



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

DAÑO INICIAL INDUCIDO EN DNA POR
EXPOSICIÓN A BAJAS DOSIS DE RADIACIÓN
IONIZANTE DE BAJA Y ALTA TRANSFERENCIA
LINEAL DE ENERGÍA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA VILLEGAS NAVARRO

DIRECTORAS DE TESIS: DRA. PATRICIA OSTROSKY WEGMAN
DRA. MARÍA ESTER BRANDAN SIQUÉS

3° MIEMBRO DEL COMITÉ TUTORAL: DR. LUIS BENÍTEZ-BRIBIESCA



posgrado en ciencias físicas
u n a m

MÉXICO, D.F.

2009



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 veces la vida parece irse en un suspiro,
A veces parece detenerse en el tiempo,
Hay que aprender a amar,
Hay que comprender para perdonar,
Hay que saber llorar,
Hay que volver a la felicidad,
Y siempre se debe vivir con intensidad.

MFVN

A mis amados padres,
A Gina y Eduardo,
A Carina,
Por siempre les estaré agradecida por su amor y apoyo incondicional.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de crecer en mi vida profesional a través de una educación gratuita y de excelencia.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Física y al Instituto de Ciencias Nucleares por permitirme utilizar sus instalaciones y equipos que hicieron posible la realización de este trabajo y en particular por el préstamo de las fuentes radioactivas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el apoyo económico a través del programa de Becas Nacionales y de Proyecto, durante los dos años en los que cursé mis estudios de posgrado.

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para dar a conocer las diferentes etapas de este trabajo en diversos congresos.

Al proyecto PAPIIT IN-108906 por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo de tesis.

Agradecimientos

A mis tutoras, Dra. Patricia Ostrosky y Dra. María Ester Brandan. Agradezco profundamente el constante apoyo y las valiosas enseñanzas que me han dado. Gracias por ser mis guías en este camino que sé apenas comienza.

Al Dr. Luis Benítez que por ser parte de mi comité tutorial, desde el principio brindó a este trabajo su extraordinaria experiencia científica a través de sus múltiples comentarios.

A los miembros del jurado de titulación: Dra. Patricia Ostrosky, Dr. Luis Benítez, Dr. Fabio Salamanca, Dra. Isabel Gamboa y Dra. María Eugenia Gonsebatt por sus comentarios sobre el trabajo escrito.

A la Dra. Isabel Gamboa y a la M. en C. Ana Elena Buenfil por las múltiples discusiones que ayudaron a la realización de los trabajos de dosimetría.

A la Dra. Ana María Salazar y a la Q.F.B. Monserrat Sordo por enseñarme a cultivar células y a realizar el método cometa ya que sin ustedes este trabajo no hubiera existido. Gracias por su amabilidad y paciencia.

Al M. en C. César Ruiz, al taller del Instituto de Física y al Ing. Marco Antonio Veytia por la elaboración de la base de irradiación para la fuente de ^{241}Am .

A Carlos Castellanos por el apoyo para el préstamo de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$.

A todos mis profesores de la maestría, agradezco enormemente sus valiosas enseñanzas que estoy segura me acompañaran a lo largo de mi vida profesional.

A mis compañeros de clase, por compartir todos los buenos y malos momentos a lo largo de nuestra formación profesional. Gracias Suemi, Orlando, Iván, Marcelino, Ruth, Cristian, Abraham y Alejandro.

A mis compañeros del laboratorio, por brindar un ambiente interdisciplinario al laboratorio que nos hace mejores en nuestras carreras académicas. Gracias Ani, Monse, Andrea, Patymen, Fátima, Sandra, Natalia, Pau, Eddy, Moy, Juan y Monsesita.

ÍNDICE

Capítulo 1. Radiación Ionizante

1.1	Generalidades -----	1
1.2	Decaimiento radiactivo -----	3
1.3	Interacción de la radiación ionizante con la materia -----	4
1.3.1	Interacción de las partículas cargadas -----	5
1.3.2	Poder de frenado y LET -----	6
1.3.3	Alcance -----	7
1.4	Dosis y Dosis Equivalente -----	8
1.5	Dosis en Profundidad -----	10
1.6	Dosimetría -----	10
1.6.1	Dosímetros termoluminiscentes (DTL) -----	12
1.6.2	Dosímetros de película de tinte radiocrómico -----	14

Capítulo 2. Ácido desoxirribonucleico (ADN)

2.0	Generalidades -----	16
2.1	Genes y mutaciones -----	19
2.2	Daño al ADN por radiación ionizante -----	20
2.3	Radiosensibilidad -----	24
2.4	Riesgo debido a la exposición a dosis altas de radiación -----	24
2.5	Riesgo debido a la exposición a dosis bajas de radiación -----	25

Capítulo 3. Gen Ataxia Telangiectasia Mutado (ATM)

3.0	Generalidades -----	28
3.1	Función de la proteína ATM -----	29
3.2	Mecanismos de la activación de la proteína ATM -----	31
3.3	Enfermedad Ataxia Telangiectasia (AT) -----	32
3.4	Mutaciones en ATM -----	33

ÍNDICE

Capítulo 4. Método de electroforesis en gel unicelular (COMETA)

4.0	Generalidades -----	34
4.1	Ventajas y desventajas -----	35
4.2	Implicaciones de los métodos de análisis -----	36

Capítulo 5. Antecedentes

5.0	Antecedentes -----	38
-----	--------------------	----

Capítulo 6. Planteamiento del Estudio

6.0	Planteamiento del Estudio -----	41
6.1	Hipótesis -----	42
6.2	Objetivo general -----	42
6.3	Objetivos particulares -----	42

Capítulo 7. Materiales y Métodos

7.1	Fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ -----	43
7.1.1	Antecedentes de caracterización de la fuente -----	43
7.1.2	Caracterización de la fuente -----	45
7.2.	Fuente de ^{241}Am -----	48
7.2.1	Necesidades de irradiación -----	49
7.2.2	Diseño del irradiador -----	49
7.2.3	Descripción del irradiador -----	50
7.2.4	Cálculos para obtener la tasa de dosis -----	50
7.2.5	Comprobación de la ecuación para el cálculo de la tasa de dosis -----	52
7.2.6	Comprobación de la uniformidad -----	54

ÍNDICE

7.3	Línea celular -----	61
7.4	Linfocitos de sangre periférica -----	61
7.5	Conteo celular -----	62
7.6	Irradiación con partícula beta -----	62
7.7	Irradiación con partículas alfa -----	62
7.8	Viabilidad -----	63
7.9	Ensayo Cometa -----	64
7.9.1	Preparación de laminillas -----	64
7.9.2	Versión Neutra: lisis, desenrollamiento y electroforesis -----	64
7.9.3	Versión Alcalina: lisis, desenrollamiento y electroforesis -----	64
7.10	Lectura de laminillas -----	65
7.11	Análisis Estadístico -----	65

Capítulo 8. Resultados

8.1	Exposición a partículas beta -----	66
8.1.1	Irradiación de células AT -----	67
8.1.2	Irradiación de linfocitos -----	70
8.2	Exposición a partículas alfa -----	73
8.2.1	Irradiación de células AT -----	73
8.2.2	Irradiación de linfocitos -----	77
8.3	Comparación del daño al ADN en células AT y linfocitos -----	80
8.4	Análisis -----	82

Capítulo 9. Discusión ----- 87

Capítulo 10. Conclusiones ----- 92

ÍNDICE

Anexos

Anexo 1 ----- 94

Referencias ----- 95

Introducción

Los efectos biológicos a largo y corto plazo por exposición a altas dosis de radiación ionizante han sido bien documentados en sistemas mamíferos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, bajo circunstancias normales los humanos se encuentran expuestos a dosis bajas de RI por lo que riesgos carcinogénicos a dosis del orden de unos cuantos mGy son relevantes. Debido a que el posible riesgo a desarrollar cáncer por exposición a dosis bajas (< 0.2 Sv) es demasiado pequeño para poder ser inferido directamente de estudios epidemiológicos, organizaciones mundiales como la UNSCEAR y el comité BEIR VII de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos Americanos usan el modelo Lineal sin Umbral (LNT por sus siglas en inglés) que extrapola dichos riesgos de la información proporcionada de exposición a altas dosis [53, 34].

La aproximación LNT se ha vuelto objeto de debate desde el advenimiento de la biología molecular. La reparación del ADN, la hormesis y el efecto 'bystander' entre otros fenómenos ponen en duda la estimación del riesgo dada por el modelo LNT ya que pueden estar sobre o subestimados [5-7, 18, 51].

En el 2005, Ding y col. [17], usaron la técnica de microarreglos para observar qué genes se activan al tratar de reparar el daño causado por exposición a rayos X. Reportan que el porcentaje de genes que respondieron a bajas dosis siempre fue menor que el de altas dosis. En particular, aquellos que fueron activados a bajas dosis son los responsables de la señalización entre células y de la respuesta al daño al ADN. Concluyen diciendo que el hecho de que exista una pronta reparación del daño a bajas dosis y no a altas dosis, indica que existen diferencias importantes que repercuten en la sobrevivencia de la célula y es necesaria su investigación. En otro estudio realizado por Short y col. [49], encuentran que células, provenientes de líneas celulares de cáncer humano, expuestas a dosis bajas (< 1 Gy) de RI presentan activación de genes promotores de la reparación celular después de ser expuestas a dosis tan bajas como 0.1 Gy y que dicha señalización aumenta de manera lineal conforme incrementa la dosis.

Ciertamente el interés en esta línea de investigación proviene, en gran parte, de proponer mejoras en la protección del personal ocupacionalmente expuesto (POE). La mayoría de los trabajos de investigación publicados hacen referencia al daño provocado por exposición a rayos X y rayos γ , probablemente debido a que estos tipos de radiación son los más utilizados en radioterapia y radiodiagnóstico. Sin embargo, el crecimiento en el uso de otros tipos de radiación como lo son la radiación beta y otras partículas cargadas

pesadas, en medicina nuclear y en la industria hace relevante el estudio de los efectos biológicos que pueden ocurrir a nivel celular.

Es importante recordar que cada tipo de radiación ionizante interacciona de manera diferente con la materia, por lo que es de esperar que los efectos biológicos sean distintos. El número de partículas que pasan por una célula está descrito por una distribución de Poisson. A bajas dosis, el daño al ADN se debe principalmente por el paso de una sola partícula; que si pertenece a radiación de baja LET, muy probablemente, provocará roturas de una sola cadena. Al incrementar la dosis la probabilidad de que más partículas atraviesen la célula aumenta de modo que a dosis suficientemente altas, las roturas de doble cadena se vuelven el tipo de daño predominante, sin importar el tipo de radiación incidente.

Para enfatizar lo anterior, Mill y col. [31], presentan un trabajo en el que exponen linfocitos de sangre periférica a varias dosis (> 0.2 Gy) de cuatro tipos de radiación dentro de un rango de LET de 0.26 a 43.8 keV μm^{-1} , para luego determinar el daño genotóxico causado. Encuentran una dependencia de eficacia biológica relativa (RBE) con la dosis entre partículas alfa, partículas beta y neutrones con respecto a rayos X. Las tres curvas son diferentes, implicando una diferencia en el daño biológico causado por cada una.

En otro estudio realizado por Cleasson y col. [13], se reporta que la RBE para la inducción de roturas DSB por partículas alfa con respecto a rayos X es de 3.1, mientras que con respecto a rayos gamma es de 2.1. Además, la distribución de DSB es no aleatoria para la radiación de alta LET y aleatoria para la radiación de baja LET. Esto último se encuentra reportado también en el trabajo de Höglund y col. [23] en el que compararon el daño producido por rayos γ , partículas alfa e iones de nitrógeno. Concluyen que la LET provoca un pronunciado efecto en la distribución inicial de fragmentos de ADN. De este modo, ambos estudios demuestran la existencia de una marcada diferencia en el daño biológico causado por radiación de alta y de baja LET.

En el presente estudio se investigó la producción inicial del daño de tipo SSB y DSB inducido en una línea celular homocigota recesiva para el gen ATM y linfocitos aislados de sangre periférica al ser expuestos a radiación beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) y radiación alfa (^{241}Am).

Líneas celulares obtenidas de pacientes que presentan Ataxia Telangiectasia (AT) representan un modelo interesante para el estudio de los efectos a bajas dosis de RI. La AT es una enfermedad autosomal recesiva causada por mutaciones en el gen ATM. Se encuentra caracterizada por una hipersensibilidad a la RI y un consecuente aumento en la incidencia de desarrollo de cáncer debido a la imposibilidad de la correcta reparación del

daño tipo DSB [48]. Varios estudios han reportado que presentar la heterocigocidad aumenta el riesgo a desarrollar cáncer de mama, en particular se encontró que de 9 a 18% de los casos de cáncer de mama en los Estados Unidos podría ser atribuido a tal heterocigocidad [50]. Esto sólo marca la relevancia que tiene el estudio de los efectos celulares en líneas celulares de AT.

Para distinguir entre los dos tipos de daño se hizo uso del método de electroforesis en gel unicelular, mejor conocido como ensayo cometa. Este se encuentra entre los métodos más usados por su alta sensibilidad y simpleza para la determinación de daño genotóxico. Introducido por vez primera por Ostling y Johanson en 1984, el ensayo cometa fue diseñado en sus inicios para medir roturas de una sola hebra del ADN (SSB) [38] obteniendo el nombre de ensayo cometa alcalino. Años mas tarde, Olive y col. desarrollaron una nueva versión sensible a DSB llamándolo ensayo cometa neutral [57]. La diferencia entre ambas versiones radica únicamente en el pH utilizado durante los pasos de lisis y electroforesis, siendo típicamente de diez y trece, respectivamente, para el alcalino y de alrededor de ocho en ambos casos para el neutro.

Resumen

La estimación del riesgo a desarrollar cáncer por exposición a bajas dosis de radiación ionizante (RI) se encuentra basado en la extrapolación de estudios epidemiológicos de poblaciones expuestas a altas dosis. Se asume que la respuesta celular al daño producido es igual de eficiente tras la exposición a bajas o altas dosis de RI. El propósito de este trabajo fue el identificar el tipo de daño al ADN predominante inducido por dosis bajas (≤ 160 mGy) tanto de radiación ionizante de alta LET (partículas alfa) como de baja LET (partículas beta). Se expusieron dos tipos de modelos celulares, uno radiosensible (células de una línea celular linfoblastoide homocigota recesiva para el gen ATM) y otro no radiosensible (linfocitos aislados de sangre periférica). Se utilizó el ensayo de electroforesis unicelular en sus versiones alcalina y neutra para poder distinguir entre daño por rotura de una sola (SSB) o de dos (DSB) cadenas del ADN. Las células radiosensibles presentaron como daño predominante roturas SSB a dosis de 120 y 160 mGy por exposición a la radiación beta, mientras que la radiación alfa provocó que el tipo de daño predominante fuesen las roturas DSB a dosis tan bajas como 40 mGy. Además se encontró que en las células radiosensibles la producción de roturas DSB por unidad de dosis debido a la radiación de alta LET 62% mayor que a la debida a radiación de baja LET lo que sugiere la inducción de un efecto 'bystander' en este modelo celular. En los linfocitos expuestos a radiación de baja LET, se observó producción significativa de roturas SSB y DSB a 120 y 160 mGy, respectivamente. La radiación de alta LET produjo principalmente roturas SSB a dosis de 40 y 80 mGy. Sin embargo, en los linfocitos no se observó una producción de roturas SSB y DSB por unidad de dosis constante como ocurrió para las células radiosensibles. Esto implica que la capacidad de reparación celular juega un papel importante en la radiosensibilidad de los modelos celulares.

Abstract

Cancer risks estimates at low doses of ionizing radiation (IR) are based upon extrapolations from high dose data from epidemiological studies. It is generally assumed that cellular responses operate equally efficiently at low and high doses of IR. The aim of this study is to identify the predominant type of DNA damage as a result from exposure to low doses (≤ 160 mGy) of low- (beta particles) and high-LET (alpha particles) ionizing radiation. Two cellular models were used: a radiosensitive model (cells form an homozygous recessive ATM gene lymphoblastoid cell line) and a non radiosensitive model (peripheral blood lymphocytes). Sham and irradiated cells were immediately subjected to single cell gel electrophoresis technique (comet assay) using both the alkaline and neutral versions to measure DNA single-strand breaks (SSBs) and double strand-breaks (DSBs), respectively. For the radiosensitive cells exposed to beta radiation we found that SSB are the predominant type of DNA damage at 120 and 160 mGy. With those exposed to alpha radiation, data showed that DSBs were the predominant type of damage at a dose as low as 40 mGy. Further, the rate of induction (per mGy) of DSBs was around 62% higher with alpha than with beta irradiation suggesting that a bystander effect is being triggered in the radiosensitive cells. For lymphocytes exposed to low-LET radiation we found that a significant rise in SSB and DSB production at 120 and 160 mGy, respectively. While for those exposed to high-LET radiation, data showed that the principal type of damage was SSBs at doses of 40 and 80 mGy. Contrary to data from the radiosensitive cellular model, the rate of induction of SSBs or DSBs per mGy was not constant. This implies that cellular repair mechanisms play a crucial role in both cellular models' radiosensitivity.

1. Radiación Ionizante

1.0 Generalidades

Desde que la vida comenzó sobre el planeta Tierra, todos los seres vivos en él han estado expuestos a la radiación ionizante. Sin embargo, se identificó hasta finales del siglo XIX a través de dos grandes descubrimientos: la existencia de los rayos X y el decaimiento radiactivo. Desde entonces enormes esfuerzos se han hecho para poder entenderla, controlarla y manipularla. Hoy en día es usada universalmente para diversos propósitos, la mayoría con fines benéficos (como en la medicina de diagnóstico y la medicina oncológica) pero desgraciadamente, también ha sido usada con fines bélicos.

La radiación es energía en movimiento que puede ser transportada tanto por ondas electromagnéticas como por partículas. La radiación ionizante (RI) se caracteriza por la habilidad para ionizar y/o excitar los átomos del medio con el que interacciona. Debido a que la energía necesaria para liberar un electrón de valencia del átomo es del orden de 4-25 eV, la radiación debe transportar energía cinética mayor que tal valor para que se le pueda considerar como ionizante [2]. El estudio de dicha interacción se conoce como física radiológica; y en particular, la determinación cuantitativa del depósito de energía en la materia de interacción se denomina dosimetría [2].

Hoy, los tipos de radiación ionizante más importantes son:

- Rayos γ (gamma): considerada como radiación electromagnética emitida por un núcleo al decaer. También pueden ser producidos en la aniquilación entre materia y antimateria.
- Rayos X: considerados como radiación electromagnética emitida por partículas cargadas (usualmente electrones) cuando cambian entre los niveles energéticos del átomo (rayos X característicos) o cuando se aceleran al interaccionar dentro de un campo de Coulomb (rayos X de bremsstrahlung). Cabe hacer mención que un rayo γ y un rayo X con la misma energía cuántica, tienen propiedades idénticas y sólo se diferencian por su origen.
- Electrones rápidos: Son emitidos por el núcleo y se denominan partículas β (beta). Pueden ser positivos (positrones) o negativos en carga eléctrica. Si son resultado de colisiones de partículas cargadas, se les llama rayos δ (delta).

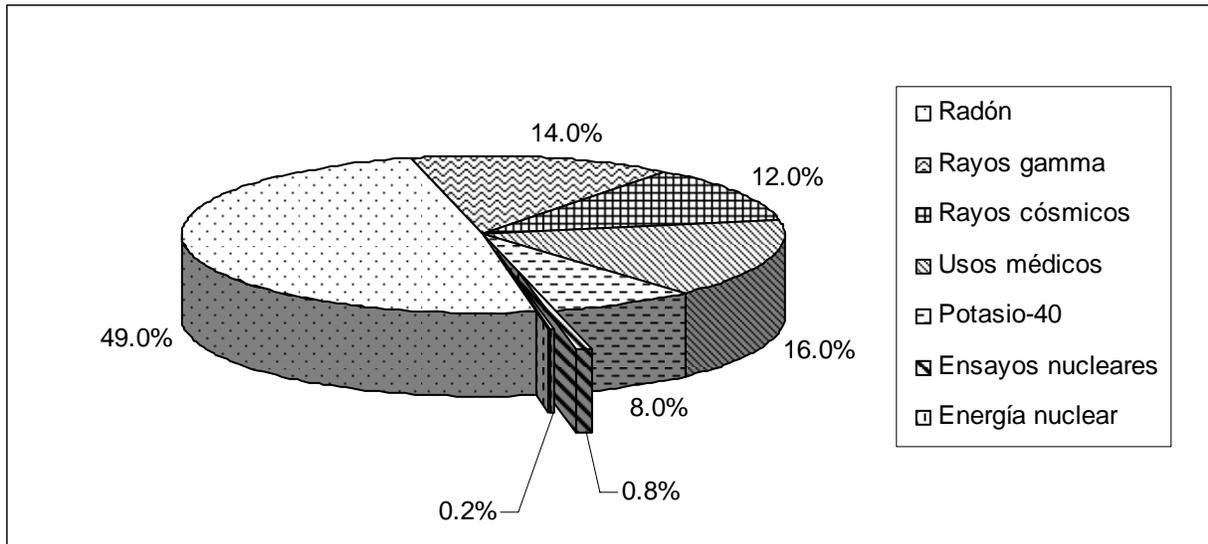


Figura 1.1 Principales fuentes de radiación. Se indican los porcentajes con que cada fuente contribuye a la dosis total promedio en el mundo actual [3].

- Partículas Cargadas Pesadas (PCP): Generalmente obtenidas de la aceleración de átomos pesados en un campo de Coulomb. Sin embargo, algunos núcleos radiactivos emiten partículas α (alfa) que son núcleos de helio y que también se consideran como PCP.
- Neutrones: Son partículas sin carga eléctrica obtenidos de reacciones nucleares como la fisión nuclear.

La exposición del ser humano a la radiación ionizante generada por fuentes naturales es parte inherente de la vida sobre la tierra. Para la mayoría de los humanos, esta exposición sobrepasa por mucho a la combinación de todas las fuentes artificiales (hechas por el ser humano). La radiación natural se compone principalmente de rayos cósmicos de alta energía incidentes en la atmósfera y radionúclidos originados en la corteza terrestre y que se encuentran presentes en todas partes del medio ambiente incluyendo el interior del cuerpo humano [54].

De todos los radionúclidos presentes en la tierra, el que contribuye más a la radiación natural es el radón. Éste es un producto gaseoso de la desintegración del ^{226}Ra , que escapa de la tierra y se eleva a la atmósfera. En sitios ventilados no es peligroso, sin embargo, en sitios con poca ventilación, el radón tiende a acumularse y puede representar un incremento en el riesgo de salud de los individuos. Como se muestra en la Figura 1.1, el radón representa aproximadamente el 49% de la radiación ionizante a la que está expuesto el ser humano.

Por otro lado, la radiación artificial proviene principalmente de tres fuentes: las aplicaciones médicas de las radiaciones, las pruebas de explosivos nucleares realizadas en la atmósfera y la producción de energía nucleoelectrónica. Aquellas aplicadas en la industria, la agricultura y la investigación representan una aportación insignificante frente a las antes descritas. Desde hace 100 años el incremento en el uso de la RI en medicina ha hecho que hoy en día resulte ser una herramienta esencial para el diagnóstico y la terapia. Es por ello que las aplicaciones médicas son la fuente artificial de exposición más importante para la población mundial.

1.1 Decaimiento radiactivo.

Núcleos radiactivos son inestables y tienden a buscar configuraciones más estables a través de la expulsión de partículas energéticas y es entonces cuando se dice que un núcleo emite radiación ionizante. Este proceso se denomina decaimiento radiactivo [2].

La expresión matemática para este decaimiento considera una muestra de material radiactivo de N átomos idénticos, por lo que la rapidez con la que esta cantidad cambia resulta directamente proporcional a N . Entonces:

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Donde dN es el número de transformaciones ocurridas en un tiempo dt y a λ se le denomina la constante de decaimiento radiactivo. Dicha constante es característica de cada radionúclido y físicamente representa la probabilidad de decaimiento de un núcleo por unidad de tiempo.

Si resolvemos la ecuación diferencial obtenemos que:

$$N(t) = N_0 \exp[-\lambda t] \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Lo que nos dice que la cantidad de núcleos restantes al tiempo t es una función que decae exponencialmente conforme avanza el tiempo. Así, la actividad (A) de una muestra radiactiva definida como el número de transformaciones por unidad de tiempo estará dada por λN . Y también se comporta como una función de decaimiento exponencial.

$$A = A_0 \exp[-\lambda t] \quad (\text{Ec. 1.3})$$

La unidad de actividad en el Sistema Internacional de Unidades es el becquerel (Bq) que corresponde a un decaimiento por segundo por lo que está dada en s^{-1} . Sin embargo, en algunas citas,

se sigue usando la unidad curie (Ci) que corresponde aproximadamente a la actividad de 1 gramo de ^{226}Ra y cuya conversión a bequerels es $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$.

De la última expresión se obtiene una cantidad importante denominada vida media ($t_{1/2}$) que indica el tiempo necesario para que la actividad de la muestra disminuya a la mitad, es decir, $N(t_{1/2})=N_0/2$. Si sustituimos esto en (1.2) y despejamos t obtenemos que:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

La vida media es específica para cada radionúclido y se ha observado que existen algunos con vidas medias extremadamente cortas (μs) hasta vidas medias extremadamente largas (miles de años).

De este modo, para calcular el decaimiento de una fuente es necesario hacer uso de la ecuación 1.4 de la cual se despeja λ y se sustituye en la ecuación 1.3 para así obtener:

$$A(t) = A_0 \exp\left[-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} t\right] \quad (\text{Ec. 1.5})$$

1.2 Interacción de la Radiación Ionizante con la materia

Cuando la RI incide sobre algún material, la energía transportada se deposita en los átomos del material causando excitaciones o ionizaciones. La forma en que esto ocurre depende, en gran parte del tipo de RI; esto es, si la radiación está formada por partículas cargadas (PCP o partículas α) o por partículas no cargadas (rayos γ y X o neutrones).

Por recomendación de la organización internacional ICRU (Internacional Commission on Radiation Units and Measurements), se decidió clasificar a la RI en dos grupos [2]:

- Radiación directamente ionizante: consta de todas las partículas cargadas que entregan su energía de manera directa a los átomos del medio a través de muchas interacciones por fuerza de Coulomb a lo largo de su trayectoria.
- Radiación indirectamente ionizante: fotones de rayos X o γ o neutrones que primero transfieren su energía a partículas cargadas en la materia a través de algunas interacciones a lo largo de su trayectoria. Las partículas cargadas liberadas son las que entregan la energía en el medio.

1.2.1 Interacción de las partículas cargadas

Debido a que las partículas cargadas se encuentran rodeadas de un campo de fuerza eléctrica, la probabilidad de que no ocurran interacciones en el medio de incidencia es nula. Es conveniente imaginarse que dicha partícula pierde energía cinética gradualmente a través de un proceso de fricción que usualmente se le refiere como la aproximación de desaceleración continua ó CSDA por sus siglas en inglés.

Existen tres tipos de colisiones que dependen de la relación entre el parámetro de impacto b y el radio atómico a (ver Figura 1.2):

- Colisiones suaves ($b \gg a$): En este caso al pasar la partícula cargada a una distancia considerable del átomo, la fuerza de Coulomb afecta al átomo entero, excitándolo a un nivel de energía más alto o en ciertas ocasiones ionizándolo al sacar un electrón de valencia. El efecto neto es la transferencia de una pequeña cantidad de energía (del orden de eV) al átomo del medio. Como valores grandes de b son claramente más probables que valores pequeños, este tipo de colisión es el responsable de aproximadamente la mitad de la energía transferida al medio.
- Colisiones duras ($b \approx a$): En este tipo de colisión se vuelve altamente probable que la partícula interactúe directamente con un electrón atómico. Éste es lanzado del átomo con energía suficiente para que continúe ionizando y excitando el medio. Estos electrones son conocidos como rayos δ y disipan su energía cinética a lo largo de trayectorias diferentes a la de la partícula original. Aun cuando este tipo de colisión ocurre en menor frecuencia que las colisiones suaves, las fracciones de la energía gastadas en ambos tipos de interacción son comparables.
- Colisiones con el campo nuclear ($b \ll a$): Cuando las partículas incidentes son electrones este tipo de colisión se vuelve muy importante ya que en el 97-98% de los casos, el electrón es dispersado elásticamente por lo que no se emiten rayos X y no existe una transferencia de energía. El camino tortuoso que sufren estos electrones, especialmente en medios de alta Z , se debe a este tipo de interacción. En el restante 2-3% las interacciones son de tipo inelástico y hay producción de rayos X que generalmente se lleva una fracción significativa de la energía del electrón incidente. Sin embargo, este tipo de disipación de energía resulta insignificante para materiales de baja Z (tipo tejido). A veces cuando la energía cinética de la partícula

cargada es muy alta (100 MeV) es posible que ocurran interacciones inelásticas con el núcleo. El resultado es una excitación del núcleo que emitirá el exceso de energía generando partículas de evaporación y rayos γ .

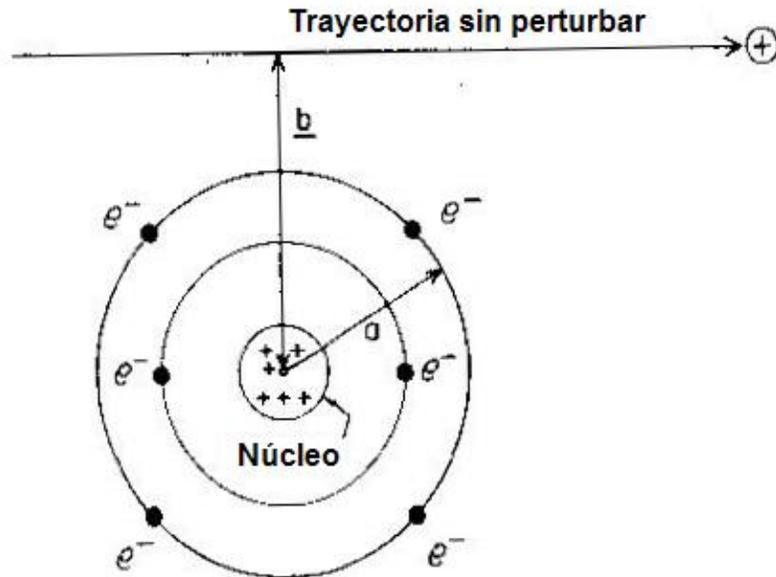


Figura 1.2 Parámetros importantes en las colisiones de partículas cargadas con átomos: a es el radio del átomo clásico y b es el parámetro de impacto [2].

1.2.2 Poder de Frenado y LET

La magnitud que describe la pérdida de energía de la partícula cargada al interactuar con el medio está dada por el poder de frenado (S). Éste es el valor esperado de la pérdida de energía cinética por unidad de longitud de trayectoria de una partícula cargada de un tipo y energía (T) dada, que atraviesa un medio con número atómico Z:

$$S = \left(\frac{dT}{dx} \right)_{T,Z} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Generalmente se da en unidades de MeV cm^{-1} . También se utiliza el poder de frenado dividido por la densidad (ρ) del material absorbente, lo que da origen al poder de frenado másico ($dT/\rho dx$).

Cuando el interés radica en el destino de la energía perdida por la partícula, el poder de frenado se subdivide en “poder de frenado de colisión” y “poder de frenado radiativo”. El primero

se refiere a la energía perdida al interactuar por colisiones duras y suaves; mientras que el segundo se refiere a la energía disipada por interacciones radiativas (radiación bremsstrahlung).

La expresión para el poder de frenado de colisión fue desarrollada por el físico Bethe tanto para electrones como para PCP. Dicha expresión depende del medio absorbente, la velocidad y carga de la partícula, pero no tendrá dependencia con la masa de la misma. Hoy en día existen tablas generadas por programas computacionales como las del programa SRIM-2008.03 [58], donde se pueden encontrar los valores de los poderes máscicos de frenado para diversas partículas incidentes en diferentes materiales.

Los rayos δ producto de las colisiones duras pueden ser suficientemente energéticos para entregar energía cinética a distancias considerables de la trayectoria original. De modo que si se quiere calcular la dosis en un objeto pequeño, el poder máscico de colisión generalmente sobreestimaré la dosis a menos que los rayos δ que escapan sean remplazados. Es por esto que se decide hacer uso de la transferencia lineal de energía o LET (Linear Energy Transfer). La LET se define como el valor esperado de pérdida de energía en un volumen local por unidad de longitud de trayectoria de una partícula cargada con energía dada. Se expresa generalmente en unidades de energía sobre longitud (keV/ μ m).

$$L = \left(\frac{dE_c}{dx} \right)_{E,P} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Cabe hacer notar que la LET sólo se define para partículas cargadas o radiación directamente ionizante; sin embargo, esta cantidad es muy usada en radiobiología como una atribución característica de radiación indirectamente ionizante (rayos X y rayos γ). Esto se debe a que, como ya se ha mencionado, este tipo de radiación transfiere su energía a partículas cargadas dentro del medio y son éstas las que depositan la energía cinética por lo que la LET en realidad se refiere a las partículas secundarias y no a los fotones.

1.1.3. Alcance

El alcance (R) de una partícula cargada de un tipo y energía dados en un medio es el valor esperado de la longitud de la trayectoria (p) recorrida en el material hasta detenerse. Otra cantidad relacionada es el alcance proyectado (t) de una partícula, que se define como el valor esperado de la máxima profundidad de penetración alcanzada en el medio. Ambas cantidades no son estocásticas y usualmente se les expresan en unidades de masa sobre área (ver Figura 1.3).

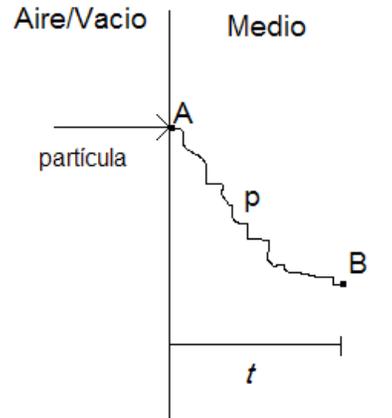


Figura 1.3 Conceptos de alcance: p es la distancia total desde el punto de entrada A hasta el punto de freno total B (trayectoria de la partícula) y t es el alcance proyectado.

1.3 Dosis y Dosis Equivalente

La dosis se define como el valor esperado de la energía impartida por RI a un medio dado por unidad de masa en el punto de interés [2]:

$$D = \frac{d\epsilon}{dm} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

con $d\epsilon$ el valor esperado de la energía impartida a un volumen infinitesimal dV en un punto P y dm es la masa en dV . La unidad establecida por el SI es el gray (Gy) ($1\text{Gy} = 1\text{ J kg}^{-1}$) aunque es común encontrar referencia a la dosis medida en rad ($1\text{rad} = 100\text{ erg g}^{-1} = 10^{-2}\text{ Gy} = 1\text{ cGy}$).

Para calcular la dosis depositada en películas delgadas se deben cumplir los siguientes requisitos:

- El poder de frenado de colisión debe ser prácticamente constante y característico a una energía T_0 a lo largo del material de absorción.
- Toda partícula incidente debe pasar a través de la lámina o que la dispersión sea despreciable.
- La energía cinética neta que se sale de la lámina debida a los rayos δ debe ser despreciable.

Así, la energía perdida en las interacciones de colisión por una fluencia Φ (partículas cm^{-2}) de partículas cargadas con energía inicial T_0 que pasan perpendicularmente por una lámina de espesor másico ρt (g cm^{-2}) está dada por:

$$E = \Phi \left(\frac{dT}{\rho dx} \right)_c \rho t \quad (\text{Ec. 1.9})$$

El tercer requisito indica que la energía perdida por la partícula se queda en la lámina como energía impartida, por lo que la dosis absorbida será la obtenida al dividir la ecuación anterior entre la masa por unidad de área de la lámina:

$$D = \Phi \left(\frac{dT}{\rho dx} \right)_c \left[\frac{MeV}{g} \right] \quad (\text{Ecs. 1.10 y 1.11})$$

$$D = 1.6 \times 10^{-10} \Phi \left(\frac{dT}{\rho dx} \right)_c [Gy]$$

Cuando la lámina resulta ser lo suficientemente gruesa como para que el poder másico de frenado de colisión varíe, se hace uso de las tablas de alcance proyectado, en vez del poder másico de frenado para obtener la dosis impartida. La energía impartida estará dada por:

$$E = \Phi \Delta T = \Phi (T_{\text{entrada}} - T_{\text{salida}}) \quad (\text{Ec. 1.12})$$

Por lo que la dosis impartida por un haz de PCP que incide perpendicularmente en la lámina será la energía impartida en el espesor másico correspondiente:

$$D = (1.6 \times 10^{-10}) \frac{\Phi \Delta T}{\rho t} [Gy] \quad (\text{Ec. 1.13})$$

Para poder calcular correctamente la cantidad de energía depositada en un material con cierto espesor es necesario hacer uso de las tablas de alcance como las obtenidas con el programa SRIM.2008-03. Primero se busca el alcance de las PCP que tienen energía cinética inicial T_{entrada} en la tabla correspondiente al material de interés. Posteriormente, al valor del alcance se le sustrae el grosor de la lámina del material en la dirección por el cual atraviesan las PCP. A este nuevo alcance le corresponde una energía final T_{salida} que debe ser localizado en la misma tabla. Si es necesario se puede realizar una interpolación lineal.

Para cuestiones de protección radiológica se utiliza una relación numérica que asocia la dosis absorbida y el posible efecto biológico que produzca. Tal es el propósito de la magnitud dosimétrica denominada *dosis equivalente* (H_T). Ésta se deriva de la dosis absorbida promediada sobre un tejido u órgano y se define como [40]:

$$H_T = w_R D_{T,R} \quad (\text{Ec. 1.14})$$

Donde D_T es la dosis promedio debida al tipo de radiación R en el tejido u órgano T y w_R es el factor de ponderación por tipo de radiación. Debido a la adimensionalidad de w_R entonces la dosis equivalente tiene las mismas unidades que la dosis absorbida pero para distinguir entre ambas magnitudes se le asignó una unidad especial llamada el sievert (Sv). Para radiación de baja LET w_R es igual a la unidad pero para radiación de alta LET, w_R varia entre 5 y 20, siendo este último valor para partículas alfa.

1.4 Dosis en profundidad

Las PCP incidentes en un material en el cual las interacciones nucleares son despreciables, muestran una distribución de dosis versus profundidad en la forma de una curva clásica de Bragg (ver Figura 1.4). Si la partícula pierde la primera mitad de su energía cinética a lo largo de una trayectoria x , el resto de la energía será perdida en una distancia aproximadamente $x/3$, de manera que al final de la trayectoria existe un incremento en la tasa de pérdida de energía. Esto provoca que la partícula deje toda su energía y se detenga rápidamente. La dosis depositada en el material será máxima en el pico de la curva de Bragg.

Por otro lado, la forma de la curva de dosis versus profundidad para los electrones resulta diferente ya que éstos son dispersados con facilidad. De modo que un máximo difuso es alcanzado aproximadamente a la mitad del máximo alcance para un haz de electrones amplio (ver Figura 1.5).

1.5 Dosimetría

La dosimetría es la técnica para la determinación de la dosis absorbida o la tasa de dosis que resulte de la interacción de la RI con la materia. Para realizar lo anterior es necesario el uso de dosímetros, que pueden ser definidos como un dispositivo capaz de entregar una lectura r que idealmente sea proporcional a la dosis absorbida D , depositada en el volumen sensible del mismo. Si la dosis no es homogénea en el dosímetro, entonces r será una medida de un valor promedio de la dosis. Existen diversos tipos de dosímetros, en cuanto a composición química y física, que han sido desarrollados conforme a las necesidades de determinación de dosis en diferentes situaciones.

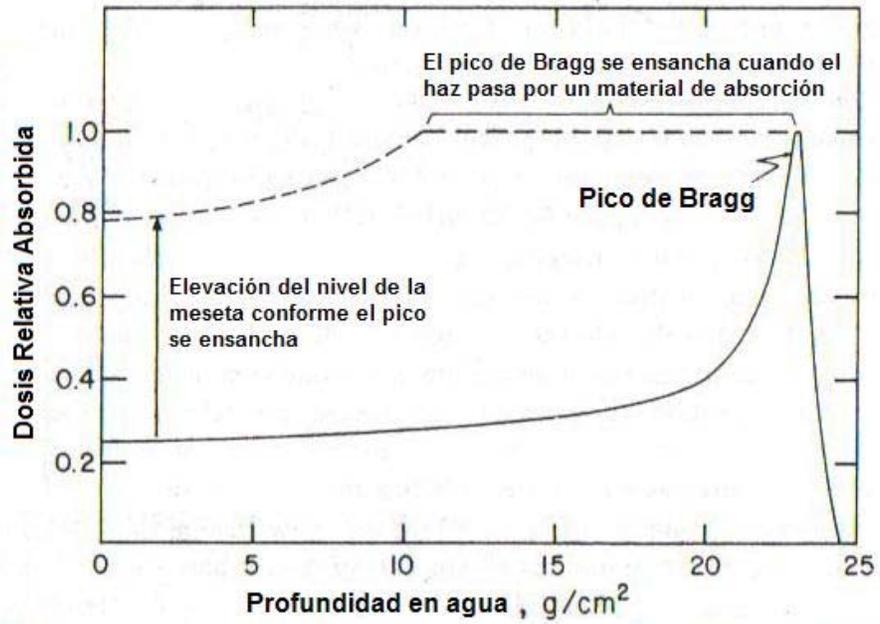


Figura 1.4 Dosis en profundidad para protones en agua. La línea punteada representa el efecto de pasar el haz por un material de absorción diseñado especialmente [2].

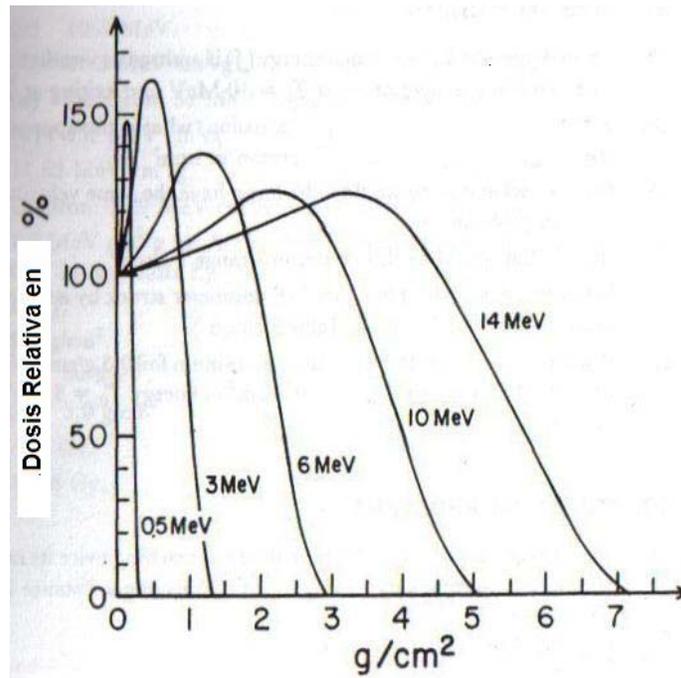


Figura 1.5 Dosis en profundidad en agua para haces de electrones de varias energías [2].

1.5.1 Dosímetros Termoluminiscentes (DTL)

Los dosímetros termoluminiscentes consisten en una pequeña masa (1-100 mg) de un material cristalino dieléctrico que contiene ciertas impurezas. Éstas pueden actuar como trampas para los portadores de carga (electrones y huecos) que se encuentran entre la banda de valencia y la de conducción. Al ser sometidos a un campo de radiación ionizante, existe una redistribución de carga dentro del material. Después de ser irradiados, la mayoría de los electrones vuelve a su estado original en un periodo de tiempo relativamente corto, sin embargo, hay algunas cargas que quedan atrapadas. Por lo que se dice que estos materiales retienen memoria sobre la radiación a la que fueron expuestos.

La energía extra que tiene el cristal debido a la radiación puede ser liberada si se calienta. Esto provoca la emisión de luz si la trampa (con el portador de carga en su interior) se encuentra cerca de un centro luminiscente. Este efecto se conoce como termoluminiscencia (TL) y se encuentra esquematizado en la Figura 1.6.

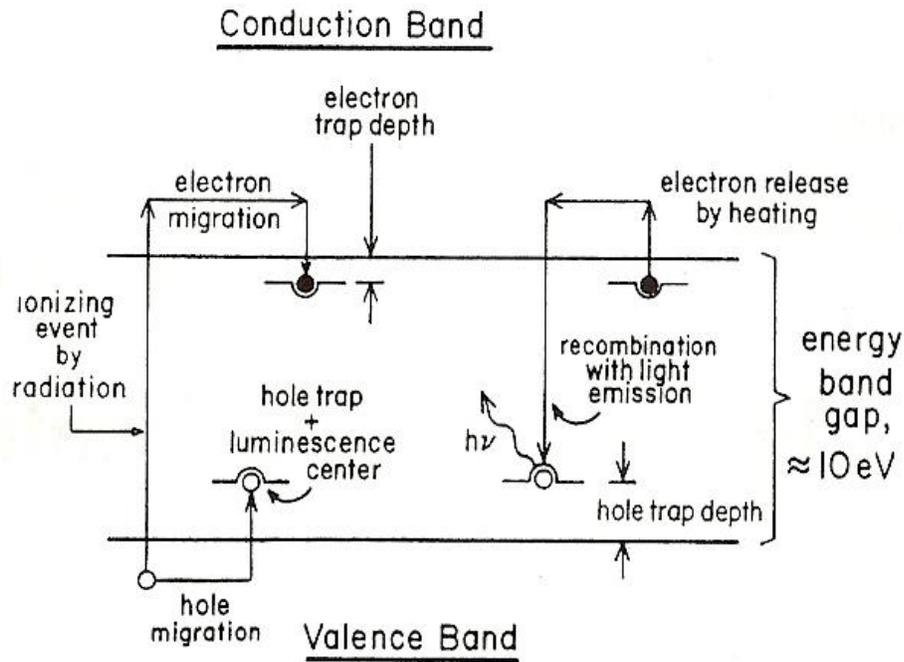


Figura 1.6. Diagrama de los niveles de energía del proceso termoluminiscente: a la izquierda se observa la ionización por la radiación y el atrapado de los electrones y huecos; mientras que a la derecha se observa el calentamiento que libera los electrones permitiendo la producción de luminiscencia [2].

Los DTL pueden encontrarse en diversas presentaciones en cuanto a forma y composición química. Uno de los más usados en aplicaciones médicas es el dosímetro comercialmente llamado TLD-100 que consta de un cristal de fluoruro de litio. Contiene impurezas de Mg y Ti en 300 ppm y 15 ppm, respectivamente. Tiene un número atómico efectivo de 8.2 y una densidad de 2.64 g cm^{-3} . El intervalo de dosis útil es de $100 \text{ }\mu\text{Gy}$ a 1 kGy . Sin embargo tiene tres desventajas importantes: (1) su sensibilidad a la luz ultravioleta, solar y fluorescente; (2) su carencia de uniformidad (ya que cada lote muestra una variabilidad en su sensibilidad) y (3) el desvanecimiento de la señal termoluminiscente con el transcurso del tiempo después de su irradiación [2].

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 su irradiación se procede a determinar su respuesta con un equipo lector, que consiste de una fuente de corriente que calienta una plancheta sobre la cual se colocan los DTL. La luz liberada al calentar hasta 300°C es capturada y transformada en una señal eléctrica por un tubo fotomultiplicador. La integral de la señal eléctrica durante un determinado intervalo de tiempo se denomina respuesta TL del dosímetro [42].

Los niveles de las trampas varían por lo 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 una gráfica llamada curva de brillo (ver Figura 1.7). Cada curva de brillo depende del tratamiento térmico previo a la irradiación, la rapidez de calentamiento, el campo de radiación y la cantidad de dosis absorbida. De modo que esta curva puede ser separada en varios picos correspondientes a las diferentes trampas que existen en el cristal [42].

Los DTL no son dosímetros absolutos por lo que es necesaria la calibración de los mismos con una fuente de radiación de referencia. Con irradiaciones a dosis conocidas se construye una gráfica de respuesta versus dosis que da como resultado la curva de calibración. Al irradiar los DTL en la fuente prueba, se obtiene una lectura que es sustituida en la ecuación de dicha curva para obtener la dosis.

Una desventaja de los DTL es que su respuesta es dependiente de la energía, o en su caso de la LET a al cual son expuestos [4]. De manera que si se está trabajando con un haz de radiación de PCP hay que multiplicar la lectura por un coeficiente de eficiencia relativa (η) para poder obtener la dosis.

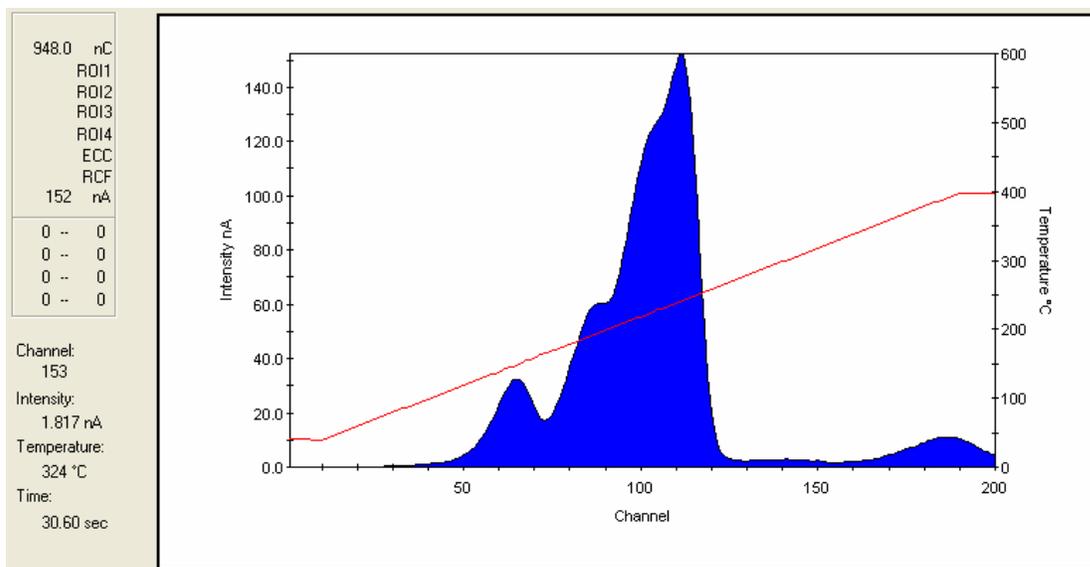


Figura 1.7 Curva de brillo para un dosímetro TLD-100 expuesto a un haz de radiación beta.

La eficiencia relativa se encuentra definida como la razón de la señal TL por unidad de dosis por unidad de masa irradiada medida para las PCP y la misma cantidad medida para la radiación de referencia (generalmente gammas):

$$\eta_{PCP,\gamma} = \frac{R_{PCP}/D_{PCP}}{R_{\gamma}/D_{\gamma}} \quad (\text{Ec. 1.15})$$

Donde R_{PCP} y R_{γ} son las señales TL por unidad de masa irradiada para PCP y gammas a dosis D_{PCP} y D_{γ} , respectivamente. Cuando se realizan este tipo de medidas es importante hacer las irradiaciones PCP y gamma en materiales que tengan la misma presentación, del mismo lote y el seguimiento de los mismos protocolos en todas las etapas del experimento.

1.5.2 Dosímetros de Película de Tinte Radiocrómico

La propiedad radiocrómica es la coloración que adquiere una sustancia al ser expuesta a radiación ionizante. Las películas de tinte radiocrómico (PTR) son dosímetros que se basan en esta propiedad. Generalmente constan de una capa de plástico flexible base sobre la cual se coloca la capa activa (sustancia radiocrómica) que consta de microcristales de un monómero. La intensidad de su

coloración corresponde proporcionalmente a la dosis absorbida; es decir; a mayor dosis, mayor opacidad de la película.

Existen distintos tipos de PTR que son comercializados masivamente y cada uno tiene propiedades específicas que se ajustan a las necesidades de caracterización de diversas fuentes radiactivas. Las PTR se utilizan especialmente en aplicaciones médicas por su buena equivalencia con el tejido biológico además de su alta sensibilidad y resolución espacial. No requieren la realización de alguna manipulación antes de ser expuestas ni un proceso de revelado después.

Al cambiar de color, la lectura que se obtiene de las PTR se puede obtener de dos formas:

- El primer método consiste en utilizar un espectrofotómetro o un densitómetro para medir la densidad óptica de las películas antes (DO_i) y después de la irradiación (DO_f). La respuesta óptica se define como la diferencia entre ambas cantidades:

$$R = DO_i - DO_f \quad (\text{Ec. 1.16})$$

- El segundo método consiste en obtener imágenes digitalizadas de las películas empleando un escáner. De esta manera se obtiene el tono de gris de PTR no irradiada (TG_{ni}) y la irradiada (TG_i). La respuesta óptica en este caso se define como:

$$R = \log_{10} \left(\frac{TG_{ni}}{TG_i} \right) \quad (\text{Ec. 1.17})$$

De modo que la disminución en el tono de gris implica que la película es más oscura por lo que la dosis que recibió fue mayor.

Al igual que los DTL, las PTR no son dosímetros absolutos por lo que es necesario hacer una calibración con un haz de referencia. La respuesta en función de la dosis será la curva de calibración. También resulta necesario seguir un protocolo para su uso y lectura de manera que se puedan garantizar resultados reproducibles [59].

2. Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

2.0 Generalidades

Localizada en el núcleo de toda célula eucariótica (mamíferas) se encuentra una macromolécula denominada ADN que almacena toda la información que la célula necesita para vivir. Por a estudios de difracción de rayos X fue posible descifrar la estructura del ADN. Hoy en día sabemos que consiste de dos hebras que forman una doble hélice de 2 nm de ancho. Cada hebra está compuesta por una serie de nucleótidos, cuya secuencia específica contiene el código genético para la síntesis de proteínas. El soporte del ADN tiene porciones de azúcar (desoxirribosa) y grupos fosfatos que se encuentran entrelazados por bases nitrogenadas con los correspondientes en la hebra contraria. Las bases son dos purinas: adenina (A) y guanina (G); y dos pirimidinas: timina (T) y citosina (C). Las bases deben ser complementarias; es decir, adenina sólo se aparea con timina mientras que la guanina se junta con la citosina (ver Figura 2.1). Se sabe que cada vuelta completa de la hélice tiene 3.4 nm de altura lo que equivale a 10 pares de bases.

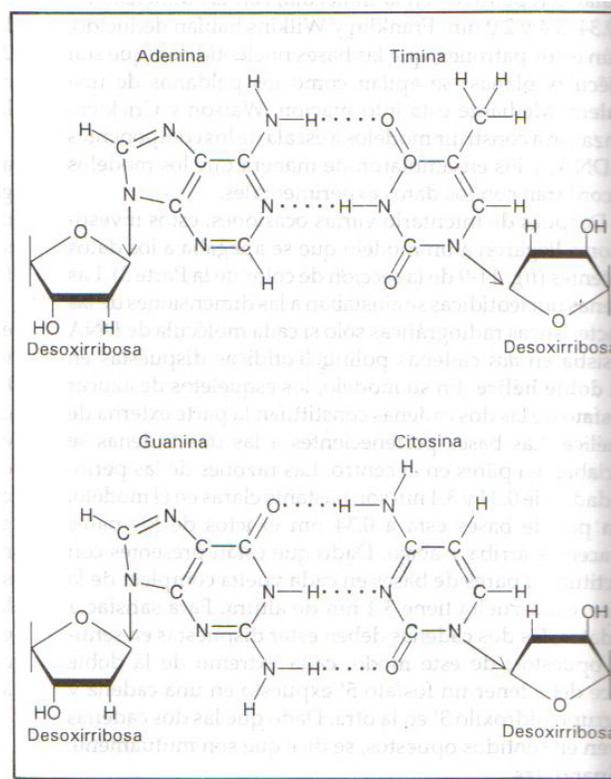


Figura 2.1 Diagrama de la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases A-T (con dos enlaces) y G-C (con tres enlaces). Notar que las dos cadenas de grupos fosfato y azúcar tiene sentidos opuestos, lo que permite el apareamiento de bases [55].

Existen algunas estimaciones de que la cadena del ADN en células eucarióticas puede llegar a medir dos metros de largo; por lo que resulta increíble que una molécula tan grande como ésta pueda estar confinada a un espacio microscópico dentro del núcleo de la célula. El ADN debe ser enrollado de tal forma que sea imposible que se pueda enredar en sí mismo. La doble hélice se enrolla dando aproximadamente dos vueltas a un conjunto de ocho proteínas moleculares llamadas histonas. Esta primera estructura se llama nucleosoma. Esto no resulta suficiente, por lo que los nucleosomas a su vez se enrollan formando una hélice apretada. La hélice se junta formando bucles que dan lugar a la cromatina extendida (Figura 2.2). Finalmente, cuando el ADN se copia para ser heredado, la cromatina debe condensarse para formar cromosomas.

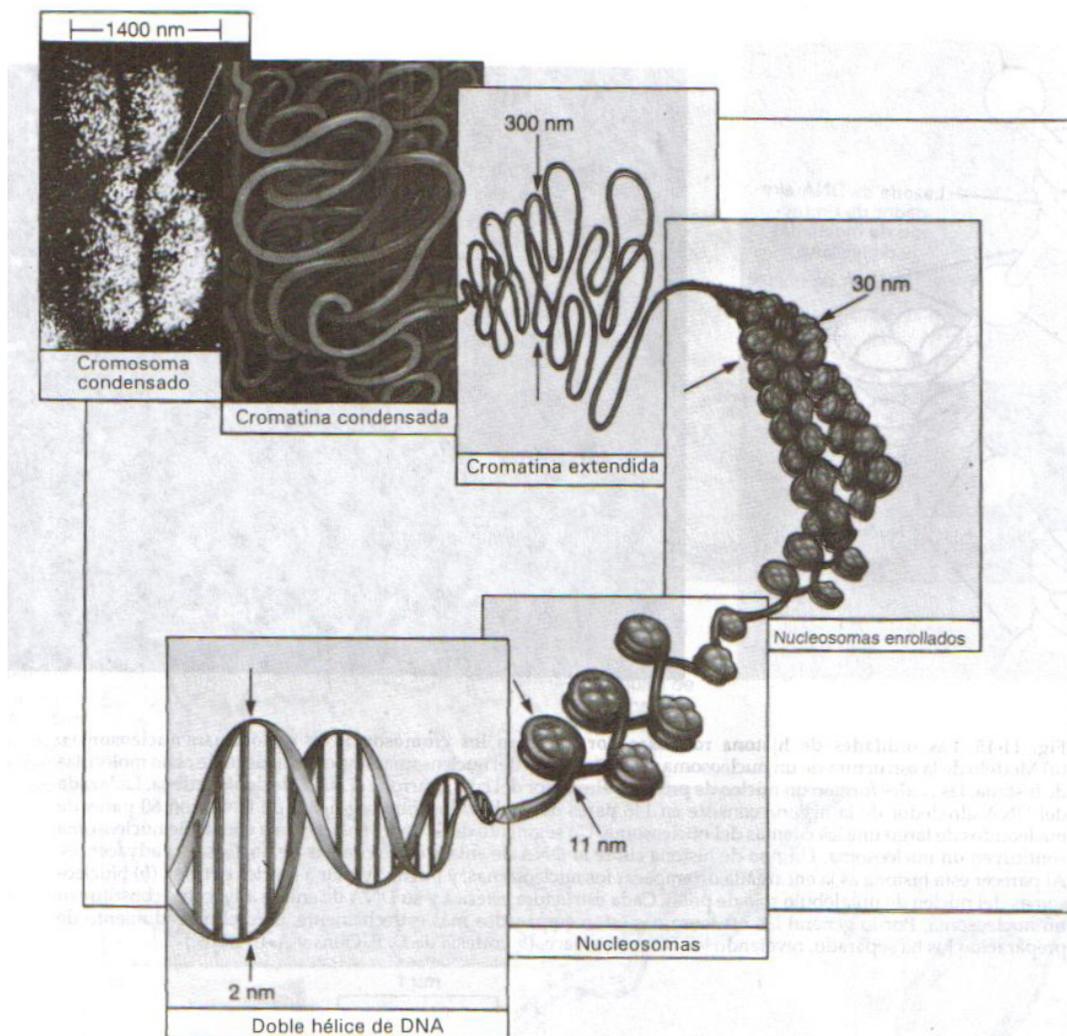


Figura 2.2 Diagrama de los diferentes niveles de organización del ADN eucariótico. Se comienza por la doble cadena de ADN enrollándose alrededor de 8 histonas. Los nucleosomas ahora se compactan hasta formar la cromatina [55].

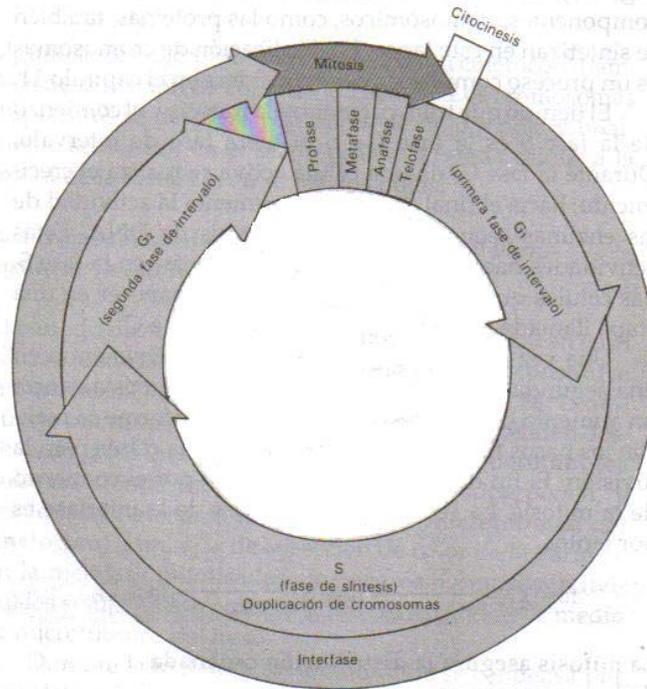


Figura 2.3 Esquema del ciclo celular de una célula eucariótica somática. El tiempo que le toma a las células pasar por las diferentes fases es específico a cada una [55].

La célula pasa la mayor parte de su vida en la interfase, es decir, la etapa entre divisiones celulares sucesivas (Figura 2.3). Es en esta fase en la que se sabe que los cromosomas se duplican para luego separarse y distribuirse entre los núcleos hijos. La interfase se divide en: fase G1, fase S y fase G2.

Durante la primera aumenta la actividad de las enzimas requeridas para la síntesis el ADN [55]. Luego, en la fase de síntesis o fase S, se lleva a cabo la separación de la doble hélice del ADN mediante una serie de enzimas. Además se sintetizan las copias complementarias por polimerización de las bases nitrogenadas y se vuelven a sellar las cadenas sintetizadas para dar lugar a la nueva macromolécula de ADN. Este proceso se le conoce como replicación semiconservativa ya que una cadena de cada hélice se conserva y es el template con el cual la nueva cadena es polimerizada. Es un proceso extremadamente rápido y preciso pues se calcula que ocurre sólo un error por un millón de bases sintetizadas [8]. Finalmente, la célula entra en la fase G2 en la que ocurre un aumento en la síntesis de proteínas conforme se realizan los pasos finales de la preparación de la célula para la división. Antes de entrar a cada fase, el ADN puede, mediante enzimas específicas, verificar que la duplicación se ha llevado a cabo de manera correcta y si no existe algún daño que comprometa su

integridad. Estos puntos de sondeo se conocen como ‘checkpoints’ y juegan un papel muy importante durante la reparación celular.

La mitosis (fase del ciclo celular en la cual los cromosomas se distribuyen entre los núcleos hijos) se lleva a cabo en las células somáticas y se pueden identificar cuatro fases: *profase*, *metafase*, *anafase* y *telofase*. Al final, se tienen dos células hijas con copias exactas de la secuencia de ADN de la célula madre. Por otro lado, las células gonadales deben poder dividirse de forma que el número de cromosomas sea constante en generaciones sucesivas. Esto lo brinda el tipo de división celular llamado meiosis. Durante ésta, la información genética de ambos progenitores se combina, de modo que cada célula haploide (sólo tiene un juego completo de cromosomas) resultante tiene una combinación virtualmente única de genes [55].

2.1 Genes y Mutaciones

La unidad funcional del ADN se denomina gen. Consta de un número determinado de pares de bases que contienen la información para la fabricación de las distintas proteínas que necesita la célula para vivir y/o para cumplir con su función. Combinaciones de tres bases nitrogenadas dan lugar a un codón, que al traducirse, formarán un aminoácido. Al juntarse en una secuencia específica (dada por el orden de las bases nitrogenadas) de aminoácidos se forman polipéptidos y proteínas. Sus funciones pueden ser estructurales, enzimáticas o de regulación. Todas las cualidades funcionales del organismo, que en conjunto se define como fenotipo, son dependientes de la estructura precisa y la expresión de los productos genéticos [8].

La producción de un polipéptido involucra dos tipos de ARN (ácido ribonucleico): mRNA (mensajero), copia del gen que se está expresando, y tARN (transferencia) que contribuye tanto a la transportación como a la unión de los aminoácidos. En células eucarióticas, las partes del gen que no codifican, llamadas intrones, deben ser removidas del mRNA antes de que traducción ocurra. La iniciación y terminación de la transcripción de un gen está regulada por otro juego de genes reguladores que se activan en respuesta a un cambio químico que tiene cierta duración, de modo que el resto de los genes permanece apagado.

Cuando existe un cambio en la secuencia de las bases del ADN se dice que ocurre una mutación. Los efectos pueden ser variados y dependen del tipo de célula en el que ocurrieron; si es en una célula reproductiva, es la descendencia quien presentará el efecto, mientras que si la célula es somática, es el individuo quien sufrirá las consecuencias.

Todos los seres vivos adquieren cambios a su ADN durante el transcurso de su vida. Algunas veces estas mutaciones se obtienen de un error al momento de la replicación del ADN, otras se generan con la exposición a agentes tóxicos. Sin embargo, la célula no está completamente indefensa ya que cuenta con un complejo mecanismo de reparación que identifica la mutación y la repara. A pesar de esto, dicho mecanismo puede fallar dejando que la mutación pueda ser transmitida a las siguientes generaciones.

2.2 Daño al ADN por radiación ionizante

Poco tiempo después del descubrimiento de los rayos X en 1895 y su subsiguiente uso en la medicina de diagnóstico se comenzaron a notar los efectos sobre el tejido humano. Entre los años 1911 y 1914 se reportan 54 casos de muerte debido a enfermedades radio-inducidas [45]. Por lo que la investigación sobre los efectos a la exposición a RI se hace relevante, naciendo así, la radiobiología.

En 1927 el genetista americano Joseph Muller descubre los efectos mutagénicos de los rayos X en células germinales (reproductivas) de la mosca de la fruta (*Drosophila*). Lamentablemente no fue seriamente tomado en cuenta por la comunidad médica hasta que ocurrió la detonación de las bombas atómicas en Hiroshima y Nagasaki durante la Segunda Guerra Mundial. Durante los años 50, debido a las pruebas de bombas atómicas, se desarrolla con rapidez la preocupación por entender los efectos genéticos e incluirlos como parte de las recomendaciones en la protección radiológica [45].

Hoy en día se sabe que la RI, al incidir sobre las células, puede interaccionar con cualquier molécula en su interior causando ionización. Una molécula ionizada, por lo general, presenta propiedades distintas a aquellas que son neutras y por ende su funcionamiento se ve alterado. De la misma manera el ADN puede verse afectado por la RI causando pérdida de información (bases nitrogenadas) o dar lugar a una mutación que puede dar origen a la división descontrolada conocido como tumor.

La interacción con el ADN se puede llevar a cabo de dos maneras:

- *Directa*: produciendo ionización directamente en las moléculas del ADN.
- *Indirecta*: el haz de RI produce ionizaciones en otras estructuras de la célula, creando radicales libres que causarán daño al ADN. Lo más común es la radiólisis del agua.

La manera tradicional de observar el daño causado al ADN debido a la exposición a RI es a través del estudio de aberraciones que se realiza en la primera metafase después de la agresión y en la cual se pueden discernir los cromosomas. Las aberraciones se pueden clasificar en: cromosómicas y de cromátides. Las primeras son producto de la irradiación en la interfase temprana antes de que la cromatina haya sido duplicada. Si la irradiación ocurrió en la parte tardía de la interfase, entonces se producen las aberraciones cromosómicas. Dos tipos de aberraciones cromosómicas letales son los anillos y los dicéntricos (ver Figura 2.4). Dos tipos no letales y muy comunes son las traslocaciones y las deleciones (ver Figura 2.5) [21].

En particular, la RI puede causar roturas de una sola cadena (SSB) o de doble cadena (DSB) del ADN. Si el rompimiento ocurre en una sola de las hebras del ADN entonces es de poca relevancia biológica en cuanto a la muerte celular se refiere, ya que puede ser reparada prontamente usando la hebra intacta como templete. Si tal reparación es incorrecta, entonces se tendrá una mutación que se hará evidente en la siguiente división celular. En cambio, si llega a ocurrir un rompimiento en ambas hebras y las lesiones están suficientemente separadas, entonces es posible la reparación, ya que aún hay suficiente ADN como templete. Pero si este rompimiento ocurre en el mismo lugar en ambas cadenas ocurre una rotura DSB [21].

La producción de SSB y de DSB depende en gran parte de la microdistribución espacial de la energía transferida o LET. Para ejemplificar su importancia, digamos que una partícula cargada produce 10 ionizaciones en una micra ($1 \mu\text{m}$), en promedio una ionización ocurre cada vez que la partícula recorre una décima de micra (100 nanómetros). Si por el contrario la partícula cargada produce 100 ionizaciones en una micra, entonces cada ionización ocurrirá cuando la partícula avance tan sólo 10 nanómetros (nm). De modo que la última se considera de alta LET ($\geq 10 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$) mientras que la primera sería de baja LET ($\leq 10 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$).

Sabemos que las hebras del ADN se encuentran a 2 nm de distancia, entonces aquella partícula que tenga por LET alrededor de $100 \text{ keV } \mu\text{m}^{-1}$ (considerada alta), tiene amplias posibilidades de producir una DSB en un solo evento, cabe recordar que para producir una ionización es necesario una energía cinética mayor a 4 eV. Por otro lado, radiación de menor LET necesita dos eventos para causar una DSB. Esto es, si por casualidad la ionización del segundo evento ocurre en cualquier molécula de la hebra opuesta a la que tiene la SSB producida por el primer evento, entonces se tiene una DSB. Si la dosis es alta, la probabilidad de que ambos eventos ocurran dentro de una escala temporalmente cercana aumenta.

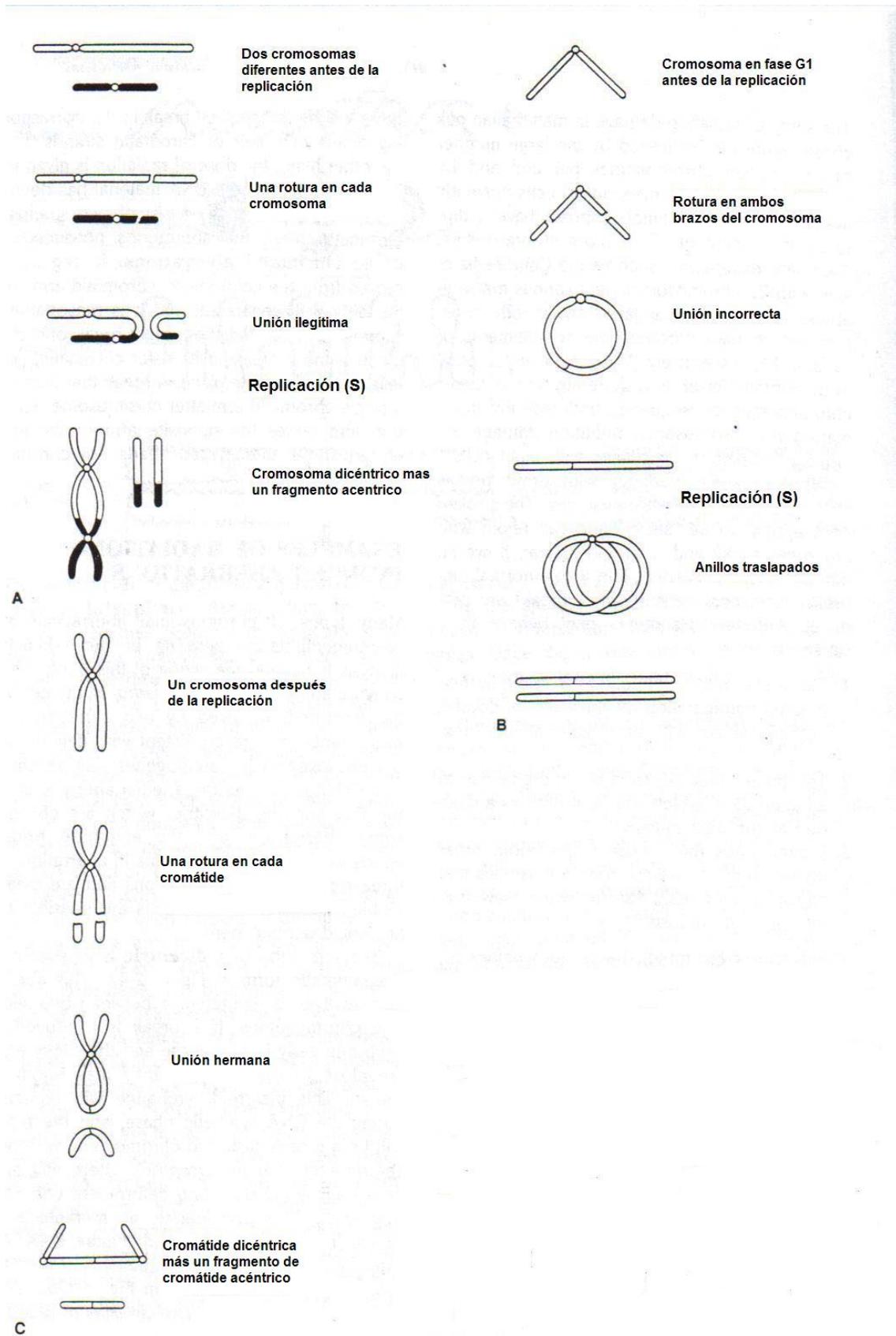


Figura 2.4. Diagrama que muestra los pasos para la formación de un dicéntrico (A), un anillo (B) y un puente anafásico (C) [21].

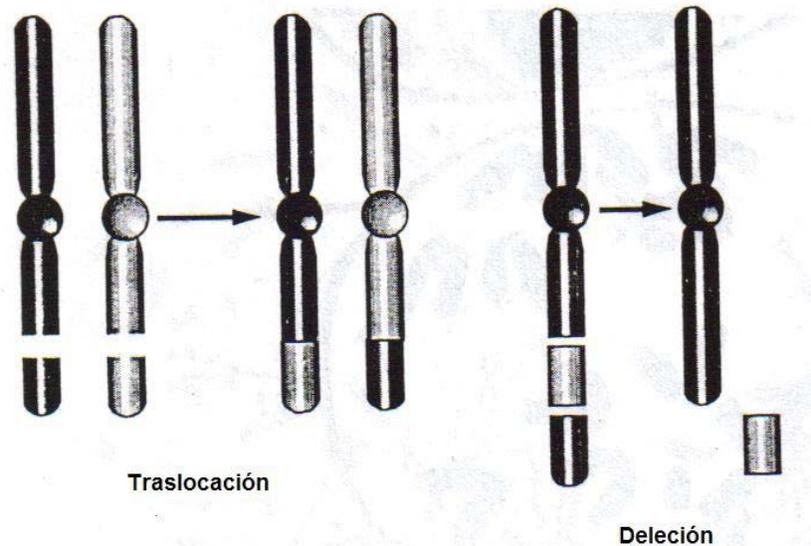


Figura 2.5. A la izquierda se tiene la ilustración de la formación de una translocación simétrica en la que la radiación causa roturas en ambos cromosomas y los pedazos son intercambiados. A la derecha se ilustra el proceso de formación de una delección en la que la radiación rompe en dos lugares al cromosoma de modo que el pedazo es insertado en el cromosoma erróneo [21].

Con todo lo anterior se ha adoptado una forma práctica de poder clasificar los efectos de la RI en seres humanos y que se utiliza con fines de protección radiológica [25]:

- *Deterministas*: Se presentan cuando la radiación ocasiona la muerte de una cantidad de células que no puede compensarse por la reproducción de aquellas que conservaron dicha capacidad, afectando a la función del órgano o tejido. Se espera que exista un umbral de dosis por debajo del cual no se observe daño. Arriba del umbral, el efecto y su severidad dependen de la dosis. Ejemplos son: cataratas, esterilidad, lesiones con necrosis posteriores.
- *Estocásticos*: Se originan cuando la radiación produce alteraciones en el código genético de las células. No se espera la existencia de un umbral de dosis como en los efectos deterministas. La probabilidad de que se presenten efectos depende de la dosis, pero la severidad no presenta relación con ella. Existe un periodo de latencia que depende de la rapidez de dosis, energía y factores de ambiente celular. Ejemplos son: leucemia, cáncer, alteraciones hereditarias.

2.3 Radiosensibilidad

La radiosensibilidad está definida en términos de la rapidez con que se manifiestan los daños inducidos por la RI. Se define como más sensible un elemento biológico en cuanto mayor es la respuesta a una dosis determinada de RI, y como radioresistente cuando necesita mayor dosis para alcanzar un efecto determinado.

La mitosis es la etapa del ciclo celular en la que las células son más vulnerables a la RI. Células que se dividen poco o ya no se dividen (diferenciadas) son las menos sensibles, mientras que aquellas que tienen una alta tasa de división celular resultan ser más radiosensibles [21].

2.4 Riesgo debido a exposición a dosis altas de radiación

Estimados de los riesgos a exposición a la RI se obtienen primordialmente de estudios epidemiológicos. Dichos estudios sólo pueden distinguir claramente los efectos biológicos a altas dosis [52].

El estudio más documentado es el de los sobrevivientes a las bombas atómicas en Japón donde algunos recibieron una dosis máxima de 1.2 Sv a cuerpo entero. Tan sólo tres años después de las explosiones ya se había registrado una frecuencia de casos de leucemia (cáncer de células sanguíneas) superior a la normal y la máxima incidencia se registró 10 años después [3]. Por lo que se encuentra bien documentado que una exposición prolongada o dada una sola vez a dosis de radiación considerada alta e intermedia (≥ 1 Sv) produce consecuencias nocivas en humanos, incluyendo, pero no exclusivamente, cáncer [6].

La documentación de que altas dosis de radiación pueden causar cáncer es extensa ya que se ha demostrado que la RI es un agente mutagénico y que las mutaciones en el ADN desempeñan un papel importante en la carcinogénesis. En sí, el proceso implica no sólo la exposición a un agente, sino la interacción de éste con el ADN, la reparación de la lesión (eficiente o ineficiente), la fijación del daño tras la replicación del ADN y el desarrollo de la lesión fijada para dar origen a una célula defectuosa que se replicará sin control formando un tumor [3].

Si se irradia por accidente el cuerpo entero a dosis mayores que 1 Sv se presentan síntomas que requieren de una vigilancia médica, pero si la dosis sobrepasa los 2 Sv, entonces resulta necesaria la hospitalización por aplasia medular.

Debido a la característica mutagénica de la RI, ésta también es usada para la destrucción de células cancerígenas. El procedimiento consta de irradiar la zona comprometida con altas dosis (del orden de Gy) durante tiempos determinados. Cada tipo de tumor tiene un protocolo a seguir basado

en numerosos estudios *in vitro* y clínicos que determinan las dosis máximas que pueden recibir los tejidos sanos que rodean al tumor. Los efectos secundarios al tratamiento pueden ser: falta de apetito, náuseas, vómito, diarrea, sensación de malestar, dolor de cabeza, cansancio, somnolencia y disminución de la cuneta de glóbulos rojos y blancos [3]. Sin embargo, en algunas ocasiones se ha documentado la reaparición de los tumores varios años después de terminada la sesión clínica.

2.5 Riesgo debido a exposición a dosis bajas de radiación.

El ser humano recibe en promedio una dosis anual de 0.002 Gy debida al campo de radiación natural o radiación de fondo. Hasta el momento no existe evidencia alguna de que esta exposición constante implique un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer. Sin embargo, ya sea por trabajo o por salud, millones de personas en el mundo se exponen a pequeñas dosis de radiación artificial. Actualmente, dicha exposición se encuentra regulada por leyes acordadas por cada país, basadas en las recomendaciones de distintas organizaciones mundiales como la ICRP (Comisión Internacional de Protección Radiológica) y el UNSCEAR (Comité Científico de las Naciones Unidas en los Efectos de Radiación Atómica), entre muchas otras. Así, el objetivo de la protección radiológica es permitir el aprovechamiento de la radiación, en todas sus formas conocidas, con un riesgo aceptable tanto para los individuos que la manejan como para la población en general y las generaciones futuras [3].

Según el UNCEAR, una dosis baja de RI, 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. Cuantitativamente se considera dosis baja si es menor que 0.2 Gy [54].

Para poder cuantificar los riesgos debidos a la exposición a bajas dosis, deben realizarse estudios extraordinariamente amplios. Para cuantificar el riesgo a 1 Sv se necesita una muestra de 500 personas, por lo que para estimar el riesgo a 0.1 Sv se necesitaría una muestra de 50,000 personas y 5 millones de personas sería lo óptimo para estimar el riesgo para 0.01 Sv. En otras palabras, para mantener la precisión estadística, el tamaño de muestra incrementa aproximadamente como el inverso del cuadrado de la dosis [6]. De modo que se ha optado por hacer estimaciones basadas en lo que sucede en exposiciones a altas dosis.

Hoy en día se proponen dos teorías opuestas sobre los riesgos potenciales de la exposición a bajas dosis: (1) no hay dosis de radiación que pueda ser considerada completamente segura y el uso de RI debe ser determinado en la base de un estudio de tipo riesgo versus beneficio; (2) el riesgo

debido a la exposición a dosis menores que una dosis umbral no es cuantificable y por ende podría ser inexistente [39].

La primera hipótesis que se expresa mediante el Modelo Lineal Sin Umbral (LNT por sus siglas en inglés) indica que no existe una dosis umbral a la cual ya no exista efecto alguno por exposición a la radiación ionizante. Esto significa que se utilizan los datos obtenidos a dosis altas y se hace una extrapolación lineal para estimar el riesgo a dosis bajas. El concepto de la relación lineal entre dosis y efecto surge de cuatro principios básicos de la radiobiología en 1950: (1) las mutaciones, espontáneas o inducidas, generalmente son dañinas; (2) cualquier dosis de radiación que llega a las células reproductivas conlleva algún daño genético; (3) el número de mutaciones producidas es proporcional a la dosis (altas y bajas dosis); (4) el efecto es independiente de la tasa a la cual la radiación es depositada y el espaciamiento entre exposiciones [45]. Hoy en día es en este modelo en el que se basan las organizaciones internacionales para sugerir los límites de dosis que protegen a la población.

Sin embargo, con el advenimiento de la genética molecular, el modelo LNT se encuentra bajo constante debate entre argumentos a favor y en contra. Procesos como los mecanismos de reparación del ADN, apoptosis, efecto 'bystander', adaptación (hormesis), entre otros, eran desconocidos cuando se propuso este modelo por primera vez; procesos que pueden modificar significativamente la forma lineal hasta ahora aceptada.

Se dice que el modelo LNT puede subestimar los riesgos. Existe evidencia de individuos que son hipersensibles a la radiación dentro de una población dada; que al sumar su curva de riesgo con el modelo LNT (válido para el resto de la población) se obtiene una nueva curva que pasa por arriba de la lineal. El efecto 'bystander', puede ser una alternativa que explique la sobreestimación. El efecto se caracteriza por respuestas excesivas a bajas dosis debido a la aparición de daño en células no irradiadas adyacentes a las irradiadas. Ha sido comprobado para radiación de alta LET y no existe información concluyente para radiación de baja LET [6].

Por otro lado, también existe evidencia de lo contrario, es decir, que el modelo LNT sobreestima los riesgos. El proceso de adaptación o radioresistencia inducida en el que una dosis pequeña decrece la radiosensibilidad de las células al ser posteriormente expuestas a altas dosis de RI, parece apuntar a que bajas dosis de radiación pueden ser benéficas para el ser humano. Sin embargo, los datos a veces son limitados e inconsistentes [39].

El argumento a favor del uso de la LNT es el denominado microdosimétrico y que puede ser explicado de la siguiente manera: Se expone una población celular a una dosis baja D_1 , la cual corresponde a un promedio de que por una célula atraviesa sólo un fotón. Además suponemos que

ésta causa un incremento en el riesgo a cáncer. Si ahora exponemos a una dosis 10 veces menor ($D1/10$), entonces sabemos que 10 veces menos células fueron dañadas. Lo que implica que la respuesta biológica básica decrece 10 veces a esta dosis, aún cuando la naturaleza del daño es la misma a $D1$ que a $D1/10$ [7]. De ahí que exista una relación uno a uno entre riesgo y dosis impartida.

El debate continúa y es preciso hacer más investigación *in vitro* e *in vivo* para entender los procesos internos y externos que la célula tiene para defenderse de agentes genotóxicos como la radiación ionizante. Sólo así, a través de la incorporación de dicha información, será posible hacer modelos cuantitativos más precisos para la estimación de riesgo a cáncer a exposiciones de bajas dosis.

3. Gen Ataxia Telangiectacia Mutado (ATM)

3.0 Generalidades

Las alteraciones en la secuencia del ADN pueden surgir de diversos cambios en los componentes del ADN, errores de replicación y daño directo al ADN. El gran reto para la estabilidad genómica proviene de agentes dañinos que pueden ser endógenos (producidos normalmente durante el metabolismo de la célula) o exógenos (del medio ambiente). Los daños causados pueden ser extremadamente citotóxicos si no son reparados, mientras que otros son mutagénicos y afectan la producción, estructura y función de las proteínas con consecuencias que varían desde el malfuncionamiento de la célula hasta la transformación maligna (formación de tumores).

Afortunadamente, la célula cuenta con varios mecanismos de detección y reparación que le permiten defenderse de esta constante amenaza. Sin embargo, el tipo y cantidad de daño producido puede ser tan grande que sobrepasa los mecanismos de defensa y la célula debe comenzar el mecanismo que la manda a la muerte programada (apoptosis) [48].

Uno de los mecanismos más complejos es el de reparación de daño tipo DSB. Consta de una red intrincada de secuencias de señalamientos que detienen temporalmente el ciclo celular mientras mantienen la estabilidad celular. Hoy en día se sabe que hay dos caminos para la reparación de DSB: (1) la unión no homóloga (NHEJ por sus siglas en inglés) que une los extremos libres del ADN, y (2) la recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés) que requiere del apareamiento homólogo de secuencias del ADN [27]. Estos mecanismos son activados principalmente por la acción de una única proteína cinasa llamada ATM.

Dicha proteína proviene del gen con el mismo nombre ubicado en el cromosoma 11q22-23. Está compuesto de 66 exones de los cuales 62 codifican para un mRNA de 13 kb [28].

La proteína es miembro de la familia PI3K, se localiza principalmente en el núcleo, y posee una masa molecular de 350.6 kDa de aproximadamente 3056 aminoácidos. Estructuralmente está formada por tres dominios principales (ver Figura 3.1): (1) dominio FAT, (2) dominio PI3K en el cual se ubica el grupo N-terminal que es requerido para la activación de p53 y (3) un dominio FATC en el cual se ubica un grupo C-terminal de aproximadamente 350 aminoácidos y que es similar al de otras proteínas de la familia como la ATR y ADNPK [52].

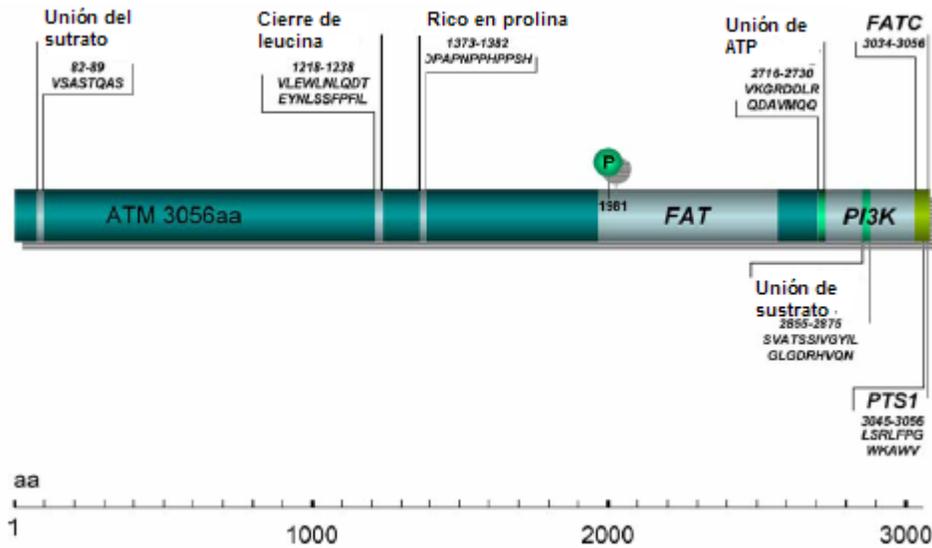


Figura 3.1 Esquema de la proteína de ATM indicando sus tres dominios principales y varios supuestos [28].

3.1 Función de la proteína ATM

Esta proteína, después de detectar la señal del daño sufrido, se autofosforila e inicia la cascada de señalización a través de la fosforilación de otros sustratos directamente relacionados con el ciclo celular.

Se ha observado que en respuesta a la exposición a radiación ionizante la actividad cinasa asociada al gen ATM fosforila a p53 en la serina 15, resultando en el aumento de su concentración intracelular. La proteína p53 es un activador transcripcional presente en distintos genes que codifican para la proteína p21 entre otros y que, al inhibir al complejo cinasa dsk2.ciclina E evita la progresión de la célula de la fase G1 a la fase S. Este mecanismo indica que la proteína ATM está involucrada en el control de síntesis del ADN. En las células que presentan Ataxia Telangiectasia (AT), también se ha encontrado deficiencia en la activación del 'checkpoint' en la fase G2/M del ciclo celular lo que implica de manera directa a p53 y por ende, a ATM [1].

Entre los sustratos involucrados en reconocer daño al ADN se encuentran la serina 139 de la histona 2AX, treonina 68 del Chk2 y la serina 957 del SMC1. También se encuentran aquellos involucrados en la respuesta a la agresión al RI como Brca1, Brca2 y Nbs1, proteínas que se encuentran mutadas en algunos cánceres humanos como el hereditario de mama [22].

La proteína ATM también interacciona con c-Abl activando un camino de señalización alterno que opera mediante otras cinasas reguladoras de estrés. Esto lleva a la inducción de genes vía c-Jun y la regulación del ‘checkpoint’ en el ciclo celular de manera independiente a p53 [1].

Otro blanco para la proteína ATM es IκB. Después de la exposición a la RI el blanco es fosforilado y disociado de NFκB dentro del citoplasma lo que le permite entrar al núcleo y actuar como un activador transcripcional de varios genes y desempeña un papel importante en la protección celular contra una variedad de estímulos apoptóticos, además de participar en la reparación del daño al ADN. La inhibición de NFκB puede desencadenar la radiosensibilización de la célula [35].

La ausencia de la proteína ATM o de alguno de sus substratos puede originar que la lesión subletal del ADN no sea reparada de manera efectiva. La inactivación de los puntos de control del ciclo celular (checkpoints), necesarios para la reparación, aumenta la inestabilidad celular [28].

A continuación se presenta un esquema (Figura 3.2) en el cual se encuentran algunas de las vías de acción de la proteína ATM:

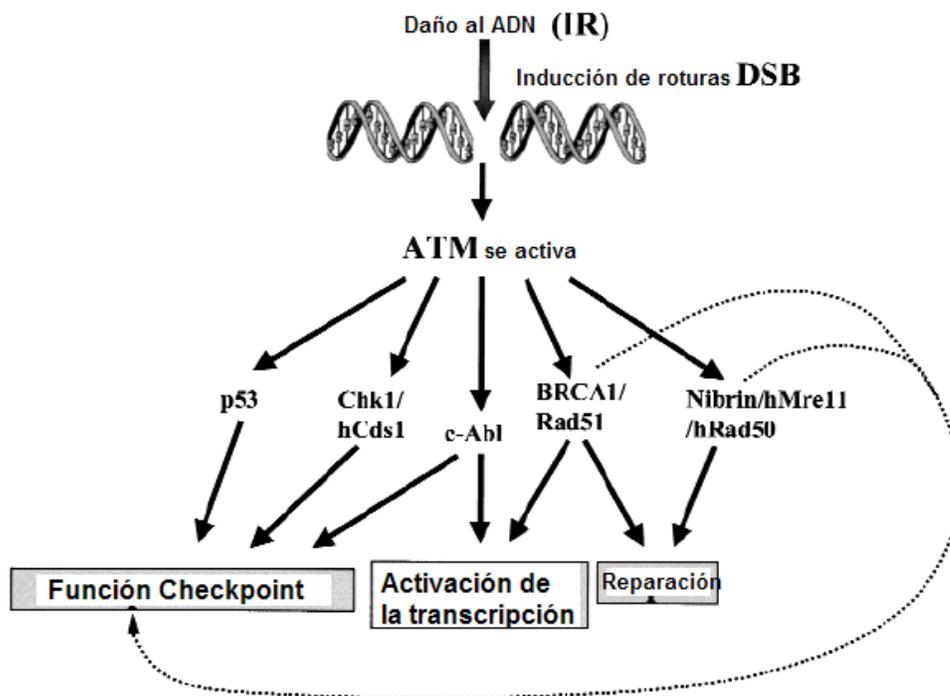


Figura 3.2 Esquema de las vías de acción de la proteína ATM y la función de los sustratos fosforilados [26].

3.2 Mecanismos de activación de la proteína ATM

La evidencia inicial indicaba que la activación de la proteína ATM involucraba la autofosforilación en la serina 1981. Sin embargo, experimentos recientes sugieren que es en realidad un complejo polimérico inactivo. Después de la aparición de un DSB, cada molécula fosforila la siguiente en la serina 1981 dentro del dominio FAT. Esto produce que se desliguen y se conviertan en monómeros activos. Así, al parecer la proteína ATM se divide en dos fracciones, una se adhiere a la cromatina y la otra se encuentra libre en el núcleo [48].

Se ha reportado que la proteína purificada no cambia su peso molecular en respuesta a la fosforilación, lo que indica que su forma multimérica es inestable o dependiente de otros factores desconocidos dentro de la célula. También se reporta la relación con tres componentes protéicos: Mre11, Rad50, y Nbs1. Al juntarse, forman un complejo funcional con actividades helicasa y nucleasa, dicho complejo se conoce como MRN [22].

La proteína ATM puede asociarse directamente con el complejo MRN y su interacción controla la señalización que influye algunos de los sustratos. Uno de ellos es la histona 2AX presente en la cromatina lo que hace que el complejo MRN junto con BRCA1 pueda identificar el lugar de la lesión. La proteína activa se une a todo este complejo y dispara todos los otros mecanismos de reparación in situ [30] (ver Figura 3.3).

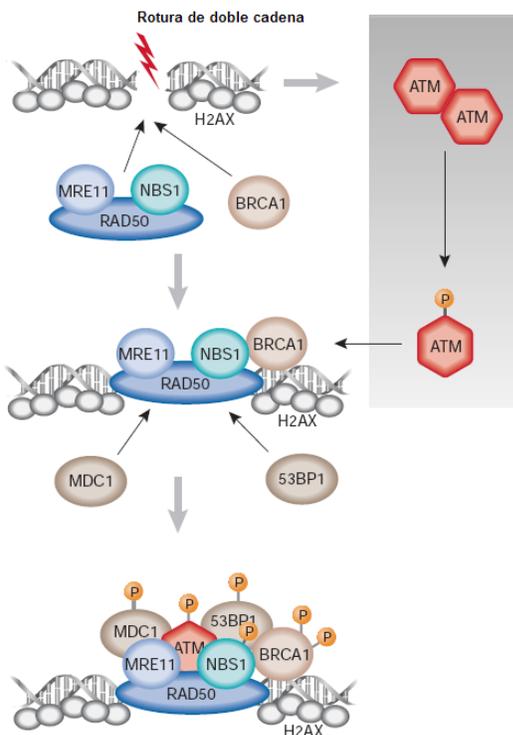


Figura 3.3 Mecanismo de activación de la proteína ATM al existir una rotura de doble cadena [30].

3.3 Enfermedad Ataxia Telangiectasia (AT)

La Ataxia-telangiectasia (AT) es una enfermedad autosomal recesiva degenerativa caracterizada por la neurodegeneración, inmunodeficiencia, hipogonadismo y susceptibilidad al cáncer. Generalmente se diagnostica en bebés que presentan un gateo inestable (ataxia), que refleja la degeneración cerebelar, y por la presencia de la dilatación de vasos sanguíneos de pequeño calibre (telangiectasias) en las conjuntivas y en otras partes de la cara. Los niños presentan en un 70% aproximadamente inmunodeficiencia que desencadena infecciones respiratorias reincidentes. Tanto como una tercera parte de los pacientes con AT desarrollan cáncer, siendo la mayoría de tipo linfóide. Algunos de estos cánceres se originan de células B y T e incluyen al linfoma de tipo Hodgkin y no-Hodgkin así como varias formas de leucemia [26]. De modo que los pacientes con AT generalmente mueren durante su segunda a principios de la tercera década de vida [46].

Células de pacientes con este síndrome presentan mutaciones en el gen ATM. Esto significa que se encuentran marcadas por una inestabilidad genómica resultado de una respuesta pobre a la reparación de daño al ADN de tipo DSB. Esto se manifiesta en la hipersensibilidad a la RI y a otros agentes químicos radiomiméticos como la Bleomicina [14,28].

Antes de que el gen ATM fuera clonado, una asociación con el cáncer de mama fue reportado por Swift et al. [50], al observar este tipo de cáncer en parientes de pacientes con AT. Fue sugerido que heterocigotos de AT fuesen el mejor candidato para la condición de predisposición asociada con alrededor del 5% de todos los cánceres de mama [26]. Otros genes de susceptibilidad para este cáncer son BRAC1 y BRCA2, sin embargo, la frecuencia de mutaciones en dichos genes es baja en la población en general, lo que atribuye a cada uno menos del 1% de los todos los casos de cáncer de mama [1].

También se ha reportado que los cromosomas 7 y 14 son los más afectados con aberraciones tipo inversión y de traslocación, en pacientes con AT. Los 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 que el rearrreglo de dichos genes durante la maduración linfocítica puede ser una explicación a la inmunodeficiencia característica de este síndrome [28].

Estudios epidemiológicos indican que la ocurrencia de pacientes con AT se encuentra entre 1 en 40,000 a 1 en 300,000 por nacimiento en las poblaciones de los EEUU y de Europa, respectivamente [1]. De la población en general del 0.35% al 1% es heterocíga para el gen ATM con algunas variaciones en diferentes poblaciones étnicas [50].

3.4 Mutaciones en el gen ATM

Mutaciones en el gen ATM originan cambios conformacionales en la estructura de la proteína ATM, en la activación de la función cinasa o en la alteración de la estabilidad de la molécula primaria. El estudio de las mutaciones que presentan pacientes que sufren de AT, revela que son únicas y se encuentran distribuidos uniformemente a lo largo del gen ATM. La misma mutación para ambos alelos del gen ATM es presentado por muy pocos pacientes [1].

Hasta el momento, se han descrito 36 polimorfismos del gen ATM. En los heterocigotos, el 70% de las mutaciones originan proteínas truncadas, el restante 30% son mutaciones de cambio de sentido y una pequeña fracción presenta mutaciones de tipo inserción/delección [26].

En una compilación de tres publicaciones, se reportan hasta 75 mutaciones en los pacientes con AT. Varias se ubicaron en el marco de lectura del transcrito, en lugares que aparentemente no son puntos calientes (hotspots). También menciona que ninguna de las mutaciones encontradas es la responsable de la elevada inestabilidad del transcrito de ATM [32].

4. Método de electroforesis en gel unicelular (COMETA)

4.0 Generalidades

El método de electroforesis en gel unicelular o ensayo cometa es un método fluorescente microscópico que permite observar el daño producido al ADN en células individuales [57]. El primer intento por desarrollar este método fue en 1984 cuando Ostling y Johanson se basaron en la migración del ADN en un campo eléctrico. Las células embebidas en agarosa se sumergen en una solución de lisis. Si el ADN contiene roturas, entonces hay un relajamiento del enrollamiento tal que al ser sometido a una electroforesis breve, los extremos de los fragmentos de ADN están libres para migrar hacia el ánodo. Si no hubo daño, la falta de fragmentos previene la migración. De este modo, la longitud de migración del ADN se tomó como un indicador de la cantidad de roturas de ADN en células individuales [38]. En la Figura 4.1 se muestran los pasos básicos del protocolo del ensayo cometa.

El nombre de ensayo cometa proviene de lo que se observa en el microscopio al momento de teñir las laminillas con un tinte fluorescente que se adhiere al ADN. Aquellos fragmentos grandes que no migraron se quedan concentrados en el núcleo mientras que los fragmentos más pequeños que logran migrar en una dirección específica forman una cola que sale del núcleo. Por ende, lo que se observa son los núcleos en forma de cometas (ver Figura 4.2).

Para 1988, Singh y col. usan un pH alcalino (> 10) que deja que el ADN pueda desenrollarse durante la lisis y la electroforesis, incrementando así su sensibilidad. Se volvió una forma popular de medir la suma de los daños tipo SSB y DSB generados por diversos agentes genotóxicos [57]. Hoy en día se le conoce como *método cometa alcalino* y es el más usado.

El ensayo fue modificado por Olive y col., para hacerlo sensible a la estimación de daño tipo DSB sin la interferencia de roturas SSB. El procedimiento implica un tratamiento extendido de lisis a 50°C a pH 8.3, condiciones bajo las cuales la matriz nuclear es fragmentada de modo que se observa el comportamiento de roturas DSB. Otros autores [37, 57] han refinado esta nueva versión que hoy en día se le conoce como *método cometa neutro* [16].

Así que dependiendo del pH usado en la lisis y la electroforesis la sensibilidad de la técnica puede ser modificada por lo que hay que tener muy claro cuál es el propósito del estudio para poder aplicar la versión correcta [43].

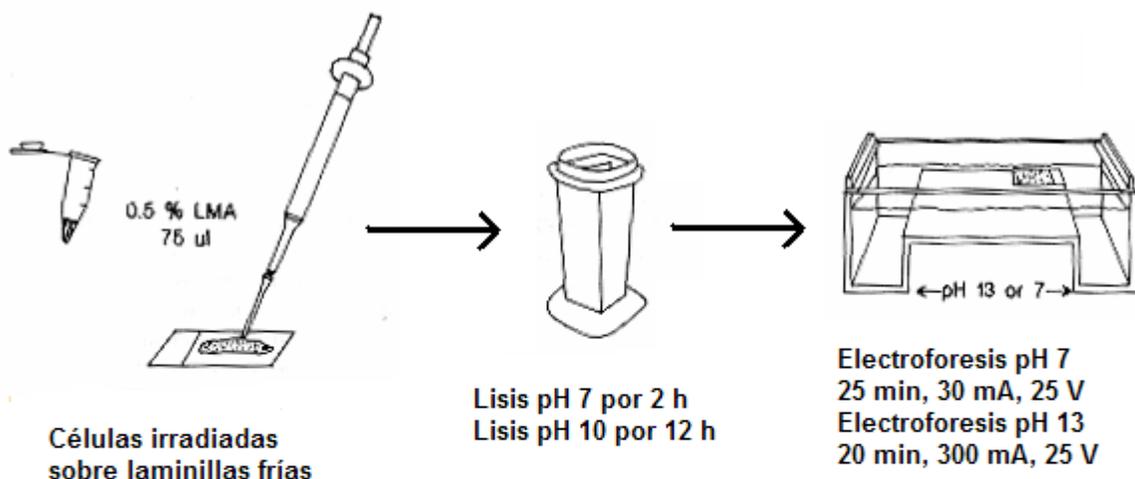


Figura 4.1 Esquema del protocolo a seguir para la realización del ensayo cometa en cualquiera de sus dos versiones [43].

A lo largo de la década pasada, el ensayo cometa se ha convertido en uno de los métodos estándar para la evaluación del daño al ADN con aplicaciones en genotoxicidad, monitoreo biológico, ecogenotoxicidad, epidemiología molecular, así como también en investigación fundamental en daño al ADN y su reparación [15].

4.1 Ventajas y Desventajas

Dentro de las ventajas de este ensayo se encuentran: (1) la información puede ser colectada de manera individual célula por célula, (2) se necesita solo una pequeña cantidad de células, (3) se puede aplicar a casi cualquier población de células eucarióticas, (4) el método resulta ser sensible, simple y económico, (5) la información se obtiene después de unas horas posterior al muestreo, entre otras [43].

Por otro lado esta técnica tiene algunas desventajas. Existe una limitación práctica en la cantidad de células que pueden ser analizadas. A lo mucho, de 6 a 10 laminillas pueden ser contabilizados por hora si se analizan manualmente y unas 50 laminillas si se utilizan sistemas automatizados. Otra limitación es el requerimiento de una suspensión celular viable, ya que si se componen primordialmente de células necróticas o apoptóticas no se puede obtener una información precisa sobre el tipo de daño. Además, el ensayo cometa no puede dar información acerca del tamaño de los fragmentos de ADN pues éstos relajan el enrollamiento del ADN y son sólo los extremos libres los que migran [38].

La interpretación de los resultados arrojados por este ensayo se ve complicado por el hecho de que no existe una relación simple entre la cantidad de daño al ADN causado por un agente químico específico y el impacto biológico de tal agresión. Cada sustancia o medicamento puede diferir en términos del número de roturas de ADN que están asociadas a un efecto biológico dado. De modo que se recomienda la comparación del ensayo cometa con otro tipo de ensayo que pueda medir daño para poder interpretar la relevancia biológica [38].

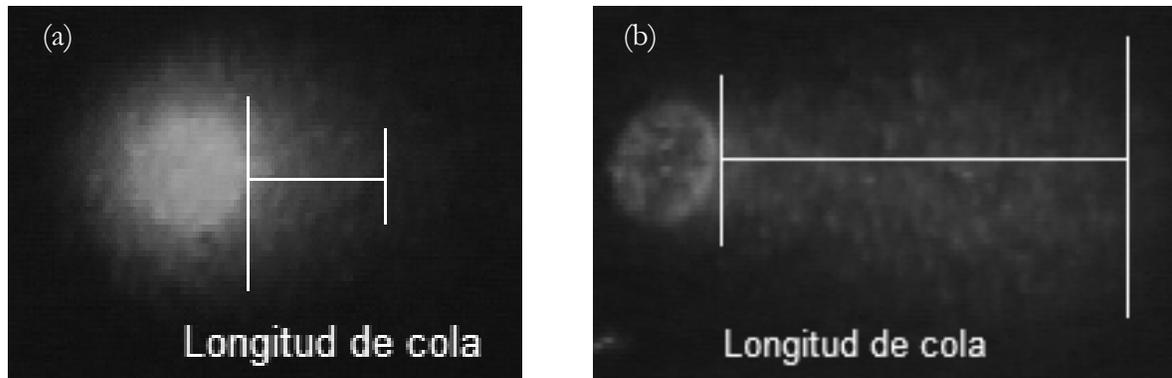


Figura 4.2 Imágenes en blanco y negro de cometas neutro (a) y alcalino (b) producidos por exposición a una misma dosis de radiación alfa (este trabajo). El parámetro de daño denominado ‘longitud de cola’ es la distancia entre el final de la cabeza y el último punto distinguible de la cola del cometa, como se muestra en las imágenes.

4.2 Implicaciones de los métodos de análisis

La manera más sencilla de obtener información se basa en determinar la proporción de células con daño, es decir, aquellas que exhiben migración contra aquellas que no lo presentan. Sin embargo, la extensión del daño no puede ser inferida de estos datos. Por lo que generalmente se mide el parámetro llamado *longitud de cola* o la distancia que ha recorrido el ADN en la migración. Se encuentra directamente relacionado con el tamaño del fragmento y se espera que fuese proporcional al daño producido al ADN [43].

El ojo humano puede ser fácilmente entrenado para discernir los diferentes grados de daño a modo de poder clasificar los cometas en cinco clases; siendo 0 para cometas sin cola y 4 para cometas muy largos. Un problema con la longitud de cola es que incrementa sólo mientras las colas se comienzan a establecer a bajos niveles de daño. Subsecuentemente la cola incrementa en intensidad pero no en longitud conforme el daño aumenta [16]. Sin embargo, la desventaja es que el

conteo de los cometas siempre debe llevarse a cabo por la misma persona a modo de evitar diferencias entre individuos.

Otra forma de análisis, que se ha vuelto muy popular por su rapidez, es el de toma de imágenes digitales de cada cometa. Esto permite obtener dos parámetros: la cantidad de ADN que ha migrado en la cola, expresado como el porcentaje de ADN y medido como intensidad de fluorescencia; y su versión más sofisticada y popular llamada *momento de cola*. Éste último fue propuesto por Olive y col., y básicamente se refiere a la multiplicación de la longitud de cola por el porcentaje de ADN en la cola. Se ha reportado un comportamiento lineal conforme al aumento de dosis de RI. La forma específica en que se calcula el momento de cola varía entre los programas computacionales, lo que implica diferencias cuantitativas que pueden ser problemáticas al momento de comparar datos entre laboratorios [11].

Existen diferentes sugerencias de tamaños de muestra para obtener una buena estadística. Si el objetivo del proyecto es sólo hacer un 'screening', se recomienda el conteo de 50 cometas por laminilla [15]. Si la población celular es heterogénea, entonces es necesaria una muestra mayor.

En la cuarta reunión internacional del Trabajo de Grupo sobre Genotoxicidad llevada a cabo en septiembre del 2005 en California, se llegó al consenso de que el análisis vía imágenes digitales es preferido pero no requerido. También se expuso que el porcentaje de ADN es el parámetro que muestra una respuesta lineal con respecto a la dosis en un rango amplio, además de ser el más fácil de entender intuitivamente. Si se decide utilizar el momento de cola, entonces es necesario presentar alguna otra gráfica con otro parámetro como el porcentaje de ADN o la longitud de cola [11].

5. Antecedentes

5.0 Antecedentes

Los efectos biológicos a largo y corto plazo por exposición a altas dosis de radiación ionizante han sido bien documentados en sistemas mamíferos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, bajo circunstancias normales los humanos se encuentran expuestos a dosis bajas de RI por lo que riesgos carcinogénicos a dosis del orden de unos cuantos mGy son relevantes. Debido a que el posible riesgo a desarrollar cáncer por exposición a dosis bajas (< 0.2 Sv) es demasiado pequeño para poder ser inferido directamente de estudios epidemiológicos, organizaciones mundiales como la UNSCEAR y el comité BEIR VII de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos Americanos usan el modelo Lineal sin Umbral (LNT por sus siglas en inglés) que extrapola dichos riesgos de la información proporcionada de exposición a altas dosis [53, 34].

La aproximación LNT se ha vuelto objeto de debate desde el advenimiento de la biología molecular. La reparación del ADN, la hormesis y el efecto 'bystander' entre otros fenómenos ponen en duda la estimación del riesgo dada por el modelo LNT ya que pueden estar sobre o subestimados [5-7, 18, 51].

En el 2005, Ding y col. [17], usaron la técnica de microarreglos para observar qué genes se activan al tratar de reparar el daño causado por exposición a rayos X. Reportan que el porcentaje de genes que respondieron a bajas dosis siempre fue menor que el de altas dosis. En particular, aquellos que fueron activados a bajas dosis son los responsables de la señalización entre células y de la respuesta al daño al ADN. Concluyen diciendo que el hecho de que exista una pronta reparación del daño a bajas dosis y no a altas dosis, indica que existen diferencias importantes que repercuten en la sobrevivencia de la célula y es necesaria su investigación. En otro estudio realizado por Short y col. [49], encuentran que células, provenientes de líneas celulares de cáncer humano, expuestas a dosis bajas (< 1 Gy) de RI presentan activación de genes promotores de la reparación celular después de ser expuestas a dosis tan bajas como 0.1 Gy y que dicha señalización aumenta de manera lineal conforme incrementa la dosis.

Ciertamente el interés en esta línea de investigación proviene, en gran parte, de proponer mejoras en la protección del personal ocupacionalmente expuesto (POE). La mayoría de los trabajos de investigación publicados hacen referencia al daño provocado por exposición a rayos X y rayos γ , probablemente debido a que estos tipos de radiación son los más utilizados en radioterapia y

radiodiagnóstico. Sin embargo, el crecimiento en el uso de otros tipos de radiación como lo son la radiación beta y otras partículas cargadas pesadas, en medicina nuclear y en la industria hace relevante el estudio de los efectos biológicos que pueden ocurrir a nivel celular.

Es importante recordar que cada tipo de radiación ionizante interacciona de manera diferente con la materia, por lo que es de esperar que los efectos biológicos sean distintos. El número de partículas que pasan por una célula está descrito por una distribución de Poisson. A bajas dosis, el daño al ADN se debe principalmente por el paso de una sola partícula; que si pertenece a radiación de baja LET, muy probablemente, provocará roturas de una sola cadena. Al incrementar la dosis la probabilidad de que más partículas atraviesen la célula aumenta de modo que a dosis suficientemente altas, las roturas de doble cadena se vuelven el tipo de daño predominante, sin importar el tipo de radiación incidente.

Para enfatizar lo anterior, Mill y col. [31], presentan un trabajo en el que exponen linfocitos de sangre periférica a varias dosis (> 0.2 Gy) de cuatro tipos de radiación dentro de un rango de LET de 0.26 a 43.8 keV μm^{-1} , para luego determinar el daño genotóxico causado. Encuentran una dependencia de eficacia biológica relativa (RBE) con la dosis entre partículas alfa, partículas beta y neutrones con respecto a rayos X. Las tres curvas son diferentes, implicando una diferencia en el daño biológico causado por cada una.

En otro estudio realizado por Cleasson y col. [13], se reporta que la RBE para la inducción de roturas DSB por partículas alfa con respecto a rayos X es de 3.1, mientras que con respecto a rayos gamma es de 2.1. Además, la distribución de DSB es no aleatoria para la radiación de alta LET y aleatoria para la radiación de baja LET. Esto último se encuentra reportado también en el trabajo de Höglund y col. [23] en el que compararon el daño producido por rayos γ , partículas alfa e iones de nitrógeno. Concluyen que la LET provoca un pronunciado efecto en la distribución inicial de fragmentos de ADN. De este modo, ambos estudios demuestran la existencia de una marcada diferencia en el daño biológico causado por radiación de alta y de baja LET.

En el presente estudio se investigó la producción inicial del daño de tipo SSB y DSB inducido en una línea celular homocigota recesiva para el gen ATM y linfocitos aislados de sangre periférica al ser expuestos a radiación beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) y radiación alfa (^{241}Am).

Líneas celulares obtenidas de pacientes que presentan Ataxia Telangiectasia (AT) representan un modelo interesante para el estudio de los efectos a bajas dosis de RI. La AT es una enfermedad autosomal recesiva causada por mutaciones en el gen ATM. Se encuentra caracterizada por una hipersensibilidad a la RI y un consecuente aumento en la incidencia de desarrollo de cáncer debido

a la imposibilidad de la correcta reparación del daño tipo DSB [48]. Varios estudios han reportado que presentar la heterocigocidad aumenta el riesgo a desarrollar cáncer de mama, en particular se encontró que de 9 a 18% de los casos de cáncer de mama en los Estados Unidos podría ser atribuido a tal heterocigocidad [50]. Esto sólo marca la relevancia que tiene el estudio de los efectos celulares en líneas celulares de AT.

Para distinguir entre los dos tipos de daño se hizo uso del método de electroforesis en gel unicelular, mejor conocido como ensayo cometa. Este se encuentra entre los métodos más usados por su alta sensibilidad y simpleza para la determinación de daño genotóxico. Introducido por vez primera por Ostling y Johanson en 1984, el ensayo cometa fue diseñado en sus inicios para medir roturas de una sola hebra del ADN (SSB) [38] obteniendo el nombre de ensayo cometa alcalino. Años mas tarde, Olive y col. desarrollaron una nueva versión sensible a DSB llamándolo ensayo cometa neutral [57]. La diferencia entre ambas versiones radica únicamente en el pH utilizado durante los pasos de lisis y electroforesis, siendo típicamente de diez y trece, respectivamente, para el alcalino y de alrededor de ocho en ambos casos para el neutro.

6. Planteamiento del Estudio

6.0 Planteamiento del Estudio

El daño al ADN en el núcleo es el evento iniciador por el cual la radiación ionizante puede causar efectos nocivos en órganos y tejidos del cuerpo humano. En particular, la doble rotura de cadena del ADN (DSB) se considera como el candidato más probable a causar daño crítico. Las ionizaciones a lo largo de la trayectoria de las partículas tienen la capacidad de poder provocar este tipo de daño, que en la ausencia de una reparación eficiente, podría resultar en daño a largo plazo aún a las dosis más bajas [53].

El daño biológico producido por exposición a bajas dosis de radiación de baja LET, como lo son las partículas beta, se encuentra a lo largo de las trayectorias de las partículas del haz que actúan de manera independiente. A dosis más altas la cantidad de partículas aumenta de modo que es posible observar un efecto sinérgico entre ellas, mostrando una pérdida en la linealidad de la curva dosis-efecto. Para radiación de alta LET, como lo son las partículas alfa, se espera que la linealidad se mantenga para altas y bajas dosis [21].

Estudios explorando el daño causado por altas dosis (> 0.5 Gy) de radiación beta indican una gran producción de DSB. Estos resultados son esperados puesto que la probabilidad de que dos eventos primarios causen daño en sitios opuestos de ambas cadenas del ADN aumenta con la dosis. De la misma manera, conforme disminuye la dosis (≤ 0.2 Gy) se espera que la producción de DSB fuese cada vez menor. A bajas dosis, a lo largo de las trayectorias de las partículas se deberían producir de manera predominante roturas en una sola hebra del ADN (SSB) en vez de daño tipo DSB.

En el 2005, se realizaron dos estudios en el laboratorio de Genómica Toxicológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en los que irradiaron líneas celulares con diferentes estatus génico para el gen ATM con bajas dosis (≤ 0.12 Gy) de radiación beta suministrada por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. El primero reporta un aumento significativo en el daño genotóxico a partir de una dosis de 0.4 Gy en células homocigotas recesivas y de 0.8 Gy en las dos líneas celulares heterocigotas al ser irradiadas de manera fraccionada [29]. El segundo estudio reporta un aumento significativo de daño genotóxico en dos de las cuatro líneas celulares heterocigotas al ser irradiadas con 0.12 Gy de radiación beta [32]. Ambos confirman el hecho de que bajas dosis de radiación considerada de baja LET son capaces de inducir daño de tipo DSB por arriba de los niveles basales.

En el presente trabajo se desea verificar el daño predominante causado por bajas dosis de radiación beta y alfa mediante el uso de la técnica de cometa en sus dos versiones: alcalina y neutra. La primera está diseñada para la detección preferentemente de daño tipo SSB, mientras que la segunda es sensible a daño de tipo DSB.

6.1 Hipótesis

Por la alta radiosensibilidad que presentan las células homocigotas recesivas para el gen ATM, debido a su baja capacidad de reparación del daño al ADN, se espera que la exposición a bajas dosis de radiación de baja LET cause principalmente roturas de una sola cadena mientras que exposición a bajas dosis de radiación de alta LET producirá predominantemente roturas de doble cadena. Se espera que la exposición bajo las mismas condiciones mencionadas de linfocitos aislados de sangre periférica de un individuo sano no permita la detección de daño al ADN por la capacidad de reparación que presentan.

6.2 Objetivo General

Verificar el principal tipo de daño (SSB o DSB) producido por bajas dosis de radiación beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) y de radiación alfa (^{241}Am) mediante el uso del método de electroforesis en gel unicelular en su versión alcalina (sensible a SSB) y su versión neutra (sensible a DSB) a través de la medición de la 'longitud de cola' de los cometas.

6.3 Objetivos Específicos

- 1) Comparar la longitud de cola promedio de los cometas obtenidos de la versión alcalina (proporcional a la cantidad de roturas SSB) con la longitud de cola promedio obtenida de la versión neutra (proporcional a las roturas DSB) del ensayo cometa que produce la exposición a radiación beta y alfa en células de una línea celular linfoblastoide homocigota recesiva para el gen ATM como modelo celular radiosensible.
- 2) Comparar la longitud de cola promedio de los cometas obtenidos de la versión alcalina (proporcional a la cantidad de roturas SSB) con la longitud de cola promedio obtenida de la versión neutra (proporcional a las roturas DSB) del ensayo cometa que produce la exposición a radiación beta y alfa en linfocitos aislados de sangre periférica como modelo celular sano.

7. Materiales y Métodos

7.1 Fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$

La fuente radiactiva de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ es propiedad del Instituto de Ciencias Nucleares (ICNUNAM) y fue prestada al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBUNAM) para la realización de este trabajo. Consta de un cilindro metálico de aproximadamente 0.2 cm de diámetro y 1 cm de altura. El ^{90}Sr decae al ^{90}Y emitiendo betas con una energía máxima de 0.546 MeV y tiene una vida media de 28.7 años. Posteriormente el ^{90}Y decae al ^{90}Zr emitiendo betas con energía máxima de 2.28 MeV y su vida media es de 64 horas [60].

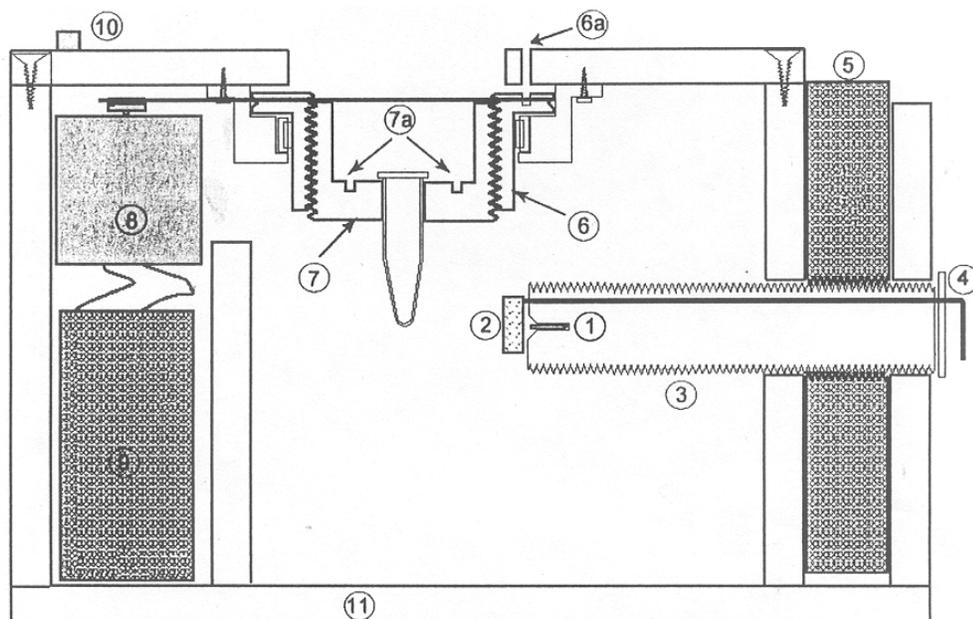
La fuente se encuentra dentro de un irradiador que fue construido por el Fís. Alejandro Rodríguez como proyecto de tesis de licenciatura [42]. El irradiador tiene el fin específico de impartir una dosis entre 10 mGy y 2 Gy a una muestra biológica en un volumen mínimo de 100 μl con una uniformidad igual o mayor al 90%.

Como se muestra en la Figura 7.1, la fuente (1) se encuentra montada sobre un tornillo de nylon (3) dentro de una caja de lucita. La caja también cuenta con un portamuestras (7) que puede girar gracias a un motor (8), haciendo que la dosis impartida a la muestra sea uniforme. También permite modificar la distancia de irradiación al girar un disco de nylon (5) que, a su vez, mueve el tornillo con la fuente. De este modo es posible lograr distintas tasas de dosis.

El irradiador cuenta con un manual de manejo que incluye una tabla [Anexo 1] en la cual se puede consultar el tiempo de exposición según la distancia y la dosis que se quiere impartir a la muestra. Ésta surge de una curva de tasa de dosis con respecto a la distancia de irradiación que se obtuvo de irradiar PTR a distintas distancias. Con la ecuación de dicha curva es posible saber la tasa de dosis a cualquier distancia que se desee, lo que da plena libertad de poder escoger tiempos adecuados de irradiación.

7.1.1 Antecedentes de la caracterización de la fuente

Las características dosimétricas del irradiador fueron reportadas en diciembre del 2002. En esa fecha, se encontró que la fuente entregaba una tasa de dosis de $11.5 \pm 0.3 \text{ mGy min}^{-1}$ a una distancia de 1.6 cm. Este dato fue obtenido a través del uso de películas de tinte radiocrómico (PTR) GafChromic MD-55-2 que fueron calibradas con otra fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ propiedad del Instituto de Física (IFUNAM). Esta última fue caracterizada en un laboratorio secundario con una fuente de ^{60}Co (que emite rayos gamma) [42].



1 Fuente radiactiva de ^{90}Sr - ^{90}Y ; 2 Obturador; 3 Tornillo donde se encuentra alojada la fuente radiactiva; 4 Manija del obturador; 5 Disco de nylon; 6 Tuerca del porta muestra; 7 Tornillo del porta muestra; 8 Motor; 9 Pilas; 10 Interruptor; 11 Paredes del irradiador.

Figura 7.1 Esquema del irradiador construido para la exposición de muestras biológicas a betas emitidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. Consta de un motor que hace girar la muestra celular de modo que pueda recibir una dosis uniforme. También es posible modificar la distancia de irradiación al mover de posición el tornillo que contiene la fuente radiactiva [42].

Por lo que la tasa de dosis para la fuente del ICNUNAM reportada en el 2002 corresponde a las mediciones de una respuesta igual a la obtenida por radiación gamma (^{60}Co) y que para fines prácticos se le denominará en este trabajo dosis gamma.

Por otro lado, en mayo del 2005, se obtuvo la tasa de dosis en agua impartida por las partículas beta de la fuente $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ del IFUNAM como parte de la tesis de licenciatura del M. en C. Hugo Ramírez [41]. Este dato se adquirió mediante la irradiación de diferentes volúmenes de solución Fricke. Con las lecturas se construyó una gráfica de tasa de dosis como función del espesor. Se concluyó que la tasa de dosis resultante impartida a un dosímetro termoluminiscente (TLD) en la posición normal de irradiación fue de $10.48 \text{ Gy h}^{-1} \pm 2\%$ y que para fines prácticos llamaremos dosis beta. Así, se reportó que la tasa de dosis beta es un 11% menor que el valor de la tasa de dosis gamma de la misma fuente bajo las mismas condiciones en dosímetros TLD-100 [41]. Como el propósito de este trabajo es encontrar el daño causado por dosis bajas de radiación beta, este dato fue utilizado para realizar una nueva caracterización de la fuente del ICNUNAM.

7.1.2 Caracterización de la fuente

Para caracterizar la fuente con la cual se harán las irradiaciones de la muestra celular se hizo uso de dosímetros termoluminiscentes TLD-100 (LiF:Mg,Ti) Harshaw-Bricon con dimensiones de 3x3x1 mm. El lector termoluminiscente Harshaw 3500 con flujo de N₂ fue utilizado para leer la respuesta termoluminiscente (carga) de cada TLD. El protocolo de manejo en la irradiación y lectura se hizo conforme a las recomendaciones del manual del Laboratorio de Dosimetría del IFUNAM [9].

Como se mencionó en 1.5.1, este tipo de dosímetros no son absolutos, por lo que es necesaria su calibración. Dicha calibración se llevó a cabo utilizando una fuente de ⁹⁰Sr/⁹⁰Y del IFUNAM cuya tasa de dosis beta fue medida en el 2005 y que ajustada por decaimiento natural de la fuente es:

$$\dot{D}_{04/2008} = \dot{D}_{05/2005} \exp\left[-\left(\frac{0.693}{t_{1/2}}\right)t\right] = 10.48\text{Gyh}^{-1} \exp\left[-(0.002\text{mes}^{-1})(35\text{mes})\right] = 9.77\text{Gyh}^{-1} \quad \text{Ec. 7.1}$$

Es recomendable que el rango de dosis para la calibración incluya el rango de dosis a la que se quiere exponer la muestra. De este modo, la curva de calibración generada permite inferir con mayor exactitud y precisión la dosis en el dosímetro colocado en la fuente prueba.

En la Tabla 7.1 se muestran las lecturas promedio de la calibración de los dosímetros TLD-100. En la Figura 7.2 se muestra la curva de calibración obtenida de los datos en la tabla. La curva ajustada por regresión lineal por el programa Sigmaplot v.10, muestra una dependencia lineal entre la carga y la dosis entre 50 y 450 mGy. La ecuación está dada por $R = (0.0071 \mu\text{CmGy}^{-1} \pm 1\%)D + (0.034 \mu\text{C} \pm 7\%)$, donde R es la respuesta y D es la dosis.

Una vez calibrados los dosímetros TLD-100 se procedió a exponerlos en la fuente del ICNUNAM en las mismas condiciones a las de la exposición de la muestra celular. Por lo tanto, cada dosímetro fue colocado en el fondo del tubo cónico Eppendorf (1.5 ml) de manera que estuviera perpendicular al haz de partículas beta. Posteriormente se agregó 100 μl de medio de cultivo RPMI-1640 sin suplementar. Debido a que este tipo de dosímetros no pueden estar en contacto directo con el agua, fue necesario envolverlos cuidadosamente en plástico PARAFILM "M". Además, para mantenerlo en su lugar se colocaron dos trozos de esponja arriba y abajo del mismo. El esquema en la Figura 7.3 muestra este montaje experimental.

Tabla 7.1. Resultados de la irradiación para la calibración de los TLD-100		
Dosis (mGy)	Tiempo	Lectura Promedio (μC)
50	18s	0.416 \pm 0.004
150	55s	1.061 \pm 0.059
250	1min 32s	1.79 \pm 0.021
350	2min 9s	2.511 \pm 0.033
450	2min 46s	3.223 \pm 0.101

Tabla 7.1 Lecturas (μC) promedio de los dosímetros TLD-100 expuestos a diferentes dosis de radiación beta emitida por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ cuya tasa de dosis beta reportada fue de 9.77 Gy h^{-1} al momento de la irradiación. La incertidumbre en las lecturas corresponde a una desviación estándar.

Calibración de TLD

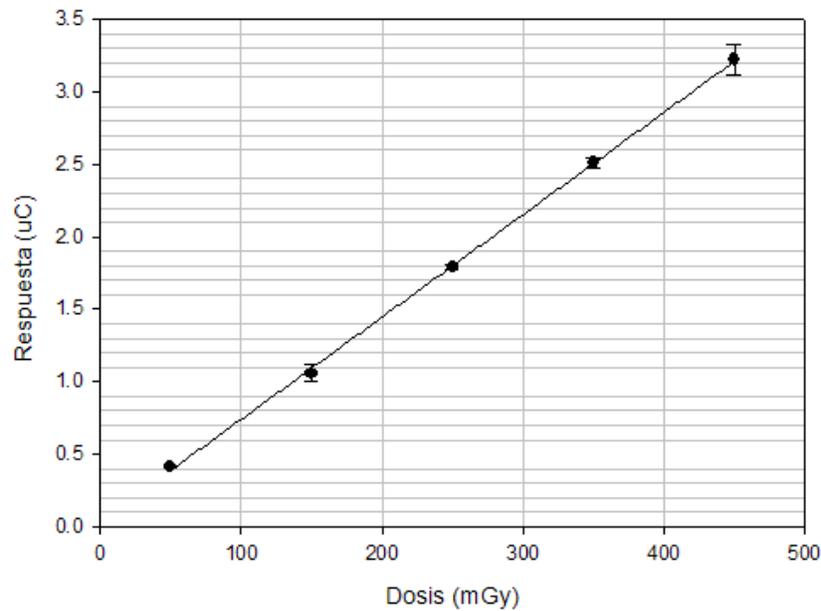


Figura 7.2 Curva de calibración para dosímetros TLD-100 expuestos a una fuente $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ cuya tasa de dosis beta fue de 9.77 Gy h^{-1} al momento de la irradiación. La curva ajustada por regresión lineal muestra un comportamiento lineal entre la carga (respuesta termoluminiscente) y la dosis en un rango de 50 a 450 mGy.

Los dosímetros fueron expuestos a dosis gamma de 50, 100 y 150 mGy a una distancia de 2.5 cm de la fuente y cuyo tiempo de irradiación se tomó de la tabla del Anexo 1 corregida por decaimiento. Sin embargo, como ya se reportó que la diferencia nominal entre las tasas de dosis

gamma y beta es del 11%, sabemos que las lecturas de los dosímetros irradiados aquí deben diferir aproximadamente en este porcentaje. En otras palabras, las ‘dosis esperadas’ son 44.5, 89 y 133.5 mGy en vez de los 50, 100 y 150 mGy, respectivamente.

En la Tabla 7.2 se muestran las lecturas y las dosis (representadas por el encabezado ‘dosis real’) correspondientes calculadas a partir de la curva de calibración de la Figura 7.2. Para la ‘dosis supuesta’ de 100 mGy se observa una mínima diferencia de 0.03% entre la ‘dosis esperada’ y la ‘dosis real’, mientras que para los otros dos datos se tiene una diferencia entre 7.5 y 8.5%. Esto implica que los valores de dosis medidos por los TLD-100 calibrados y los valores de ‘dosis esperada’ son estadísticamente consistentes. Por lo tanto, la tasa de dosis beta de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ del ICNUNAM a una distancia de 2.5 cm puede calcularse mediante la división de la ‘dosis esperada’ entre el tiempo de irradiación. Al hacer el promedio se obtiene un valor de $3.78 \text{ mGymin}^{-1} \pm 4\%$.

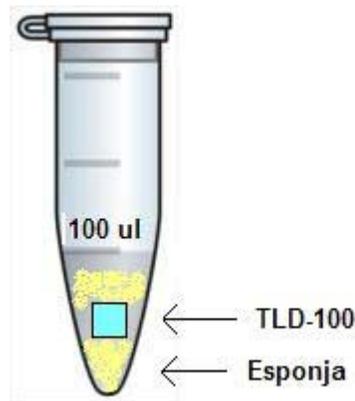


Figura 7.3 Esquema de la colocación del TLD-100 dentro de un tubo Eppendorf (capacidad máxima 1.5 ml). Se coloca primero la esponja en la parte inferior, luego el TLD-100 previamente envuelto en PARAFILM y para mantenerlo en su lugar se le coloca arriba otro pedazo de esponja. Finalmente se agrega 100 μl de medio RPMI-1640 sin suplementar.

7.2 Fuente de ^{241}Am

Debido a que uno de los objetivos particulares de este trabajo contempla la exposición de la muestra celular a radiación de alta LET, se decidió utilizar una fuente de ^{241}Am propiedad del Instituto de Física de la U.N.A.M. Este radioisotopo decae al ^{237}Np emitiendo partículas alfa con energía de 5.511 (0.22%), 5.54 (0.34%), 5.44 (13%), 5.48 (84.5%) MeV entre otras con porcentajes menores al 0.01%. Su vida media es de 432.2 años [60].

Tabla 5.2. Cálculo de la tasa de dosis para una distancia de 2.5 cm							
Dosis Supuesta (mGy)	Dosis Esperada (mGy)	Lectura promedio (μC)		Dosis Real (mGy)		Tiempo (min)	Tasa de Dosis (mGy/min)
50	44.5	0.326	$\pm 2\%$	41.13	$\pm 2\%$	11.77	3.7817 ± 0.1271
100	89	0.668	$\pm 3\%$	89.30	$\pm 3\%$	23.53	3.7819 ± 0.2761
150	133.5	1.062	$\pm 11\%$	144.79	$\pm 11\%$	35.3	3.7818 ± 0.0784
Promedio =							3.78 $\pm 4\%$

Tabla 7.2 Lecturas promedio de los dosímetros TLD-100 y la dosis correspondiente calculada con la curva de calibración de la Figura 7.2. La tasa de dosis se calcula al dividir la ‘dosis esperada’ entre el tiempo de irradiación. Las incertidumbres en todos los casos, excepto en la tasa de dosis promedio, corresponden a una desviación estándar. Para la tasa de dosis promedio, la incertidumbre corresponde al promedio de las incertidumbres de cada tasa de dosis calculada.

La fuente radiactiva se encuentra depositada en una placa metálica rectangular de 1.6 x 5.2 mm. A su vez, ésta se encuentra dentro de un cilindro de aluminio de 2.5 cm de diámetro y 5.35 mm de espesor a una profundidad de alrededor de 1 mm. La fuente cuenta con un recubrimiento protector, de modo que después de atravesarlo y viajar 1 mm en aire, la energía de las alfas es de 5.3 MeV [19].

En 1996 se determinó la fluencia de partículas alfa de esta fuente a diferentes distancias de irradiación a través de cálculos con Monte Carlo, además de mediciones con un detector de barrera superficial y dosímetros TLD-100 (ver Figura 7.4) [19]. Estos datos son cruciales para el cálculo de la tasa de dosis en función de la distancia, sin embargo, es necesario hacer una corrección por decaimiento radiactivo de la fuente haciendo uso de las Ecuaciones 1.4 y 1.5.

7.2.1 Necesidades de irradiación

El hecho de que la muestra celular reciba una dosis uniforme igual o mayor que el 90% para un volumen no menor que 5 μl y no mayor que 100 μl es un requisito indispensable; ya que de este modo, garantizamos que todas las células tienen la misma probabilidad de ser atravesadas por una partícula. Es necesario tomar en cuenta que las alfas, como cualquier otra PCP, pierden energía conforme atraviesan algún material. En particular, alfas con energía de 5.3 MeV tienen un alcance en aire de aproximadamente 3 cm [58], lo que significa que la distancia de irradiación no puede ser mayor que el alcance. Es por esta razón que la distancia de irradiación debe ser tal que cuando las alfas lleguen a la muestra, les quede energía suficiente para poder causar eventos de ionización.

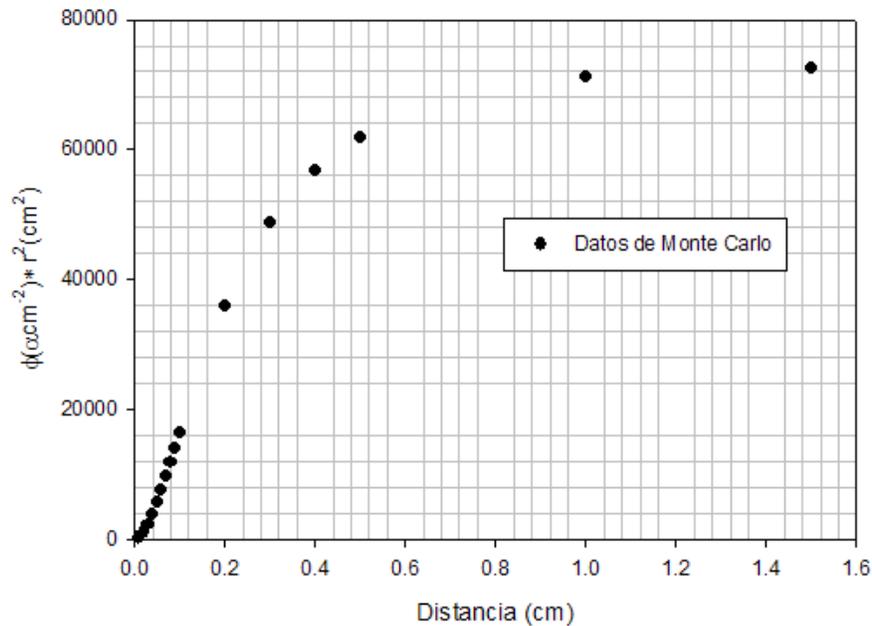


Figura 7.4 Fluencia versus distancia de irradiación a la fuente de ^{241}Am construida a partir de cálculos Monte Carlo y medidas, realizados en 1996 [19].

Otro requisito es que debe ser posible impartir una dosis dentro de un rango que va desde 40 mGy hasta 500 mGy en un tiempo no menor que los 5 segundos. Debido a que la colocación de la fuente es manual, un tiempo menor a éste implicaría que, los 2 segundos que tarda la reacción humana, se conviertan en una incertidumbre igual o mayor al 20% para la dosis impartida.

7.2.2 Diseño del irradiador

La geometría de irradiación adecuada para los fines descritos con anterioridad es aquella en la que todas las partículas alfa emitidas recorran distancias iguales a través del aire hasta llegar a la muestra celular. Si suponemos una fuente puntual y un plano perpendicular a la dirección de emisión y sobre éste un blanco en forma de cuadrado, entonces las partículas que lleguen a la periferia de dicho blanco habrán recorrido una distancia mayor que aquellas que lleguen al centro del blanco. Ahora, si a este plano se le dobla de manera que ahora sea un semicilindro y el blanco quedara ahora en su interior, entonces todas las partículas alfa recorrerán la misma distancia, es decir; el radio del semicilindro (ver Figura 7.5).

Como la muestra celular a irradiar es líquida, es necesario el uso de un cubre-objetos moldeable que pueda mantener el líquido sobre la pared interior del semicilindro. Además, este cubre-objetos debe ser lo suficientemente delgado para que pueda ser atravesado por completo por

las alfas y que éstas aún tengan suficiente energía para penetrar toda la muestra. De modo que se decidió usar recortes rectangulares de una película transparente de Mylar de 6 μm de espesor como cubre objetos. El Mylar es una película de poliéster que es ampliamente usada en la industria y que puede ser fabricada de distintos espesores dependiendo del uso.

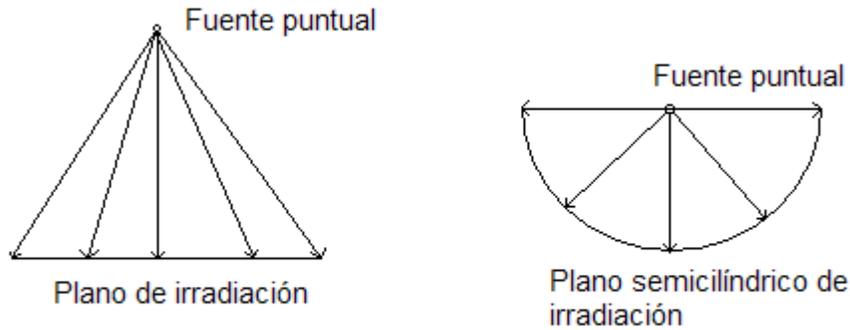


Figura 7.5 Esquema transversal sobre el cambio en la geometría de irradiación para una fuente puntual sobre un plano. A la izquierda se muestra que la distancia recorrida por las partículas emitidas por la fuente sobre un plano perpendicular al haz de radiación varía, mientras que al doblar el plano para formar un semicilindro como se muestra a la derecha, la distancia recorrida por todas las partículas es la misma.

7.2.3 Descripción del irradiador

El irradiador construido en realidad es una base con la cual se puede asegurar que la colocación de la fuente y la muestra celular sea igual en cada irradiación. Consta de un bloque de acrílico de 6x6x3 cm; en cuyo centro (espacio en el cual se coloca la fuente) se encuentra un semicilindro de 1 cm de radio y 2 cm de alto como se muestra en la Figura 7.6. De tal modo que el área efectiva de irradiación es de 6.3 cm^2 .

La colocación de la fuente es manual y de preferencia debe ser puesta y retirada usando pinzas de teflón. Sobre la base de acrílico se hizo una marca, con la que la flecha sobre el cilindro metálico que contiene la fuente radiactiva debe coincidir. Esto asegura que la fuente es colocada en la misma dirección; es decir, paralela al eje del semicilindro.

El porta-muestras en este caso será el semicilindro en el centro de la base. La muestra celular se deposita en forma de una gota (ya que son tan sólo 5-8 μl) que debe ser ‘aplanada’ por el cubre-objetos que, en este caso, es el recorte de la película de Mylar previamente esterilizado por luz UV.

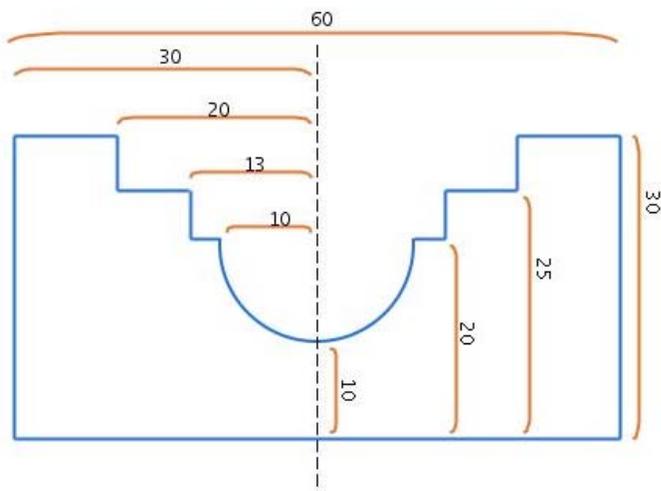


Figura 7.6 Esquema transversal (izquierda) y fotografía (derecha) de la base de acrílico construida para la exposición de muestra celular a partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am . Las medidas del esquema están en milímetros.

7.2.4 Cálculos para obtener la tasa de dosis.

Utilizando tablas de alcance generados por el programa SRIM-2008.03 para partículas alfa en aire, Mylar y agua se calculó la pérdida de energía en cada etapa tal y como se describe a continuación (ver 1.3).

Partículas con energía de 5.3 MeV tienen un alcance en aire de 29 mm, si éstas recorren 10 mm entonces la energía con la que llegan al Mylar será la correspondiente a aquellas que tengan un alcance de 19 mm. De las tablas se obtiene que esta energía es de 3.98 MeV.

Utilizando ahora las tablas para Mylar, alfas de 3.98 MeV tienen un alcance de $20.34 \mu\text{m}$ por lo que si atraviesan $6 \mu\text{m}$, entonces la nueva energía corresponde a aquellas partículas que tengan un alcance de $14.34 \mu\text{m}$. La energía ahora es de 3.08 MeV; es decir, pierden 0.9 MeV al atravesar la película de Mylar. Finalmente, alfas de 3.08 MeV tienen un alcance en agua de $18.3 \mu\text{m}$. Por lo tanto, sabemos que el volumen de la muestra celular debe ajustarse de tal forma que no exceda dicha altura, de lo contrario, no habrá partícula alguna que deposite dosis a las células que se encuentren en el fondo.

Para conocer la tasa de dosis utilizamos la Ecuación 1.9, la cual requiere de obtener la tasa de fluencia, misma que se encuentra en la gráfica de la Figura 7.4 corregida por 12 años de decaimiento radiactivo.

Despejando la Ecuación 1.4, la constante de decaimiento para el ^{241}Am es:

$$\lambda = \frac{\ln(2)}{432.3a} = 0.0016a^{-1} \quad \text{Ec. 7.2}$$

Aplicamos ahora la Ecuación 1.5 de la Sección 1.2 para obtener la tasa de fluencia en el 2008.

$$\dot{\Phi}(2008) = \dot{\Phi}(1996) \exp[-\lambda t] = (1.23 \times 10^6 \alpha \text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}) \exp[-0.0016 a^{-1} \times 12a]$$

$$\dot{\Phi}(2008) = 1.21 \times 10^6 \alpha \text{cm}^{-2} \text{min}^{-1} \quad \text{Ec. 7.3}$$

Entonces la tasa de dosis en agua a 1 cm de distancia en Septiembre del 2008 puede ser calculada usando la ecuación 1.13:

$$\dot{D} = (1.6 \times 10^{-10}) \frac{\dot{\Phi} E}{\rho R} = (1.6 \times 10^{-10}) \frac{(1.21 \times 10^6 \alpha \text{cm}^{-2} \text{min}^{-1})(3.08 \text{MeV})}{(18.3 \mu\text{m})(1 \text{gcm}^{-3})}$$

$$\dot{D} = 0.33 \text{Gy min}^{-1} \quad \text{Ec. 7.4}$$

7.2.5 Comprobación de la ecuación para cálculo de tasa de dosis

Para comprobar el valor obtenido en la Ecuación 7.4, se hizo uso de dosímetros termoluminiscentes TLD-100 (LiF:Mg,Ti) Harshaw-Bricon con dimensiones de 3x3x1 mm. El protocolo de manejo en la irradiación y lectura se hizo conforme a las recomendaciones de la referencia dada por el Laboratorio de Dosimetría del Instituto de Física, UNAM [9].

Como se menciona en 1.5.1, los DTL no son dosímetros absolutos por lo que requieren de la calibración mediante el uso de una fuente cuya tasa de dosis es conocida para una geometría dada. En este caso se hizo uso de la misma fuente de ^{241}Am sobre una base de acrílico especialmente fabricada para la irradiación de dosímetros TLD-100. En el 2005 se reportó una tasa de dosis de 4.44 mGy min⁻¹ en la posición de irradiación. Después de hacer la corrección por decaimiento radiactivo obtuvimos que la tasa de dosis en el 2008 es de 4.42 mGy min⁻¹. Se escogieron dosis de 2, 4, 6 y 8 Gy para tener tiempos de irradiación suficientemente largos.

Las irradiaciones se realizaron por duplicado. Para leer la respuesta termoluminiscente (carga) de cada DLT se utilizó el lector termoluminiscente Harshaw 3500 con flujo de N₂. La carga como función de la dosis se muestra en la Figura 7.7.

La curva de la Figura 7.7 presenta una relación lineal entre dosis y la respuesta termoluminiscente en un rango de 2 a 8 Gy. Fue ajustada por el programa Sigmaplot v.10 con un valor r de 0.99 y se encuentra representada por la ecuación $R = 29.55D + 3.24$, donde R es la respuesta y D es la dosis.

Posteriormente se irradiaron los DTL en el centro del irradiador para la muestra biológica, descrito con anterioridad, durante tiempos de 5, 10 y 15 minutos. La distancia entre la fuente y el DTL es de 9 mm sin otro material de por medio más que aire.

Cabe recordar que al usar un haz de PCP es necesario tomar en cuenta que la LET varía al cambiar la distancia de irradiación entre la fuente y el DTL. Esto implica que la respuesta termoluminiscente de aquellos DTL irradiados a una distancia mayor debe ser corregidas por la eficiencia relativa y por la diferencia entre la masa irradiada.

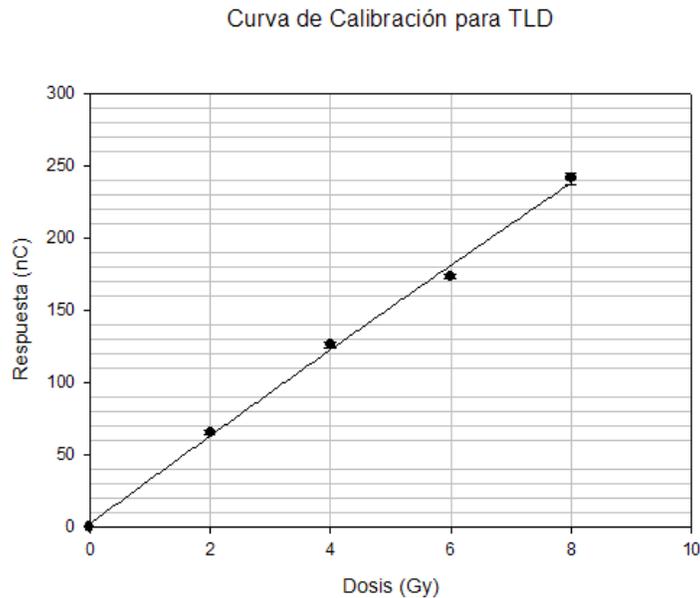


Figura 7.7 Curva de calibración para TLD-100 expuestos a partículas alfa de una fuente de ^{241}Am .

Para obtener las eficiencias relativas se debe saber la LET o la energía de las PCP incidentes. El haz de alfas usadas en la calibración tiene una energía de 5.3 MeV (energía con la que sale de la fuente). Para encontrar su energía a una distancia de 9 mm volvemos a hacer uso de las tablas de alcance dadas por el programa SRIM-2008.03 para aire. Se calculó que alfas de 5.3 MeV tienen un alcance en aire de 29 mm por lo que si atraviesan 9 mm, la energía de salida será la correspondiente a alfas con un alcance de 20 mm, es decir, tendrán una energía de 4.1 MeV. Alfas de esta energía tienen un alcance de $t = 14.1 \mu\text{m}$, mientras que el alcance de alfas de 5.3 MeV es de $t = 20.2 \mu\text{m}$ en el material de los dosímetros TLD-100.

La eficiencia relativa se obtuvo de la Figura 7.8, publicada por Brandan et al. [4], en la que comparan medidas experimentales con el modelo de interacción de trayectorias (TIM por sus siglas

en inglés). Se encontró que la eficiencia para alfas con energía de 5.3 MeV con respecto a gammas de ^{60}Co es de 0.173, mientras que para alfas con energía de 4.1 MeV es de 0.206.

De modo que el cálculo de la tasa de dosis impartida a 9 mm de distancia se calcula de la siguiente manera:

$$D_9 = D(R) \frac{(\rho t)_1 \eta_{4.1,\gamma}}{(\rho t)_9 \eta_{5.3,\gamma}} = D(R)(1.19)(1.43) \quad \text{Ec. 7.5}$$

donde $(\rho t)_i$ es el espesor másico que atraviesan las partículas alfas a una distancia i de 1 y 9 mm respectivamente, $\eta_{E,\gamma}$ son las eficiencias relativas entre rayos γ y alfas de energías 4.1 y 5.3 MeV y $D(R)$ es la ecuación de la curva de calibración.

Tomando en cuenta todo lo anterior se obtuvo la tasa de dosis de la división de la dosis entre el tiempo de exposición (ver tabla 7.3).

Tabla 7.3 Tasa de Dosis para TLD						
Lectura (nC)		Dosis (Gy)		Tiempo (min)	Tasa de dosis (Gy/min)	
20.14	+0.2	0.98	+0.02	5+0.03	0.195	+0.003
38.71	+2.3	2.05	+0.09	10+0.03	0.205	+0.009
53.95	+3.4	2.93	+0.13	15+0.03	0.195	+0.008
Promedio =					0.198	+3%

Tabla 7.3 Lecturas promedio de los TLD-100 expuestos a partículas alfa de una fuente de ^{241}Am y la dosis correspondiente calculada a través de la curva de calibración de la Figura 7.7. La tasa de dosis se obtiene de la división de la dosis entre el tiempo de irradiación. Las incertidumbres en todos los casos representan una desviación estándar.

Al hacer el promedio de los tres valores obtenemos que la tasa de dosis es de $0.198 \text{ Gy min}^{-1} \pm 3\%$ en TLD-100 a una distancia de 9 mm. La incertidumbre corresponde a una desviación estándar.

Por otro lado, el valor para la tasa de dosis calculado directamente de la teoría haciendo uso de la Ecuación 1.13 es:

$$\dot{D}(9\text{mm}) = \frac{(1.6 \times 10^{-10})(1.21 \times 10^6 \alpha \text{cm}^{-2} \text{min}^{-1})(4.1 \text{MeV})}{(14.1 \mu\text{m})(2.64 \text{gcm}^{-3})} = 0.21 \text{Gy min}^{-1} \quad \text{Ec. 7.6}$$

La diferencia nominal entre el valor experimental y el valor teórico es del 6% que equivale a dos desviaciones estándar de la tasa de dosis experimental; por lo que se puede decir que son estadísticamente consistentes.

Con lo anterior se concluye que la tasa de dosis calculada con la Ecuación 7.3 es correcta con un 3% de incertidumbre (inferido de la medición experimental).

7.2.6 Comprobación de la uniformidad

Para la comprobación de la uniformidad de la dosis depositada se utilizó película de tinte radiocrómico (PTR) GafChromic EBT lote #37275-04 donada por el Dr. David Lewis de ISPCorp. Dicha película consta de una capa sensitiva de 21 μm montada sobre una capa de plástico base de 104 μm . Esta característica la hace sensible a las partículas alfas y ser lo suficientemente flexible como para darle la forma de semicilindro sin ser dañada. Tiene una densidad aproximada de 1.2 g cm^{-3} , lo que la hace una herramienta útil para la dosimetría en agua.

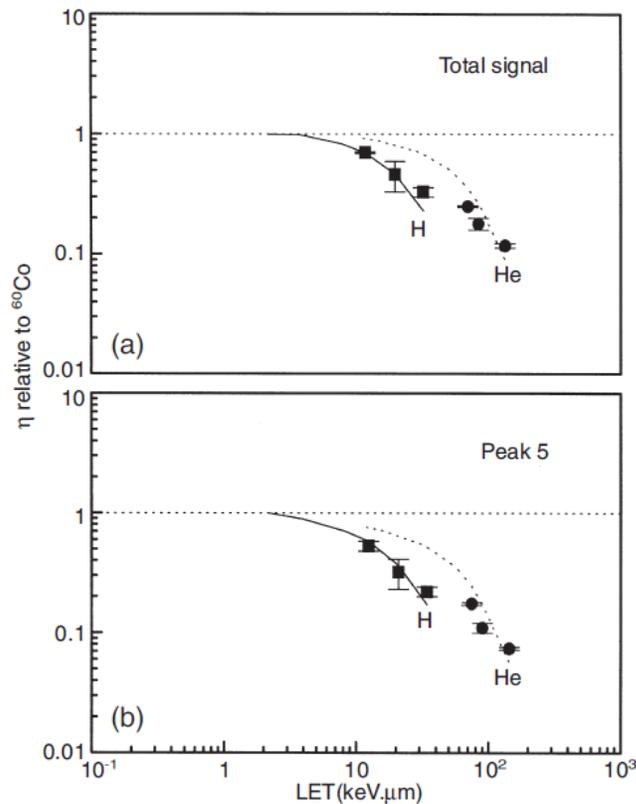


Figura 7.8 Eficiencias relativas de TLD-100 para protones y partículas alfa con respecto a rayos gamma emitidos por una fuente de ^{60}Co . Los tres puntos para He en cada curva corresponden a energías de 7, 5.3 y 3 MeV respectivamente [4].

La respuesta a la radiación ionizante de la EBT fue determinada a través de imágenes digitalizadas, usando un escáner de reflexión con cama plana Microtek ScanMaker E3. Las imágenes se adquirieron con ScanWizard Pro versión 6.51 a color (24 bits), con una resolución espacial de 300 puntos por pulgada (dpi) en formato TIFF y con todas las opciones de retoque de imagen deshabilitadas. Posteriormente, cada imagen se separó en sus tres componentes: rojo, verde y azul usando el software Paint Shop Pro versión 4.12. Éstas proporcionan intensidades de gris de la imagen original en una escala de 0 a 256. Debido a que este tipo de película responde mejor al filtro rojo, el análisis final se hizo a través de este archivo. Cada imagen se procesó mediante el software Matlab versión 6.5 de modo que a diferentes rangos de intensidades de gris se les asignó un color, para así formar un mapa de color falso que nos pudiera indicar la distribución de la dosis de manera visual. Además fue posible saber el tono de gris promedio de una región de interés usando el software Osiris versión 3.6.

La película EBT siempre fue manipulada en luz amarilla y guantes para evitar el oscurecimiento y/o maltrato de la misma. La digitalización ocurrió 24 horas después de la irradiación para permitir que el proceso químico fuese completado.

Se escogieron cuatro tiempos de exposición (0, 1, 10 y 20 min) correspondientes a dosis de 0, 0.33, 3.3 y 6.6 Gy tomando la tasa de dosis calculada en la Ecuación 7.4. En esta prueba también se colocó en la posición de irradiación una película que no fue irradiada y que llamaremos control. Esto con el objetivo de poder saber si el simple hecho de doblar la película le causa algún daño y pueda ser malinterpretado como exposición a radiación. Todas las películas fueron cubiertas con plástico Mylar a modo de poder simular la irradiación de la muestra celular.

En la Figura 7.9 se muestra a la izquierda la digitalización original de la película y a la derecha la procesada. La escala de colores a la derecha representa el tono de gris, siendo café para 218 y azul oscuro para 165. También es posible percibir zonas blancas que corresponde a pixeles con un tono de gris al que no le fue asignado un color específico. Las figuras triangulares que se alcanzan a percibir en las esquinas corresponden a la cinta adhesiva con que fueron pegadas al cartón blanco durante su digitalización. Cabe recordar que la disminución en el tono de gris significa que una mayor dosis fue depositada.

La película no irradiada (Figura 7.9) tiene un tono de gris promedio de 218 ± 1 . No se observa ningún daño provocado por el doblar ya que se aprecia una uniformidad en el tono de gris (color café) confirmado por los histogramas realizados a lo largo y ancho de la película (perfiles de tono de color 'Profile-1' y 'Profile-2' de la Figura 7.9). Sólo es posible vislumbrar algunos puntos en donde el

tono disminuye debido a las manchas intrínsecas de la película o pelusas que se encontraban sobre el escáner al momento de la digitalización. El borde de la película tiende a cambiar de tono puesto que no fue digitalizado claramente.

La película expuesta durante 1 minuto (Figura 7.10) tiene un tono de gris promedio de 212 ± 2 , ligeramente menor que el control lo que nos indica que sí hubo una exposición a radiación ionizante. Además se observa que la uniformidad (color café rojizo) a lo largo y ancho de la película se conserva como en el control (perfiles de tono de color 'Profile-1' y 'Profile-2' de la Figura 7.10), indicando que toda la muestra ha recibido la misma dosis.

Existe un cambio en la uniformidad de la película cuando es expuesta por 10 minutos (Figura 7.11). A esta dosis aparecen áreas de isodosis con la esperada geometría rectangular. En el centro se observa un rectángulo de color azul claro que tiene un tono de gris promedio de 188 ± 4 (área encerrada por los perfiles 'Profile-1' al 'Profile-4').

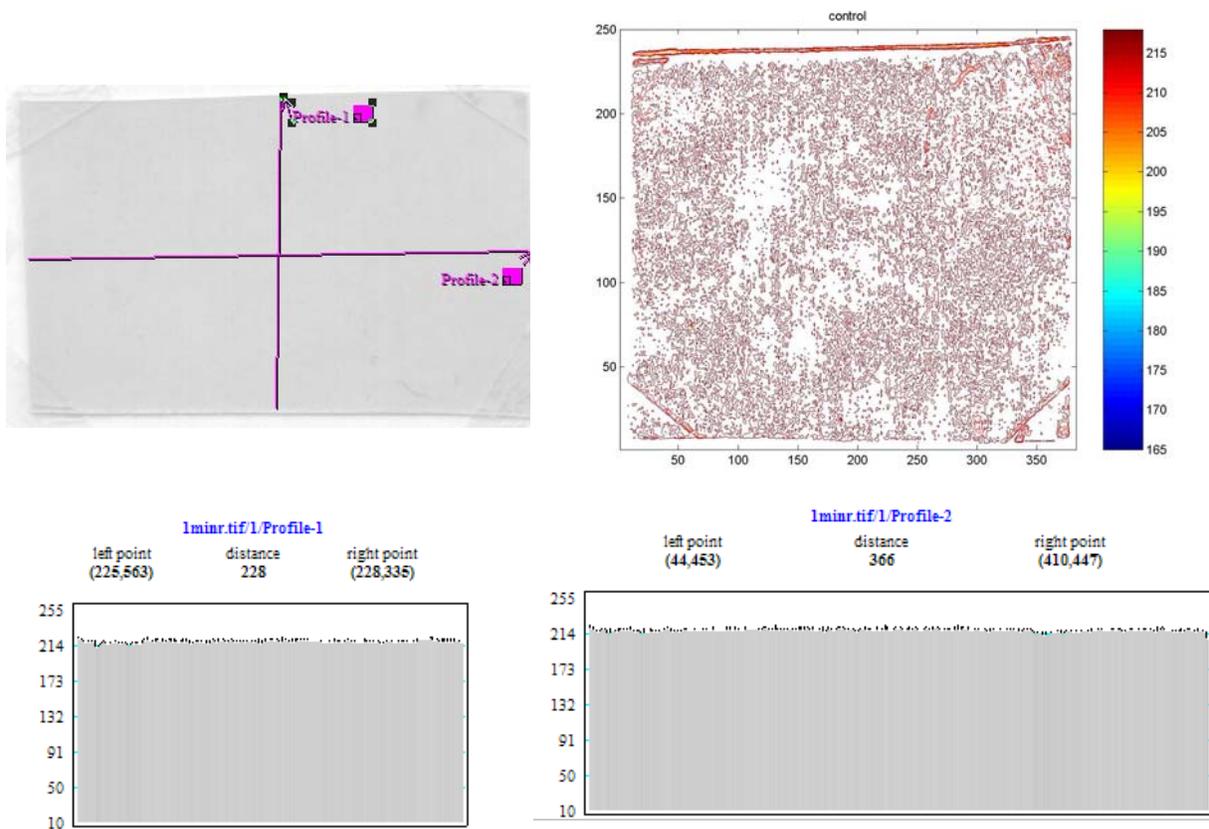


Figura 7.9 Imagen digital de la película no irradiada (izquierda arriba) y el correspondiente mapa de color (derecha arriba). Los perfiles denotados por las líneas 'Profile-1' y 'Profile-2' muestran el cambio en tonalidad de gris sobre la vertical (izquierda abajo) y la horizontal (derecha abajo) de la película.

El rectángulo es seguido por un marco blanco cuyo tono de gris sabemos que se encuentra entre 190 y 200 puesto que es rematado por un marco de color naranja (tono de gris de 205). La última curva de isodosis tiene el mismo color que la película no irradiada. El cambio de grises sobre la vertical es evidente en los perfiles 'Profile-1' y 'Profile-3' de la Figura 7.12, donde se manifiesta la disminución simétrica del tono de gris en el centro de la película. En cambio, en los perfiles 'Profile-2' y 'Profile-4' que representan la variación a lo largo de la horizontal se mantiene la uniformidad de irradiación, indicando una homogeneidad en la dosis depositada en esta dirección.

Una exposición de 20 minutos (Figura 7.13) causa que la película presente un tono de gris promedio de 169 ± 5 en el rectángulo central (azul oscuro). La incertidumbre en dicho rectángulo aumenta debido a que hay una zona blanca que debe tener un tono de gris menor que 165 y que no aparece en la escala de color falso. Este rectángulo se encuentra rodeado de tres curvas de isodosis con tono de gris de 175, 180 y 185 (curvas de diferentes tonalidades de azul) y que cubren prácticamente el área total de la película. Al igual que la película expuesta por 10 minutos, en la Figura 8.11 es posible observar en la orilla una curva de isodosis de 205 y otra de 215. Los perfiles en la Figura 7.14 repiten la tendencia de distribución de dosis observada en la Figura 7.12.

Los datos obtenidos de las películas irradiadas sugieren que el área total de irradiación (2x3 cm) no recibe una dosis uniforme ya que la dosis depositada en el centro disminuye paulatinamente hasta ser nula al llegar a las orillas de la película. De modo que para asegurar una uniformidad en la dosis de alrededor del 90% es necesario reducir el área de irradiación.

Como sabemos que los recuadros de las EBT miden 20x30 mm y al tomar un promedio de las longitudes en pixeles de las diferentes películas se encontró que 64 pixeles corresponden aproximadamente a 10 mm. De modo que en las Figuras 7.10, 7.11 y 7.13 la región de interés (no mostrada para 7.10) tiene un área aproximada de 23x19 mm, 23.6x9.5 mm y 23x13 mm respectivamente. Dentro de estas regiones, la incertidumbre del tono de gris promedio va del 1% al 3%, valores que se encuentran por debajo del error máximo permitido del 10%.

Según la tasa de dosis a utilizar (Ecuación 7.4) para la irradiación de la muestra celular en el presente trabajo, el tiempo de exposición correspondiente a la dosis más alta (160 mGy) no supera el minuto. Es de esperar que la distribución de la dosis depositada en la muestra celular sea parecida a lo que se observa en la película irradiada durante un minuto. Es por esto que el área de irradiación para la muestra celular debe ser igual o menor que 15x25 mm para asegurar una uniformidad del 97%.

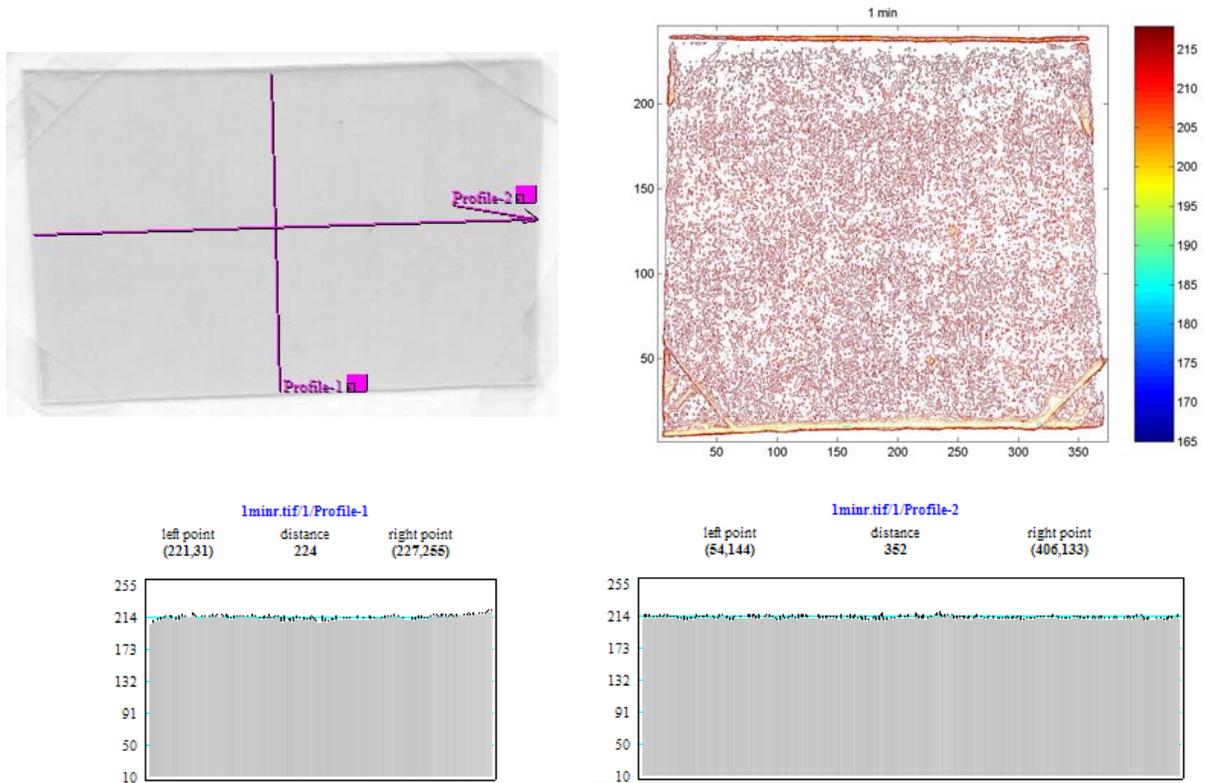


Figura 7.10 Imagen digital de la película expuesta durante 1 minuto a partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am (izquierda arriba) y el correspondiente mapa de color (derecha arriba). Los perfiles denotados por las líneas 'Profile-1' y 'Profile-2' muestran el cambio en tonalidad de gris sobre la vertical (izquierda abajo) y la horizontal (derecha abajo) de la película.

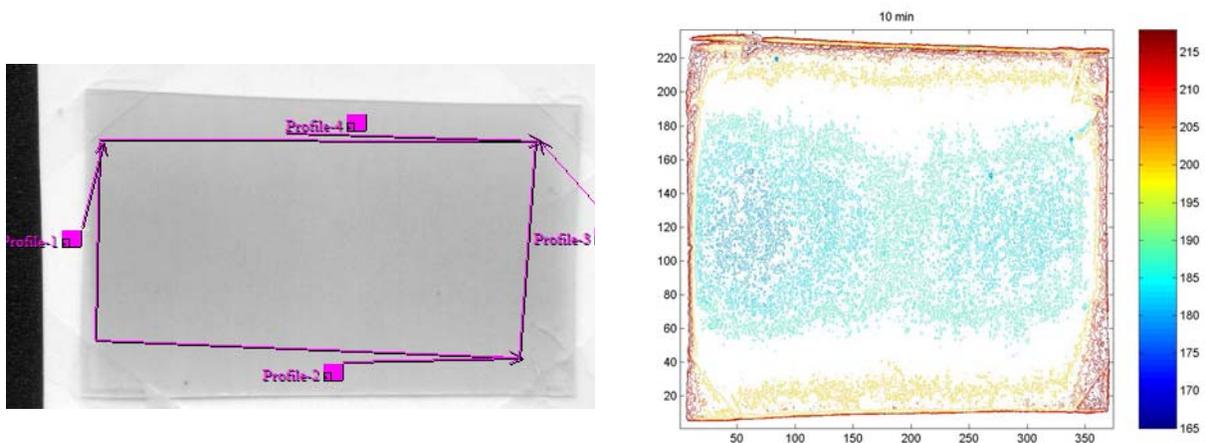


Figura 7.11 Imagen digital de la película expuesta durante 10 minutos a partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am (izquierda) y el correspondiente mapa de color (derecha). Dentro de la región de interés (rodeada por los perfiles 'Profile-1' a 'Profile-4') el tono de gris promedio es de 188 ± 4 . Esta zona corresponde al rectángulo azul claro observado en el mapa de color.

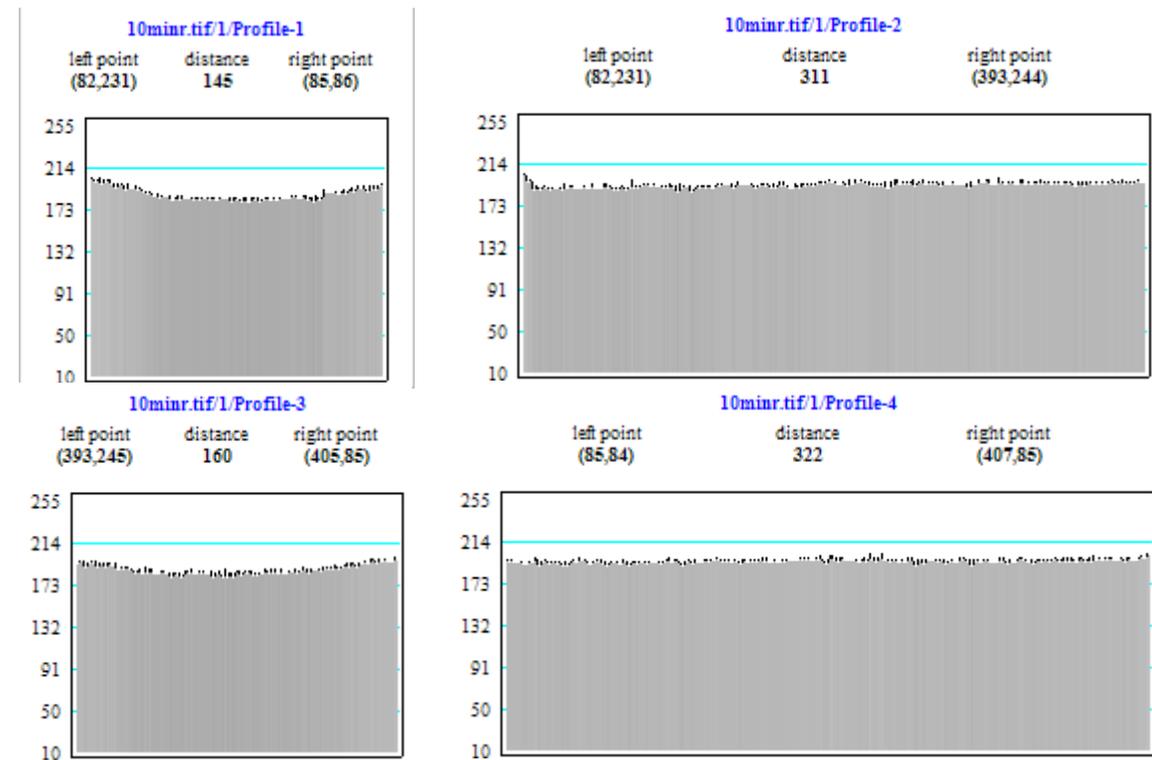


Figura 7.12 Perfiles del tono de gris a lo largo de las cuatro líneas mostradas sobre la imagen digital de la película expuesta durante 10 minutos. Los perfiles 'Profile-1' y 'Profile-3' son sobre la vertical y 'Profile-2' y 'Profile-4' son sobre la horizontal de la película.

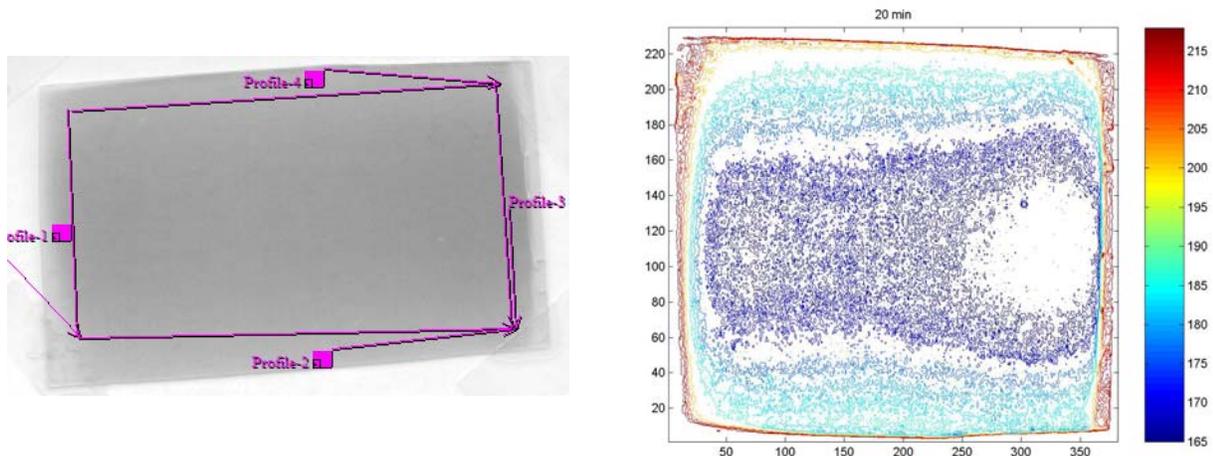


Figura 7.13 Imagen digital de la película expuesta durante 20 minutos a partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am (izquierda) y el correspondiente mapa de color (derecha). Dentro de la región de interés (rodeada por los perfiles 'Profile-1' a 'Profile-4') el tono de gris promedio es de 169 ± 6 . Esta zona corresponde al rectángulo azul oscuro observado en el mapa de color.

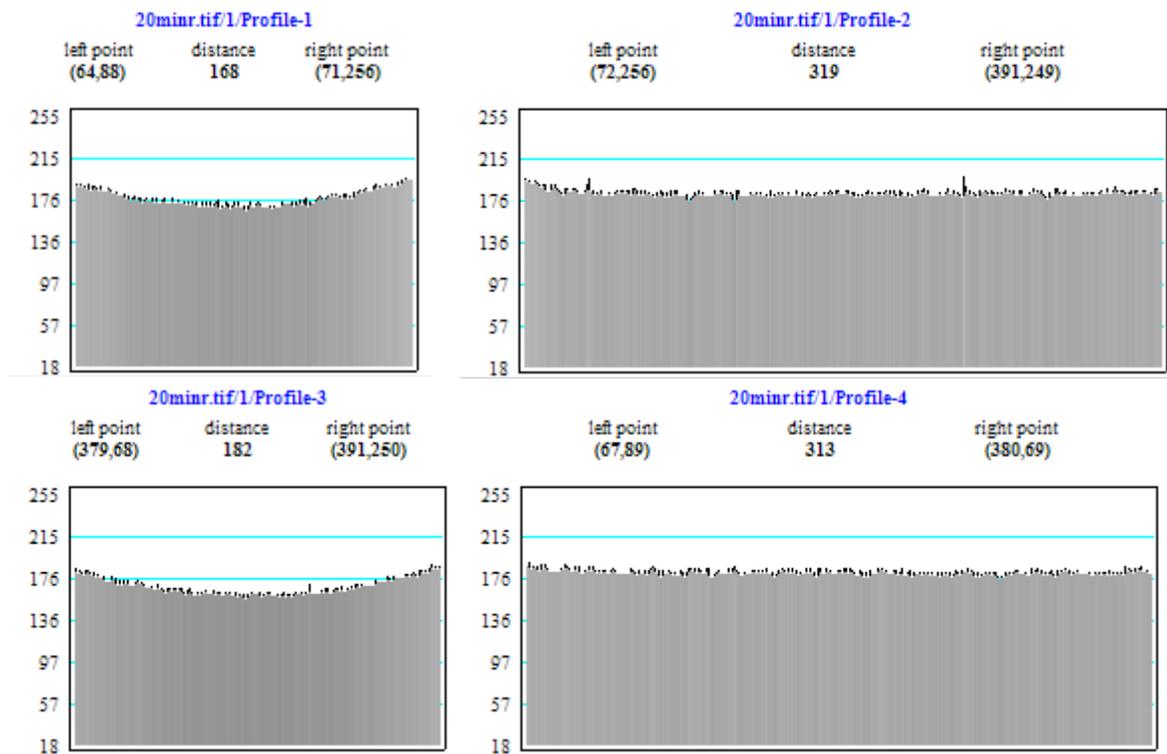


Figura 7.14 Perfiles del tono de gris a lo largo de las cuatro líneas mostradas sobre la imagen digital de la película expuesta durante 20 minutos. Los perfiles 'Profile-1' y 'Profile-3' son sobre la vertical y 'Profile-2' y 'Profile-4' son sobre la horizontal de la película.

7.3 Línea Celular

La línea celular linfoblastoide JHE/AT11LA/ es homocigota recesiva para el gen ATM, lo que la hace una de las más sensibles a la radiación (ver 3.4). Se obtuvo de los linfocitos B de un paciente que sufría AT. La línea fue donada al laboratorio por el Dr. Richard Gatti (Centro Médico de UCLA, EUA).

Las células se cultivan en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptocimina y 1% de piruvato.

Se siembran en cajas de cultivo 48 horas previas a la irradiación con partículas beta y 96 horas previas a la irradiación con partículas alfa, a 37°C con 5% de CO₂; esto con el fin de poder alcanzar la concentración necesaria para la toma de alícuotas.

La manipulación se realiza dentro de la campana de flujo laminar Nuair Clase II tipo A/B3. La incubación se llevó a cabo en una incubadora con corriente de CO₂ VWR Scientific Modelo 2400.

7.4 Linfocitos de sangre periférica

Debido a que las células AT son homocigas recesivas para el gen ATM, lo que las hace radiosensibles, es necesario obtener datos con células control o sanas, por lo que se decidió irradiar linfocitos de sangre periférica. La muestra de sangre para cada experimento fue tomada de un solo donador sano no fumador por venopunción. Se tomaron 3 ml de sangre colectada en tubos heparinizados para evitar la coagulación.

La separación de linfocitos se realiza mediante un gradiente de densidad Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma) a 1600 rpm durante 25 minutos. Inmediatamente después de su separación fueron colocados en 1 ml de medio RPMI-1640 suplementado.

7.5 Conteo celular

Se usó el ensayo de exclusión por azul tripano usando un hemacitómetro (cámara Neubauer) y un microscopio óptico Zeiss con objetivo de 20X.

Se tomaron 20 μ l de muestra celular y se mezclaron con 900 μ l de solución RPMI-1640 y 80 μ l del colorante azul tripano al 0.4%. Se calculó el porcentaje de células viables (refringentes) y el porcentaje de células muertas (azules). Se determinó el Numero Total de Células (NTC) mediante la fórmula:

$$NTC \left[\frac{\text{células}}{\text{ml}} \right] = \frac{\# \text{células}}{(\# \text{cuadrantes})(\text{dilución}) \left(\frac{1}{V_{\text{cuadrante}}} \right)} \quad \text{Ec. 8.1}$$

Hay cuatro cuadrantes en la cámara; la dilución tiene un valor de 50 (1000:20) y el volumen del cuadrante se considera de 0.1 μ l = 1x 10⁻⁴ ml.

7.6 Irradiación con partículas beta

Una vez hecho el conteo celular se hace el cálculo del tamaño de alícuota necesario para tener una cantidad de 60,000 células y llevarlas a un volumen de 100 μ l de medio. El tubo Eppendorf con la muestra celular se coloca a una distancia de 2.5 cm de la fuente en donde se tiene una tasa de dosis de 3.78 mGy min⁻¹ \pm 4% (ver 7.1.2). Las alícuotas fueron expuestas a cinco dosis diferentes: 0, 40,

80, 120 y 160 mGy. Para garantizar una dosis uniforme se siguieron los pasos dados en el manual de uso del irradiador [42].

7.7 Irradiación con partículas de alfa

Con el conteo celular se hace el cálculo para obtener una concentración celular de 60,000 células en 5 a 8 μl de medio. La alícuota se colocó en el centro del pozo de irradiación (ver Figura 7.15). Por encima de la gota con la muestra celular se colocó un recuadro de 1.5x2.5 cm de plástico Mylar (previamente esterilizado en luz UV), a modo de cubrir objetos para que ésta adquiriera la geometría esperada.

La fuente de ^{241}Am tiene una tasa de dosis en agua a 1 cm de distancia de 0.33 Gy min^{-1} (ver 7.2.4). Las dosis a las que fueron expuestas las células son las mismas que para las partículas beta: 40, 80, 120 y 160 mGy.

Se retira el Mylar y con todo cuidado se lava con 500 μl de medio de cultivo RPMI-1640 sin suplementar dentro de una caja de cultivo nueva. Se le agregan al pozo de irradiación otros 500 μl de la misma solución para poder recolectar el resto de la muestra irradiada. De este modo se tendrá 1ml aproximadamente de medio con 60,000 células irradiadas.

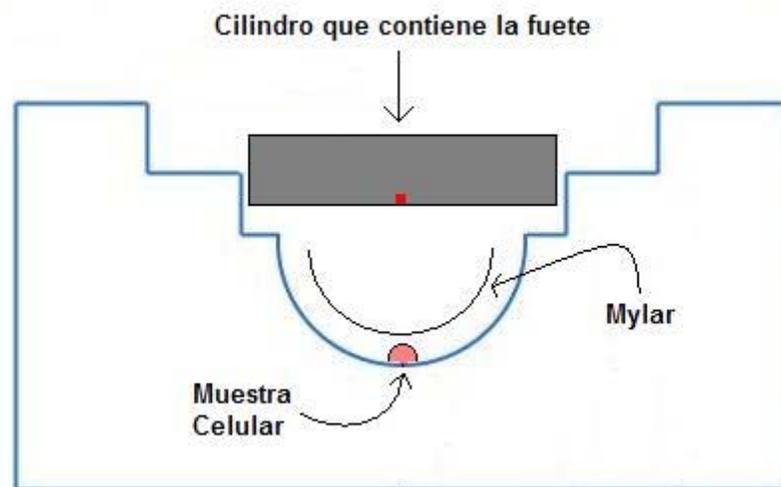


Figura 7.15 Montura del experimento para la irradiación de muestra la celular dentro del irradiador de acrílico construido para la fuente de ^{241}Am . La alícuota con células se coloca en medio del pozo de irradiación y posteriormente se cubre con un trozo de plástico Mylar. Finalmente se coloca manualmente el cilindro metálico que contiene la fuente de alfas.

7.8 Viabilidad

La citotoxicidad de la RI en las células fue evaluada al determinar el porcentaje de sobrevivencia celular utilizando el método diferencial de tinción de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA/BrEt). Se tomó una alícuota de 33 μ l de la muestra irradiada con betas y de 330 μ l de la irradiada con alfas, para mezclarla con 20 μ l de FDA/BrEt. En el microscopio de fluorescencia Olympus BX60 que emite luz de excitación a 530 nm, las células vivas se observan de color verde mientras que las muertas se observan de color rojo. Se contaron 200 células por laminilla.

7.9 Ensayo Cometa

7.9.1 Preparación de las laminillas

Las muestras celulares irradiadas son centrifugadas durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se agregan 300 μ l de agarosa Low Melting Point (LMP) al 0.5% derretida previamente en un microondas y mantenida a una temperatura de 37°C. Se resuspenden con pipeta y se toman 75 μ l para depositarlos sobre un portaobjetos previamente cubierto con agarosa y rotulado. Se coloca un cubreobjetos. Esto se hace en cuatro laminillas, dos para la versión alcalina y dos para la versión neutra. Se dejan refrigerando durante 7 minutos a 4°C. Se retiran los cubreobjetos, se agregan otros 75 μ l de agarosa LMP y se dejan refrigerando otros 5 minutos más.

7.9.2 Versión Neutra: Lisis, Desenrollamiento y Electroforesis

Todas las laminillas, sin cubreobjetos, son introducidas en un envase Coplin con solución de lisis (0.03M EDTA, 0.5% SDS a pH 7) dejándose en refrigeración a 4°C durante dos horas. Se enjuagan en buffer de corrida (90mM Ácido Bórico, 200mM EDTA, 12% Tris Base a pH=7), se colocan en otro envase Coplin con el mismo buffer y se dejan en refrigeración durante dos horas más a 4°C para lograr el desenrollamiento del ADN.

La electroforesis se lleva a cabo en una cámara horizontal BioRad con capacidad para 2 litros. Ésta se coloca sobre una cama de hielo y se nivela. Se vierten 1250 ml de buffer de corrida y se colocan las laminillas de manera paralela al campo eléctrico. La fuente de poder se programa para 25 V, 20 mA durante 25 minutos. Se retiran las laminillas y se enjuagan con Tris pH 7.4 dos veces. Las laminillas son fijadas con alcohol y se dejan secar toda la noche.

7.9.3 Versión Alcalina: Lisis, Desenrollamiento y Electroforesis

El procedimiento es básicamente el mismo que para la versión neutra. La solución de lisis (2.5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris al que se le añade 10% DMSO y 1% Triton-X justo antes de introducir las laminillas) se ajusta a pH 10 y se deja en refrigeración a 4°C durante toda la noche. El buffer de corrida se prepara en el momento (10 mM NaOH, 200mM EDTA) y se dejan las laminillas durante 20 minutos lograr el desenrollamiento del ADN mientras se programa la fuente de poder para 25 V, 300 mA durante 25 minutos. Se retiran las laminillas y se enjuagan con Tris pH 7.4 dos veces. Las laminillas son fijadas con alcohol y se dejan secar toda la noche.

7.10 Lectura de laminillas.

Se agregan 20 μ l de bromuro de etidio, se coloca un cubre objetos y se observa la laminilla en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con una luz de 600 nm. Se escogen 100 cometas al azar por laminilla. Se mide la longitud de la cola usando una reglilla en el ocular del microscopio, cuya mínima escala es de 5 μ m.

7.11 Análisis Estadístico.

Para la evaluación estadística se usarán los promedios de las longitudes de cola de cada experimento. El paquete Graphpad realizará la prueba t-student pareada para poder determinar la diferencia estadística significativa entre el grupo control y los grupos irradiados. Además, se realizará una ANOVA pareada para encontrar diferencias entre los resultados de la versión neutra y alcalina.

8. Resultados

8.1 Exposición a partículas beta

Células de la línea celular JHE (células AT) y linfocitos aislados de sangre periférica se expusieron a partículas beta emitidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ a dosis de 0, 40, 80, 120 y 160 mGy. Las células irradiadas fueron procesadas mediante el ensayo cometa en sus dos versiones con el objetivo de poder determinar el daño inicial causado al ADN. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Después de cada irradiación se realizó un ensayo de viabilidad, es decir, se contó la cantidad de células vivas y muertas utilizando una mezcla de tintes fluorescente (FDA/BrEt).

En la Figura 8.1 se muestran las gráficas de viabilidad donde el porcentaje promedio (de las tres repeticiones) de células vivas se mantiene por arriba del 90% en todas las dosis para las células AT. Para los linfocitos se tiene una viabilidad alrededor del 80% para todas las dosis. Por lo que se concluye que la agresión no resulta ser citotóxica.

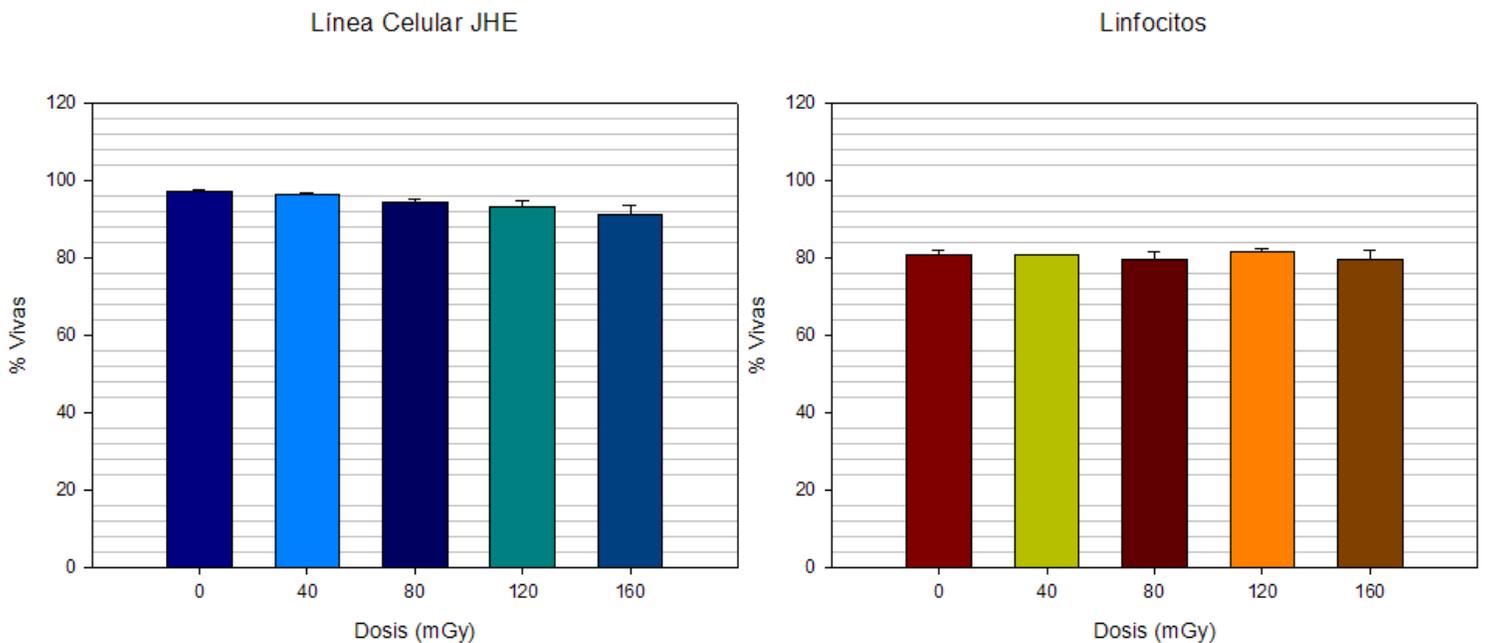


Figura 8.1 Porcentaje de células AT (izquierda) y linfocitos (derecha) vivos después de ser irradiados con partículas beta emitidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. La viabilidad se determinó usando el ensayo de tinción por FDA/BrEt. Las barras representan el promedio de tres repeticiones del mismo experimento y la incertidumbre es una desviación estándar.

8.1.1 Irradiación de células AT

En la Figura 8.2 se presentan los histogramas donde se grafica el número de cometas (eje 'y') versus la migración o longitud de cola (eje 'x') para las distintas dosis (eje 'z'). Del lado izquierdo (Panel A) se muestran los resultados de la versión neutra del ensayo cometa y del lado derecho (Panel B) aquellos arrojados por la versión alcalina para las tres repeticiones del experimento. En el Panel A no se encuentra evidencia de un incremento medible en la migración del DNA (longitud de cola). Además, es posible apreciar que el cambio en la distribución de la longitud de cola es mínimo comparado con el nivel basal (células no irradiadas) en cualquiera de los tres casos. Al juntar todos los datos (ver Figura 8.3 Panel A), la longitud de cola más frecuente a 0 mGy (24%) presentaron una longitud de cola de 30 μm y sólo una pequeña proporción (0.33%) tienen una longitud de cola de 55 μm . A la dosis más alta (160 mGy) se encontró que el 19% tuvo una migración de 50 μm y sólo el 1.3% presentó una longitud de cola máxima de 70 μm .

En contraste, la versión alcalina (Panel B) sugiere un incremento en la longitud de cola comparada con el nivel basal como función de la dosis. En la Figura 8.3 Panel B, se observa que para las dosis de 0 y 40 mGy, la longitud de cola más frecuente es de 75 μm con 26.7% y 29.3% de los cometas respectivamente. Sólo un 21.7% de los cometas a una dosis de 80 mGy presentaron tal migración pero la longitud de cola máxima registrada fue de 100 μm (7.7%). A la dosis más alta, de 160 mGy, la longitud de cola más frecuente (20.7%) fue de 90 μm y la máxima observada fue de 115 μm .

Para poder confirmar la existencia de una relación dosis-efecto fue necesario utilizar como parámetro de daño el promedio de la longitud de cola. Sin embargo, como es evidente de los histogramas, el daño basal medido por la versión neutra difiere del medido por la versión alcalina, presentando un promedio de longitud de cola poco menos que el doble que la primera. De modo que se realizó una normalización de los datos alcalinos al restarles el promedio basal neutro.

En los Paneles A y B de la Figura 8.4 se muestra el promedio de las longitudes de cola versus la dosis del ensayo neutro del alcalino. Después de la normalización, el promedio basal para ambos casos es de $33.3 \pm 7.7 \mu\text{m}$. En la versión neutra (Panel A) la prueba estadística de t-student pareada muestra que sólo para la dosis más alta de 160 mGy existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control, siendo la longitud de cola promedio de $46.8 \pm 11.7 \mu\text{m}$.

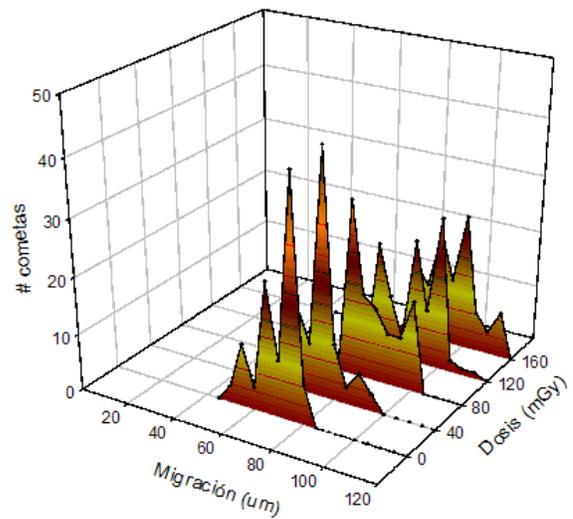
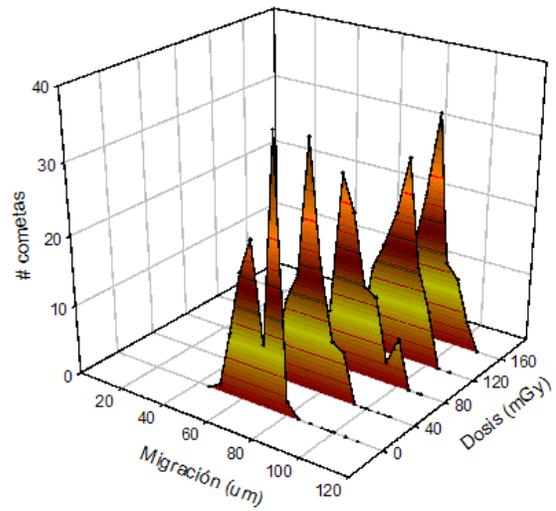
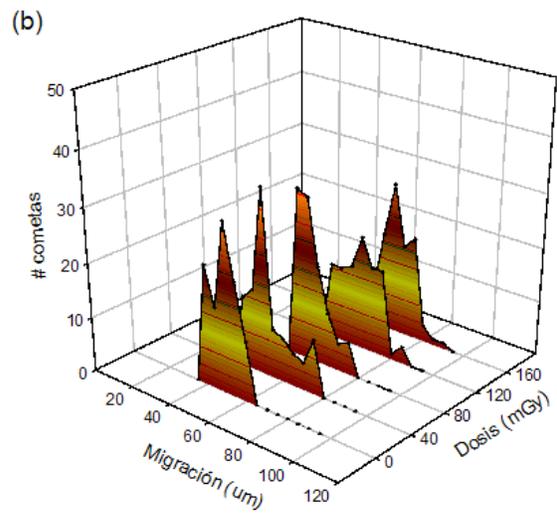
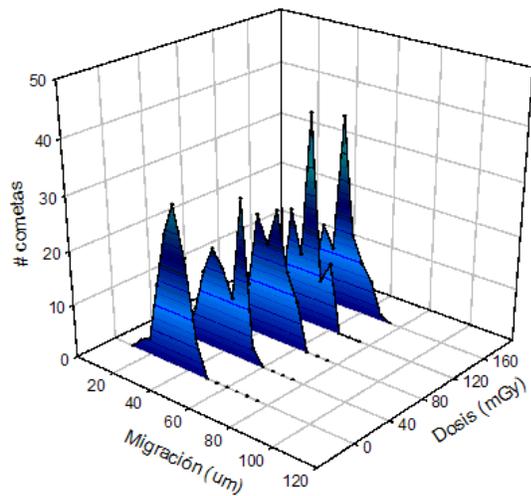
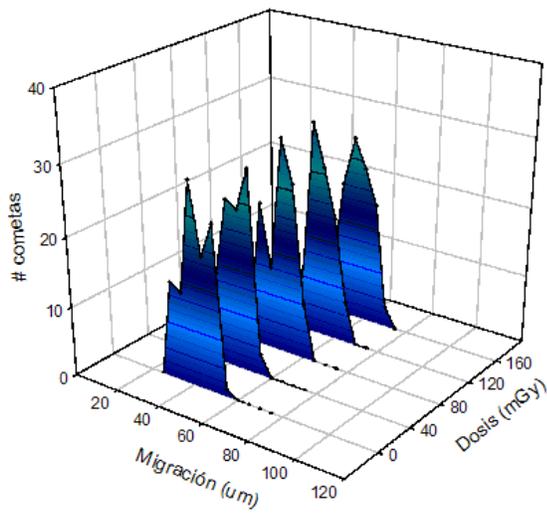
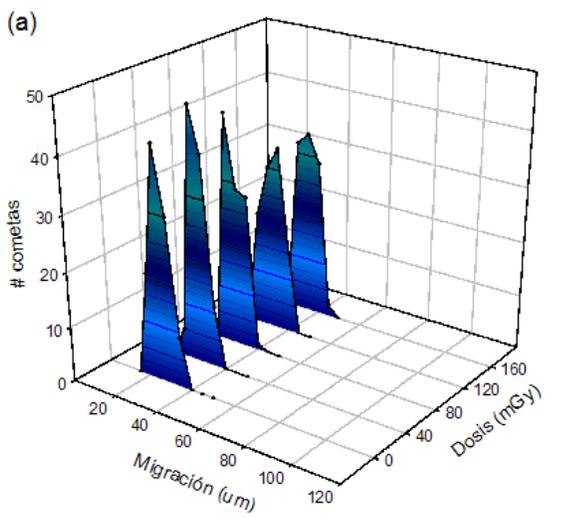


Figura 8.2 Histogramas del número de cometas versus migración generados por exposición de células AT a distintas dosis de radiación beta. Se presentan las tres repeticiones del experimento neutro (Panel A) y alcalino (Panel B).

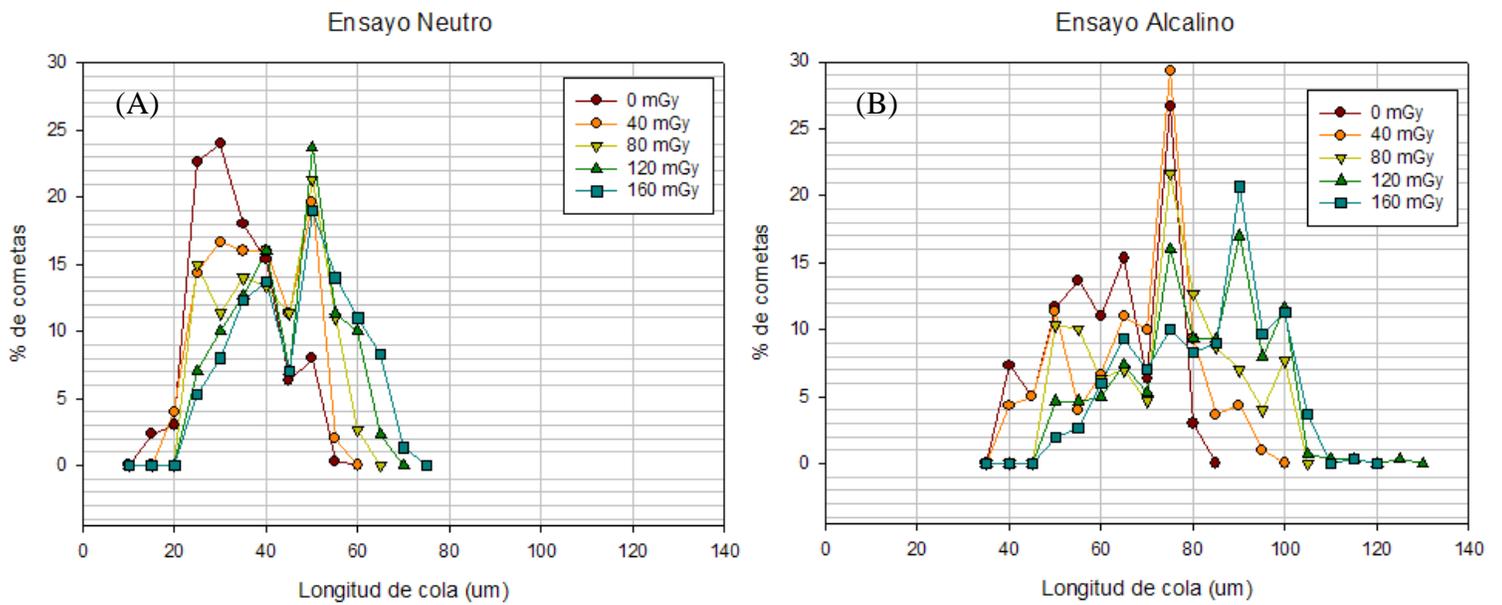


Figura 8.3 Porcentaje de cometas versus longitud de cola de células AT expuestas a una fuente de partículas beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) a dosis de 0 a 160 mGy obtenidos de la versión neutra (izquierda) y alcalina (derecha) del ensayo cometa. Los porcentajes toman en cuenta los datos de las tres repeticiones del experimento.

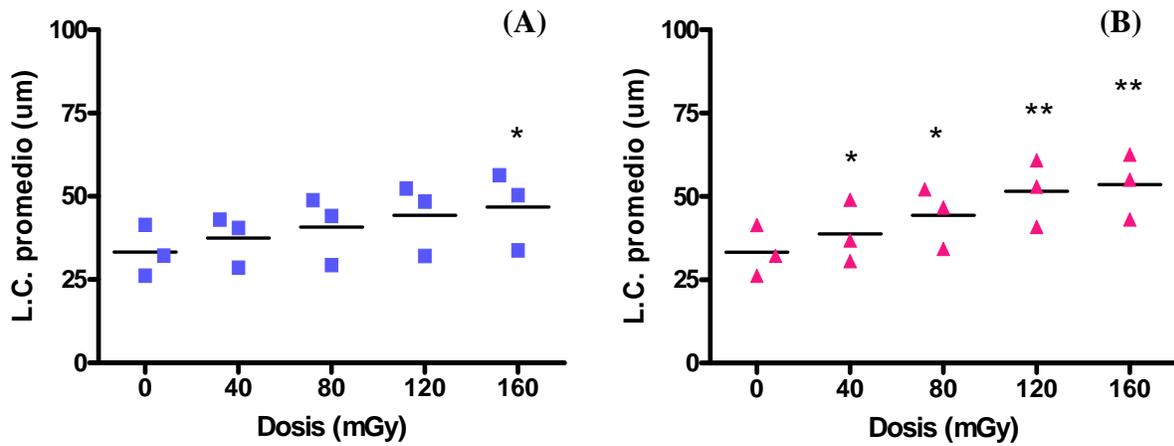


Figura 8.4 Longitud de cola (L.C.) promedio normalizado a un mismo control para el ensayo neutro (A) y el alcalino (B) de células AT expuestas a una fuente de partículas beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) a dosis de 0 a 160 mGy. El análisis estadístico realizado fue una t-student pareada entre el control y las demás dosis: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Por otro lado, en el Panel B de la Figura 8.4, se observa una dependencia clara entre la dosis y la migración del ADN ya que desde 40 mGy existe una diferencia significativa contra el control, que va aumentando conforme incrementa la dosis ($p=0.033$, $p=0.027$, $p=0.009$ y $p=0.007$, respectivamente).

8.1.2 Irradiación de linfocitos

En la Figura 8.5 se presentan los histogramas de las longitudes de cola neutros (Panel A) y alcalinos (Panel B) obtenidos de las tres repeticiones de la exposición de linfocitos aislados a partículas beta. Los datos de la versión neutra (Panel A) no muestran evidencia de un incremento en la longitud de cola con respecto a la dosis en ninguno de los tres casos. Cabe hacer notar la clara existencia de dos poblaciones de cometas que aparecen en el daño basal (al menos en las dos últimas repeticiones); los cerrados (longitud de cola de $\leq 5 \mu\text{m}$) y los abiertos (longitud de cola $\geq 15 \mu\text{m}$). Esta división se mantiene para todas las dosis, sin embargo, existe una disminución paulatina de los cometas ‘cerrados’ con respecto a la dosis. Además, al juntar todos los datos, la distribución de las longitudes de cola no se ve afectada por incrementos en dosis (ver Figura 8.6 Panel A). A 0 mGy, 24.7% de los cometas presentan una longitud de cola de $5 \mu\text{m}$ seguidos por un 21% con longitud de $50 \mu\text{m}$. A 160 mGy el porcentaje de los cometas con $5 \mu\text{m}$ de longitud de cola disminuye a 19.7% y para aquellos con $50 \mu\text{m}$ se reduce a 20%.

Los histogramas alcalinos (Panel B Figura 8.5) presentan el mismo comportamiento que los neutros; es decir, no existe evidencia de una relación dosis-efecto y la aparición de dos poblaciones de cometas en la muestra. Sin embargo, la cantidad total de cometas alcalinos cerrados a 0 mGy (10.3%) es mucho menor que la observada en el control neutro (24.7%) (ver Figura 8.6). Cometas con una longitud de cola de $75 \mu\text{m}$ predominaron en las cinco distintas dosis con porcentajes de 23 a 27.3%. En cuanto a la distribución de las longitudes de cola, observamos en la Figura 8.6, que a unas dosis de 120 y de 160 mGy existe un aumento visible en la cantidad de cometas con longitud de cola mayor que $75 \mu\text{m}$.

En la Figura 8.7 se presentan los promedios de las longitudes de cola de la versión neutra (Panel A) de las tres repeticiones del experimento, así como también los promedios normalizados de las longitudes de cola de la versión alcalina (Panel B) después de haberles restado el promedio basal neutro correspondiente. El promedio basal es de $33 \pm 11 \mu\text{m}$.

La prueba estadística t-student pareada muestra que en el caso de la versión neutra no existen diferencias significativas entre los promedios a las distintas dosis y el basal; en otras palabras, no existe una relación dosis-daño. Por otro lado, en el Panel B existe un pequeño incremento significativo en el daño causado por una dosis de 120 mGy ($p=0.0312$) y que aumenta para 160 mGy ($p=0.0204$).

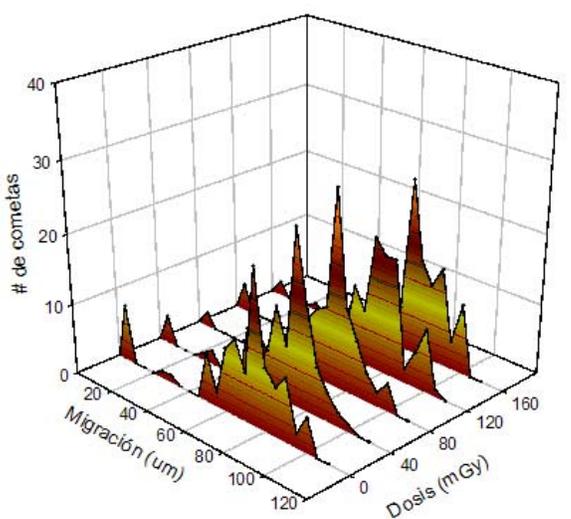
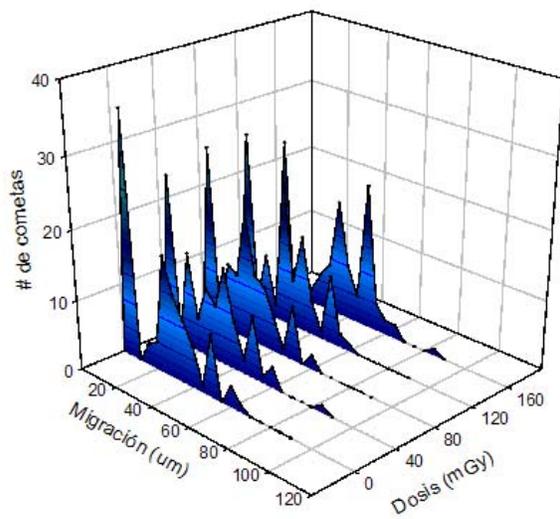
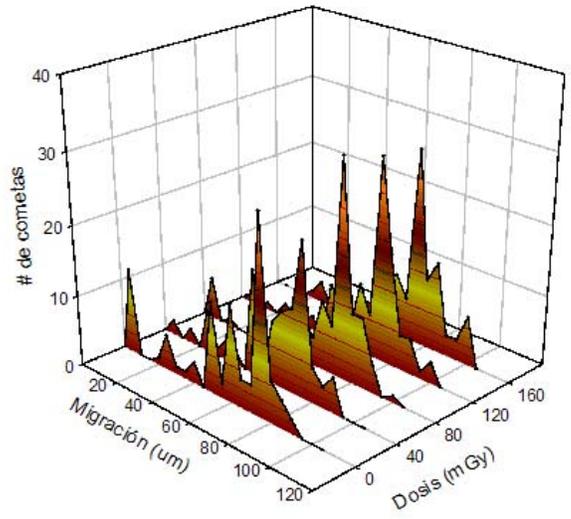
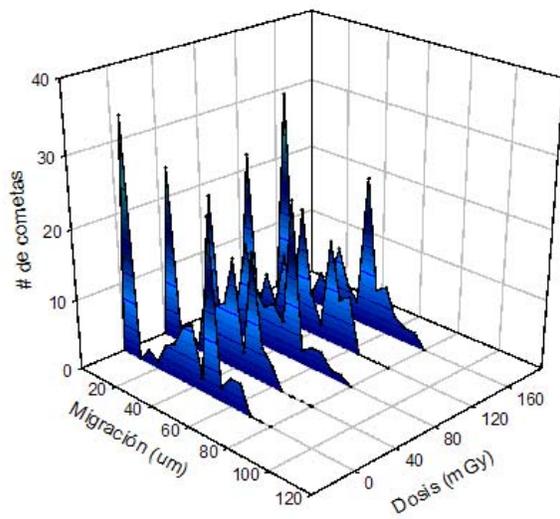
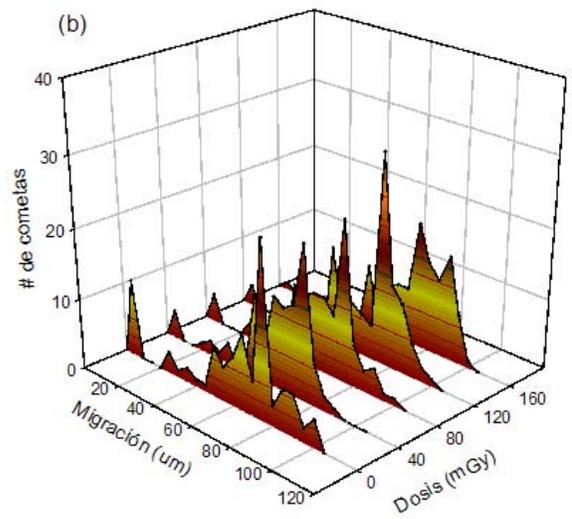
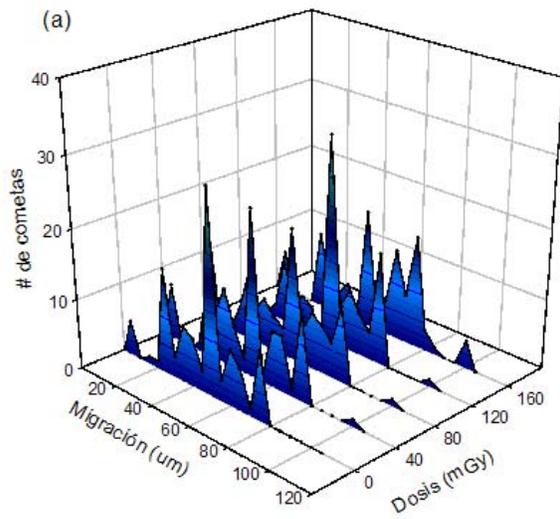


Figura 8.5 Histogramas del número de cometas versus migración generados por exposición de linfocitos a radiación beta. Se presentan las tres repeticiones del experimento neutro (Panel A) y alcalino (Panel B)

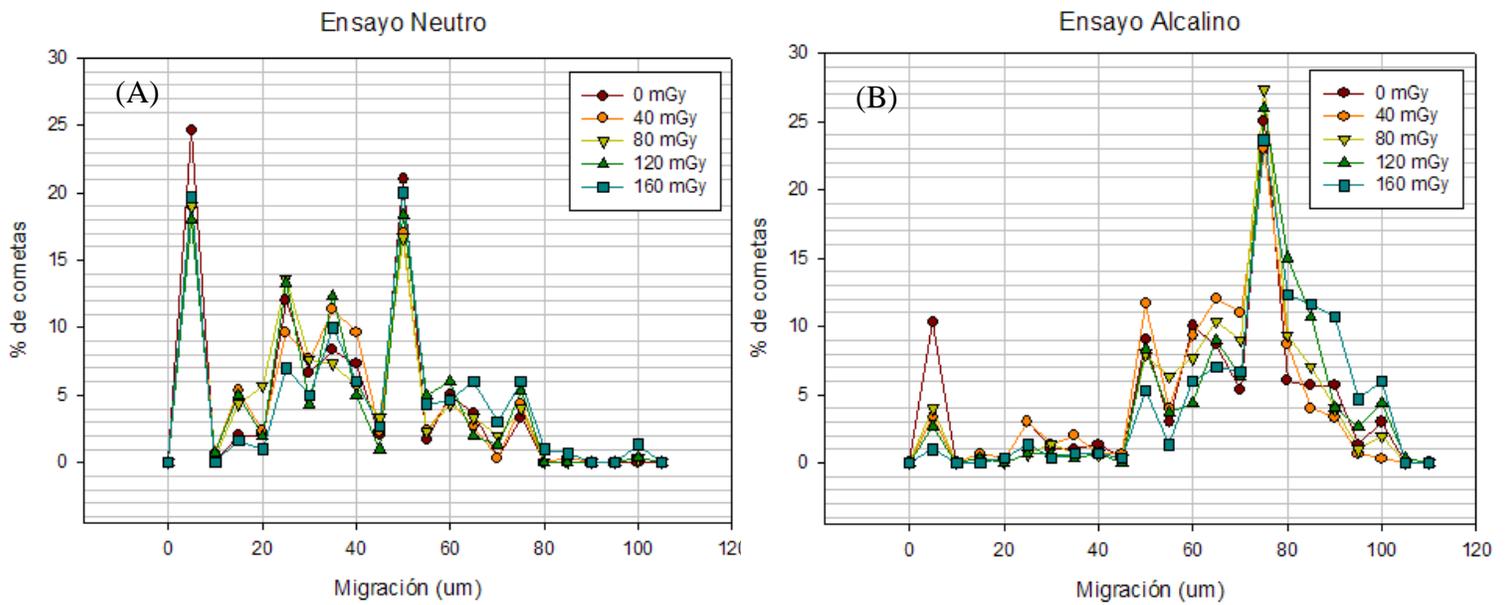


Figura 8.6 Porcentaje de cometas versus longitud de cola de linfocitos expuestos a una fuente emisora de partículas beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) a dosis de 0 a 160 mGy obtenidos de la versión neutra (izquierda) y alcalina (derecha) del ensayo cometa. Los porcentajes toman en cuenta los datos obtenidos de las tres repeticiones.

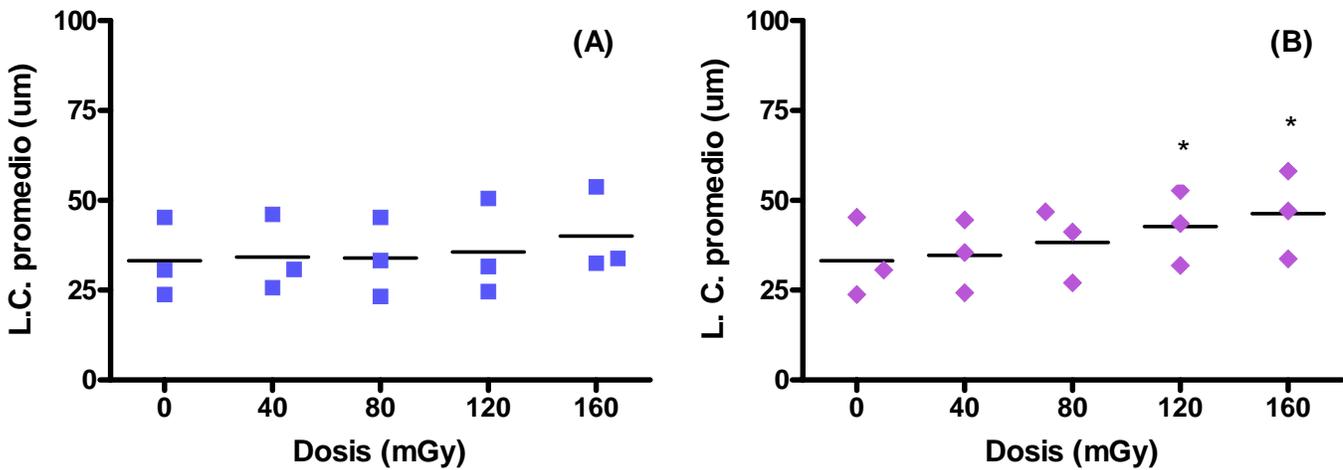


Figura 8.7 Longitud de cola (L.C.) promedio normalizado a un mismo control para el ensayo neutro (A) y el alcalino (B) de linfocitos expuestos a una fuente emisora de partículas beta ($^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) a dosis de 0 a 160 mGy. El análisis estadístico realizado fue una t-student pareada entre el control y las demás dosis: * $p < 0.05$.

8.2 Exposición a partículas alfa

Células de la línea celular JHE (células AT) y linfocitos aislados de sangre periférica se expusieron a partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am emisora de a dosis de 0, 40, 80, 120 y 160 mGy. Las células irradiadas fueron procesadas mediante el ensayo cometa en sus dos versiones con el objetivo de poder determinar el daño inicial causado al ADN. Los experimentos con células AT fueron realizados por triplicado.

Cabe mencionar que al realizar los experimentos de exposición a linfocitos se tuvo un problema en la recolección de las células irradiadas. Esta pérdida de células durante los lavados (ver 7.7) causó que no se obtuvieran suficientes células para realizar el ensayo de viabilidad. Por lo tanto, en el presente trabajo se reportarán sólo dos repeticiones de esta parte, de las cuales se obtuvieron en total 200 datos para la versión neutra del ensayo cometa y 150 datos para la versión alcalina.

En la Figura 8.8 se muestra la viabilidad promedio de las de las células AT posterior a la exposición para las tres repeticiones. El porcentaje de células vivas se mantiene por arriba del 80% para todas las dosis, por lo que se concluye que la agresión no resulta ser citotóxica.

8.2.1 Irradiación de células AT

La Figura 8.9 presenta los histogramas de las longitudes de cola (migración) neutra (Panel A) y alcalina (Panel B) de las tres repeticiones del experimento. Las tres gráficas del lado izquierdo (Panel A) sugieren un aumento en migración con respecto a la dosis. Al juntar todos los datos, en la Figura 8.10 Panel A, se observa con claridad como la distribución de longitud de cola se modifica recorriéndose a lo largo del eje 'x' (migración) a dosis cada vez más altas. Cometas con una longitud de cola de 25 μm fueron los más frecuentes (28.7%) a una dosis de 0 mGy. Para la siguiente dosis (40 mGy) la longitud de cola más frecuente presentó fue de 50 μm , dos veces más que en el basal. A la dosis más alta (160 mGy), poco menos de la mitad de los cometas presenta longitudes mayores que 60 μm .

En contraste, los histogramas del lado derecho de la Figura 8.9 sugieren poca modificación en la distribución de la longitud de cola. En los dos últimos casos se observa un incremento en la migración entre el nivel basal y la primera dosis (40 mGy), pero para mayores dosis no se observa incrementos significativos en la migración.

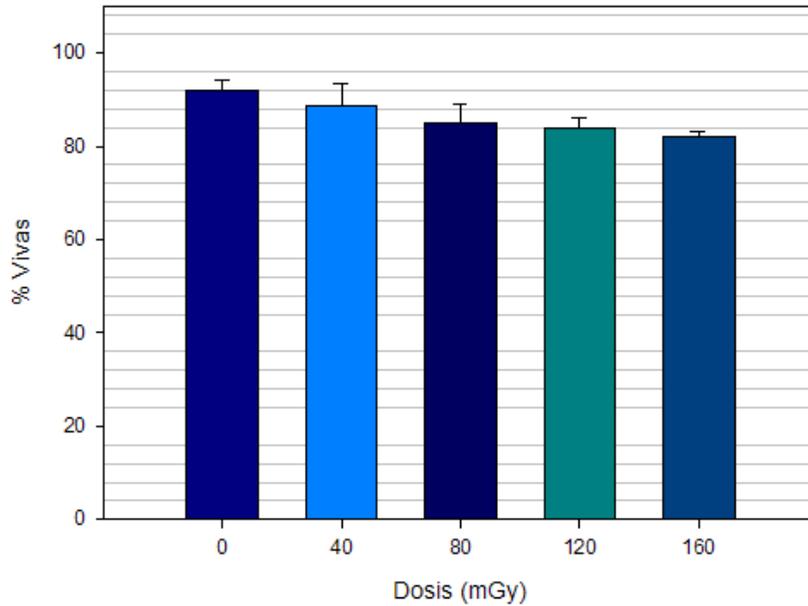


Figura 8.8 Porcentaje de células AT vivas después de ser irradiadas con partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am , observadas mediante el ensayo de viabilidad por FDA/BrEt. Las barras representan el promedio de tres repeticiones del mismo experimento y la incertidumbre es una desviación estándar.

En la Figura 8.10 se grafica el porcentaje de cometas versus la migración para la versión neutra (Panel A) y para la versión alcalina (Panel B). En el Panel B, existe un desplazamiento observable de la distribución de longitud de cola del nivel basal a la dosis más alta sin ser tan pronunciada como la observada en el Panel A de esta misma figura. En el Panel B, de los cometas basales la longitud de cola más frecuente (21%) fue de $75\ \mu\text{m}$ lo que se conserva hasta una dosis de 120 mGy. A 160 mGy la mayoría presenta una longitud de cola de $70\ \mu\text{m}$, pero alrededor de dos terceras partes presentan migraciones mayores que $75\ \mu\text{m}$.

En la Figura 8.11 se muestran los promedios de las longitudes de cola para la versión neutra (Panel A) y los promedios normalizados para la versión alcalina (Panel B). En el Panel A, el daño se vuelve significativo con respecto al basal a partir de una dosis de 80 mGy ($p=0.0242$); el daño se hace cada vez más significativo a dosis mayores. Por otro lado, en el Panel B se observa que el daño difiere estadísticamente del basal a partir de una dosis de 120 mGy ($p=0.0268$).

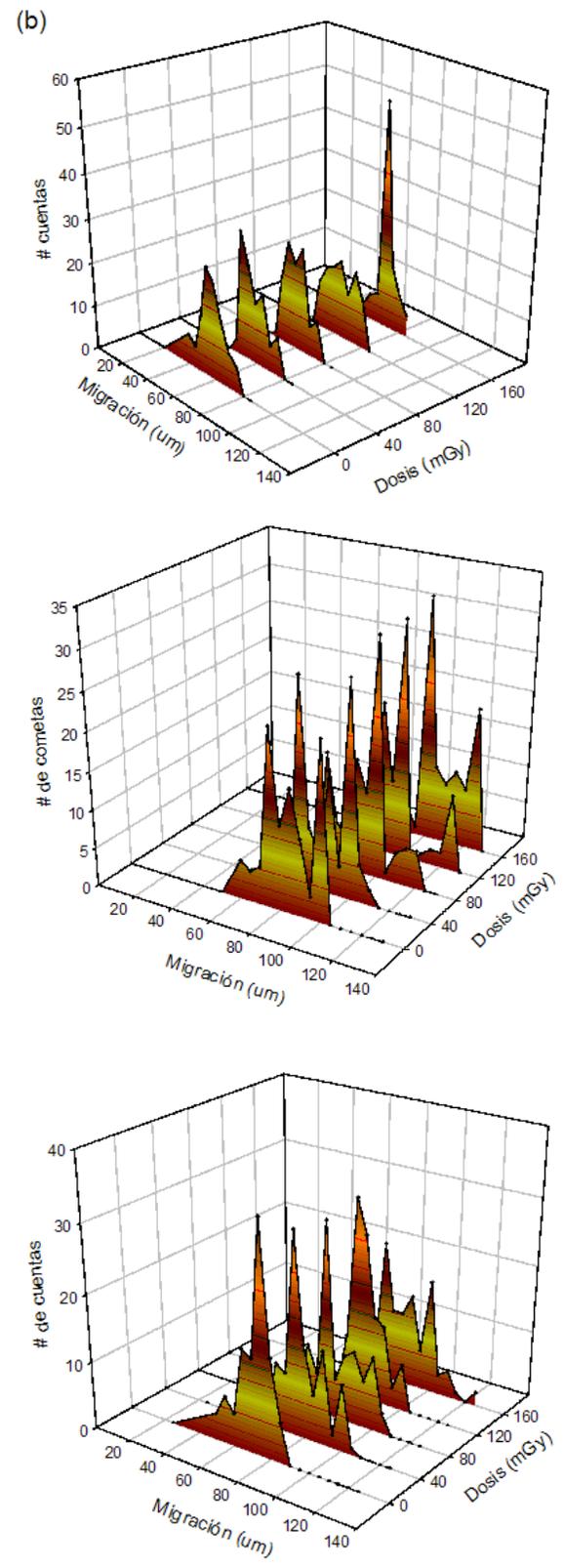
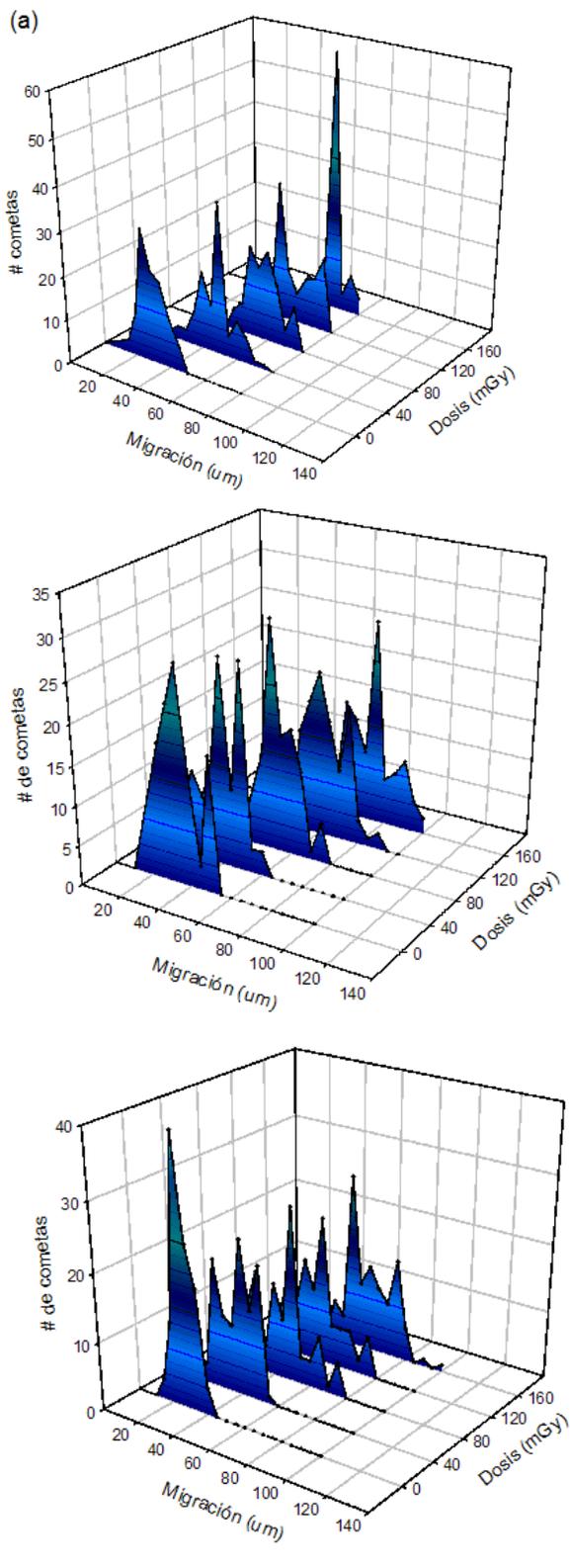


Figura 8.9 Histogramas del número de cometas versus migración generados por exposición de células AT a radiación alfa. Se presentan las tres repeticiones del experimento neutro (Panel A) y alcalino (Panel B).

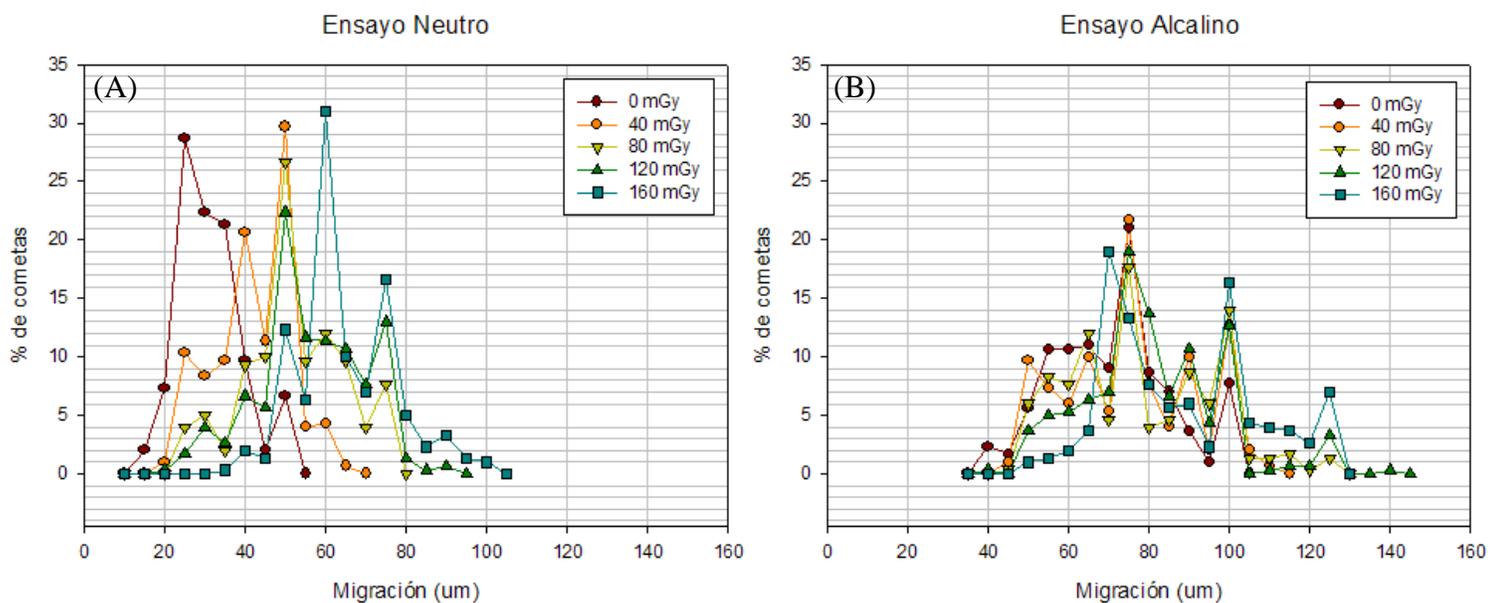


Figura 8.10 Porcentaje de cometas versus longitud de cola de células AT expuestas a una fuente emisora de partículas alfa (^{241}Am) a dosis de 0 a 160 mGy obtenidos de la versión neutra (izquierda) y alcalina (derecha) del ensayo cometa. Los porcentajes toman en cuenta los datos obtenidos de las tres repeticiones.

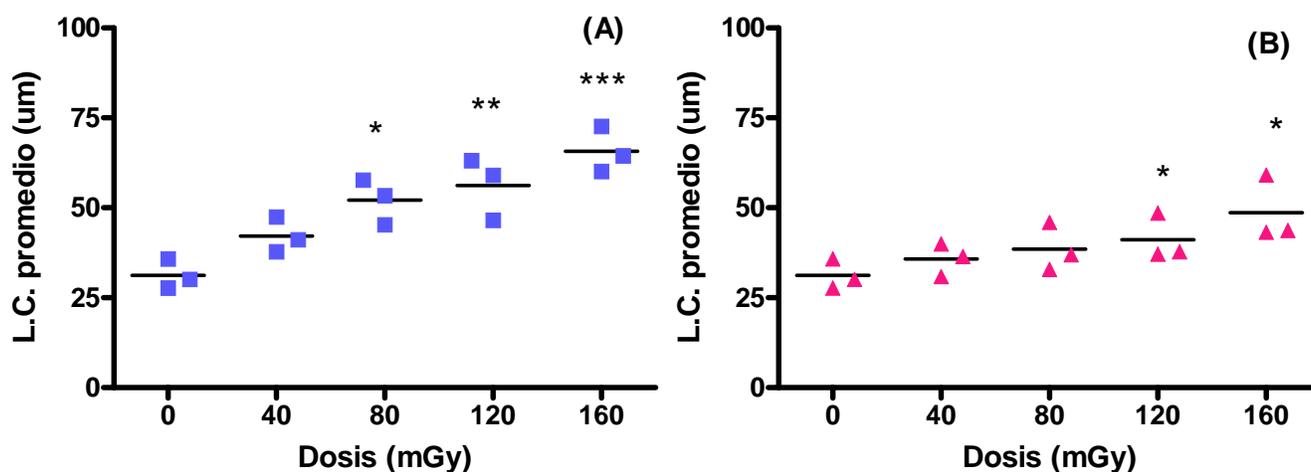


Figura 8.11 Se muestra la longitud de cola (L.C.) promedio normalizado a un mismo control para el ensayo neutro (a) y el alcalino (b) de células AT expuestas a una fuente emisora de partículas alfa (^{241}Am) a dosis de 0 a 160 mGy. El análisis estadístico usado fue una t-student pareada entre control y las distintas dosis: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

8.2.2 Irradiación de Linfocitos.

En la Figura 8.12 se muestran los histogramas de las longitudes de cola versus el número de cometas para las distintas dosis. Cabe recordar que debido a problemas en la recolección de células sólo se obtuvieron datos de dos de las tres repeticiones del experimento. Los histogramas del Panel B muestran un total de 100 cometas por dosis, mientras que los del Panel A muestran 50 y 100 cometas contabilizados en la primera y segunda gráfica (de arriba hacia abajo) respectivamente.

Las gráficas obtenidas para la versión neutra del ensayo cometa (Panel A) muestran un incremento en la migración entre el control y la dosis más alta. Para las dosis intermedias no se observa un cambio en la distribución con respecto al daño basal. Al juntar todos los datos (ver Figura 8.13, Panel A) la longitud de cola más frecuente a 0 mGy (25%) son cerrados ($5 \mu\text{m}$) y otro tanto (23%) presenta una migración de $15 \mu\text{m}$. Para dosis de 40 y 80 mGy los cometas siguen presentando longitudes de cola de $5 \mu\text{m}$ como las más frecuentes, pero cuando se les expone a 120 mGy la cantidad de cometas con migraciones mayores a $20 \mu\text{m}$ incrementa.

En el Panel B de la Figura 8.12, las gráficas sugieren que, al contrario que para el ensayo neutro, existe un incremento en migración desde una dosis de 40 mGy. Sin embargo, la distribución no parece modificarse a dosis más altas. Algo importante a resaltar es el hecho de que no se observa de manera clara la existencia de dos poblaciones; como se hizo notar en la Figura 8.5 en la que los linfocitos fueron expuestos a las partículas beta. Dicha ausencia desde el daño basal sugiere que el manejo que se le da a la muestra celular antes, durante y después de la irradiación causa daño extra que se manifiesta en la desaparición de cometas cerrados. La Figura 8.13 Panel B muestra que aun cuando los cometas con longitud de cola de $75 \mu\text{m}$ son los más frecuentes a todas las dosis, incluyendo el control, la distribución se corre hacia mayores migraciones y se mantiene para las dosis de 40, 80, 120 y 160 mGy.

En la Figura 8.14 se presentan los promedios de las longitudes de cola para el ensayo neutro (Panel A) y los promedios normalizados para el ensayo alcalino (Panel B). La prueba estadística ANOVA pareada con Bonferroni post-test fue aplicada para encontrar diferencias entre las medias de las longitudes de cola de las distintas dosis y el control correspondiente. El Panel A demuestra lo que era visible en los histogramas, es decir, sólo existe diferencia significativa entre 0 y 160 mGy ($p < 0.05$).

Por otro lado, en el Panel B la prueba estadística solamente encuentra una diferencia significativa entre el control y la primera (40 mGy) y la última dosis (160 mGy). Las dosis intermedias de 80 y 120 mGy no presentan diferencia con el basal.

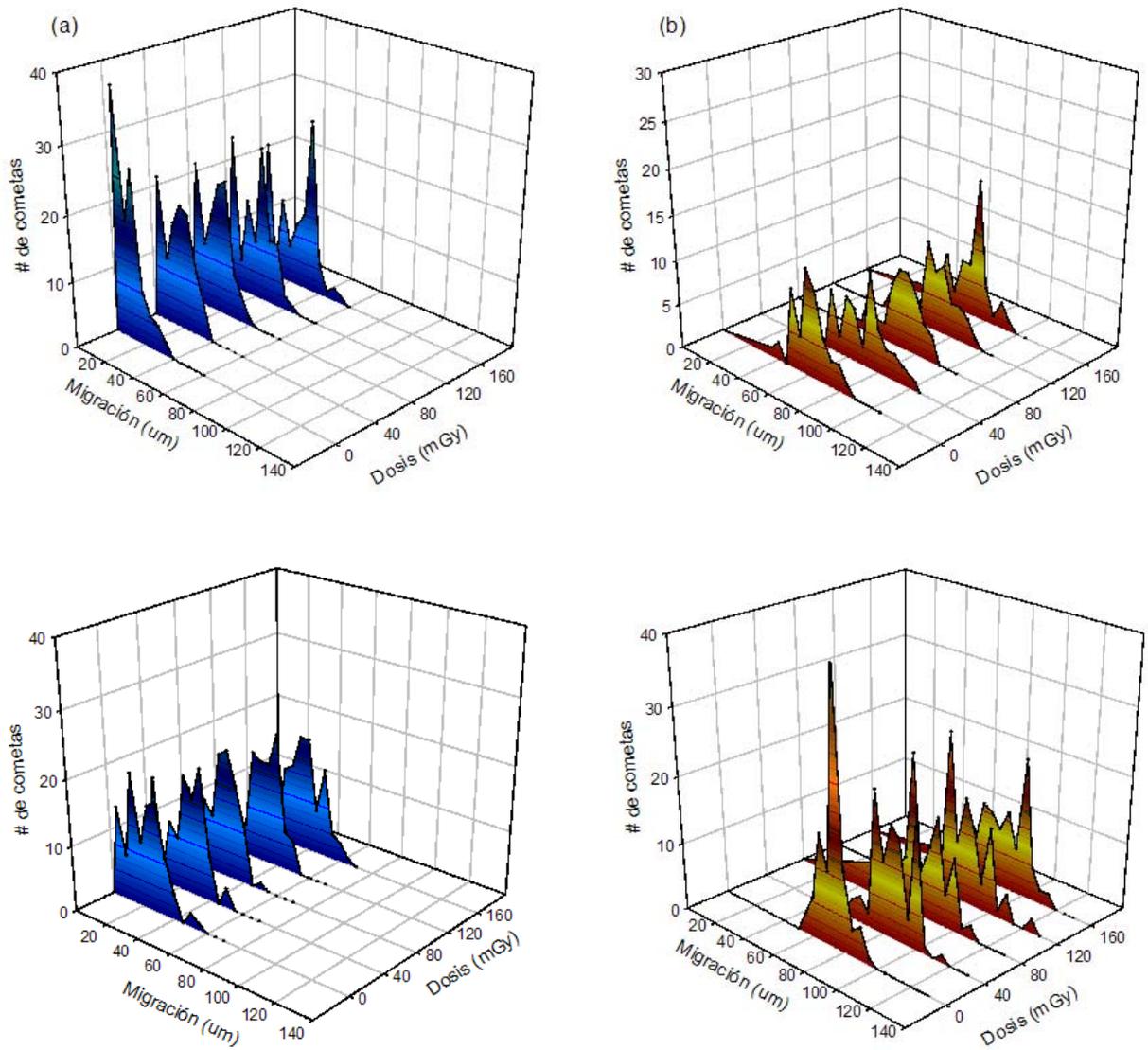


Figura 8.12 Histogramas del número de cometas versus migración generados por exposición de linfocitos a radiación alfa. Debido a la pérdida de células irradiadas sólo se presentan dos repeticiones del experimento neutro (Panel A) y del alcalino (Panel B). Los histogramas del Panel B muestran un total de 100 cometas por dosis mientras que los del Panel A muestran un total de 50 y 100 cometas en la primera y segunda gráfica (de arriba hacia abajo), respectivamente.

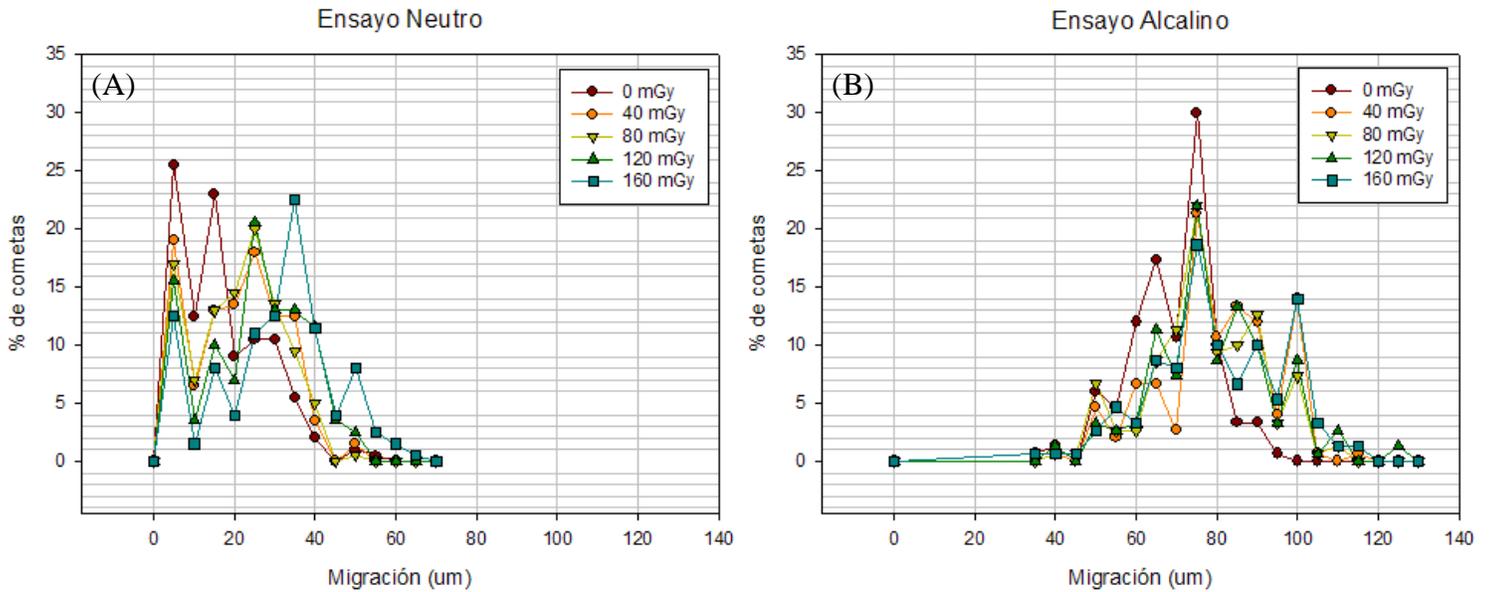


Figura 8.13 Porcentaje de cometas versus longitud de cola de linfocitos expuestos a una fuente emisora de partículas alfa (^{241}Am) a dosis de 0 a 160 mGy obtenidos de la versión neutra (izquierda) y alcalina (derecha) del ensayo cometa. Los porcentajes toman en cuenta los datos obtenidos de las dos repeticiones.

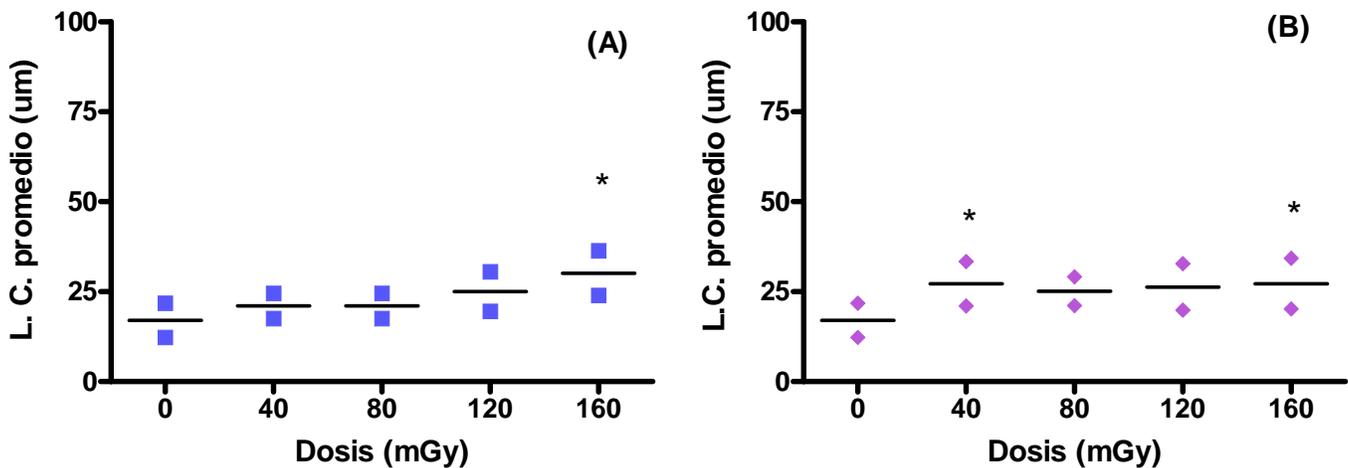


Figura 8.14 Longitud de cola (L.C.) promedio normalizado a un mismo control para el ensayo neutro (a) y el alcalino (b) de linfocitos expuestos a una fuente emisora de partículas alfa (^{241}Am) a dosis de 0 a 160 mGy. El análisis estadístico usado fue una ANOVA pareada entre el control y las distintas dosis: * $p < 0.05$.

8.3 Comparación del daño al ADN en células AT y linfocitos.

Para poder realizar la comparación entre los resultados a la exposición a radiación beta y alfa fue necesario hacer una nueva normalización. Dividiendo el promedio de las longitudes de cola entre el promedio control correspondiente obtenemos un parámetro adimensional, útil para la comparación, denominado ‘daño relativo’. Esta normalización hace que el promedio basal, en cualquier caso, sea igual a la unidad.

En la Figura 8.15 se muestran las curvas dosis-efecto al graficar el ‘daño relativo’ versus la dosis para las células AT (Paneles A y B) y los linfocitos (Paneles C y D) expuestos a las partículas beta y las alfa, respectivamente. Cada gráfica contiene dos curvas, una obtenida para el daño causado por la producción de roturas tipo DSB (ensayo neutro) y la otra obtenida para el daño causado por la producción de roturas SSB (ensayo alcalino). La prueba estadística aplicada fue ANOVA pareada con un post-test de Bonferroni que comparó parejas de promedios de daño relativo para los ensayos neutro y alcalino a cada dosis.

El análisis estadístico de los valores en el Panel A revela que la producción de roturas tipo SSB y DSB es similar a dosis de 40 y 80 mGy ($p > 0.05$). Sin embargo, a las dosis más altas (120 y 160 mGy) la producción de SSB aumenta significativamente ($p < 0.01$) con respecto a la producción de DSB. La exposición a radiación alfa (Panel B) provoca el efecto contrario; es decir, las roturas de tipo DSB predominan sobre las SSB a partir de una dosis de 80 mGy, aumentando dicha diferencia de manera paulatina con la dosis.

Cabe resaltar que los datos obtenidos de la irradiación de la línea celular con ambos tipos de radiación son consistentes con un incremento lineal con la dosis tanto para roturas de tipo SSB como DSB. Las curvas fueron ajustadas por el programa Sigmaplot v. 10 y sus parámetros son presentados en la Tabla 8.1. Todos los coeficientes de correlación fueron mayores que 0.9. Las pendientes de las curvas dosis-efecto son proporcionales a la cantidad de roturas SSB o DSB por unidad de dosis (mGy) por lo que resulta interesante su análisis específico. La prueba t-student no pareada muestra la inexistencia de una diferencia significativa entre las pendientes para el ensayo alcalino para la exposición con partículas alfa y beta. Contrariamente, las pendientes para el ensayo neutro presentan una diferencia muy significativa ($p < 0.001$) entre ambos tipos de radiación.

Por último, en los Paneles C y D de la Figura 8.15 se presenta el ‘daño relativo’ causado por ambas radiaciones en linfocitos. En el Panel C, la prueba estadística sugiere que la radiación beta parece producir la misma cantidad de roturas SSB y DSB aún cuando a 120 mGy se pudo detectar una pequeña diferencia significativa ($p < 0.05$).

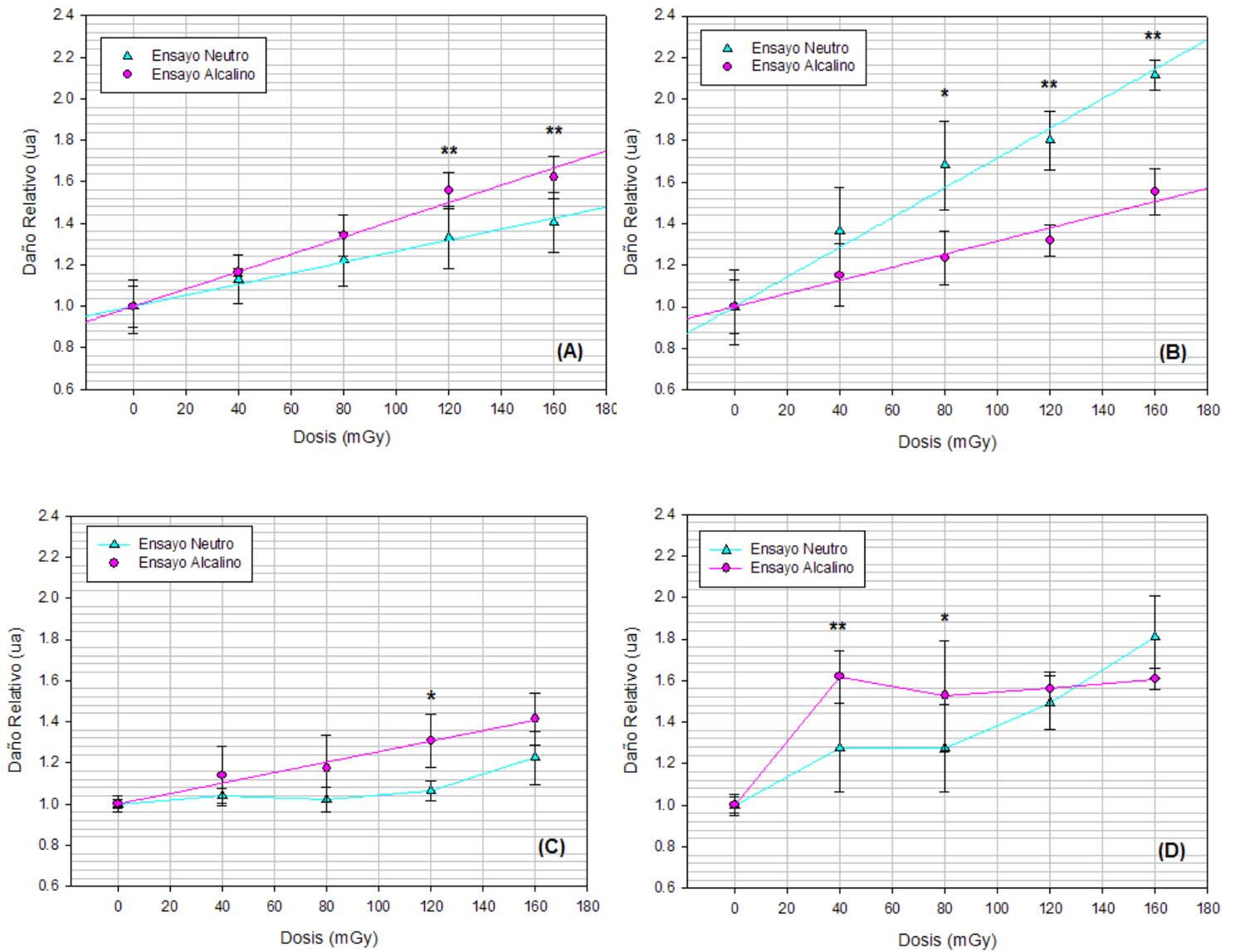


Figura 8.15 Daño relativo promedio como función de la dosis para las células AT (Paneles A y B) y los linfocitos (Paneles C y D) expuestas a radiación beta (Paneles A y C) y alfa (Paneles B y D). La incertidumbre representa una desviación estándar. El análisis estadístico realizado (prueba ANOVA pareada) compara el daño relativo para el ensayo alcalino con el del neutro en cada dosis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Versión	Radiación Beta		Radiación Alfa		Ana. Esta.
	a	b	A	b	
Neutra	1.00±0.02	0.0027±0.0002	1.00±0.07	0.0071±0.0007	p=0.0009 ***
Alcalina	1.00±0.03	0.0042±0.0003	1.00±0.04	0.0032±0.0004	p=0.1868 (ns)

Tabla 8.1 Parámetros ajustados por regresión lineal al daño relativo encontrado para las versiones neutra y alcalina al exponer células AT a radiación alfa y beta. La ecuación general es $Y = a + bx$. El análisis estadístico aplicado a las pendientes ('b') fue una prueba t-student. *** $p < 0.001$ (muy significativo), ns $p \geq 0.05$ (no significativa).

Por el otro lado, los resultados indican que la radiación alfa (Panel D) produce mayor cantidad de roturas tipo SSB que roturas DSB a 40 y 80 mGy ($p < 0.001$ y < 0.05 , respectivamente), pero dicha tendencia se revierte a 120 mGy. A pesar de que no se encontró una diferencia significativa a 160 mGy, la curva dosis-daño parece sugerir que a dosis mayores las roturas DSB son las que predominan.

Resulta de interés la observación de que en las curvas dosis-efecto obtenidas al exponer linfocitos a radiación beta no se encuentra una relación lineal clara entre dosis y el daño por roturas tipo DSB pero sí para SSB. La ecuación obtenida por regresión lineal es $Y = (1.00 \pm 0.02) + (0.0025 \pm 0.002)x$, donde 'Y' es el daño relativo y 'x' es la dosis. La prueba t-student muestra que existe una diferencia significativa entre esta pendiente y las obtenidas para las células AT. En cuanto a la radiación alfa, queda claro que el comportamiento del tipo de daño inducido no es lineal para ninguno de los dos tipos de roturas.

8.4 Análisis

Como se mencionó en 4.2, existen distintas formas de análisis de los cometas siendo una de ellas la longitud de cola. En este trabajo se ha medido la migración del ADN a través de éste parámetro que, al graficarlo en función de la dosis, nos permite inferir de manera cualitativa la severidad del daño causado por la radiación ionizante.

Para obtener datos cuantificables hemos desarrollado un simple modelo matemático que se basa en tres puntos:

- El ensayo cometa alcalino detecta daño de tipo SSB.
- El ensayo cometa neutro detecta daño de tipo DSB.

- El parámetro de longitud de cola (migración) es proporcional a la cantidad de roturas producidas que a su vez depende de la dosis del agente genotóxico administrado.

La linealidad encontrada en las curvas dosis-efecto de la figura 8.15 para la línea celular nos permite aplicar de manera simple las siguientes ecuaciones para la longitud de cola:

$$L.C._A(D) = \alpha s(D) + L.C._A^0 \quad \text{Ec. 8.1}$$

$$L.C._N(D) = \beta d(D) + L.C._N^0 \quad \text{Ec. 8.2}$$

Donde $L.C._x$ es la longitud de cola para el ensayo tipo x (alcalino o neutro) que es proporcional a la cantidad de roturas SSB (s) y DSB (d) y donde α y β son los coeficientes de proporcionalidad o la sensibilidad del ensayo alcalino y neutro, respectivamente y $L.C._x^0$ es la longitud de cola del control o daño basal que presentan las células.

Si ahora graficamos los promedios de las longitudes de cola alcalinas versus neutras para las tres repeticiones de los experimentos, obtenemos gráficas como las que se muestran en las Figura 8.16 (radiación beta) y 8.17 (radiación alfa). Observamos que la relación en todos los casos es de tipo lineal. Además, al ajustar las curvas por el método de regresión lineal obtenemos que las tres pendientes (m) en la Figura 8.16 son mayores que 1, mientras las pendientes en la Figura 8.17 son menores que 1. Si estos experimentos se repitieran N veces, el promedio de las pendientes M_i (siendo el subíndice i el tipo de radiación) tenderá a un valor dado por:

$$M_i = \frac{\sum_{k=1}^N m_k}{N} = \frac{L.C._A - L.C._A^0}{L.C._N - L.C._N^0} \quad \text{Ec. 8.3}$$

Que al despejar de las ecuaciones 8.1 y 8.2 y sustituir en 8.3 obtenemos:

$$M_i = \frac{\alpha \left[\frac{s}{d} \right]_i}{\beta} \quad \text{Ec. 8.4}$$

Con los datos recolectados en este trabajo tenemos que los promedios de las pendientes son:

$$M_{Beta} = 1.674 \pm 35\% \quad \text{Ec. 8.5}$$

$$M_{Alfa} = 0.449 \pm 29\% \quad \text{Ec. 8.6}$$

Por lo que despejando la ecuación 8.4 obtenemos:

$$\left[\frac{s}{d} \right]_{Beta} = (1.674 \pm 35\%) \frac{\beta}{\alpha} \quad \text{Ec. 8.7}$$

$$\left[\frac{s}{d} \right]_{Alfa} = (0.449 \pm 29\%) \frac{\beta}{\alpha} \quad \text{Ec. 8.8}$$

Encontramos que el cociente de roturas SSB sobre roturas DSB que causa la radiación beta es mayor que el debido a la radiación alfa. Desgraciadamente no es posible saber el valor exacto ya que no es posible obtener los coeficientes α y β para los ensayos alcalino y neutro de los datos aquí exhibidos. Lo que sí podemos encontrar es la proporción entre dichos cocientes para la radiación beta y alfa. Si despejamos el cociente β/α de las ecuaciones 8.7 y 8.8 obtenemos finalmente que:

Ec. 8.9

$$\left[\frac{s}{d} \right]_{Beta} = (3.728 \pm 45\%) \left[\frac{s}{d} \right]_{Alfa}$$

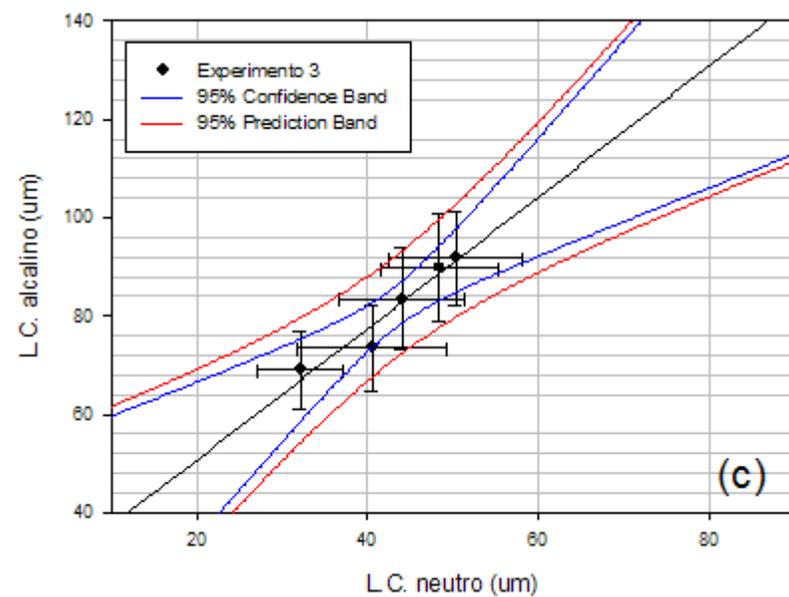
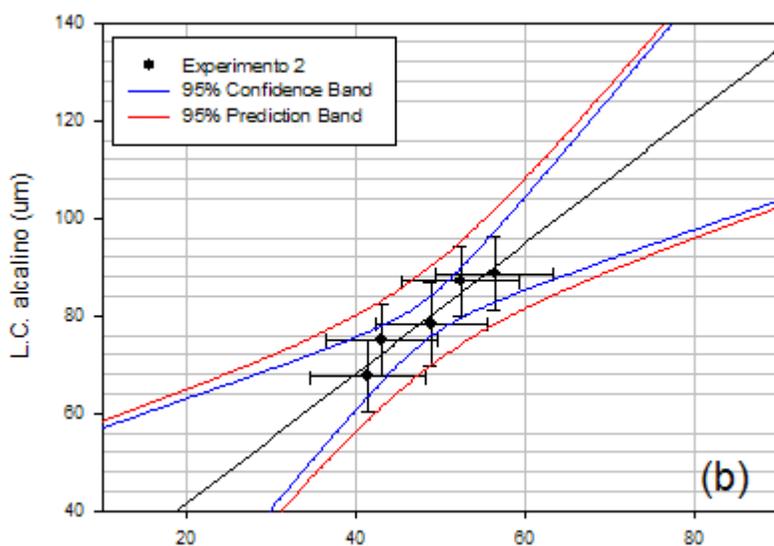
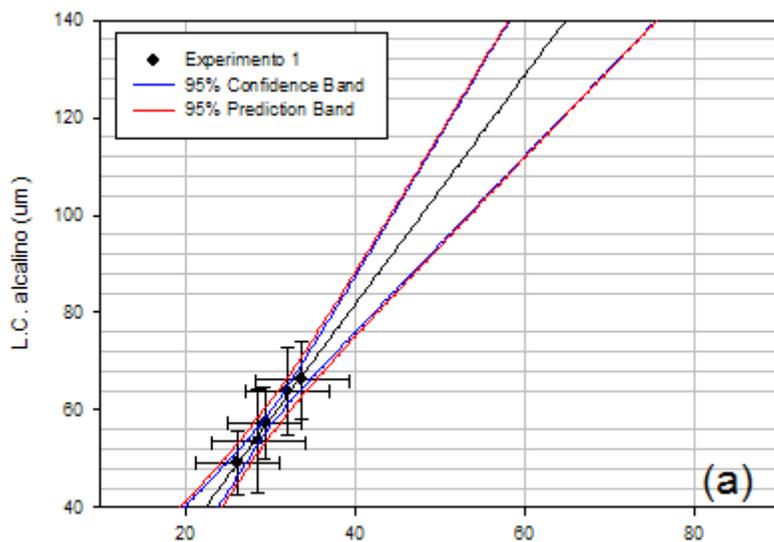


Figura 8.16 Longitud de cola (L.C.) para la versión alcalina versus longitud de cola para la versión neutra de células AT expuestas a dosis 0 - 160 mGy de radiación beta. (a), (b) y (c) son las tres repeticiones del experimento. Las curvas fueron ajustadas por Sigmaplot v.10 mediante el método de regresión lineal obteniendo ecuaciones de tipo $y = mx + b$:

(a) $m=2.35\pm 0.17$, $b=12.61\pm 5.22$, $r = 0.99$.

(b) $m=1.33\pm 0.23$, $b=14.79\pm 11.38$, $r=0.96$.

(c) $m=1.34\pm 0.21$, $b=23.87\pm 9.07$, $r=0.97$.

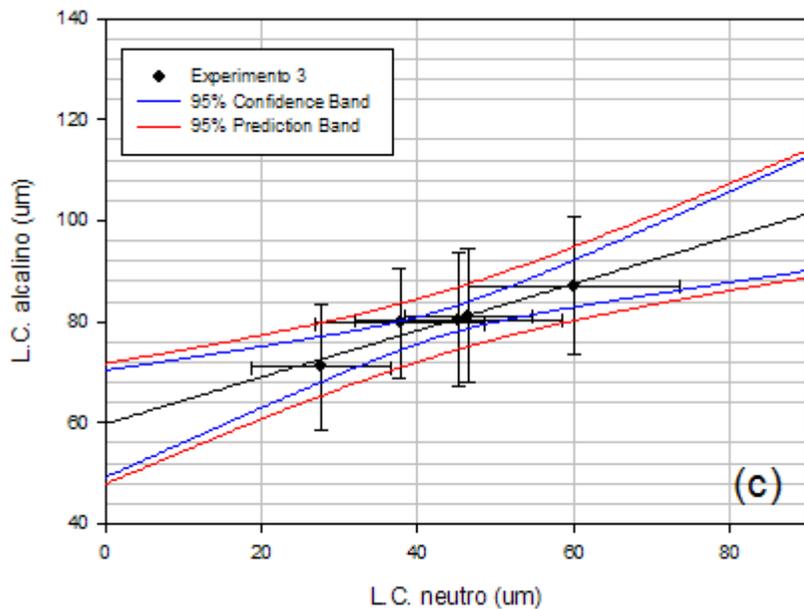
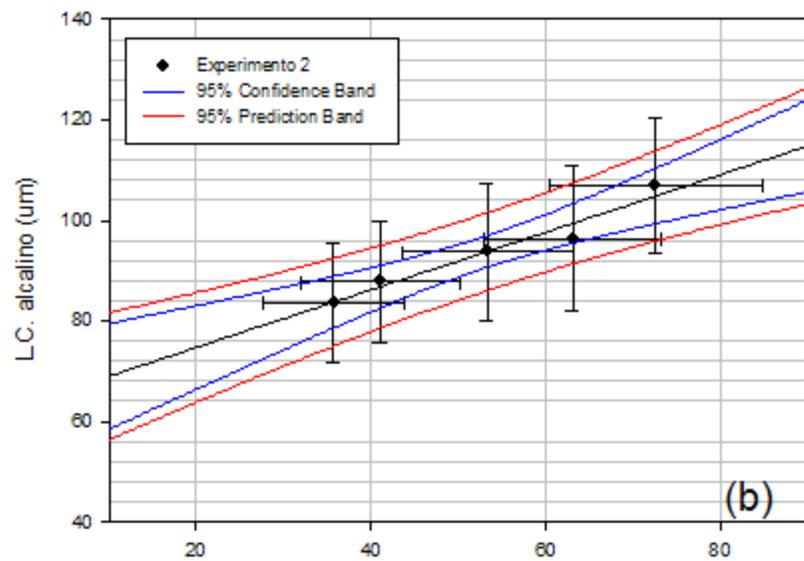
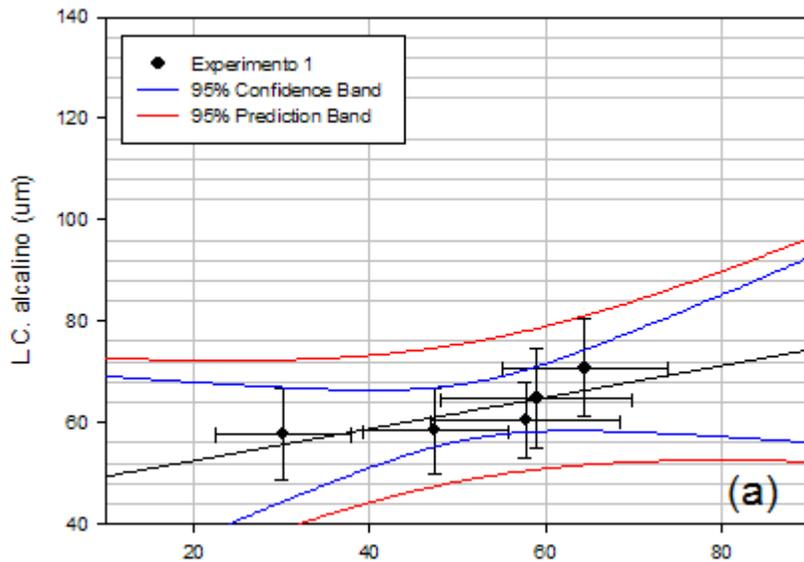


Figura 8.17 Longitud de cola (L.C.) para la versión alcalina versus longitud de cola para la versión neutra de células AT expuestas a dosis 0 - 160 mGy de radiación alfa. (a), (b) y (c) son las tres repeticiones del experimento. Las curvas fueron ajustadas por Sigmaplot v.10 mediante el método de regresión lineal obteniendo ecuaciones de tipo $y = mx + b$:

- (a) $m=0.31 \pm 0.14$, $b=46.23 \pm 7.61$, $r=0.78$.
- (b) $m=0.57 \pm 0.07$, $b=63.23 \pm 4.01$, $r=0.98$.
- (c) $m=0.46 \pm 0.07$, $b=59.79 \pm 3.32$, $r=0.96$.

9. Discusión

Aún cuando está bien documentado que la mayoría de las exposiciones a radiación ionizante que sufren los seres humanos son a dosis bajas (≤ 0.2 Gy), la información en la literatura sobre los efectos biológicos a estas dosis es limitada. De este modo, el objetivo del presente trabajo fue el determinar el tipo de daño inicial predominante en el ADN al exponer células de una línea celular AT (consideradas radiosensibles por tener un mecanismo de reparación de roturas DSB defectuoso) y linfocitos de sangre periférica (capaces de reparar eficientemente roturas DSB) a dosis bajas (≤ 0.16 Gy) de radiación considerada de baja (betas de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) y alta (alfas de ^{241}Am) transferencia lineal de energía. Las versiones alcalina y neutra del ensayo cometa fueron utilizadas para la detección de roturas de una o dos cadenas del ADN, respectivamente, mediante el parámetro longitud de cola.

Primeramente cabe resaltar que nuestros resultados muestran una distribución de longitud de cola heterogénea (Figuras 8.3, 8.6, 8.10 y 8.13), lo que confirma la naturaleza estocástica de la RI al inducir daño en una población celular. El hecho de que en los histogramas para la radiación beta y alfa se encontraran células sin incremento en daño comparado con el basal sugiere que hubo un porcentaje de células que no fueron atravesadas por partículas emitidas por las fuentes radiactivas. En particular, en las Figuras 8.3 y 8.6 correspondientes a la exposición de células AT expuestas a partículas beta, no se encuentra evidencia de la existencia de una subpoblación celular que estuviera comportándose de diferente manera al resto; lo que sugiere que la muestra celular se encontraba sincronizada al momento de la irradiación. Por el contrario, los resultados de la exposición de linfocitos (ver Figuras 8.9 y 8.11) indican la presencia de dos poblaciones de cometas: los cerrados (longitud de cola menor a $5\ \mu\text{m}$) y los abiertos (longitud de cola mayor a $10\ \mu\text{m}$). Este comportamiento se debe a que los linfocitos se encuentran en diferentes estados del ciclo celular. Si las células se encuentran en la fase S, la longitud de cola incrementa debido a la presencia de los fragmentos de Okasaki mientras que si la célula se encuentra en alguna otra fase, el cometa se observa cerrado.

En la literatura se ha reportado que dosis mayores que 1 Gy de radiación beta pueden producir roturas de tipo DSB. Claros ejemplos son los estudios realizados por Murakami y col. [33] y Mill y col. [31] en los que se mostró un incremento en micronúcleos (MN) con respecto a la dosis beta de una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ usando células CHO-K1 y linfocitos humanos, respectivamente. La formación de MN se da por daño irreparable, específicamente roturas DSB [33]. A dosis más bajas, Vral y col. [56] encontraron que radiación de baja LET (rayos γ del ^{60}Co) provoca un incremento en

MN para dosis menores que 0.5 Gy en células T y B. También, Rothkamm y col. [44] reportaron un claro incremento en la formación de DSB en fibroblastos pulmonares humanos después de ser expuestos a una dosis de rayos X de 0.2 Gy. Dicho incremento fue inferido al contar la cantidad de focos γ -H2AX, técnica cuya confiabilidad ha sido demostrada para ser utilizada como un marcador de formación de roturas DSB [47].

Por otro lado, existen publicaciones que discuten la producción inicial de daño al ADN por exposición a la RI basados en métodos computacionales Monte Carlo que simulan el paso de la RI por secciones de ADN lineal en un medio acuoso. Nikjoo y col. [36] aplicaron el código Monte Carlo PITS (modelaje de trayectorias de iones) y CPA100 (modelaje de trayectorias de electrones δ) para encontrar el daño directo de la radiación, al que incorporaron un cierto nivel de daño indirecto debido a la formación de radicales libres en la cercanía del ADN. El daño inicial es clasificado en roturas simples (SSB y DSB) y complejas (SSB+ y DSB+) basándose en la cercanía de las roturas producidas. Se concluye que al aumentar la LET, la complejidad de roturas de una y dos cadenas del ADN aumenta en complejidad, sin embargo, la cantidad de roturas simples (SSB y DSB) por unidad de dosis permanece constante en un amplio rango de LET. A pesar de esto, no encontramos publicaciones que discutan esta teoría a través de resultados obtenidos de la exposición de modelos biológicos.

En el presente trabajo, células radiosensibles (células AT) expuestas a partículas beta y subsecuentemente analizadas por la versión neutra del ensayo cometa presentan una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de una dosis de 160 mGy (Figura 8.4 Panel A) y no a dosis menores. Esta observación sugiere que a 160 mGy más de una partícula beta pasa por algunas células de la muestra celular, lo que se manifestaría como un incremento en la producción de roturas DSB sobre el nivel basal. Sin embargo, al ser analizadas con la versión alcalina del ensayo cometa (Figura 8.4 Panel B), se detecta un incremento significativo en la producción de roturas SSB sobre el control a partir de una dosis de 40 mGy hasta la dosis más alta. Esto apoya la idea de que el daño causado por exposición a dosis bajas de radiación de baja LET se encuentra dominado por la acción de una sola partícula.

Por otro lado, debido al patrón de depósito de energía que presentan las partículas alfa, se esperaría que roturas DSB fuesen producidas aun cuando el núcleo se vea atravesado por una sola partícula. Esto implicaría la aparición de roturas DSB inclusive a bajas dosis. Hu y col. [24] muestran resultados en los que el daño de tipo DSB inducido por una dosis de 0.5 mGy de radiación alfa, concuerda con dicha aseveración. Nuestros resultados obtenidos para células AT para el ensayo

neutro (Figura 8.11 Panel A) muestran una diferencia significativa con respecto al control a una dosis de 80 mGy y mayores. Para el ensayo alcalino (Figura 8.11 Panel B) se obtiene una diferencia significativa con respecto al control a partir de una dosis de 120 mGy. De modo que los resultados sugieren que no sólo se están produciendo roturas de doble cadena si no que también hay una cantidad significativa de roturas de una sola cadena.

Los datos revelan que las curvas dosis-efecto encontradas presentan una relación lineal entre el daño relativo y la dosis (Figura 8.15 Paneles A y B). Esto nos permite calcular la efectividad biológica de la radiación beta comparada con la de la radiación alfa. Se calculó que para producir un incremento del 50% sobre el nivel basal de roturas DSB (daño relativo de 1.5) la dosis beta debe ser 2.6 veces mayor que la dosis alfa. Para un incremento de 50% de roturas SSB, la dosis beta debe ser de 0.8 veces la dosis alfa. En otras palabras, la radiación alfa produce 2.6 veces más cantidad de roturas DSB y alrededor de la misma cantidad de roturas SSB que la radiación beta dentro del rango de dosis probado aquí.

De primera impresión, esto se encuentra en contradicción con la predicción hecha por modelos computacionales [36]. En la tabla 8.1 se muestra que las pendientes (que son proporcionales a la cantidad de roturas por mGy) de las curvas de dosis-efecto correspondientes a la producción de SSB (ensayo alcalino) son estadísticamente consistentes para la radiación beta y la alfa. Sin embargo, se muestra la existencia de una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre las pendientes correspondientes a la producción de roturas DSB, siendo ésta mayor para la radiación alfa. Este aumento en el porcentaje de células que presentan roturas DSB puede sugerir que la radiación alfa provoca un efecto 'bystander' en células AT. Por el momento, esta explicación debe ser considerada *meramente especulativa* y sería necesario realizar otro tipo de experimentos que la confirmen.

Dicho efecto ya ha sido observado *in vitro* para este tipo de radiación en células AT [10]. Burdak-Rothkamm y col. argumentaron que el gen ATM no era necesario para la formación de focos γ -H2AX bajo condiciones 'bystander', sino que es el gen ATR el que juega un papel crucial. Por lo tanto no sería posible excluir la posibilidad de que nuestro modelo celular involucre un proceso alternativo por el cual se inicie el efecto 'bystander'.

Para complementar los resultados anteriores se acordó la irradiación de linfocitos de sangre periférica bajo las mismas condiciones en las que se manejaron las células AT. Los linfocitos son considerados como un modelo celular ideal para el biomonitorio de la exposición a algunos agentes genotóxicos tales como la RI ya que la capacidad de reparación del ADN es considerada como un factor que contribuye a la variabilidad interindividual en el desarrollo de cáncer [12]. De modo que, el

realizar la exposición de linfocitos a bajas dosis de radiación ionizante resulta interesante para observar si la pronta capacidad de reparación influye en el daño inicial causado al ADN.

Nuestros resultados indican que la radiación beta (Figura 8.7 Panel A) no produce roturas DSB detectables por arriba del nivel basal en cualquiera de las dosis, mientras que la producción de roturas SSB (Figura 8.7 Panel B) se vuelve significativa a una dosis de 120 mGy. Al observar la comparación entre los ‘daños relativos’ (Figura 8.15 Panel C) se sugiere que la radiación beta produce alrededor de la misma cantidad de roturas SSB que DSB a dosis de 40 y 80 mGy, al igual que en la línea celular. Sin embargo, a 120 mGy se detecta que el daño que predomina es del tipo SSB pero a 160 mGy dicha diferencia desaparece.

En cuanto a la producción de roturas DSB causadas por la radiación alfa, sólo se ve incrementada con respecto al control a una dosis de 160 mGy (Figura 8.14 Panel A). Interesantemente, se observa un incremento significativo en la producción de SSB (Figura 8.14 Panel B) desde 40 mGy, lo que implica que las roturas SSB sean el tipo de daño predominante a dosis de 40 y 80 mGy (Figura 8.15 Panel D). A mayores dosis (120 y 160 mGy) la producción de roturas DSB incrementa haciendo que el daño causado por radiación alfa produzca de ambos tipos de roturas por igual.

El punto a resaltar es que existe una relación dosis-daño para linfocitos pero resulta no ser lineal como la encontrada para células AT, excepto para las roturas SSB causadas por la radiación beta (Figura 8.15 Panel C). Además, en este caso se encontró que la pendiente fue estadísticamente diferente a la obtenida para las células AT. Así que los datos sugieren que ambos tipos de radiación no están produciendo una cantidad constante de roturas SSB y/o DSB inicial por unidad de dosis lo que va en directa contradicción con lo estipulado por los cálculos computacionales.

Debido a que todas las condiciones de cultivo, exposición a la RI y del ensayo cometa fueron exactamente iguales que para las células AT, la explicación para la diferencia observada debe radicar en las distintas características biológicas de ambos modelos celulares. El hecho de que los linfocitos tengan un mecanismo de reparación más eficiente que las células AT sugiere que la radiosensibilidad celular también está jugando un papel importante en cuanto al daño inicial provocado.

Tampoco hay que descartar el hecho de que los datos reportados para la irradiación con alfas corresponden a dos repeticiones en vez de las tres realizadas en todos los demás casos. Es posible que la menor cantidad de datos comprometa la confiabilidad de la estadística pero este error no debe modificar la tendencia de las gráficas dosis-daño. Se recomienda repetir este experimento para tener una muestra de 300 cometas por dosis de modo que se defina mejor la relación dosis-daño.

Al igual que con las células AT, los datos presentados para los linfocitos muestran que la radiación alfa produce mayor cantidad de roturas DSB en comparación con la radiación beta, sin embargo, no es posible descartar que esto se deba a un efecto 'bystander' ya que dicho efecto ha sido observado en otras líneas celulares sanas. Han y col. [20], al igual que Hu y col., reportaron un incremento en la producción de DSB en fibroblastos humanos normales 30 minutos después de la exposición a dosis tan bajas como 1 cGy de partículas alfa emitidas por una fuente de ^{241}Am .

En conjunto, los resultados presentados aquí, indican que las conclusiones obtenidas de los métodos computacionales no determinan en su totalidad el de daño producido inicialmente en ADN por exposición a la radiación ionizante. La simulación resulta pues, un escalón más que nos acerca al entendimiento de los mecanismos físicos iniciados por la RI. Sin embargo, los variados mecanismos biológicos juegan un papel fundamental y deben ser estudiados con mayor profundidad.

10. Conclusiones

En el presente trabajo se expusieron una línea celular linfoblastoide homocigota recesiva para el gen ATM (células AT) y linfocitos aislados de sangre periférica a dosis bajas (≤ 160 mGy) de radiación ionizante de baja LET (partículas beta de una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) y de alta LET (partículas alfa de una fuente de ^{241}Am) con el objetivo de verificar el principal tipo de daño inicial al ADN inducido, mediante el uso del ensayo de electroforesis unicelular en su versión neutra (sensible a roturas DSB) y alcalina (sensible a roturas SSB). De los resultados aquí mostrados se concluye lo siguiente:

- El diseño singular del irradiador de partículas alfa permitió reproducibilidad en la exposición en aire de una capa delgada de muestra celular, mostrando una uniformidad en el depósito de dosis mayor que un 97%. Su tamaño ofrece fácil movilidad y la ventaja de poder realizar irradiaciones en un ambiente estéril si se requiere.
- El uso de ambas versiones del ensayo cometa permitió determinar el daño al ADN por exposición a dosis bajas de radiación de alta y baja LET. Se encontró que:
 - *En células AT*: la radiación beta induce principalmente roturas de tipo SSB a partir de una dosis de 120 mGy mientras que la radiación alfa induce principalmente roturas de tipo DSB desde una dosis de 80 mGy.
 - *En linfocitos de sangre periférica*: se encontró que la radiación beta no induce roturas por arriba del nivel basal hasta una dosis de 120 mGy para SSB y de 160 mGy para DSB. A la dosis más alta utilizada (160 mGy), el análisis estadístico no pudo distinguir qué tipo de lesión inicial fue el principal, por lo que se supone que la radiación de baja LET produce ambas roturas por igual. La radiación alfa induce principalmente daño de tipo SSB a dosis de 40 y 80 mGy pero a 120 y 160 mGy la cantidad de DSB es indistinguible de la de SSB.
- En células AT, las curvas dosis-efecto encontradas muestran una clara dependencia lineal entre el 'daño relativo' y la dosis implicando la inducción constante de ambos tipos de roturas por unidad de dosis (mGy) tanto para radiación de baja LET como de alta LET. Estos resultados están en concordancia con predicciones computacionales. La diferencia

estadísticamente significativa encontrada entre las pendientes de las curvas dosis-efecto para la radiación de baja y alta LET para el ensayo neutro sugiere la iniciación de un efecto biológico que provoca el incremento en el promedio general de células con daño DSB. La inducción de un efecto 'bystander' pareciera ser una explicación pues ya ha sido reportada en células AT por exposición a radiación alfa. Por el momento esta explicación es meramente especulativa y se requeriría de la realización de otros experimentos para aceptar o rechazar dicha hipótesis.

- En linfocitos, la pérdida de linealidad en las curvas de dosis-efecto se encuentra en contradicción con predicciones computacionales. Lo que significa que la capacidad de reparación juega un papel en la radiosensibilidad de este modelo celular en donde si se activan los mecanismos biológicos que protegen a la célula del daño cromosómico.

Dosis (mGy)	Distancia de irradiación (cm)								
	1.6	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.6
10	52 s	1 min 21 s	2 min 5 s	2 min 56 s	4 min	5 min 15 s	6 min 40 s	7 min 41 s	10 min
20	1 min 44 s	2 min 42 s	4 min 10 s	5 min 44 s	8 min	10 min 30 s	13 min 20 s	15 min 22 s	20 min
30	2 min 36 s	4 min 3 s	6 min 15 s	8 min 48 s	12 min	15 min 45 s	20 min	23 min 3 s	30 min
40	3 min 28 s	5 min 22 s	8 min 20 s	11 min 44 s	16 min	21 min	26 min 40 s	30 min 44 s	40 min
50	4 min 20 s	6 min 45 s	10 min 25 s	14 min 42 s	20 min	26 min 15 s	33 min 20 s	38 min 25 s	50 min
100	8 min 40 s	13 min 30 s	20 min 50 s	29 min 22 s	40 min	52 min 30 s	1 h 6 min	1 h 17 min	1 h 40 min
300	26 min	40 min 30 s	1 h 2 min	1 h 28 min	2 h	2 h 37 mins	3 h 18 min	3 h 51 min	5 h
500	43 min 20 s	1 h 7 min	1 h 44 min	2 h 26 min	3 h 20 min	4 h 22 min	5 h 30 min	6 h 25 min	8 h 20 min
1000	1 h 26 min	2 h 14 min	3 h 28 min	4 h 54 min	6 h 40 min	8 h 44 min	11 h	12 h 50 min	16 h 40 min
1500	2 h 33 min	3 h 21 min	4 h 32 min	7 h 11 min	10 h	13 h 6 min	16 h 30 min	19 h 15 min	25 h
2000	2 h 53 min	4 h 28 min	6 h 56 min	9 h 48 min	13 h 20 min	17 h 28 min	22 h	25 h 40 min	33 h 20 min

Tabla 2. Distancias y tiempos de irradiación necesarios para acumular las dosis mostradas. Se recomienda no usar los tiempos de irradiación que se muestran en las casillas grises.

Imagen obtenida del manual de uso para el irradiador de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ construido por el Fis. Alejandro Rodríguez [42].

REFERENCIAS

- [1] Angele, S. Hall, J. *The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor?* Mut. Res. **462**: 167-178 (2002).
- [2] Attix, F.H. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. John Wiley & Sons, USA (1986).
- [3] Brandan, M. E. Díaz, R. y Ostrosky, P. *La radiación al servicio de la vida*. SEP, FCE, CONACYT. La ciencia para todos. 3ª. Ed. México, D.F. (2003).
- [4] Brandan, M. E. Gamboa-deBuen, I. Rodríguez-Villafuerte, M. *Thermoluminescence induced by heavy charged particles*. Rad. Protec. Dos. **100**: 39-44 (2002).
- [5] Breckow, J. *Linear-no-threshold is a radiation-protection standard rather than a mechanistic effect model*. Radiat. Environ. Biophys. **44**: 257-260 (2006).
- [6] Brenner, D. J. y col. *Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know*. Proc. Nat. Acad. Sci. **25**: 13761-13766 (2003).
- [7] Brenner, D. J. Scahs, R.K. *Estimating radiation-induced cancer risks at very low doses: rationale for using a linear no-threshold approach*. Radiat. Environ. Biophys. **44**: 253-256 (2006).
- [8] Brusick, D. *Principles of Genetic Toxicology*. Plenum Press. Second Edition. New York, USA (1987).
- [9] Buenfil, A. E. y col. *Manual de procedimientos de trabajo del laboratorio de dosimetría de la radiación*. Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, UNAM (1996).

- [10] Burdak-Rothkamm, S. Short, S.C., Folkard, M., Rothkam, K., Prise, K.M. *ATR-dependent radiation-induced H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells*. *Oncogene* **26**:993-1002 (2007).
- [11] Burlinson, B. y col. *Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup*. *Mut. Res.* **627**: 31-35 (2001).
- [12] Chang, J. *DNA damage and repair measurements from cryopreserved lymphocytes without cell culture- A reproducible assay for intervention studies*. *Environ. Mol. Mut.* **47**: 503-508 (2006)
- [13] Cleasson, A. K. Stenerlöw, B. Jacobsson, L. Elmroth, K. *Relative biological Effectiveness of the α -particle emitter ^{211}At for double-strand break induction in human fibroblasts*. *Rad. Res.* **167**: 312-318 (2007).
- [14] Cohen, M. Simpson, S. *The effect of bleomycin on DNA synthesis in ataxia telangiectasia lymphoid cells*. *Environ. Mut.* **4**: 27-36 (1983).
- [15] Collins, A. R. y col. *The comet assay: what can it really tell us?* *Mut. Res.* **375**: 183-193 (1997).
- [16] Collins, A. R. *The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations*. *Mol. Biotech.* **26**: 249-261 (2004).
- [17] Ding, L. H. y col. *Gene expression profiles of normal human fibroblasts alter exposure to ionizing radiation: a comparative study of low and high doses*. *Rad. Res.* **164**: 17-26 (2005).
- [18] Friedl, A.A., Rühm, W. *LTN: a never ending story*. *Radiat. Environ. Biophys.* **44**:241-244 (2006).
- [19] Gamboa-deBuen, I. *Medida de la respuesta termoluminiscente (eficiencia y supralinealidad) de LiF:Mg,Ti expuesto a radiación altamente ionizante*. Tesis de doctorado en física. Instituto de Física, UNAM (1996).

- [20] Han, W. et al. *Constitutive nitric oxide acting as a possible intercellular signaling molecule in the initiation of radiation-induced DNA double strand breaks in non-irradiated bystander cells*. *Oncogene* **26**: 2330-2339 (2007).
- [21] Hall, E. J. *Radiobiology for the radiologist*. Lipponcott Williams & Wilkins. 4^a Ed. New York, USA (1994).
- [22] Hassan, I. Nyström, S. Nygren J. Hammarsten, O. *Activation of Ataxia Telangiectasia Mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA strand breaks*. *J. Biol. Chem.* **280(6)**: 4649-4655 (2005).
- [23] Höglund, E. Blomquist, E. Carlsson, J. Stenerlöw, B. *DNA damage induced by radiation of different linear energy transfer: initial fragmentation*. *Int. J. Radiat. Biol.* **76**: 539-547 (2000).
- [24] Hu, B. et al. *In Situ visualization of DSB to assess the extranuclear/extracellular effects induced by low-dose α -particle irradiation*. *Rad. Res.* **164**:2286-291 (2005).
- [25] International Commission on Radiation Protection. *ICRP Publication 60* (1990).
- [26] Khanna, K. K. *Cancer risk and ATM gene: a continuing debate*. *J. Nat. Can. Inst.* **92**: 795-802 (2000).
- [27] Lavin, F. M. Domenico, D. Chessa, L. *ATM and the DNA damage response: workshop on Ataxia-Telangiectasia and related syndromes*. *EMBO reports.* **7**:156-160 (2006).
- [28] Lavin, F. M. *The product of the gene mutated in ataxia telangiectasia*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**: 735-740 (1999).
- [29] Mata, D. *Susceptibilidad genética a dosis bajas de radiación ionizante*. Proyecto de tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (2005).
- [30] McKinnon, P. J. *ATM and ataxia telangiectasia*. *EMBO reports.* **5**: 772-776 (2004).

- [31] 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*. Rad. Res. **145**: 575-585 (1996).
- [32] Moscoso, 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-Xochimilco (2006).
- [33] Murakami, D. Suzuki, M.F. Dias, M. Okasaki, K. *Genotoxic and cytotoxic effects of ^{60}Co γ -rays and $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ β -rays on Chinese hamster ovary cells (CHO-K1)*. Radiat. Environ. Biophys. **43**: 91-99 (2004).
- [34] National Research Council, National Academy of Sciences. *Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation, BEIR VII Phase 2*, National Academies Press, Washington, DC, 2006.
- [35] Naxin, L. Banin, S. Ouyang, H. *ATM is required for I κ B kinase (IKK) activation in response to DNA double strand breaks*. J. Biol. Chem. **276**:8898-8903 (2001).
- [36] Nikjoo, H. O'Neill, P. Willson, W. P. and Goodhead, D. T. *Computational approach for determining the Spectrum of DNA damage induced by ionizing radiation*. Rad. Res. **156**: 577-583 (2001).
- [37] Olive, P. L. Wlodek, D. Banath, J. P. *DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis*. Cancer Res. **51**: 4671-4676 (1991).
- [38] Olive, P. L. Banath, J. P. *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells*. Nat. Prot. **1**:23-29 (2006).
- [39] Prasad, K. N. Cole, W. C. Hasse, G. M. *Health risks of low dose ionizing radiation in humans: A review*. Exp. Biol. Med. **229**: 378-382 (2004).
- [40] Podgorsak, E. B. *Radiation Oncology Physics: A handbook for teachers and students*. IAEA. Vienna (2005).

- [41] Ramírez, H. *Determinación de la dosis impartida a células expuestas a un irradiador de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ y en un equipo de rayos X*. Tesis de licenciatura en física. Facultad de Ciencias, UNAM (2005).
- [42] Rodríguez, A. *Diseño, construcción y caracterización dosimétrica a de un irradiador de bajas dosis para muestras biológicas*. Tesis de licenciatura en física. Facultad de Ciencias, UNAM (2003).
- [43] Rojas, E. *Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications*. J. Chrom. B **722**: 225-254 (1999).
- [44] Rothkamm, K. and Löbrich, M. *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. PNAS **100**: 5057-5062 (2003).
- [45] Sankaranarayanan, K. Wassom, J.S. *Reflections on the impact of advances in the assessment of genetic risks of exposure to ionizing radiation on international radiation protection recommendations between the mid-1950's and the present*. Mutat. Res. **658**:1-27 (2008).
- [46] Savitsky, K. y col. *A single Ataxia Telangiectasia gene with a product similar to PI-3kinase*. Science. **268**: 1749-1753 (1995).
- [47] Sedelnikova, O.A., Pilch D.R., Redon,C., and Bonner, W.M. *Histone H2AX in DNA damage and repair*. Cancer Biol. Ther. **2**:233-235 (2003).
- [48] Shiloh, Y. *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity*. Nat. Rev. Cancer. **3**:155-168 (2003).
- [49] Short, S. C. Bourne, S. Martindale, C. Woodcock, M. Jackson, S. P. *DNA damage responses at low radiation doses*. Rad. Res. **164**:292-302 (2005).
- [50] Swift, M. Chase, C. L. Morrell, D. *Cancer predisposition of Ataxia-Telangiectasia heterozygotes*. Cancer Genet. Cytogenet. **46**:21-27 (1990).

- [51] Tubiana, M. *The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses*. J. Radiol. Prot. **26**:317-324 (2006).
- [52] Turrence, G. Paul, P. Laflair, B. *Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53*. Oncogene. **20**: 5100-5110 (2001).
- [53] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Report to the General Assembly* (2000).
- [54] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Sources and effects of ionizing radiation. Vol. II: Annex G biological effects at low radiation doses*. UNSCEAR (2000).
- [55] Ville, C. y col. *Biología de Ville*. McGraw-Hill Interamericana editores. 4ª. Edición traducida del inglés. México (1996).
- [56] Vral, A., Thierens, H., Bryant, P., De Ridder, L. *A higher micronucleus yield in B- versus T- cells after low-dose irradiation is not linked with defective Ku86 protein*. Int. J. Radiat. Biol. **77**:329-339 (2001).
- [57] Wojewodzka, M. Gradzka, I. Buraczewska, I. *Modified neutral comet assay for human lymphocytes*. Nukleonika. **47**:1-5 (2002).

Referencias de Internet

- [58] www.srim.org (sitio de descarga del programa para calcular alcances SRIM-2008.03)
- [59] www.gafchromic.com (sitio de descarga del manual para el manejo de la película EBT)
- [60] <http://ie.lbl.gov/education/isotopes.htm> (tabla de isótopos)