mu\text{l}$ ) se le dio el siguiente tratamiento:
- 3) Pasar 4 veces por aguja de calibre no. 21. Lo anterior se realizó para fragmentar el ADN en trozos de tamaño similar.
- 4) Adicionar  $500\ \mu\text{l}$  de Solución B y mezclar durante 5 s a toda velocidad en el vórtex. La solución B está compuesta por KCl, la cual es una sal que se une a las proteínas. Los pasos 7 a 11 tienen como finalidad aislar a las proteínas y los DPC formados. Para ello se realizan 3 lavados, quedándonos únicamente con las proteínas y el ADN que fue entrecruzado con proteínas
- 5) Poner en baño térmico a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos
- 6) Invertir tubos 3 veces
- 7) Poner en hielo 5 minutos
- 8) Centrifugar a  $6000g$  por 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$
- 9) Quitar el sobrenadante con pipeta (cuidado). Adicionar 1ml de Solución C (agitar brevemente)
- 10) Resuspender con micropipeta
- 11) Poner en baño térmico a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos (invertir tubos 3 veces)
- 12) Transcurrido el tiempo en el baño térmico, colocar la muestra en hielo por 5 minutos
- 13) Repetir pasos 7-11, 2 veces más. En total se hacen 3 lavados
- 14) Después del último lavado, resuspender el botón en  $250\ \mu\text{l}$  de Solución D

- 15) Adicionar proteinasa K (PK) de forma tal que su concentración en la muestra sea de 0.2 mg/ml. La adición de PK se realiza para degradar a las proteínas entrecruzadas con el ADN.
- 16) Poner en baño a 50-55 ° C durante 3 horas.
- 17) Adicionar 50 µl de BSA 4 mg/ml, mezclar y poner en hielo, para precipitar las proteínas y los péptidos.
- 18) Centrifugar a 12000 g durante 10 min a 4 ° C
- 19) Recuperar el sobrenadante y determinar la concentración de ADN por fluorescencia. El sobrenadante recuperado corresponde al ADN que se entrecruzó con proteínas por enlaces covalentes.

La figura 3.7 representa el diagrama esquemático con el procedimiento experimental descrito en esta sección.

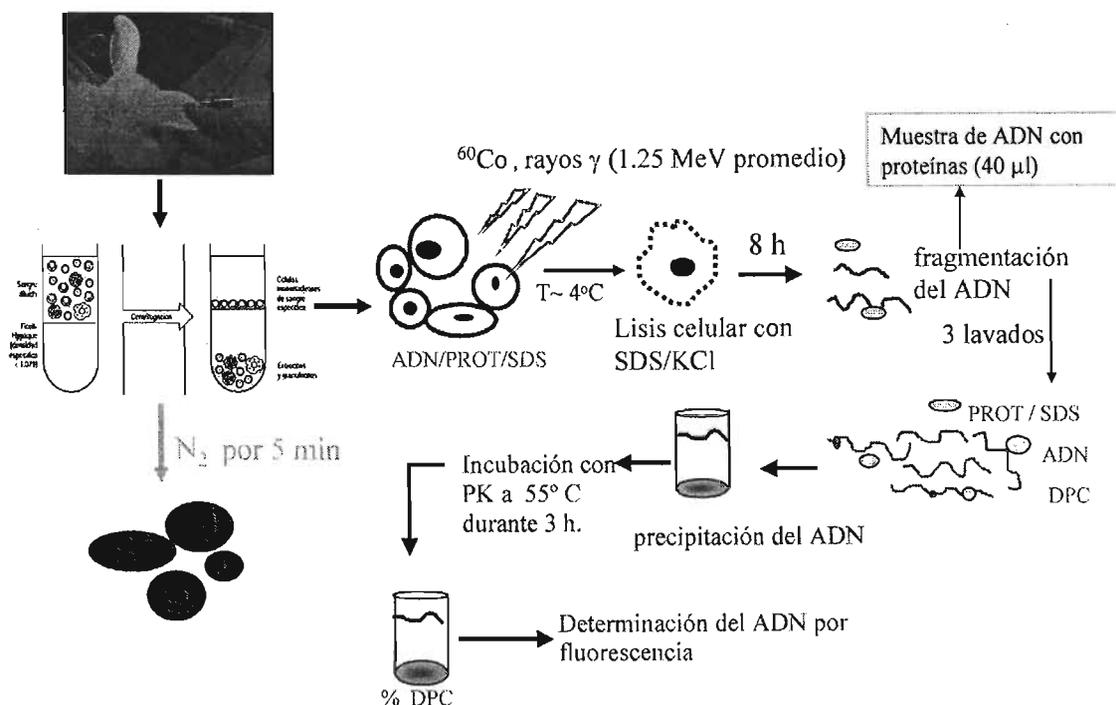


Figura 3.7. Esquema del protocolo de desproteinización utilizado

### 3.7 Determinación del porcentaje de ADN entrecruzado con proteínas

Una vez obtenido el sobrenadante, se dejó reposar a  $-20^\circ\text{C}$  durante al menos 8 h antes de leer su fluorescencia. Las muestras fueron descongeladas a  $37^\circ\text{C}$  y resuspendidas con micropipeta para asegurar una mayor homogenización.

Se tomó todo el sobrenadante de las muestras de ADN (total y de DPC) y se aforó a 1 ml con Solución D (Apéndice). Posteriormente, se añadieron 12.5  $\mu$ l de Hoescht con una concentración de 20 ng/ml. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos en oscuridad y se determinó su fluorescencia con el fluorómetro.

## Capítulo IV

### Resultados

En este capítulo se presentan los resultados del porcentaje de entrecruzamientos ADN-proteína (% DPC) producidos en muestras de linfocitos de conejo ( $2 - 3 \times 10^6$  células) irradiados en solución isotónica (PBS) en condiciones de normoxia (nivel normal de oxígeno) e hipoxia (baja o nula cantidad de oxígeno), a un intervalo de dosis de 0 a 20 Gy. La cuantificación del %DPC en ambas condiciones fue determinadas de acuerdo con los protocolos descritos en las secciones 3.4 - 3.6.

#### 4.1.1 Irradiación en normoxia

Los resultados que se presentan en la tabla 4.1 corresponden a los ng de ADN contenidos en la muestra celular, mismos que fueron determinados con la curva de calibración; ADN/ml = 7.9358 fluorescencia - 44.711, obtenida en la sección 3.3.

Tabla 4.1. Cantidad de ADN total, obtenida en condiciones de normoxia.

ng de ADN determinado a través de su fluorescencia y la curva de calibración del fluorómetro (figura 3.5)					
Dosis Gy	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	PROMEDIO $\times 10^4$
0.0	105669		147678		$12.0 \pm 5$
0.4	123102	117547	130508		$12.4 \pm 0.4$
0.7	145586	131037			$13.8 \pm 0.6$
2.2	173097	151935	117760		$15.0 \pm 2$
3.7	154580	146645	113050		$14.0 \pm 1$
6.5	97443	74669	68320		$8.0 \pm 0.9$
9.2	91623	40896	27451	56767	$5.0 \pm 2$
13.9	41803	46111			$3.9 \pm 0.5$
18.5	30239	64250			$5.0 \pm 1$

Tabla 4.2. Cantidad de ADN que estuvo entrecruzado con proteínas, obtenido en condiciones de normoxia.

ng de ADN determinado a través de su fluorescencia y la curva de calibración del fluorómetro (figura 3.5)					
Dosis Gy ± 4%	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	PROMEDIO × 10 <sup>3</sup>
0	5443		3670		4.3 ± 0.6
0.4	2686	4193	4551		3.8 ± 0.6
0.7	4828	3896			4.4 ± 0.5
2.2	6832	4451	4016		5.1 ± 0.8
3.7	5443	6158	4420		5.3 ± 0.4
6.5	4954	3497	3093		3.8 ± 0.6
9.2	4579	2899	1939	2581	3.0 ± 0.7
13.9	2775	3604			4 ± 1
18.5	2193	5544			4 ± 2

El porcentaje de ADN entrecruzado con proteínas (%DPC) fue obtenido con el cociente del valor obtenido de ADN en la alícuota de 40 µl (ADN total) con respecto a la alícuota de ADN sometida al proceso de desproteínización (DPC) de acuerdo con la relación:

$$\%DPC = \left( \frac{\text{ADN DPC}}{\text{ADN total}} \right) \times 100 \quad [4.1]$$

Donde ADN DPC representa la cantidad de ADN que estuvo entrecruzada con proteínas y que le fueron quitadas con el proceso descrito en la sección 3.6.

La tabla 4.3 muestra el % de DPC obtenido a partir de las tablas 4.1 y 4.2.

Tabla 4.3. %DPC obtenido en condiciones de normoxia.

Dosis	% DPC determinado por fluorescencia				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Promedio
0	2.9		2.5		2.7 ± 0.2
0.4	2.2	3.6	3.5		3.1 ± 0.5
0.7	3.3	3.0			3.2 ± 0.2
2.2	3.9	2.9	3.4		3.4 ± 0.4
3.7	3.5	4.2	3.9		3.9 ± 0.3
6.5	5.1	4.7	4.5		4.8 ± 0.2
9.2	5.0	7.1	7.1	4.5	5.9 ± 0.8
13.9	6.6	7.8			7.2 ± 0.6
18.5	7.3	8.6			7.9 ± 0.7

La figura 4.1 muestra los resultados anteriores, en forma gráfica, para el % DPC obtenido en condiciones de normoxia y en solución PBS.

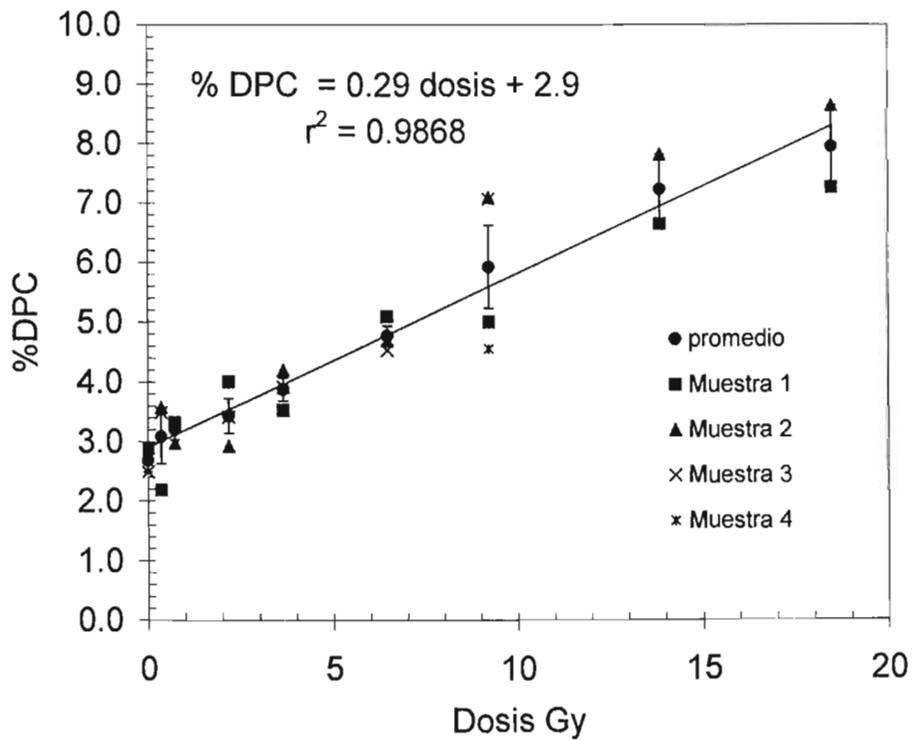


Figura 4.1. %DPC, obtenido en condiciones de normoxia, como función de la dosis suministrada.

#### 4.1.2 Irradiación en condiciones hipóxicas

Para determinar la influencia de la reducción de oxígeno en la muestra irradiada, se realizó el mismo procedimiento de aislar proteínas en condiciones normales de oxígeno (normoxia), que fue descrito en la sección 3.6. La variación a este procedimiento para producir hipoxia celular consistió en bombear durante 5 minutos gas N<sub>2</sub> a la muestra para desplazar la cantidad de oxígeno presente en ella. Aunque no se estimó el grado de hipoxia celular producido por el bombeo, creemos que éste fue suficiente para reducir la cantidad normal de oxígeno. La tabla 4.4 muestra los resultados en tales condiciones.

Tabla 4.4. Cantidad de ADN total bajo condiciones de hipoxia.

ng de ADN determinado a través de su fluorescencia y la curva de calibración del fluorómetro (figura 3.5)			
Dosis Gy ± 4%	Muestra 1	Muestra 2	PROMEDIO x 10 <sup>4</sup>
0.0	26195	25930	2.61 ± 0.04
9.2	23748	15051	1.9 ± 0.9
18.5	23582	15389	2 ± 1

Tabla 4.5. Cantidad de ADN sin proteínas bajo condiciones de hipoxia.

ng de ADN determinado a través de su fluorescencia y la curva de calibración del fluorómetro (figura 3.5)			
Dosis Gy ± 4%	Muestra 1	Muestra 2	PROMEDIO x 10 <sup>3</sup>
0.0	2720	2796	2.7 ± 0.1
9.2	3762	2375	3.1 ± 0.1
18.5	5524	3156	4.3 ± 0.1

Tabla 4.6 % DPC medido en condiciones de hipoxia.

Dosis Gy ± 4%	% DPC determinados por fluorescencia		
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio
0.0	10.4	10.8	10.6 ± 0.2
9.2	15.84	15.78	15.80 ± 0.03
18.5	20.5	23.4	22 ± 1

A continuación, se presenta la gráfica correspondiente a los resultados de la tabla 4.6.

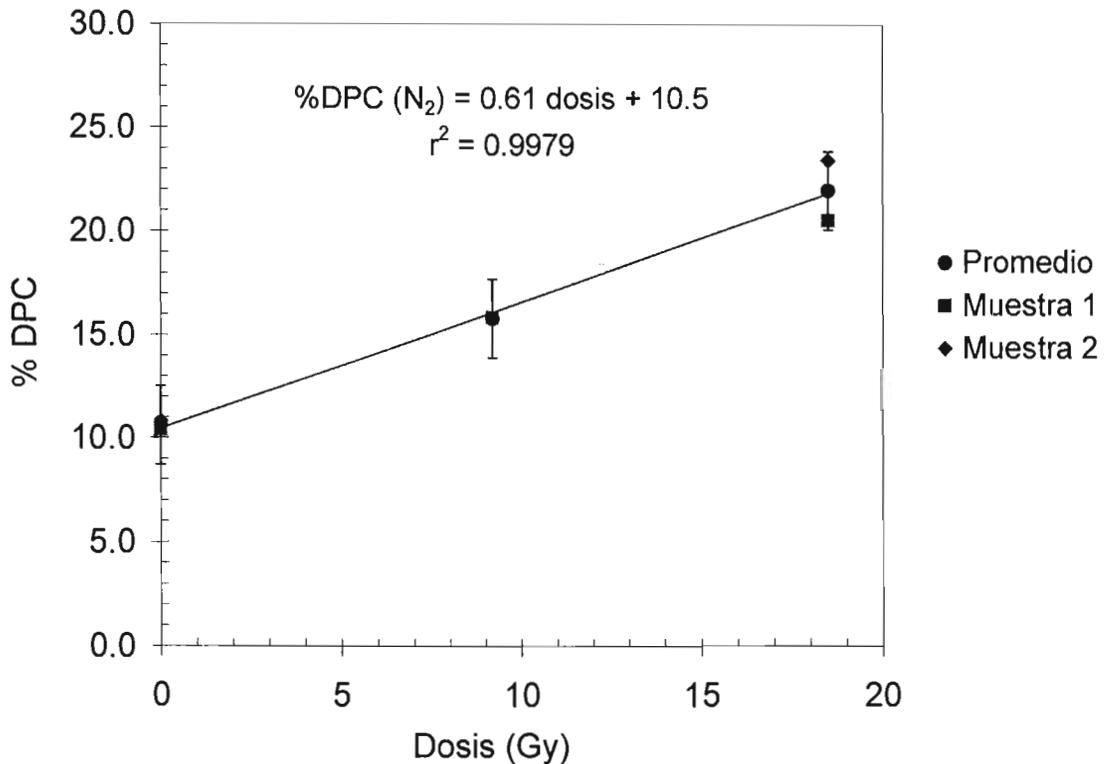


Figura 4.2. % de DPC obtenido como función de la dosis suministrada a las muestras bajo condiciones de hipoxia y en solución PBS.

Como puede observarse de las figuras 4.1 y 4.2, el burbujear  $N_2$  en la muestra induce la formación de DPC, ya que la muestra sin irradiar incrementó en un 7.9% el porcentaje de DPC formados.

Para cuantificar el efecto de la radiación ionizante bajo condiciones de hipoxia, se restó  $7.9 \pm 0.3$  (diferencia entre el %DPC de las muestras sin irradiar en condiciones de hipoxia y normal de oxígeno) a las muestras a las que se les burbujearó  $N_2$ . Esto permitió obtener el incremento

en el % de DPC debido únicamente a la radiación. Posteriormente, se comparó esta corrección, con el %DPC producidos en normoxia para una misma dosis. La tabla 4.7 muestra los resultados.

Tabla 4.7. % DPC obtenido en condiciones de hipoxia y normoxia.

Dosis Gy ± 4%	% DPC			$\%(M_h - M_n)$
	Muestra en hipoxia	Muestra en normoxia ( $M_n$ )	Muestra en hipoxia - 7.9 ( $M_h$ )	
0.0	10.6 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.3	0
9.2	15.80 ± 0.03	5.9 ± 0.8	7.9 ± 0.3	34
18.5	22 ± 1	7.9 ± 0.7	14 ± 1	78

Donde  $\%(M_h - M_n)$  representa el incremento en el %DPC debido al efecto de irradiar a las células en presencia de  $N_2$ . La figura 4.3 muestra el %DPC, como función de la dosis de los valores

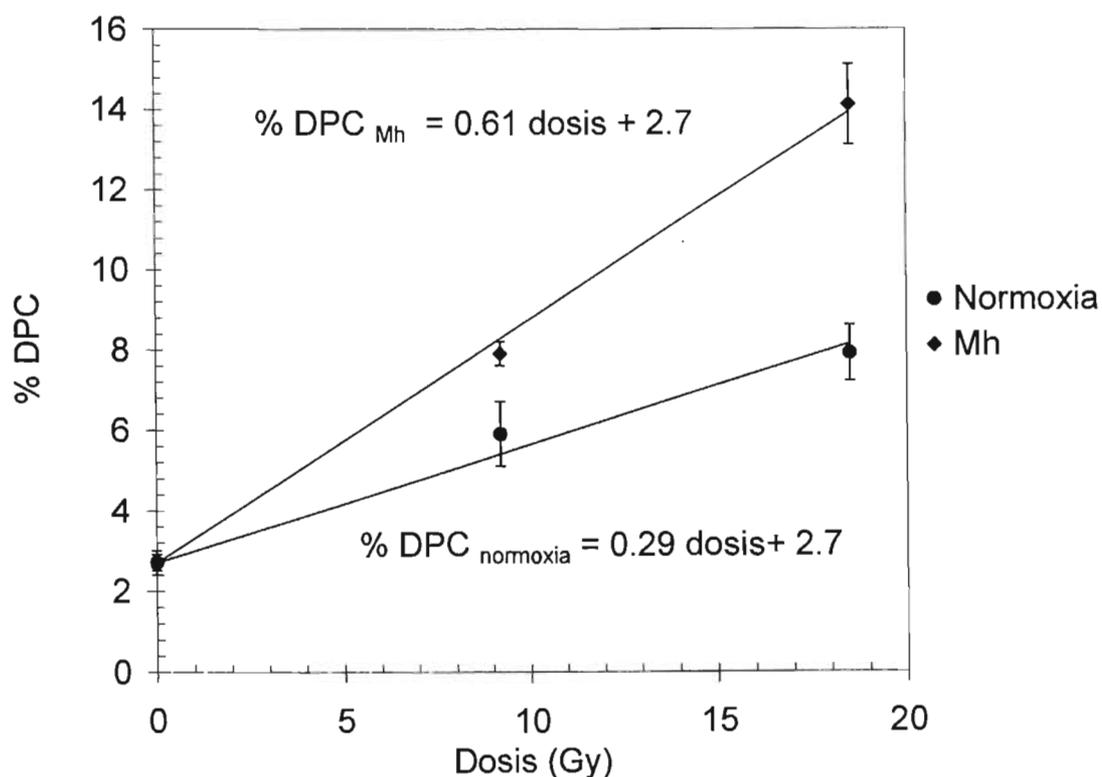


Figura 4.3. Comparación del % DPC formados bajo condiciones de hipoxia, normoxia.

De acuerdo con los resultados presentados en las figuras 4.1 y 4.2, se induce aproximadamente el doble de DPC, por unidad de dosis, en condiciones de hipoxia que en normoxia.

Para tratar de explicar el incremento del entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas bajo condiciones hipóxicas resultó necesario descartar los posibles factores que pudieron producir dicho incremento. Una de las primeras preguntas a resolver fue la influencia del burbujeo en la muestra. Para determinar si la viabilidad (morbilidad) de la muestra celular de linfocitos era modificada por el burbujeo de N<sub>2</sub>, se realizó el experimento que se describe a continuación (sección 4.2).

#### 4.2 Determinación de la viabilidad celular como función del burbujeo de N<sub>2</sub>

Se realizó el conteo de células vivas con respecto a las muertas en una solución de 10 µl de linfocitos en PBS y 10µl de azul tripán en la cámara de Newbauer. La tabla 4.8 muestra los resultados de viabilidad celular obtenidos.

Tabla 4.8 Relación de viabilidad celular antes de aplicar el tratamiento.

	Vivas	Muertas
	90	26
	64	22
	97	17
	89	24
	70	25
Promedio	82 ± 6	23 ± 2
% Viabilidad	72 ± 8	
# inicial cel/ml	6.5 × 10 <sup>6</sup>	

Una vez que se determinó el porcentaje de células vivas en la alícuota, se resuspendió y dividió a ésta en 3 alícuotas de 333 µl cada una, de éstas, se burbujeo a una muestra con N<sub>2</sub>, y a otra con aire durante 5 minutos. Se guardó una muestra control a la que no se le aplicó ningún tratamiento. Posteriormente se determinó nuevamente la viabilidad celular por muestra. Los resultados se indican en la tabla 4.9.

**Tabla 4.9.** Viabilidad celular posterior al burbujeo.

	<b>N<sub>2</sub></b>	<b>Aire</b>	<b>Control</b>
	<b>Vivas / Muertas</b>	<b>Vivas / Muertas</b>	<b>Vivas / Muertas</b>
	54 / 21	50 / 20	35 / 14
	38 / 17	64 / 23	57 / 16
	50 / 18	44 / 20	60 / 18
	55 / 15	50 / 20	50 / 12
<b>Promedio</b>	49 ± 8 / 18 ± 3	52 ± 8 / 21 ± 2	50 ± 10 / 15 ± 3
<b>% Viabilidad</b>	60 ± 10	60 ± 10	70 ± 20

De lo anterior, puede concluirse que la muerte celular ocurre principalmente porque las células se encuentran un tiempo mayor en PBS, no así por burbujear N<sub>2</sub> o aire, ya que no hay una reducción significativa entre la viabilidad celular de las alícuotas que recibieron tratamiento con respecto a la control. Una vez que corroboramos que el burbujeo no afecta al daño celular, realizamos una prueba para establecer si este burbujeo incrementa el estrés oxidativo en las células.

La sección 4.3 describe la metodología utilizada para determinar a través de una técnica de tinción, el grado de estrés oxidativo generado en las células cuando se les burbujea gas N<sub>2</sub> o aire.

### **4.3 Protocolo para determinar el grado de oxidación celular**

Lo que buscamos al realizar este ensayo es entender qué es lo que está causando un incremento en el porcentaje de entrecruzamientos entre el ADN y las proteínas en condiciones de hipoxia. Para ello, suponemos que uno de los factores que influye en la producción de DPC es el estrés oxidativo de las células, y que este nivel se ve modificado cuando se les ha burbujeadado N<sub>2</sub>. Si este valor es significativamente diferente del obtenido en normoxia, este cambio en el estrés oxidativo pudiera estar relacionado con una mayor o menor producción del porcentaje de DPC en condiciones de hipoxia. Esto podría explicar porqué en condiciones donde existe una mayor cantidad de oxígeno rodeando a la célula, se produce un menor porcentaje de DPC.

Uno de los blancos de la oxidación celular es el ADN. La oxidación de las guaninas es el indicador que más frecuentemente se utiliza. En este protocolo se decidió identificar de

manera semi- cuantitativa, la cantidad de 8 hidroxiguanosina mediante el uso de un anticuerpo específico, para ello, se realizó el siguiente protocolo experimental, aplicado a muestras por duplicado, el cual está formado por 4 etapas: i) Fijación de las células en etanol, ii) fijación de las células en la laminilla, iii) tinción celular y iv) cuantificación del grado de oxidación a partir del tono de gris en la imagen. El estrés oxidativo producido en la muestra es proporcional al % de tinción.

### **i) Fijación de las células en etanol**

- 1) Se obtuvieron de 8 a 10 millones de linfocitos
- 2) Posteriormente, se les aisló en muestras de  $\approx 10^6$  linfocitos en un tubo eppendorf en 1 ml de PBS estéril.
- 3) Se consideraron 4 grupos:
  - i) Control
  - ii) Control positivo (Muestra con 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
  - iii) Burbujeo de aire durante 5 minutos
  - iv) Burbujeo de N<sub>2</sub> durante 5 minutos
- 4) Los tubos eppendorf fueron centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos, únicamente para que las células se vayan al fondo del tubo.
- 5) Posteriormente, se fijó el pellet (células en botón) con etanol al 70%, se resuspendió con cuidado y se centrifugó para cambiar el fijador.
- 6) Se almacenó a la muestra a -20 ° C durante 24 horas.

### **ii) Fijación de las células en la laminilla**

- 1) Para hacer las laminillas, se centrifugaron los tubos a 1000 rpm durante 10 minutos. Lo anterior permitió que se concentraran las células. Nuevamente, se resuspendió a las células en un volumen igual al pellet.
- 2) Se agregaron las células en las laminillas con poli-lisina, tal como se muestra en la figura 4.4.

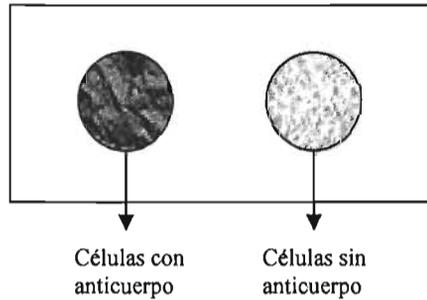


Figura 4.4 Vista frontal del portaobjetos con las muestras celulares en presencia y en ausencia del anticuerpo positivo.

- 3) Una vez que se secó la muestra celular en la laminilla, se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se procede a la tinción.

### iii) Tinción celular

Consistió en los siguientes pasos:

- 1) Precalentar el baño térmico a  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 2) Colocar buffer de citrato en un Koplín dentro del baño térmico. Una vez alcanzada la temperatura final, meter las laminillas completamente en el buffer e incubarlas durante 10 ó 15 minutos.
- 3) Lavar las laminillas en PBS/Tween 20 ( $2 \times 2$  minutos).
- 4) Incubar con solución bloqueadora durante 30 minutos. NO DEJAR SECAR.
- 5) Incubar con anticuerpo primario diluido 1:40 (en buffer para anticuerpo primario) por 1 hora.
- 6) Lavar con PBS/Tween 20 ( $2 \times 2$  minutos).
- 7) Incubar en solución bloqueadora de peroxidasa por 10 minutos.
- 8) Lavar con PBS/Tween 20 ( $3 \times 2$  minutos).
- 9) Incubar con reactivo amarillo de ABC (anticuerpo secundario) durante 15 minutos.
- 10) Lavar ( $2 \times 3$  minutos) en PBS/Tween 20.
- 11) Incubar con reactivo rojo de ABC (Streptavidina) durante 15 minutos.
- 12) Lavar ( $2 \times 3$  minutos) en PBS/Tween 20.
- 13) Incubar con DAB de 5 a 10 minutos. Los núcleos con mayor oxidación se observan con mayor tinción café.
- 14) Lavar con agua destilada.

#### iv) Cuantificación del grado de oxidación celular

Una vez que se realizaron las tinciones, se procedió a cuantificar el número de células teñidas como una medida indirecta del grado de oxidación producido. El control positivo (muestra con agua oxigenada) fue un indicador del éxito de la tinción, ya que toda la muestra presentó tinción, independientemente de que estuviera presente el anticuerpo primario (Figura 4.3).

El grado de oxidación fue determinado realizando un conteo de 400 células en la laminilla. Se observó y contó la relación de células teñidas (en color café) con respecto a las no-teñidas para una misma muestra. El conteo se realizó utilizando un objetivo 10× y por el mismo observador. Los resultados se muestran en la tabla 4.10.

Tabla 4.10. Conteo de las muestras teñidas vs sin teñir.

Muestra celular	No Teñidas	Teñidas	% Tinción
Control (i.e, sin tratamiento)	335	66	20
Burbujeo de N <sub>2</sub> por 5 minutos	346	54	16
Burbujeo de aire por 5 minutos	353	47	13

De lo anterior, puede observarse que, aunque hay un mayor estrés oxidativo en las células en condiciones normales de oxígeno, con respecto a las que se les burbujeó aire o nitrógeno, esta diferencia no es estadísticamente significativa, dado que el % de tinción presentado en los tratamientos con N<sub>2</sub> y aire difiere en un 3%. Por lo anterior, podemos decir que el método de tinción utilizado bajo las condiciones experimentales descritas no permite concluir que haya un incremento en el estrés oxidativo celular.

## Resumen del Capítulo IV

Se realizó la dosimetría del irradiador GammaCell 200 en dos etapas. En la primera, se determinó la dosis de tránsito de la muestra por el irradiador, para corregir el valor de la dosis suministrada. Encontramos que en tal caso, el valor de la dosis de subida + bajada corresponde a  $0.06 \pm 0.002$  Gy, lo que mostró que ésta es relevante únicamente cuando el tiempo de irradiación es menor que 1 minuto. En la segunda etapa de la dosimetría se determinó la tasa de dosis del irradiador GammaCell 200. El valor obtenido fue de  $0.67 \pm 0.03$  Gy/ min (7 diciembre 2004).

La metodología biológica experimental consistió de tres etapas principales, en la primera, se calibró el fluorómetro por utilizar; en la segunda, se obtuvieron e irradiaron las células de mamífero (linfocitos), en la tercera se aislaron los entrecruzamientos ADN-proteína y se determinó, por fluorescencia, la cantidad de nanogramos de ADN contenidos en la muestra.

Con respecto al protocolo utilizado para determinar la cantidad de ADN contenida en la muestra, mostró que es posible obtener una alta precisión en la medida siempre que se realice de manera consistente. Debido a que el fluorómetro es un equipo altamente sensible, resulta indispensable controlar que el valor de fluorescencia de la muestra blanco siempre sea cero. Para ello, deberá mantenerse constante el valor de fluorescencia del capuchón una vez que se ha calibrado a cero con el span. Durante las mediciones, el menor movimiento del equipo, o alguna basura en la muestra por leer, pueden modificar enormemente el valor de fluorescencia obtenido, por lo que deberá verificarse que una vez que se ha calibrado a cero, la lectura del capuchón permanezca constante. Si la lectura cambia, deberá colocarse nuevamente la muestra blanco y calibrarse nuevamente a cero. Lo anterior, junto con la adecuada resuspensión de la muestra, colocación el tubo de ensaye en la misma posición y repetición de este proceso al menos unas cinco veces para cada muestra, garantiza una buena precisión del fluorómetro y menor dispersión en las medidas.

El método de aislamiento de DPC utilizado permite determinar la inducción de DPC al amplificar el ADN asociado con las proteínas una vez que la proteína es precipitada con dodecyl sulfato de sodio (SDS/K<sup>+</sup>). El SDS/K<sup>+</sup> actúa como agente precipitador de proteínas, ya que el SDS se adhiere a éstas y posteriormente son precipitadas por el potasio [Costa, M. et al. 1996]. Sin embargo, tiene la desventaja de que es posible que se precipiten otras proteínas que no han sido unidas de manera covalente con el ADN.

## Capítulo V

### Discusión y Conclusiones

Históricamente, los DPC fueron observados cuando se retenían en filtros porcentajes importantes de ADN al eluirlo mediante soluciones de elevada fuerza iónica. Esta elución mejoraba por el tratamiento con proteinasas, por lo que se concluyó que el ADN estaba retenido a proteínas [Kohn, 1991], [Lozano, 2002]. Existen numerosos agentes citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, que incluyen a la radiación UV e ionizante, y que han sido identificados como productores de DPC.

Los entrecruzamientos covalentes entre proteínas y ADN representan un cambio físico en los procesos metabólicos del ADN y las proteínas, formando los DPC. Sin embargo, la formación de DPC ha recibido una menor atención que otro tipo de daños al ADN, por lo que sus consecuencias biológicas así como sus mecanismos de reparación son desconocidos. Por otro lado, se ha observado que los resultados obtenidos para cuantificar DPC dependen fuertemente de la metodología implementada para detectarlos, debido a la diferente sensibilidad de cada método, por lo que resulta difícil comparar los resultados obtenidos con diferentes condiciones experimentales.

En este trabajo se irradiaron linfocitos de conejo con radiación gamma proveniente de una fuente de  $^{60}\text{Co}$ , en un intervalo de dosis de 0 a 19 Gy, en condiciones normales y bajas de oxígeno. El método utilizado para la cuantificación de los DPC consistió de dos etapas. En la primera, se realizó un proceso de aislamiento del ADN y las proteínas entrecruzadas a través de la digestión de proteínas con proteinasa K, descrito en la sección 3.6.

La segunda etapa consistió en la cuantificación de la cantidad de ADN a través del método de fluorescencia. El resultado se expresó como el porcentaje de ADN que fue precipitado por las proteínas que tenía entrecruzadas.

Estudios recientes indican que el daño producido por la formación de entrecruzamientos ADN proteínas puede interrumpir los procesos metabólicos del ADN tales como su replicación, reparación, recombinación, transcripción y remodelación de cromátidas.

La formación de DPC por radiación tiene relevancia biológica en condiciones similares a las que recibimos por fondo natural de radiación (i.e, a dosis menores a 0.1 Gy). Estudios recientes indican que la cantidad de DPC producidos por radiación ionizante en condiciones normales de oxígeno es del mismo orden de magnitud que la formación de DSB [Xue et al. 1994], [Distel, 2002]. En 1999 E.C. Woudstra, reportó que por cada célula de mamífero expuesta a una dosis de un gray, se producen aproximadamente 150 DPC, en contraste con la formación de DSB que se producen en promedio de 20-40 DSB/célula Gy [Barker et al. 2005]. Lo anterior se contrapone con lo reportado en la mayor parte de la literatura en la que se ha señalado que el daño principal por radiación es debido a los DSB, dejando de lado el daño celular por entrecruzamientos ADN-proteína.

Dado que la formación de DPC ha sido asociada con el uso de agentes carcinogénicos como el cisplatino, es necesario entender la influencia de tales entrecruzamientos en la citotoxicidad celular, que ayuden a entender la respuesta clínica y los mecanismos de resistencia a este medicamento, lo cual podría originar el desarrollo novedoso de una droga anti-tumores.

A dosis altas de radiación, la formación de DPC resulta importante por las mutaciones que pudieran producir en células hipóxicas y oxigenadas, ya que radiobiológicamente podría modificar el tratamiento en pacientes en los que se busca eliminar el máximo de células tumorales con un daño mínimo a las células sanas.

La combinación del protocolo utilizado para el aislamiento de DPC y el implementado para las lecturas con el fluorómetro permitió aislar a las proteínas entrecruzadas al ADN de una manera fácil, con una alta precisión en la determinación del ADN contenido en la muestra y poca dispersión en los datos, tal como se desprende de la figura 3.6.

En este trabajo, hemos observado que la formación de entrecruzamientos ADN-proteína (DPC) tiene un comportamiento lineal con la dosis suministrada, y que es consistente con la hipótesis planteada al inicio. El intervalo de dosis estudiado en este trabajo (< 20 Gy) es un intervalo alto que es relevante desde el punto de vista biológico debido a que cuantifica la cantidad de entrecruzamientos ADN-proteína a niveles bajos, medios y altos de radiación, en donde se ha observado que existe una correlación entre la dosis suministrada a la célula con los efectos mutagénicos y carcinogénicos que le produce [Chakrabarti et al. 2001].

Se ha observado que el nivel de DPC es significativamente mayor en pacientes con cáncer de mama en relación con el nivel basal de DPC en pacientes sanas. Presumiblemente, el nivel basal de DPC es causado por factores ambientales y productos metabólicos, y el incremento en la aparición de DPC puede presentarse en el desarrollo de cáncer de mama o bien durante su tratamiento [Wu, et al. 2002].

El papel de los DPC como efecto biológico de la radiación ionizante no se ha estudiado, en gran medida porque estas lesiones son menos abundantes cuando se irradia en presencia de oxígeno, no así para la mayoría de las otras lesiones inducidas por radiación, como muerte celular y mutaciones, que se ven favorecidas en condiciones oxigenadas [Zhang, et al. 1995]. Sin embargo, existe evidencia de que los DPC pueden contribuir a la muerte celular cuando su reparación es inhibida. Tal es el caso de ciertas líneas deficientes en reparación como UV41 y UV20, que son significativamente más sensibles que las células normales a la muerte por radiación ionizante bajo condiciones hipóxicas, por lo que se piensa que estas células también son deficientes en reparación de DPC [Murray, and Rosenberg, 1996], [Murray et al. 1996].

Muchos tumores contienen proporciones significativas de células hipóxicas lo cual representa un problema cuando se usa la radiación ionizante en la terapia contra el cáncer, ya que las células hipóxicas son más resistentes a la muerte por radiación. El hallazgo de que los DPC son inducidos por la radiación ionizante en una mayor proporción con respecto a otras lesiones en condiciones hipóxicas, y que ciertas deficiencias de reparación aumentan la radiosensibilidad de las células hipóxicas, pueden representar evidencia para mejores terapias de radiación si se pueden inhibir específicamente estos sitios de reparación.

Lo anterior está íntimamente ligado con la aparición de daño genético, intercambio de cromátidas y citotoxicidad celular. Se ha observado que el nivel de DPC es significativamente mayor en pacientes con cáncer de mama con relación al nivel basal de DPC en pacientes sanas. Presumiblemente, el nivel basal de DPC es causado por factores ambientales y productos metabólicos, y el incremento en la aparición de DPC puede presentarse en el desarrollo de cáncer de mama o bien durante su tratamiento [Wu et al. 2002].

En este trabajo se observó que en condiciones de hipoxia, el porcentaje de DPC por unidad de dosis es aproximadamente el doble que el obtenido en normoxia. El estudio de viabilidad celular que se describió en la sección 4.2 descartó el burbujeo de nitrógeno como un agente productor de muerte celular. Los resultados presentados en la tabla 4.7, muestran que el

burbujeo de N<sub>2</sub> o aire no ocasionan una muerte celular significativa comparada con las células sin tratar, y que el factor principal de muerte celular se debe que las células permanecen mayor tiempo en el PBS, lo cual es consistente con lo citado en la literatura [Freshney, 2000].

Lo anterior deja abierta la pregunta sobre el mecanismo y las condiciones que producen un mayor entrecruzamiento entre el ADN y las proteínas. Para investigar si el bombeo de nitrógeno modificó las condiciones redox de la célula, se diseñó un experimento en el cual se utilizó un anticuerpo primario que detectó la oxidación del ADN.

Los resultados obtenidos de la comparación del grado de oxidación de la muestra por burbujeo de N<sub>2</sub>, aire o en normoxia no fueron estadísticamente significativos, ya que el conteo de las células tiene un error intrínseco debido a la persona que realiza el conteo y por otro lado, la diferencia absoluta del % de tinción fue pequeña.

Podemos decir que el método utilizado en este trabajo para determinar estrés oxidativo a través de la tinción celular no ofrece información muy precisa que pueda descartar el incremento del estrés oxidativo en diferentes condiciones de oxigenación, ya que no fue posible implementar un análisis cuantitativo riguroso.

Un método para cuantificar el grado de estrés oxidativo, a partir de la tinción celular, podría consistir en determinar la densidad óptica de una región de interés en la muestra teñida, para compararla con la obtenida para una muestra control.

En la medida que se tenga una mayor información sobre los mecanismos de formación y remoción de los DPC, podrá determinarse con mayor grado la relevancia biológica de este tipo de lesión. Sin embargo, entender la formación de los entrecruzamientos ADN-proteína resulta complicado debido a que los DPC son formados por diversos agentes, tales como radicales libres generados por mecanismos de estrés oxidativo o bien por sustancias químicas que forman enlaces entre los átomos metálicos y las proteínas.

Como trabajo a futuro, sería interesante conocer los mecanismos que permiten formar una mayor cantidad de DPC por radiación ionizante en condiciones hipóxicas.

## Referencias

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1994. "Molecular biology of cell". 3<sup>th</sup> Editon. New York: Garland 1255.
- Al-Nabusi, I., and Wheeler, K. 1997. "Temperature Dependence of Radiation-Induced DNA-Protein Crosslinks Formed under Hypoxic Conditions". *Radiat. Res.* (148): 568-574
- Attix, F. 1986. "Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry". John Wiley & Sons, U.S.A.
- Barker, S., Weinfeld, M., Murray, D. 2005. "DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences". *Mut. Res.* Article in press.
- Costa, M., Zhitkovich, A., Gargas, M., Paustenbach, D. 1996. "Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein crosslinks". *Mutation Research* (369): 13-21.
- Chakrabarti, S., Bai, C., Subramanian, K. 2001. "DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat lymphocytes: role of reactive oxygen species and specific amino acids", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (170): 153-165.
- Chiu, S., Xue, L., Friedman, L., and Olienick, N. 1992. "Chromatin Compaction and the Efficiency of Formation of DNA-Protein Crosslinks in  $\gamma$ -Irradiated Mammalian Cells". *Radiat. Res.* (129): 184-191.
- Distel, L., Distel, B., Schussler, H. 2002. "Formation of DNA double-strand breaks and DNA-protein crosslinks by irradiation of DNA in the presence of a protein". *Radiat. Phys. Chem.* (65): 141-149.
- Freshney, Ian R., 2000. "Culture of Animal Cells. A manual of basic technique". Fourth edition. USA. Editorial Wiley-Liss.
- Fornace, Albert Jr., and Little, John. 1997. "DNA Crosslinks induced by X-Rays and Chemical Agents". *Biochimica et Biophysica Acta* (477): 343-355.
- Gálvez Galán, Francisco. 1995. "La mano de Bertha. Otra historia de la Radiología". Justesa Imagen S.A. España.
- García Cruz, Luz María. 1960. "Calibración de fuentes de  $^{60}\text{Co}$ ". Tesis para obtener el grado de Físico. Facultad de Ciencias, UNAM.

Gebicki,S., Gebicki, J. 1999. "Crosslinking of DNA and proteins induced by protein hydroperoxides". Biochem. J. 629-636.

Goodhead Dudley T. 1989. "The initial physical damage produced by ionizing radiations". Int.J. Radiat.Biol. (56): 623-634.

Gutteridge, J.M. and Quinlan, G.J. 1993. Biochim. Biophys. Acta (1156): 144-150.

Hall, D.P. 1994. "Radiobiology for the Radiologist". Fourth Edition. Lippincott Company. USA.

Halliwell, B., 1998. Biochem, Pharmacol.(37): 569-571.

Hortwell, L., Kastan, M. 1994. "Cell cycle control and cancer ". Science (266):1821.

Ito, A. 1987. "Calculation of double strand break probability of DNA for low-LET radiations based on track structure analysis". Nuclear and Atomic Data for Radiotherapy and Related Radiobiology (International Atomic Energy Agency, Vienna): 413-429

Khan, F. 2002. "The Physics of Radiation Therapy (3<sup>th</sup> Edition)". Williams & Wilkins, USA.

Kastan, M. 1997. "Molecular biology of cancer: the cell cycle". Cancer: principles and practice of oncology. 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Lippincot

Kathren, R., Ziemer, P. 1980. " Health Physics: A Backward Glace". Pergamon Press, USA

Kiefer, Jürgen. 1990. "Biological Radiation Effects". Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.

Kohn, Kurt W. 1991. "Principles and Practice of DNA Filter Elution". Pharmac.Ther. (49): 55-77.

Lawrence J., Gofman J., and Hayes T. 1980. "Advances in Biological and Medical Physics". (17) Academic Press. USA.

Lozano-Vincent, Antonio. 2002. "Aplicación de la dosimetría de la radiación ionizante en la técnica de lución alcalina de ADN". Tesis de licenciatura para obtener el grado de Físico. Facultad de Ciencias, UNAM.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

Meyn, R., Vanaankeren, S., Jenkins, T. 1987. "The induction of DNA-Protein Crosslinks in Hypoxic Cells and Their Possible Contribution to Cell Lethality". *Radiat. Res.* (109) 419-429.

Mozumder A. 1985. "Early production of radicals from charged particle tracks in water". *Radiat. Res. Suppl.* (8 ): S33-S39.

M.U. 1999. "Manual del usuario del fluorómetro mod. 250".

Murray, D. Rosenberg, E. 1996. "The importance of the ERCC1/ ERCC4[XPF] complex for hypoxic-cell radioresistance does not appear to derive from its participation in the nucleotide excision repair pathway". *Mutat. Res.* (364) 217-226.

Murray, D., Macann, A., Hanson, J., Rosenberg, E. 1996. "ERCC1/ ERCC4 50-endonuclease activity as a determinant of hypoxic cell radiosensitivity". *Int. J. Radiat. Biol.* (69): 319-327.

Okayasu, R., Iliakis, G. 1992. " The shape of DNA-elution dose-response curves under non-denaturing conditions: The contribution of the degree of chromatin condensation". *Int J Radiat Biol.* (61:4): 455-63.

Oleinck, N., Chiu, S., Ramakrishnan, N., Xue, L. 1987. "The formation, identification and significance of DNA-protein crosslinks in mammalian cells". *Br. J. Cancer* (55):135-140.

Olin, K., Cherr, G., Rifkin, E., Keen C. 1995. "The effects of some redox-active metals and reactive aldehydes on DNA-protein cross-links in vitro". *Toxicol.* (110): 1-8.

Ramírez P., Del Razo, L., Gutierrez-Ruiz, M., Gonsebatt, ME. 2000. "Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line". *Carcinogenesis* (21: 4): 701-706.

Recio, L., Sisk, S., Pluta, L., Bermudez, E., Gross, E.A., Chen, Z., Morgan, K., Walker, C. 1992. "p53 mutations in formaldehyde-induced nasal squamous cell carcinomas in rats". *Cancer Res.* (52): 6113-6116.

Shaham, J., Bomstein, Y., Gurvich, R., Raschkovsky M., Kaufman, Z. 2003. "DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde". *Occup Environ Med.* (60):403-409.

Taylor, J. 1982. "An Introduction to error analysis: The study of uncertainties in physical measurements". University Science books. USA.

Turner, J. 1995. "Atoms, Radiation, and Radiation Protection (2<sup>nd</sup> Edition) ". John Wiley & Sons, U.S.A.

Wolffe, A. 1998. "Chromatin Structure & Function. (3<sup>th</sup> Edition) ". Academic Press, U.S.A.

Wu, F., Lee, Y., Chen, D., Kuo, H. 2002. "Association of DNA-protein crosslinks and breast cancer". *Mutat. Res.* (501): 69-78.

Xue, L., Friedman, L., Oleinick, N., Chiu S. 1994. "Induction of DNA damage in  $\gamma$ -irradiated nuclei stripped of nuclear protein classes: differential modulation of double-strand break and DNA-protein crosslink formation". *Int. J. Radiat. Biol.* (66): 11-21.

Yu, Y., Giocanti, N. 2000. "Radiation-induced arrest of cells in G2 phase elicits hypersensitivity to DNA double-strand break inducers and altered pattern of DNA cleavage upon re-irradiation". *Int. J. Radiat. Biol.* (76 :7): 901-9012.

Zhang, H., Koch C., Wallen, C. 1995. "Radiation-Induced DNA Damage in Tumors and Normal Tissues. Oxygen Dependence of the Formation of Strand Breaks and DNA-Protein Crosslinks". *Radiat. Res.* (142): 163-168.

Zhang, H., Wheeler, K. 1994. "Radiation-induced DNA damage in tumors and normal tissues. II. Influence of dose, residual DNA damage and physiological factors in oxygenated cells". *Radiat. Res.* (140): 321-326.

Zhitkovich, A., Voitkun, V., Kluz, T., Costa, M. 1998. "Utilization of DNA-protein cross-links as a biomarker of chromium exposure". *Environ. Health Perspect.* (106) (Suppl. 4): 969- 974.

# Apéndice

## A.1 Lista de Soluciones

En todas se hizo un ajuste del PH a 7.5 y posteriormente se aforó a 100 ml.

### ❖ Solución A

SDS 2%

PMSF 1mM

Tris-HCl 20 mM

### ❖ Solución B

KCl 200 mM

Tris HCl 20 mM

### ❖ Solución C

KCl 100 mM

Tris HCl 20 mM

### ❖ Solución D

KCl 100 mM

Tris HCl 10 mM

EDTA (disódico) 10 Mm

## Glosario

**Aberraciones cromosómicas.** Mutación que ocurre en la célula cuando ésta es irradiada en la etapa temprana de la interfase, antes de que se duplique el material cromosómico. La radiación ionizante produce aberraciones cromosómicas a través de la formación de SSB de la cromatina.

**Aberraciones de cromátidas.** Mutación que ocurre en una etapa posterior a la interfase de la célula, donde ésta ha replicado su ADN.

**Anticuerpo.** Proteínas producidas por los linfocitos y cuya acción primordial es la defensa de la célula en contra de sustancias extrañas a ésta.

**ARN (Acido Ribonucleico).** Es un ácido orgánico compuesto por unidades de nucleótidos repetidos: guanina, citosina, adenina y uracilo, cuya componente de ribosa se encuentra unida por enlaces fosfodiéster.

**Centrómero.** Porción central de un cromosoma en el que se sujetan las fibras durante la división mitótica y meiótica.

**Células eucariontes.** Células que forman a organismos como hongos, algunas plantas y animales. Están formadas por múltiples organelos. En este tipo de células, el ADN se encuentra contenido dentro del núcleo y está rodeado por diversas proteínas.

**Elución.** Método que se utiliza para aislar ADN intacto de las células haciéndolas pasar a través de un filtro y una solución que contiene algún tipo de detergente (alcalino o no alcalino).

**Gen.** Localización de un cromosoma que contiene una proteína específica o muchas proteínas que están relacionadas entre sí.

**Heparina.** Sustancia que es producida por el hígado y que es utilizada como anticoagulante.

**Heparinizar.** Impregnar las paredes de un recipiente con heparina.

**Hipoxia.** Ausencia de oxígeno.

**Koplin.** Recipiente que sirve para colocar y sujetar portaobjetos dentro de una solución.

**Linfocito.** Célula blanca responsable de la producción de los anticuerpos involucrados en la respuesta inmune.

**Mutación.** Alteración en la estructura del ADN o secuencia de un gen.

**Normoxia.** Cantidad de oxígeno que es considerada normal.

**Nucleótido.** Estructura en bloque formada por ADN y ARN. Los nucleótidos complementarios están formados por los pares adenina-timina, adenina uracilo y guanina-citosina los cuales tienen la habilidad de unir un hidrógeno con otro.

**p53.** Gen supresor de tumores que arresta a las células anormales en la etapa G1

**pellet.** Muestra biológica que se encuentra en forma compacta (botón), y que se forma cuando la muestra ha sido centrifugada.