



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

DAÑO GENÉTICO EN LÍNEAS CELULARES  
LINFOBLASTOIDES DE ATAXIA TELANGIECTASIA  
OCASIONADO POR DOSIS BAJAS DE RAYOS - X

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

P R E S E N T A :

**HUGO RAMÍREZ PÉREZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET

COMITÉ TUTORAL: DRA. MARÍA ESTER BRANDAN SIQUÉS

M. en C. ANA ELENA BUENFIL BURGOS



posgrado en ciencias físicas  
unam

MÉXICO, D.F.

2008



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.

A mi familia:  
a mi Madre, a mi Padre, a mis hermanos y  
amistades.

Sin quienes el amor, la dedicación, la  
felicidad, y demás cosas maravillosas a lo  
largo de mi vida hubiera podido conocer,  
compartir y disfrutar, siendo además una  
fuente de motivación para continuar en  
crecimiento.

Y sobre todo a ti: *Mar...*

*Vi vet hur många!!!*

*Mehr Licht!!!*

*Johan Wolfgang Goethe.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a las siguientes personas, con las que aprendí, compartí, conviví y disfruté excelentes momentos en esta bella etapa de mi vida, además de que con su apoyo e instrucciones me auxiliaron en la realización de esta tesis:

A la Dra. Patricia Ostrosky, por su paciencia, apoyo, dedicación y sabios consejos durante la construcción, desarrollo, elaboración y revisión de este trabajo de tesis.

A los integrantes del jurado: *Dra. María Ester. Brandan Siqués, M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos, Dra. Isabel Gamboa de Buen, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Dra. Patricia Ostrosky Wegman, por la lectura, comentarios y sugerencias acerca de este trabajo.*

A la C. a Dra. Dorys Mata López, M. en C. Gladys A. Moscoso Mujica, Téc. Lab. Monserrat Sordo y Dra. Ana María Salazar, por su disposición indiscutible y apoyo invaluable en el manejo de las líneas celulares, además de comentarios y recomendaciones durante la realización de los experimentos de esta tesis.

A la M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos, por su gran dedicación, apoyo, consejos, comentarios y sugerencias en el trabajo con dosímetros termoluminiscentes, así como las facilidades otorgadas para utilizar las instalaciones y el equipo del Laboratorio de Dosimetría del IFUNAM.

A la Dra. María Ester Brandan Siqués, por la atención que tuvo al revisar este trabajo, su apoyo y sugerencias siempre oportunas durante la planeación y escritura de esta tesis, además de su incesante estímulo en el avance de este trabajo.

Al M. en C. César Gustavo Ruiz Trejo, por su apoyo en el manejo del tubo de rayos X, de la cámara de ionización, en la solución de dudas al respecto, y en su colaboración para que nos fuera permitido usar un equipo de rayos X del INCan, pero sobre todo por ser una persona de excelente calidad.

Al Téc. Radiólogo Gerardo Camacho, por las facilidades otorgadas en la realización de los experimentos con un equipo de rayos X ubicado en el INCan.

Al Dr. Luis A. Herrera Montalvo y su equipo de trabajo del INCan por las facilidades otorgadas en el uso de sus instalaciones y equipo de laboratorio.

Al Dr. Luis A. Medina y el equipo de trabajo del departamento de Física Médica del INCan por el uso de material de laboratorio para realizar las irradiaciones en el hospital.

A los profesores y médicos de la Maestría en Física Médica, por compartir los conocimientos y sobre todo la experiencia durante los cursos expuestos.

A mis compañeros de generación (Benjamín, Bianey, Eglain, Gabriel, Luis Manuel, Olinca y Ulises), por los momentos compartidos durante horas clase y principalmente durante las horas extra-clase, deseándoles un futuro lleno de éxitos.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Genómica y Toxicología Ambiental del IIB – UNAM (Ana María, Anita, Andrea, Dorys, Fátima, Fernanda, Gladys, Moisés, Monse, Natalia, Paty M.), por la ayuda brindada en los momentos requeridos, pero sobre todo por su amistad y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Finalmente, agradezco a CONACYT, por el apoyo económico brindado durante el transcurso de la maestría.

# INDICE

---

## Capítulo I. Radiación ionizante

<b>I. 1 Radiación Ionizante .....</b>	<b>1</b>
<b>I. 2 Radiación Natural.....</b>	<b>3</b>
<b>I. 3 Radiación producida por el ser humano.....</b>	<b>3</b>
<b>I. 3. 1. Aplicaciones Médicas .....</b>	<b>4</b>
<b>I. 3. 2. Aplicaciones Bélicas .....</b>	<b>5</b>
<b>I. 3. 3. Energía Nuclear .....</b>	<b>5</b>
<b>I. 3. 4. Otros usos .....</b>	<b>6</b>

## Capítulo II. Interacción de la radiación ionizante con la materia

<b>II. 1 Radiación Directa e indirectamente Ionizante.....</b>	<b>7</b>
<b>II. 2 Interacción de fotones con la materia .....</b>	<b>8</b>
<b>II. 2. 1 Efecto fotoeléctrico.....</b>	<b>10</b>
<b>II. 2. 2 Efecto Compton.....</b>	<b>11</b>
<b>II. 2. 3 Producción de pares.....</b>	<b>12</b>
<b>II. 3 Coeficiente lineal de atenuación y coeficiente másico de atenuación .....</b>	<b>13</b>
<b>II. 4 Atenuación de fotones y capa hemirreductora.....</b>	<b>14</b>
<b>II. 5 Transferencia y absorción de energía .....</b>	<b>15</b>

## INDICE

---

### Capítulo III. Dosimetría de la Radiación

III.1. Dosis absorbida y tasa de dosis.....	16
III.2. ¿Qué es un Dosímetro? .....	16
III.3. Dosímetros Termoluminiscentes.....	17
III. 3. 1 Características .....	17
III. 3. 2 Equipo lector y Respuesta Termoluminiscente .....	19

### Capítulo IV. Rayos X

IV. 1 Equipo de rayos X .....	22
IV. 1. 1 Tubo de rayos X .....	22
IV. 1. 2 Consola del Operador .....	22
IV. 2 Producción de rayos X .....	23
IV. 1. 1 Espectro de radiación de frenado (Bremsstrahlung).....	23
IV. 1. 2 Espectro de rayos X característicos.....	24

### Capítulo V. Efectos biológicos de la radiación ionizante

V. 1. Efectos Biológicos de la Radiación Ionizante .....	26
V. 2. Efectos Deterministas y Estocásticos .....	27
V. 3. Modelos Cuadrático Lineal sin Umbral.....	29

## INDICE

---

### Capítulo VI: Dosis baja y efecto de Tasa de dosis

VI. 1. Dosis bajas de Radiación Ionizante .....	31
VI. 2. Tasa de Dosis .....	33

### Capítulo VII: SIC

VII. 1. Síndrome de Inestabilidad Cromosómica.....	34
--	----

### Capítulo VIII: Ataxia Telangiectasia

VIII. 1. Ataxia Telangiectasia .....	36
VIII. 1. 1 Características de las células de AT .....	37
VIII. 1. 2 El gen ATM .....	37
VIII. 1. 3 La proteína ATM.....	38
VIII. 1. 4 La proteína ATM regula los puntos de control del ciclo celular.....	38
VIII. 1. 5 Funciones de la proteína ATM .....	39
VIII. 1. 6 Mecanismo de acción de la proteína ATM.....	40
VIII. 1. 7 Mecanismo de activación de la proteína ATM.....	43
VIII. 1. 8 Mutaciones en ATM.....	45

## INDICE

---

### Capítulo IX: Frecuencia de Micronúcleos

IX 1. Evaluación de la frecuencias de micronúcleos en estudios de genotoxicidad.....47

### Capítulo X: Antecedentes

X. 1. Antecedentes.....49

### Capítulo XI: Planteamiento del Estudio

XI. 1. Planteamiento del Estudio.....53

### Capítulo XII: Materiales y Métodos Experimentales

XII. A. Condiciones de Irradiación..... 54

XII. A. a Estimación de las distancias fuente – objeto para irradiar líneas celulares a distintas tasas de dosis..... 54

XII. A. b Capa Hemirreductora..... 55

XII. A. c Energía equivalente del haz de rayos X y cálculo de  $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{aire}^{agua}$  ..... 57

XII. A. d Dosis en agua, en función de la Exposición..... 58

XII. A. e Factor de corrección por la pared del tubo Eppendorf..... 59

XII. A. f Cálculo de las distancias fuente – objeto para obtener distintos valores de tasa de dosis y una dosis en agua constante..... 60

XII. B. Dosimetría Termoluminiscente .....62

XII. B. a Irradiación de dosímetros termoluminiscentes (DTL) para determinar la dosis impartida por un tubo de rayos X..... 62

XII. B. b Protocolo para el uso de DTL..... 64

## INDICE

---

<b>XII. B. c</b>	Calibración de los DTL.....	<b>65</b>
<b>XII. B. d</b>	Factor de corrección por la energía del haz de irradiación.....	<b>67</b>
<b>XII. B. e</b>	Dosis impartida por un tubo de rayos X.....	<b>67</b>
<b>XII. C.</b>	<b>Línea Celular Linfoblastoide .....</b>	<b>68</b>
<b>XII. C. a</b>	Cultivo de las líneas celulares.....	<b>68</b>
<b>XII. C. b</b>	Condiciones de irradiación.....	<b>69</b>
<b>XII. C. c</b>	Evaluación del efecto citostático y genotóxico de la RI.....	<b>70</b>
<b>XII. C. d</b>	Análisis Estadístico.....	<b>70</b>

## Capítulo XIII: Resultados

<b>XIII. A</b>	<b>Resultados DTL.....</b>	<b>71</b>
<b>XIII. A. a</b>	Dosis impartida por un tubo de rayos X empleando dosímetros termoluminiscentes (DTL).....	<b>71</b>
<b>XIII. B.</b>	<b>Resultados de la irradiación de LCL.....</b>	<b>73</b>
<b>XIII. B. a</b>	Dosis y Tasa de Dosis calculada con CI, impartida a las células.....	<b>73</b>
<b>XIII. B. b</b>	Índice de División Nuclear (IDN).....	<b>74</b>
<b>XIII. B. c</b>	Frecuencia de Micronúcleos (MN).....	<b>74</b>

## Capítulo XIV: Discusión de Resultados

<b>XIV. A</b>	<b>Efecto de la Tasa de Dosis en la inducción de MN con radiación de baja LET.....</b>	<b>76</b>
<b>XIV. B</b>	<b>Inducción de MN con partículas beta y con rayos X de diagnóstico.....</b>	<b>78</b>

## **INDICE**

---

### **Capítulo XV: Conclusiones**

<b>XV.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>81</b>
------------	--------------------------	-----------

### **ANEXOS**

<b>Anexo A:</b>	<b>Características y parámetros de operación del tubo de rayos X.....</b>	<b>82</b>
-----------------	---	-----------

<b>Anexo B:</b>	<b>Cálculo del factor de corrección por la energía del haz de irradiación a los DTL.....</b>	<b>84</b>
-----------------	--	-----------

<b>Anexo C:</b>	<b>Protocolo para trabajar con líneas celulares linfoblastoides.....</b>	<b>87</b>
-----------------	--	-----------

<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>92</b>
--------------------------	-----------

---

# CAPÍTULO I. RADIACIÓN IONIZANTE

## I.1 Radiación Ionizante

En física se entiende que la radiación es energía en movimiento. Debido a que cualquier partícula que se mueva posee energía, tanto los átomos, los núcleos de los átomos, los electrones, los protones o los neutrones, cuando se trasladan de un lugar a otro en el espacio, son radiación.

La energía de la radiación no debe ser transportada necesariamente por una partícula. Es posible que sea una onda la que lleve energía de un lugar a otro. Las ondas de radio y de televisión, por ejemplo, son energía emitida desde la planta transmisora y que viaja por el espacio hasta llegar a nuestro aparato receptor de radio o televisión. Estas ondas forman parte de la llamada radiación electromagnética, que también incluye la luz visible y la luz ultravioleta, así como los rayos X y los rayos gamma, éstos últimos, forman parte de la radiación emitida por las sales de uranio. La única diferencia entre estos diversos tipos de radiación electromagnética es la energía transportada por cada rayo [Brandan y col., 03].

La física radiológica es la ciencia que estudia la radiación ionizante y su interacción con la materia, siendo de especial interés la energía absorbida en ésta. Comenzó con el descubrimiento de los rayos X por Wilhelm Röntgen, de la radiactividad por Henri Becquerel, y del radio por la familia Curie durante la última década del siglo XIX, llegando a ser en poco tiempo, tanto los rayos X como el radio adoptados como herramientas útiles en la medicina [Attix 86].

La radiación ionizante se caracteriza principalmente por su habilidad de excitar e ionizar átomos de la materia con la cual interacciona. A partir de que la energía necesaria para que un electrón de valencia escape del átomo, es del orden de 4 – 25 eV, la radiación debe de tener una energía cinética o cuántica mayor que esa magnitud para que se le pueda llamar “ionizante” [Attix 86].

Los tipos más importantes de radiación ionizante son los siguientes:

- Rayos gamma ( $\gamma$ ): Radiación electromagnética emitida desde un núcleo o desde reacciones de aniquilación entre materia y antimateria.

- Rayos X: Radiación electromagnética emitida por partículas cargadas (usualmente electrones) al cambiar entre los niveles de energía atómicos (llamados rayos X característicos o de fluorescencia) o al cambiar su velocidad dentro de un campo de Coulomb (rayos X continuos o de bremsstrahlung).

Tanto un rayo X como un fotón de un rayo gamma de la misma energía, tienen las mismas propiedades, diferenciándose sólo en el origen de cada uno. Los rayos X pueden tener energías de 15 keV hasta 50 MeV para fines médicos.

- Electrones Rápidos: Si su carga es positiva se les denomina positrones. Si son emitidos por un núcleo se les llama rayos  $\beta$  (positivos o negativos). Si son resultado de colisiones de partículas cargadas, se les llama rayos  $\delta$ .
- Partículas Cargadas Pesadas (PCP): Obtenidas usualmente de la aceleración *de átomos pesados* ( $>He$ ) por un campo coulombiano. Las partículas alfa también pueden ser emitidas por algún núcleo radiactivo.
- Neutrones: Partículas neutras obtenidas de reacciones nucleares, por ejemplo: (p, n) o fisión nuclear.

## I.2 Radiación Natural

El ser humano desde su origen ha estado expuesto a las radiaciones ionizantes presentes en el ambiente, las cuales proceden de dos fuentes naturales: los rayos cósmicos que vienen del espacio y los radionúclidos presentes en el suelo, agua y aire.

Los **rayos cósmicos** están constituidos principalmente por las partículas secundarias producidas por reacciones nucleares en las capas altas de la atmósfera, entre la radiación galáctica y el aire, que forman la llamada cascada de partículas y rayos gamma. La intensidad con que llegan a la superficie de la tierra depende de la actividad solar y de la latitud y altitud del lugar. A nivel del mar se recibe menor cantidad de radiación que en los lugares altos porque el aire absorbe parte de ella. Los rayos cósmicos contribuyen con alrededor del 15 % de la dosis promedio anual por fuentes naturales, esto es 0.4 mSv al año [UNSCEAR 2000].

Los **radionúclidos** presentes en el ambiente son de dos tipos: los de origen primordial (que por su vida media tan larga han sobrevivido desde la formación de la tierra), y los que se producen continuamente por procesos naturales. Entre los primeros se encuentran todos los que se derivan de las series de transformación del  $^{238}\text{U}$  ( $4.49 \times 10^9$  años) y del  $^{232}\text{Th}$  ( $1.4 \times 10^{10}$  años), de los descendientes de éstos, el  $^{220}\text{Rn}$  y el  $^{222}\text{Rn}$ , son los que más contribuyen a la dosis mundial que recibe el ser humano; por inhalación del radón se calcula un equivalente de dosis anual de 1.3 mSv. La otra fuente importante de irradiación externa la constituyen los *rayos gamma* emitidos por núcleos radiactivos presentes en el suelo o el aire. Se estima que el equivalente de dosis promedio anual mundial para un individuo, producto de la radiación externa por rayos gamma, es de unos 0.46 mSv anuales, 19 % de la radiación natural. Otros radionúclidos importantes son el  $^{40}\text{K}$  ( $1.28 \times 10^7$  años) y el  $^{87}\text{Rb}$  ( $4.7 \times 10^{10}$  años), el primero aporta un 15 % de la radiación natural y el segundo, junto con otros, representa el 1 %. El segundo tipo de radionúclidos está constituido principalmente por  $^3\text{H}$  (12.35 años) y el  $^{14}\text{C}$  (5730 años), que se generan en las capas altas de la atmósfera y cuya concentración se mantiene bastante constante. En conjunto, al ser ingeridos por los seres vivos, se produce una dosis interna de 0.23 mSv anuales.

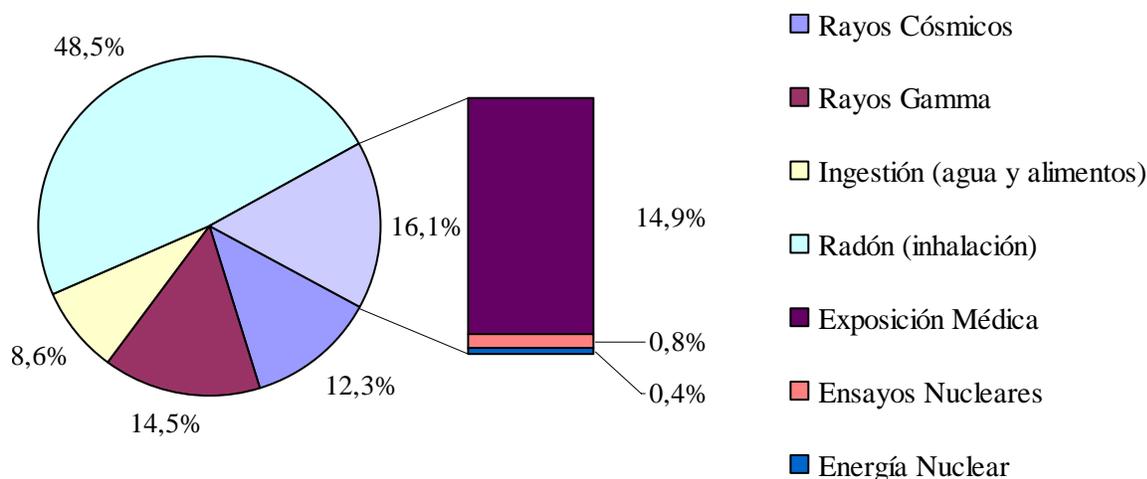
## I.3 Radiación Producida por el Ser Humano

Además de las fuentes naturales, las fuentes antropogénicas aportan dosis adicionales debidas principalmente a tres tipos de actividades: las aplicaciones médicas de las radiaciones, las pruebas de explosivos nucleares realizadas en la atmósfera y la producción de energía nucleoelectrónica. Las aplicaciones en la industria, la agricultura y la investigación, son aportaciones insignificantes frente a las anteriores. En la figura I. 1 se muestran las diferentes contribuciones a la dosis anual promedio que recibe un habitante de la tierra por las distintas

fuentes de radiación [UNSCEAR 2000].

A diferencia de la irradiación natural, las dosis recibidas a causa del uso de radiación producida ex profeso varían mucho entre un individuo y otro, dependiendo incluso de su profesión y de sus hábitos de vida. [Brandan y col., 03].

### Fuentes de Radiación Natural y Artificial



**Figura I. 1:** Principales fuentes de radiaci3n. Se indican los porcentajes con que cada fuente contribuye a la dosis total promedio en el mundo actual (2000). [UNSCEAR 2000].

#### 1.3.1 Aplicaciones M3dicas

La fuente m3s com3n e importante de exposici3n a radiaci3n producida por el ser humano hoy en d3a son los ex3menes m3dicos que utilizan rayos X. Al realizarse alg3n examen radiol3gico, se pueden recibir equivalentes de dosis entre 3 y 30 mSv [Brenner y col., 03]. Los valores promedio para una poblaci3n dependen de la frecuencia con que los individuos se someten a un examen radiol3gico. En los pa3ses industrializados se estima que se toman entre 300 y 900 radiograf3as al a3o por cada 1 000 habitantes, mientras que en el llamado Tercer Mundo, la frecuencia es diez veces menor [Brandan y col., 03].

Se calcula que, en promedio, el ser humano recibe alrededor de 400 μSv anuales debido a ex3menes radiol3gicos.

Por el contrario, la radioterapia irradia una zona bien localizada del paciente con valores de dosis que son 10 000 o más veces los valores naturales. Debido a que esta gran cantidad de radiación es recibida por un paciente cuya vida está en peligro a causa de un tumor maligno, se considera que cualquier efecto negativo que pudiera causar la irradiación es irrelevante frente al gran beneficio de la posible curación. El cálculo de la dosis promedio recibida por una población no incluye las contribuciones de los tratamientos de radioterapia.

### *1.3.2 Aplicaciones Bélicas:*

Después de los exámenes radiológicos, el segundo lugar entre las fuentes de radiación creadas por el ser humano que actualmente causan irradiación en la población lo ocupan los ensayos de bombas nucleares realizados en la atmósfera desde 1945. Los núcleos más importantes entre los cientos que se producen durante la detonación de un artefacto nuclear resultan ser el carbono-14, el cesio-137, el circonio-95 y el estroncio-90.

Hoy en día la dosis es de 20  $\mu\text{Sv}$  anuales aproximadamente [UNSCEAR 2000]. Esta fuente de radiación afecta a todo el planeta, y es la única que no es consecuencia de un uso benéfico de la radiación. Por el contrario, la radiación producida por las armas nucleares es una amenaza real a la existencia de la humanidad.

### *1.3.3 Energía Nuclear*

La producción de energía nuclear en un reactor presupone la elaboración previa y el tratamiento posterior del combustible nuclear, y son estos procesos los que producen la mayor parte de la dosis relacionada con la energía nuclear. El público recibe, en promedio, debido a la producción de energía nuclear, dosis que son diez mil veces menores que los valores naturales. Hay grandes variaciones alrededor del valor promedio, y la mayor es la dosis que reciben quienes viven cerca de las instalaciones nucleares. Inmediatamente junto a un reactor (en la reja) las dosis fluctúan entre uno y cinco  $\mu\text{Sv}$  anuales (alrededor del 0.04 al 0.1 % de la dosis promedio anual). A una distancia de 8 kilómetros de la planta núcleo-eléctrica, la dosis disminuye a la mitad del valor anterior, y así progresivamente. En un país como la Gran Bretaña, con 38 reactores en funcionamiento, la dosis que origina la producción de energía núcleo-eléctrica contribuye al promedio total de sus habitantes con menos del 0.1% de los valores naturales [Brandan y col., 03].

### *I.3.4 Otros usos*

Hay actividades humanas que, sin estar relacionadas con el uso de la radiación, ocasionan dosis adicionales para los individuos que las practican. La combustión del carbón libera al ambiente los elementos radiactivos uranio y torio, que están presentes de manera natural en el mineral de carbón.

Quizás la actividad moderna que implica una mayor exposición adicional a fuentes naturales sean los *viajes en jet*. Debido a la altura a que vuela el avión (10 000 metros, aproximadamente), la capa protectora de la atmósfera se ve fuertemente disminuida y los pasajeros se exponen a niveles de radiación cósmica varias veces superiores a los normales en tierra. Un viaje de ida y vuelta de la ciudad de México a Nueva York (10 horas de vuelo a 10 000 metros de altura) ocasiona una dosis adicional de 20  $\mu\text{Sv}$ , comparable con la dosis máxima recibida al vivir durante un año en las cercanías de un reactor nuclear, aunque pueden representar dosis significativas para los individuos expuestos, como son la tripulación de las aeronaves y los viajeros más frecuentes, no influyen dentro del promedio mundial debido a que son pocas las personas expuestas (comparadas con la población mundial) [Brandan y col., 03].

Tomando en cuenta todas las fuentes de radiación mencionadas, el promedio mundial de equivalente de dosis hoy día se puede estimar en 2.7 mSv anuales, de los cuales 2.3 mSv (84%) se deben a fuentes naturales y los 0.4 mSv restantes (16%), al uso de la radiación por el ser humano [UNSCEAR 2000].

## CAPÍTULO II. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON LA MATERIA

### II.1 Radiación directa e indirectamente ionizante

Cuando la radiación ionizante incide sobre la materia, la energía que transporta se deposita en el medio a través de varios procesos, cuyo resultado es la **excitación** de los átomos que constituyen el medio; esto es, se aumenta la energía de los electrones atómicos. Si se les imparte suficiente energía se produce una **ionización**, en la cual el electrón queda liberado del átomo, formándose dos iones, uno positivo que es el átomo al que se le ha arrancado el electrón y uno negativo que es el electrón liberado.

La radiación incidente pierde su energía de un modo particular que depende del tipo de radiación mismo, de su energía y del medio en el que incide. La diferencia más sobresaliente depende de si la radiación incidente está formada por partículas cargadas, (partículas  $\alpha$ , partículas  $\beta$  o iones acelerados), o por partículas no cargadas (neutrones, fotones gamma y rayos x).

En el primero de los casos siempre está presente la fuerza electromagnética, mediante la cual las partículas cargadas incidentes interactúan con los electrones y núcleos del medio. La acción mutua de sus campos eléctricos permite una transferencia de energía de manera directa, gradual y continua, en forma análoga a un proceso de fricción mecánica. A este tipo de radiación se le conoce como **directamente ionizante**.

En el caso de las partículas no cargadas, no existe la fuerza electromagnética que permita la interacción a distancia, por lo cual interactúan mediante un proceso de transferencia de energía, en el que se alteran drásticamente las condiciones iniciales. Es posible que la partícula incidente pierda la totalidad de su energía en eventos comúnmente llamados catastróficos. Su energía se transfiere a uno o varios electrones u otras partículas cargadas, las cuales depositan la energía en el resto del medio. Es por esto que a este tipo de radiación se le conoce como radiación **indirectamente ionizante**.

## II.2 Interacción de fotones con la materia

Los fotones, al carecer de carga eléctrica, tienen una interacción con la materia completamente diferente a la interacción que sufren las partículas cargadas. Los fotones pueden viajar una cierta distancia (mucho mayor que electrones de energía similar) dentro de un medio antes de interactuar con un átomo. Esta distancia está gobernada estadísticamente por una probabilidad de interacción por unidad de distancia recorrida que depende de la energía de los fotones y del material donde inciden.

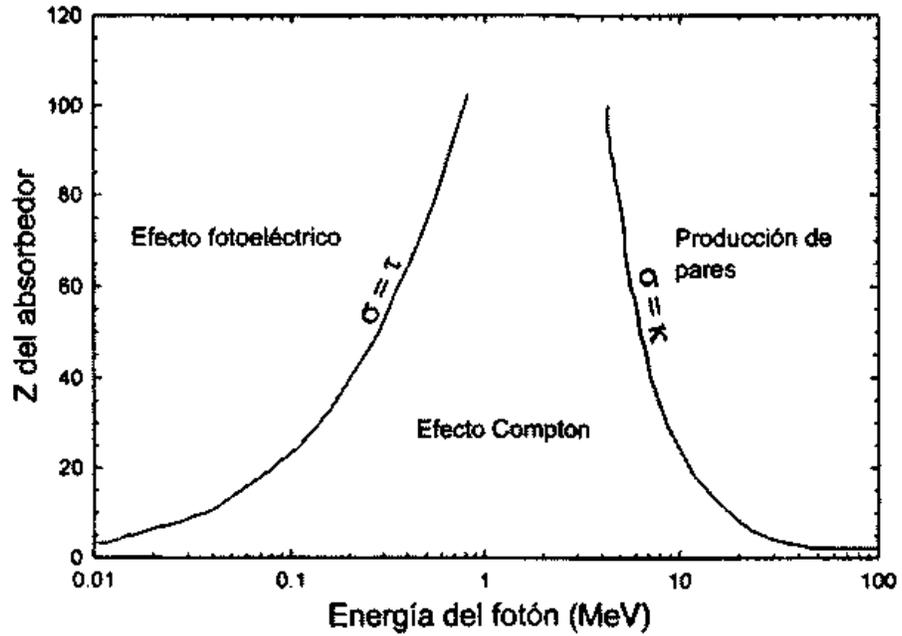
Hay cinco tipos de interacción de rayos X o fotones gamma con la materia que deben ser considerados:

- Efecto Compton
- Efecto fotoeléctrico
- Producción de pares
- Dispersión de Rayleigh (o dispersión coherente)
- Interacciones fotonucleares.

Los primeros tres efectos son considerados los de mayor importancia, ya que la energía se transfiere a los electrones del medio y a su vez se imparte a la materia a través de interacciones coulombianas. La dispersión de Rayleigh es elástica, esto es, el fotón solamente es desviado un pequeño ángulo de su trayectoria sin pérdida de energía al interactuar con el átomo, las energías a la que esto sucede son muy pequeñas (~20 keV). Las interacciones fotonucleares solamente son significativas para fotones con energías del orden de MeV.

La importancia relativa del efecto Compton (EC), fotoeléctrico (EF) y de producción de pares (PP) depende tanto de la energía cuántica del fotón ( $E_\gamma = h\nu$ ) como del número atómico  $Z$  del medio absorbente, figura II. 1 (página siguiente).

Se observa que el EF es dominante a energías bajas (10 – 100 keV), luego el EC se presenta con mayor probabilidad a energías intermedias (0.1 – 10 MeV) y la PP es dominante a altas energías (> 10 MeV). Para valores de  $Z$  bajos e intermedios (carbón, aire, agua, tejido humano) la presencia del efecto Compton es amplia (de 20 keV a 30 MeV) [Attix 86]. Nos enfocaremos con mayor detalle a los 3 efectos principales



**Figura II.1:** Importancia relativa de ocurrencia de los efectos: fotoeléctrico, Compton y la producción de pares (representados con las letras griegas  $\tau$ ,  $\sigma$  y  $\kappa$ , respectivamente). Las curvas muestran los valores de Z y E, en los que los dos tipos de efectos tienen la misma probabilidad de ocurrencia [Attix 86 pág. 125].

## II.2.1 Efecto fotoeléctrico

El efecto fotoeléctrico consiste en la absorción de un fotón de energía  $E_f$  por un electrón atómico. Este electrón (llamado fotoelectrón) adquiere suficiente energía cinética  $E_e$  y es expulsado del átomo con una energía  $E_e = E_f - E_b$ ; donde  $E_b$  es la energía de amarre del electrón con el átomo (ver Figura II.2). La interacción del electrón con el resto del átomo que forma, es indispensable para que el efecto fotoeléctrico ocurra, por lo cual este efecto no se presenta en electrones libres, de hecho ocurre principalmente con electrones fuertemente ligados (de las capas K, L y M). La probabilidad de producción respecto de la dependencia con  $Z$  y  $E_\gamma$ , se puede representar de la siguiente manera:  $\tau \propto Z^4/E_f^3$  (para una energía  $E_\gamma \leq 100$  keV, donde el EF tiene mayor probabilidad de que ocurra), esto indica que la probabilidad es mayor en materiales de alto  $Z$  y fotones de energías bajas; además, la probabilidad de que un electrón sea liberado es máxima si el fotón tiene justamente la energía suficiente ( $E_b$ ) para extraerlo de su órbita.

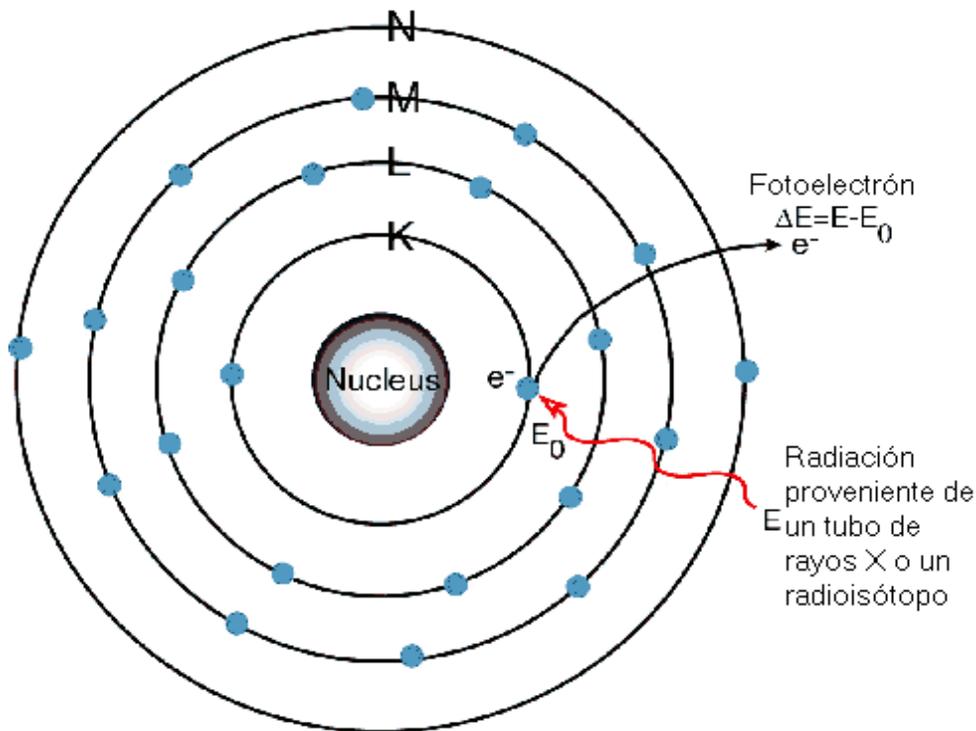


Figura II. 2: Diagrama que ilustra el efecto fotoeléctrico.

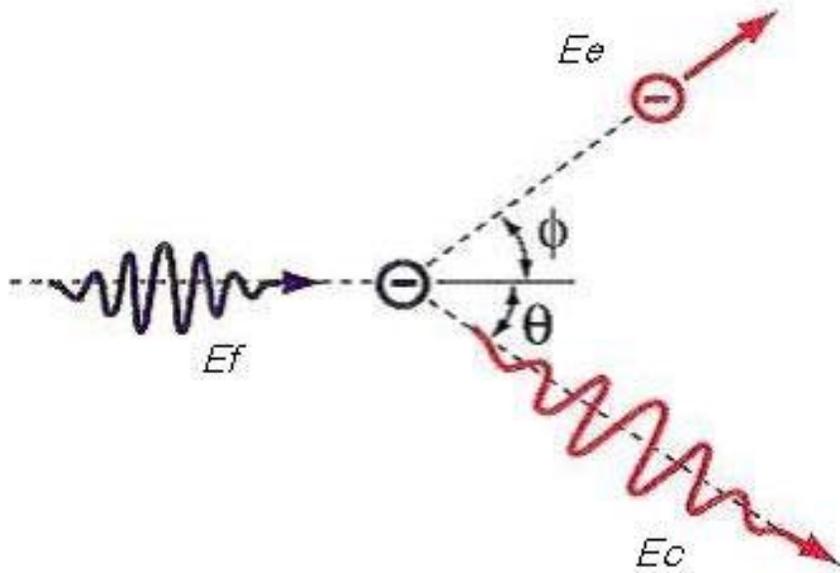
## II.2.2 Efecto Compton

En el efecto Compton un fotón de energía  $E_f$  incide sobre un electrón poco ligado (o libre), parte de su energía es transferida al electrón, que adquiere una energía  $E_e$  y es expulsado a un ángulo  $\phi$  que se mide respecto de la dirección del fotón incidente; el resto de la energía  $E_f$  es emitida como un fotón, conocido como fotón Compton, de energía  $E_c$ , emitido a un ángulo  $\theta$  (ver *Figura II.4*). Aplicando la conservación de la energía y del momento se obtiene que la energía cinética del electrón expulsado está dada por la relación  $E_e = E_f - E_c$ , y la energía del fotón Compton es:

$$E_c = \frac{E_f}{1 + E_f(1 - \cos\theta)/m_0c^2} \quad (\text{Ec. II. 3})$$

donde  $m_0$  es la masa del electrón y  $c$  es la velocidad de la luz. Este efecto produce un espectro continuo de energía de fotones Compton, desde cero hasta un valor máximo cercano a  $E_f$ .

Estos fotones pueden seguir interaccionando con el resto del medio mediante los efectos fotoeléctrico o Compton (dependiendo de su energía) hasta ser completamente absorbidos o escaparse del medio. La probabilidad de interacción por efecto Compton es prácticamente independiente del número atómico  $Z$  del medio absorbedor.



**Figura II. 4:** Diagrama que ilustra el efecto Compton.

### II.2.3 Producción de pares

La producción de pares se presenta cuando la energía del fotón incidente es mayor que 1.022 MeV, que es el doble del valor de la masa en reposo del electrón, 0.511 MeV; la interacción ocurre entre el fotón y el campo electromagnético de un núcleo atómico, donde se presenta una transformación de energía en materia (Figura II.6). El fotón desaparece y se producen un electrón y un positrón (antipartícula del electrón, con una masa igual a la de éste, pero con carga eléctrica positiva), con energías  $E_e$  y  $E_p$ , respectivamente, y se tiene que la energía del fotón  $E_f$  se distribuye de la siguiente manera:

$$E_f = 1.022 \text{ MeV} + E_e + E_p \quad (\text{Ec II. 5})$$

$E_e$  y  $E_p$ , no necesariamente son iguales, dependiendo del ángulo con el que se propaguen. El electrón y el positrón emitidos interactúan con el resto del material produciendo ionizaciones. El positrón, al final de su recorrido, se combina con un electrón del medio, dando lugar a una aniquilación, en la cual se transforma materia en energía, generándose dos fotones de 0.511 MeV que salen en direcciones opuestas. La probabilidad de que ocurra la producción de pares crece rápidamente con el aumento de la energía de los fotones y con el número atómico del medio.

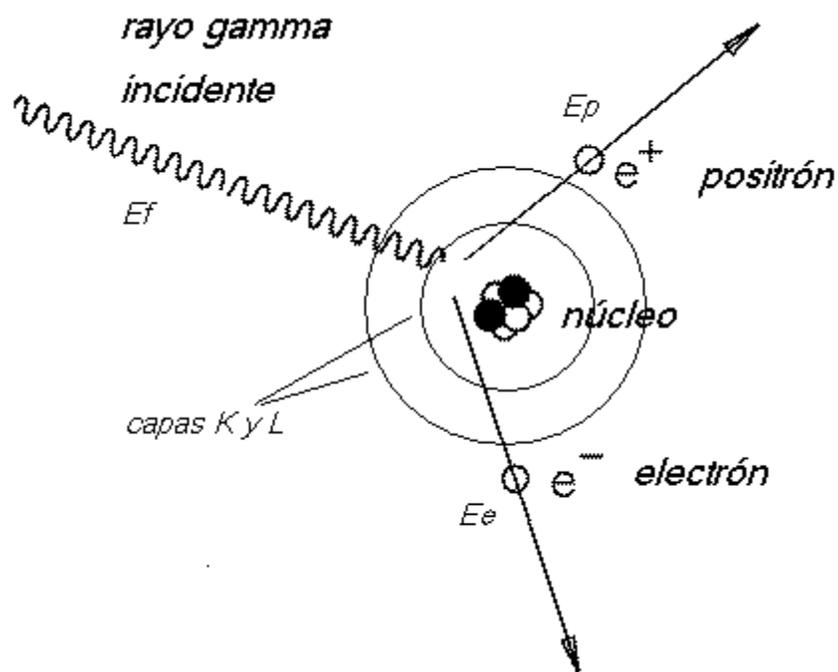


Figura II. 6: Diagrama que representa la producción de pares.

### II.3 Coeficiente lineal de atenuación y coeficiente másico de atenuación

La probabilidad de que ocurra alguno de los efectos antes mencionados está determinada por la “sección transversal” o “sección eficaz” del efecto<sup>a</sup>. Para el efecto fotoeléctrico, Compton y para la producción de pares, las secciones transversales se representan con las letras griegas  $\tau$ ,  $\sigma$ ,  $\kappa$ , respectivamente. En la figura II. 1, se observa la importancia relativa de ocurrencia de estos tres efectos.

El coeficiente lineal de atenuación se representa con la letra griega  $\mu$ , representa la fracción de fotones removidos de un haz monoenergético de rayos X o gamma, por unidad de espesor del material. La probabilidad de que un fotón sufra una interacción en un material de grosor  $dl$  esta dada por  $\mu dl$  [Bushberg 02].

El coeficiente másico de atenuación,  $\mu/\rho$  de un material para radiación electromagnética, es el cociente de  $dN/N$  entre  $\rho dl$ ,  $dN/N$  es la fracción de partículas que sufren una interacción al atravesar una distancia  $dl$  en un material de densidad  $\rho$ . Sus unidades son  $m^2kg^{-1}$  [ICRU 98]. Este coeficiente está determinado por la suma de las contribuciones de cada uno de los efectos mencionados:

$$\frac{\mu}{\rho} = \frac{\tau}{\rho} + \frac{\sigma}{\rho} + \frac{\kappa}{\rho} \quad (\text{Ec. II. 7})$$

$\tau / \rho$ ,  $\sigma / \rho$  y  $\kappa / \rho$ , representan los coeficientes másicos de atenuación para el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares, respectivamente [Attix 86].

---

<sup>a</sup> La “sección eficaz” de una interacción particular producida por partículas incidentes, es el cociente de P entre  $\Phi$ , P es la probabilidad de que ocurra dicha interacción, cuando se tiene una fluencia de partículas incidentes  $\Phi$ . La unidad de la sección transversal es el  $m^2$  [ICRU 98].

## II.4 Atenuación de fotones y capa hemirreductora

Se entiende por atenuación la eliminación de fotones del haz de rayos X que atraviesa la materia; se produce tanto por la absorción como por la dispersión de los fotones primarios [Bushberg 02]. A continuación se explicará cómo un haz de fotones monoenergéticos es atenuado exponencialmente en un blanco uniforme:

Consideremos  $N_0$  el número de fotones incidentes sobre el blanco. Conforme el haz penetra en el material algunos fotones son absorbidos, otros dispersados y el resto no interacciona con el medio. Sea  $N(x)$  el número de fotones que ha alcanzado una profundidad  $x$  en el material sin haber sufrido interacción, y  $dN$  la disminución en el número de fotones del haz original producida por un espesor  $dx$  del blanco, que es directamente proporcional a  $N(x), \mu$  y  $dx$ :

$$dN = -\mu N dx \quad (\text{Ec. II. 8})$$

El signo negativo indica un cambio negativo o disminución. Se separan las variables y se integra, suponiendo que  $N(x=0) = N_0$ , se tiene entonces que:

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -\mu \int_0^x dx \quad (\text{Ec. II. 9})$$

Evaluando los límites de integración:

$$\ln \frac{N(x)}{N_0} = -\mu \cdot x \quad (\text{Ec. II. 10})$$

de donde se obtiene:

$$N(x) = N_0 e^{-\mu \cdot x} \quad (\text{Ec. II. 11})$$

De la expresión anterior se deduce inmediatamente el espesor necesario de un material para disminuir a la mitad de su valor inicial el número de fotones que lo constituyen; este espesor se conoce como capa hemirreductora (CHR). Partiendo de la expresión  $N(x) = N_0 e^{-\mu \cdot x}$ , la condición es  $N(x=CHR) = N_0/2$ , de donde se obtiene que:

$$\frac{N(x=CHR)}{N_0} = e^{-\mu \cdot CHR} = \frac{1}{2} \quad (\text{Ec. II. 12})$$

Despejando se obtiene:

$$CHR = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ec. II. 13})$$

## II.5 Transferencia y absorción de energía

La fracción de energía de un haz de fotones transferida a partículas cargadas de un medio absorbente, como energía cinética, está determinada por el coeficiente lineal de transferencia de energía, denotado por  $\mu_{tr}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ], o por el coeficiente másico de transferencia de energía  $\mu_{tr} / \rho$  [ $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ]. Este coeficiente se relaciona con  $\mu$  de la siguiente manera:

$$\mu_{tr} = \left( \frac{\overline{E_{tr}}}{E_f} \right) \mu \quad (\text{Ec. II. 14})$$

$\overline{E_{tr}}$  es la energía cinética promedio transferida a las partículas cargadas del medio y  $E_f$  es la energía de los fotones del haz.

Sin embargo, no toda la energía transferida a los electrones del medio es totalmente absorbida en éste, ya que una parte sale como rayos x de frenado, por lo tanto, la energía transferida es mayor que la energía absorbida. Esta última está representada por el coeficiente lineal de absorción de energía  $\mu_{en}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ], o por el coeficiente másico de absorción de energía  $\mu_{en} / \rho$  [ $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ], su relación con  $\mu$  es:

$$\mu_{en} = \left( \frac{\overline{E_{en}}}{E_f} \right) \mu \quad (\text{Ec. II. 15})$$

$\overline{E_{en}}$  es la energía promedio absorbida por interacción. Ambos coeficientes están relacionados de la siguiente manera:

$$\mu_{en} = \mu_{tr} (1 - g) \quad (\text{Ec. II. 16})$$

donde  $g$  es la fracción promedio de la energía cinética inicial transferida a electrones que es emitida como rayos x de frenado [Attix 86].

## CAPÍTULO III. DOSIMETRÍA DE LA RADIACIÓN

La Dosimetría de la Radiación o simplemente Dosimetría, es el conjunto de conocimientos y técnicas que se encargan de la medida de la dosis absorbida o de la tasa de dosis, que resulta de la interacción de la radiación ionizante con la materia.

### III.1 Dosis absorbida y Tasa de Dosis

La dosis absorbida  $D$ , es la cantidad promedio de energía depositada en una unidad de masa, por la radiación ionizante que incide en un medio dado. Matemáticamente se define de la siguiente manera:

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (\text{Ec. III. 1})$$

$d\varepsilon$  es la energía promedio depositada por la radiación ionizante en una cantidad de masa  $dm$ . La unidad de dosis absorbida establecida por el Sistema Internacional de Unidades es el Gray (Gy) ( $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1}$ ). Sin embargo, aún es común encontrar la dosis medida en rad ( $1 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g} = 10^{-2} \text{ Gy} = 1 \text{ cGy}$ ).

La rapidez de dosis absorbida  $D$  (con unidades:  $\text{Gy s}^{-1}$ ), indica el incremento de la dosis absorbida  $dD$ , durante un intervalo de tiempo  $dt$ :

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} \quad (\text{Ec. III. 2})$$

### III.2 ¿Qué es un Dosímetro?

Un *dosímetro* puede definirse como cualquier dispositivo capaz de proporcionar una lectura  $r$ , relacionada con la dosis absorbida  $D_g$  depositada dentro de un volumen sensible  $V$ , en el dispositivo, por radiación ionizante. Idealmente se desearía que  $r$  fuera proporcional a  $D_g$ , y que cada elemento de volumen tenga una influencia igual sobre el valor de  $r$ .

Algunos dosímetros cumplen satisfactoriamente con esta idealización, sin embargo, la mayoría exhibe un grado de no linealidad de la lectura respecto de la dosis en al menos una parte de su intervalo de dosis.

### III.3 Dosímetros Termoluminiscentes

### III.3.1 Características

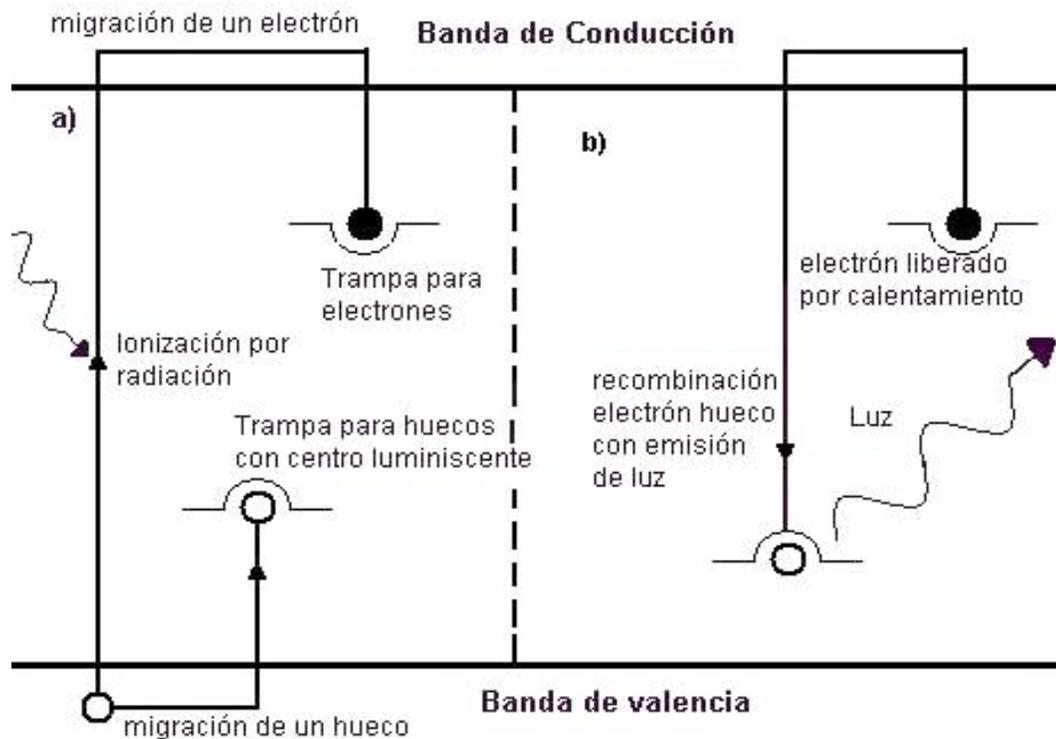
La termoluminiscencia es la emisión de luz por un material, previamente excitado con radiación ionizante, cuando éste se calienta. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de energía depositada por la radiación en el material, lo cual hace posible utilizarlo como un dosímetro.

Los dosímetros termoluminiscentes consisten básicamente de un cristal huésped que contiene una o más impurezas las cuales generan dos tipos de imperfecciones en la red cristalina:

- *Trampas* para electrones y huecos, que capturan y mantienen a los portadores de carga atrapados por largos periodos.
- *Centros luminiscentes*, localizados tanto en las trampas de electrones o las trampas de huecos; presentan emisión de luz cuando se da la recombinación entre electrones y huecos en dicho centro.

Cuando la radiación ionizante incide sobre los DTL, se producen muchos eventos de ionización que liberan electrones y huecos, que son el análogo de iones positivos en gases (Figura III. 3 a). Los electrones migran de la banda de valencia a la banda de conducción, desde donde son retenidos por trampas para electrones localizadas en la banda de energías prohibidas, de la misma manera que los huecos son retenidos en sus respectivas trampas. A la temperatura a la cual se realiza la irradiación estas trampas son profundas en términos de energía potencial, lo que hace difícil que los electrones y huecos atrapados sean liberados. Lo anterior permite que éstos permanezcan atrapados durante largos periodos [Attix 86].

Al elevar la temperatura de un DTL irradiado se logra que los electrones y huecos atrapados adquieran suficiente energía para vencer el potencial de las trampas, y puedan ser liberados (Figura III. 3 b). Cuando los electrones son liberados pueden migrar a una trampa de huecos, donde se lleva a cabo la recombinación que va acompañada de la emisión de un fotón. Este proceso permite traducir la llegada de un fotón de alta energía en un conjunto de fotones luminosos que pueden ser convertidos en una señal eléctrica fácilmente cuantificable.



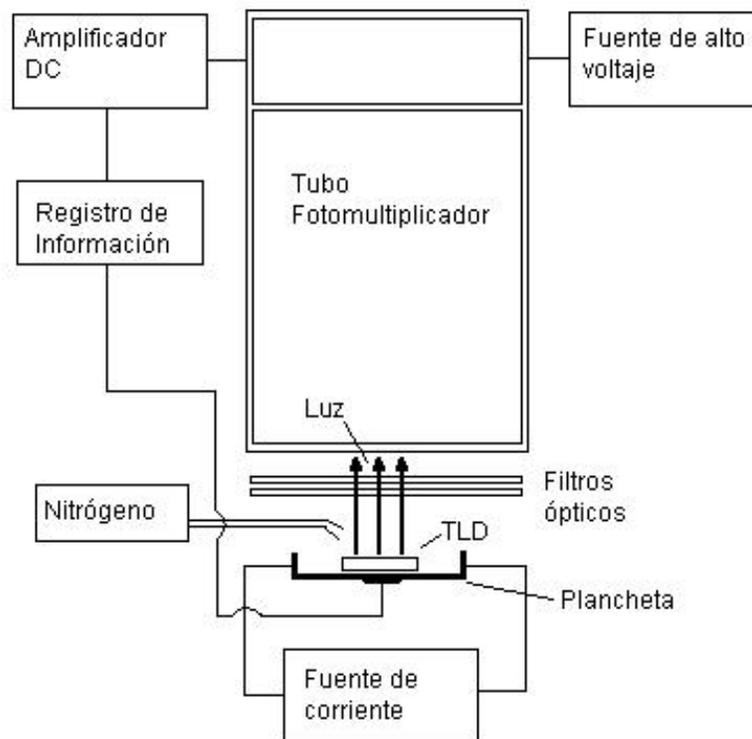
**Figura III. 3 a) y b):** Proceso de termoluminiscencia. Inciso: a) Ionización; b) Recombinación y emisión de la señal termoluminiscente [Attix 86].

Los DTL se pueden encontrar en diversas presentaciones de tamaño y forma, así como de sus componentes, entre los que se cuentan el fluoruro de calcio, el sulfato de calcio y el fluoruro de litio; de este último material se encuentra el dosímetro conocido comercialmente como TLD – 100 (TLD por sus siglas en inglés, compuesto de Li natural: 7.5% de  $^6\text{Li}$  y 92.5% de  $^7\text{Li}$ ), el cual es ampliamente usado en aplicaciones médicas por su buena equivalencia con el tejido biológico, su alta sensibilidad y su posibilidad de reutilización. Contiene impurezas de Mg y Ti en 300 ppm y 15 ppm, respectivamente, tiene un número atómico efectivo de 8.2, una densidad de  $2.64\text{ g/cm}^3$  y un intervalo de dosis útil de  $100\text{ }\mu\text{Gy}$  a  $1\text{ kGy}$  [Attix 86].

Con el TLD – 100 se puede lograr una precisión del 3 al 5% en la determinación de la dosis y se ha observado independencia de su respuesta con la rapidez de dosis, en un intervalo de 0 a  $10\text{ Gy/s}$ . Entre algunas de sus desventajas se encuentra su sensibilidad a luz ultravioleta, solar y fluorescente, su carencia de uniformidad (ya que cada lote en general muestra una sensibilidad diferente), y la existencia de desvanecimiento de la señal termoluminiscente, con el transcurso del tiempo, después de su irradiación [Attix 86].

### III.3.2 Equipo lector y respuesta termoluminiscente

Previamente a su utilización, los DTL deben ser sometidos a un tratamiento térmico, que tiene como función borrar la señal acumulada durante su almacenamiento y dispersar las impurezas; después de la irradiación de los DTL se procede a determinar su respuesta con un equipo lector, que consiste básicamente de una fuente de corriente que calienta una plancheta, sobre la que se colocan los DTL, así como un tubo fotomultiplicador que colecta la señal luminosa emitida por los dosímetros al ser calentados por contacto con la plancheta, y la transforma en una señal eléctrica (Figura III. 4). La integral de la señal eléctrica durante un determinado intervalo de tiempo se denomina **respuesta** del dosímetro.



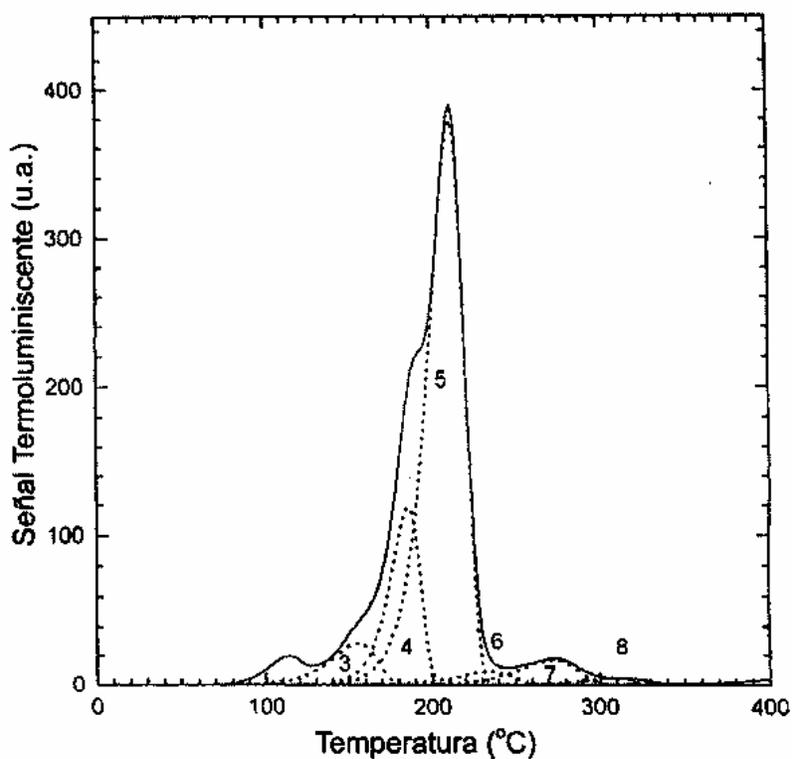
**Figura III. 4:** Diagrama de bloques de un lector para dosímetros DTL.

Durante la lectura se suministra gas nitrógeno ( $N_2$ ) al módulo donde se encuentra la plancheta. Esto permite disminuir la emisión de radiación infrarroja por la plancheta y evitar que existan reacciones químicas entre la plancheta y el aire debido a las altas temperaturas, evitando la posible contaminación de la superficie de los dosímetros.

Los parámetros de operación de un equipo lector son: *el voltaje de operación del tubo fotomultiplicador, la rapidez de calentamiento de la plancheta, el tiempo durante el cual se integra*

la señal termoluminiscente y la ventana de integración, que es el intervalo de temperatura en el cual se integra la señal eléctrica proveniente del tubo fotomultiplicador.

Los niveles de energía de las trampas en un DTL dependen directamente del material de que esté formado y de las impurezas que contenga; un mismo material puede tener varias trampas con diferentes niveles de energía, lo cual implica que los portadores de carga son liberados a diferentes temperaturas, por lo cual la emisión termoluminiscente se presenta gradualmente mientras se calienta el dosímetro, empezando por las trampas de menor energía. La relación entre la emisión de luz y la temperatura de calentamiento se expresa en la curva de brillo del cristal, que es una gráfica en la cual el eje de las abscisas representa la temperatura de calentamiento y el eje de las ordenadas la señal termoluminiscente. Cada curva de brillo depende además, del tratamiento térmico previo a la irradiación, de la rapidez de calentamiento, del campo de radiación y de la cantidad de dosis absorbida. En la figura III. 5 se muestra una curva de brillo formada por un conjunto de picos correspondientes a las diferentes trampas que existen en el cristal de LiF.



**Figura III. 5:** Curva de brillo típica de un TLD-100 irradiado con rayos gamma emitidos por una fuente de  $^{60}\text{Co}$ .

Al igual que muchos otros dosímetros, los DTL no son dosímetros absolutos, esto es, se necesita calibrarlos en un campo de radiación de referencia, bien caracterizado. De esta manera, se obtiene una curva de calibración para los DTL que permita determinar una dosis desconocida por

medio de la respuesta termoluminiscente que presentan. La Figura III. 6, muestra una curva de calibración para TLD – 100 irradiados con rayos X de **TANTOS kV...** en la que se observa la señal termoluminiscente (TL), en función de la dosis, en un intervalo de dosis de 1 a 10 Gy [Ávila 01]. En la Figura III. 7, se presenta un **diagrama de bloques** que resume el proceso para la determinación de la dosis usando los dosímetros termoluminiscentes.

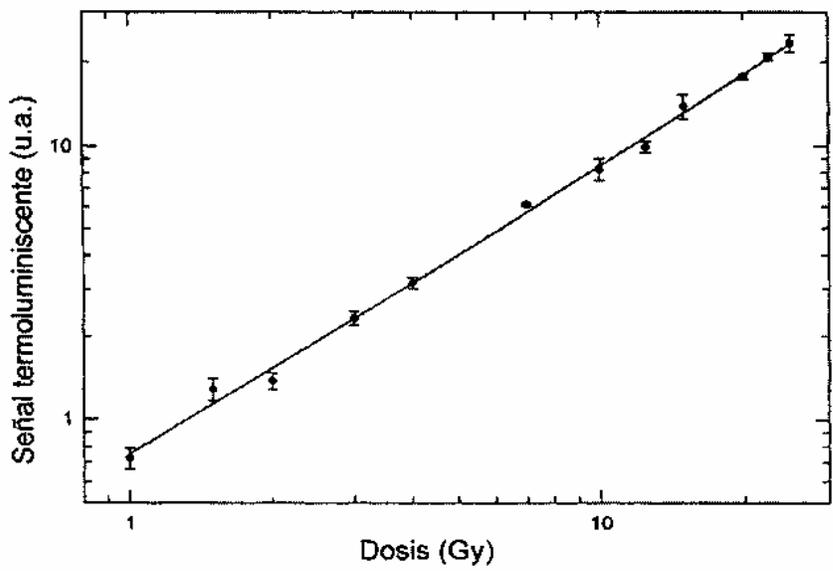


Figura III. 6: Curva de calibración de TLD-100 irradiados con rayos X **TANTOS kV...**

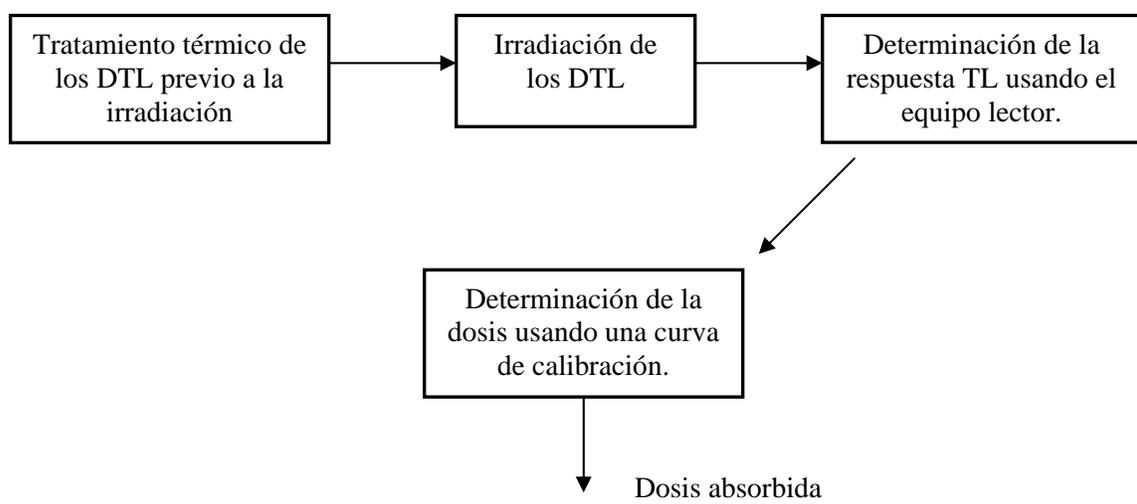


Figura III. 7: Diagrama de bloques que muestra el procedimiento para determinar la dosis usando DTL.

## CAPÍTULO IV. RAYOS – X

### IV.1 Equipo de Rayos X

Un equipo de rayos X se encuentra constituido, principalmente, de los siguientes componentes: *tubo de rayos X* el cual contiene la fuente de electrones y el blanco dentro de una envoltura de vidrio o metal al vacío; *la caja del tubo* proporciona blindaje y cuenta con un baño de aceite en el interior para el enfriamiento del tubo de rayos X; *los colimadores* definen el campo de rayos X; *el generador* es la fuente de energía que proporciona el voltaje para acelerar los electrones; *el gabinete de control* permite la salida de los rayos X seleccionando el voltaje, corriente y tiempo de exposición (dependiendo del equipo). Estos componentes trabajan en conjunto para obtener un haz de rayos X bien definido en intensidad, penetrabilidad y distribución espacial [Bushberg 02]. A continuación nos enfocaremos en el tubo de rayos X que es donde se producen los rayos.

#### IV.1.1 Tubo de rayos X

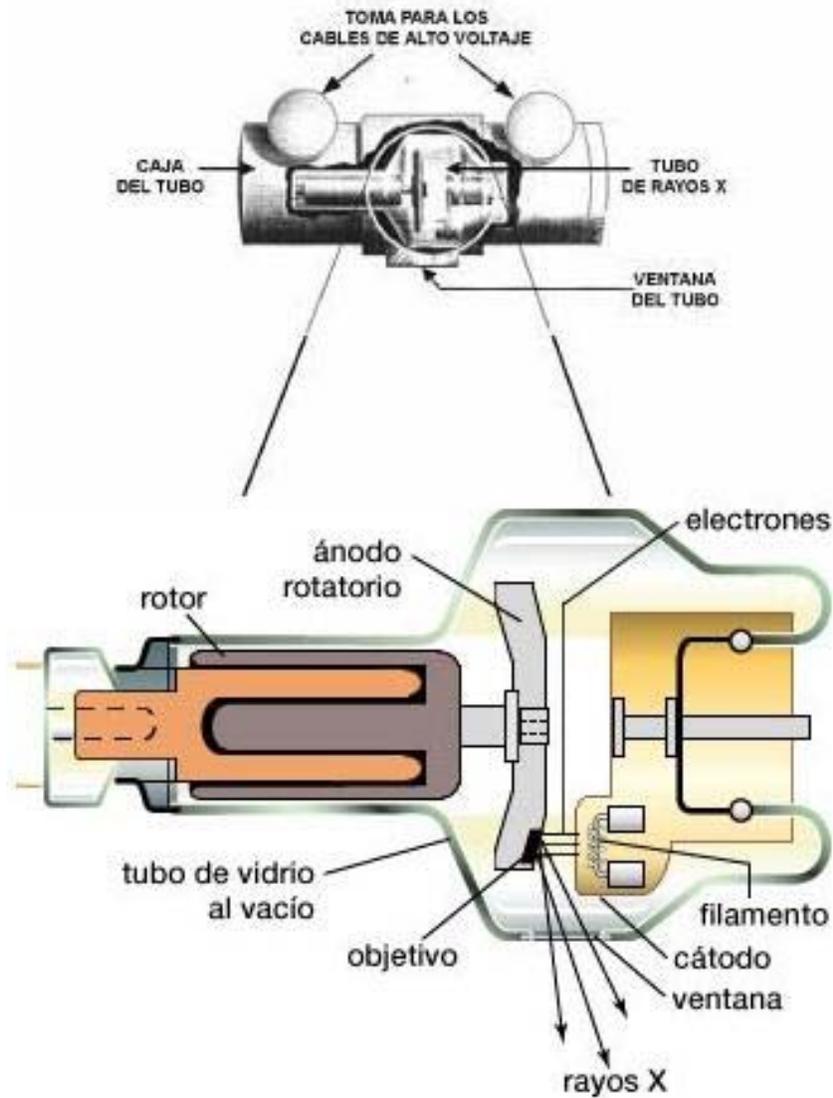
El tubo de rayos X proporciona un “ambiente” para la producción de rayos X a través de los procesos de formación de la radiación de frenado y de la radiación característica. Los principales componentes son el *cátodo*, *ánodo*, *rotor*, *cápsula de vidrio (o metal)* y *la carcasa del tubo* (Figura IV. 1). Para imágenes de diagnóstico, los electrones provenientes del filamento del cátodo son acelerados hacia el ánodo por un voltaje pico (voltaje máximo) que varía de 20,000 a 150,000 Volts (20 a 150 kVp). La *corriente del tubo* es la rapidez del flujo de electrones del cátodo al ánodo, medido en miliamperes (mA), donde  $1 \text{ mA} = 6.24 \times 10^{15}$  electrones / segundo.

Para fluoroscopia, la corriente del tubo es de 1 a 5 mA típicamente, y para radiografías, las corrientes son de 100 a 1000 mA, empleadas en tiempos cortos de exposición (menores que 100 ms). El kVp, mA y el tiempo de exposición son los tres parámetros principales que se pueden seleccionar desde el tablero de control del generador de rayos X y determinan las características del haz de radiación (*calidad y cantidad*) [Bushberg 02].

#### IV.1.2 Consola del operador

En la consola del operador, se puede seleccionar el kVp, mA, y el tiempo de exposición (entre otros parámetros). El kilovoltaje pico (kVp), determina la calidad del haz de rayos X (penetrabilidad), el cual es de utilidad para la imagen médica. La corriente del tubo (mA) determina el flujo de rayos X (fotones por  $\text{cm}^2$ ) emitido por el tubo a un kVp y en un tiempo dado. El producto de la corriente (mA) y el tiempo de exposición (segundos) se expresa como miliampere-segundo (mAs). Algunos generadores de rayos X, empleados en radiografía permiten

la selección del kVp, mA y tiempo de exposición de manera independiente, mientras otros sólo permiten seleccionar el kVp y el mAs.



*Figura IV. 1: Componentes principales de un tubo de rayos X de radiodiagnóstico.*

## IV.2 Producción de Rayos X

### IV.2.1 Espectro de radiación de frenado (*Bremsstrahlung*)

La conversión de la energía cinética de los electrones en radiación electromagnética produce rayos X, para que esto suceda es necesario aplicar un alto voltaje entre los dos

electrodos (cátodo y ánodo) que se encuentran al vacío. El cátodo (de carga negativa) es la fuente de electrones; el ánodo (carga positiva) es el blanco contra el que colisionarán los electrones. La energía cinética adquirida por los electrones es proporcional a la diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo, esto es una diferencia de potencial de 30 y 100 kilovoltaje pico (kVp) son 30 y 100 keV, respectivamente [Bushberg 02].

Al impactar los electrones en el blanco, una gran cantidad de energía se transforma en calor (*del 95 al 99 %*), una fracción muy pequeña de los electrones (dependiendo del material del blanco y de la energía de los electrones incidentes) se acerca a los núcleos de los átomos del blanco, de tal manera que al interactuar con las fuerzas Coulombianas se generan fotones de rayos X con una energía igual a la perdida por los electrones en las interacciones; la radiación así producida recibe el nombre de “bremsstrahlung” o radiación de frenado [Bushberg 02].

La energía de los rayos X depende de la cercanía con la que pasen los electrones del núcleo atómico del blanco, siendo una energía mayor cuando se presenta un “impacto directo” entre electrón y núcleo. La probabilidad de que ocurra un impacto directo es muy pequeña debido a las dimensiones atómicas, por esta razón hay una mayor producción de rayos X de energía baja y el número de rayos X decrece linealmente con la energía de los fotones, (la energía máxima de los rayos X producidos es equivalente al kVp aplicado al tubo, por ejemplo, para 100 kV, la energía máxima de los fotones es de 100 keV). En la figura IV. 2, se muestra un espectro de rayos X de frenado con y sin filtro, producidos en un blanco de tungsteno. En la actualidad, todos los equipos de radiodiagnóstico cuentan con un filtrado inherente a fin de atenuar los rayos X de baja energía que irradiarían la piel del paciente sin llegar a ser de utilidad en la imagen médica. La energía promedio de un espectro de rayos X de frenado con filtro es de un tercio a un medio del valor de la energía máxima de rayos X del espectro.

#### IV.2.2 *Espectro de rayos X característicos*

Cada electrón de los átomos del blanco tiene una energía de “amarre” que depende de la capa en la que se encuentre. La energía de amarre es mayor para los electrones que se encuentran en las capas más cercanas al núcleo atómico y decrece conforme se aleja de éste como el inverso al cuadrado de la distancia de separación.

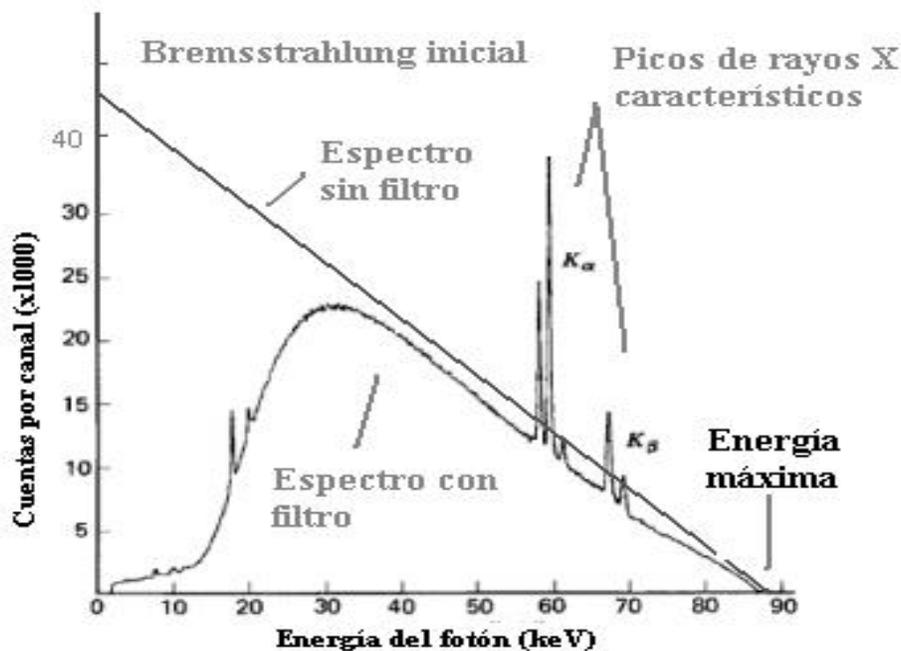
Cuando la energía de un electrón incidente excede la energía de amarre de un electrón del átomo del blanco, es energéticamente posible, al ocurrir una colisión entre ambos, que el electrón del átomo salga expulsado ionizándolo. La capa incompleta es entonces inestable y algún electrón de las capas externas con menor energía de amarre llenará la vacante, la transición de este electrón a un nivel menor de energía hace que la energía en exceso pueda ser liberada como fotones de rayos X característicos, con una energía igual a la diferencia de las dos energías de amarre. Las energías de amarre son únicas para cada elemento y por

consecuencia su diferencia también lo es, de esta manera los rayos X producidos tienen energías discretas características de cada elemento. Por ejemplo, para el **tungsteno**, de la capa L a la K hay una diferencia de 59.3 keV [Bushberg 02].

Pueden ocurrir muchas transiciones electrónicas ya sea desde capas adyacentes o desde capas más alejadas, lo que produce muchos picos discretos de energía que se superponen al espectro continuo de bremsstrahlung (Figura IV. 2). Los rayos X más prevaletentes para energías de radiodiagnóstico resultan de las vacantes de la capa K, que son ocupadas por electrones de las capas L, M y N.

Los rayos X característicos generados, aparte de los de las transiciones de la capa K, son de poca relevancia para radiodiagnóstico, ya que son atenuados casi completamente por la ventana del tubo de rayos X o el filtro añadido.

La producción de rayos X característicos en un tubo de rayos X es resultado en gran parte de colisiones electrón – electrón. Sin embargo, las colisiones de electrón – rayos X de frenado, a través del efecto fotoeléctrico, también contribuyen a la producción de los rayos X característicos.



*Figura IV. 2: Espectro de un tubo de rayos X con blanco de tungsteno operado a 87 kVp.*

# CAPÍTULO V. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE

## V. 1 Efectos Biológicos en Humanos de la Radiación Ionizante

Las primeras manifestaciones de los efectos de las radiaciones ionizantes sobre los tejidos humanos, se observaron poco tiempo después del descubrimiento de los rayos X (1895) y de la radiactividad natural (1896), la evidencia clínica de los daños en la piel indicó que las radiaciones pueden ser peligrosas, por lo que se inició el estudio de sus efectos en los seres vivos. Han transcurrido más de cien años de manejo y aprovechamiento de las radiaciones ionizantes, durante los cuales se ha mantenido el interés por estudiar esos efectos. Las aplicaciones médicas y bélicas han estimulado fuertemente dichos estudios, se estima que existe mayor información sobre los efectos para la salud debidos a la radiación, que la asociada con cualquier otro agente nocivo o peligroso [Iturbe 02].

Se sabe que la energía transferida a cada átomo o volumen pequeño del medio no es la misma para todos, existe un valor promedio y una distribución de valores alrededor de éste, la energía promedio transferida por unidad de masa del medio es la **dosis absorbida**, los efectos de la radiación dependen de la cantidad de energía transferida o sea de la dosis absorbida, así como de la microdistribución de esa energía, esto es, del tipo de radiación que la depositó. La energía transferida da lugar a la iniciación de procesos fisicoquímicos como la producción de radicales libres, los cuales pueden desplazarse en el medio y originar cambios químicos, como la ruptura y modificación de enlaces químicos cuyas consecuencias se manifiestan cierto tiempo después, especialmente en los seres vivos.

En las células, se desarrolla una actividad metabólica que implica un constante intercambio de productos químicos entre los organelos celulares y con el exterior de la célula misma, cuyo funcionamiento puede alterarse por los cambios químicos originados por la radiación, por ejemplo una alteración de la permeabilidad de las membranas puede atentar contra el equilibrio del intercambio y dañar a la célula severamente. Igualmente la radiólisis del agua en el protoplasma produce especies químicas que son tóxicas ( $H_2O_2$ ) o que inician los cambios químicos (radicales libres), a los que se suman las alteraciones que pueden sufrir la enorme variedad de moléculas que se encuentran en el protoplasma. Si bien una dosis pequeña puede producir una alteración temporal recuperable, dosis mayores pueden conducir a la muerte celular por intoxicación u otras causas.

En el núcleo celular se encuentra la información genética codificada en el ADN, que proporciona las instrucciones para la reproducción celular y para la síntesis de proteínas. La radiación puede afectar partes vitales de la molécula de ADN y producir roturas en las cadenas de aminoácidos, enlaces cruzados o alteración en sus componentes, dando lugar a cambios en

los cromosomas y a efectos genéticos. La célula tiene mecanismos de reparación que pueden corregir esas alteraciones. Si la reparación es perfecta no habrá consecuencias a largo plazo, pero puede haber errores en el proceso y aún cuando se mantenga la integridad total del ADN, pueden quedar modificaciones locales o bien desaparición de genes y re-arreglos que se manifiestan como aberraciones cromosómicas. Estos cambios pueden ser causa de los efectos tardíos observados en los seres vivos.

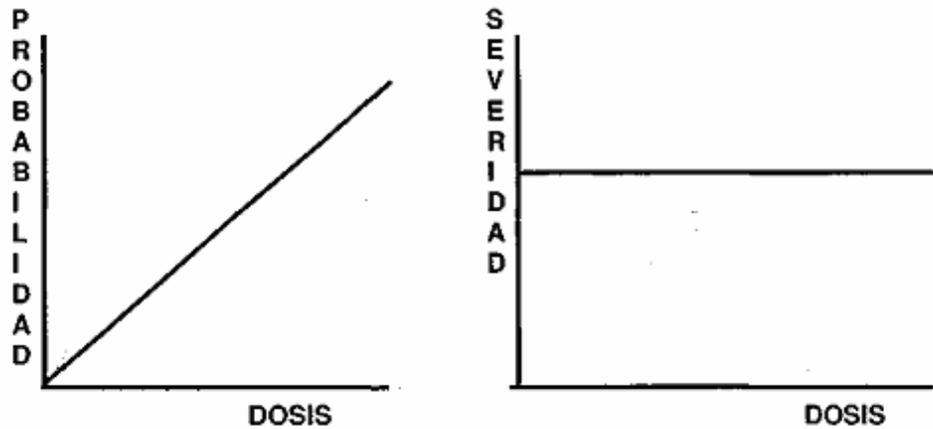
Las células que sufren daños irreparables mueren o pierden su capacidad reproductiva, las consecuencias se manifiestan a corto o mediano plazo según la rapidez de reproducción celular en cada tejido, el número de células que mueren depende de la dosis y, si es muy alto, afectará severamente la función del tejido u órgano, así como la de otros órganos, particularmente cuando el tejido es glandular. Si el daño es muy severo y los órganos afectados son vitales, se puede producir la muerte del organismo.

## V. 2 Efectos Deterministas y Estocásticos

Para fines de protección radiológica los efectos de la radiación en sistemas biológicos se clasifican en deterministas y estocásticos.

Los **efectos deterministas** (antes denominados no estocásticos), son los producidos en el tejido irradiado, generalmente por dosis altas, cuya severidad depende de la dosis recibida y para los cuales existe un **umbral**, esto es, un valor de la dosis por debajo del cual no se produce el efecto. Entre los efectos deterministas pueden mencionarse la esterilidad, las cataratas, el abatimiento de la función hematopoyética de la médula ósea roja, así como las lesiones con posterior necrosis debida a dosis altas (> 4 Gy) [UNSCEAR 2000]

Los **efectos estocásticos** son los que se originan cuando la radiación produce alteraciones en el código genético de las células, la probabilidad de que se presente el efecto depende de la dosis, no existe umbral y la severidad del mismo no es función de la dosis, pues aún a bajas dosis puede llegar a producirse, aunque la frecuencia de esos casos es reducida. Entre los efectos estocásticos producidos por RI se encuentran: la leucemia, los distintos tipos de cáncer, los desórdenes hereditarios y las alteraciones en el desarrollo de embriones y fetos por irradiación prenatal. En la Figura V. 1, se representa la relación de la probabilidad de producir algún efecto estocástico respecto de la dosis de radiación.



*Figura V. 1: Relación de la Dosis de Radiación Ionizante respecto a la Probabilidad y Severidad de que ocurra algún efecto estocástico.*

El tiempo que transcurre desde la irradiación hasta la manifestación del efecto estocástico (período de latencia), es muy variable, en humanos tiene una mediana de alrededor de 8 años para la leucemia, para muchos tumores sólidos es el doble o el triple. Para leucemia aguda mieloide y para osteosarcomas inducidos por  $^{224}\text{Ra}$ , el período mínimo de latencia es de 2 años, para otros tumores entre 5 y 10 años [UNSCEAR 2000]. Este período también se encuentra influido por la edad en el momento de la irradiación y por muchos otros factores como la rapidez de dosis, la LET (siglas en inglés de Transferencia Lineal de Energía) <sup>b</sup> de radiación y algunos factores del ambiente celular, como la presencia de sustancias químicas que actúan como activadores o inhibidores, y que aceleran o retardan el desarrollo del tumor.

Se supone que el riesgo de inducción de cáncer es proporcional al número de células irradiadas en un órgano o tejido y depende de la distribución de la dosis. Si existiera información sobre la incidencia de cáncer inducido por radiación, a los niveles de dosis que son de interés para la protección radiológica (de 5 a 50 mSv, aproximadamente de 5 a 50 mGy para radiación de baja LET), no existiría preocupación por determinar si existe un umbral para los efectos estocásticos, ni por la forma de la curva dosis – respuesta o del efecto de la rapidez de dosis, sin embargo, debido a que sólo se tiene información confiable para valores altos de la dosis (considerados de 200 mGy en adelante), deben emplearse los pocos datos experimentales, la limitada experiencia con humanos y las consideraciones teóricas, a fin de establecer una relación dosis – respuesta confiable, para la incidencia de cáncer en humanos, debida a bajas dosis.

<sup>b</sup> La Transferencia Lineal de Energía, se considera como la cantidad de energía depositada por unidad de longitud en la trayectoria de una partícula cargada, se expresa en unidades de keV/ $\mu\text{m}$ , o de eV/cm. En general, radiaciones de “alta LET” (partículas alfa, protones, etc.) producen mucho más daño a los tejidos que las radiaciones de “baja LET” (electrones, partículas  $\beta^+$  y  $\beta^-$ , rayos X y gamma).

### V.3 Modelo Cuadrático Lineal sin Umbral

Las células de mamíferos poseen sistemas enzimáticos que reconocen y corrigen daños en el ADN y algunos de estos sistemas parecen funcionar mejor después de una dosis pequeña, estimulante, dada a baja rapidez de dosis [U2000 – F], lo que supone una respuesta diferente cuando la dosis se da con baja rapidez de dosis que cuando se da con alta rapidez de dosis; esto introduce un factor que modifica la respuesta a bajas dosis respecto de la proporcionalidad directa representada en la Figura V. 1. Para la protección radiológica el problema radica en definir el comportamiento de la inducción de cáncer por radiación entre las dosis muy bajas y los valores conocidos a dosis altas, la primera aproximación y la más conservadora es la extrapolación con una recta desde los valores observados a alta dosis hasta el origen, (recta B de la Figura V. 2), sin embargo la información experimental de la relación dosis – respuesta y la revisión de la influencia de la rapidez de dosis, han conducido a la conclusión general de que la forma de la curva es lineal cuadrática, (curva A en la Figura V. 2). La curva dibujada sigue la ecuación:  $E = \alpha D + \beta D^2$ , donde E representa la incidencia del efecto, D la dosis,  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes [Iturbe 02].

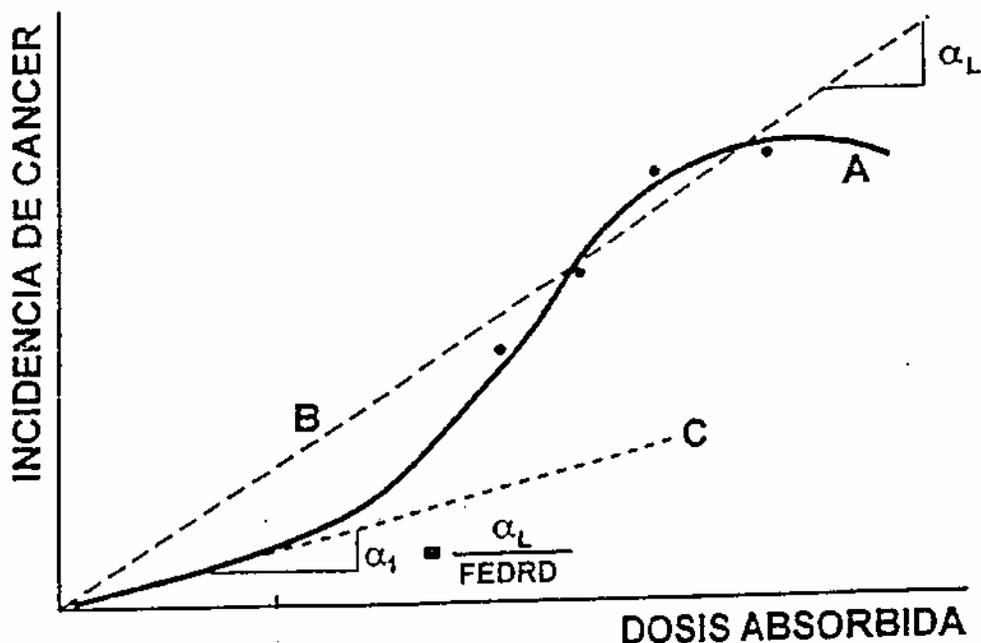


Figura V. 2: Relación dosis – respuesta para inducción de cáncer. La simbología se explica en el texto.

A muy bajas dosis (<1 mGy), la respuesta es lineal porque la contribución del término cuadrático es despreciable, conforme aumenta la dosis esta contribución gana importancia y la curva se eleva, al final de la curva la probabilidad de un cáncer disminuye por la abundante muerte celular a dosis muy altas. La parte inicial de la curva es recta, (se muestra el ajuste de la

recta C), tiene una pendiente  $\alpha_1$  que es menor que la pendiente  $\alpha_L$  de B, por un **factor de efectividad de dosis y rapidez de dosis** (FEDRD, DDREF por sus siglas en inglés) que la NCRP (National Council of Radiological Protection and Measurements) considera que está entre 2 y 10, para diferentes tipos de tumor y para el acortamiento de la vida en animales [NCRP 87]. La ICRP (International Commission of Radiological Protection) recomienda que para propósitos de protección radiológica se use un valor FEDRD = 2, reconociendo que el valor puede ser un poco arbitrario pero conservador.

Las consideraciones teóricas y la mayoría de los datos experimentales no apoyan la posibilidad de un umbral para la inducción de cáncer por radiación de baja LET, sin embargo, en caso de existir, tendría un valor de dosis muy pequeño para tumores en humanos.

## CAPÍTULO VI. DOSIS BAJA Y EFECTO DE TASA DE DOSIS

### VI.1 Dosis Bajas de Radiación Ionizante

Según el UNSCEAR (acrónimo de United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) una **dosis baja** de radiación ionizante, es aquella en la que resulta muy improbable que ocurra más de un evento de absorción de energía en las partes críticas de la célula y que la dañe durante el tiempo en el que pueden operar en ella sus mecanismos de reparación. Cuantitativamente se considera menor que 200 mGy. [U2000 – G].

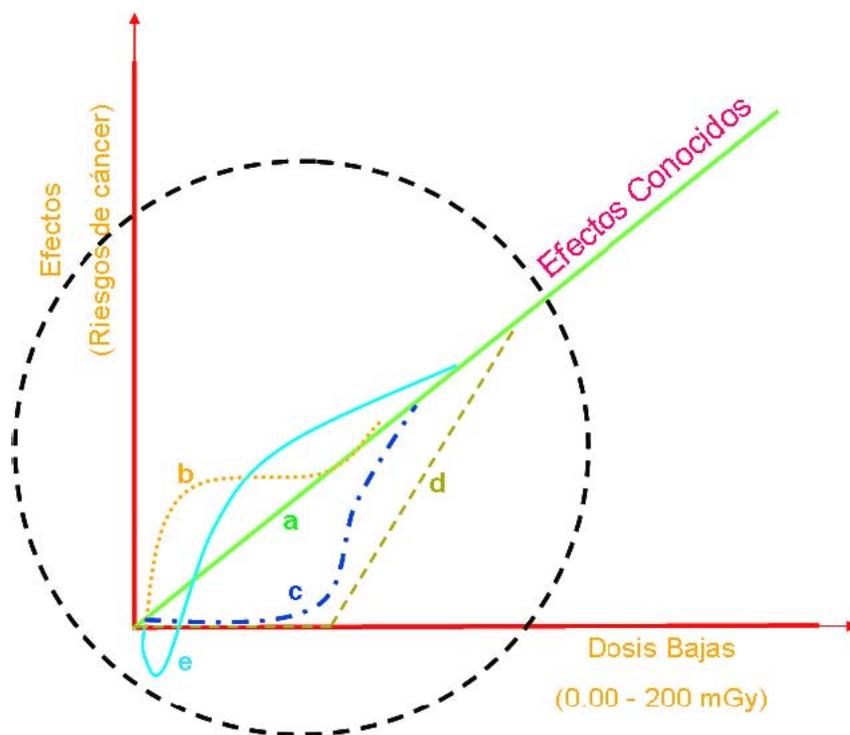
Los organismos dedicados a la protección radiológica utilizan la hipótesis conservadora de que incluso a dosis muy bajas o moderadas, la radiación ionizante (RI) aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer, y que ésta aumenta proporcionalmente con la dosis recibida (hipótesis lineal sin umbral). Esta hipótesis explica el modelo de la carcinogénesis, indicando que un único impacto de la RI en la célula puede causar una alteración, originando una mutación, que posiblemente sea la primera célula cancerosa de un tumor [Brenner y Elliston 04].

La estimación del riesgo para dosis bajas se basó en la extrapolación de los datos obtenidos a dosis elevadas, utilizando el modelo lineal sin umbral. Este modelo asume que la respuesta celular, incluyendo la reparación del ADN, operan eficientemente igual a dosis altas que a dosis bajas de radiación [U2000 – G].

Actualmente se han desarrollado varios modelos mediante los cuales se pretende explicar los efectos en la salud de las dosis bajas de la RI. Pierce y Preston (1996) plantearon dos propuestas: la primera menciona que no existen dosis completamente seguras y el uso de la RI se debe determinar con base en el riesgo / beneficio. La segunda propuesta indica que los riesgos no se pueden medir y por lo tanto son inexistentes.

En el 2003 [Brenner y col., 03], realizaron diferentes extrapolaciones de los datos epidemiológicos a dosis altas para poder explicar el posible efecto mutagénico y carcinogénico de dosis bajas de RI, plantearon 5 posibles modelos (ver Figura VI. 1). El primer modelo (curva a) muestra una *relación lineal sin umbral* dosis – efecto, es decir a mayor dosis mayor efecto. En un segundo modelo (curva b) se observa una curva *supralineal* y se han considerado varias interpretaciones para este modelo. La primera interpretación indica la existencia de una población pequeña de individuos del total de la población que son denominados hipersensibles a la RI; la segunda interpretación se explica en términos de radio – resistencia denominada también respuesta adaptativa, la cual indica que después de una primera dosis de radiación (generalmente < 0.1 Gy) disminuye la radiosensibilidad a una subsecuente exposición, comprometiéndose probablemente algún mecanismo de reparación del ADN; y una tercera

interpretación que explica el efecto bystander, el cual considera que las células dañadas pueden transmitir factores que dañan a las células adyacentes que no fueron directamente afectadas por la RI. En un tercer modelo (curva c) *no se presenta umbral* a partir del cual se pueda decir que hubo un efecto, por lo tanto no se puede medir la dosis mínima que produce un efecto. El cuarto modelo (curva d) explica que para poder observar un efecto se debe *superar el umbral de dosis*. En el quinto modelo (curva e) se observa una *respuesta hormética*, la cual ocurre si una dosis de radiación reduce la incidencia de algún efecto deletéreo. Las gráficas de estas propuestas se pueden observar en la figura VI. 1.



**Figura VI. 1:** Representación esquemática de los cinco posibles modelos de desarrollar cáncer por dosis bajas de radiación ionizante [Brenner y col., 03].

## VI.2 Tasa de dosis

Se ha mostrado que la rapidez de dosis (tasa de dosis) a la que se imparte la radiación de baja LET, afecta la magnitud del daño biológico producido. Se ha experimentado con una gran variedad de parámetros biológicos como son: aberraciones cromosómicas, proliferación celular, reparación celular, frecuencia de micronúcleos, transformación neoplástica, etc. [U2000 – G]. En general, altas tasas de dosis son más efectivas en la producción del daño biológico que bajas tasas, para una misma dosis total.

El **efecto de tasa de dosis** se refiere al cambio en la sensibilidad celular cuando se varía la tasa de dosis. La mayoría de los estudios realizados en el efecto de tasa de dosis han mostrado que al reducir la tasa de dosis disminuye el efecto biológico [Hall 2000], esto implica que cuando la rapidez de dosis disminuye, se tendría que aumentar la dosis para obtener el mismo efecto biológico. En un gran número de estudios, las dosis empleadas han sido mayores que 1 Gy.

Sin embargo, en algunos experimentos con cierto tipo de líneas celulares [Witcosfski y col., 74]; [Mitchel y col., 79]; [Amudson y Chen 96]; [Widel y col., 98], al tener un decremento de la tasa de dosis y permitir que las células continúen su ciclo hasta llegar a la fase G2, la cual es una fase radiosensible, se observa que la curva de sobrevivencia disminuye más rápidamente conforme se aumenta la dosis, que si se hiciera la irradiación con un valor de tasa de dosis más alto, a esto se le llama el efecto de tasa de dosis inverso [Hall 2000].

En algunos casos, no hay presencia del efecto de tasa de dosis, dependiendo del tipo de parámetro biológico medido y/o del tipo de sistema biológico empleado. [König y Kiefer 88], [Kreder y col., 04], [Vral y col., 92], cabe mencionar que en los casos anteriores, las irradiaciones se realizaron con diferencias de tasas de dosis de 2 a 3 órdenes de magnitud y dosis mayores que 1 Gy.

## **CAPÍTULO VII. SÍNDROME DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA**

### **VII.1 Síndrome de Inestabilidad Cromosómica (SIC)**

Los SIC son un grupo de enfermedades generalmente con herencia autosómica recesiva, que presentan un fenotipo clínico característico, una alta frecuencia de alteraciones cromosómicas y una mayor predisposición al cáncer [Salamanca 90].

Una de las características moleculares comunes de los SIC es que presentan deficiencias para mantener la integridad genómica, que produce una acumulación de daño en el ADN, lo cual promueve la transformación celular y la neoplasia [Taylor 01]. También presentan anomalías estructurales en los cromosomas que son ocasionadas por la acción de los agentes mutagénicos como la RI que produce rompimientos, los cuales se manifestarán en una sola cromátide si el daño ocurrió después del periodo de replicación del ADN, o en ambas cromátides si la lesión fue sufrida en el periodo presintético [Salamanca 90].

En 1968 Cleaver publicó un trabajo en el que se da a conocer que los fibroblastos en cultivo procedentes de un paciente afectado de Xeroderma Pigmentosum (XP) no eran capaces de llevar a cabo la reparación por escisión de nucleótidos después de la exposición a la radiación ultravioleta [Cleaver 68]. Este tipo de trabajo sirvió para estimular el interés de investigar la respuesta a los agentes genotóxicos de las células de personas afectadas con distintas enfermedades hereditarias, en especial con aquellas enfermedades que están asociadas con anomalías cromosómicas o con una elevada incidencia de neoplasias.

Los SIC tienen una entidad clínica variable y un incremento en la frecuencia de neoplasias. Entre ellos se encuentran aquellos en los que la alteración se ha encontrado en un solo gen como la Ataxia Telangiectasia (AT), el Síndrome de Bloom (SB) y el Síndrome de Nijmegen (SN) así como aquellos en los que se ha encontrado que la alteración se presenta en un gen que pertenece a una vía compuesta por varios genes y presentan heterogeneidad genética como la Anemia de Fanconi (AF) con 8 genes identificados y el XP con 7 genes identificados [Salamanca 90]; [Taylor 01]; [Digweed 03]. Probablemente los genes de inestabilidad cromosómica están involucrados principalmente en la reparación del daño al ADN. Es también importante el papel que desempeñan en la regulación de la proliferación y en los puntos de control del ciclo celular [Taylor 01].

Los pacientes con AF, presentan pancitopenia progresiva debido a la disminución de médula ósea, retraso mental, talla baja, anomalías esqueléticas, hiperpigmentación, anomalías renales, genitales y oculares. Las células de los individuos con AF presentan una elevada frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas, con la presencia de cromosomas

dicéntricos, fragmentos y figuras tri-, tetra-radiales asimétricas, porque involucran cromosomas no homólogos. La frecuencia de estas alteraciones se incrementa en forma notable cuando las células se exponen a la acción de distintos agentes mutagénicos y carcinogénicos, en especial de aquellos que producen enlaces cruzados en el ADN, tales como la mostaza nitrogenada, la mitomicina-C o metilmetano-sulfonato. Las células de AF también son muy sensibles a la acción letal de estos agentes, pero no al daño en el ADN producido por la radiación UV o la ionizante [Salamanca 90]; [Paz y col., 02].

Los pacientes con SB se caracterizan por un peso notablemente bajo al nacer y un crecimiento raquítico, sensibilidad de la piel a la luz solar, mancha facial en mariposa, tienen la cabeza alargada y son muy susceptibles a las infecciones. Las células de SB presentan un número muy elevado de rupturas y reordenaciones cromosómicas tetra-radiales simétricas entre cromosomas homólogos y presentan un aumento de intercambios de cromátidas hermanas de 10 a 15 veces mayor que la frecuencia en las células normales [Salamanca 90]; [Taylor 01].

El síndrome de XP desde el punto de vista clínico, se caracteriza principalmente por una extrema fotosensibilidad de las regiones expuestas de la piel, los ojos y la lengua. Esta enfermedad se produce como consecuencia de las diferentes alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN dañados por la luz UV. En la exposición de estos pacientes a la luz solar, su piel presentará eritema, seguido por atrofia, telangiectasias, desencadenándose en cáncer de piel. Además presentan microcefalia, deficiencia mental progresiva, anomalías en el desarrollo sexual, sordera, coreoatenosis, ataxia y arreflexia. Existen 9 subtipos clínicos de la enfermedad que incluyen formas cutáneas y neurológicas [Salamanca 90]; [Taylor 01]; [Paz y col., 02].

Los pacientes con SN se caracterizan por presentar microcefalia, cara de pájaro, talla corta, inmunodeficiencia combinada acompañada de infecciones recurrentes. Los linfocitos de estos pacientes presentan frecuentemente aberraciones cromosómicas como inversiones y traslocaciones. Son particularmente sensibles a la RI y a químicos como la bleomicina que producen daño a nivel de la doble hebra del ADN. Aproximadamente el 40% de los pacientes desarrollan un linfoma antes de los 20 años de edad [Shiloh 97]; [Taylor 01].

El síndrome de AT también se puede mencionar dentro de las enfermedades hereditarias caracterizadas por presentar respuesta celular defectuosa en el daño al ADN y una elevada incidencia de desarrollar cáncer. En el siguiente capítulo, este síndrome será tratado más ampliamente.

## CAPÍTULO VIII. ATAXIA TELANGIECTASIA

### VIII.1 Ataxia Telangiectasia

La Ataxia Telangiectasia o síndrome de Louis-Bar es un síndrome progresivo y degenerativo que afecta a una variedad de sistemas en el cuerpo, suele iniciarse durante la niñez. Los pacientes con AT parecen normales en el nacimiento, generalmente las primeras señales de la patología aparecen durante el segundo año de edad. La Dra. Elena Boder en 1957 acuñó el nombre de AT, por las dos características clínicas más resaltantes de esta enfermedad. La palabra ataxia describe la marcha inestable de los pacientes, debido a la pérdida del control de los movimientos voluntarios, como el caminar y el hablar, lo cual se debe a la pérdida gradual de las células de Purkinje en el cerebelo, que es la parte del cerebro involucrada con la coordinación motora y usualmente es el primer signo clínico. La palabra telangiectasia describe a la red de vasos sanguíneos de pequeño calibre que se encuentra en las conjuntivas, en la superficie de las orejas y en las mejillas expuestas a la luz solar [Boder, 85]; [Savitsky y col., 95]; [McKinnon, 04].

Los niños con AT en un 70% aproximadamente presentan inmunodeficiencias, con la disminución de los niveles de IgA, IgE e IgG2, que normalmente desencadena infecciones respiratorias reincidentes. Tienden a desarrollar neoplasias en el sistema sanguíneo con una frecuencia 1000 veces mayor que la población en general, presentan incidencia incrementada de cáncer del tipo linfomas no-Hodgkin y leucemias, la mayoría es de tipo linfático [Shiloh, 95]. Por la extrema sensibilidad a la RI que presentan estos pacientes no pueden tolerar la radiación terapéutica como tratamiento al cáncer y esta radiosensibilidad está relacionada con la reparación defectuosa del daño al ADN [Savitsky y col., 95]. Las características como la inestabilidad cromosómica y la radiosensibilidad parecen estar relacionadas con la activación defectuosa de los puntos de control del ciclo celular [Lavin y Khanna, 99]. La esterilidad resulta de defectos tempranos en la meiosis que involucran eventos de recombinación genética [Barlow y col., 97]. Otros rasgos como telangiectasia ocular y resistencia a la insulina son más difíciles de relacionar con la respuesta defectuosa al daño del ADN [McKinnon, 04].

Además de estas características principales, algunos pacientes con AT pueden padecer de diabetes mellitus, encanecido prematuro de cabello, dificultad para masticar que causa ahogo y retraso en el crecimiento. A pesar de ser un desorden multisistémico, los pacientes mantienen la inteligencia normal o incluso mayor que la normal [Savitsky y col., 95].

En las células de los pacientes con AT se ha encontrado menor cantidad de aberraciones cromosómicas que en los de AF y el SB. Se ha observado que los cromosomas 7 y 14 son los más afectados con aberraciones del tipo de inversiones y de traslocaciones,

encontrando inv(7), inv(14), t(7;14) o t(14;14). Los sitios de rompimiento más frecuentes son: 7p14, 7q35, 14q12 y 14qter, 2p11, 2p12, 22q12, 22q13. Todos estos sitios de rompimientos corresponden a la localización de los genes de las inmunoglobulinas, de los receptores de los antígenos de linfocitos T o de los antígenos leucocitarios. Esto sugiere el rearreglo de estos genes durante la maduración linfocítica, los cuales requieren del corte y replicación del ADN, lo cual probablemente explique la inmunodeficiencia característica de este síndrome [Lavin y Khanna, 99]; [Gatti y col., 01] y [Lavin y col., 04].

La causa principal de muerte en los pacientes con AT es la neumonía y las enfermedades del pulmón crónicas, que resulta de aspiraciones por defectos del masticar o del tragar debido al daño neurológico progresivo [Lefton-Greif y col., 2000]. Esta disfunción también está acompañada del aumento en la incidencia de neoplasias del sistema linforreticular como las leucemias y los linfomas [Gumy y col., 04]. Aproximadamente un 10% de los individuos con AT desarrollan neoplasias antes de los 20 años de edad. La incidencia global de cáncer es muy elevada [Morrell y col., 86]. El gen ATM mutado está estrechamente relacionado con el desarrollo de cáncer de mama [Angele y col., 03].

Estudios epidemiológicos indican que la AT es un síndrome raro que se ha estimado que ocurre en un rango entre 1 en 40 000 a 1 en 300 000 por nacimiento en las poblaciones de los EEUU y de Europa, respectivamente [Angele y Hall, 2000]. Del 0.35% al 1% de la población en general es heterociga para el gen ATM con algunas variaciones en diferentes poblaciones étnicas [Bretsky y col., 03] y [Swift y col., 86].

### *VIII. 1. 1. – Características de las Células de AT.*

Las células provenientes de los pacientes con AT son hipersensibles a la RI [Lavin 99] y a las drogas radiomiméticas como la bleomicina [Cohen y Simpson 83]. Presentan inestabilidad cromosómica, anormalidades en la recombinación genética y alteraciones en los procesos de detención en el ciclo celular [Gatti y col., 91] y [Lavin y Khanna, 99].

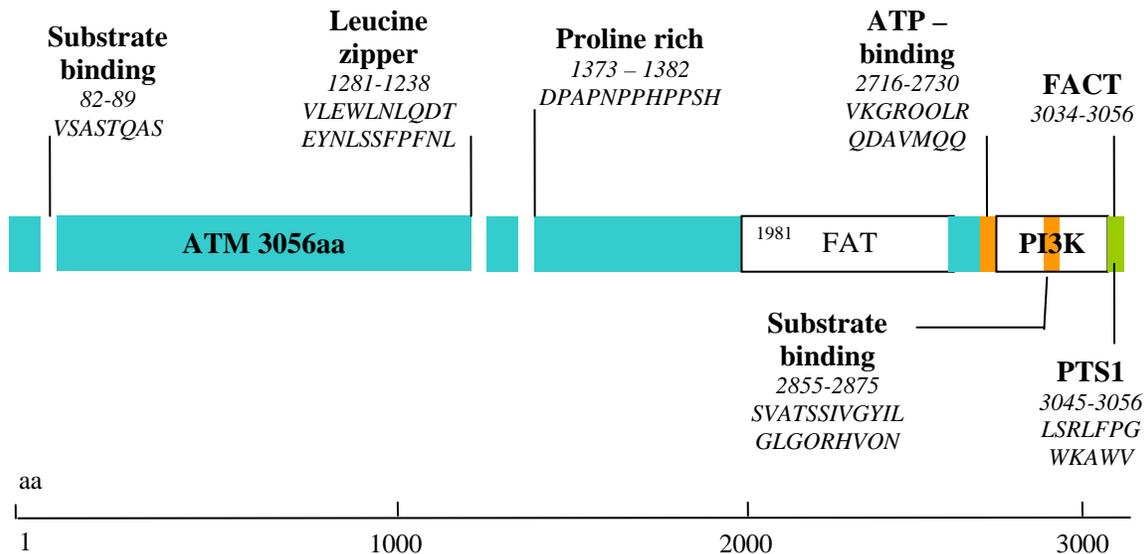
### *VIII. 1. 2. – El Gen ATM.*

El gen mutado en AT es Ataxia telangiectasia mutado (ATM) y fue clonado en 1995. Este gen se localiza en el cromosoma 11q22-23 y está compuesto de 66 exones de los cuales 62 codifican para un mRNA de 13 kb [Shiloh 03]; [Lavin 99].

### VIII. 1. 3. – La Proteína ATM.

La proteína ATM es miembro de la familia PI3K, se localiza principalmente en el núcleo, posee una masa molecular de 350.6 kDa de aproximadamente 3056 aminoácidos. Es una proteína grande que posee un grupo C-terminal similar al de otras proteínas de la familia PI3K, como ATR y ADNPK [Shiloh 03].

Estructuralmente la proteína ATM está formada por tres dominios principales (ver figura VIII. 1): un dominio FAT que es común en otras proteínas relacionadas como FRAPP/ ATM/ TRRAP, un dominio PI3K en el cual se ubica el grupo N-terminal entre los residuos de los aminoácidos 2855-2875, esta región es requerida para la activación de p53 en respuesta al daño del ADN y un dominio FATC en el cual se ubica el grupo C-terminal de aproximadamente 350 aminoácidos [Turrence y col., 01].



**Figura VIII. 1:** Proteína ATM indicando sus tres dominios principales y varios dominios supuestos [Lavin y col. 04].

### VIII. 1. 4. – La Proteína ATM Regula los Puntos de Control del Ciclo Celular.

La radiosensibilidad en las células de AT parece no deberse a los defectos en la habilidad de reparar la ruptura de las hebras del ADN o por el daño excesivo en el ADN, sino más bien a defectos en la monitorización o selección para captar la señal de la ruptura o de daño en el ADN [Lavin y col., 04].

Para que la célula pueda sobrevivir después de la ruptura de la doble hebra del ADN ocasionado por la RI, es importante la inhibición del ciclo celular a través de la activación de los puntos de control en el ciclo celular, los cuales detienen la proliferación celular [Angele y col., 03].

Los factores involucrados en la respuesta del daño al ADN están íntimamente relacionados con la activación de los puntos de control, porque varios sustratos ATM son muy importantes en el ciclo celular. Se ha observado en las células aisladas de los pacientes con AT, alteración en los puntos de control del ciclo celular, por ejemplo en la proteína p53 que es requerida para activar el punto de control G1/S y la proteína Chk2 para actuar en G2/M, ambas proteínas están inducidas por el daño al ADN [Khanan y col., 95]; [Meyn 95].

En cultivos celulares de linfocitos, se ha observado que las células AT no expuestas a RI, presentaron una menor tasa en la síntesis del ADN y una fase S más larga en el ciclo celular, mientras que la mayoría de las células de AT irradiadas fueron significativamente más resistentes a la inhibición en la síntesis del ADN provocado por la RI [Ford y Lavin, 81].

En varios estudios se ha reportado una acumulación de las células en la fase G2, al exponer las células de AT a la RI, [Khanan y col., 95], mientras que otros estudios sugieren un retraso tanto en G1 como en la fase S [Lavin 99]. Se ha demostrado, que en un tiempo corto después de la irradiación, las células de AT presentan un bloqueo reducido en G2, pero posteriormente (posiblemente después de que el daño en el ADN haya sido procesado incorrectamente) el bloqueo en G2 se prolonga [Beamish y Lavin 94].

Cualquier alteración en los puntos de control en las células de AT después del daño al ADN por la RI, es ocasionada por una fosforilación defectuosa en las proteínas que son sustratos de ATM, debido a que ATM no podrá activarlos para que realicen sus funciones de reparación del ADN [Motoyama y Naka 04]. Se ha observado que la proteína BRCA1 que incrementa el riesgo de desarrollar cáncer en los pacientes con AT, al no ser fosforilada adecuadamente por la proteína ATM, va a permitir el desarrollo del cáncer [Lavin y col., 04]. Estas proteínas están asociadas con la respuesta del daño al ADN [Ball y Xiao 05].

#### *VIII. 1. 5. – Funciones de la Proteína ATM.*

La proteína ATM está localizada en el núcleo y en el citoplasma de las células; se ubica principalmente en el núcleo y en menor proporción se encuentra en el citoplasma en vesículas [Turrence y col., 01]. La ausencia de la proteína ATM nuclear bloquea la respuesta del daño al ADN y el ATM citoplasmático de cierta manera es responsable de la respuesta a intermediarios reactivos como el oxígeno, que son productos del metabolismo o del

mecanismo de defensa a agentes extraños, por lo que se considera que las células de AT están en constante estrés oxidativo [Lavin y col., 04] y [Barlow y col., 97].

En condiciones normales la proteína ATM participa en la detección y la reparación del daño al ADN, como en el control del ciclo celular, enviando a las células que no pudieron reparar el daño del ADN a muerte celular programada (apoptosis). Posiblemente la proteína ATM en la apoptosis genere inactivación de la proteína cinasa que actúa en la capacidad de unión del ADN, previniendo la reparación y la señalización de daño al ADN [Angele y Hall 2000].

La proteína ATM desempeña un papel importante en la respuesta celular, al captar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN [Shiloh 03]. La falta de una respuesta normal del gen ATM puede romper el rearreglo de los genes que codifican a inmunoglobulinas y causar la inestabilidad genómica, que finalmente generará un cáncer [Lavin y col., 04]. La proteína ATM también es requerida para el procesamiento de las rupturas de las hebras del ADN que ocurren en procesos endógenos como la meiosis o la replicación, en la exposición a agentes externos como la RI, en la maduración del sistema inmune y en el mantenimiento de telómeros [Angele y col., 03]. La alteración de ATM por la RI, puede ser responsable de cualquier anomalía en la activación múltiple de los puntos de control del ciclo celular e inducir a una reparación defectuosa del ADN. Se ha observado que por acción de la RI no se incrementan los niveles de la proteína ATM, lo que se incrementa o altera es la función cinasa de la proteína [Khanna y col., 98].

#### *VIII. 1. 6. – Mecanismo de Acción de la Proteína ATM.*

La proteína ATM es una proteína cinasa serina/treonina que después de captar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN (probablemente ocasionado por la RI), se autofosforila e inicia la cascada de señalización a través de la fosforilación de otros sustratos [Kastan y Lim 2000]. Los sustratos de ATM son reguladores del ciclo celular que se activan en respuesta a la producción de daño en el ADN.

Entre los sustratos se encuentran proteínas como: p53, RPA, Chk2, Chk1, c-Abl, NF-kB y BRCA1 [Angele y Hall, 2000]. La mayoría de estos sustratos participan en la reparación de la ruptura de la doble hebra del ADN, la minoría realiza esta función como tarea principal ya que, además, participa en otras funciones para mantener la estabilidad celular [Khanna 2000].

La cascada de señalización activada por la RI es dirigida principalmente por las proteínas ATM y p53. La proteína ATM es activada en las fases S y G2, y también es requerida en el punto de control G1/S y en la recombinación homóloga [Kurz y Lees-Miller 04].

La actividad cinasa asociada a la proteína ATM fosforila a una Ser-15 en p53, produciendo un incremento en la concentración intracelular de p53 como consecuencia de tratar de mantener la estabilidad en la célula. También se ha reportado la desfosforilación de la Ser-376 en la porción C-terminal de p53 que es dependiente de ATM [Angele y Hall, 2000]. En otro estudio, se observó la inducción normal de p53 en las células expuestas a la UV y una inhibición de p53 en las células expuestas a la RI [Kastan y col. 91]. En las células con AT la activación de p53 es mínima, ocasionando alteración en los puntos de control G1/S y G2/M del ciclo celular [Lavin y col., 04].

La proteína p53 es un activador transcripcional presente en muchos genes incluyendo el gen WAF1/CIP1, el cual codifica a p21 que es un inhibidor cinasa y desempeña un papel importante en el ciclo celular. La proteína p21 se une al complejo cinasa cdk2-ciclina E y por inhibición de este complejo evita la progresión de la célula de G1 a la fase S, indicando que la proteína ATM está involucrada en el control de la síntesis del ADN [Ko 96].

El complejo heterodimérico RPA es fosforilado en la subunidad 34 Kd por la acción de la proteína ATM. Este complejo es un efector importante en el punto de control en la fase S, que permite la reparación de la ruptura en la doble hebra del ADN, antes de que la célula inicie la replicación del material genético [Khanna 2000].

La cinasa Chk2 es activada por la proteína ATM y va a fosforilar a p53 en la Ser 20 para favorecer la estabilización de p53 [Matsuoka y Huang 98]. La expresión de la cinasa Chk1 es dependiente del ciclo celular pero independiente de la proteína ATM, ambas proteínas cinasas Chk1 y Chk2 también son llamadas hCDs1 y actúan como reguladores en el punto de control G2/M del ciclo celular [Angele y Hall 2000].

Se ha observado que ATM interacciona con una tirosina cinasa c-Abl, que es activada por señales independientes de la radiación como estrés y regula el ciclo celular a través de caminos independientes a p53 [Lavin y col., 04]. La radiación induce a la activación de ATM que junto a c-Abl forman un complejo con las proteínas rad51 y rad52; este complejo participa en la reparación del daño al ADN [Khanna 2000].

Otro blanco para ATM es I $\kappa$ B- $\alpha$ , el cual está asociado con NF $\kappa$ B en el citoplasma, el cual, después de la exposición a la radiación ionizante I $\kappa$ B- $\alpha$  es fosforilado y disociado de NF $\kappa$ B. El NF $\kappa$ B nuevamente entra al núcleo y actúa como un activador transcripcional de varios genes y desempeña un papel importante en la protección celular contra una variedad de

estímulos apoptóticos, también participa en la reparación del daño al ADN; la inhibición de NFkB puede desencadenar la radiosensibilización de la célula [Nanxin y col., 01]. Se ha observado que la proteína ATM es requerida para la fosforilación de BRCA1 inducida por la radiación ionizante [Cortez y col. 99].

Las proteínas BRCA protegen al genoma de las consecuencias de la RI, ya que permiten detener el ciclo celular y promueven la reparación del ADN [Wilson y Elledge 02]. BRCA1 y BRCA2 son importantes para mantener la estabilidad genómica a través de la recombinación homóloga, de la transcripción y de la reparación en la doble hebra del ADN, estas funciones sugieren que participan junto a otras proteínas como Rad51 [Venkitaraman 01].

La proteína BRCA1 está implicada en la regulación transcripcional de varios genes en respuesta al daño radioinducido al ADN, que incluye a p21 que es un inhibidor ciclina-cinasa y a un supresor de tumores GADD45, estas dos proteínas (BRCA1 y BRCA2) son los blancos de p53 [Li y col., 99]. Se ha sugerido que BRCA1 regula el ciclo celular mediante la fosforilación, que por su actividad cinasa endógena, hiperfosforila al complejo de ciclina cdk2, el cual controla la transición de G1-S, también se ha reportado que participa en la desfosforilación de las proteínas que participan en la fase M del ciclo celular [Ruffner y col., 99] y que BRCA1 puede detener el ciclo celular en la fase S cuando existe daño en el ADN y participa en el punto de control G2/M [Aprelikova y col., 99].

La proteína BRCA2 a diferencia de la BRCA1 parece no tener un efecto marcado en el control del ciclo celular [Patel y col., 98] y el mecanismo con el que actúa BRCA2 aún no se conoce bien. Sin embargo algunos autores indican que la BRCA2 está involucrada en la regulación de la progresión de la metafase en la división celular y que de cierta manera desempeña una función importante en la respuesta al daño del ADN [Futamura y col., 2000]. Otros autores proponen que la BRCA2 es esencial en la reparación de la ruptura de la doble hebra del ADN [Welch y col., 2000]. Se ha observado que las células que contienen proteínas truncadas de BRCA2 presentan una acumulación progresiva de aberraciones cromosómicas, que originan estructuras cromosómicas tri- y tetra-radiadas [Patel y col., 98], que son similares a las observadas en la AF y en el SB que indican los defectos en la recombinación mitótica [Venkitaraman 01]. En un estudio reciente en el subgrupo FANCD2 de la AF se observó que la proteína BRCA2 está involucrada en la recombinación homóloga en respuesta a la ruptura de la doble hebra del ADN ocasionado por RI [Stewart y Elledge 02].

La herencia de un alelo defectuoso de BRCA1 y BRCA2 es suficiente para la predisposición de cáncer. Tumores de mama y de ovario muestran pérdida de la heterocigocidad [Collins y col., 95], indicando que los productos de estos genes deben comportarse como proteínas supresoras de tumores [Venkitaraman 01]. Se han observado mutaciones en los genes de BRCA en las células de mujeres con cánceres primarios múltiples,

en las células de cánceres de mama de origen esporádico y en las células de cáncer de mama de mujeres que presentaron antecedentes de cáncer familiar [Wilson y Elledge 02].

La ausencia de la proteína ATM o de alguno de sus sustratos puede originar que la lesión subletal del ADN no sea efectivamente reparada y la inactivación de los puntos de control del ciclo celular, que son necesarios para reparar el daño celular, ocasionando que se incremente la inestabilidad genómica [Lavin y col., 04]. El mecanismo de acción de la proteína ATM se observa en la figura VIII. 2.

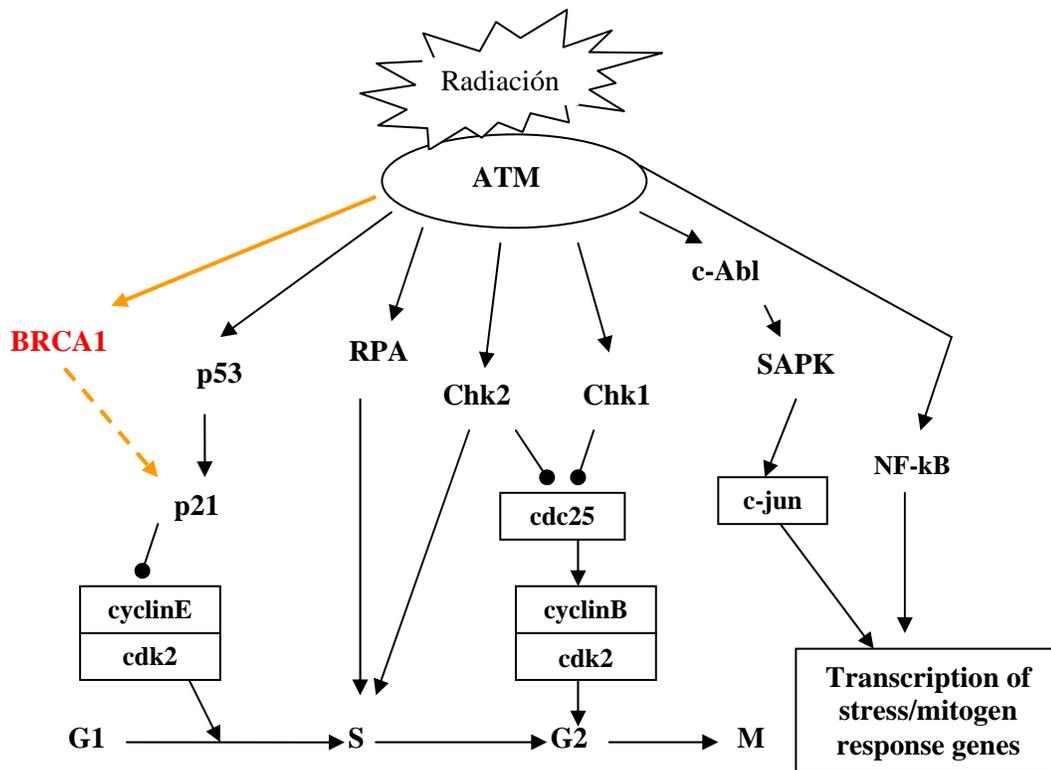


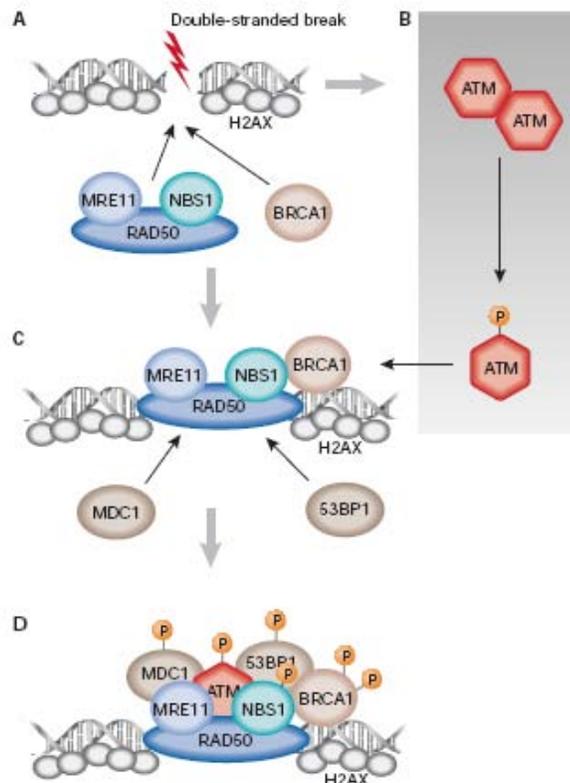
Figura VIII. 2: Mecanismo de acción de la proteína ATM [Lavin y Khanna 99].

### VIII. 1. 7. – Mecanismo de Activación de la Proteína ATM.

La proteína ATM después de la ruptura de la doble hebra del ADN conduce a una serie de eventos coordinados que ocurren en forma rápida y colectiva para activar a los efectores celulares [Shiloh 03]. La proteína ATM se encuentra inactiva en forma dimérica o multimérica; al captar la señal de la ruptura de la doble hebra del ADN, se autofosforila en la Ser-1981, lo que permite la activación de ATM y la iniciación de la cascada de señalización de los otros sustratos [Bakkenist y Kastan 03]. A pesar de que la proteína ATM es esencial en la respuesta de la ruptura de la doble hebra del ADN, participa de manera conjunta con tres componentes proteicos MRE11, RAD50 y NBS1 [Amours y Jackson 02], formando el

complejo denominado MRN [Carson y col., 03]. El ATM activo se asocia directamente con el complejo MRN y esta interacción controla la señalización que estará influenciada por el sustrato ATM seleccionado como las histonas H2AX, 53BP1, MDC1 y BRCA1 [Lee y Paul 04]. De esta manera la proteína ATM y el MRN desempeñan funciones importantes en la respuesta a la ruptura de la doble hebra del ADN [Ball y Xiao 05].

Después del daño radioinducido al ADN, estas proteínas se movilizan rápidamente al sitio de la ruptura de la doble hebra del ADN e inician la cascada de señalización dependiente de la proteína ATM, que permite la reparación del daño al ADN o en el caso de daño excesivo, se inicia la muerte celular a través de apoptosis mediada por p53. Todas estas proteínas actúan colectivamente con interdependencia entre ellas, por lo tanto la inactivación de alguna de ellas produce hipersensibilidad a la ruptura de la doble hebra del ADN [McKinnon 04]. Este mecanismo se observa en la figura VIII. 3.



**Figura VIII. 3:** Mecanismo de activación de la proteína ATM [McKinnon 04].

### VIII. 1. 8. – Mutaciones en ATM.

Las mutaciones en la proteína ATM originan cambios conformacionales en la estructura, en la activación de la función cinasa o en la alteración de la estabilidad de la molécula primaria. Las mutaciones en la proteína ATM son responsables de las características fenotípicas clásicas en los pacientes con AT [Khanan y col., 95]; [Angele y col., 03].

Las mutaciones en la proteína ATM descritas hasta el momento se han encontrado en más de 300 familias con AT, se han descrito 36 polimorfismos del gen ATM (<http://www.vmmc.org/vmrc/atm.htm>). En los heterócigos en el gen ATM, el 70% de las mutaciones originan proteínas truncadas, el 30% presentan mutaciones de cambio de sentido y una pequeña fracción presenta mutaciones de tipo inserción/delección. La mayoría de las mutaciones encontradas en el gen ATM se ubican en el dominio PI3K de la proteína [Khanna 2000].

En una compilación de tres publicaciones [Lavin y col. 04] sobre las mutaciones del gen ATM, reportan hasta 75 mutaciones en los pacientes con AT. Varias de las mutaciones encontradas se ubicaron en el marco de lectura del transcrito, en lugares que aparentemente no son puntos calientes (hot spot). También mencionan que ninguna de las mutaciones encontradas era la responsable de la elevada inestabilidad en el transcrito de ATM.

Se ha reportado que en un mismo fragmento del gen ATM se pueden encontrar mutaciones tipo delección, inserción o de cambio de sentido [Angele y col., 03]. La mutación más frecuente observada en el gen ATM es de tipo delección, que transcribe principalmente a las proteínas truncadas, las cuales presentan sus funciones disminuidas o normales, pero con una actividad cinasa notablemente disminuida [Lavin y col., 04]. Las diferentes mutaciones en la proteína ATM son responsables de la severidad de los casos de AT, existen versiones de AT con una sintomatología menos severa [Stewart y col., 01].

En un estudio realizado en dos familias británicas se han observado transversiones en 7271 pares de bases que implican principalmente el reemplazo de valina por glicina. Estas mutaciones se asociaron con un fenotipo clínico leve, baja radiosensibilidad e incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama en homócigos y heterócigos [Stankovic y col., 98]. En otro estudio en 41 familias nórdicas con AT, evaluaron en 28 familias mutaciones en ambos alelos del gen ATM, en 11 familias se encontró sólo una mutación y en las 2 familias restantes no se identificó ninguna mutación. Encontraron 82 alelos mutados que causan la enfermedad, de los cuales se identificaron 67 alelos (82%); de estos alelos identificados, 37 fueron mutaciones únicas. Las mutaciones encontradas presentaron 5 diferencias en el transcrito ATM, observándose mutaciones que afectan el splicing (43%), mutaciones frameshift (32%), mutaciones sin sentido (16%), delección en un fragmento pequeño (5%) y una doble sustitución

(3%). También se observó que una tercera parte de los participantes fueron homocigos, mientras que la mayoría de los participantes fueron heterocigos con al menos un alelo identificado [Laake y col., 2000].

Los estudios de mutaciones en la proteína ATM han permitido correlacionar al genotipo-fenotipo de las poblaciones; la modificación en los genes y/o en la exposición con el medio ambiente puede afectar el fenotipo de AT [Khanan y col, 95].

## CAPÍTULO IX. FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS

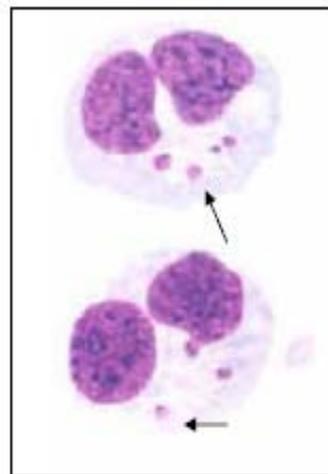
### IX. 1. Evaluación de la frecuencia de los micronúcleos en estudios de genotoxicidad.

Existen varios parámetros que pueden ser utilizados para la evaluación de los efectos genotóxicos de agentes físicos, químicos y biológicos. Uno de los métodos más empleados en la actualidad debido a su sensibilidad y sencillez, es la determinación de la frecuencia de células con micronúcleos (MN).

Los MN (figura IX. 1) son fragmentos del núcleo celular que se forman como consecuencia de una división cromosómica errónea, que provoca la pérdida de un fragmento de cromosoma o del cromosoma completo, el cual puede incluirse en alguna de las células hijas después de la citocinesis [Fenech 97]. La técnica originalmente se desarrolló para la evaluación del daño inducido por la RI, aunque poco después se amplió su uso para el análisis de otros mutágenos [Heddle y col., 83].

Para el análisis de MN en linfocitos de sangre periférica de seres humanos se emplea una metodología que se basa en el bloqueo de la citocinesis utilizando Citocalasina-B (Cyt-B), lo que permite identificar a las células que se han dividido una vez en cultivo, observándose éstas como células binucleadas, debido al efecto inhibitorio de la Cyt-B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis [Carter 67].

**Figura IX. 1:** Células binucleadas con micronúcleos (MN), teñidas con Giemsa. Obsérvese los dos núcleos principales y los MN en el citoplasma (flechas) [Fenech y col.; 03].



Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy útil para la detección de daño genético, además de presentar otras ventajas como su rapidez, facilidad y versatilidad, pues es aplicable a diferentes tipos celulares, siendo en algunos casos capaz de sustituir el análisis de aberraciones cromosómicas.

Los criterios para la identificación de MN en células binucleadas (CBN) aceptados en estudios internacionales son [Fenech y col.; 03]:

- Criterios empleados para identificar CBN.

- ✓ Las células deben ser binucleadas.
- ✓ Los dos núcleos deben presentar una membrana nuclear intacta y deben situarse dentro del mismo límite citoplasmático.
- ✓ Los dos núcleos deben ser aproximadamente del mismo tamaño con la misma intensidad de tinción.
- ✓ Los dos núcleos pueden estar unidos por un puente nucleoplasmático fino, el cual no debe ser mayor que  $\frac{1}{4}$  del largo del diámetro nuclear.
- ✓ Los dos núcleos pueden traslaparse, pero debe distinguirse la membrana nuclear de cada uno.
- ✓ La membrana citoplasmática debe estar intacta y ser claramente distinguible de las células adyacentes.

- Criterios para la identificación de MN.

- ✓ El diámetro de un MN en linfocitos humanos usualmente debe considerarse entre  $\frac{1}{16}$  y  $\frac{1}{3}$  del diámetro de un núcleo de las CBN, que corresponde a  $\frac{1}{256}$  y  $\frac{1}{9}$  del área de uno de los núcleos de las CBN.
- ✓ Son de forma redonda u oval.
- ✓ No debe refringir para poder distinguirlos de artefactos como partículas teñidas.
- ✓ No deben estar unidos o conectados al núcleo principal.
- ✓ Debe presentar color e intensidad similares a los del núcleo principal.
- ✓ No debe tocar ninguno de los núcleos.
- ✓ Debe presentar la misma condensación de los núcleos.

## CAPÍTULO X. ANTECEDENTES

### X.1 Antecedentes

Hoy en día se sabe que la exposición moderada a altas dosis de radiación ionizante es un factor de riesgo para la salud del ser humano, sin embargo, la relación entre dosis bajas de radiación y la generación de algún tipo de cáncer o daño celular de consecuencias graves, es aún incierta. La incertidumbre radica en la frecuencia tan baja con la que dichos efectos se presentan, y en las diversas variables ambientales que se escapan de control al realizar estudios epidemiológicos.

La dosis promedio de las personas expuestas en el grupo de “estudio de tiempo de vida” (life – span study, LSS cohort)<sup>c</sup> es de solamente 200 mSv, de éstas, más del 50 % (26,300 individuos) recibieron dosis menores que 50 mSv por lo que representa el estudio epidemiológico con la mayor estadística para evaluar los riesgos por dosis bajas de radiación aguda a cuerpo completo. En un estudio realizado de esa población [Preston y col., 2003], se estimó la incidencia en la mortalidad por algún cáncer sólido, (en pacientes que fallecieron durante los años de 1950 – 1997), se mostró que aquellos que recibieron dosis de 5 a 125 mSv (dosis promedio de 34 mSv), mostraron un incremento significativo ( $P = 0.025$ ) en la mortalidad relacionada con un cáncer sólido.

Otro grupo de tamaño considerable que recibe dosis bajas de radiación ionizante, lo constituyen los trabajadores de plantas núcleo-eléctricas u otro personal ocupacionalmente expuesto (POE). En un estudio realizado con trabajadores de plantas nucleares en 15 países, se evaluó el riesgo del desarrollo de cáncer. Los trabajadores mostraron valores de dosis de 5 a 500 mSv impartidos por fotones cuyo intervalo de energía era de 100 a 3000 keV, durante al menos un año (90 % de los trabajadores recibieron dosis acumuladas menores que 50 mSv y menos del 0.1% recibió dosis acumuladas mayores que 500 mSv). Los resultados mostraron un riesgo de dos a tres veces mayor que el obtenido al extrapolar (mediante el modelo clásico lineal) el riesgo estimado a partir de los datos obtenidos de los sobrevivientes a la bomba atómica [Cardis y col., 05].

---

<sup>c</sup> Las bombas atómicas que detonaron en Hiroshima y Nagasaki, Japón en 1945, provocaron que cientos de miles de personas fueran expuestas a la radiación gamma. Las estimaciones de dosis, para 86,572 sobrevivientes de los bombardeos de Hiroshima y de Nagasaki, están disponibles como parte del “grupo de estudio de tiempo de vida” (Life Span Study cohort, LSS – cohort). Estos estudios fueron realizados por la Fundación de Investigación de los Efectos de Radiación ([http://www.rerf.or.jp/index\\_e.html](http://www.rerf.or.jp/index_e.html)), que investiga los efectos de largo plazo de la exposición durante los bombardeos. Se estimó una exposición media de cerca de 300 mSv. Para los residentes que permanecieron en ambas ciudades, se realizaron estimaciones individuales de dosis que incluyen mortalidad por cáncer (1950 – 1990) e incidencia de cáncer (1958 – 1987).

En otro estudio [Gilbert 01] realizado con trabajadores nucleares de 3 distintos países (EU, Canadá y Reino Unido) se mostró que para los trabajadores canadienses, estadísticamente se encontró una incidencia excesiva de cáncer y riesgo de mortalidad por cánceres sólidos (dosis promedio 6.5 mSv). En contraste, ningún análisis de los trabajadores del Reino Unido ni de los Estados Unidos (con dosis promedio de 30 y 40 mSv, respectivamente), mostró un incremento significativo en el riesgo de cáncer sólido. Sin embargo, los tres estudios mencionan un incremento en el riesgo a leucemia.

Diversos métodos experimentales han sido desarrollados para evaluar el daño por radiación in vitro o in vivo. Estos métodos incluyen como parámetros biológicos a las aberraciones cromosómicas, transformaciones celulares e inducción de mutaciones principalmente, entre otros (como pueden ser: daño a la cadena del ADN y frecuencia de micronúcleos).

Distintos modelos han sido desarrollados para describir los efectos inducidos por la radiación y su dependencia con la dosis, tasa de dosis y tipo de radiación sobre dichos parámetros biológicos (modelo lineal cuadrático, lineal sin umbral, etc.). Estos modelos, indican en general, que una sola interacción, aun por radiación de baja LET, tiene una probabilidad finita de producir uno o más rompimientos de cadena doble en el ADN del núcleo celular [U2000 – F]. Por esto, las consecuencias a nivel celular de que se produzca un rompimiento de cadena doble, es posible aún a la menor dosis. Sin embargo, esto podría no suceder si el proceso de reparación celular, para algunos rompimientos de cadena doble, fuera totalmente eficiente, en ese caso, se tendría la presencia de una dosis umbral que motivara a la respuesta celular. No hay evidencia de que el proceso de reparación celular sea totalmente eficiente, pero sí de que los métodos experimentales tienen límites para poder determinar el daño producido por debajo de cierto valor de la dosis [U2000 – G].

La mayoría de los resultados encontrados al analizar aberraciones cromosómicas producidas por radiación ionizante en linfocitos humanos, muestran una relación lineal a bajas dosis, aunque también se ha ajustado el modelo lineal – cuadrático y en algunos casos, a dosis muy bajas (5 – 10 mGy) se habla del efecto de hormesis [U2000 – G]. En un estudio realizado a bajas dosis (0 – 300 mGy) de rayos X [Lloyd y col., 92], utilizando linfocitos humanos de sangre periférica, encontraron que la producción de aberraciones tiene una relación lineal con la dosis, en cambio, los datos de la producción de dicéntricos, mostraron una relación lineal, pero con umbral (a partir de 10 mGy) [Edwards 98]. Los datos hasta ahora obtenidos para aberraciones cromosómicas no permiten establecer resultados confiables para valores de dosis menores que 20 mGy de rayos X, debido a la incertidumbre en los resultados obtenidos [U2000 – G].

De los resultados para mutaciones somáticas y transformaciones celulares, se observa que la mayoría de las relaciones dosis – respuesta son del tipo lineal [U2000 – G], aunque también están presentes relaciones lineal cuadráticas y en algunos casos se adjudican, a dosis muy bajas, efectos de radio-adaptación [Sanderson y Morley 86] y [Kelsey y col., 91]. Sin embargo se manifiesta [U2000 – G] que las dosis mínimas, hasta ahora, en la que los datos de mutaciones somáticas y transformaciones celulares resultan confiables son a dosis mayores que 200 mGy y 100 mGy, respectivamente.

También se ha determinado el efecto producido a bajas dosis mediante otro tipo de parámetros.

En particular, la técnica de **micronúcleos** (MN) ha sido empleada como un indicador de daño al ADN tanto por agentes físicos como por agentes químicos [Odagiri y col 90], incluyendo la radiación ionizante [Evans y col., 59], [Heddle y Carrano 77], [Fenech y Morley 86] y [Littlefield y col., 89]. Los MN son pequeños corpúsculos redondos dentro del citoplasma y fuera del núcleo principal que contienen cromosomas completos o parte de ellos. Estructuralmente se parecen al núcleo principal de la célula. [Walker y col., 96] y [Schiffmann y De Boni 91].

Empleando la técnica de bloqueo citocinético (CBMN) se observó que la producción de MN aumentó significativamente, en linfocitos humanos, con dosis de 100 a 500 mGy respecto del control [Fenech y Morley 86], encontrando una relación lineal entre la dosis y la frecuencia de MN. Se menciona además que esta técnica modificada con el bloqueo citocinético permite detectar cambios en la frecuencia de MN producidos por dosis mayores que 50 mGy de rayos X.

Los datos obtenidos hasta ahora, acerca de la inducción de micronúcleos a bajas dosis son controversiales, ya que existen algunos resultados [Cole y col., 81], [Nagasawa y col., 92], [Livingston y col., 93]; que mencionan un efecto dosis – respuesta, acorde con la extrapolación lineal de los datos obtenidos desde dosis altas. Sin embargo otros estudios, obtuvieron una respuesta no lineal respecto de la dosis impartida [Mitchell y Norman 87], al irradiar linfocitos humanos a una dosis de 0.1 Gy impartida por rayos X de 90 kVp se encontró que se producía una mayor cantidad de MN que el valor esperado al extrapolar los datos obtenidos para dosis altas (1 – 2 Gy).

Irradiando eritroblastos (células de médula ósea) de ratón [Jenssen y Ramel 76], [Uma Devi y Sharma 90] y [Jagetia y Ganapathi 94], o fibroblastos de hámster chino [Zaichkina y col., 04], se encontró una inducción mayor de micronúcleos a dosis bajas de rayos X y rayos gamma que la predicha por la extrapolación lineal desde dosis altas.

Se sabe que los principales factores que determinan el efecto biológico de una exposición son: la dosis absorbida y el tipo de radiación. Sin embargo la velocidad con la que se recibe esta dosis y el número de veces que un individuo se expone a la radiación son factores que pueden modificar los efectos producidos. De esta manera, se hace necesario tomar en consideración tanto la dosis total impartida como la tasa de dosis, para determinar el riesgo de exposición a la radiación ionizante de baja LET.

Existen algunos estudios que muestran el efecto de la tasa de dosis al analizar el número de micronúcleos producido en células humanas, irradiadas por rayos X de 150 kVp [Nakamura y col., 06] y 250 kVp [Vral y col., 92] o por rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$  [Boreham y col., 2000], [Magae y col., 03], [Geard y Chen 90], así como en líneas celulares de ratón [Widel y col., 98], [Brooks y col., 90] En la mayoría de los estudios realizados se encuentra que a menor tasa de dosis, la frecuencia de MN producidos, analizados por el ensayo de bloqueo citocinético, se reduce. Sin embargo hay excepciones en las que este efecto no se presenta [Nakamura y col., 06], [Zaichkina y col., 04] o incluso se invierte, es decir, a menor tasa de dosis, mayor inducción de micronúcleos [Widel y col., 98]. Cabe señalar que en los trabajos mencionados se utilizaron dosis totales consideradas como altas ( $> 1$  Gy).

La existencia de síndromes de inestabilidad cromosómica que se caracterizan por presentar altas frecuencias de cáncer y mayor sensibilidad a mutágenos incluyendo a la radiación ionizante, plantea la posibilidad de que los individuos heterocigos para estos síndromes sean sensibles a dosis menores que las permitidas [Cuncliffe y col., 75]. Uno de estos síndromes es el de Ataxia Telangiectasia (AT), una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen ATM. Se estima que la incidencia de enfermos a escala mundial es de 1 en 40,000 a 1 en 300,000 y la frecuencia de heterocigos en la población se calcula en 1% [Hall y col., 99]. Swift y colaboradores [Swift y col., 87], estiman que entre el 8 y el 18% de todas las pacientes con cáncer de mama, son heterocigos para ATM, lo que implicaría que ATM sea el gen más común de susceptibilidad al cáncer.

## CAPÍTULO XI: PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

### XI Planteamiento

Los organismos dedicados a la protección radiológica utilizan la hipótesis lineal sin umbral, que indica que a dosis bajas, la radiación ionizante tiene la misma probabilidad, por unidad de dosis, de inducir el desarrollo de cáncer que a dosis altas y que el riesgo se incrementa linealmente con la dosis recibida [ICRP 60].

En 1996 se propuso que la exposición, a dosis bajas de RI puede causar efectos severos sin conocer exactamente la magnitud de estos, planteando dos teorías, la primera menciona que no existe dosis completamente segura y el uso de la RI se debe determinar con base en la medida del riesgo/beneficio, la segunda indica que los riesgos no son medibles y por lo tanto pueden ser inexistentes [Pierce y Preston 96].

Recientemente (2005) se irradiaron, con partículas beta de una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ , líneas celulares linfoblastoides de AT, con el fin de estimar las diferencias en la susceptibilidad al daño genético medido por la frecuencia de MN, ocasionado por la exposición a dosis bajas. Específicamente se emplearon 4 líneas celulares con diferentes estatus genéticos: CHOC: silvestre (+/+), RHO y FBU: heterocigas (+/-) y una homociga: JHE (-/-), para el gen ATM. Las irradiaciones se realizaron con dosis bajas (del orden de 10 cGy) y baja tasas de dosis (~ 0.25 cGy/min) [Mata 05].

Los resultados obtenidos mostraron que dosis consideradas como bajas (12 cGy), produjeron una disminución en la viabilidad de la población celular irradiada, con excepción de células silvestres (CHOC +/+, las que no tienen el gen ATM mutado). De igual forma se presentó un incremento en la inducción de micronúcleos en las otras células radio – sensibles, (entre ellas JHE – / –) a dosis bajas (8 y 12 cGy) [Mata 05].

En el presente trabajo se pretende determinar si se produce un efecto similar o no, en la producción de micronúcleos, utilizando la línea celular más radio – sensible, (JHE – / –) empleada anteriormente [Mata 05], pero en esta ocasión, irradiada en un equipo de rayos X de diagnóstico a bajas dosis. Además, como procedimiento inicial, se observará el posible cambio en la frecuencia de micronúcleos, producido al irradiar a distintos valores de tasa de dosis, manteniendo como constante la dosis absorbida total.

## CAPÍTULO XII. MATERIALES Y MÉTODOS

### XII. A. Condiciones de Irradiación

La irradiación de las líneas celulares se realizó con un equipo de rayos X de radiodiagnóstico marca Philips modelo “Diagnost 15” ubicado en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan). El voltaje de operación máximo del tubo de rayos X es de 150 kV, consta de un ánodo de tungsteno y filtrado inherente de 2.5 mm de Al. El tubo de rayos X fue operado a un voltaje de 125 kVp con una carga producida de 500 mAs. Para detalles acerca de los parámetros elegidos para la irradiación, consultar el Anexo A.

Para poder impartir diferentes tasas de dosis, se modificó la distancia fuente – objeto, procurando en cada caso, acumular una dosis total constante. La dosis impartida por los rayos X a las líneas celulares, se determinó empleando dosímetros termoluminiscentes (DTL).

*XII. A. a: Estimación de las distancias fuente – objeto para irradiar líneas celulares a distintas tasas de dosis*

Para tener una estimación de las distancias fuente – objeto a emplearse, calcularemos la dosis absorbida a partir de la exposición registrada por una cámara de ionización<sup>d</sup> (CI) ya que su operación es simple y rápida.

Para rayos X de 300 keV o menores, y considerando condiciones de Equilibrio de Partícula Cargada (EPC), la relación entre dosis absorbida en agua ( $D_{agua}$ , expresada en cGy) en el espacio libre y exposición ( $X$ , expresada en röntgen) viene dada por la siguiente ecuación [Attix 86]:

$$D_{agua}^{EPC} = 0.876X \left( \frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho} \right)_{aire}^{agua} \quad (\text{ec. XII. A. 1})$$

Para determinar el cociente de los coeficiente másicos de absorción de energía, de agua entre aire:  $\left( \frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho} \right)_{aire}^{agua}$ ; debemos conocer el valor de la energía equivalente del haz; ésta se puede

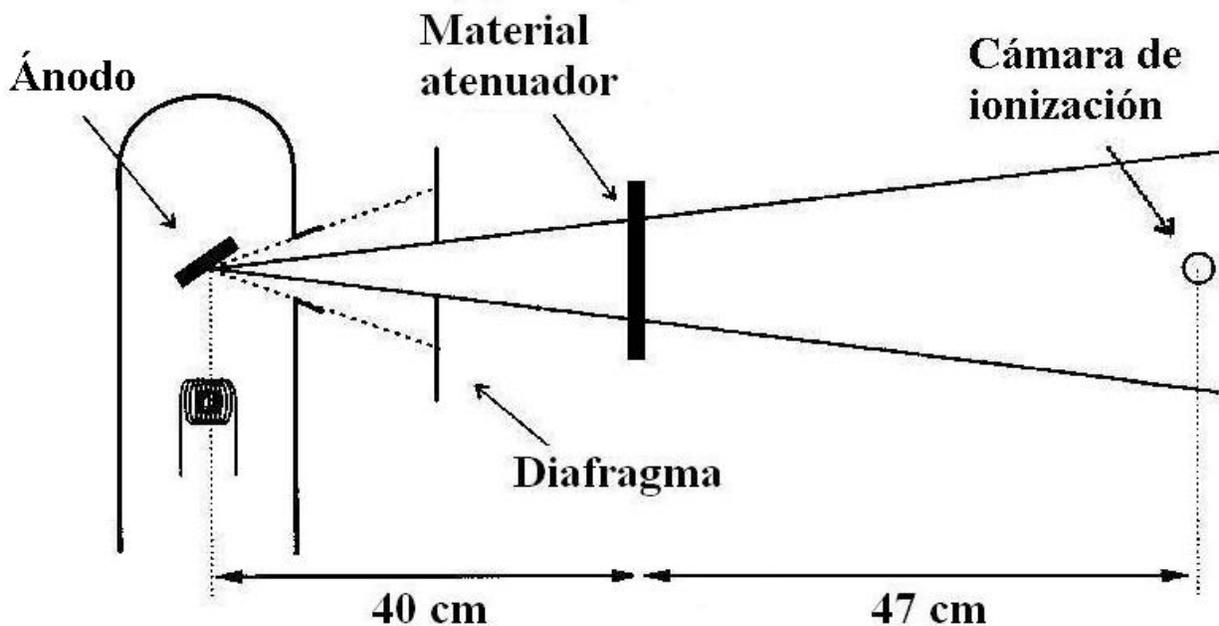
---

<sup>d</sup> Cámara de ionización y electrómetro asociado RADCAL Corporation. Mod. 2026C Radiation Monitor Controller, propiedad del IFUNAM. La CI no se encontraba calibrada por un laboratorio primario al realizar las medidas, los datos obtenidos son sólo para tener una idea de la dosis impartida por el haz de rayos X a cierta distancia.

calcular si conocemos el valor de la capa hemirreductora (CHR, para aluminio tipo 1100, por ejemplo); del espectro de fotones. Se utiliza agua debido a que las líneas celulares se encuentran en un medio de cultivo similar al agua.

### XII. A. b: Capa Hemirreductora

La capa hemirreductora (CHR) de un haz de rayos X se define como el espesor de cierto material atenuador que reduce la exposición (o la dosis, tasa de dosis, tasa de kerma en aire, etc.), a la mitad de su valor original, en geometría de haz angosto. La geometría de la irradiación, para determinar la CHR, se muestra en la figura XII. A.2.



*Figura XII. A.2: La determinación de la CHR involucra la medida de la exposición conforme el espesor del material atenuador varía, utilizando geometría de haz angosto y en un punto libre de dispersión.*

Para medir la CHR del haz producido por el equipo de radiodiagnóstico se realizó lo siguiente: se midió la exposición con la cámara de ionización (CI) a cierta distancia del ánodo ( $87 \pm 1$  cm), centrada en el campo de luz del equipo, posteriormente se colocaron placas de aluminio puro (1100 Victoreen), a  $40 \pm 1$  cm del ánodo y se realizó un disparo, registrando la exposición medida por la CI. Se continuaron agregando placas de aluminio y realizando disparos para cada espesor, hasta que el valor de la exposición inicial (sin placa) se redujo a menos de la mitad, finalmente se midió nuevamente la exposición sin placa y se registró la medida.

Las condiciones en las que se realizó la medida de la CHR, así como los datos obtenidos de la exposición con distintos espesores de aluminio se muestran a continuación:

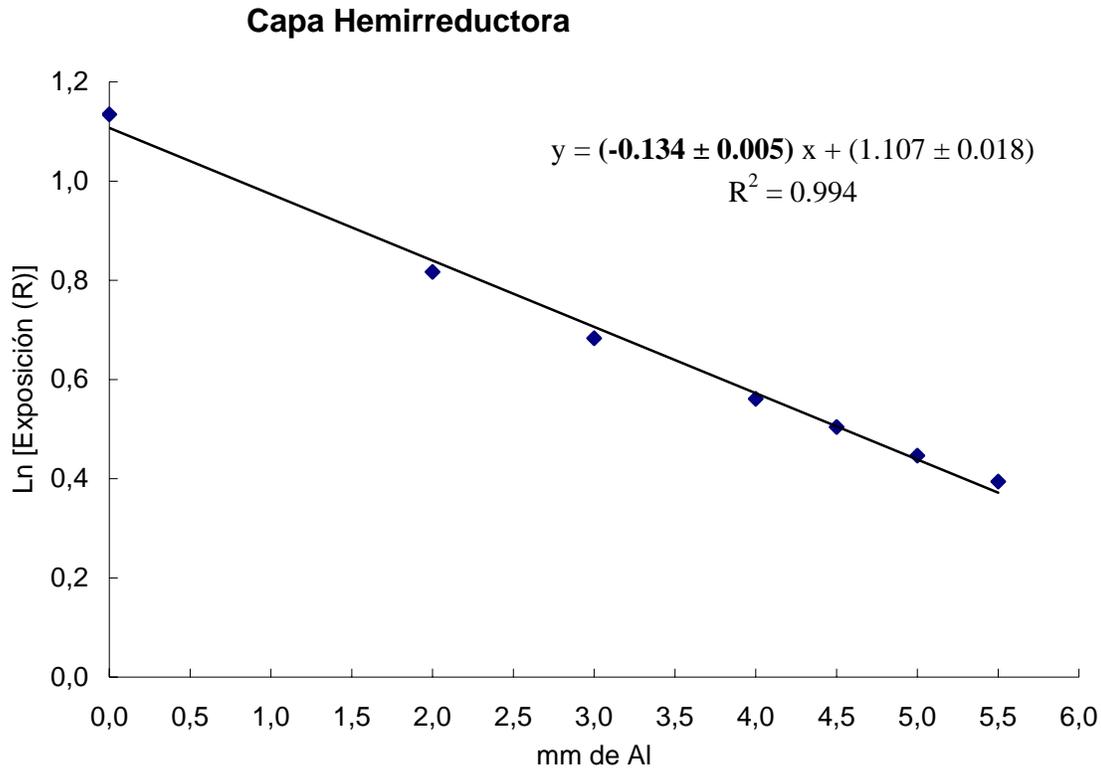
Tamaño del campo	10 x 10 (cm x cm $\pm$ 1.0 cm <sup>2</sup> )
Distancia ánodo – mesa	97.0 cm $\pm$ 1.0 cm
Distancia ánodo – CI	87.0 cm $\pm$ 1.0 cm
Distancia centro de CI – mesa	10.0 cm $\pm$ 0.5 cm
Voltaje de operación del tubo de rayos – X (kVp).	125 kV
Carga de operación del tubo	200 mAs
Tiempo de exposición	0.678 segundos

**Tabla XII. A.3:** El voltaje de operación, la carga y el tiempo de exposición fueron obtenidos desde la consola del equipo de rayos X.

Grosor de Al (mm)	Exposición promedio (röntgen)	Porcentaje de la Desviación Estándar	# de disparos
0.0	3.11	0.00	2
2.0	2.26	0.00	2
3.0	1.98	0.21	2
4.0	1.75	0.04	2
4.5	1.66	0.00	2
5.0	1.56	0.09	2
5.5	1.48	---	1
0.0*	3.12	---	1

**Tabla XII. A.4:** Los espesores disponibles de las placas de aluminio (tipo 1100 Victoreen) eran de 0.5 y 1 mm. El valor 0.0\* se refiere a la exposición sin placas de aluminio al final de la sesión, la diferencia con respecto de la primera medida fue del 0.3%. Los valores de la exposición se encuentran corregidos por la presión y temperatura del aire al momento de realizar las medidas, esta corrección se realiza por la propia electrónica del electrómetro asociado a la CI, en donde se establece una presión y temperatura de referencia

Se observa de la tabla que los valores de exposición fueron reproducibles (porcentaje de la desviación estándar máximo: 0.2%). Aplicando la función logaritmo natural  $\ln(x)$  a los datos de exposición y graficando contra el espesor de aluminio se obtiene:



**Gráfica XII. A.5:** Logaritmo de la exposición, como función del espesor de Al, para determinar la CHR. Las incertidumbres en la exposición son pequeñas (0.2 % máxima) por lo que no se aprecian en la gráfica

La pendiente de la recta ajustada nos da el valor del coeficiente lineal de atenuación  $\mu$  (mediante el ajuste lineal por el método de mínimos cuadrados, empleando el programa Origin Pro 7.0, se obtiene una incertidumbre del:  $\pm 3.7\%$  para el valor de la pendiente), de esta manera, podemos determinar el valor de la CHR mediante la siguiente relación:

$$\mathbf{CHR} = -\ln 2 / \mu = -\ln 2 / (-0.134 \pm 0.005) = \mathbf{5.2 \pm 0.2 \text{ mm de Al.}}$$

XII. A. c      Energía equivalente del haz de rayos X y cálculo de  $\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{\text{aire}}^{\text{agua}}$ :

Para conocer la energía equivalente correspondiente al valor de la CHR medida, empleamos la ecuación:  $\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{eq} = \frac{0.6931}{\rho \cdot CHR} \text{ cm}^2 / \text{g}$  [Attix 86], donde:  $\rho = 2.699 \text{ g/cm}^3$  para el

aluminio tipo 1100 [<http://www.supplersonline.com/propertypages/1100.asp>], así:

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{eq} = 0.496 \pm 0.017 \text{ cm}^2 / \text{g}, \text{ (esto es: } 0.496 \pm 3.5\% \text{ cm}^2/\text{g}).$$

Para obtener la energía equivalente, consultamos la base de datos del NIST (para aluminio, en la página: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab3.html>), y extrapolando para el valor de interés, obtenemos:

$$E_{eq} = 43.6 \pm 3.5 \% \text{ keV} = \mathbf{43.6 \pm 1.5 \text{ keV}}. \quad (\text{ec. XII. A.6})$$

Con este valor calcularemos el coeficiente  $\left(\frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho}\right)_{\text{aire}}^{\text{agua}}$  de la ec. XII. A.1: consultando la base de datos del NIST, (<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab4.html>), y considerando ahora la energía equivalente (ec. XII. A.6), se obtiene:

$$\left(\frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho}\right)_{\text{aire}}^{\text{agua}} = 0.05986 / 0.05832 = \mathbf{1.022 \pm 0.002 = 1.022 \pm 0.2\%} \quad (\text{ec. XII. A.7})$$

La incertidumbre se reduce considerablemente (de un  $\pm 3.5 \%$  a  $\pm 0.2 \%$ ) ya que los valores del cociente  $\left(\frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho}\right)_{\text{aire}}^{\text{agua}}$  varían muy poco con respecto de la energía equivalente del haz incidente.

#### *XII. A. d Dosis en agua, en función de la exposición:*

Sustituyendo el valor (ec. XII. A.7) en la ecuación XII. A.1:

$$D_{\text{agua}}^{EPC} = 0.876 X \left(\frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho}\right)_{\text{aire}}^{\text{agua}} = 0.876 X (1.022 \pm 0.002) =$$

$$D_{\text{agua}}^{EPC} = (0.895 \pm 0.002 \left[\frac{\text{cGy}}{R}\right]) X \quad (\text{ec. XII. A.8})^{\circ}$$

Podemos calcular la dosis impartida en agua ( $D_{\text{agua}}$ , en cGy) por el haz de rayos X (con una energía equivalente de  $43.6 \pm 1.5 \text{ keV}$ ), a partir del valor medido de la exposición ( $X$ , en röntgens) por la cámara de ionización. Aunque es necesario considerar factores de corrección al determinar la dosis en las células irradiadas.

---

<sup>°</sup> Se garantiza la existencia de EPC, cuando el volumen de interés  $V$  es mucho mayor que el alcance máximo de las partículas secundarias producidas por un haz de rayos X. El alcance de electrones producidos por fotones de 125 keV incidentes en agua es de: 0.19 mm, el espesor del volumen de agua en dónde se encuentran las células es de 5 mm mínimo (ya que el recipiente tiene forma cónica) y máximo de 9 mm.

*XII. A. e Factor de corrección por la pared del tubo Eppendorf.*

Para irradiar a las células se depositan dentro de tubos Eppendorf, por lo que se considera necesario determinar la atenuación del haz por la pared del recipiente, al pretender estimar la dosis impartida a las células.

Los tubos Eppendorf cuentan con paredes de polipropileno<sup>f</sup>, de 1 mm de espesor ( $\rho = 0.9 \text{ g/cm}^3$  y para una energía de  $43.6 \pm 3.5 \text{ \% keV}$ , se tiene un coeficiente másico de atenuación  $\mu/\rho = 0.219 \pm 0.003 = 0.219 \pm 1.4 \text{ \% cm}^2/\text{g}$ , este último estimado con ayuda del programa XCOM). Entonces, el factor de atenuación por dicho material se calcula de la siguiente manera:

$$f_{Eppen} = \exp \left[ \left( -\frac{\mu}{\rho} \right) \times (\rho x) \right] = \exp \left[ (-0.219 \pm 0.003 \text{ cm}^2/\text{g}) \times (0.9 \text{ g/cm}^3 \times 0.1 \pm 0.01 \text{ cm}) \right] =$$

$$= 0.98 \pm 0.01 \quad (\text{ec. XII. A.9})$$

La exposición se midió con la cámara de ionización, bajo las condiciones de la Tabla XII. A.10.

Tamaño del campo	10 x 10 (cm x cm)
Distancia fuente (ánodo) – CI	87.0 cm $\pm$ 1.0 cm
Voltaje de operación del tubo de rayos – X (kVp).	125 kV
Carga de operación del tubo	500 mAs
Tiempo de exposición	4.235 segundos
Temperatura	24 °C
Presión	77.3 kPa
Exposición medida (röntgen)	7.52 $\pm$ 0.01 R

**Tabla XII. A.10:** El voltaje de operación, la carga y el tiempo de exposición fueron obtenidos desde la consola del equipo de rayos X. La presión y temperatura se obtuvieron desde la CI, la cual nos entrega el valor de la exposición (en röntgens) corregido por la densidad del aire dentro de la cámara.

Se puede calcular entonces, el valor de la dosis absorbida empleando la ec. XII. A.8 y considerando el factor de atenuación por la pared del tubo Eppendorf, se tiene:

<sup>f</sup> Tubo Eppendorf con capacidad de 1,5 ml (cilindro de 11 x 41 mm, base x altura). Polipropileno puro (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>), de alta calidad, espesor de la pared de 1.1 mm. Densidad de 0.9 g/cm<sup>3</sup>. <http://www.eppendorfna.com/faqs/Centrifugation.asp>.

$$\begin{aligned}
D_{agua}^{EPC} &= (0.895 \pm 0.002) X \times f_{Eppen} && \text{(XII. A.11)} \\
&= (0.895 \pm 0.002 \text{ cGy} / \text{R}) \times (7.52 \pm 0.01 \text{ R}) \times (0.98 \pm 0.01) \\
&= 6.59 \pm 0.07 \text{ cGy} = 6.59 \pm 1.1 \% \text{ cGy} && \text{(XII. A.11a)}
\end{aligned}$$

La incertidumbre se obtuvo de la suma porcentual de los cuadrados de las incertidumbres de cada elemento del producto.

De esta manera, tenemos el valor de la dosis absorbida en agua, por un disparo del tubo de rayos X, a 125 kVp y 500 mAs, y a una distancia fuente – CI de  $87 \pm 1$  cm.

*XII. A. f Cálculo de las distancias fuente – objeto para obtener distintos valores de tasa de dosis y una dosis en agua constante.*

Nos interesa impartir una dosis en agua que sea constante, pero a distintos valores de tasas de dosis. Una forma sencilla de obtener distintos valores de tasa de dosis sin modificar las condiciones de operación (kVp y mAs), ni el valor de la energía equivalente, es variando la distancia entre el tubo de rayos X y el objeto a irradiar; de esta manera, si llamamos  $D_0$ , y  $D_1$  a la dosis impartida a una distancia  $d_0$  y  $d_1$ , respectivamente, estas cantidades se encuentran relacionadas mediante la siguiente expresión:

$$D_1 d_1^2 = D_0 d_0^2 \quad \text{(ec. XII. A.12)}$$

De esta forma, si conocemos la dosis ( $D_0$ ) a la distancia ( $d_0$ ), la distancia ( $d_1$ ) a la que obtendremos la dosis deseada ( $D_1$ ), será:

$$d_1 = d_0 \sqrt{\frac{D_0}{D_1}} \quad \text{(ec. XII. A.13)}$$

Emplearemos dos valores distintos de tasa de dosis a fin de poder comparar los efectos de la radiación sobre las líneas celulares, manteniendo una misma dosis total en cada caso. Para la tasa de dosis alta, proponemos ejecutar dos disparos consecutivos, y para la tasa de dosis baja, usaremos 6 disparos.

De esta manera, empleando la ec. XII. A.13 y haciendo:  $d_0 = 0.87 \pm 0.01$  m,  $D_0 = 6.59 \pm 1.1 \% \text{ cGy}$  y  $D_1$  igual a (Dosis total)/N (se empleó una dosis total de 11 cGy; N = 2 y 6, el número de disparos para la tasa de dosis alta y baja respectivamente), obtenemos los valores reportados en la tabla XII. A.14.

Número de disparos	Distancia ( $\pm 0.01$ m)	Exposición por disparo (röntgen)	Dosis en agua por disparo (cGy)	Dosis total en agua (cGy)	Tasa de dosis por disparo (cGy/min)
2	0.95	6.143	5.49	<b>10.97</b>	77.7
6	1.65	2.098	1.84	<b>11.03</b>	25.9

**Tabla XII. A.14:** El valor de la dosis en cGy, es calculado después de considerar la atenuación por la pared del tubo Eppendorf que contendría a las células. Las distancias requeridas se calcularon para tener una dosis total de 11 cGy. También se muestra la exposición esperada que registraría la CI a las distancias establecidas. No se muestran incertidumbres de Dosis y Tasa de dosis debido a que son estimaciones a partir de las distancias requeridas para obtener dichos resultados.

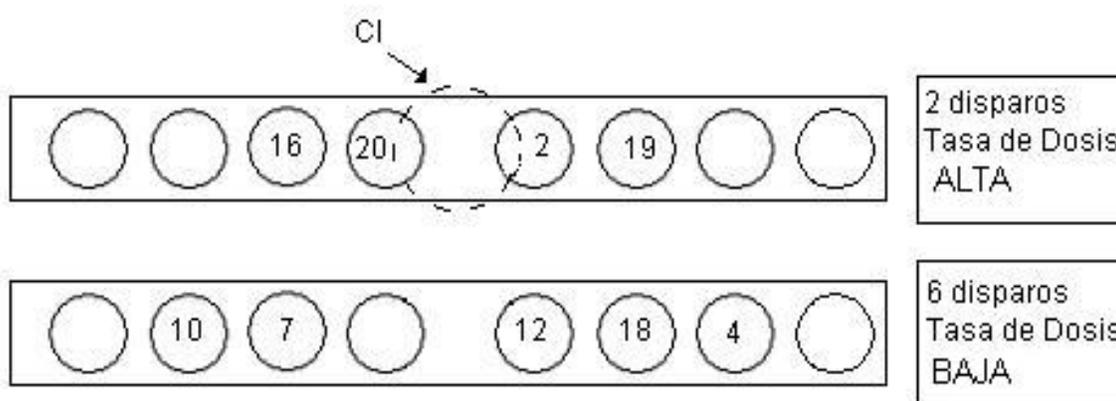
## XII. B. Dosimetría Termoluminiscente

XII. B. a: *Irradiación de dosímetros termoluminiscentes (DTL) para determinar la dosis impartida por un tubo de rayos X.*

Los DTL fueron colocados dentro de los tubos Eppendorf con 200  $\mu$ l de medio RPMI, envueltos por una película delgada de Parafilm<sup>f</sup> a fin de que no se humedecieran y se viera afectada la respuesta TL, procurando que una de las caras de los DTL fuera perpendicular a los rayos X. (Figura XII. B.1), de esta manera se simulan las condiciones en las que las líneas celulares serán irradiadas. Los tubos Eppendorf (con los DTL en el interior) se colocaron en una gradilla de plástico para mantenerlos en posición perpendicular respecto a la dirección del haz (Figura XII. B.3).



**Figura XII. B.1:** Tubo Eppendorf con DTL (envuelto en Parafilm) y medio de cultivo.

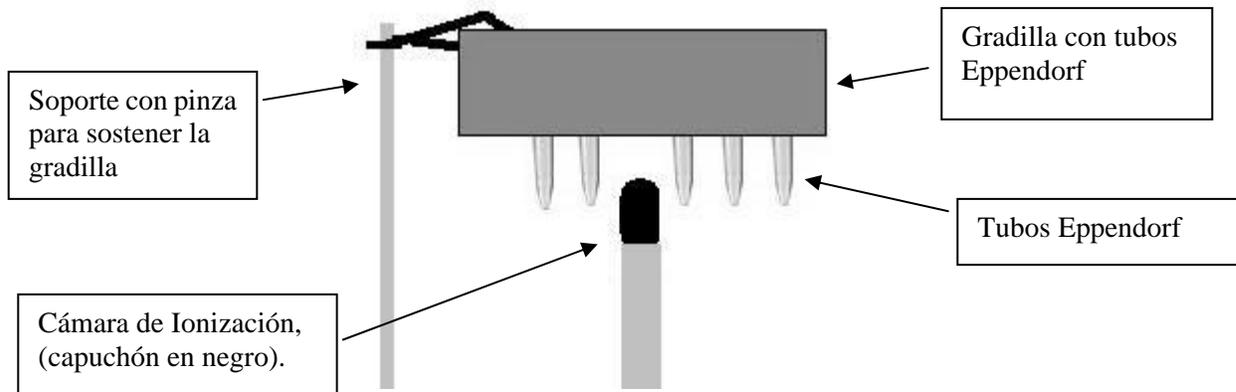


**Figura XII. B.2:** La gradilla cuenta con 8 cavidades por hilera. En cada cavidad, se muestra el número de identificación del dosímetro. Las tasas de dosis alta y baja se imparten con 2 y 6 disparos respectivamente. La cámara de ionización (CI) se colocó solamente para verificar que la exposición por disparo fuera la requerida (como aparece en la Tabla XII. A.14).

<sup>f</sup> **Parafilm M**<sup>®</sup>: Termo – plástico, flexible, elástico y semitransparente, en su presentación final es de forma laminar altamente resistente al agua, incoloro, inodoro, sin sabor y con un espesor aproximado de 127  $\mu$ m (0.005”). La densidad, en su forma laminar, se reporta con un valor de: 0.992 g/cm<sup>3</sup>. La composición real del Parafilm M no ha sido dada a conocer por el fabricante.

[<http://www.2spi.com/catalog/supp/supp4b3.html>]

Se muestra un esquema (figura XII. B.3), de la geometría de la radiación de los DTL, el haz va en dirección perpendicular a la hoja.



**Figura XII. B.3:** Los tubos Eppendorf con DTL (cubiertos con Parafilm) en su interior, sumergidos en medio de cultivo. La cámara de ionización se colocó para medir la exposición durante la irradiación de los cristales. Lo mismo se realizó para la tasa de dosis alta y la baja.

Las condiciones de operación del tubo al irradiar los DTL se muestran en el siguiente cuadro:

Tasa de Dosis	Alta	Baja
Número de disparos	2	6
Tamaño del campo	25 x 15 (cm x cm)	25 x 20 (cm x cm)
Distancia fuente (foco) – CI	95 ± 1 cm	165 ± 1 cm
Voltaje de operación del tubo de rayos – X (kVp).	125 kV	
Carga de operación del tubo	500 mAs	
Tiempo de exposición	4.235 segundos	
Exposición promedio por disparo medida con la CI	6.21 ± 0.0 % R	2.10 ± 3.3 % R
Dosis total en agua estimada con la CI	10.9 ± 1.2 % cGy	11.1 ± 4.6 % cGy

**Tabla XII. B.4:** El voltaje de operación, la carga y el tiempo de exposición fueron determinados desde la consola del equipo de rayos X. La CI se empleó sólo como referencia para verificar que se impartiera la exposición requerida a la distancia determinada, con base en los datos de la Tabla XII. A. 14.

## XII. B. b Protocolo para el uso de DTL

Para medir la dosis depositada en las células se usaron dosímetros termoluminiscentes (TLD – 100 (LiF:Mg,Ti) fabricados por Harshaw – Bricon, con dimensiones de 3x3x1 mm<sup>3</sup>). Antes de ser irradiados, fueron sometidos a un tratamiento térmico que consistió en un horneado en aire a 400 °C durante una hora, seguido de un horneado a 100 °C durante 2 h; después de cada horneado los dosímetros se enfriaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. La irradiación se realiza aproximadamente 24 h después de terminado el tratamiento térmico y entre el proceso de irradiación y el de lectura se dejó pasar un periodo de 24 horas [Horowitz 84].

La lectura de los DTL se realizó con un equipo automático (Harshaw 3500), que consiste de una plancheta (donde se colocan los DTL), ésta se calienta desde los 19 °C hasta los 300 °C en 30 segundos, en ese tiempo se registra la carga (señal) proporcional al número de fotones emitidos por el cristal, con ayuda de un tubo fotomultiplicador.

Es conveniente hacer una caracterización de los DTL que van a ser usados con el propósito de agrupar dosímetros con respuestas similares ante una misma dosis, esto es, que presenten uniformidad en la respuesta y además que se tenga una buena reproducibilidad en la respuesta individual de cada dosímetro. En este trabajo se usaron 9 dosímetros previamente seleccionados de un lote de 21 dosímetros, de acuerdo con el procedimiento de selección establecido en el Laboratorio de Dosimetría del IFUNAM, el cual se describe a continuación.

Nuestro interés es conocer la variación en la respuesta de los dosímetros al ser irradiados, por lo que repetimos el mismo procedimiento (horneado – irradiación<sup>§</sup> – lectura) al menos tres veces, obteniendo los datos de las lecturas de los dosímetros irradiados en cada caso y determinando, en cada repetición, el factor de corrección individual  $C_{ij}$  de los DTL, dado por:

$$C_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^n R_{ij}}{nR_{ij}} \quad (\text{ec. XII. B.5})$$

Siendo  $R_{ij}$  la  $j$ -ésima lectura del  $i$ -ésimo dosímetro, y  $n$  es el número de dosímetros, de donde se obtiene el factor de corrección promedio  $C_i$ , para cada DTL [Horowitz 84]:

$$C_i = \frac{\sum_{j=1}^m C_{ij}}{m} \quad (\text{ec. XII. B.6})$$

---

<sup>§</sup> En este caso la irradiación se realizó con una fuente de <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y (ubicada en el Laboratorio de Dosimetría del IFUNAM), durante 2 minutos bajo una geometría fija (soporte de lucita).

m es el número de veces que se irradió y leyó cada uno de los dosímetros con el propósito de su caracterización. La desviación estándar  $S$  de cualquier dosímetro del lote y la desviación estándar para el lote  $S_{lote}$ , se muestran a continuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^n (C_i - C_{ij})^2}{n(m-1)}} \quad (\text{ec. XII. B.7a})$$

$$S_{lote} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - 1)^2}{n}} \quad (\text{ec. XII. B.7b})$$

$S_{lote}$  es una medida de la precisión con la que se puede trabajar con el lote de dosímetros caracterizados, de esta manera se pueden agrupar los dosímetros con respuestas similares ante una dosis dada, y se pueden eliminar aquellos cuya diferencia en su respuesta individual respecto del valor promedio sea mayor que una desviación estándar:  $\pm S_{lote}$ .

Para los 9 dosímetros elegidos se obtuvieron valores de  $S_{m\acute{a}x} = \pm 1.0 \%$  y  $S_{lote} = \pm 2.0 \%$ . Esto nos permite trabajar con una uniformidad en la respuesta mejor que el  $\pm 2.0 \%$ .  $S_{m\acute{a}x}$  se refiere a la desviación estándar máxima del grupo de los 9 dosímetros elegidos.

En lo siguiente, cada valor obtenido de la respuesta se multiplicó por el factor de corrección promedio correspondiente para cada dosímetro ( $C_i$ ), permitiendo corregir por el efecto de sensibilidad individual.

### XII. B. c *Calibración de los DTL*

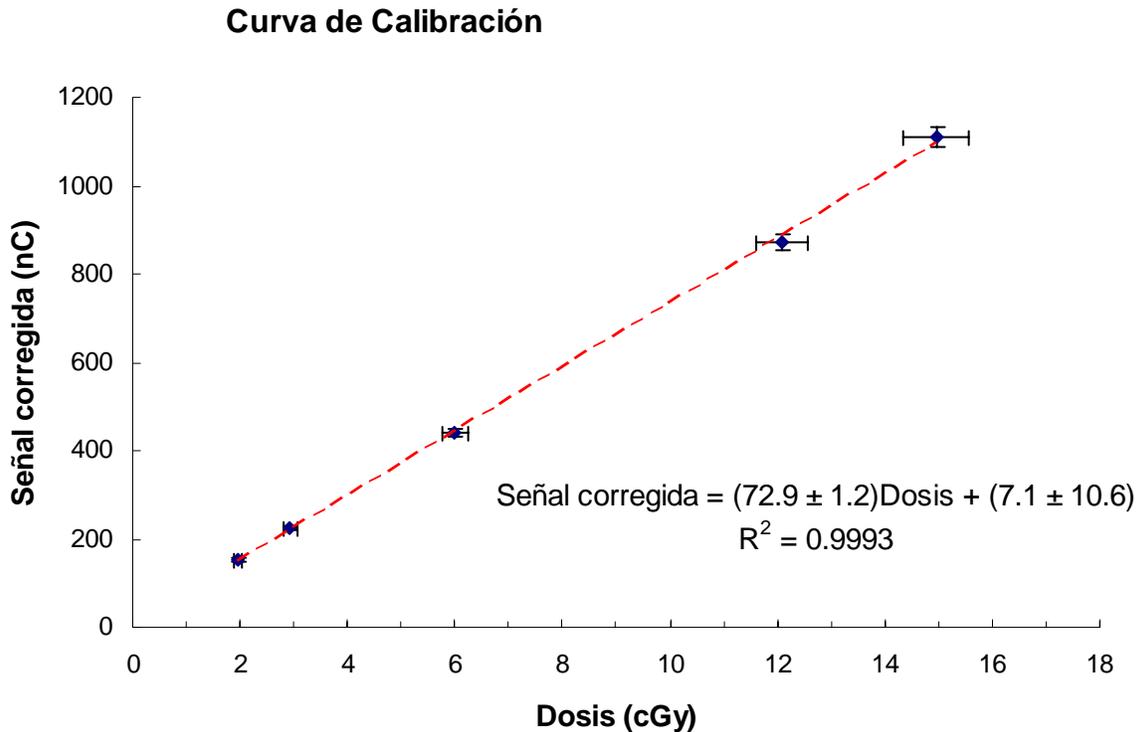
Empleando DTL podemos conocer la dosis impartida por un haz de radiación cualquiera; para ello es necesario que conozcamos primero la respuesta de los dosímetros al exponerse, a diferentes dosis, a un haz de radiación calibrado.

Los DTL fueron calibrados en un intervalo de dosis de 2 cGy a 15 cGy, para lo cual se usó una fuente de  $^{60}\text{Co}$  calibrada, con una rapidez de dosis de  $3.7 \times 10^{-5} \pm 4\%$  cGy/s (en marzo del 2007). Los tiempos de irradiación y las respuestas obtenidas se muestran en la tabla XII. B.8. La incertidumbre en la respuesta está dada por  $S_{lote} = \pm 2.0 \%$  (ecuación XII. B.7a). La curva de calibración correspondiente se muestra en la Gráfica XII. B.9.

# de DTL	Dosis requerida (cGy)	Tiempo efectivo (hh:mm)	Dosis DTL (cGy $\pm$ 4 %)	Señal corregida (nC $\pm$ 2%)
16	2	14 h 41 min	1.96	153.0
20	3	22 h 3min	2.94	224.0
19	6	45 h 5 min	6.01	442.6
12	12	90 h 45 min	12.09	870.7
10	15	112 h 16 min	14.95	1110.6

**Tabla XII. B.8:** La “Dosis DTL” fue calculada a partir de la tasa de dosis de dicha fuente, al mes de marzo del 2007 ( $0.037 \pm 4\% \text{ mrad/s} = 2.2 \times 10^{-3} \pm 4\% \text{ cGy/min} = 0.133 \pm 4\% \text{ cGy/h}$ ) y el tiempo efectivo (tiempo que se dejó irradiando cada dosímetro) tiene una incertidumbre despreciable de  $\pm 10 \text{ s}$ . La señal obtenida de los DTL fue multiplicada por el factor de corrección individual  $C_i$  (ec. XII. B.6) para obtener la “Señal corregida”.

En la gráfica XII. B.9 se presenta la Curva de Calibración obtenida con los datos de la Tabla XII. B.8.



**Gráfica XII. B.9:** Curva de calibración para DTL irradiados con rayos gamma emitidos por una fuente de  $^{60}\text{Co}$  calibrada, en un intervalo de dosis de 2 a 15 cGy. Se observa que se ajusta una línea recta a los puntos mostrados, la ecuación de la misma se obtuvo empleando el programa Origin Pro 7.0.

Al realizar una regresión lineal, se encuentra que la ecuación de la recta ajustada es la siguiente:

$$\text{Señal (nC)} = (72.9 \pm 1.2) \times \text{Dosis (cGy)} + (7.1 \pm 10.6) \quad (\text{ec. XII. B.10})$$

Sin embargo, para conocer la dosis depositada en los DTL, necesitamos conocer la relación inversa:

$$\text{Dosis (cGy)} = (13.71 \pm 0.22) \times \text{Señal (\mu C)} - (0.09 \pm 0.15) \quad (\text{ec. XII. B.11})$$

Las incertidumbres de la pendiente y ordenada al origen, de ambas ecuaciones, fueron determinadas por el ajuste lineal realizado con Origin Pro 7.0. Para la ec. XII. B.11 se consideraron las unidades de la señal en  $\mu\text{C}$ , en vez de nC.

#### *XII. B. d Factor de corrección por la energía del haz de irradiación*

Como se mencionó anteriormente, los DTL fueron calibrados empleando una fuente de  $^{60}\text{Co}$  con rayos  $\gamma$  con energía promedio de 1.25 MeV, por otro lado el haz de rayos X con el que se irradió a la línea celular, tiene una energía efectiva de 43.6 keV, y una energía máxima de 125 keV. Por ello es necesario utilizar un factor de corrección para la respuesta TL, que depende de la energía del haz incidente sobre el cristal TL. Este factor tiene un valor de: 0.70 [ver Anexo B].

#### *XII. B. e Dosis impartida por el haz de rayos X*

De esta manera, para determinar el valor de la dosis absorbida en agua impartida por el haz de rayos X, a partir de la señal termoluminiscente, se emplea la siguiente relación [ec. B. 7 del Anexo B]:

$$(D_w)_X = 0.70 \times S_X \left\{ \frac{D_w}{S} \right\}_{^{60}\text{Co}} \quad (\text{ec. XII. B.12})$$

Siendo  $\left\{ \frac{D_w}{S} \right\}_{^{60}\text{Co}} = 13.71 \pm 0.22$ , la pendiente de la relación mostrada en la ec. XII. B.11 y  $S_X$  la señal TL (en  $\mu\text{C}$ ) después de ser irradiados con el haz de rayos X y corregida por el factor de homogeneidad ( $C_i$ ). Sustituyendo el valor de la pendiente, obtenemos:

$$(D_w)_X = (9.60 \pm 1.6\%) \times S_X \quad (\text{ec. XII. B.13})$$

La cual es la ecuación que nos dará el valor de la dosis absorbida en agua, impartida por el haz de rayos X, dependiendo de la señal TL del cristal irradiado.

## **XII. C. Línea Celular Linfoblastoide**

Se utilizó una línea celular linfoblastoide, homóciga recesiva para el gen ATM denominada: **JHE** (- / -) /**AT11LA**/ (nomenclatura internacional).

Esta línea se obtuvo de los linfocitos B de un paciente que sufría AT. La línea celular fue donada al laboratorio por el Dr. Richard Gatti (Centro Médico de UCLA, EUA).

### *XII. C. a: Cultivo de las líneas celulares.*

Equipo empleado: *Campana de Flujo Laminar Nuair Clase II tipo A/B3. Incubadora con corriente de CO<sub>2</sub> VWR Scientific Modelo 2400. Centrifuga Beckman. Microscopio invertido Olympus CK2*

Las líneas celulares se encuentran congeladas dentro de crioviales sumergidos en nitrógeno líquido. Al descongelarlas (dentro de la campana de flujo), se colocan las células en botellas de cultivo que contienen 10 ml de medio de cultivo<sup>h</sup> y se guardan dentro de la incubadora (a una temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>), observando su crecimiento cada 24 h.

Las células continuarán dividiéndose y con ello multiplicando su número, por lo que después de observar que su estado es adecuado (células viables)<sup>i</sup>, se realiza un conteo celular, un día antes del experimento, para así tomar las porciones correspondientes de células que serán irradiadas y de aquellas que serán congeladas nuevamente (para evitar que se extinga el tipo de línea celular), además de considerar una proporción igual para las células que servirán como control de nuestro experimento.

Se cultivaron alrededor de 800 000 células en 1.5 ml de medio de cultivo completo, dentro de cada pozo de cajas estériles (Costar), identificando en cada pozo a las células control (NO irradiadas) y a las células a irradiar. Después de 24 h, se toman las células de cada pozo y se colocan en tubos cónicos de polipropileno de 1.5 ml (Eppendorf), con 200 µl de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma), en donde será más fácil su transporte e irradiación.

---

<sup>h</sup> El medio de cultivo “completo” para el crecimiento de las células se constituye de: 87% de medio RPMI-1640 (Sigma), 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco-Invitrogen), 1% de L-glutamina (Sigma) 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma) y 1% de penicilina/estreptomina (Gibco-Invitrogen) [Anexo C].

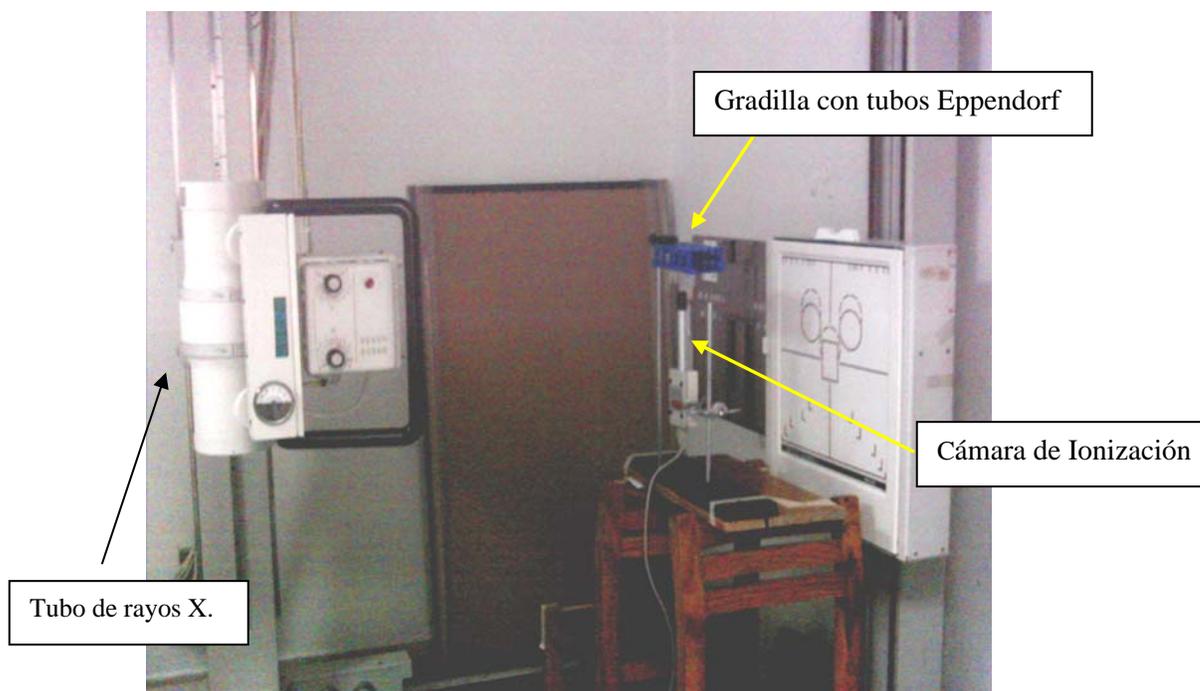
<sup>i</sup> Por células viables, se entiende que al observarse con el microscopio, presentan una apariencia esférica, y con un brillo intenso en la membrana (membrana refringente).

### XII. C. b: Condiciones de irradiación

Como se mencionó anteriormente: la irradiación de las líneas celulares se realizó con un equipo de rayos X de radiodiagnóstico marca Philips modelo “Diagnost 15” del INCan. Las condiciones de operación del tubo al irradiar a las células, se muestran en la siguiente tabla:

Tasa de Dosis	Alta	Baja
Número de disparos	2	6
Tamaño del campo	15 x 15 (cm x cm)	15 x 17 (cm x cm)
Distancia fuente (foco) – CI	95 ± 1 cm	165 ± 1 cm
Voltaje de operación del tubo de rayos – X (kVp).	125 kV	
Carga de operación del tubo	500 mAs	
Tiempo de exposición	4.235 segundos	

**Tabla XII. C.1:** El voltaje de operación, la carga del tubo y el tiempo de exposición fueron determinados desde la consola del equipo de rayos X. La CI se empleó en cada irradiación, sólo como referencia para verificar que se impartiera la exposición requerida (según Tabla XII. A.14) a la distancia establecida.



**Figura XII. C.2.** Imagen de la irradiación de células (dentro de los tubos Eppendorf) con rayos X.

La dosis impartida por el haz de rayos X a las líneas celulares, se determinó empleando dosímetros termoluminiscentes (DTL). El cálculo de la dosis se mostrará posteriormente.

### *XII. C. c: Evaluación del efecto citostático y genotóxico de la RI*

Se evaluaron biomarcadores de citotoxicidad y daño al ADN utilizando la técnica de MN [Fenech 2000], [Gutiérrez y Hall 02]. Para evaluar el efecto citostático de la RI se determinó el Índice de División Nuclear (IDN) [Fenech 2000], que se calculó analizando 200 células (m) y la frecuencia de las células mononucleadas (CMN), binucleadas (CBN) y polinucleadas (CPN), utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{CMN} + 2 (\text{CBN}) + 3 (\text{CPN})] / m$$

Para la evaluación del efecto genotóxico de la RI, se analizó la frecuencia de MN en un total de 1000 CBN por laminilla [Fenech y Crott 02], contando bajo el microscopio óptico (Olympus, modelo BH2).

A las 24 horas de iniciado el cultivo y después de la exposición a los rayos X, se agregó a cada cultivo celular, una concentración final (3 µl por cada 1 ml de medio completo) de Citocalasina – B (Cyt – B) de una solución stock de 2 mg/ml en Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). Las células fueron cosechadas a las 48 horas de iniciado el cultivo (esto es 24 horas después de la irradiación). Por centrifugación (a 1200 rpm por 10 minutos) se separaron del medio de cultivo y fueron fijadas con metanol/ácido acético glacial (Merk) (3:1). Las células fijadas se colocaron en un portaobjetos humedecido previamente con agua fría, y se colorearon con la tinción Giemsa (Merck), después del secado, se observaron bajo el microscopio (100X) para la evaluación de las células y conteo de MN.

### *XII. C. d: Análisis Estadístico*

- 1.- Todos los experimentos fueron realizados cuatro veces en pruebas independientes.
- 2.- Para la evaluación de los datos se utilizó la estadística (prueba t – Student y ANOVA, con Tukey al 95%) del programa OriginPro versión 7.0, para determinar la diferencia de medias entre el grupo control y el grupo irradiado de la línea celular.
- 3.- Se consideraron valores de \*p<0.05 (significativo) y \*\*p<0.01 (altamente significativo).

## CAPÍTULO XIII. RESULTADOS

### XIII. A.- Resultados DTL

Inicialmente mostraremos el valor, determinado con DTL, de la dosis impartida por el haz de rayos X. Posteriormente, se mostrará la frecuencia de micronúcleos inducida en la línea celular irradiada, bajo las condiciones establecidas y se comparará el daño producido con la fuente de partículas beta  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  a valores similares de dosis.

#### *XIII. A. a: Dosis impartida por rayos X, medida con dosímetros termoluminiscentes (DTL)*

Una vez irradiados los DTL, se trasladaron al Laboratorio de Dosimetría del IFUNAM, para realizar la lectura de la señal al día siguiente (como lo indica el protocolo), empleando la ecuación XII. B. 13 calcularemos la dosis en agua recibida por los cristales; los datos obtenidos para cada tasa de dosis se muestran en las siguientes tablas:

# de DTL	Señal TL corregida ( $\pm 2\%$ ) $\mu\text{C}$	Dosis ( $\pm 3.6\%$ ) cGy
10	1.094	10.5
7	1.093	10.5
12	1.100	10.6
18	1.159	11.1
4	1.156	11.1

**Tabla XIII. A.1a:** DTL irradiados a una tasa de dosis BAJA.

# de DTL	Señal TL corregida ( $\pm 2\%$ ) $\mu\text{C}$	Dosis ( $\pm 3.6\%$ ) cGy
16	1.114	10.7
20	1.137	10.9
2	1.142	11.0
19	1.102	10.6

**Tabla XIII. A.1b:** DTL irradiados a una tasa de dosis ALTA.

Se realizó una lectura de fondo de los DTL, obteniendo en promedio:  $(70 \pm 4) \times 10^{-5} \mu\text{C}$ , lo cual es despreciable con respecto de la lectura de cada dosímetro.

En la siguiente tabla se muestra la dosis promedio (CI) en agua (calculada con la ec. XII. A.11) empleando la cámara de ionización, así como la dosis promedio (DTL) en agua, medida con los DTL, para cada valor de tasa de dosis.

Tasa de dosis	Dosis promedio (CI) en agua (cGy)	Incertidumbre de Dosis (CI) (%)	Dosis promedio (DTL) en agua (cGy)	Incertidumbre de Dosis (DTL) (%)
BAJA	11.1	3.4	10.76	3.6
ALTA	10.9	1.0	10.79	3.6

**Tabla XIII. A.2:** Dosis promedio en agua, empleando los datos de la CI al momento de la irradiación y los valores obtenidos para la dosis DTL de las tablas XIII. A.1a y A.1.b.

La tasa de dosis promedio se determinó, para cada caso (alta y baja), empleando el tiempo total de exposición dado por la consola de operación del tubo de rayos X y la dosis promedio medida con los DTL:

Tasa de Dosis	Tiempo total de los disparos (s)	Dosis promedio en agua ( $\pm 3.6\%$ ) cGy	Tasa de Dosis promedio ( $\pm 3.6\%$ ) cGy/s
BAJA	25.410	10.76	0.42
ALTA	8.470	10.79	1.27

**Tabla XIII. A.3:** Tasa de dosis promedio (en agua) a partir del valor de dosis promedio en agua determinado por los DTL y el tiempo total de los disparos.

Como era de esperarse, la tasa de dosis alta es 3 veces mayor que la tasa de dosis baja.

De los datos mostrados en las tablas anteriores, observamos que ambos valores de dosis en agua y tasa de dosis, medidos tanto con los DTL como con la CI son consistentes, por lo que podemos tener confianza al determinar la dosis impartida en agua por el haz de rayos X, a partir de medir la exposición con la CI.

En promedio, el valor de la dosis calculado con los datos de la CI es mayor en un 4 % (aproximadamente) que el valor de la dosis promedio determinada con los DTL.

### XIII. B.- Resultados de la irradiación de LCL

Para cada valor de tasa de dosis, se realizaron 4 réplicas del experimento, a fin de obtener una estadística adecuada en la determinación de la frecuencia de micronúcleos.

#### XIII. B. a Dosis y Tasa de Dosis calculada con la CI, impartida a las células

La CI se utilizó en cada réplica para garantizar que no hubiera variaciones considerables en la exposición (y por lo tanto en la dosis absorbida) al realizar cada disparo de rayos X, además de que así conoceríamos el valor de la dosis impartida en el momento de las irradiaciones, ya que en esta ocasión no se ocuparían DTL.

Los valores promedio de la dosis total impartida (calculada con la ec. XII. A.11) y la tasa de dosis ( $\dot{D}$ ), se muestran en la Tabla XIII. B.1.

Tasa de Dosis	Dosis total en agua (cGy)	Tasa de Dosis ( $\dot{D}$ ) (cGy/s)	DE % de Dosis y $\dot{D}$
BAJA	11.2	0.44	1.1
ALTA	10.9	1.29	1.7

**Tabla XIII. B.1:** Valores medidos de la dosis total y tasa de dosis impartida a las líneas celulares al momento de irradiarlas. Se muestra la desviación estándar porcentual (DE %) en cada caso. El tubo fue operado a 125 kVp y 500 mAs.

Considerando la diferencia mostrada (en la sección XIII. A) entre la dosis calculada con la CI y la dosis estimada con DTL, podemos asegurar que las células recibieron un promedio de dosis total en agua de  $11 \pm 4$  % cGy, por el haz de rayos X, para ambos valores de tasa de dosis. En la Figura XIII. B.2 se muestran ejemplos de las células irradiadas.



**Figura XIII. B.2:** Imágenes de células binucleadas con micronúcleo dentro de la membrana celular. Obtenidas después de ser irradiadas con rayos X de 125 kVp a una dosis de 11 cGy.

### XIII. B. b: Índice de División Nuclear (IDN)

Las células irradiadas (IRRAD) y las no irradiadas (CTRL, llamadas también “control”), se trasladaron de regreso al Laboratorio de Genómica y Toxicología Ambiental (IIB – UNAM) y se colocaron en 1.5 ml de medio de cultivo con 4.5 µl de citocalasina – B (como lo indica el protocolo) y se cosecharon 24 horas después de la irradiación. Al día siguiente, se realizó la fijación en las laminillas y tinción de las mismas para el conteo de micronúcleos y del IDN (índice de división nuclear). Los resultados de este último se muestran en la Tabla XIII. B.3.

Tasa de dosis	IRRAD						CTRL					
	I	II	III	IV	Prom	DE	I	II	III	IV	Prom	DE
<b>BAJA</b>	1.6	1.7	1.8	1.8	1.75	0.09	1.7	1.8	1.7	1.8	1.74	0.05
<b>ALTA</b>	1.6	1.7	1.6	1.8	1.64	0.09	1.6	1.4	1.7	1.8	1.69	0.10

**Tabla XIII. B.3:** Se muestran los valores del IDN, su promedio y desviación estándar (DE). Los números romanos indican la repetición realizada.

Ni para las células irradiadas (IRRAD), ni para el control (CTRL), existe diferencia estadística entre los valores promedio del IDN (columna “Prom”) para baja y alta tasa de dosis. El promedio del IDN de las células irradiadas y del control es de  $1.69 \pm 0.07$  y  $1.72 \pm 0.04$ , respectivamente. Estadísticamente (prueba t de Student) no se encuentra una diferencia significativa entre estos valores (IRRAD y CTRL), esto indica que la irradiación con rayos X no afectó la cinética de la línea celular.

### XIII. B. c: Frecuencia de Micronúcleos

Los micronúcleos se contabilizaron en un total de 1000 células binucleadas, para cada una de las repeticiones (I – IV). Los datos obtenidos se muestran en la tabla XIII. B.4.

Tasa de Dosis	IRRAD						CTRL					
	I	II	III	IV	Prom	DE	I	II	III	IV	Prom	DE
<b>BAJA</b>	102	80	64	88	83.5	15.9	66	39	24	19	37.0	21.1
<b>ALTA</b>	174	140	88	110	128.0	37.3	75	66	24	19	46.0	28.6

**Tabla XIII. B. 4:** Valores del número de micronúcleos (# de MN) en células control y células irradiadas (IRRAD), para dos valores distintos de tasa de dosis. Se determinó el promedio (Prom) y la desviación estándar (DE) en cada caso.

La incertidumbre del conteo de MN se estimó mediante la desviación estándar de los datos obtenidos para cada repetición. En todas las repeticiones, se presenta un menor número de MN en las células irradiadas a una baja tasa de dosis que a un valor mayor de tasa de dosis.

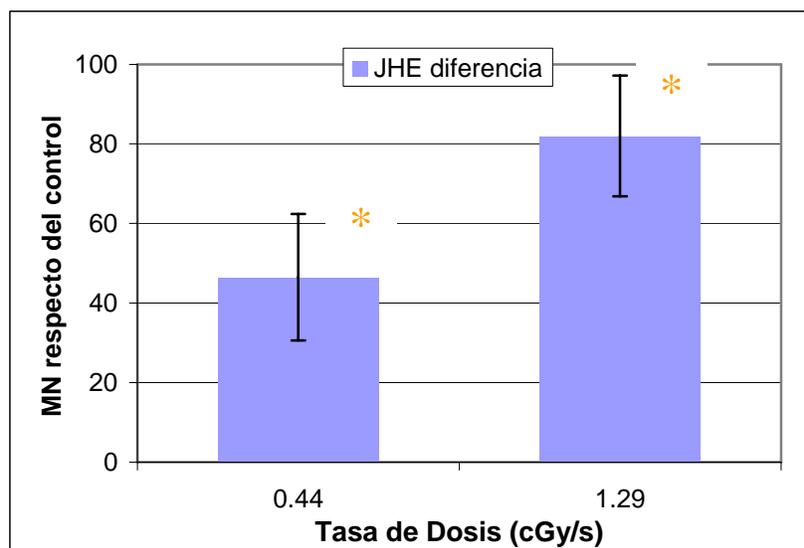
Se observa que en las repeticiones III y IV, el número de MN en las células control se redujo aproximadamente de 1/3 a 1/2 veces los valores contados en I y II, esto refleja la variabilidad y sensibilidad en la línea celular empleada, por lo que es recomendable obtener la diferencia en la inducción de MN.

De esta manera, haciendo la diferencia del número de micronúcleos de las células irradiadas con respecto a su control (# de MN irradiado – # de MN control), tenemos:

Tasa de Dosis	I	II	III	IV	Prom	± DE	Valor P
<b>BAJA</b>	36	41	40	69	46.5	15.2	0.014
<b>ALTA</b>	99	74	64	91	82.0	15.9	0.015

**Tabla XIII. B. 5:** Datos obtenidos después de restar la lectura de micronúcleos presentes en células NO irradiadas de los MN presentes en células irradiadas. Se muestra el promedio (Prom), la desviación estándar (DE) para cada tasa de dosis, y el valor P después de aplicar la prueba t de Student.

Se observa que se obtienen en promedio, cerca de 82 y 46 (± 15) micronúcleos adicionales al irradiar con 11 cGy a una tasa de dosis alta y baja, respectivamente. Además, la inducción de micronúcleos es significativa (valor P < 0.05) en ambos casos. Como se muestra en la gráfica XIII. B.6.



**Gráfica XIII. B. 6:** Incremento en el # de MN por encima del valor basal para cada tasa de dosis. Las incertidumbres se obtuvieron a partir de la desviación estándar de los valores obtenidos al restar el número de MN de las células sin irradiar (\* valor significativo  $p < 0.05$ ).

De no existir inducción de MN en las células irradiadas, el valor de la columna sería cero. Realizando un análisis de varianza (ANOVA), se observó una diferencia significativa ( $p = 0.02 < 0.05$ ) en la magnitud del daño provocado por cada tasa de dosis.

## **CAPÍTULO XIV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Los mecanismos relacionados con efectos adversos a la salud después de exponerse a bajas dosis de radiación ionizante no han sido del todo comprendidos. La RI empleada en métodos de diagnóstico, cuenta con suficiente energía para modificar la estructura molecular, incluso al ADN, de las células irradiadas. Algunos de estos cambios moleculares son tan complejos que difícilmente los mecanismos de defensa podrían repararlos correctamente. Sin embargo, las evidencias indican que sólo un pequeño porcentaje de tales cambios podrían resultar en algún cáncer o en algún otro daño a la salud [BEIR VII 05].

La RI afecta, principalmente, al ciclo celular en los puntos de control G1/S y G2/M, la situación más crítica se ha observado en la fase G1 ya que la célula irradiada no se detiene a reparar antes de una nueva replicación, si se da un proceso de reparación, pero no es adecuado, puede dar por resultado una replicación defectuosa en el ADN y como consecuencia inestabilidad cromosómica [Kastan y col., 1992] y [Morgan y Kastan, 1997].

En este trabajo se evaluó la magnitud del daño producido por bajas dosis de rayos X de diagnóstico (125 kVp), utilizando un modelo biológico sensible a la radiación, adecuado para evaluar los efectos genotóxicos de la RI a bajas dosis. En particular, se determinó la inducción de MN en la línea celular linfoblastoide JHE (- / -) (homóciga recesiva del gen ATM), al ser irradiada a baja dosis. Además, se observó si existe diferencia al irradiar con dos tasas de dosis distintas.

Los resultados obtenidos para proliferación celular (determinada con el IDN) mostraron que la exposición a rayos X de 125 kVp, no tuvo efectos citotóxicos ni modificó la cinética celular de la línea celular linfoblastoide irradiada. Sin embargo, se muestra un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de MN de las células irradiadas, con respecto de las no irradiadas, a una dosis total de ~11 cGy. Obteniendo además, un mayor número de MN al emplear una tasa de dosis mayor que otra tres veces inferior.

### **XIV. A.- Efecto de la Tasa de Dosis en la inducción de MN con radiación de baja LET**

Los trabajos realizados respecto del efecto de la tasa de dosis de la radiación de baja LET sobre algún sistema biológico, muestran diversos resultados. La mayoría de los trabajos previos emplea dosis totales mayores que 100 cGy [UNSCEAR 2000], mostrando en general, que el efecto depende de la dosis total impartida y que el daño producido por radiación de baja LET disminuye al reducir la tasa de dosis, como consecuencia de la reparación del daño subletal. También existen resultados en los que no se presenta una diferencia considerable en el efecto producido al variar la tasa de dosis, e incluso, en algunos estudios, se llega a presentar un efecto inverso, esto es, que a menor tasa de dosis, se produce mayor daño.

La información disponible que considera la inducción de micronúcleos y los efectos de la tasa de dosis por fotones muestra también resultados diversos, aunque escasos. Se presentan experimentos en donde al variar la tasa de dosis y con dosis menores que 1 Gy (de rayos X de 250 kVp), no se produce ningún efecto en la inducción de MN, [Vral y col., 92], sin embargo, al irradiar a dosis totales mayores que 2 Gy, se presenta un menor número de MN a una baja tasa de dosis (0.67 cGy/min) que a un valor 10 veces mayor. Un efecto similar se presenta en otro estudio al emplear tasas de dosis con una diferencia mayor (de 0.21 a 300 cGy/min) [Bhat y Rao 03] empleando una fuente de  $^{60}\text{Co}$ . Al irradiar linfocitos humanos a 4 Gy, con rayos gamma de una fuente de  $^{60}\text{Co}$ , se observó una inducción de MN 1.7 veces mayor, con 0.3 cGy/min, que con 0.15 cGy/min [Boreham y col., 2000].

En todos los casos anteriores se emplearon linfocitos humanos de donadores sanos, las diferencias significativas en la frecuencia de MN, se obtuvieron a partir de dosis totales mayores que 1 Gy.

El hecho de que a una tasa de dosis mayor se presente un mayor número de MN no es concluyente, ya que también se ha observado un efecto inverso de tasa de dosis: al irradiar ratones con células implantadas de carcinoma de Lewis, empleando dosis de 2 a 6 Gy por un haz de rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$ , y a tasas de dosis de 34 y 100 cGy/min [Widel y col., 98], se obtuvo un mayor número de MN (3.25 veces más) con la tasa de dosis más baja; se comenta que las diferencias en el tiempo de exposición no son significativas, por lo que esta diferencia no puede explicarse por algún cambio en la cinética celular, sin embargo, probablemente el tipo de línea celular provocó que hubiera una mayor muerte celular a alta tasa de dosis provocando que el conteo de MN resultara menor que con una baja tasa de dosis.

La formación de MN depende también de la capacidad de reparación del daño al ADN. Algunos de los autores coinciden en que, para dosis menores que 2 Gy, la reparación del daño subletal resulta eficiente, sin embargo, a dosis mayores, los efectos producidos son difíciles de modificar ya que se presenta un daño más severo, influyendo en la magnitud del daño tanto la dosis total impartida como la rapidez con la que ésta se deposita (tasa de dosis) [Vral y col., 92], [Boreham y col., 2000] y [Bhat y Rao 03], además del tipo de células irradiadas.

Empleando células de pacientes con AT (AT1OS/T – n, AT2KY/T y AT5KY/T, homocigas recesivas), irradiadas a baja tasa de dosis (0.03 cGy/min por rayos  $\gamma$  con energía de 660 keV emitidos por una fuente de  $^{137}\text{Cs}$ .) y a alta tasa de dosis (2 Gy/min por rayos X de 150 kVp), con dosis totales de 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 Gy, encontraron que la frecuencia de MN no tuvo una diferencia significativa a las tasas de dosis empleadas [Nakamura y col., 06].

Nuestros resultados muestran que con una alta tasa de dosis se encuentra una mayor inducción de micronúcleos comparada con la irradiación a un valor menor de tasa de dosis, (para 11 cGy de rayos X de diagnóstico) en una línea celular homociga recesiva de AT, empleando en ambos casos el mismo haz de radiación.

#### XIV. B.- Inducción de MN con partículas beta y con rayos X de diagnóstico

Los datos obtenidos, hasta ahora, de la inducción de MN en la línea celular JHE --, al irradiarlas con partículas beta y rayos X se muestran en la Tabla XIV. 1.

Referencia	Fuente de Radiación	Dosis (cGy)	Tasa de Dosis (cGy/min)	LCL (JHE -/-)	MN en 1000 CBN	Incremento en MN	RR/cGy
Mata 05	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$	12	---	CTRL	95	$25 \pm 6$	$0.11 \pm 0.01$
			0.3	IRRAD	120		
Moscoso 06	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$	12	---	CTRL	67	$21 \pm 6$	$0.11 \pm 0.01$
			0.7	IRRAD	88		
Presente trabajo	rayos X	11	---	CTRL	37	$46 \pm 15$	$0.20 \pm 0.02$
			26	IRRAD	83		
			---	CTRL	46	$82 \pm 16$	$0.25 \pm 0.02$
			77	IRRAD	128		

**Tabla XIV.1:** Valores de MN inducidos en la línea celular linfoblastoide JHE --, por partículas beta de una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  y por rayos X de diagnóstico (125 kVp), a bajas dosis y distintos valores de tasas de dosis. La irradiación con el haz de rayos X tiene una duración del orden de segundos, mientras que con la fuente de partículas beta es de minutos, para poder comparar las magnitudes de la tasa de dosis de cada haz de radiación (y con otras referencias bibliográficas) se emplearon las unidades de cGy/min. RR/cGy se refiere a la Respuesta Relativa por unidad de dosis.

En todos los casos, los MN se contaron en un total de 1000 células binucleadas (CBN). Se aprecia una diferencia (2 a 4 veces mayor) en el incremento de MN por rayos X respecto de los obtenidos al irradiar con partículas beta. Para rayos X, la respuesta relativa por unidad de dosis aumenta conforme se incrementa la tasa de dosis, mientras que para partículas beta no hay un cambio notable.

Se han realizado trabajos similares en donde se compara el efecto en líneas celulares producido por rayos X y por partículas beta (en particular de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ ); aunque éstos han sido escasos, en la mayoría de los estudios se encuentra que los rayos X inducen un mayor daño, incrementando la producción de dicéntricos [Schmid y col., 06], aberraciones cromosómicas [Oliveira y col., 01], micronúcleos [Mill y col., 96], e incluso analizando daño celular empleando simulaciones Monte Carlo [Brenner y col., 98].

En un artículo se menciona que hay una frecuencia del doble de MN inducidos con rayos X de 250 kVp ( $RBE_M = 2.0 \pm 1.3$ ) en linfocitos humanos, comparado con los obtenidos por partículas beta de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ . Las dosis empleadas fueron de 0.3 a 1.8 Gy, [Mill y col., 96].

En el presente trabajo se encontró que la respuesta relativa por unidad de dosis aumenta de 0.11 a 0.20 y 0.25 al incrementar la tasa de dosis, 100 y 200 veces respectivamente, mostrando que la tasa de dosis por radiación de baja LET influye de manera considerable en la línea celular JHE --/.

Otro factor importante en el daño celular es el espectro de energía del haz empleado como se muestra en un estudio realizado con distintas calidades de haces de rayos X y rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$  se evaluó la inducción de MN al irradiar linfocitos humanos a dosis de 0.1 a 5 Gy con la misma tasa, encontrando que a menor energía (kVp) la LET se incrementa y el RBE (Eficacia Biológica Relativa, considerando la frecuencia de MN) se incrementa de forma proporcional con respecto de la LET empleada [Verhaegen y Reniers 94].

Los efectos encontrados en el presente trabajo respecto de un mayor número de MN inducido por rayos X que por partículas beta, nos muestran que las condiciones de irradiación influyen en el daño biológico producido en las células radio-sensibles. Uno de los principales factores que pueden contribuir a que el efecto sea de mayor (o menor) magnitud es la tasa de dosis. Aún a bajas dosis, este factor debe ser tomado en consideración.

El modelo biológico empleado en este trabajo nos permitió tener una mayor sensibilidad en la respuesta al irradiar con valores bajos de dosis, sin embargo, de ninguna manera pueden extrapolarse los resultados obtenidos, creyendo que efectos similares se encontrarán en líneas celulares de otro tipo.

La razón por la que el factor de ponderación por radiación  $w_R^j$  se considera igual a 1 para radiación de baja LET (fotones y electrones de cualquier energía, excepto electrones Auger de 0.3 – 2.1 eV [ICRP 60]), es más por un acuerdo del Comité<sup>k</sup>, que por un proceso científico riguroso, aunque hasta ahora no hay estudios concluyentes que contradigan dicha

---

<sup>j</sup> El factor de ponderación  $w_R$  depende de la LET y está determinado por la ICRP como una manera de representar RBE a bajas dosis y baja tasa de dosis para efectos biológicos relevantes a la protección radiológica, tales como la inducción del cáncer y efectos hereditarios. Se emplea en protección radiológica para reducir a las radiaciones de una efectividad biológica distinta a una escala común. [Hall 2000]

<sup>k</sup> Basado en que los rayos X ionizan y excitan indirectamente a la materia: a través de los electrones primarios, expulsados de sus órbitas alrededor de los átomos que la constituyen (efecto fotoeléctrico y Compton), estos electrones a su vez, producen una ionización mayor que la radiación primaria. De manera semejante las partículas beta, ionizan y excitan directamente al interaccionar mediante los campos electromagnéticos con los electrones y átomos del material irradiado. Aunque pueden existir fluctuaciones en los valores de  $w_R$ , para propósitos prácticos se toma el valor de 1 para ambos tipos de partículas.

decisión. Sin embargo, se sabe que a baja energía, haces de baja LET no cuentan con la misma efectividad biológica [Schmid y col., 06].

Los parámetros de irradiación con rayos X (125 kVp), fueron elegidos de tal forma que se pudiera obtener una dosis similar a la empleada con partículas beta [Mata 05 y Moscoso 06], además de considerar las dimensiones de la sala, para variar la distancia fuente – blanco, a fin de impartir diferentes valores de tasa de dosis. El uso de estos parámetros no es común al tomar placas radiográficas.

Los valores de dosis equivalente empleados en radiodiagnóstico van de 3 a 25 mSv, para mamografía y tomografía computarizada, respectivamente; (para haces de baja LET podemos considerar  $1 \text{ mGy} = 1 \text{ mSv}$  (mili – Sievert)), las dosis empleadas en el presente trabajo (~11 cGy), son superiores a las empleadas en este tipo de estudios, sin embargo en ocasiones las pruebas no se realizan solamente una vez además de que los efectos de la radiación son acumulativos. Además el tipo de línea celular empleada no corresponde a pacientes sanos, ya que al contar con los dos alelos mutados, el síndrome se hace evidente y los efectos presentes, contrario a como podría ocurrir con células heterócigas o normales al gen ATM.

La información proporcionada en este trabajo respecto a la inducción de MN por partículas beta y por rayos X debe ser verificada y complementada con estudios posteriores, en donde se incluyan otras líneas celulares del gen ATM (heterócigas y silvestres), e incluso células de pacientes sanos, además de verificar si los efectos de la tasa de dosis, a dosis totales bajas, resultan relevantes.

## CAPÍTULO XV. CONCLUSIONES

### XV.- Conclusiones

En el presente trabajo, se irradió la línea celular JHE  $-/-$  (heteróciga al gen ATM) con un haz de rayos X de radiodiagnóstico operado a 125 kVp (energía efectiva de 43.6 keV), impartiendo bajas dosis (11 cGy) y dos valores distintos de tasas de dosis (0.44 y 1.29 cGy/s, esto es 26 y 77 cGy/min). Se plantean las siguientes conclusiones:

- Al irradiar con rayos X, se presentó un incremento en la frecuencia de MN del doble y una respuesta relativa por unidad de dosis, mayor en un 25% al irradiar con un valor de tasa de dosis  $\sim 3$  veces mayor que otro.
- Con una dosis en agua de  $11 \pm 4\%$  cGy de rayos X, no se presentó ninguna alteración considerable en la proliferación celular de JHE  $-/-$ , observado al medir el índice de división celular (IDN).
- Se puede apreciar (Tabla XIV. 1) que la cantidad de micronúcleos inducidos por partículas beta de una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  con una dosis total de 12 cGy y tasas de dosis de 0.3 y 0.7 cGy/min, es 2 veces menor que los MN encontrados al irradiar con rayos X, con una dosis total en agua de  $11 \pm 4\%$  cGy y tasas de dosis de 26 y 77 cGy/min. Un resultado similar se obtiene al considerar la respuesta relativa por unidad de dosis.
- La tasa de dosis debe ser tomada en consideración al irradiar a la línea celular JHE  $-/-$ , aún a bajas dosis de rayos X y partículas beta.

## CAPÍTULO XV. CONCLUSIONES

### XV.- Conclusiones

En el presente trabajo, se irradió la línea celular JHE  $-/-$  (heteróciga al gen ATM) con un haz de rayos X de radiodiagnóstico operado a 125 kVp (energía efectiva de 43.6 keV), impartiendo bajas dosis (11 cGy) y dos valores distintos de tasas de dosis (0.44 y 1.29 cGy/s, esto es 26 y 77 cGy/min). Se plantean las siguientes conclusiones:

- Al irradiar con rayos X, se presentó un incremento en la frecuencia de MN del doble y una respuesta relativa por unidad de dosis, mayor en un 25% al irradiar con un valor de tasa de dosis  $\sim 3$  veces mayor que otro.
- Con una dosis en agua de  $11 \pm 4\%$  cGy de rayos X, no se presentó ninguna alteración considerable en la proliferación celular de JHE  $-/-$ , observado al medir el índice de división celular (IDN).
- Se puede apreciar (Tabla XIV. 1) que la cantidad de micronúcleos inducidos por partículas beta de una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  con una dosis total de 12 cGy y tasas de dosis de 0.3 y 0.7 cGy/min, es 2 veces menor que los MN encontrados al irradiar con rayos X, con una dosis total en agua de  $11 \pm 4\%$  cGy y tasas de dosis de 26 y 77 cGy/min. Un resultado similar se obtiene al considerar la respuesta relativa por unidad de dosis.
- La tasa de dosis debe ser tomada en consideración al irradiar a la línea celular JHE  $-/-$ , aún a bajas dosis de rayos X y partículas beta.

## ANEXO A.- CARACTERÍSTICAS Y PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL TUBO DE RAYOS X.

Antes de irradiar las líneas celulares, se determinaron las condiciones de operación del equipo de rayos X para irradiar a las células. Principalmente se determinó el kVp (kilo voltaje pico) y el mAs (carga producida por el tubo, definida como: *Corriente x Tiempo*), los cuales son parámetros que se manipulan directamente desde la consola de operación del tubo. Se pretendió obtener la máxima exposición, por lo que los parámetros finales fueron de los más altos posibles (sin llegar a los límites propios del equipo).

Con una cámara de ionización (marca Unfors), se determinó si el voltaje y tiempo de exposición indicado desde la consola del equipo correspondía a lo que medía la CI. Manteniendo una distancia ánodo – CI de  $87 \pm 1$  cm y tamaño de campo de  $10 \times 10$  cm<sup>2</sup>, se encontraron resultados para 60, 100 y 125 kVp; mostrando que el promedio del voltaje medido (con la CI) siempre fue menor (4%) respecto del valor esperado (consola del equipo). Para el tiempo de exposición, se tuvo una diferencia menor que el 1.0% del valor medido respecto del esperado, manejando 100 mAs para 60 y 100 kVp y 60, 100 y 300 mAs para 125 kVp. En ambos casos, la reproducibilidad de las medidas (por triplicado) es aceptable, ya que tanto para el tiempo como para el voltaje, la desviación estándar de las medidas realizadas con la CI Unfors no fue mayor al 0.2%.

Una de las razones por la que se decidió usar la cámara Unfors es porque proporciona diversa información (voltaje, exposición, tiempo de disparo, tasa de exposición) al realizar un disparo, sin embargo la CI Unfors no es adecuada para medir la exposición de haces de ortovoltaje (100 – 300 kVp), para ello se empleó la CI RADCAL. La diferencia entre los valores de la exposición con 125 kVp y 60, 100 y 300 mAs, medidos por ambas cámaras, no fue mayor que el 1%. Se encontró que la exposición aumenta proporcionalmente con respecto de la carga (mAs) empleada, para un kilovoltaje fijo (125 kV). El máximo valor de carga permitido por el equipo de rayos X es de 750 mAs, para evitar que el equipo se sobrecaliente y obtener la mayor dosis posible se empleó una carga de 500 mAs.

De manera semejante se midió la tasa de exposición, la CI Unfors nos da directamente este valor. Para la CI RADCAL, es necesario dividir el valor de la exposición determinado por la cámara entre el tiempo de disparo mostrado en la consola de operación del tubo de rayos X, así se pudo verificar también la veracidad del valor del tiempo mostrado en la consola. Los datos obtenidos, con un kV fijo de 125 y variando la carga a 60, 100 y 300 mAs se muestran en la Tabla A.1.

Los datos encontrados determinan que la diferencia porcentual es menor que el 1% entre el tiempo medido con la cámara UNFORS y el tiempo que marca la consola, de manera semejante para la tasa de dosis se presenta una diferencia porcentual menor que el 4% entre ambas cámaras de ionización. Con estos datos, podemos considerar a la lectura del tiempo en la consola del tubo de operación de rayos X como confiable, bajo una certeza del 1%.

CI	Carga mAs	Exposición (X) (mR)	± DE de X	Tiempo de Exposición (ms)	± DE de tiempo de X	Tasa de Exposición (X/t) (R/min)	± DE de X/t
<b>UNFORS</b>	60	883.27	1.10	157.8	0.12	335.20	0.10
	100	1467.0	2.8	283.25	0.07	310.4	0.6
	300	4420.5	1.5	1195.0	0.10	221.80	0.00
<b>RADCAL</b>	60	914.0	0.0	157	---	349.3	2.22
	100	1518.7	0.0	284	---	320.8	1.13
	300	4516.7	0.1	1205	---	224.9	0.19

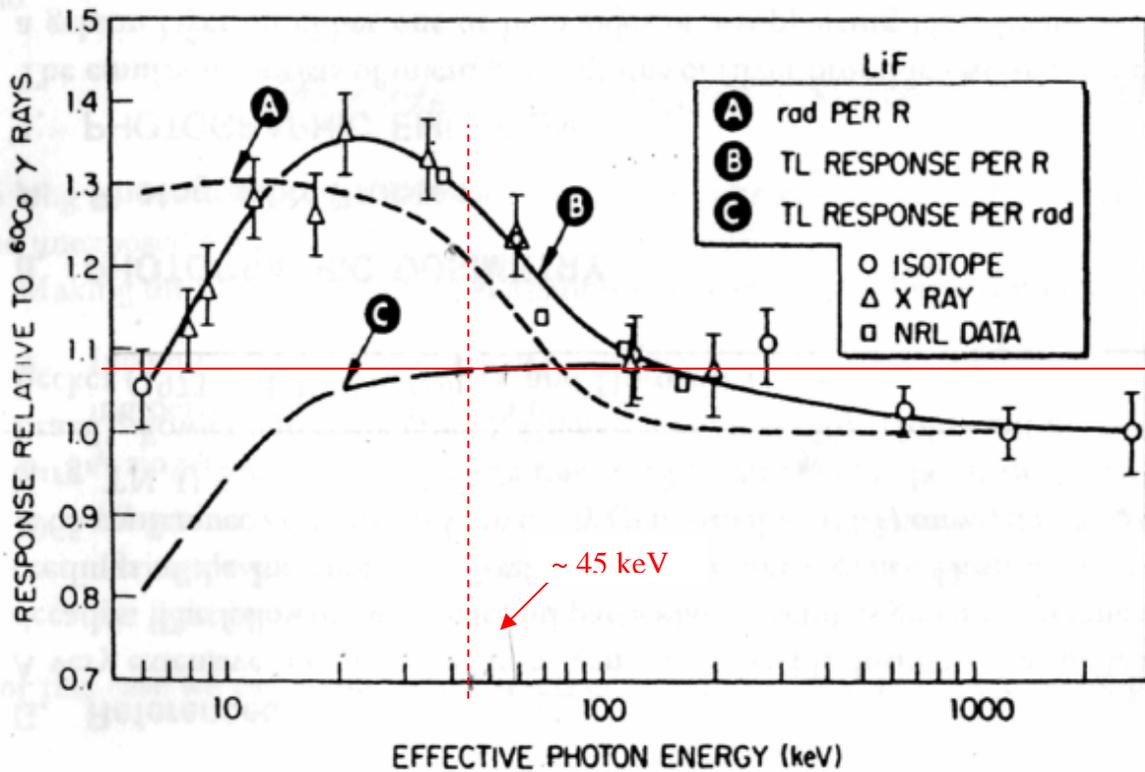
**Tabla A.1:** Exposición, tiempo y tasa de exposición obtenidos con ambas cámaras de ionización, así como la desviación estándar ( $\pm DE$ ) correspondiente a cada valor, realizando 3 repeticiones a un valor fijo de 125 kV y cargas de 60, 100 y 300 mAs.

Se aprecia que la tasa de exposición disminuye conforme aumenta el valor de la carga producida (mAs). Al realizar disparos a 300 mAs, se encontró que el equipo marcaba un tiempo de enfriamiento de 90 segundos, antes de ese tiempo no se pueden realizar disparos.

Finalmente, las condiciones de operación del equipo quedaron en emplear un voltaje de 125 kVp y una carga de 500 mAs, considerando las limitaciones del equipo (150 kV y 700 mAs), a fin de no forzar su funcionamiento habitual (100 kV y 60 mAs, valores comúnmente empleados). Las condiciones finales de operación del tubo de rayos X, así como la distancia fuente – objeto y el tamaño del campo, se muestran en el Capítulo XII de esta tesis.

## ANEXO B: CÁLCULO DEL FACTOR DE CORRECCIÓN POR LA ENERGÍA DEL HAZ DE IRRADIACIÓN DE LOS DTL.

La respuesta TL del LiF varía dependiendo de la energía del haz de irradiación. Para determinar la relación en la respuesta por unidad de dosis, al irradiar con gammas de una fuente de  $^{60}\text{Co}$ , y fotones de distinta energía emplearemos la figura B.1 [Attix 86]:



**Figura B.1:** La curva C representa la respuesta TL por rad en LiF (1 rad = 1 cGy) para fotones con energías de 6 a 2800 keV, dividida entre la misma cantidad medida para rayos  $\gamma$  y de  $^{60}\text{Co}$ . [Figura 14.9 de Attix 86].

Observamos que para una energía de 45 keV (aprox.), el valor de la respuesta TL por unidad de dosis en LiF, en la curva C, es de  $\sim 1.07$  respecto de la respuesta a un haz de  $^{60}\text{Co}$ , esto es, que la respuesta TL para rayos X de  $\sim 45$  keV es 7 % mayor que la estimada con radiación gamma de  $^{60}\text{Co}$ , en la región de respuesta lineal del DTL y para la dosis absorbida en LiF. Esto se puede expresar de la siguiente manera:

$$\frac{\left(\frac{S}{D_{LiF}}\right)_X}{\left(\frac{S}{D_{LiF}}\right)^{60Co}} = 1.07 \quad (\text{ec. B.2}) \quad \text{Donde: } \left(\frac{S}{D_{LiF}}\right)_X \text{ y } \left(\frac{S}{D_{LiF}}\right)^{60Co} \text{ son las respuestas a}$$

una energía "X" y a rayos gamma de  $^{60}\text{Co}$ , por unidad de dosis en LiF ( $D_{LiF}$ ), respectivamente.

(En la ecuación (ec. B.2) "X" se refiere a la energía efectiva del haz de rayos X, y tiene un valor de 43.6 keV, " $^{60}\text{Co}$ " = 1.25 MeV)

Si consideramos equilibrio de partícula cargada (EPC) y una misma fluencia de fotones irradiando al cristal de LiF y el material W, se satisface la siguiente relación:

$$\frac{D_{LiF}^{EPC}}{D_W} = \frac{\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_{LiF}}{\left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_W} = \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_W^{LiF} \quad (\text{ec. B.3})$$

Entre las dosis ( $D_{LiF}$  y  $D_W$ ) y el coeficiente másico de absorción de energía, para un haz de fotones de cierta energía que incide en el material W, si despejamos  $D_{LiF}$  y se sustituye en (ec. B.2) tenemos:

$$1.07 = \frac{S_X \left[ D_W \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_W^{LiF} \right]^{60Co}}{S^{60Co} \left[ D_W \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_W^{LiF} \right]_X} \quad (\text{ec. B.4})$$

Considerando W = agua, entonces  $(D_W)_X$  nos dará la dosis en agua al irradiar con el haz de rayos X. Despejando este término de la ecuación anterior y acomodando:

$$(D_W)_X = \frac{S_X}{1.07} \left\{ \frac{D_W}{S} \right\}^{60Co} \frac{\left[ \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_W^{LiF} \right]^{60Co}}{\left[ \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}\right)_W^{LiF} \right]_X} \quad (\text{ec. B.5})$$

Sustituyendo los valores correspondientes para los coeficientes másicos de absorción de energía y considerando  $\left\{ \frac{D_W}{S} \right\}^{60Co}$  como el inverso de la pendiente de la curva de calibración de los TLD (el valor se muestra en la ec. XII. B.11) obtenida para rayos  $\gamma$  de  $^{60}\text{Co}$ :

$$(D_w)_x = \frac{S_x}{1.07} \left\{ \frac{D_w}{S} \right\}_{^{60}\text{Co}} \left[ \frac{0.0247/0.02965}{0.0622/0.0558} \right] \quad (\text{ec. B.6})$$

y considerando:

$$\left[ \frac{0.0247/0.02965}{0.0622/0.0558} = \frac{0.8331}{1.1147} = 0.7474 \right] \quad (\text{ec. B.6a})$$

Obtenemos así:

$$(D_w)_x = 0.70 \times S_x \left\{ \frac{D_w}{S} \right\}_{^{60}\text{Co}} \quad (\text{ec. B.7})$$

En esta expresión se relaciona la señal de los DTL ( $S_x$ ) al ser irradiados por el haz de rayos X y la dosis en agua impartida  $(D_w)_x$ .

En los cálculos anteriores, todos los valores de  $\left( \frac{\mu_{en}}{\rho} \right)$  fueron obtenidos de la página del NIST: <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>

## ANEXO C: PROTOCOLO PARA TRABAJAR CON LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES

### PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO

El material a esterilizar, se coloca en la campana del cuarto de cultivo, ésta debe estar con luz UV 15 min, y luego al dejar todo el material se deja con flujo laminar y luz UV por 90 min. Obligatorio usar guantes y flujo laminar permanente. Antes de empezar a trabajar, limpiar el área con alcohol al 70%.

### Inactivación de Suero Fetal Bovino (SFB)

- El SFB tal como viene del proveedor (Gibson) se utiliza para preparar el RPMI – normal.
- Para preparar el Medio RPMI – completo, se debe **inactivar**, lo cual se realiza en baño maría a 56 °C por 30 min, (se inactivan algunas proteínas que no son necesarias para el crecimiento de la mayoría de las líneas celulares).
- Luego se guarda a – 70 °C.

### Preparación de L-glutamina

Se resuspende con 10 ml de agua estéril filtrándose con papel con poro de 20 µm, se agita suavemente porque presenta presión y la tapa puede salir volando.

### RPMI-COMPLETO

Para preparar 300 ml necesitamos:

- a. Antibioticos (1%).....3 ml
  - b. Aminoácidos no esenciales (1%)...3 ml
  - c. L- glutamina (1%).....3 ml
  - d. **SFB Inactivo** (10%) .....30 ml
  - e. RPMI-1640 (cpb).....261 ml
- i. El orden en que se enlistaron es el orden en el que se deben de agregar los reactivos (todos deben estar a temperatura de 37 °C, en baño María, aproximadamente 15 min).

- ii. Se utiliza primero AB (antibióticos y antimicóticos) para evitar contaminación.
- iii. a, b y c se agregan con punta azul (1 ml), SFB con pipeta serológica de 10 ml y RPMI-1640 con pipeta de 25 ml.
- iv. Se rotula indicando fecha de fabricación, se sella con Parafilm, para evitar contaminación, en caso de que no se use, se refrigera.

### Observaciones:

- *Medio RPMI – 1640*: es medio simple (no forma burbujas al agitarlo porque no tiene SFB el cual es rico en proteínas). Debe estar a un pH de 7 – 7.2, es decir neutro (color anaranjado). Cuando se vuelve rojo = básico, amarillo = ácido. Se utiliza para realizar los lavados, conteo de células, para resuspender y leer en la cámara de Neubauer, y también al momento de irradiar
- *Medio RPMI – completo*: se utiliza para realizar los cultivos, sembrados, etc.

### Conservación de Reactivos:

*Congelador:*

SFB, L-glut., AB.

*Refrigerador:*

RPMI-1640, AA no esenciales, Piruvato de Na (sólo para líneas celulares de Linfocitos B).

### Descongelación de la línea celular:

Se descongeló la línea celular JHE (-/-) de la siguiente manera:

1. En la campana de flujo laminar se ponen tubos cónicos de 15 ml con 10 ml de Medio RPMI-Completo (rotulados y uno por línea).
2. Se sacan los crioviales del tanque, canastilla y caña correspondiente a la línea celular. Se encuentran en nitrógeno líquido a -170°C.
3. Llevarlos a la campana y comenzar a descongelar agitándolos hasta observar

líquido en la parte superior del criovial (no es recomendable descongelar todo de una sola vez, para que al momento de trabajar se termine de descongelar).

4. El criovial antes de abrirlo, se debe descontaminar con alcohol al 70 %, se enjuaga la tapa del criovial y se abre despacio, la tapa se desecha.
5. Se toma un poco de medio de cultivo y se agrega al criovial se trata de homogenizar con el fin de terminar de descongelar.
6. Se pasan las células al tubo cónico con el resto del medio completamente.
7. Llevar a centrifugar a 1200 RPM durante 10 min, se observa el botón de células (si el botón es grande se recomienda lavar dos veces y si es pequeño una sola vez).
8. Se extrae el sobrenadante con la pipeta Pasteur conectada al vacío, dejando un poco de medio (menos de 1 ml).
9. Con una punta azul homogenizar lentamente evitando hacer burbujas y estresar a las células.
10. Se pasan las células a las botellas de cultivo ya rotuladas y con medio de cultivo, se humedece la parte de atrás para que cuando se observen al microscopio invertido no se peguen y corramos el riesgo de perder células), se agrega todo el resuspendido celular.
11. Se homogeniza lentamente y se tapa bien.
12. Se les observa en el microscopio invertido, para dar un diagnóstico de las células.
13. Se deja en la estufa a 37 °C y una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub>. La tapa se deja entreabierta para asegurar que exista intercambio de gas.
14. Se dejan 24 h para su crecimiento.

#### ***Notas del crecimiento celular:***

- Para revisar como están creciendo las células se cierran bien las botellas de cultivo antes de sacarlas de la estufa y evitar contaminación, se agitan suavemente y se dejan recostadas (evitando que el medio tenga contacto con la tapa y sea un foco de contaminación).
- Se dice que están creciendo bien cuando la membrana citoplasmática de las células esta

lisa y se observan redondas, la membrana se ve refringente, cuando tienen forma de estrella indican que están estresadas.

- Si están muy aglomeradas, se hace una alícuota para que las demás células puedan crecer.
- Las células para crecer emiten factores de crecimiento que se engarzan unas con otras formando cúmulos.
- Cuando las células no pueden crecer fácilmente o demoran su crecimiento normal, se debe evitar moverlas para no estresarlas y se colocan en una posición inclinada, es decir, que se acumulen en una esquina de la botella para que entren en mayor contacto y los factores de crecimiento que emiten les facilite un mejor desarrollo.

## EXPERIMENTO CON RADIACIÓN IONIZANTE:

### Previo al experimento:

- Ponerse guantes, apagar la luz UV de la campana de flujo laminar y tapar todo el material.
- Traer las botellas o pozos de cultivo de la estufa bien cerrados evitando agitarlas, pues las células deben estar en el fondo para que al extraer el sobrenadante del medio no corramos el riesgo de succionar células con el vacío.

### Procedimiento del Primer Día:

- 1.- Poner 6 ml de Fycoll (Histopaque), escurriendo por un costado, en cada tubo cónico de 15 ml, previamente rotulado con el nombre de la línea y si es control o irradiado.
- 2.- Se absorbe lo más posible del sobrenadante de las botellas de cultivo dejando lo suficiente para no absorber células.
- 3.- Homogenizar lentamente sin hacer burbujas con pipetas Pasteur estériles.
- 4.- Con una pipeta de 1 ml se toman las células, se agregan al tubo cónico por el lado contrario al que se agregó el Fycoll; el primer ml debe ser agregado lo más lento posible para formar el gradiente (para esto es mejor inclinar el tubo cónico y agregar lentamente), las siguientes puestas pueden ser mas rápidas, no tardar mucho porque el Fycoll es tóxico para las células). El gradiente se observa de dos colores, el Fycoll es transparente y las células color durazno amarillento, quedando hasta arriba del tubo. Se agrega todo el contenido de células (las botellas sin células, se tapan y se llevan nuevamente a la estufa hasta que se utilicen en el resembrado).
- 5.- Centrifugar a 1200 rpm por 10 min, **sin freno** para evitar romper el gradiente revisando que los tubos de la centrífuga estén bien balanceados.
- 6.- Preparar tubos con 10 ml de Medio RPMI-1640, para realizar el lavado del botón celular.
- 7.- Del centrifugado se observa el anillo de las células (existen tres fases inferior transparente

que es el Fycoll con células muertas, anillo denso con células vivas y superior medio sin células, esto se forma por densidad).

8.- Con pipeta de 1 ml (punta azul) extraer el anillo con sumo cuidado, preferentemente de un solo paso, para lo cual inclinamos el tubo, inmediatamente se agrega a los tubos con Medio RPMI-1640.

9.- Llevar a centrifugar a 1200 rpm por 10 min (con freno para bajar todas las células).

10.- Se preparan tubos Eppendorf rotulados, agregando 80 µl de azul de tripano y 900 µl de medio RPMI-1640, finalmente se agregarán 20 µl del resuspendido celular (20+80+900 = 1000:20, dilución 50:1).

11.- Al acabar el centrifugado de los tubos, con pipeta Pasteur se extrae el sobrenadante lo más posible sin absorber células.

12.- Agregar 1 ml de Medio RPMI-1640 con una pipeta serológica a cada tubo que quedó con el botón para resuspender.

13.- Homogenizar con la misma pipeta dos a tres veces sin hacer burbujas y evitando estresar a las células (eliminando los grumos), de este resuspendido se toman alícuotas para contar, sembrar, resembrar y congelar células.

### Conteo de células

1. Tomar 20 µl del resuspendido y se agrega a un tubo Eppendorf, (previo rotulado), que contiene azul de tripano y medio RPMI-1640 (tardar lo menos posible ya que el azul de tripano es tóxico).
2. Vortexear 20 s.
3. Tomar con la misma pipeta 20 µl del Eppendorf y cargar la cámara de Neubauer.
4. Llevar a contar los 4 cuadrantes en el microscopio óptico a 20 X (16 cuadros en total, verdes refringentes vivas y azules muertas).
5. Según el número de células totales se decidirá cuantas se resiembran y cuantas se congelan, para esto se determina el volumen a considerar en 1 ml de células. Al obtener el número de células necesarias a sembrar (para posterior irradiación), se reparte el sobrante en partes equitativas para el resembrado y congelación.

6. El número total de células (NTC por ml) se determinó mediante la siguiente fórmula [González 90]:

$$NTC \text{ (células/mL)} = \frac{(\# \text{ de células})}{4 \times 50} \times 10^4$$

Donde:

“# de células”: representa al número de células contadas en los cuatro cuadrantes. Los factores 4 y 50 se refieren al número de cuadrantes de la cámara de Neubauer y a la dilución realizada de la muestra celular en el medio RPMI-1640 (1000:20) respectivamente. El factor  $10^4$  se refiere al inverso del volumen de un cuadro de la cámara de Neubauer ( $0.1 \mu\text{l} = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$ ).

### Para Sembrar

- 1.- En un frasco multipozos o pozos sencillos se siembran las células para realizar el experimento, considerando células control e irradiadas.
- 2.- En cada pozo, agregar 1.5 ml de Medio RPMI-Completo (apenas se agrega se debe tapar para evitar contaminación).
- 3.- Con micropipeta se agregan las células de las líneas celulares (cantidad en  $\mu\text{l}$  determinadas por cálculo), homogenizando para que se distribuyan adecuadamente.
- 4.- Se tapa y se lleva a la estufa por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ .

### Resembrado

- 1.- Las botellas donde anteriormente se encontraban las células en crecimiento se ocupan para resembrarlas, agregando a cada botella 10 ml de Medio RPMI-Completo.
- 2.- Agregar la cantidad según cálculos para resembrado con una micropipeta sin tocar boquillas.
- 3.- Homogenizar muy lentamente sin hacer burbujas y llevar a estufa por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .

### Congelado

- 1.- Se realizan en crioviales los cuales deben

estar previamente rotulados (Nombre línea celular, estatus génico, cantidad de células, fecha y nombre del investigador).

2.- Se toma la cantidad según cálculos realizados del resuspendido de los tubos cónicos.

3.- Se abre el criovial y se agrega la cantidad de células, luego agregar 1 ml de SFB inactivado, se tapa y se agrega 50  $\mu\text{l}$  de DMSO (por cada 1 ml de SFB se agrega 50  $\mu\text{l}$  de DMSO, no exceder porque causa la muerte celular).

4.- Se tapa con mucho cuidado, y se agita de arriba a abajo suavemente y se lleva rápidamente al tanque el cual debe estar con el porta crioviales que se deja en la fase gaseosa por 24 h.

5.- Después de las 24 h se transfiere a su correspondiente canastilla (contacto directo con nitrógeno líquido).

## Procedimiento del Segundo Día

- 1.- Establecidos los parámetros y condiciones de irradiación, se marcan 2 tubos Eppendorf (control e irradiado).
- 2.- Con una pipeta de 1 ml se resuspenden las células de los pozos, tomando la mitad del resuspendido (1.5 ml + volumen de células agregadas) y se pone en su correspondiente Eppendorf (control e irradiado).
- 3.- Llevar a la microcentrifugadora durante 20 segundos.
- 4.- Se localiza el botón y se extrae el sobrenadante con una punta de 1 ml con cuidado de no llevarse células.
- 5.- Agregar 200 µl de RPMI-1640 para resuspender el botón, sin hacer burbujas. Así las células quedan listas para ser transportadas e irradiadas.
- 5a.- IRRADIACIÓN...
- 6.- Después de la irradiación se llevan de nuevo al laboratorio y se agregan 1.5 ml de Medio RPMI-completo a los pozos vacíos (es decir donde las células se sembraron desde el día anterior), así quedan listas para el nuevo sembrado después de la irradiación.
- 7.- Se agrega Citocalasina-B 4.5 µl (3 µl/ml Medio), a cada pozo.
- 8.- Con una pipeta amarilla de 200 µl se resuspenden las células y se pasan a sus respectivos pozos (que contienen medio y cit-B).
- 9.- Se llevan a la estufa bien tapados a 37°C a 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

## Procedimiento del Tercer Día

- 1.- Por cada pozo con células rotulamos un tubo de ensayo de vidrio y un **tubo Eppendorf**.
- 2.- Tener listo los medios a utilizar (Fijador<sup>a</sup>, y Etanol 70%).
- 3.- Dejar durante 30 min, 2 porta objetos (por

<sup>a</sup> Fijador: Metanol – Ácido Acético (3:1), para tener un volumen final de 160 ml, se agregan 120 ml de Metanol y 40 ml de ácido acético. Se prepara en la campana, primero el metanol se mide con una probeta y luego en un envase se le agrega el ácido con una pipeta.

- cada línea celular) en el refrigerador en un vaso con agua, tapados con papel aluminio.
- 4.- De los pozos se toman todas las células y se ponen en un tubo de vidrio, por el lado contrario al que se le agregaron las células se agregan 128 µl del fijador (por cada 1.5 ml), se torna de color amarillo por cambio de pH.
- 5.- Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos (sin freno).
- 6.- Extraer el sobrenadante y se deja el botón con poco fijador.
- 7.- Agregar 5 ml de fijador (se utiliza la pipeta gruesa de 5 ml, para evitar maltratar mucho las células) y se agita un poco (se hace despacio para que sea posible conservar la integridad de las células).
- 8.- Nuevamente se centrifuga a 1200 rpm por 10 min (dependiendo del tamaño del botón se vuelve a lavar)
- 9.- Se extrae el sobrenadante dejando 100 µl aproximadamente.
- 10.- Se resuspende y se gotea con una pipeta a los porta objetos que se dejan en una rejilla para que evaporen aprox. 1 h. (Recordar el orden de trabajo para no confundir al rotular).
- 11.- Una vez secos, se rotula por la parte esmerilada con lápiz: línea celular, tasa de dosis y fecha.

## Tinción

- 1.- Se realiza una coloración Giemsa, primero se agrega Eosina (rosa, tiñen zonas básicas) y después el azul de metileno (tiñe zonas ácidas).
- 2.- La lámina se toma con una pinza y se le pasa agitando por la Eosina por 15 s y luego al Azul de metileno por 15 s; inmediatamente se sumerge en agua para quitar el exceso de tinte y se deja secar.
- 3.- Se observa en el microscopio a 20X, si están muy teñidas se puede dejar en el agua, las células no se despegan pues ya están fijadas.

## REFERENCIAS

- [Amours y Jackson 02] Amours, D. and Jackson, S. 2002. *The MRE 11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **3**: 317 – 327.
- [Amundson y Chen 96] Amundson S. A., Chen d. J., 1996. *Inverse dose – rate effect for mutation induction by  $\gamma$  – rays in lymphoblasts*. Int. J. Radiat. Biol, Vol. **69**, No. 5, 555 – 563.
- [Angele y Hall 2000] Angele, S. and Hall, J. 2000. *The ATM gene and breast cancer: is it really a riskfactor?* Mutat. Res. **462**: 167 – 178.
- [Angele y col., 03] Angele, S. et al. 2003. *ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association whit breast cancer risk and clinical radiosensibility*. Cancer Res. **63**: 8717 – 8725.
- [Aprelikova y col., 99] Aprelikova, O. et al. 1999. *BRCA-associated growth arrest is RB-dependent*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**: 11866 – 11871.
- [Attix 86] Attix F.H., *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*, John Wiley& Sons, USA (1986).
- [Ávila 01] Ávila Rodríguez M.A., *Dosimetría en tratamientos de radiocirugia estereotáctica*. Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), UNAM, México D.F. (2001).
- [Bakkenist y Kastan 03] Bakkenist, C. and Kastan, M. 2003. *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimmer dissociation*. Nature **421**: 499 – 506.
- [Ball y Xiao 05] Ball, L. and Xiao, W. 2005. *Molecular basis of ataxia telangiectasia and related diseases*. Acta Pharmacol. Sinica. SK Canada **26**: 897 – 907.
- [Barlow y col., 97] Barlow, C. Liyanage, M. Moens, PB. Deng, CX. Ried, T. and Wynshaw-Boris, A. 1997. *Partial rescue of the prophase I defects of Atm-deficient mice by p53 and p21 null alleles*. Nat. Genet. **17**: 462-466.
- [Beamish y Lavin 94] Beamish, H. and Lavin, M. 1994. *Radiosensibility in ataxia telangiectasia: anomalies in radiation induced cell cycle delay*. Int. J. Radiat. Biol. **65**: 175 – 184.

- [BEIR VII 05] Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation. *BEIR VII: Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation*. National Academy Press. June 2005. Report in brief.
- [Bhat y Rao 03] Bhat, N. N., Rao B. S. *Dose rate effect on micronuclei induction in cytokinesis blocked human peripheral blood lymphocytes*. Radiation Protection Dosimetry Vol. **106**, No. 1, pp. 45 – 52 (2003).
- [Boder 85] Boder, E. 1985. *Ataxia-telangiectasia: an overview*. In: R. A. Gatti (ed.), *Ataxia-Telangiectasia: Genetics, Neuropathology and Immunology of a Degenerative Disease of Childhood*. New York. Alan R. Liss: 1 – 63.
- [Boreham y col., 2000] Boreham D. R., Dolling J. A., Maves S. R., Siwarungsun N., Mitchel R. E. *Dose – rate effects for apoptosis and micronucleus formation in gamma – irradiated human lymphocytes*. Radiat. Res. 2000. May; **153** (5 Pt. 1): 579 – 586.
- [Brandan y col., 03] Brandan, M. E. Díaz, R. y Ostrosky, P. 2003. *La radiación al servicio de la vida*. SEP, FCE, CONACYT, La ciencia desde México/99. 3a Ed. México D.F. 128 p.
- [Brenner y col., 98] Brenner D. J., Leu C. S., Beatty J. F., Shefer R. E. *Clinical relative biological effectiveness of low-energy x-rays emitted by miniature x-ray devices*. Phys. Med. Biol. 1999 Feb; **44** (2): 323 – 333.
- [Brenner y col., 03] Brenner, D. Doll, R. Goodhead, D. Hall, E. Little, J. Lubin, J. Preston, D. Preston, J. Puskin, J. Ron, E. Sachs, R. Samet, J. Setlow, R. and Zaider, M. 2003. *Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know*. Proc. Nat. Acad. Sci. **25**: 13761–13766.
- [Brenner y Elliston 04] Brenner, D. and Elliston, C. 2004. *Estimated radiation risks potentially associated with full-body CT screening*. Radiol. **232**: 735-738.
- [Bretsky y col., 03] Bretsky, P. Haiman, C. Gilad, S. Yahalom, J. Grossman, A. Paglin, S. Van Den Berg, D. Kolonel, L. Skaliter, R. and Henderson, B. 2003. *The relationship between twenty missense ATM variants and Breast Cancer Risk. The multiethnic Cohort*. Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent. **12**: 733 – 738.

- [Brooks y col., 90] Brooks A. L, Newton G. J, Shyr L. J, Seiler F. A, Scott B. R. *The combined effects of alpha particles and X rays on cell killing and micronuclei induction in lung epithelial cells.* Int. J. Radiat. Biol. 1990; **58** (5): 799 – 811.
- [Bushberg 02] Bushberg, J. T., *The Essential Physics of Medical Imaging*, Wolters Kluwer Health, USA (2002).
- [Cardis y col., 05] Cardis, E. Vrijheid, M. Blettner, M. Gilbert, E. Hakama, M. Hill, C. Howe, G. Kaldor, J. Muirhead, CR. Schubauer-Berigan, M. Yoshimura, T. et al. 2005. *Risk of cancer after low doses of ionizing radiation: retrospective cohort study in 15 countries.* BMJ. 331: 77-79.
- [Carson y col., 03] Carson, C. Schwartz, R. Stracker, T. Lilley, C. Lee, D. and Weitzman, M. 2003. *The MRE11 complex is requirement for ATM activation and the G(2)/M checkpoint.* EMBO. **22**: 6610 – 6620.
- [Carter 67] Carter, S. 1967. *Effects of cytochalasin on mammalian cells.* Nature **213**: 261 – 264.
- [Cleaver 68] Cleaver, J. 1968. *Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum.* Nature 218: 652-656.
- [Cohen y Simpson 83] Cohen, M. and Simpson, S. 1983. *The effect of bleomycin on DNA synthesis in ataxia telangiectasia lymphoid cells.* Environ. Mut. **4**: 27 – 36.
- [Cole y col., 81] Cole, R. J ., Taylor, N ., Cole, J ., and Arlett, C. F., 1981, *Short-term tests for transplacentally active carcinogens. 1.- Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts.* Mutation Research, **80**, 141 – 157.
- [Collins y col., 95] Collins, N. McManus, R. Wooster, R. Mangion, J. Seal, S. Lakhani, S. Ormiston, W. and Daly, P. 1995. *Consistent loss of the wild-type allele in breast cancers from a family linked to the BRCA2 gene on chromosome 13q12-13.* Oncogene **10**: 1673 – 1675.
- [Cortez y col., 99] Cortez D. Wang Y. and Qin S. 1999. *Requirement of ATM dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double strand breaks.* Science **286**: 1162 – 1166.

- [Cuncliffe y col., 75] Cuncliffe, P. Mann, J. and Cameron, A. 1975. *Radiosensitivity in ataxiatelangiectesia*. Br. J. Radiol. **48**: 374 – 376.
- [Digweed 03] Digweed, M. 2003. *Response to environmental carcinogens in DNA – repair deficient disorders*. Toxicol. **193**: 111 – 124.
- [Edwards 98] Edwards, A. *Communication to the UNSCEAR Secretariat* (1998).
- [Evans y col., 59] H. J. Evans, G. J. Neary and F. S. Williamson. *The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen. II. Chromosome damage: The production of micronuclei*. Int. J. Radiat. Biol. **1**, 216–229 (1959).
- [Fenech y Morley 86] Fenech, M. and Morley, A. 1986. *Cytokinesis block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo again and low dose X-irradiation*. Mutat. Res. **161**, 193 – 198 (1986).
- [Fenech 97] Fenech, M. 1997. *The advantages and disadvantages of the cytokinesis block micronucleus method*. Mutat. Res. **392**: 11 – 18.
- [Fenech 2000] Fenech, M. 2000. *The in vitro micronucleus technique*. Mutat. Res. **455**: 81 – 95.
- [Fenech y col.; 03] Fenech, M. Chang, W. Kirsch-Volders, M. Holland, N. Bonassi, S. and Zeiger, E. 2003. *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isoted human lymphocytes cultures*. Mutat. Res. **534**: 65 – 75.
- [Fenech y Crott 02] Fenech, M. and Crott, J. 2002. *Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds incident in folic acid deficient human lymphocytes evidence for breakage fusion bridge cycles in the cytokinesis block micronucleus assay*. Mutation Res. **504**: 131 – 136.
- [Ford y Lavin 81] Ford, M. and Lavin, M. 1981. *Ataxia telangiectasia: an anomaly in ADN replication after radiation*. Nucleic. Acid. Res. **9**: 1395 – 1404.

- [Futamura y col., 2000] Futamura, M. Arakawa, H. Matsuda, K. Katagiri, T. Saji, S. Miki, Y. and Nakamura, Y. 2000. *Potential role of BRCA2 in a mitotic checkpoint after phosphorylation by hBUBR1*. *Cancer Res.* **60**: 1531 – 1535.
- [Gatti y col., 91] Gatti, R. Boder, E. Vinters, R. and Sparkes, A. Norman, K. Large, K. 1991. *Ataxia telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis*. *Medic.* **70**: 99 – 117.
- [Gatti y col., 01] Gatti, R. et al. 2001. *The pathogenesis of ataxia telangiectasia, learning from Rosetta stone*. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 20: 87 – 108.
- [Geard y Chen 90] Geard C. R, Chen C. Y. *Micronuclei and clonogenicity following low- and high-dose-rate gamma irradiation of normal human fibroblasts*. *Radiat. Res.* 1990 Oct; **124** (1 Suppl): S 56 – 61.
- [Gilbert 01] Gilbert Ethel S., 2001. *Studies of workers exposed to low doses of radiation*. *Am. J. Epidemiol.* **153**, 319 – 322.
- [González 90] González, J. 1990. *Tecnología y métodos del laboratorio clínico*. Salvat Editores S.A. España. pp: 70-73.
- [Gumy y col., 04] Gumy, A. Pause, F. Wacker, P. and Sappino, A. 2004. *ATM gene and lymphoid malignancies*. *Leukemia* **18**: 238 – 242.
- [Gutiérrez y Hall 02] Gutiérrez, S. and Hall, J. 2002. *Use of the cytokinesis-block micronucleus assay to measure radiation-induced chromosome damage in lymphoblastoid cell lines*. *Mutat. Res.* **535**: 1 – 13.
- [Hall y Angèle 99] Hall J., Angèle S. *Radiation, DNA damage and cancer*. *Mol Med Today*. 1999 Apr; **5** (4): 157 – 164. Review.
- [Hall y col., 99] Hall E. J., Schiff P. B., Hanks G. E., Brenner D. J., Russo J., Chen J., Sawant S. G., Pandita T. K. *A preliminary report: frequency of A-T heterozygotes among prostate cancer patients with severe late responses to radiation therapy*. *Cancer J. Sci. Am.* 1998 Nov –Dec; **4** (6): 385 – 389.

- [Hall 2000] Hall E. J., *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, USA (2000).
- [Heddle y Carrano 77] J. A. Heddle and A. Carrano. *The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma irradiation; evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments*. *Mutat. Res.* **44**, 63 – 69 (1977).
- [Heddle y col., 83] Heddle, J. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. MacGregorr, G. New ell, and Salamone, M. 1983. *The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*. *Mutat. Res.* **123**: 61 – 118.
- [Horowitz 84] Horowitz Y. S., *Thermoluminescence and thermoluminescent dosimetry*. CRC Press. Vol.: I – III (1984).
- [ICRP 60] International Commission on Radiological Protection. *Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*. Publication 60. Pergamon Press, Oxford, 1991.
- [ICRU 98] International Commission on Radiation Units, *Fundamentals quantities and units for ionizing radiation*, ICRU Report 60, (1998).
- [Iturbe 02] Iturbe-Hermann F., Gamboa-de Buen I, *Protección Radiológica para el uso de fuentes abiertas y selladas, curso para personal ocupacionalmente expuesto*, Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM (2002).
- [Jagetia y Ganapathi 94] Jagetia, G. C., and Ganapathi, N. G. 1994. *Radiation-induced micronucleus formation in mouse bone marrow after low dose exposure*. *Mutat. Res.* **304**: 235 – 242.
- [Jenssen y Ramel 76] Jenssen, D., and Ramel, C. 1976. *Dose response at low doses of X irradiation and MMS on the induction of micronuclei in mouse erythroblasts*. *Mutat. Res.* **41**: 311 – 320.
- [Kastan y col. 91] Kastan, M. Oneykwere, O. Sidransky, D. Vogelstein, B. and Craig, R. 1991. *Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage*. *Cancer Res.* **51**: 6304 – 6311.

- [Kastan y col., 1992] Kastan, M. Zhan, Q. El-Deiry, W. Carrier, F. Jacks, T. Walsh, W. Plunkett, B. Vogelstein, B. and Fornace, A. 1992. *Mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia*. *Cell* **71**: 587 – 597.
- [Kastan y Lim 2000] Kastan, M. and Lim, D. 2000. *The many substrates and functions of ATM*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 179 – 186.
- [Kelsey y col., 91] Kelsey, K.T., A. Memisoglu, D. Frenkel et al. *Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis*. *Mutat. Res.* **263**: 197 – 201 (1991).
- [Khanna y col., 95] Khanna, K. Beamish, H. Yan, J. Hobson, K. Williams, R. Duna, I. and Lavin, M. 1995. *Nature of GS/1 cell cycle checkpoint defect in ataxia telangiectasia*. *Oncogene* **11**: 609 – 618.
- [Khanna y col., 98] Khanna, K. Keating, K. Kozlov, S. Scott, S. Gatei, M. Hobson, K. Taya, Y. Gabrielli, B. Chan, D. Lees-Miller, S. and Lavin, M. 1998. *ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction*. *Nat. Genet.* **20**: 398 – 400.
- [Khanna 2000] Khanna, K. 2000. *Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate*. *J. Nat. Cancer Inst.* **92**: 795 – 802.
- [Ko 96] Ko L, P. 1996. *p53: Puzzle and paradigm*. *Genes dev.* **10**: 1054 – 1072.
- [König y Kiefer 88] König F., y Kiefer J. 1988. *Lack of dose – rate effect for mutation induction by  $\gamma$  – rays in human TK<sub>6</sub> cells*. *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, No. 6, 891 – 897.
- [Kreder y col., 04] N. Castro Kreder, R. ten Cate, H. M. Rodermond, C. Van Bree, N. A. P. Franken, M. Z. Zdzienicka, y J. Haveman., *Cellular response to pulsed low-dose rate irradiation in X-ray sensitive Hamster mutant cell lines*. *J. Radiat. Res.*, **45**, 385 – 391.
- [Kurz y Lees-Miller 04] Kurz, E. and Lees-Miller, S. 2004. *DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways*. *DNA Repair (Amst)* **3**: 889 – 900.
- [Laake y col., 2000] Laake, K. Jansen, L. Hahnemann, J. Brondum, K. et al. 2000. *Characterization of ATM mutations in 41 Nordic Families whit Ataxia Telangiectasia*. *Hum. Mutat.* **16**: 232 – 246.

- [Lavin 99] Lavin, M. 1999. *The product of the gene mutated in ataxia telangiectasia*. Int. J. Biochem. Cell Biol. **31**: 735 – 740.
- [Lavin y Khanna 99] Lavin, M. and Khanna, K. 1999. *Review: ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia*. Int. J. Radiat. Biol. **75**: 1201 – 1214.
- [Lavin y col., 04] Lavin, M. Scott, S. Gueven. N. Kozlov, S. Peng C. and Chen. P. 2004. *Functional consequences of sequence alterations in the ATM*. DNA Repair **3**: 1197 – 1205.
- [Lee y Paul 04] Lee, J. and Paul, T. 2004. *Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex*. Science **304**: 93 – 96.
- [Lefton – Greif y col., 2000] Lefton-Greif, M. Crawford, T. Winkelstein, J. Loughlin, G. Koerner, C. Zahurak, M. and Lederman, H. 2000. *Oropharyngeal dysphagia and aspiration in patients with ataxia telangiectasia*. J. Ped **136**: 225 – 231.
- [Li y col., 99] Li, S. Chen, P. Subramanian, T. Chinnadurai, G. Tomlinson, G. Osborne, C. Sharp, Z. and Lee, W. 1999. *Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage*. J. Biol. Chem. **274**: 11334 – 11338.
- [Littlefield y col., 89] L. G. Littlefield, A. M. Sayer and E. L. Frome. *Comparisons of dose–response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes*. Mutagenesis **4**, 265–270 (1989).
- [Livingston y col., 93] Livingston G. K., Foster A. E., Elson H. R. *Effect of in vivo exposure to iodine – 131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes*. J Toxicol Environ Health. 1993; **40** (2 – 3): 367 – 375.
- [Lloyd y col., 92] Lloyd, D. Edwards, C. Leonard, A. Deknudt, G. Verschaeve, L. Natarajan, A. Darroudi, F. Obe, G. Palitti, F. Anzarella, C. and Twan, E. 1992. *Chromosomal aberrations in human lymphocytes induced in vitro by very low dose of X-rays*. Int. J. Radiat. Biol. **61**: 335 – 343.
- [Magae y col., 03] Magae J., Hoshi Y., Furukawa C., Kawakami Y., Ogata H. *Quantitative analysis of biological responses to ionizing radiation, including dose, irradiation time, and dose rate*. Radiat. Res. 2003 Nov; **160** (5): 543 – 548.

- [Mata 05] Mata López D. *Susceptibilidad genética a dosis bajas de radiación ionizante*. Proyecto de tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, (2005).
- [Matsuoka y Huang 98] Matsuoka, S. and Huang M. 1998. *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase*. *Science* **282**: 1893 – 1897.
- [McKinnon 04] McKinnon P. 2004. *ATM and ataxia telangiectasia*. *EMBO. Reports*, **5**: 772-776.
- [Meyn 95] Meyn, M. 1995. *Ataxia Telangiectasia and cellular responses to DNA damage*. *Cancer Res.* **55**: 5591 – 6001.
- [Mill y col., 96] Mill A. J., Wells J., Hall S. C., Butler A. *Micronucleus induction in human lymphocytes: comparative effects of X rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry*. *Radiat Res.* 1996 May; **145** (5): 575 – 585.
- [Mitchell y col., 79] Mitchell, J. B., Bedford, J. S., and Bailey, S. M. 1979, *Dose rate effects on the cell cycle and survival of S3 HeLa and V79 cells*. *Radiat Res.* **79**: 520-536.
- [Mitchell y Norman 87] Mitchell, J. C., and Norman, A. 1987, *The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation*. *Int. J. Radiat. Biol.*, No. 4, **52**: 527 – 535.
- [Morgan y Kastan, 1997] Morgan, S. and Kastan, M. 1997. *p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer*. *Adv. Cancer Res.* 71: 1 – 25.
- [Morrell y col., 86] Morrell, D. Chase, CL. Kupper, LL. and Swift, M. 1986. *Diabetes mellitus in Ataxiatelangiectasia, Fanconi anemia, Xeroderma pigmentosum, common variable immunodeficiency, and severe cabinet immune deficiency, and severe combined immunodeficiency families*. *Diabetes* **35**: 143 – 147.
- [Moscoso 06] Moscoso Mujica G. A. “*Diferencias en la sensibilidad a los efectos genotóxicos de dosis bajas de radiación ionizante*”. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM – Xoch., (2006).

- [Motoyama y Naka 04] Motoyama, N. and Naka, K. 2004. *DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**: 11 – 16.
- [Nagasawa y col., 92] Nagasawa H., Little J. B. *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha – particles*. *Cancer Res.* 1992. Nov. 15; **52** (22): 6394 – 6396.
- [NCRP 87] National Council on Radiation Protection and Measurement, 1987. *Recommendations on limits for exposure to ionizing radiation. Report no. 91*.
- [Nakamura y col., 06] Hideaki Nakamura,a,1 Yoshihiro Yasui,a Noriko Saito,a Akira Tachibana,b Kenshi Komatsub and Kanji Ishizakia *DNA repair defect in AT cells and their hypersensitivity to low – dose rate*. *Radiation Res.* **165**, 277 – 282 (2006).
- [Nanxin y col., 01] Nanxin, L. Banin, S. and Ouyang, H. 2001. *ATM is required for I $\kappa$ B Kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks*. *J.Biol. Chem.* **276**: 8898 – 8903.
- [Odagiri y col 90] Y. Odagiri, J. L. Dempsey and A. A. Morley. *Damage to lymphocytes by X-rays and bleomycin measured with the cytokinesis-block micronucleus technique*. *Mutat. Res.* **237**, 147–152 (1990).
- [Oliveira y col., 01] Oliveira, E. Suzuki, M. Nascimento, P. Silva, M. and Okazaki, K. 2001. *Evaluation of effect of <sup>90</sup>Sr  $\beta$ -radiation on human blood cells chromosome aberration and single cell gel electrophoresis (comet assay) analysis*. *Brazil. Mutat. Res.* **476**: 109 – 121.
- [Patel y col., 98] Patel, K. Yu, V. Lee, H. Corcoran, A. Thistlethwaite, F. Evans, M. Colledge, W. Friedman, L. Ponder, B. and Venkitaraman, A. 1998. *Involvement of BRCA2 in DNA repair*. *Mol. Cell* **1**: 347 – 357.
- [Paz y col., 02] Paz, C. Creus, A. y Leone, P. 2002. *Genética Toxicológica y Carcinogénesis*. Edición del laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana. BIDFUNDACYT – PUCE. Ecuador. 297 pág.
- [Pierce y Preston 96] Pierce, D. and Preston, D. 1996. *Risks from low doses of radiation*. *Science* **272**: 632 – 633.

- [Preston y col., 03] Preston, D. Shimizu, Y. Pierce, D. Suyama, A. and Mabuchi, K. 2003. *Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: solid cancer and non-cancer disease mortality: 1950 – 1997*. Radiat. Res. **160**: 381 – 407.
- [Ruffner y col., 99] Ruffner, H. et al. 1999. *BRCA1 is phosphorylated at serine1497 in vivo at a cyclindependent kinase 2 phosphorylation site*. Mol. Cell. Biol. **19**: 4843 – 4854.
- [Salamanca 90] Salamanca, F. 1990. *Citogenética Humana*. Editorial Médica Panamericana S.Ade C.V. México D. F., 400 p.
- [Sanderson y Morley 86] Sanderson, B.J.S. y A.A. Morley. *Exposure of human lymphocytes to ionizing radiation reduces mutagenesis by subsequent ionizing radiation*. Mutat. Res. **164**: 347 – 351. (1986).
- [Savitsky y col. 95] Savitsky, K. Bar-Shira, A. Gilad, S. Rotman, G. Ziv, Y. Vanagaite, L. Tagle, D. Smith, S. Uziel, T. Sfez, S. Ashkenasi, M. Pecker, I. Frydman, M. Harnick, R. Patanjali, S. Simmons, A. Clines, G. Sartiel, A. Gatti, R. Chessa, L. Ganal, O. Lavin, M. Jaspers, N. Taylor, A. Arlett, C. Mili, T. Weissman, S. Lovett, M. Collins, F. and Shiloh, Y. 1995. *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science **268**: 1749 – 1753.
- [Schiffmann y De Boni 91] D. Schiffmann and U. De Boni, *Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise*. Mutat. Res. **246**, 113–122 (1991).
- [Schmid y col., 06] Schmid E., Selbach H.-J. Voth M., Pinkert J., Gildehaus F. J., Klett R. Haney M. *The effect of the  $\beta$ -emitting yttrium-90 citrate on the dose–response of dicentric chromosomes in human lymphocytes: a basis for biological dosimetry after radiosynoviorthesis*. Radiat Environ Biophys (2006) **45**: 93 – 98.
- [Shiloh 95] Shiloh, Y. 1995. *Ataxia-telangiectasia: closer to unraveling the mystery*. Eur. J. Hum. Genet. **3**: 116–138.

- [Shiloh 97] Shiloh, Y. 1997. *Ataxia-telangiectasia: and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart*, Annu. Rev. Genet. **31**: 635 – 662.
- [Shiloh 03] Shiloh Y. 2003. *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nat. Rev. Cancer. **3**: 155 – 168.
- [Stankovic y col., 98] Stankovic, T. Kidd, A. Sutcliffe, G. McGuire, P. Robison, P. Weber, T. Bradwell, D. Easton, G. Lennox, N. Haites, P. Byrd, A. and Taylor, P. 1998. *ATM mutation and phenotypes in ataxia telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer*. Am. J. Hum. Genet. **62**: 334 – 345.
- [Stewart y col., 01] Stewart, G. Last, J. Stankovic, T. Haites, N. Kidd, A. Byrd, P. et al. 2001. *Residual ataxia telangiectasia mutated protein function in cell from ataxia telangiectasia patients, with 5762ins137 and 7271T→G mutations, showing a less severe phenotype*. J. Biol. Chem. **276**: 30133 – 30141.
- [Stewart y Elledge 02] Stewart, G. and Elledge, S. 2002. *The Two Faces of BRCA2, a FANCTastic discovery*. Mol. Cell **10**: 2 – 4.
- [Swift y col., 86] Swift, M. Morrell, D. Cromartie, E. et al. 1986. *The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States*. Am J Hum Genet. **39**: 573 – 583.
- [Swift y col., 87] Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL. *Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia*. N Engl J Med. 1987 May 21;316(21):1289-94.
- [Taylor 01] Taylor A. 2001. *Chromosome instability syndromes*. Best Pract Res Clin Haematol. **3**: 631 – 644.
- [Turrence y col., 01] Turrence, G. Paul, P. and Laflair, B. 2001. *Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53*. Oncogene **20**: 5100 – 5110.
- [U2000 – F] UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation, Vol.: II. *Annex F: DNA repair and mutagenesis*.

- [U2000 – G] UNSCEAR. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 2000. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Vol.: II. *AnnexG: Biological effects at low radiation doses.*
- [UNSCEAR 2000] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. 2000. Report to the General Assembly.
- [Uma Devi y Sharma 90] Uma Devi, P. Sharma, A. S. K. V. S. 1990. *Mouse bone-marrow response to low doses of whole-body gamma irradiation: induction of micronuclei.* Int. J. Radiat. Biol., **57**: 97 – 101.
- [Venkitaraman 01] Venkitaraman, A. 2001. *Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage.* J. Cell Sci. **114**: 3591 – 3598.
- [Verhaegen y Reniers 94] Verhaegen F. and Reniers B. *Microdosimetric Analysis of Various Mammography Spectra: Lineal Energy Distributions and Ionization Cluster Analysis.* Radiat. Research. **162**, 592 – 599 (2004).
- [Vral y col., 92] Vral A., Thierens H., De Ridder L. *Study of dose – rate and split – dose effects on the in vitro micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays.* Int J. Radiat. Biol. 1992 Jun; **61** (6): 777 – 784.
- [Walker y col 96] J – A. Walker, D. R. Boreham, P. Unrau and A. M. V. Duncan, *Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei.* Mutagenesis **11**, 419–424 (1996).
- [Welsh y col., 2000] Welsh, P. Owens, K. King, M. 2000. *Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2.* Trends Genet. **16**: 69 – 74.
- [Widel y col., 98] Widel M, Przybyszewski W. M. 1998. *Inverse dose-rate effect for the induction of micronuclei in Lewis Lung Carcinoma after exposure to Cobalt-60 gamma-rays.* Radiation Res **149**: 98-102.
- [Wilson y Elledge 02] Wilson, J. and Elledge, S. 2002. *BRCA2 enter the fray.* Science. **279**: 1822 – 1823.

[Witcosfski y col., 74] Witcosfski R. L., Pizzarello D. J., Smith E. M., Everhart H., y Gnau T. R., 1974, *Dose Correlation of Dose Rate and Biological Effect in Rat Liver Cells Resulting from X-Ray, <sup>113m</sup>In, and <sup>198</sup>Au Irradiation*. Journal of Nuclear Medicine **15**, No: 4, 241 – 245.

[Zaichkina y col., 04] Zaichkina S. I., Rozanova O. M., Aptikaeva G. F., Achmadieva A. Ch., and Klovov D. Y., 2004. *Low doses of gamma-radiation induce nonlinear dose responses in mammalian and plant cells*. Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine, **2**: 213 – 221.

#### **REFERENCIAS DE INTERNET:**

**Aluminio 1100:** <http://www.suppliersonline.com/propertypages/1100.asp>

**ATM:** <http://www.vmmc.org/vmrc/atm.htm>

**LSS – cohort** [http://www.rerf.or.jp/index\\_e.html](http://www.rerf.or.jp/index_e.html)

**NIST:** <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab3.html>)

<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab4.html>)

<http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/cover.html>

**Parafilm:** <http://www.2spi.com/catalog/supp/supp4b3.html>

**Tubo Eppendorf** <http://www.eppendorfn.com/faqs/Centrifugation.asp>.

**XCOM:** <http://physics.nist.gov/PhysRefData/Xcom/Text/XCOM.html>