



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

DAÑO EN ADN DE LINFOCITOS DE SANGRE  
PERIFÉRICA EXPUESTOS A BAJAS DOSIS DE  
RADIACIÓN IONIZANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

PRESENTA:

ERICK JUÁREZ ARRIAGA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA OSTROSKY SHEJET



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

DAÑO EN ADN DE LINFOCITOS DE SANGRE  
PERIFÉRICA EXPUESTOS A BAJAS DOSIS  
DE RADIACIÓN IONIZANTE



---

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Juárez
Apellido materno	Arriaga
Nombre(s)	Erick
Teléfono	51 15 70 39
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Física
Número de cuenta	303138172
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Patricia
Apellido paterno	Ostrosky
Apellido materno	Shejet
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dr.
Nombre(s)	María Ester
Apellido paterno	Brandan
Apellido materno	Siqués
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	M en C.
Nombre(s)	Patricia Raquel
Apellido paterno	Avilés
Apellido materno	Mandujano
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dr.
Nombre(s)	Alejandro
Apellido paterno	Frank
Apellido materno	Hoeflich
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Fis.
Nombre(s)	René
Apellido paterno	Ortega
Apellido materno	Alvarado
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	Daño en ADN de linfocitos de sangre periférica expuestos a bajas dosis de radiación ionizante
Número de páginas	66
Año	2013

---

Pequeñísima  
estrella,  
parecías  
para siempre  
enterrada  
en el metal: oculto,  
tu diabólico  
fuego.  
Un día  
golpearon  
la puerta  
minúscula:  
era el hombre.  
Con una  
descarga  
te desencadenaron,  
viste el mundo,  
saliste  
por el día,  
recorriste  
ciudades,  
tu gran fulgor llegaba  
a iluminar las vidas,  
eras  
una fruta terrible,  
de eléctrica hermosura.

*Oda al átomo*, Pablo Neruda (Fragmento)

Átomos en movimiento  
que tejen vago capuz,  
en prodigioso ardimiento,  
de rayos hacimiento  
palpitante : eso es la luz.

*La Luz*, Rubén Darío (Fragmento)



## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

---

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de brindarme una vida profesional en la Facultad de Ciencias y ofrecerme todo el apoyo para mi formación humana a través de una educación de excelencia.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Instituto de Física por permitirme utilizar sus instalaciones y equipos que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la DGPA-PAPIIT (UNAM) por el apoyo para la realización de este proyecto de tesis.



## AGRADECIMIENTOS

---

A mi asesora, la Dra. Patricia Ostrosky Shejet, agradezco profundamente el constante apoyo, su orientación, confianza, comprensión y paciencia durante la realización de esta tesis.

A la QFB. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño por su asesoría técnica en la realización de esta tesis y por el gran apoyo brindado desde el principio, a través de sus múltiples comentarios a este trabajo con su extraordinaria experiencia.

A los miembros del jurado de titulación: Dra. María Ester Brandan Siqués, M. en C. Patricia Raquel Avilés Mandujano, Dra. Patricia Ostrosky Shejet, Dr. Alejandro Frank Hoeflich y Fís. René Ortega Alvarado por sus comentarios sobre el trabajo escrito.

A la M. en C. María Fernanda Villegas Navarro por ser la primer persona que me acercó a la realización de este trabajo, por su apoyo, confianza y amistad.

A la Dra. Ana María Salazar, gracias por su amabilidad y apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, por brindar un ambiente interdisciplinario, gracias por sus consejos y apoyo. Gracias Abel, Anita, Arturo, Cintia, Eddy, Fer, Gerardo, Ileana, Juan, Juanito, Natalia, Paty, Pau, Salvador, Sandra, Sonia, Tere.

A todos mis profesores de la carrera, agradezco enormemente sus valiosas enseñanzas.

A mis amigos de la carrera por compartir todos los buenos y malos momentos a lo largo de nuestra formación profesional. Gracias Lucero, Marco, Naxi, Roberto, Santiago.



A mis padres, Silvestre Juárez y María Ninfa Arriaga por su comprensión, sus consejos, por su gran esfuerzo de sacarnos adelante, su incondicional apoyo y su inquebrantable voluntad de superación.

A mis hermanos Edgar, Lalo, Iván y Ale, por estar siempre conmigo durante todos estos años y apoyarme en todo momento.

*iii GRACIAS A TODOS !!!*





## AGRADECIMIENTOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. RADIACIÓN IONIZANTE</b> .....	1
<b>1.1.1. Transferencia Lineal de Energía (LET)</b> .....	3
<b>1.1.2. Dosis y Dosis Equivalente</b> .....	5
<b>1.1.3. Decaimiento radiactivo</b> .....	7
<b>1.1.4. Dosímetro termoluminiscente (DTL)</b> .....	9
<b>1.2. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)</b> .....	10
<b>1.3. ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR (TÉCNICA COMETA)</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	21
<b>3.1. HIPÓTESIS</b> .....	21
<b>3.2. OBJETIVO</b> .....	21
<b>3.3. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	21
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1. FUENTE DE <sup>90</sup>Sr/<sup>90</sup>Y</b> .....	22
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE</b> .....	23
<b>4.3. SUJETOS DE ESTUDIO</b> .....	23
<b>4.4. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS</b> .....	24
<b>4.5. CONTEO CELULAR</b> .....	24
<b>4.6. VIABILIDAD</b> .....	25
<b>4.7. IRRADIACIÓN DE LAS CÉLULAS Y DETERMINACIÓN DEL DAÑO AL ADN</b> .....	25
<b>4.7.1. Irradiación de sangre completa</b> .....	26
<b>4.7.2. Irradiación de linfocitos aislados</b> .....	26



---

4.7.3. Preparación de laminillas .....	26
4.7.4. Ensayo cometa versión neutra: lisis, desenrollamiento y electroforesis.....	27
4.7.5. Ensayo cometa versión alcalina: lisis, desenrollamiento y electroforesis.....	28
4.8. LECTURA DE LAMINILLAS .....	28
4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	28
5. RESULTADOS .....	29
5.1. CALIBRACIÓN DE LA FUENTE DE $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ .....	29
5.2. VIABILIDAD.....	32
5.3. DAÑO AL ADN.....	33
5.3.1. Daño al ADN en sangre completa.....	33
5.3.2. Daño al ADN en linfocitos aislados.....	37
6. DISCUSIÓN .....	43
7. CONCLUSIONES .....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	48
9. APÉNDICE .....	51
Apéndice A.....	50
Apéndice B .....	53
Apéndice C .....	56

## 1.1. Radiación Ionizante

En la naturaleza existen núcleos atómicos que son inestables; emiten espontáneamente partículas cargadas y/o radiación electromagnética por medio de transiciones de energía hasta que el átomo alcanza su estado estable, dicho fenómeno se conoce como radiactividad natural.

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 interactúa. 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].

En general la RI puede presentarse en reacciones nucleares, aceleradores y/o decaimientos radiactivos. La radiactividad se puede definir como la transformación espontánea de los núcleos, con emisión en forma de partículas o radiación electromagnética a través de diversos procesos.

Las transformaciones nucleares espontaneas pueden clasificarse en tres grupos principales:

a) Transformaciones isobáricas, en las cuales se conserva el número de masa. En este grupo se encuentran las transformaciones beta negativa, beta positiva y la captura electrónica.

b) Transformaciones no isobáricas, en las cuales no se conserva el número de masa. La transformación alfa es la única en este grupo.



---

c) Transformaciones isoméricas, en estas intervienen núclidos idénticos, excepto por sus estados energéticos nucleares. La transformación gamma pertenece a este grupo.

Derivado de estas transformaciones nucleares, se pueden emitir las partículas y las radiaciones electromagnéticas que se presentan a continuación:

- Rayos  $\gamma$ : Radiación electromagnética generada y emitida por los núcleos atómicos al decaer.
- Partículas  $\beta$ : son electrones generados y emitidos por los núcleos atómicos, pueden ser positivos (positrones) o negativos en la carga eléctrica. Si son resultado de colisiones de partículas cargadas se les llama rayos  $\delta$ .
- Partículas  $\alpha$ : son núcleos de  ${}^4\text{He}$  emitidos en una transformación radiactiva.
- Rayos X: Radiación electromagnética generada en las capas electrónicas de los átomos, cuando cambian entre los niveles de energía del átomo (rayos X característicos) o cuando se aceleran al interaccionar dentro de un campo de Coulomb (rayos X de *bremstrahlung*).
- Neutrones: son partículas sin carga eléctrica obtenidos generalmente de reacciones nucleares.

La absorción de energía por radiación ionizante produce rompimientos en la cadena del ADN a nivel molecular por acción directa o indirecta. Dependiendo de la interacción con la materia la RI se clasifica en dos grupos [19] [2]:



1) Radiación directamente ionizante: consta de todas las partículas cargadas, como partículas alfa y beta, que depositan su energía de manera directa a los átomos del medio a través de la interacción de Coulomb a lo largo de su trayectoria. Por esta acción, el daño ocurre como resultado de la ionización de los átomos de moléculas claves para el sistema biológico. Esto causa inactivación o alteración funcional de la molécula [19].

2) Radiación indirectamente ionizante: fotones de rayos X o  $\gamma$  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. La acción indirecta involucra la producción de radicales libres reactivos cuyo daño tóxico en moléculas claves resultará en un efecto biológico [19].

### 1.1.1. Tráferencia Lineal de Energía (LET)

La absorción de la RI por la materia viva es función tanto de la calidad y cantidad del haz de radiación como de la estructura y composición del tejido absorbente; esta produce un daño a nivel molecular por acción directa o indirecta [11].

La importancia de la ionización inducida en los tejidos vivos por radiación, se cuantifica mediante un concepto de amplia utilización en radiobiología la transferencia lineal de energía o LET (siglas en inglés de Linear Energy Transfer). Esta se define como el valor esperado de pérdida de energía ( $dE_c$ ) en un volumen local por unidad de longitud de trayectoria ( $dx$ ) de una partícula cargada ( $P$ ) con energía ( $E$ ) dada, Se expresa generalmente en unidades de energía sobre longitud ( $\text{keV}/\mu\text{m}$ ).

$$L = \left( \frac{dE_c}{dx} \right)_{E,P} \quad (\text{Ec. 1})$$



---

Cabe hacer notar que la LET sólo se define para partículas cargadas o radiación directamente ionizante. Depende del tipo de radiación (masa, carga y energía de las partículas) así como del medio absorbente; sin embargo, esta cantidad es muy usada en radiobiología como una atribución característica de radiación indirectamente ionizante (rayos X y rayos  $\gamma$ ). Esto se debe a que, este tipo de radiación transfiere su energía a partículas cargadas dentro del medio y son estas las que depositan la energía cinética, por lo que la LET en realidad se refiere a las partículas secundarias y no a los fotones. En radiobiología, el LET siempre se refiere al agua.

En general se suelen clasificar las radiaciones en dos categorías: de baja y alta LET; a la primera pertenecen la radiación  $\beta$  (electrones), los Rayos X y Rayos  $\gamma$ , mientras que la radiación  $\alpha$  y los neutrones, se consideran de alta LET. Por lo cual a mayor LET de una radiación, mayor concentración en la energía transferida al medio y mayor localización espacial de las moléculas modificadas por la ionización.



### 1.1.2. Dosis y Dosis Equivalente

La cantidad de radiación que recibe un organismo es conocida en el campo de la dosimetría y la protección radiológica como dosis absorbida ( $D$ ), comúnmente llamada dosis, la cual está definida como el valor esperado de la energía impartida por RI a un medio dado, por unidad de masa en el punto, de interés de acuerdo con la fórmula:

$$D = \frac{d\varepsilon}{dm} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:  $d\varepsilon$  es el valor esperado de la energía impartida a un volumen infinitesimal  $dV$  en un punto y  $dm$  es la masa en  $dV$ . La unidad establecida por el Sistema Internacional (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 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* ( $H_T$ ). Esta se deriva de la dosis absorbida promedio sobre un tejido u órgano y se define como:

$$H_T = w_R D_{T,R} \quad (\text{Ec. 3})$$

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  $w_R$  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,  $w_R$  varía entre 5 y 20, siendo este último



valor para partículas alfa. En la Tabla 1.1 se describen los diferentes tipos de dosis.

Tabla 1.1. Conforme a las recomendaciones de la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP, 1991 e ICRP, 1996), a la Directiva Europea 96/29 (EURATOM, 1996) y al Reglamento de Protección Radiológica (MINECO, 2000).

MAGNITUD	DEFINICIÓN	UNIDADES
<p><b>DOSIS ABSORBIDA</b></p> <p><b>D</b></p>	<p>Cociente entre la energía media (<math>dE</math>) impartida por la radiación ionizante a la materia en un elemento de volumen, y la masa (<math>dm</math>) del mismo.</p>	<p>Unidad del S.I.: gray (Gy). 1 Gy = 1 julio/kg</p> <p>Unidad histórica: rad. 1 rad = 0.01 Gy</p>
<p><b>DOSIS EQUIVALENTE</b></p> <p><b>H</b></p>	<p>Es una ponderación de la Dosis Absorbida en un tejido u órgano T, para tener en cuenta el tipo de radiación, de acuerdo con su potencialidad para producir efectos biológicos.</p> $H_T = D_{T,R} \cdot w_R$ <p><math>w_R</math> - Factor de ponderación de la radiación.</p>	<p>Unidad del S.I.: sievert (Sv). 1 Sv = 1 julio/kg</p> <p>Unidad histórica: rem. 1 rem = 0.01 Sv</p> <p><b>Valores de <math>w_R</math>:</b></p> <p><b>1</b> Radiación X, beta, gamma, electrones y positrones.</p> <p><b>5</b> Protones</p> <p><b>5 a 20</b> Neutrones, según su energía.</p> <p><b>20</b> Radiación alfa, núcleos pesados.</p>
<p><b>DOSIS EFECTIVA</b></p> <p><b>E</b></p>	<p>Es una suma ponderada de las dosis equivalentes recibidas por los distintos tejidos y órganos del cuerpo humano.</p> $E = \sum_T w_T \cdot H_T$ <p>Los factores <math>w_T</math> son representativos del detrimento, o contribución al riesgo total de daños biológicos, que supone la irradiación de cada órgano individual.</p>	<p>Unidad del S.I.: sievert (Sv).</p> <p><b>Valores de <math>w_T</math>:</b></p> <p><b>0.01</b> Sup.Huesos, Piel</p> <p><b>0.05</b> Bazo, Mama, Hígado, Esófago, Tiroides, etc.</p> <p><b>0.12</b> Colon, Pulmón, Médula Roja, Estómago</p> <p><b>0.20</b> Gónadas.</p>





### 1.1.3. Decaimiento radiactivo

No todos los núcleos atómicos son estables ya que existen ciertas combinaciones de número y tipo de nucleones que hacen que el núcleo se encuentre en un estado inestable. Esta situación tiende a buscar estados más estables a través de varios procesos que conocemos como transformaciones nucleares, mediante las cuales, los núcleos intercambian un protón por un neutrón o viceversa, o bien, se deshacen definitivamente de algunos protones y neutrones mediante energía en forma de radiación electromagnética. Este proceso se conoce como decaimiento radiactivo.

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:

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde  $dN$  es el número de transformaciones ocurridas en un tiempo  $dt$  y a  $\lambda$  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:

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t}, \quad (\text{Ec. 5})$$

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  $\lambda N$ . Y también se comporta como una función de decaimiento exponencial.

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (\text{Ec. 6})$$



La unidad de actividad en el Sistema Internacional de Unidades es el *bequerel* (Bq) que corresponde a un decaimiento por segundo por lo que está dado en  $s^{-1}$ . Sin embargo, en algunos documentos se sigue usando la unidad *curie* (Ci) que corresponde aproximadamente a la actividad de 1 gramo de  $^{226}\text{Ra}$  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 (Ec. 5) y despejamos  $t$  obtenemos que:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (\text{Ec. 7})$$

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

De este modo, para calcular el decaimiento de una fuente es necesario hacer uso de la ecuación 7 de la cual se despeja  $\lambda$  y se sustituye en la ecuación 6 para así obtener:

$$A(t) = A_0 \exp \left[ -\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} t \right] \quad (\text{Ec. 8})$$



---

#### 1.1.4. Dosímetro termoluminiscente (DTL)

La dosimetría es la técnica para la determinación de la dosis absorbida (o la tasa de dosis) en un material de interés que resulte de la interacción de la RI con la materia de otro material [4]. Para realizar lo anterior es necesario el uso de dosímetros, que pueden ser definidos como dispositivos capaces 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.

Un material termoluminiscente (TL) es aquel que emite luz cuando se calienta después de haber sido expuesto a la RI. Un dosímetro TL son pequeñas masas (en forma de polvo, escamas, barras) de materiales dieléctricos que contienen impurezas que proporcionan trampas para los electrones y huecos [4].

Los dosímetros termoluminiscentes utilizados 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).



---

## 1.2. Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

La vida depende de la capacidad de la célula de almacenar, recuperar y traducir las instrucciones genéticas requeridas para hacer y mantener un organismo vivo [1]. Cada instrucción es almacenada dentro de cada célula en sus genes, que es la secuencia ordenada de nucleótidos de la molécula de ácido desoxirribonucleico o ADN, la cual contiene la información de los elementos que determinan las características de una especie en general y de los individuos dentro de esta, es decir, aunque todos ellos contengan el mismo ADN, pueden ser muy diferentes, esto según su historia del desarrollo (una susceptibilidad adquirida) o a una predisposición genética innata (micro ARN's, epigenéticos o polimorfismos).

En la célula eucarionte toda esta información se encuentra en el núcleo, la información en los genes es copiada y transmitida de célula a células hijas millones de veces durante toda la vida en un organismo multicelular, de modo que la enorme cantidad de información requerida para el desarrollo y el mantenimiento de aún el organismo más simple pueda estar contenida dentro del espacio diminuto de una célula.

Las células contienen varias macromoléculas, como son los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Estas macromoléculas pueden clasificarse como polímeros; es decir moléculas que tienen una unidad estructural que se repite varias veces. Los ácidos nucleicos son de dos clases: a) ácido desoxirribonucleico o ADN, y b) el ácido ribonucleico o ARN. [13]

La molécula del ADN es el material genético fundamental, que almacena toda la información que la célula necesita para vivir. Mediante estudios de difracción de rayos X fue posible descifrar la estructura del ADN, la cual consiste de dos hebras que forman una doble hélice de 2 nm de ancho. Figura 1.2.1.

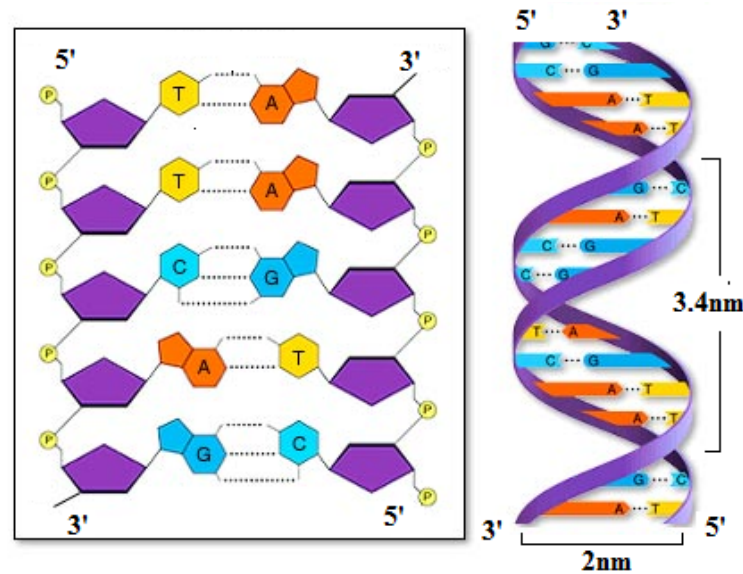


Figura 1.2.1 Estructura de la cadena de ADN. Es una hélice de giro a la derecha formada por dos hebras complementarias, en el exterior de la hélice se alternan las moléculas de desoxirribosa y ácido fosfórico, mientras las bases nitrogenadas se proyectan perpendicularmente hacia el interior. Las bases se unen por puentes de hidrógeno [13].

Esta molécula es un polímero que está formada por dos hebras complementarias unidas por puentes de hidrógeno entre bases complementarias. Cada hebra está compuesta por una serie de nucleótidos que son compuestos formados por un azúcar de cinco átomos de carbono o pentosa con uno o varios grupos fosfato y una base nitrogenada. La secuencia específica de nucleótidos contiene el código genético para la síntesis de proteínas.

Las bases nitrogenadas 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 une con la citosina (Figura 1.2.2). Se sabe que cada vuelta completa de la hélice tiene 3.4 nm de longitud lo que equivale a 10 pares de bases (Figura 1.2.1).

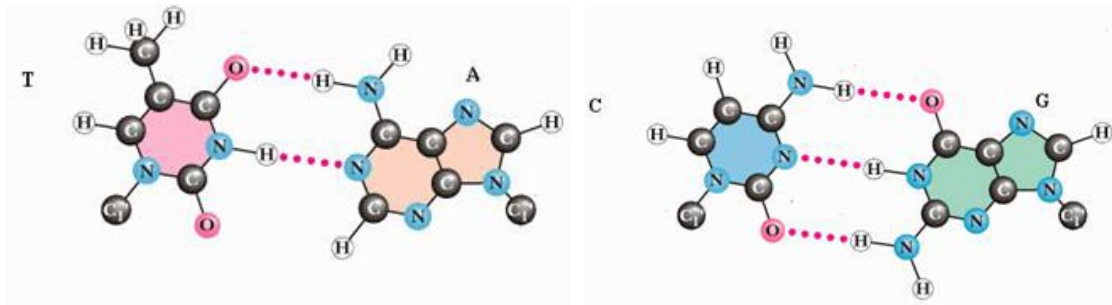


Figura 1.2.2. Diagrama de la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases T-A (con dos enlaces) y C-G (con tres enlaces).

La molécula de ADN es la encargada de portar el código genético que consiste principalmente en instrucciones para hacer proteínas, además de contener los rasgos hereditarios que definen a un individuo. El concepto de que el ADN es una molécula relativamente estable y monótona se ha sustituido por el de una molécula dinámica, con una estructura plástica que se modifica de acuerdo con la secuencia de bases, concentración de iones, pH, temperatura, unión de proteínas, tensión estructural de la hélice, etcétera [13].

El efecto de la RI se lleva a cabo principalmente a nivel celular. Cuando un órgano o tejido o microorganismo es irradiado, el ADN contenido en el núcleo de las células puede sufrir ionizaciones, provocando alteraciones en el contenido del “mensaje” que permite a la célula funcionar y reproducirse normalmente.

Los efectos producidos por una exposición a radiación ionizante en organismos vivos, varían de acuerdo al tipo de radiación, dosis impartida y tasa de dosis de la fuente de emisión. La secuencia de eventos se manifiesta posteriormente a la irradiación, los cuales pueden ser efectos físicos, químicos o biológicos, presentándose en diferentes lapsos como se observa en la Figura 1.2.3.

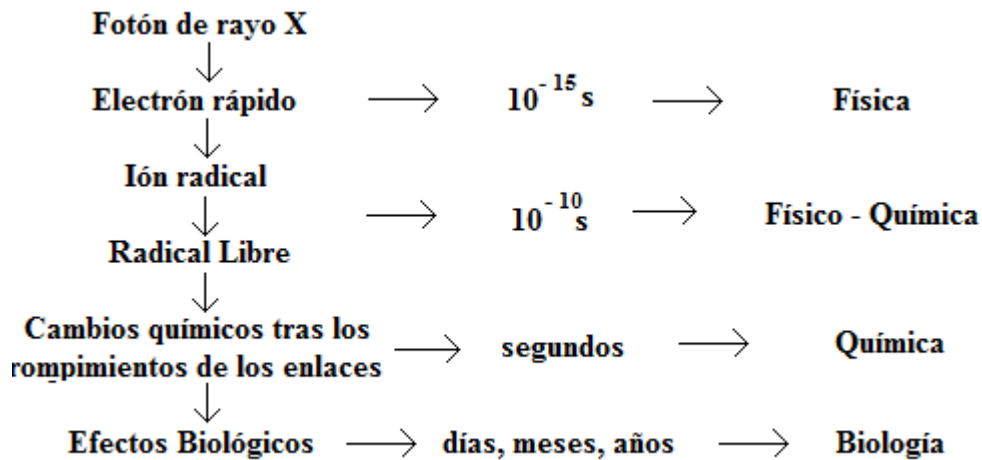


Figura 1.2.3. Etapas de efectos físicos, químicos o biológicos que se presentan a diferentes tiempos.

La interacción con el ADN se puede llevar a cabo de dos maneras: 1) Directa, produciendo ionización en la molécula de ADN. 2) Indirecta, el haz de RI produce ionizaciones en otras estructuras de la célula, creando radicales libres que causarán rompimientos al ADN.

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 entonces es de poca relevancia biológica en cuanto a la muerte celular se refiere, ya que puede ser reparada rápidamente usando la hebra intacta como template [12]. Cuando ocurre un rompimiento en ambas hebras y las lesiones están suficientemente separadas, entonces es posible la reparación, ya que aún hay suficiente ADN. En el caso de que la reparación sea incorrecta entonces se tendrá una mutación que se hará evidente en la siguiente división celular. Pero si el rompimiento ocurre en el mismo lugar en ambas cadenas y dentro de un intervalo temporal breve, ocurre una rotura DSB produciéndose un daño cromatídico, el cual no es reparable [12].



La radiosensibilidad es un concepto que engloba la respuesta celular a la RI. Un elemento biológico será más sensible, cuanto mayor sea la respuesta a una dosis determinada de RI; mientras que, será radioresistente, cuando requiera una mayor dosis para alcanzar un efecto determinado [12].

### 1.3. Ensayo de electroforesis unicelular (Técnica Cometa)

El método de electroforesis unicelular o ensayo cometa es un método microscópico fluorescente que permite observar el daño producido al ADN en células individuales [33]. 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, en la cual, 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 hay daño, no hay migración de fragmentos. De este modo, la longitud de migración del ADN se tomó como un indicador de la cantidad de roturas de ADN en células individuales [21]. En la Figura 1.3.1 se muestran los pasos básicos del protocolo del ensayo cometa.

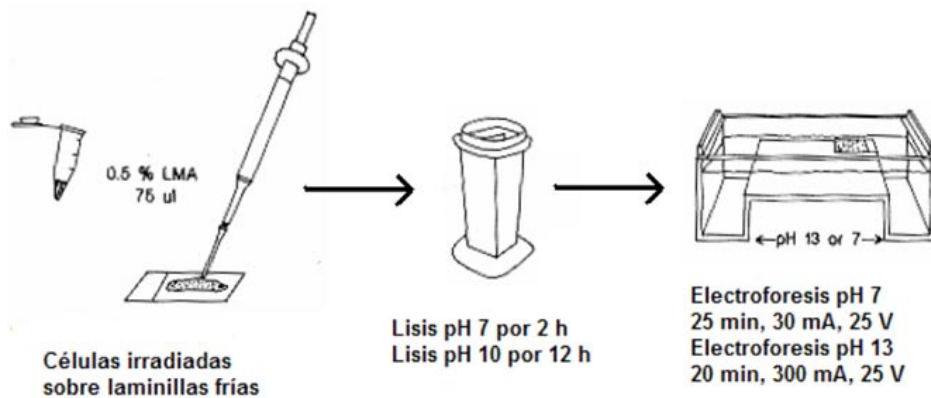


Figura 1.3.1. Esquema del protocolo a seguir para la realización del ensayo cometa en cualquiera de sus dos versiones; Neutra pH7 y Alcalina pH13. Una vez irradiada la muestra, las células se mezclan con agarosa y se colocan sobre la laminilla para colocarlas en la lisis, posteriormente se realiza la electroforesis.





El nombre del ensayo cometa proviene de lo que se observa en el microscopio al momento de teñir las laminillas con un tinte fluorescente (Bromuro de etidio), que se adhiere al ADN. Los fragmentos grandes se quedan concentrados cerca del 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 (Figura 1.3.2).

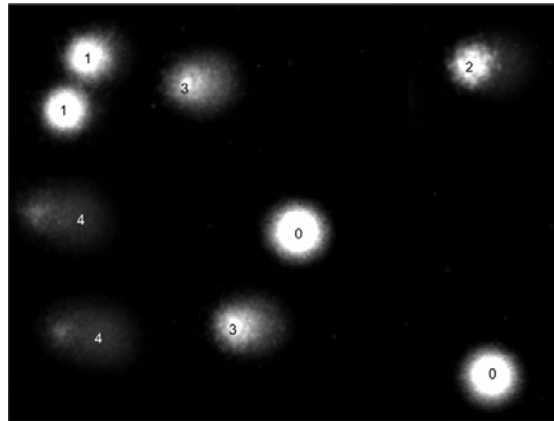


Figura 1.3.2. Ejemplo de cometas de linfocitos, los números indican una categoría por inspección visual, donde 0 representa células no dañadas y 1-4 representa el aumento en la intensidad relativa de cola. [9]

En 1988, Singh y colaboradores usan un pH alcalino ( $> 13$ ) que permite al ADN desenrollarse antes de la electroforesis, incrementando así su sensibilidad [20]. Se volvió una forma popular de medir la suma de los rompimientos de cadena sencilla (siglas en inglés SSB) detectables mayoritariamente y rompimientos de cadena doble (siglas en inglés DSB), generados por diversos agentes genotóxicos [33]. 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 con escasa interferencia de roturas SSB. El procedimiento implica un tratamiento de lisis a pH 8.3, condiciones bajo las cuales se observan rompimientos DSB. Otros autores [33,22] han refinado esta nueva versión que hoy en día se le conoce como método cometa neutro [8].



De este modo, 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 cual es el propósito del estudio para poder aplicar la versión correcta [27].

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 [22].

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. Este se encuentra directamente relacionado con el tamaño del fragmento y se espera que sea proporcional al daño producido al ADN [27].

En la Tabla 1.2 se muestra la relación entre la migración del ADN y el tipo de daño ocasionado por la RI.

Tabla 1.2. Determinación del tipo de daño dependiendo de la longitud de cola del cometa o migración del ADN.

Migración ( $\mu\text{m}$ )	Tipo de Daño
0 – 5	No
6 – 20	Leve
21 – 40	Moderado
41 – 60	Severo



## 2. ANTECEDENTES

---

Para tener una idea de la magnitud de unidad de dosis, cabe mencionar que el ser humano promedio en la Tierra, recibe cada año aproximadamente 0.002 Gy de radiación de fondo. Puesto que nuestros cuerpos han evolucionado para vivir en la presencia de estos niveles de radiación, podemos concluir que 2 mGy es una dosis baja. En el otro extremo, 4 Gy impartidos directamente en el cuerpo a un grupo de seres humanos, en promedio, les causa la muerte al 50% de ellos; lo que sin duda se debe de considerar una dosis alta. Según los experimentos internacionales, el límite entre una dosis “baja” y “alta” es de 200 mGy [4].

De acuerdo al Comité Científico de las Naciones Unidas sobre los Efectos de la Radiación Atómica (UNSCEAR), 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 [30].

La mayoría de los trabajos de investigación publicados hacen referencia al daño provocado por exposición a rayos X y rayos  $\gamma$ , probablemente debido a que estos tipos de radiación son los más utilizados en radioterapia y radiodiagnóstico médico, por ende, resultan también en exposición ocupacional y del público. Sin embargo, el aumento 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 tras la exposición a dosis bajas de estas formas de RI.

Es importante recordar que cada tipo de RI interactúa de manera diferente con la materia, por lo que es de esperar que los efectos biológicos sean distintos. A dosis bajas de RI de bajo LET, el daño al ADN se debe principalmente al paso de una partícula, donde el número de partículas que pasan por una célula está descrito por una distribución de Poisson.



---

El daño al ADN en el núcleo es el evento iniciador por el cual la RI 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 [31].

La radiación de alta LET (partículas alfa, protones) produce más daño a los tejidos que las radiaciones de baja LET (electrones, partículas  $\beta$ , rayos X y gamma [2]), las cuales, muy probablemente, provocarán 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.

El daño causado por altas dosis ( $>0.5$  Gy) de radiación beta indica una gran producción de DSB. Estos resultados son esperados puesto que la probabilidad de que dos eventos primarios causen daño en sitios opuestos de la cadena de ADN aumenta con la dosis. De la misma manera conforme disminuye la dosis ( $\leq 0.2$  Gy) se espera que la producción de DSB disminuya y se tenga predominantemente rompimientos de una sola hebra (SSB) [31].

En el 2005, se realizaron dos estudios en el laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en los que irradiaron líneas celulares con bajas dosis ( $\leq 0.12$  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 [15,31].



---

El segundo estudio reporta un aumento significativo de daño genotóxico en dos de las cuatro líneas celulares AT heterocigas al ser irradiadas con 0.12 Gy de radiación beta [26]. Ambos confirman el hecho de que cuando se aproximan a bajas dosis de RI considerada de baja LET son capaces de inducir un daño de tipo DSB por arriba de los niveles basales.

En la literatura se ha encontrado que dosis mayores que 1 Gy de radiación beta pueden producir roturas de tipo DSB [18]. Mill y colaboradores [16] mostraron 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 [18].

E. Schmid et al. [29] analizaron 22 individuos tratados con  $^{90}\text{Y}$ , y 6 de ellos mostraron números elevados de micronúcleos en los linfocitos de sangre periférica, a una dosis máxima de radiación de aproximadamente 300 mGy.

Los mecanismos moleculares que subyacen a las respuestas a las dosis bajas de radiación son aún desconocidas, sobre todo en los linfocitos, a pesar de la evidencia que sugiere cambios específicos que pueden caracterizar la respuesta celular. Muchos estudios han demostrado el potencial clastogénico de la radiación ionizante a altas dosis, así como su capacidad de causar la inestabilidad genómica en células de mamífero, pero los efectos de dosis bajas de radiación son muy difíciles de detectar por métodos convencionales [10].

En la respuesta a la radiación, los genes juegan un papel importante en múltiples procesos biológicos, e incluso dentro de un pequeño intervalo de dosis de radiación de 10 a 50 cGy, que es una dosis de baja a moderada de radiación de rayos gamma, producen importantes cambios en los perfiles de alcance de lesiones del ADN, los resultados indican un riesgo potencial para los seres humanos sobre el desarrollo de la inestabilidad genética y enfermedades adquiridas como consecuencia de la exposición a la radiación [10].



---

Los efectos genotóxicos de la radiación gamma se pueden observar a dosis de 5 cGy, puede causar roturas en la cadena de ADN y aberraciones cromosómicas como dicéntricas y determinadas frecuencias de deleción. Los niveles de daño oxidativo de base, expresado como FPG sitios sensibles, aumentaron significativamente con radiación gamma a una dosis de 10 cGy. Claramente, los efectos sobre roturas de la cadena de ADN y FPG sitios sensibles en los linfocitos fueron mayores que las de sangre completa que indica una mayor sensibilidad de los linfocitos [32].

La radiación ionizante induce altos niveles de lesiones en el ADN, incluyendo rompimientos de cadena sencilla o bases dañadas, tales daños son generalmente aislados y reparados de manera eficiente, sin embargo, hay efectos más severos (rompimientos de cadena doble), resultado principalmente al ser reparadas las lesiones del ADN de forma incompleta o incorrecta [3].

En el presente trabajo se desea verificar el daño predominante causado por bajas dosis de radiación beta, mediante el uso de la técnica cometa en sus versiones alcalina y neutra (detección de rompimientos de cadena sencilla o doble, respectivamente), esto por ser uno de los métodos más usados por su alta sensibilidad y simpleza para la determinación de daño genotóxico.



## 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

### 3.1. Hipótesis

La exposición de linfocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos a bajas dosis de radiación ionizante de baja LET, no ocasionará un daño significativo al ADN. Si llega a producir rompimientos en el ADN, serán predominantemente de cadena sencilla.

### 3.2. Objetivo

- Identificar mediante el ensayo cometa, si dosis bajas de RI de baja LET emitida mediante una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ , son capaces de producir daño en el ADN de linfocitos humanos.

### 3.3. Objetivos Particulares

- Calibración de la fuente radiactiva de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  del IIBUNAM.
- Determinar mediante la técnica de doble tinción con FDA/BrEt, si la exposición a dosis bajas de RI de baja LET ( $\leq 0.2$  Gy), afecta la viabilidad en linfocitos aislados.
- Identificar el tipo de daño al ADN (rompimientos de una cadena o doble cadena) producido por bajas dosis de radiación beta mediante el ensayo cometa (neutro y alcalino).

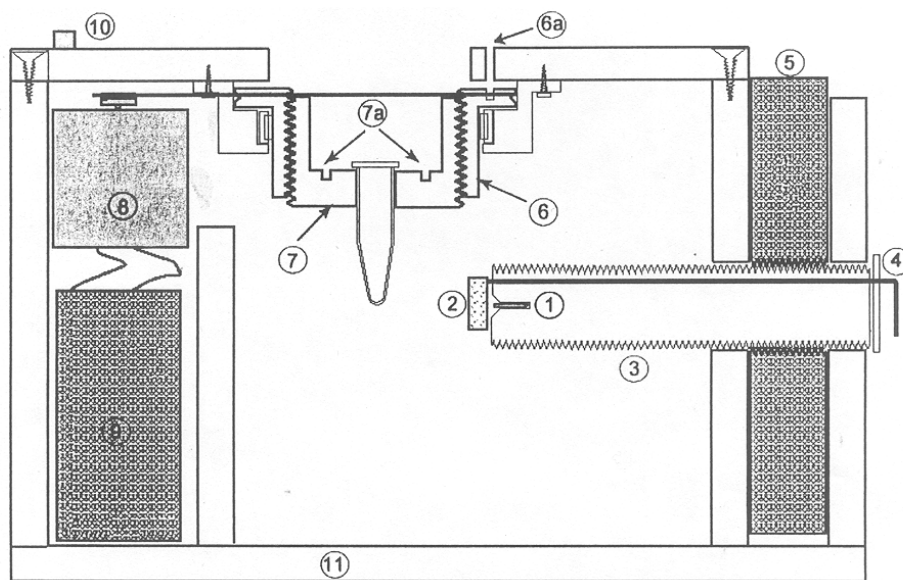


## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$

La fuente radiactiva de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  utilizada es propiedad del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBUNAM). Consta de un cilindro metálico de aproximadamente 0.2 cm de diámetro y 1 cm de altura. El  $^{90}\text{Sr}$  decae al  $^{90}\text{Y}$  emitiendo partículas  $\beta^-$  con una energía máxima de 0.546 MeV y tiene una vida media de 28.7 años. Posteriormente el  $^{90}\text{Y}$  decae a  $^{90}\text{Zr}$  emitiendo betas con energía máxima de 2.28 MeV y su vida media es de 64 horas.

La fuente se encuentra dentro de un irradiador que fue construido por el M. en C. Alejandro Rodríguez como proyecto de tesis de licenciatura [25]. 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  $\mu\text{l}$  con una uniformidad igual o mayor al 90%. La tasa de dosis de la fuente IIBUNAM es de  $D_{04-2010} = 3.58 \text{ mGy/min}$  a una distancia de 2.5 cm. Figura 4.1.



1 Fuente radiactiva de  $^{90}\text{Sr}-^{90}\text{Y}$ ; 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 4.1. Esquema del irradiador construido para la exposición de muestras biológicas a radiación beta emitida 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 [25].





---

## 4.2. Caracterización de la fuente

La calibración se realizó basado en el protocolo de manejo en la irradiación y lectura conforme a las recomendaciones del manual del Laboratorio de Dosimetría del IFUNAM [6] a partir de dosímetros termoluminiscentes DTL-100, (LiF:Mg,Ti) Harshaw-Bricon, con dimensiones 3x3x1 mm, los cuales antes de ser irradiados, fueron sometidos a un tratamiento térmico que consiste en un horneado a 400°C durante una hora, seguido de un horneado a 100°C durante dos horas, después de cada horneado los dosímetros se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Las irradiaciones se realizaron 24 horas después de terminado el tratamiento térmico; entre el proceso de irradiación y el de lectura se deja pasar un periodo igual. El tratamiento térmico tiene como función borrar la señal acumulada durante su almacenamiento y dispersar las impurezas.

Para conocer la variación en la respuesta de los DTL, fue necesario irradiarlos tres veces con la misma dosis, esto para obtener una mayor exactitud y precisión en las dosis que serán empleadas.

Después de la irradiación se procede a determinar su respuesta con un equipo lector termoluminiscente Harshaw 3500 con flujo de N<sub>2</sub>, para leer la respuesta termoluminiscente (carga). Consiste básicamente de una fuente de corriente que calienta una plancheta sobre la que se colocan los DTL; mediante un tubo fotomultiplicador se colecta la señal luminosa emitida por los dosímetros al ser calentados por contacto con la plancheta, esta señal será transformada en una señal eléctrica.

## 4.3. Sujetos de estudio

El estudio se llevó a cabo en linfocitos provenientes de muestras de sangre heparinizada (8 ml) obtenida vía venosa de tres donadores aparentemente sanos (interrogatorio dirigido negativo a patologías, sin signos ni síntomas



gastrointestinales), con un intervalo de edad entre 20 y 27 años. De cada donador se separó 1 ml de sangre para determinar el posible daño al ADN generado por el aislamiento de los linfocitos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### 4.4. Aislamiento de linfocitos

La separación de los linfocitos se realizó mediante un gradiente de densidad Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma) a 1600 rpm durante 20 minutos, obteniéndose un anillo de células blancas, el cual se extrae y se lava dos veces con medio RPMI-1640 a 3000 rpm durante 25 minutos cada uno. Inmediatamente después de su separación fueron colocados en 1 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales.

Las células se colocan en un tubo de 1.5 ml y se mantienen a 37°C durante 24 horas, con el fin de que éstas se recuperen del estrés debido al proceso de separación.

#### 4.5. Conteo celular

Para contar el número de células se utilizó el ensayo de exclusión por azul tripano. Se tomaron 20 µl de muestra celular y se mezclaron con 900 µl de medio RPMI-1640 y 80 µl del colorante azul tripano al 0.4%. Se empleó un hemocitómetro (cámara Neubauer) y un microscopio óptico Zeiss con un objetivo de 20X para el conteo. Se calculó el porcentaje de células viables (refringentes) y el porcentaje de células muertas (azules). Se determinó el Número Total de Células (NTC) mediante la fórmula:

$$NTC \left[ \frac{\text{células}}{\text{ml}} \right] = \frac{\# \text{ células}}{(\# \text{cuadrantes})(\text{dilución}) \left( \frac{1}{V_{\text{cuadrante}}} \right)} \quad (\text{Ec 9})$$

Son cuatro cuadrantes en la cámara; el factor de dilución tiene un valor de 50 (20 µl : 1000 µl) y el volumen de la cámara se considera de 0.1 µl = 1x10<sup>-4</sup> ml.



#### 4.6. Viabilidad

La citotoxicidad de la RI en las células fue evaluada al determinar el porcentaje de sobrevivencia celular utilizando el método diferencial de doble tinción con diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA/BrEt) [34]. Se toman 20  $\mu$ l de la muestra celular y se agregan 20  $\mu$ l de solución de FDA/BrEt. De esta mezcla se toman 20  $\mu$ l y se colocan en una laminilla, con cubre objetos y se observan en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con filtro de luz amarilla (excitación: 530 – 550 nm; emisión 590 nm). Las células vivas se observan de color verde mientras que las muertas se observan de color rojo.

#### 4.7. Irradiación de las células y determinación del daño al ADN

Para la determinación de los efectos genotóxicos de la RI se utilizará el método de electroforesis unicelular (ensayo cometa) en sus versiones alcalina (detección de SSB del ADN) y neutra (detección de DSB del ADN).

Asimismo, se consideró importante tener como referencia el efecto de la irradiación en sangre completa del donador correspondiente. En la Figura 4.1 se muestra el esquema general del desarrollo experimental.

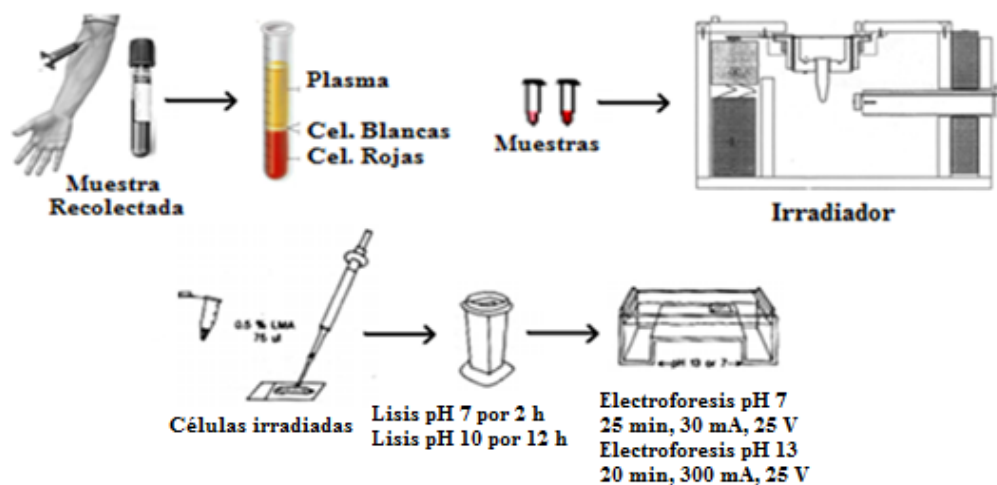


Figura 4.1. Esquema del diseño experimental que se llevo a cabo para la realización de la técnica de ensayo cometa en linfocitos de sangre periférica y en sangre entera.



---

#### **4.7.1. Irradiación de sangre completa**

Para descartar un posible daño al ADN por efecto del aislamiento de los linfocitos al aplicar el ensayo cometa, se tomó 1 ml de sangre completa como referencia para realizar con cada individuo una curva dosis-respuesta a RI de baja LET.

Se hicieron cinco alícuotas de 100  $\mu$ l con la sangre colocándolas en tubos de 1.5 ml. Cada muestra se irradió individualmente a una distancia de 2.5 cm de la fuente con una tasa de dosis de 3.58 mGy/min a dosis diferentes. Las dosis a las que fueron expuestas son de: 0, 20, 40, 80 y 120 mGy. Para garantizar una dosis uniforme se siguieron los pasos dados en el manual de uso del irradiador [25]. Posterior a la irradiación de la sangre se midió viabilidad por FDA/BrEt (4.6), tomando de cada muestra irradiada 20  $\mu$ l,

#### **4.7.2. Irradiación linfocitos aislados**

Una vez hecho el conteo celular (4.5), se hace el cálculo del tamaño de alícuota necesario para tener una cantidad de 60,000 células aproximadamente en un volumen de 100  $\mu$ l de medio. La irradiación se llevó a cabo en tubos de 1.5 ml, con la muestra celular colocada a una distancia de 2.5 cm de la fuente en donde se tiene una tasa de dosis de 3.58 mGy/min. Las alícuotas fueron expuestas a cinco dosis diferentes: 0, 20, 40, 80 y 120 mGy. Después de cada irradiación de las células se midió la viabilidad por FDA/BrEt (4.6), tomando una alícuota de 20  $\mu$ l de cada muestra.

#### **4.7.3. Preparación de laminillas**

Las muestras celulares irradiadas se centrifugan durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se agregan 300  $\mu$ l de agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point, LMP) al 0.5% derretida previamente en un horno de microondas y mantenida a una temperatura de 37°C.



---

Las células se resuspenden con una micropipeta y se toman 75  $\mu$ l para depositarlos sobre un portaobjetos previamente rotulado y cubierto con 150  $\mu$ l de agarosa normal al 0.5 %. 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  $\mu$ l de agarosa LMP, se coloca de nuevo el cubreobjetos y se dejan refrigerando otros 5 minutos más.

#### **4.7.4. Ensayo Cometa Versión Neutra: Lisis, Desenrollamiento y Electroforesis**

A las laminillas destinadas a cometa neutro, se les retira el cubreobjetos, se introducen en un envase Coplin con solución de lisis (0.03 M EDTA, 0.5 % SDS a pH 7), se dejan en refrigeración a 4 °C durante dos horas. Se enjuagan en buffer de corrida (90 mM Ácido Bórico, 200 mM 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 se fijan con alcohol y se dejan secar.



---

#### **4.7.5. Ensayo Cometa Versión Alcalina: Lisis, Desenrollamiento y Electroforesis**

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

#### **4.8. Lectura de laminillas**

Se agregan 20 µl de bromuro de etidio, se coloca un cubre objetos y se observa la laminilla en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60 con filtro verde (excitación: 450 – 490 nm, emisión: 590 nm). Se leen 100 cometas al azar por laminilla. Se mide la longitud de la cola usando el software Comet V.

#### **4.9. Análisis Estadístico**

El estudio fue realizado en tres individuos por triplicado y se llevó a cabo utilizando el software Graphpad 5.0. El análisis estadístico aplicado al ensayo de viabilidad fue una t de student, mientras que el utilizado para la determinación del daño al ADN se aplicó la prueba ANOVA de Kruskal Willis con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Apéndice B.

5.1. Calibración de la Fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ 

Para calibrar los DTL se usó una fuente del IFUNAM cuya tasa de dosis beta fue medida en el 2008 y ajustado por decaimiento natural de la fuente es:

$$D_{04-2010} = D_{04-2008} \exp\left[-\left(\frac{0.693}{t_{\frac{1}{2}}}\right)t\right] = 9.77 \text{Gyh}^{-1} \exp[-(7.69 \times 10^{-10} \text{s}^{-1})(6.31 \times 10^7 \text{s})]$$

$$D_{04-2010} = 9.31 \text{Gyh}^{-1}$$

Se expusieron los dosímetros a seis dosis. Los resultados se muestran en la Tabla 5.1.1.

Dosis (mGy)	Tiempo	Lectura promedio ( $\mu\text{C}$ )
50	19s	$0.292 \pm 0.004$
150	58s	$0.907 \pm 0.003$
250	1min 36s	$1.374 \pm 0.006$
350	2min 14s	$2.216 \pm 0.072$
450	2min 53s	$2.743 \pm 0.1372$
550	3min 32s	$3.363 \pm 0.047$

Tabla 5.1.1. Lecturas promedio ( $\mu\text{C}$ ) de los dosímetros DTL-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 9.31 Gy/h al momento de la irradiación. La incertidumbre en las lecturas corresponde a una desviación estándar.

Fecha	Dosis
Mayo 2005	$10.48 \text{Gyh}^{-1}$
Abril 2008	$9.77 \text{Gyh}^{-1}$
Abril 2010	$9.31 \text{Gyh}^{-1}$

Tabla 5.1.2. Tasa de dosis reportadas anteriormente ajustada por decaimiento natural de la fuente.



La curva de la Figura 5.1.1, presenta una relación lineal entre la dosis y la respuesta en un rango de 50 a 550 mGy. Fue ajustada por el programa OriginPro7 con un valor de  $r = 0.99$  y se encuentra representada por la ecuación:  $R = 17.927D - 0.0005$ , donde  $R$  es la respuesta ( $\mu\text{C}$ ) y  $D$  es la dosis (mGy).

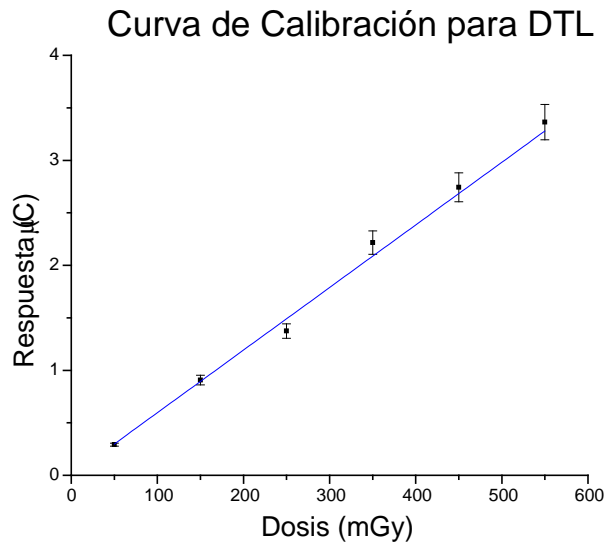


Figura 5.1.1. Curva de Calibración para TLD-100 expuestos a partículas  $\beta^-$  de una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ . La curva muestra un comportamiento lineal entre la carga (respuesta termoluminiscente) y la dosis en un rango de 50 a 550 mGy. La incertidumbre es una desviación estándar la cual se observa que es proporcional a la dosis.

Una vez calibrados los dosímetros DTL-100 se procedió a exponerlos en la fuente del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, en las mismas condiciones, fueron expuestos a dosis gamma de 50, 100 y 150 mGy a una distancia de 2.5 cm de la fuente. Se tiene 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 5.1.3, 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 5.1.1. Para la 'dosis supuesta' de 100 mGy se observa una





mínima diferencia de 2.93% entre la 'dosis esperada' y la 'dosis real', mientras que para los otros dos datos se tiene una diferencia entre 11.22 y 6.9%. 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 IIBUNAM 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 3.58 mGy/min  $\pm$  0.1551.

Tabla 5.1.3. Cálculo de la tasa de dosis para una distancia de 2.5 cm.					
Dosis Supuesta (mGy)	Dosis Esperada	Tiempo	Lectura promedio ( $\mu\text{C}$ )	Dosis Real (mGy)	Tasa de Dosis (mGy/min)
50	44.5	12min 24s	280.45 $\pm$ 44.25	45.84	3.5887 $\pm$ 0.1635
100	89	24min 49s	600.65 $\pm$ 61.25	100.26	3.5887 $\pm$ 0.1585
150	133.5	37min 13s	881.25 $\pm$ 48.75	143.39	3.5877 $\pm$ 0.1434
Promedio					3.58 $\pm$ 0.1551

Tabla 5.1.3. Lecturas promedio de los dosímetros TLD-100 y la dosis correspondiente calculada con la curva de calibración de la Figura 5.1.1. 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.

Así la tasa de dosis de la fuente IIBUNAM es de 3.58 mGy/min a una distancia de 2.5 cm que concuerda con los datos obtenidos al momento de la construcción del irradiador en el 2003 (Tabla 5.1.2).



## 5.2. Viabilidad.

En la Figura 5.2.1, se muestran las gráficas de viabilidad de linfocitos aislados y sangre completa (promedio de las tres repeticiones), las cuales presentan una viabilidad alrededor del 85 y 98% respectivamente. Esto nos indica que las dosis bajas que se aplicaron de RI no son citotóxicas.

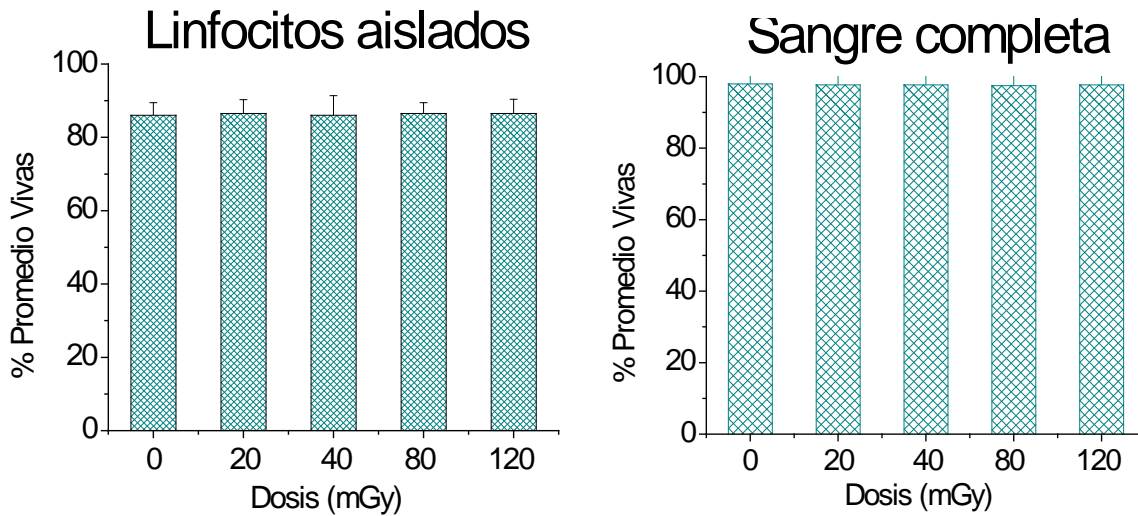


Figura 5.2.1. Porcentaje de viabilidad de linfocitos aislados (izquierda) y sangre completa (derecha) después de ser irradiados con partículas beta emitidas por una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ , para cada donador. La viabilidad se determinó usando el ensayo de doble tinción por FDA/BrEt. Las barras representan el promedio de tres repeticiones del mismo experimento y la incertidumbre es una desviación estándar.



---

### **5.3. Daño al ADN**

#### **5.3.1. Daño al ADN en sangre completa por exposición a dosis bajas de RI.**

La mayoría de los estudios de daño al ADN mediante el ensayo cometa, se llevan a cabo utilizando sangre completa. Con el fin de descartar si el proceso de separación de los linfocitos induce un daño al ADN, se realizó para cada individuo una curva dosis-respuesta a dosis bajas de RI en dicho sistema. Los resultados se muestran en la Figura 5.3.1.1 y 5.3.1.2 para los ensayos alcalino y neutro respectivamente.

Para el ensayo alcalino los tres donadores no presentan incremento dosis-respuesta, (es decir, la migración del ADN se encuentra dentro de los valores basales para todas las dosis administradas). Para el ensayo neutro se observan diferencias individuales; los donadores 1 y 2 una relación dosis-respuesta, siendo el primero más sensible a la dosis.

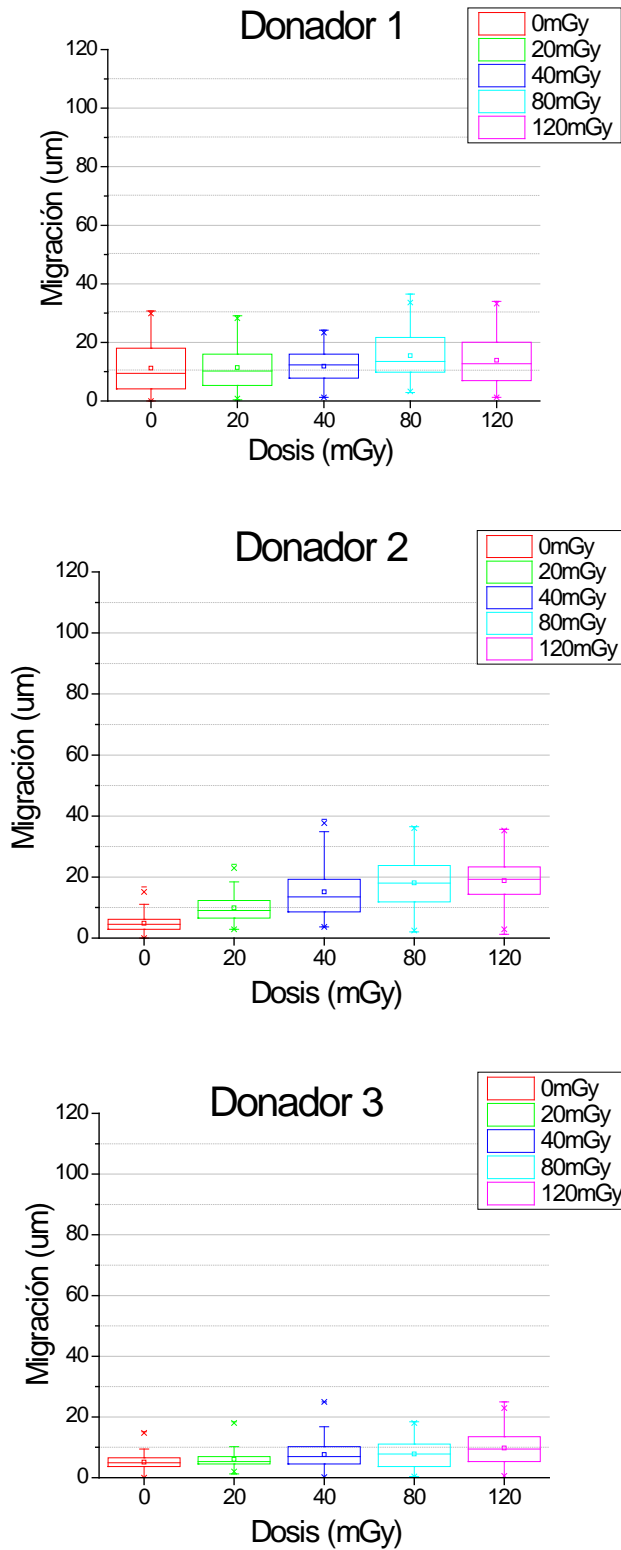


Figura 5.3.1.1. Daño al DNA ( $\mu\text{m}$ ) por efecto de dosis bajas de RI en sangre completa de tres donadores, mediante el ensayo cometa alcalino.

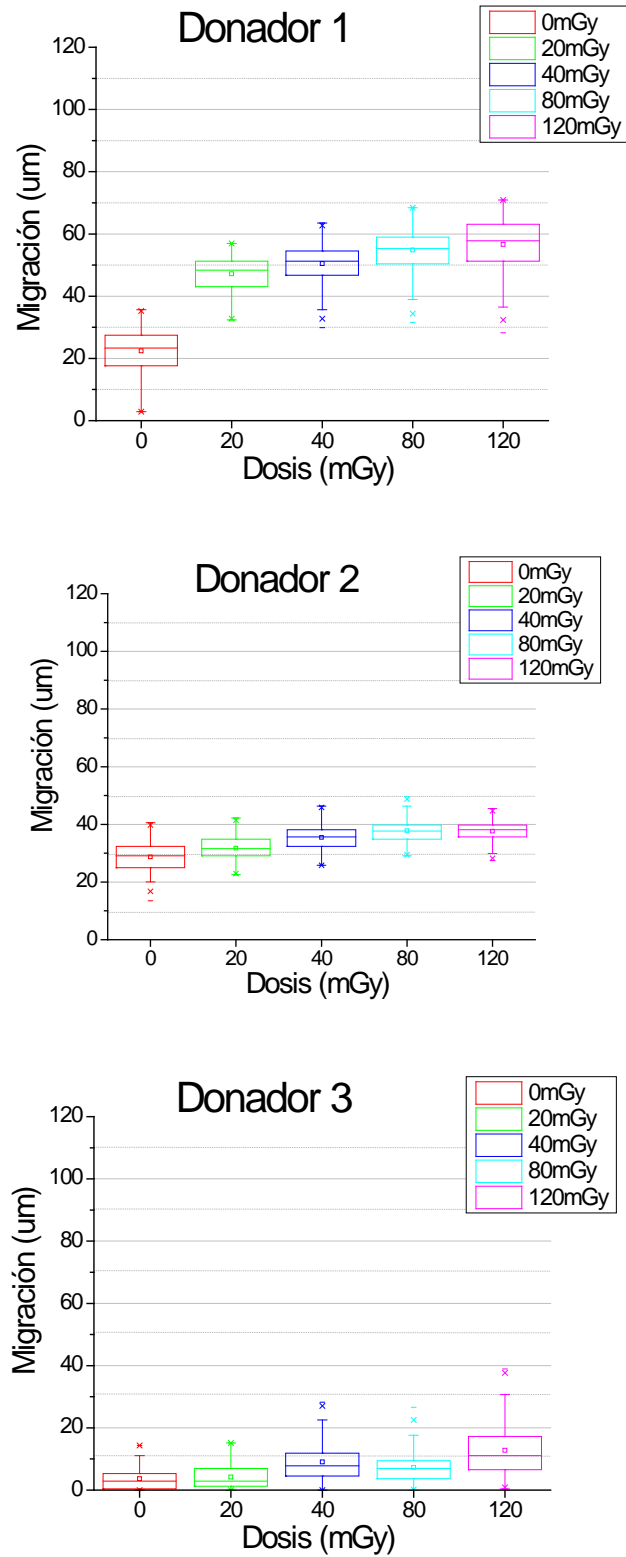


Figura 5.3.1.2. Daño al DNA ( $\mu\text{m}$ ) por efecto de dosis bajas de RI en sangre completa de tres donadores, mediante el ensayo cometa neutro.



En la Figura 5.3.1.3 se comparan el promedio del efecto de las dosis bajas de RI al utilizar el ensayo cometa alcalino (Panel A), y el ensayo cometa neutro (Panel B), en sangre completa de los tres donadores.

En la versión alcalina del ensayo cometa, el incremento en el daño al ADN no supera el valor de 20  $\mu\text{m}$ , lo cual indica que aún con la dosis de 120 mGy los valores de migración del ADN se encuentran en el rango considerado normal (0 a 20  $\mu\text{m}$ ). En el caso del ensayo cometa neutro, vemos que el rango de dispersión es muy amplio, esto debido a las diferencias individuales. La distribución de los datos por debajo de la mediana es muy amplia, cayendo la mayoría en el rango de “no daño” (0-20  $\mu\text{m}$ ) o en el de daño medio (21 – 40  $\mu\text{m}$ ).

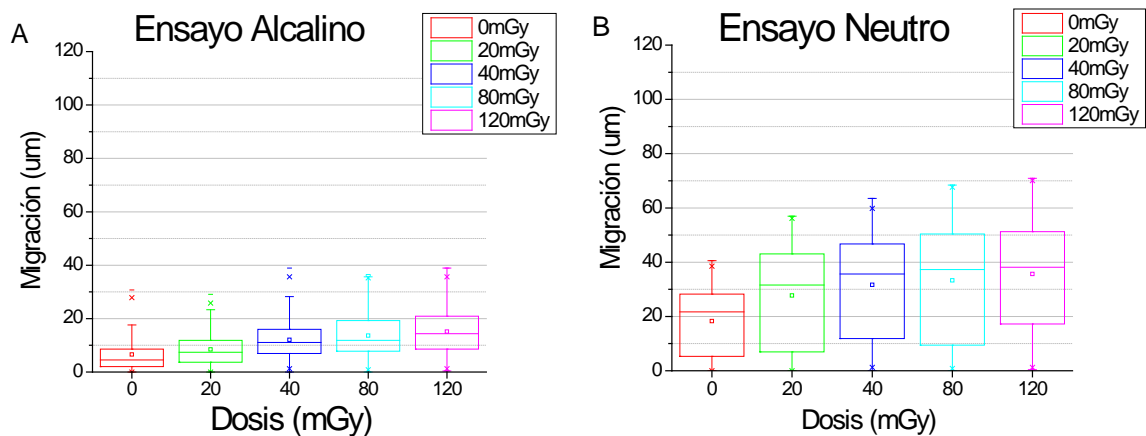


Figura 5.3.1.3. Daño al DNA producido en sangre completa por exposición a dosis bajas de RI. A) Ensayo cometa versión alcalina; B) Ensayo cometa versión neutra. Promedio de tres donadores.



---

### **5.3.2. Daño al ADN en linfocitos aislados por exposición a dosis bajas de RI.**

Se realizaron curvas dosis-respuesta a dosis bajas de RI. Las dosis utilizadas fueron 0, 20, 40, 80, 120 mGy.

En la Figura 5.3.2.1, se observan los resultados promedio del efecto de las dosis bajas de RI en linfocitos, para cada uno de los tres donadores al utilizar el ensayo cometa alcalino, mientras que en la Figura 5.3.2.2 se muestran los resultados para el ensayo cometa neutro en los mismos donadores.

En los tres donadores se observa un incremento dosis-respuesta en el daño al DNA tanto con el ensayo cometa alcalino como en el neutro. El daño basal para cada uno de los donadores, muestra diferencias individuales en ambos ensayos.

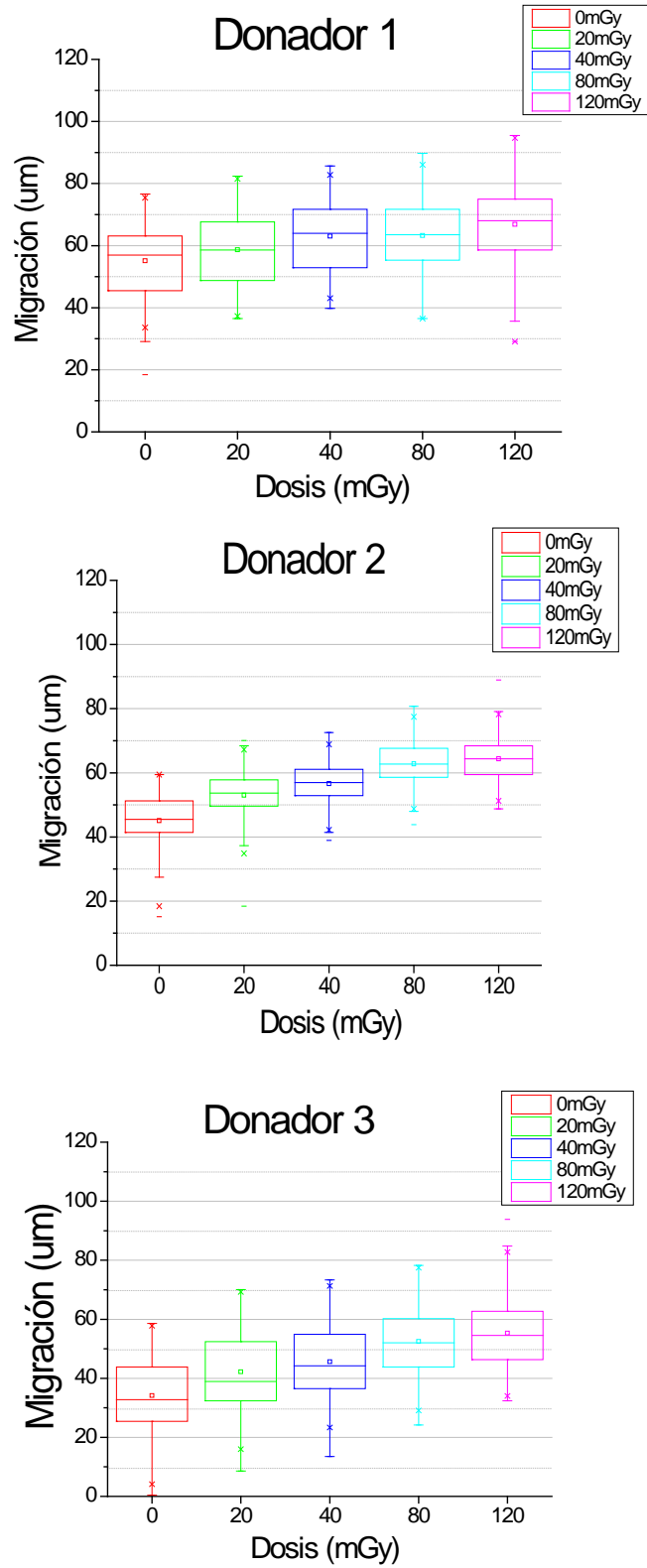


Figura 5.3.2.1. Daño al DNA ( $\mu\text{m}$ ) en linfocitos por efecto de dosis bajas de RI en tres donadores (promedio de tres repeticiones), mediante el ensayo cometa alcalino.



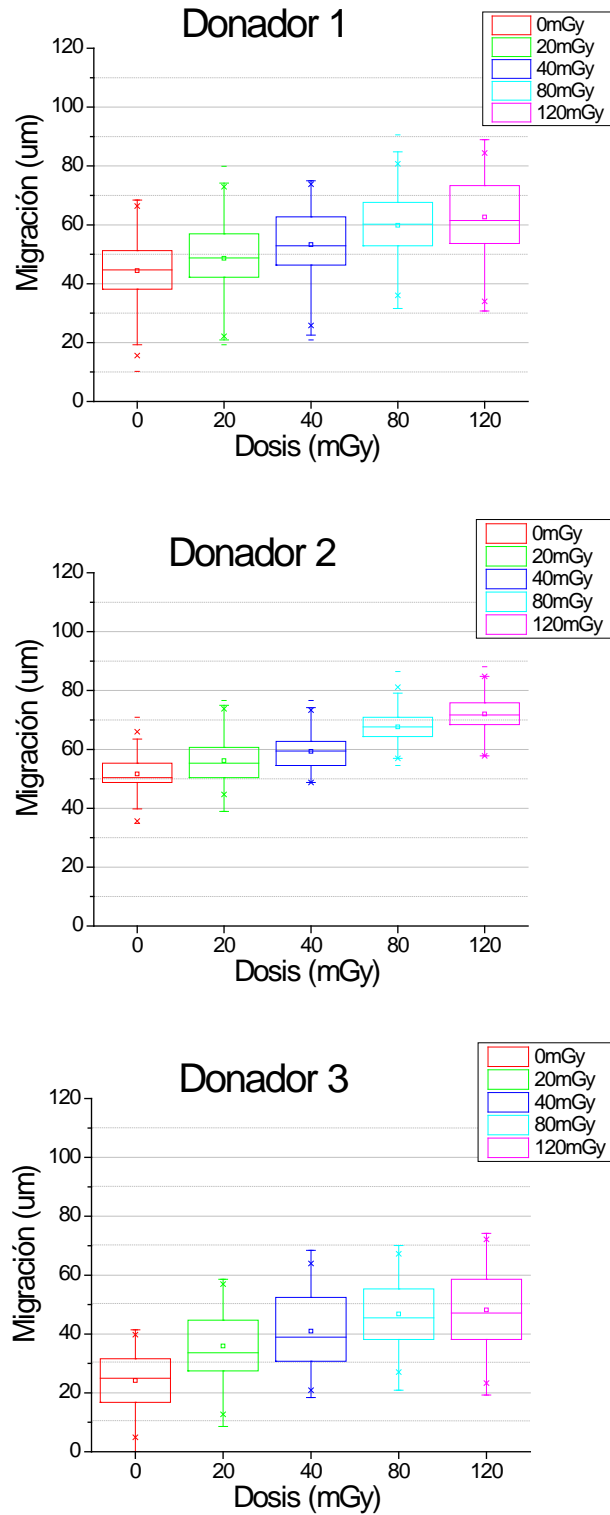


Figura 5.3.2.2. Daño al DNA ( $\mu\text{m}$ ) en linfocitos por efecto de dosis bajas de RI en tres donadores, (promedio de tres repeticiones) mediante el ensayo cometa neutro.



La gráfica del promedio general del efecto de las dosis bajas de RI de los ensayos realizados a los tres donadores para cometa alcalino y neutro (Figura 5.3.2.3), muestra un comportamiento similar entre ambas condiciones.

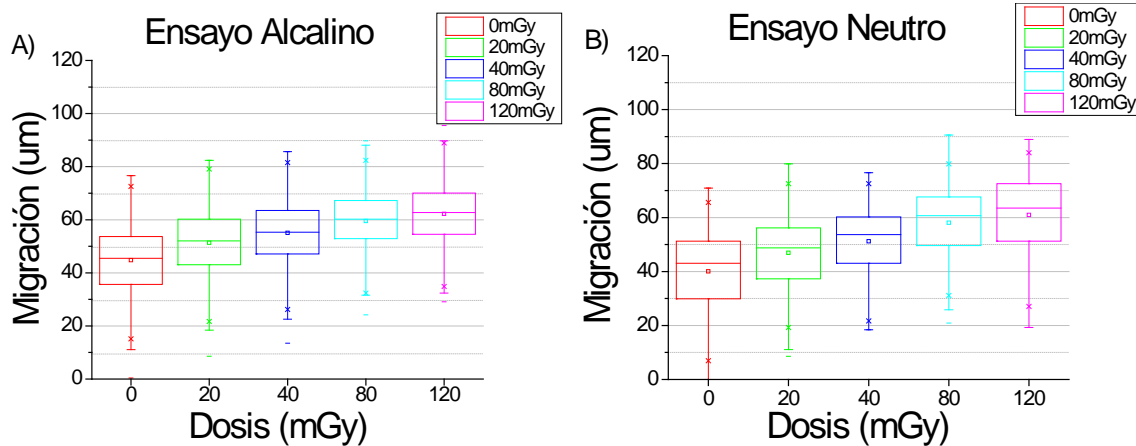


Figura 5.3.2.3. Ensayos dosis-respuesta a dosis bajas de RI en linfocitos mediante cometa alcalino (A) y neutro (B) Promediando a tres donadores por triplicado.

Si se comparan las curvas dosis-respuesta obtenidas de linfocitos aislados (Figura 5.3.2.3) con las de sangre completa (Figura 5.3.1.3), se puede apreciar que los valores basales para los primeros son más altos. Esto sugiere que el proceso de aislamiento de los linfocitos puede estar induciendo un daño en el ADN.

Debido a que los valores basales presentan diferencias entre una y otra versiones del cometa, se llevó a cabo una normalización de los datos con el fin de poder comparar el efecto de las dosis bajas de RI en ambas condiciones. Se dividió el valor promedio de cada dosis entre el valor basal correspondiente, de tal manera que el valor basal es “1” (Figura 5.3.2.4).

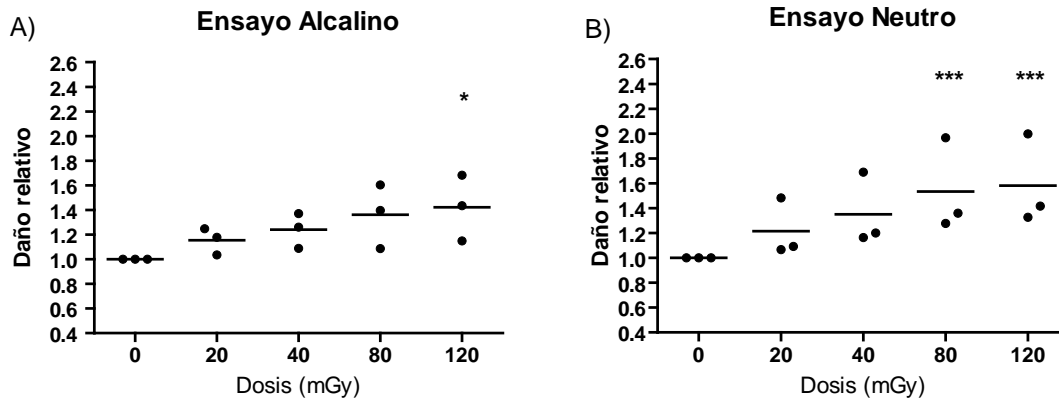


Figura 5.3.2.4. Normalización de los datos promedio de daño al DNA por efecto de dosis bajas de RI en tres donadores mediante el ensayo cometa alcalino (A) y neutro (B). El análisis estadístico realizado fue una t-student pareada entre el control y las demás dosis: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a su control. No se encontraron diferencias significativas entre ambos ensayos.

Como se puede observar en la Figura 5.3.2.4, el comportamiento dosis-respuesta se mantiene al normalizar los datos en ambos ensayos. Se encontraron diferencias significativas en el cometa alcalino a la dosis de 120 mGy con respecto al control, mientras que en el neutro, las diferencias significativas se encontraron a las dosis de 80 y 120 mGy. Se observaron diferencias en la respuesta individual, las cuales se vieron incrementadas en un individuo principalmente en el ensayo cometa neutro (Figura 5.3.2.4 B). Sin embargo, las diferencias estadísticas entre ambos ensayos no son significativas.

En la Figura 5.3.2.5, se muestran los promedios normalizados del ensayo alcalino y neutro donde se puede observar que el daño al ADN por exposición a diferentes dosis bajas de RI de baja LET, es similar en ambos casos (ligeramente mayor el ensayo neutro).

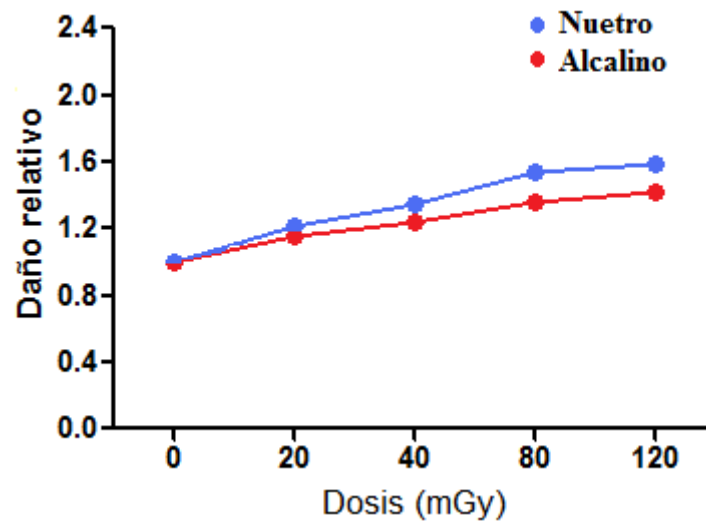


Figura 5.3.2.5. Daño relativo promedio, normalizado al nivel basal para el ensayo alcalino y neutro de linfocitos aislados expuestos a partículas beta. Se muestra que los niveles de daño son muy similares.



En este trabajo se trató de identificar el tipo de daño que predomina en el ADN de linfocitos aislados de sangre periférica al ser expuestos a una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$  emisora de partículas beta, a dosis bajas ( $\leq 0.2$  Gy) de RI de baja transferencia lineal de energía (LET). Se piensa que estas dosis sólo podrían causar rompimientos de cadena sencilla (SSB), sin embargo, esto aún no ha sido corroborado.

En esta tesis, la manera de observar el daño causado por la RI fue utilizando la técnica de electroforesis unicelular (ensayo cometa), en sus versiones neutra y alcalina, que permiten principalmente la detección de rompimientos de doble cadena (DSB) y de cadena sencilla (SSB) del ADN respectivamente, mediante el parámetro de longitud de cola.

No se observaron cambios significativos en la viabilidad de la sangre completa y de los linfocitos aislados, por lo que las dosis bajas de RI aplicadas en este estudio no resultaron citotóxicas (Fig. 5.2.1.). Este hecho es importante, ya que es necesario tener células viables para poder determinar los efectos genotóxicos.

Al analizar las gráficas de caja de sangre completa para el ensayo alcalino, se observa que la migración del ADN es menor a  $20\ \mu\text{m}$  en las dosis utilizadas, por lo que se encuentran dentro del rango considerado como “daño normal”.

El ensayo neutro para sangre completa, muestra un mayor daño, ya que los intervalos de distribución se encuentran desde  $5\ \mu\text{m}$  (Control) a  $50\ \mu\text{m}$  (dosis más alta). Cabe señalar que el daño se encuentra distribuido en mayor proporción por debajo de la mediana y el comportamiento individual resultó no ser tan similar lo que ocasionó que la distribución al unir los tres experimentos no fuera uniforme. Esto puede deberse a la susceptibilidad individual.



---

Al comparar las medianas de los niveles basales en sangre (5  $\mu\text{m}$ ) y en linfocitos aislados (45  $\mu\text{m}$ ) en el ensayo alcalino (Figuras 5.3.1.3 y 5.2.2.3, Panel A) y 20  $\mu\text{m}$  en sangre y 43  $\mu\text{m}$  en linfocitos aislados en el ensayo neutro (Figuras 5.3.1.3 y 5.3.2.3, Panel B), se puede observar que los linfocitos aislados presentan desde su basal un daño al ADN posiblemente ocasionado por el proceso de aislamiento.

El proceso de aislamiento se lleva a cabo mediante un gradiente de ficoll, que consiste en una solución de sacarosa a una densidad de 1.077 g/ml. Esta concentración puede ser capaz de producir un ligero efecto osmótico en la membrana celular y desencadenar señales que su vez pueden producir radicales libres que podrían finalmente afectar al ADN. Ya que la técnica del cometa es muy sensible, este daño puede ser detectado y de esa manera verse incrementados los valores basales en los ensayos con linfocitos aislados.

En las Figuras 5.3.2.1 y 5.3.2.2, se muestran los promedios de los experimentos de ambos ensayos por donador en linfocitos aislados, donde se observa que existen diferencias individuales en la respuesta a dosis bajas de exposición de RI. Esta susceptibilidad individual y diferencias en la respuesta a xenobióticos puede estar dada por polimorfismos en ciertos genes que según el xenobiótico del que se trate puede modificar sus efectos [14].

Fachin y colaboradores [10] demostró la eficacia de dosis bajas a moderadas de radiación inducen cambios en la transcripción de varios genes, que se encontraron expresadas diferencialmente en los linfocitos irradiados, estos cambios están involucrados en múltiples procesos celulares incluyendo la respuesta al estrés / reparación del ADN, el crecimiento celular / diferenciación, regulación de la transcripción, el transporte y el metabolismo, lo que indica una interconexión entre los procesos metabólicos.



---

En este estudio, se encontró a un individuo que presentó una mayor sensibilidad a la exposición a bajas dosis de RI. Al realizar los promedios para ambos ensayos (alcalino y neutro), se observa que las curvas muestran la misma tendencia (Figura 5.3.2.3). Es importante considerar que algunas personas presentan una mayor sensibilidad y que, si por motivos ocupacionales o de salud, se exponen constantemente a este tipo de radiación, presentarán mayores riesgos de generar enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer [14].

Al comparar las medianas del ensayo alcalino y neutro se observa que el ADN migró en un intervalo similar en ambos ensayos (versión alcalina: 45  $\mu\text{m}$  control – 62  $\mu\text{m}$  dosis más alta; ensayo neutro: 43  $\mu\text{m}$  control – 63  $\mu\text{m}$  dosis más alta. Este hecho hace pensar que las versiones tanto alcalina como neutra del ensayo cometa detectan en mayor o menor proporción rompimientos SSB y DSB de la cadena de ADN por bajas dosis de RI de baja LET, lo que dificulta discriminar el tipo de daño generado (Fig. 5.3.2.3).

Al normalizar los valores de la curva dosis-respuesta en el ensayo alcalino para linfocitos aislados, se observó que la dosis de 120 mGy es significativa con respecto al nivel basal ( $P < 0.05$ ). Esto podría estar indicando que a esta dosis comienza a haber rompimientos de cadena sencilla significativos (SSB). En el caso del ensayo neutro se observaron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) a partir de la dosis de 80 mGy y 120 mGy con respecto al control, lo que podría indicar que hay un mayor daño significativo en rompimientos de cadena doble (DSB).

Wanwisa et al. [32] observaron que a dosis de 5 cGy en linfocitos y 10 cGy en sangre completa, aumentan los niveles significativos de rompimientos de la cadena de ADN.

En la Figura 5.3.2.5 se muestra la comparación de los datos promedio normalizados del ensayo alcalino y neutro, ambos se comportaron de manera muy semejante. El incremento de daño que se observa al normalizar los datos, presento un máximo de 0.5 veces el valor basal para el ensayo neutro, mientras que para el ensayo alcalino fue de 0.3 veces el valor basal.



---

Esta similitud en el comportamiento de ambos ensayos, plantea la posibilidad de que en ambos casos se estén produciendo cantidades similares de SSB y DSB. Por lo que, al no haber diferencias significativas entre ambos ensayos, no fue posible discernir el tipo de rompimientos generados en las condiciones de este estudio.

Se propone hacer un western blot como una técnica alternativa para verificar el tipo de daño que se puede presentar al medir la expresión del gen H2AX ya que este gen es un indicador de rompimientos de doble cadena y así poder decir si se trata de rompimientos de cadena sencilla o doble.

Otra manera técnica que se está utilizando con los avances de la biología molecular son los marcadores moleculares, en los cuales se coloca una proteína fluorescente para observar si el genoma se reordena después de ser irradiado, al ser reparada la célula y si las células hijas se recombina con este gen marcador y así se poder observar si se presenta una inestabilidad genómica inducida por la radiación [14].

Muchos de estos genes o productos génicos se pueden investigar más a fondo para determinar su potencial como biomarcadores de respuesta al estrés y para determinar si las alteraciones de transcripción se asocia con cambios en las proteínas [10].





## 7. CONCLUSIÓN

---

Este estudio se realizó para conocer el tipo de rompimientos en el ADN que causa la radiación ionizante de baja LET en linfocitos aislados de sangre periférica al ser expuestos a bajas dosis ( $\leq 120$  mGy) de partículas beta de una fuente de  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ .

De los resultados obtenidos se puede concluir:

- El proceso de separación de linfocitos de sangre entera genera un daño al ADN que incrementa sus valores de migración desde los niveles basales.
- Se encontró daño significativo al ADN de linfocitos por exposición a la dosis de 120 mGy con respecto al control, mediante el ensayo cometa alcalino y a las dosis de 80 y 120 mGy con respecto al control, mediante el ensayo cometa neutro.
- No se encontraron diferencias significativas en el daño al ADN de linfocitos expuestos a dosis bajas de RI al comparar el ensayo cometa alcalino con el neutro.
- No fue posible distinguir el tipo de daño que ocasionan bajas dosis de RI de baja LET en linfocitos, mediante el ensayo cometa en sus versiones alcalina y neutra.

Cabe destacar que en el caso de las dosis bajas, los estudios epidemiológicos solo tienen actualmente una capacidad limitada para detectar y cuantificar estadísticamente los efectos estocásticos significativos de las radiaciones. Por ello, es necesario profundizar en el estudio de los efectos en el ADN ocasionados por exposición a dosis bajas de radiación ionizante. Esto permitirá evitar el riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas al mejorar la protección radiológica del personal ocupacionalmente expuesto (POE), así como de las personas que requieren de este tipo de estudios.



---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- [1]. Alberts, Bruce... [et al.]. Essential cell biology. Garland Science, Spain 3rd ed 2010.
- [2]. Attix, F.H. Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry. John Wiley & Sons, USA (1986).
- [3]. Betsy M. Sutherland, Paula V. Bennett, Olga Sidorkina, and Jacques Laval, Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. PNAS, 2000, vol. 97 no. 1
- [4]. Brandan, M. E. Dosimetry: The Art of Measuring the Energy Deposited by Ionizing Radiation in a Medium. Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine. American Institute of Physics 978-0-7354-0472-4 (2007).
- [5]. Brandan, M. E. Díaz Perches, R. y Ostrosky, P. La radiación al servicio de la vida. SEP, FCE, CONACYT. La ciencia para todos. 3ª. Ed. México, D.F. (2003).
- [6]. 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).
- [7]. 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)
- [8]. Collins, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. Mol. Biotech. 26: 249-261 (2004).
- [9]. Collins, A. R. The comet assay: topical issues. Mutagenesis vol. 23 no.3 pp. 143-151, 2008.
- [10]. Fachin, A. L., Mello, S. S., Sandrin-Garcia, P., Junta, C. M., Donadi, E. A., Passos, G. A. S. and Sakamoto-Hojo, E. T. Gene Expression Profiles in Human Lymphocytes Irradiated *In Vitro* with Low Doses of Gamma Rays. *Radiat. Res.* 168, 650–665 (2007).
- [11]. Gallego, Eduardo. Riesgos por exposición a radiaciones ionizantes. UPM, España 2005.
- [12]. Hall, E. J. Radiobiology for the radiologist. Lipponcott Williams & Wilkins. 4ª Ed. New York, USA (1994).



- 
- [13]. Jiménez, L. Felipe... [et al.]. *Biología celular y molecular*. Pearson Educación, México 1° ed 2003.
- [14]. M. Bose, M.K. Wilson, M. Morgan, P. Concannon. *Genetic Factors Affecting Susceptibility to Low-Dose Radiation*. DOE project # ER62859 0005021 (2012).
- [15]. Mata, D. *Susceptibilidad genética a dosis bajas de radiación ionizante*. Proyecto de tesis de doctorado en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (2005).
- [16]. 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).
- [17]. 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).
- [18]. Murakami, D. Suzuki, M.F. Dias, M. Okasaki, K. *Genotoxic and cytotoxic effects of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays and  $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$   $\beta$ -rays on Chinese hamster ovary cells (CHO-K1)*. Radiat. Environ. Biophys. 43: 91-99 (2004).
- [19]. Nuñez, Margarita. *Efectos biológicos de las radiaciones – Dosimetría*. EUTM, Uruguay 2008.
- [20]. N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, Exp. Cell. Res. 175 (1988) 184-191.
- [21]. Olive, P. L. Banath, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat. Prot. 1:23-29 (2006).
- [22]. Olive, P. L. Wlodek, D. Banath, J. P. DNA double-strand breaks measured in individual cellssubjected to gel electrophoresis. Cancer Res. 51: 4671-4676 (1991).
- [23]. Omenn GS. Ethnic differences in reactions to drugs and xenobiotics. Susceptibility to occupational and environmental exposures to chemicals. Prog Clin Biol Res. 1986;214:527-45. Review.
- [24]. Prosser JS, Moquet JE, Lloyd DC, Edwards AA (1993) Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. Mutat Res 199:37–45.



- 
- [25]. 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).
- [26]. Rodríguez, A. Diseño de un protocolo para la vigilancia de incorporaciones de material radiactivo en el personal ocupacionalmente expuesto de un departamento de medicina nuclear. Tesis de maestría en física médica. IFUNAM (2008).
- [27]. Rojas, E. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chrom. B* 722: 225-254 (1999).
- [28]. Sakly A, Gaspar JF, Kerkeni E, Silva S, Teixeira JP, Chaari N, Cheikh HB. Genotoxic damage in hospital workers exposed to ionizing radiation and metabolic gene polymorphisms. *J Toxicol Environ Health A*. 2012 Jul 1;75(13-15):934-46
- [29]. Schmid E, Selbach HJ, Voth M, Pinkert J, Gildehaus FJ, Klett R, Haney M. The effect of the beta-emitting yttrium-90 citrate on the dose-response of dicentric chromosomes in human lymphocytes: a basis for biological dosimetry after radiosynoviorthesis. *Radiat Environ Biophys*. 2006 Jul;45(2):93-8. 2006.
- [30]. 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 (2008).
- [31]. Villegas, M. Fernanda. Daño inducido en DNA por exposición a bajas dosis de radiación ionizante de baja y alta transferencia lineal de energía. Tesis de maestría en física médica. IFUNAM (2009).
- [32]. Wanwisa Sudprasert, Panida Navasumrit, Mathuros Ruchirawat, Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *Int. J. Hyg. Environ.-Health* 209 (2006) 503–511.
- [33]. Wojewodzka, M. Gradzka, I. Buraczewska, I. Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika*. 47:1-5 (2002).
- [34]. Zbinden, Aeschbacher M, Reinhardt Ca. A rapid cell membrane permeability test fluorescent dyes and flow cytometry. *Cell Biol Toxiol*, 1986. 2(2): 247-255.



### Glosario

**Agarosa:** Es un polisacárido que se extrae de las algas, soluble en agua a temperaturas de 65 °C y puede variar entre los 17 y 40 °C si hay sustituciones hidroxietílicas. Su uso es para construir geles que permiten separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

**Alcalino:** se aplica a sustancias que aumentan el número de iones hidróxido (OH<sup>-</sup>) en una solución: que tiene un pH superior a 7.

**Ataxia Telangiectasia (AT):** Es una enfermedad autosomal recesiva degenerativa caracterizada por la neurodegeneración, inmunodeficiencia, hipogonadismo, hipersensibilidad a la RI y susceptibilidad al cáncer.

**Aminoácido:** Moléculas orgánicas que contienen nitrógeno en forma de -NH<sub>2</sub> y grupo carboxilo, -COOH, unidos al mismo átomo de carbono; los “bloques estructurales” de las moléculas de proteínas.

**Aminoácidos no esenciales:** Biomoléculas que el cuerpo no puede sintetizar.

**Azul Tripano:** Es un colorante que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas.

**Biomolécula:** Son moléculas constituyentes de los seres vivos.

**Clastogénicos:** son agentes físicos o químicos capaces de inducir rompimientos cromosómicos.

**Epigenética:** Es el estudio de todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación del desarrollo de un organismo, entre las interacciones de los genes y el ambiente.

**FDA/BrEt:** Diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio, colorante fluorescente de doble tinción.

**Ficoll-Hitopaque:** Es una solución para separar linfocitos mediante un gradiente de densidad.



---

**Gradiente de densidad:** Técnica de separación de moléculas según la densidad, mediante el empleo de un gradiente de diversas densidades. En equilibrio cada molécula se sitúa en el gradiente equivalente de su densidad.

**Hemocitómetro:** Aparato para contar el número de células en un volumen conocido.

**Heparina:** Es un anticoagulante natural, que evita la formación de coágulos y la extensión de los coágulos que ya se han formado.

**Linfocito:** Tipo de glóbulo blanco (leucocito), son de tamaño de 7 a 15  $\mu\text{m}$  y representan del 24 al 32 % del total en sangre periférica. Presentan un núcleo donde se encuentra el ADN.

**L-glutamina:** Es uno de los 20 aminoácidos que intervienen en la composición de las proteínas.

**Micro ARN's:** Los micro ARN (miRNA) son una clase de ARN no codificante cuyo producto final es una molécula de  $\sim 22$  nucleótidos ARN funcional. Juegan papeles importantes en la regulación de los genes mediante la unión a regiones complementarias de transcripciones de mensajería para reprimir su traducción o regular la degradación

**Micronúcleo:** Fragmentos cromosómicos, los cuales son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal que se forman durante la transición de metafase a anafase.

**Medio RPMI:** Es una solución que contiene los nutrientes necesarios para cultivos de celulares.

**Polimorfismo:** Es una variación en la secuencia de un lugar determinado de ADN entre los individuos de una población. Pueden afectar la secuencia codificante o reguladora produciendo importantes cambios en la estructura o mecanismos de expresión.

**Sangre completa:** Sangre no modificada, excepto por la presencia de un anticoagulante.

**Sangre periférica:** Sangre que circula por todo el cuerpo.

**Western blot:** Es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada (debido a su peso molecular, estructura, etcétera), mediante una electroforesis en gel.



## **Estadística**

El diagrama de caja es una presentación visual que describe al mismo tiempo varias características importantes de un conjunto de datos, tales como el promedio, dispersión, simetría o asimetría y la identificación de observaciones atípicas.

Para su construcción se utilizan cinco estadísticos de la distribución de frecuencias: los valores mínimo y máximo, los tres cuartiles, la mediana y también la posición de la media.

Construcción:

1. El rectángulo delimita el rango intercuartílico con la arista inferior (o izquierda) ubicada en el primer cuartil  $Q_1$ , y la arista superior (o derecha) en el tercer cuartil  $Q_3$ .
2. Se dibuja una línea a través del rectángulo en la posición que corresponde al segundo cuartil (que es igual al percentil 50 o a la mediana),  $Q_2 = \text{Mediana}$ .
3. De cualquiera de las aristas del rectángulo se extiende una línea, o bigote, que va hacia los valores extremos (valor mínimo y valor máximo). Estas son observaciones que se encuentran entre cero y 1.5 veces el rango intercuartílico a partir de las aristas del rectángulo.
4. Las observaciones que están entre 1.5 y 3 veces el rango intercuartílico a partir de las aristas del rectángulo reciben el nombre de valores atípicos. Las observaciones que están más allá de tres veces el rango intercuartílico a partir de las aristas del rectángulo se conocen como valores atípicos extremos. En ocasiones se emplean diferentes símbolos (como círculos vacíos o llenos), para identificar los dos tipos de valores atípicos.



---

Nótese que el rectángulo o caja representa el 50% de los datos que particularmente están ubicados en la zona central de la distribución. La caja representa el cuerpo de la distribución y los bigotes sus colas.

La prueba t-student es una distribución de probabilidad que surge del problema de estimar la media de una población normalmente distribuida cuando el tamaño de la muestra es pequeño.

Se utiliza para contrastar medias en poblaciones con distribución normal, para conocer si se puede suponer que los datos siguen una distribución normal, se pueden realizar diversos contrastes llamados de bondad de ajuste, de los cuales el más usado es la prueba de Kolmogorov.

Existen dos versiones de la prueba t-student: una que supone que las varianzas poblacionales son iguales y otra versión que no asume esto último. Para decidir si se puede suponer o no la igualdad de varianzas en las dos poblaciones, se debe realizar previamente la prueba F-Snedecor de comparación de dos varianzas.

La prueba ANOVA (siglas de Análisis de Variación, ANalysis Of VAriance), es una técnica estadística que se utiliza para determinar si la diferencia que existen entre las medianas de tres o más grupos son estadísticamente significativos.

Se trata de una prueba de hipótesis útil cuando se trata de comparar dos tratamientos, teniendo en cuenta que es un procedimiento para análisis de factores cualitativos. Establece que la variabilidad total en los datos, medida por la suma de cuadrados total, puede ser dividida en una suma de cuadrados de la diferencia entre los promedios de los tratamientos y el gran promedio total más una suma de cuadrados de la diferencia de las observaciones entre tratamientos del promedio del tratamiento, lo que nos da la herramienta para distinguir si un factor afecta la respuesta en promedio.





---

Presunciones de ANOVA:

1. Los errores o residuales son independientes y distribuidos de manera normal o gaussiana, con promedio equivalente a 0 y varianza constante. Si su promedio no fuese 0, el modelo estaría subestimando o sobreestimando.
2. Anova presume que todas las varianzas de los niveles del factor son iguales y toma un solo cálculo de varianza llamada varianza conjunta.



Prueba t-student de comparación múltiple	Diferencia de medias	P < 0.05	Estadísticamente Significativo
0 vs 20 N	-0.2140	No	Ns
0 vs 20 A	-0.1537	No	Ns
0 vs 40 N	-0.3509	No	Ns
0 vs 40 A	-0.2399	No	Ns
0 vs 80 N	-0.5345	Yes	***
0 vs 80 A	-0.3622	No	Ns
0 vs 120 N	-0.5809	Yes	***
0 vs 120 A	-0.4221	Yes	*
20 N vs 20 A	0.06036	No	Ns
20 N vs 40 N	-0.1368	No	Ns
20 N vs 40 A	-0.02583	No	Ns
20 N vs 80 N	-0.3204	No	Ns
20 N vs 80 A	-0.1482	No	Ns
20 N vs 120 N	-0.3668	No	Ns
20 N vs 120 A	-0.2080	No	Ns
20 A vs 40 N	-0.1972	No	Ns
20 A vs 40 A	-0.08619	No	Ns
20 A vs 80 N	-0.3808	No	Ns
20 A vs 80 A	-0.2085	No	Ns
20 A vs 120 N	-0.4272	Yes	*
20 A vs 120 A	-0.2684	No	Ns
40 N vs 40 A	0.1110	No	Ns
40 N vs 80 N	-0.1836	No	Ns
40 N vs 80 A	-0.01134	No	Ns
40 N vs 120 N	-0.2300	No	Ns
40 N vs 120 A	-0.07121	No	Ns
40 A vs 80 N	-0.2946	No	Ns
40 A vs 80 A	-0.1223	No	Ns
40 A vs 120 N	-0.3410	No	Ns
40 A vs 120 A	-0.1822	No	Ns
80 N vs 80 A	0.1723	No	Ns
80 N vs 120 N	-0.04641	No	Ns
80 N vs 120 A	0.1124	No	Ns
80 A vs 120 N	-0.2187	No	Ns
80 A vs 120 A	-0.05987	No	Ns
120 N vs 120 A	0.1588	No	Ns

Tabla A.C.1 Comparación entre los ensayos Alcalino, Neutro y entre ellos de linfocitos aislados. Además se indica, si son estadísticamente significativos o no (Ns), donde \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



Prueba t-student de comparación múltiple	Diferencia de medias	P < 0.05	Estadísticamente Significativo
0 vs 20 N	-0.4508	No	Ns
0 vs 20 A	-0.4068	No	Ns
0 vs 40 N	-0.9874	No	Ns
0 vs 40 A	-0.8815	No	Ns
0 vs 80 N	-0.9166	No	Ns
0 vs 80 A	-1.203	No	Ns
0 vs 120 N	-1.444	No	Ns
0 vs 120 A	-1.332	No	Ns
20 N vs 20 A	0.04400	No	Ns
20 N vs 40 N	-0.5366	No	Ns
20 N vs 40 A	-0.4306	No	Ns
20 N vs 80 N	-0.4658	No	Ns
20 N vs 80 A	-0.7519	No	Ns
20 N vs 120 N	-0.9930	No	Ns
20 N vs 120 A	-0.8807	No	Ns
20 A vs 40 N	-0.5806	No	Ns
20 A vs 40 A	-0.4746	No	Ns
20 A vs 80 N	-0.5098	No	Ns
20 A vs 80 A	-0.7959	No	Ns
20 A vs 120 N	-1.037	No	Ns
20 A vs 120 A	-0.9247	No	Ns
40 N vs 40 A	0.1060	No	Ns
40 N vs 80 N	0.07083	No	Ns
40 N vs 80 A	-0.2153	No	Ns
40 N vs 120 N	-0.4564	No	Ns
40 N vs 120 A	-0.3441	No	Ns
40 A vs 80 N	-0.03513	No	Ns
40 A vs 80 A	-0.3213	No	Ns
40 A vs 120 N	-0.5623	No	Ns
40 A vs 120 A	-0.4501	No	Ns
80 N vs 80 A	-0.2862	No	Ns
80 N vs 120 N	-0.5272	No	Ns
80 N vs 120 A	-0.4149	No	Ns
80 A vs 120 N	-0.2410	No	Ns
80 A vs 120 A	-0.1288	No	Ns
120 N vs 120 A	0.1123	No	Ns

Tabla A.C.2. Comparación entre los ensayos Alcalino, Neutro y entre ellos de sangre completa. Además se indica, si son estadísticamente significativos o no (Ns), donde \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .