



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

(POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS)

“MODULACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DEBIDO A RADIACIÓN IONIZANTE EN UN MODELO MURINO”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

PRESENTA:

ROSA MARÍA FAJARDO MIRANDA

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ

DRA. MARÍA ISABEL GAMBOA DE BUEN
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES, UNAM

M. EN C. ANA ELENA BUENFIL BURGOS

INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 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.

“Te alaben, oh Jehová, todas tus obras, y tus santos te bendigan. La gloria de tu reino digan y hablen de tu poder, para hacer saber a los hijos de los hombres tus poderosos hechos, y la gloria de la magnificencia de tu reino. Tu reino es reino de todos los siglos, y tu señorío en todas las generaciones”

Salmo 145:10-13

Dedicatoria

A mi hermoso hijo Dan, por compartir su tiempo para que yo pudiera realizar este trabajo, y por sus tiernas palabras "mamá es física médica" que me alentaron a culminar esta etapa. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por aceptar dirigir este trabajo, por su guía, orientación y enseñanza en el área biomédica.

A mi comité tutorial: Dra. María Isabel Gamboa de Buen y M. en C. Ana Elena Buenfil Burgos, ya que el tiempo dedicado en forma conjunta a este trabajo permitieron desarrollar un trabajo interdisciplinario de calidad.

A los sinodales Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez, Dra. Mercedes Rodríguez Villafuerte y M. en C. Paola Ballesteros Zebadúa por aceptar evaluar este trabajo, por sus correcciones y comentarios que enriquecieron el contenido del mismo.

A mi mamá, mi hermano Fernando y mi familia por haberme apoyado en todo este tiempo.

Al Dr. Pavel Petrosyan por su enseñanza en las técnicas experimentales empleadas en este trabajo de tesis.

A mis compañeros de generación Diego Cueva, Margarita López e Itzel Torres por su gran apoyo, sonrisas y por todo el ánimo que me brindaron en los momentos difíciles.

Al QFB Carlos Castellanos Barba, Encargado de Seguridad Radiológica del IIB por el amplio apoyo e interés brindado en la caracterización dosimétrica del irradiador del instituto.

Al Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y al Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM; por permitirme usar sus instalaciones, equipos y materiales para desarrollar este trabajo de investigación.

Al programa de Posgrado en Ciencias Físicas, UNAM por la formación académica recibida en el área de Física Médica y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el soporte financiero concedido para la compra de insumos empleados en la parte experimental y asistencia a congresos.

Este trabajo se realizó con apoyo del proyecto CONACYT CB 102287

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| SUMMARY | i |
| RESUMEN | ii |
| INTRODUCCIÓN | iii |
| CAPÍTULO I. RADIACIÓN IONIZANTE, INTERACCIÓN CON LA MATERIA Y EFECTOS BIOLÓGICOS | |
| 1.1 Interacción de la radiación ionizante con la materia | 1 |
| 1.2 Energía de transferencia lineal | 4 |
| 1.3 Efectos biológicos de la radiación | 5 |
| 1.4 Efectos biológicos en el humano | 9 |
| 1.5 Radiosensibilidad | 10 |
| CAPÍTULO II. RADICALES LIBRES, ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE | |
| 2.1 Radicales libres | 12 |
| 2.1.1 Reacciones de radicales | 12 |
| 2.2 Oxígeno y especies reactivas de oxígeno (ROS) | 14 |
| 2.2.1 Reacción de Fenton | 15 |
| 2.2.2 Biomoléculas blancas de radicales y ROS | 15 |
| 2.3 Sistemas de defensa antioxidantes | 16 |
| 2.3.1 Antioxidantes no enzimáticos | 19 |
| 2.3.1.1 Sistema GSH | 19 |
| 2.3.1.2 Sistema Tiorredoxina (TRX) | 19 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1.3 Sistema Glutarredoxina (GRX) | 20 |
| 2.3.2 Enzimas antioxidantes | 22 |
| 2.4 Síntesis de proteínas: Transcripción y Traducción | 24 |
| 2.4.1 Transcripción | 25 |
| 2.4.2 Traducción | 26 |
| 2.5 Vías de señalización en respuesta a estrés oxidante | 27 |
| 2.5.1 Regulación Redox a través de Trx. | 28 |
| 2.5.2 Nrf2 | 28 |

CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

| | |
|-------------------|----|
| 3.1 Justificación | 31 |
| 3.2 Objetivos | 33 |
| 3.3 Hipótesis | 33 |

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y METODOLOGÍA EMPLEADAS

| | |
|--|----|
| 4.1 Dosimetría | 35 |
| 4.1.1 Descripción y calibración del irradiador | 35 |
| 4.1.2 Medición de la tasa de dosis | 36 |
| 4.1.3 Distribución espacial de la dosis | 39 |
| 4.2 Irradiación Ratones y Dosimetría a Órganos | 43 |
| 4.2.1 Condiciones de irradiación a los ratones | 43 |
| 4.2.2 Estimación de dosis para los órganos. | 44 |
| 4.3 Extracción y cuantificación de ARNm de <i>Grx1</i> , <i>Trx1</i> Y <i>Nrf2</i> | 45 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1 Extracción de ARN: Cuantificación, Pureza e Integridad | 45 |
| 4.3.2 Síntesis de ADNc | 46 |
| 4.4 PCR Cuantitativo | 46 |
| 4.5 Extracción y Cuantificación de Proteínas | 47 |
| 4.5.1 Método de Bradford | 48 |
| 4.5.2 Western Blot | 48 |
| | |
| CAPÍTULO V: RESULTADOS | |
| | |
| 5.1 Cuantificación de ARNm de Trx1, Grx1 y Nrf2 | 50 |
| 5.1.1 Aislamiento ARN | 50 |
| 5.1.2 Curvas calibración PCR cuantitativo | 51 |
| 5.1.3 Cuantificación de ARNm mediante Método $\Delta\Delta$ Ct. | 52 |
| | |
| 5.2 Niveles de expresión de ARNm de cada órgano | 55 |
| 5.2.1 Niveles de expresión de ARNm de Cerebro | 55 |
| 5.2.2 Niveles de expresión de ARNm de Corazón | 56 |
| 5.2.3 Niveles de expresión de ARNm de Bazo | 56 |
| 5.2.4 Niveles de expresión de ARNm de Intestino | 58 |
| | |
| 5.3 Western Blot | 59 |
| 5.3.1 Curva patrón y cuantificación de proteínas de cerebro (Bradford) | 59 |
| 5.3.2 Cuantificación de la proteína Nrf2 en núcleo y citoplasma | 62 |
| | |
| CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES | 65 |
| | |
| APÉNDICE | 74 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA | 83 |

Summary

Ionizing Radiation (IR) produces direct and indirect effects in the living matter. The first one affects cells and produces the rupture of chemical bonds in molecules such as DNA generating strand breaks. The indirect effects are produced by free radicals generated by its interaction with the water present in cytoplasm. The organisms have systems of defense, both enzymatic and no enzymatic to quench the reactive species, especially reactive oxygen species (ROS). The Glutathione (GSH), Thioredoxin (Trx) and Glutaredoxin (Grx) systems protect cells from damage of free radicals and ROS.

Transcription factors like Nrf2 are involved in the modulation of Trx system and other antioxidants proteins at the transcription level. The radiation-induced response is tissue-specific and it might be different among organs with high cellular division rate compared with those with lower cellular division rate.

Whole-body irradiation of 20 male Balb-C mice was performed with ^{137}Cs γ -rays from a Gammacell irradiator. Mice were divided in four groups: 0 (control), 0.5, 2.5 y 4.0 Gy. Treated animals and sham-irradiated controls were killed 1h after irradiation by cervical dislocation. Brain, heart, spleen and intestine were harvested to investigate the levels of *Trx1*, *Grx1* y *Nrf2* mRNA expressed in those organs after irradiation using semiquantitative PCR technique. We did not observed changes in *Trx1*, *Grx1* and *Nrf2* mRNA levels at all doses in brain and heart, while there was an increment of *Trx1* and *Nrf2* in spleen in all treatments. Intestine showed an upregulation of *Grx1* mRNA that was dose-dependent. Western Blot analysis showed the translocation of Nrf2 into nucleus in brain for high doses corroborating that Nrf2 pathway is active in this conditions. The results obtained showed a tissue-dependent response that could be related to the different levels of antioxidants and the cell proliferation rate of the different tissues.

Resumen

La radiación ionizante (RI) produce efectos directos e indirectos en la materia viva. Los primeros afectan a las células y provocan la ruptura de uniones químicas en moléculas como las cadenas del ADN. Los efectos indirectos producen radicales libres o especies reactivas como las de oxígeno (ROS) generados en su interacción con el agua del citoplasma. Los organismos poseen sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos para controlar los niveles de estas especies reactivas y ROS. Los sistemas Glutación (GSH), Tiorredoxina (Trx) y Glutarredoxina (Grx) protegen a las células del daño de los radicales libres y ROS producidos por la RI. El factor de transcripción Nrf2/Keap-1 está involucrados en la modulación de la transcripción del sistema Trx y otras proteínas antioxidantes. La respuesta inducida por radiación es tejido-específica y puede ser diferente entre órganos con alta tasa de división celular comparados con aquellos de baja tasa.

Se irradiaron a cuerpo entero 20 ratones de la cepa Balb-C en un irradiador Gammacell con una fuente de ^{137}Cs . Los ratones se dividieron en cuatro grupos: 0 (controles), 0.5, 2.5 y 4.0 Gy. Los animales tratados y los controles no irradiados se sacrificaron mediante dislocación cervical una hora después de la irradiación. Se recolectaron el cerebro, corazón, bazo e intestino para investigar los niveles de ARNm de *Trx1*, *Grx1* y *Nrf2* expresados en los órganos después de la irradiación utilizando la técnica PCR semicuantitativa.

No se observaron cambios en los niveles de ARNm de *Trx1*, *Grx1* and *Nrf2* para todas las dosis en cerebro y corazón, mientras que hubo un incremento de *Trx1* y *Nrf2* en bazo para todos los tratamientos. El intestino mostró una sobre-regulación del ARNm de *Grx1* que es dosis-dependiente. La técnica Western Blot mostró la translocación de Nrf2 al núcleo en cerebro para dosis altas corroborando que la vía Nrf2 se encuentra activa bajo estas condiciones. Los resultados obtenidos mostraron una respuesta tejido-dependiente que puede estar relacionada a los diferentes niveles de antioxidantes y la tasa de proliferación celular de los diferentes tejidos.

INTRODUCCIÓN

La célula como unidad principal en los sistemas biológicos es una maquinaria perfectamente ensamblada y equipada para llevar a cabo las funciones necesarias para mantener un ser vivo. Los organismos aerobios requieren oxígeno para obtener la energía ATP (adenosina trifosfato) necesaria para mantener en funcionamiento a la célula. Sin embargo; el producto de esas funciones genera desechos que con el paso del tiempo son los que deterioran la célula y a su vez al organismo por completo.

Una consecuencia de la respiración aerobia es la formación de moléculas dañinas llamadas “especies reactivas de oxígeno (ROS)” generadas como resultado del metabolismo intracelular normal principalmente en la mitocondria y vesículas citoplasmáticas llamadas peroxisomas. Estas especies son radicales libres altamente reactivos con otras moléculas modificando su estructura o funcionalidad al interactuar con ellas.

El organismo posee un sistema de defensa enzimático y uno no enzimático para regular los niveles de ROS a fin de mantener la homeostasis celular. Al existir un aumento en los niveles de ROS aparece una situación conocida como estrés oxidante donde se pierde el balance entre la aparición de especies nocivas y la capacidad de la célula de evitar su acumulación.

La contaminación del aire, la radiación ionizante, los rayos UV, los metales pesados, los pesticidas, etc. son agentes capaces de generar un aumento de estos niveles de ROS. Las células y los tejidos pueden modular de manera diferencial la respuesta antioxidante, para hacer frente al estrés causado por las especies reactivas.

Al interaccionar la radiación ionizante con la materia, se produce ionización, excitación y disociación en las moléculas. En la materia viva, estas modificaciones tienen importantes consecuencias a nivel biológico como la modificación de la actividad química o la funcionalidad específica. Si el daño es directamente sobre la molécula de ADN (Ácido desoxirribonucleico) rompiendo una o ambas cadenas de su estructura se denomina efecto directo de la radiación, pero además como la sustancia más abundante en la célula es el agua, su radiólisis provoca la formación de radicales libres, que son altamente reactivos y capaces de difundir lo suficiente para alcanzar y dañar a los blancos críticos como la molécula de ADN, iniciar reacciones químicas no deseadas o participar en la producción de compuestos tóxicos para la célula.

Ya en 1906 los médicos Jean Bergonié y Louis Tribondeau encontraron que las células presentan diferente sensibilidad a la radiación y con el paso del tiempo se ha encontrado que esta sensibilidad está relacionada con la capacidad de proliferación del tejido irradiado.

El daño provocado por la radiación ionizante induce una serie de eventos moleculares y bioquímicos que pueden reparar el daño o culminar en cambios fisiológicos permanentes o en muerte celular. Por ejemplo las proteínas tioredoxina (Trx) y glutaredoxina (Grx) son proteínas antioxidantes cuya expresión aumenta por la presencia de estrés oxidante (Koháryová & Kollárová, 2008) y (Song y otros, 2002), mientras que el factor de transcripción “nuclear factor E2-related factor 2” (Nrf2) participa directamente en la modulación de la expresión de muchas otras proteínas antioxidantes (Ma, 2013).

El objetivo de este trabajo es investigar si existe un aumento en la transcripción de los genes de las proteínas Grx1, Trx1 y Nrf2 como respuesta al incremento de nivel de ROS celular debido a la radiación ionizante proveniente de una fuente de ^{137}Cs en diferentes órganos: cerebro, corazón, bazo e intestino en ratones de la cepa Balb-C, así como determinar si existe una relación dosis-dependiente y tejido-dependiente de la misma.

CAPÍTULO I

RADIACIÓN IONIZANTE, INTERACCIÓN CON LA MATERIA Y EFECTOS BIOLÓGICOS

1.1 Interacción de la radiación ionizante con la materia (Attix, 1986)

La absorción de energía por un material puede llevar a dos fenómenos: excitación e ionización. La excitación ocurre cuando un electrón atómico sube a un nivel energético más alto y la ionización ocurre cuando la energía absorbida es suficiente para expulsar uno o más electrones de sus órbitas.

La radiación ionizante (RI) es capaz de producir estos fenómenos al interactuar con la materia, por tanto debe llevar la energía suficiente para producirlos. Un aspecto importante de la RI es que es capaz de liberar localmente grandes cantidades de energía. La energía disipada por cada ionización es en promedio de 33 eV, lo cual es más que suficiente para romper enlaces químicos en las moléculas.

Existen dos tipos de RI: radiación no cargada (fotones y neutrones) y partículas cargadas. Los fotones corresponden a los rayos X y rayos γ cuyas longitudes de onda en el espectro electromagnético se encuentran por debajo de 10^{-12} m y el intervalo práctico de energías emitidas por átomos radiactivos se encuentran entre 2.6 keV (rayos X característicos de $^{37}_{18}\text{Ar}$) y 6.1–7.1 MeV (rayos γ de $^{16}_7\text{N}$). La diferencia entre rayos X y γ radica en su naturaleza, los rayos γ son emitidos por un núcleo o en reacciones de interacción materia anti-materia, mientras que los rayos X provienen de la desaceleración de electrones debido a su interacción vía Coulomb con algún núcleo lo que da lugar a la llamada radiación “Bremsstrahlung” o radiación de frenado, o debido al cambio en los niveles energéticos orbitales dando lugar a rayos característicos o de fluorescencia.

La otra componente de la RI la conforman las partículas cargadas en las que se encuentran las partículas cargadas ligeras (electrones y partículas betas) y las partículas cargadas pesadas (protones, partículas alfa, deuterones, piones, etc.).

La forma de interactuar de ambas componentes es diferente, llamándole radiación indirectamente ionizante a la primera ya que primero transfieren su energía a partículas cargadas en el medio quienes a su vez depositan su energía a través de interacciones que producen ionización o excitación. Ya que este tipo de RI son fotones que viajan a través de un material, transfieren su energía a los electrones del medio mediante dos procesos: absorción o dispersión. En el primero el fotón es totalmente absorbido por el medio y en el segundo sufre una interacción elástica con algún electrón cediéndole parte de su energía y es desviado de su trayectoria original.

Los tres principales procesos de interacción de los fotones con la materia son el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton y la producción de pares. Estos fenómenos son predominantes en los materiales dependiendo de la energía del fotón incidente y de la composición del material. (Figura 1.1)

Efecto fotoeléctrico: Un rayo X interactúa con un electrón ligado en alguna de las capas atómicas K, L o M cediéndole toda su energía, parte es utilizada para liberar al electrón y el resto se libera en forma de energía cinética del electrón (Figura 1.2.a) Esta energía es igual a la energía del fotón incidente menos la energía de ligadura. Esta forma de interacción es predominante cuando los fotones son de baja energía (< 30 keV en tejido) y la probabilidad de que ocurra depende del número atómico Z del absorbedor ($\sim Z^3$).

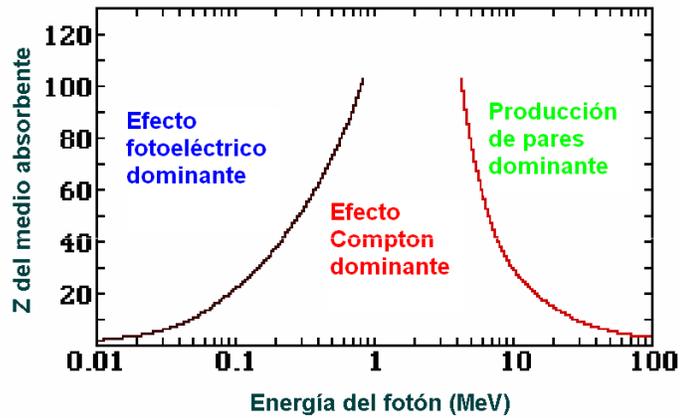


Figura 1.1.- Regiones predominantes para interacción fotoeléctrico, Compton y producción de pares de acuerdo a la energía del fotón y el tipo de medio de interacción (número atómico Z).

Efecto Compton: En este proceso el fotón interactúa con un electrón libre (v.g. un electrón poco ligado en capas exteriores del átomo). El fotón cede parte de su energía en forma de energía cinética al electrón, y un nuevo fotón, llamado fotón disperso, se lleva la energía restante (Figura 1.2.b). Las energías a las que es más probable la interacción Compton en tejido se encuentran en el intervalo de 30 keV a 20 MeV y la probabilidad de que ocurra es aproximadamente equivalente para todas las Z.

Producción de pares: Un fotón con energía mayor que 1.022 MeV al interactuar con el campo coulombiano del núcleo se convierte en un par de partículas: una es un electrón y la otra su antipartícula (positrón) de la misma masa que el electrón pero con carga del mismo valor y de signo opuesto (Figura 1.2.c). Cuando el positrón interactúa con un electrón, ambos se aniquilan creando un par de fotones de energía 0.511 MeV. La probabilidad de que se produzca este efecto es proporcional a la Z del medio.

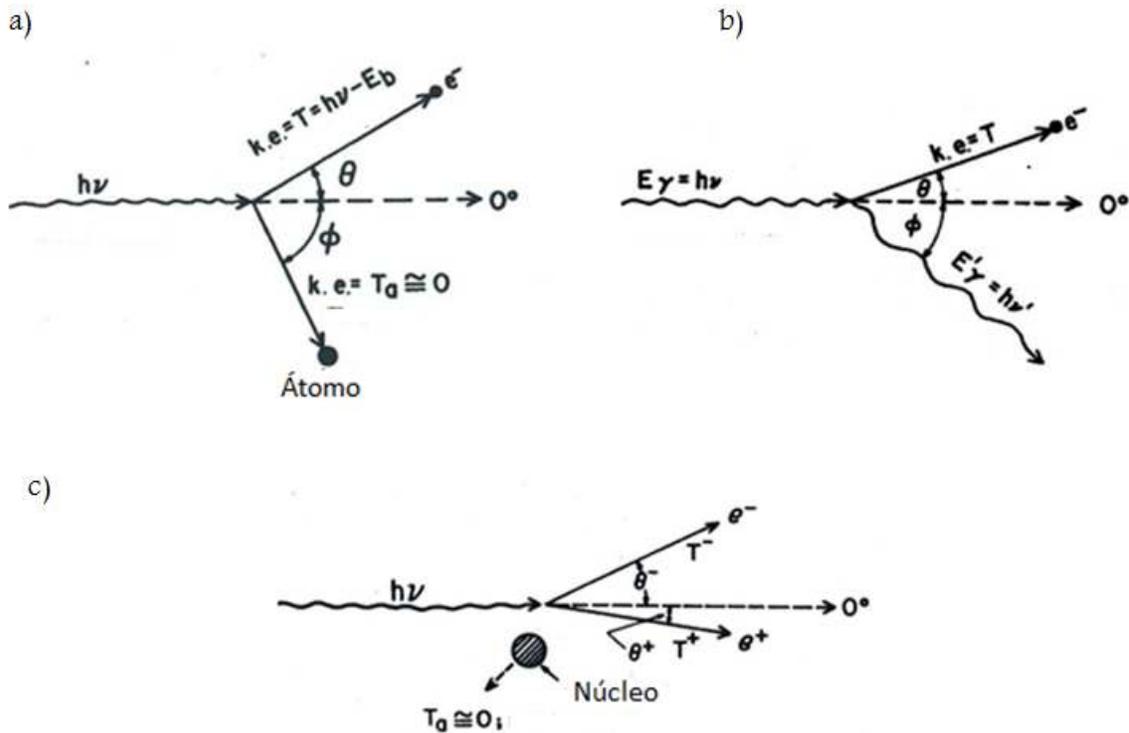


Figura 1.2 – Esquemas de los proceso de interacción de la RI con la materia: a) efecto fotoeléctrico, b) efecto Compton y c) producción de pares.

Las partículas cargadas se denominan radiación directamente ionizante ya que transfieren directamente su energía vía interacciones coulombianas a lo largo de su trayectoria. Al atravesar un medio, éstas van perdiendo su energía a través de pequeñas interacciones hasta que finalmente se detienen.

1.2 Transferencia lineal de energía (LET)

Cuando la RI interacciona con un material, las ionizaciones y excitaciones resultantes tienden a estar localizadas a lo largo de las trayectorias individuales de las partículas cargadas variando el patrón de la distribución espacial para cada tipo de radiación.

El patrón resultante para eventos primarios de rayos X se encuentra bien definido y separado en el espacio, llamándole así “escasamente ionizante”. Por el contrario, el patrón debido a una partícula cargada pesada posee ionizaciones poco separadas a lo largo de la trayectoria llamada así “densamente ionizante”.

La transferencia lineal de energía (LET por sus siglas en inglés Linear Energy Transfer) se define como la energía transferida al medio por unidad de trayectoria. La LET de una partícula cargada es el cociente $\frac{dE}{dl}$ [keV/ μ m], donde dE es la energía promedio impartida localmente al medio por una partícula cargada con una energía específica al atravesar una distancia dl . Las partículas cargadas se clasifican en cuanto a su LET en radiación de alta y baja LET. La radiación de bajo LET comprende un patrón de ionización con LET menor que 1 keV/ μ m y la de alto LET con valores entre 1 y 1000 keV/ μ m.

Con base en esta definición los electrones y las partículas beta son consideradas partículas de bajo LET y las partículas cargadas pesadas (protones, partículas alfa, etc.) se consideran de alto LET. Aunque el concepto de LET está definido para partículas cargadas, suele asociarse el término a los fotones ya que el patrón de ionización que se observa es comparable al de una partícula cargada ligera, por tanto también se consideran los rayos X y γ radiación de bajo LET.

La LET de una partícula no sólo depende de la naturaleza de ésta, sino también de su energía. La LET es inversamente proporcional a la energía de la partícula.

1.3 Efectos biológicos de la radiación (Hall, 1982)

Cuando la RI interacciona con un material biológico, existe la posibilidad de que interaccione directamente con los blancos críticos de las células de los cuales el ácido desoxirribonucleico (ADN) es el principal de ellos.

Los efectos de la interacción de la RI con el material biológico han sido descritos a nivel molecular como directos e indirectos. Los directos se refieren a su acción sobre la doble hélice del ADN, generando cortes en ella o produciendo cambios tautoméricos.

Los indirectos se refieren a los efectos producidos por la radiólisis del agua que genera numerosos radicales libres que a su vez pueden reaccionar con el ADN y generar oxidaciones y reducciones en las bases del ADN. Sin embargo los productos de la radiólisis del agua no necesariamente reaccionan con el ADN nuclear sino que lo pueden hacer con otros componentes celulares como proteínas y membranas.

Los átomos del material biológico pueden ser excitados o ionizados iniciando así una cadena de eventos que pueden llevar a un cambio biológico. El daño al ADN es dominante cuando se tiene radiación de alta LET y corresponde a la acción directa de la radiación ionizante. La acción indirecta ocurre cuando la RI interacciona con otros átomos o moléculas de la célula (particularmente agua) para producir radicales libres que son capaces de difundir lo suficiente para alcanzar y dañar blancos críticos (Figura 1.3.a).

El daño directo al ADN debido a radiación de diferente LET produce diferentes efectos. La radiación de baja LET como rayos X produce una ionización en una de las cadenas del ADN y la radiación con $LET \geq 100 \text{ keV}/\mu\text{m}$ produce daño en ambas cadenas de ADN siendo éste un daño con mayor dificultad para reparar y que puede llevar a la muerte celular o inducir mutaciones (Figura 1.3.b).

Los mecanismos de reparación del ADN, así como los antioxidantes, resuelven el problema de la exposición a la RI y al oxígeno, ya que la presencia de daño activa de alguna manera un conjunto de procesos que permiten remediar (si son exitosos) los cambios perjudiciales producidos por la exposición. Independientemente del tipo de acción de la RI, a nivel celular se activan mecanismos particulares de reparación en los organismos.

Cuando existe daño directo se activan mecanismos de reparación de ruptura de cadena simple o doble en el ADN y cuando se tiene acción indirecta que genera radicales libres que producen un estado de estrés oxidante y se activan mecanismos de defensa antioxidante en la célula.

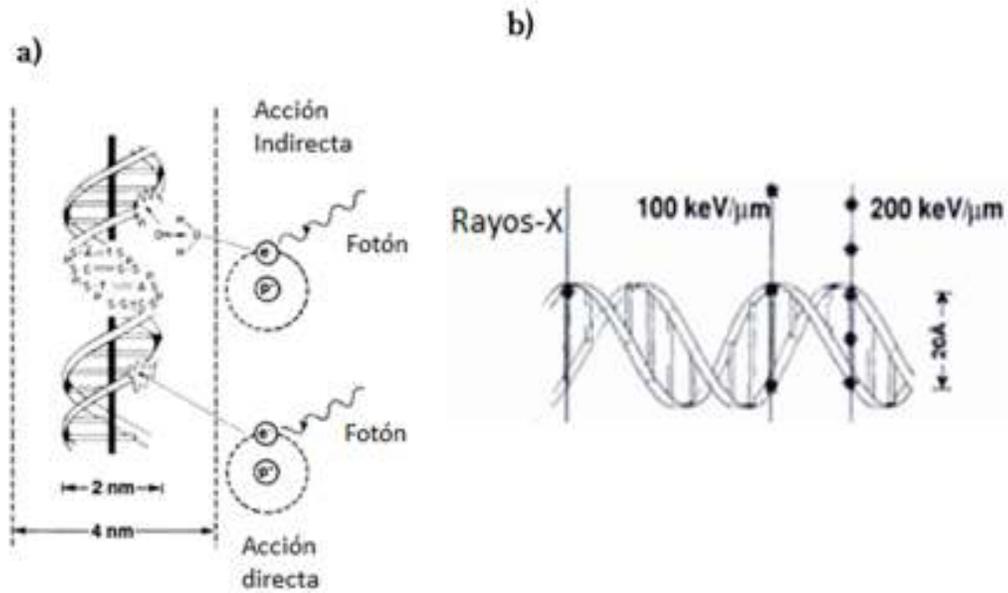


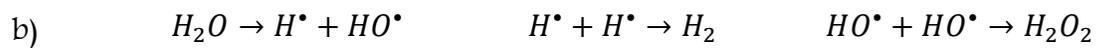
Figura 1.3.- Esquema de la acción directa e indirecta de la radiación ionizante en un blanco biológico. a) La acción directa ioniza las moléculas que componen la molécula de ADN mientras que la indirecta ioniza moléculas circundantes que alcanzan el blanco produciendo un daño. b) Daño directo en las cadenas de ADN. La radiación de baja LET produce rupturas de cadena simple y la radiación de alta LET genera ruptura de doble cadena. Tomado de (Hall, 1982).

A continuación se describen las especies reactivas generadas durante la radiólisis del agua cuyos componentes son comunes a numerosos eventos biológicos que generan estrés oxidante, como veremos más adelante. Ya que la mayor parte del cuerpo está constituido por agua, la interacción de la radiación con el agua es de las más importantes. Sus efectos son la ionización o hidrólisis de las moléculas de agua generando radicales reactivos que son capaces de interaccionar con otras moléculas (efecto indirecto) produciendo reacciones químicas no deseadas que traen consigo la producción de compuestos tóxicos para la célula que alteran su capacidad reproductiva o su funcionamiento.

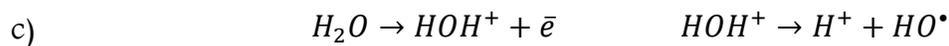
Algunas reacciones producto de la radiólisis del agua son las siguientes:



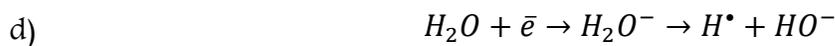
Esta reacción es la ionización del agua en un ion hidrógeno y un hidróxido que pueden recombinarse sin generar una molécula tóxica a la célula.



Esta reacción produce radicales hidroxilo (HO^\bullet) los cuales son muy reactivos. También se generan radicales secundarios como el H_2 que no son perjudiciales pero otros como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que son extremadamente tóxicos para la célula.



La RI puede ionizar al agua de tal forma que se separe produciendo un ion HOH^+ que es muy inestable y se descompone con facilidad dando lugar a un átomo de hidrógeno ionizado y la formación de un radical hidroxilo.



El radical H^{\bullet} puede combinarse con el oxígeno tal como se indica en esta reacción y producir el radical hidroperoxilo que se combina con otro igual y también produce agua oxigenada. Existen varias enzimas antioxidantes que específicamente degradan el agua oxigenada, lo que da idea de la importancia de esta especie reactiva en los seres vivos.

1.4 Efectos biológicos en el ser humano

Los efectos biológicos en un ser humano después de ser irradiado a cuerpo entero pueden clasificarse en deterministas y estocásticos. Los efectos deterministas pueden apreciarse desde las primeras horas y suelen presentar una sintomatología ya estudiada (Figura 1.4). Estos efectos dependen de la dosis, el tipo de tejido y poseen un umbral para ser observados. Para dosis menores que 0.5 Gy no se tienen efectos perceptibles. Para dosis entre 0.5 y 1 Gy se presentan dolor de cabeza, náuseas, falta de apetito, vómito, diarrea, disminución en la cuenta sanguínea. Si la dosis es mayor, la severidad de estas alteraciones aumenta y la recuperación del individuo se dificulta. La dosis letal media $DL_{50/60}$ (fallecimiento del 50% en 60 días) en los individuos sanos se encuentra entre 3-5 Gy y éstos mueren por alteraciones en la sangre, hemorragia e infección en una o dos semanas.

Cuando la dosis recibida es de 10 Gy se puede producir la perforación del intestino ocasionando alteración del equilibrio electrolítico, fiebre, peritonitis, etc. En estas condiciones es fácil que la infección pase a la sangre y cause septicemia. Además se presenta inflamación pulmonar y la muerte en unos días. Cuando la dosis alcanza los 50 Gy hay choque nervioso, convulsiones, ataxia y hemorragia en el sistema nervioso central.

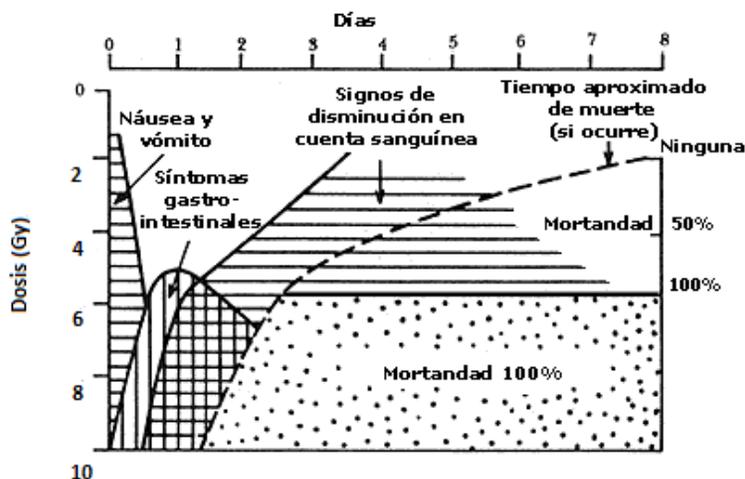


Figura 1.4.- Secuencia temporal de los principales efectos biológicos inmediatos en un ser humano, causados por una irradiación aguda y de cuerpo entero. Tomado de (Brandan, Díaz-Perchez, & Ostrosky, 1990).

Los efectos estocásticos se originan en las alteraciones a nivel genético, no poseen un umbral para desarrollarse y la probabilidad de que se presenten depende de la dosis recibida, la capacidad de las células de reparar el daño y la forma en que se administra la dosis. Estos efectos conllevan a la formación de células cancerosas o malformaciones genéticas para el individuo o su descendencia.

1.5 Radiosensibilidad

La radiosensibilidad es la magnitud del efecto en las estructuras biológicas, provocada por radiación ionizante. Un tejido es más sensible cuanto mayor es el efecto a una dosis determinada de radiación necesitando menor dosis para alcanzar un efecto determinado.

Al estudiar los efectos de la radiación ionizante sobre ratones, los científicos Jean Bergonié y Louis Tribondeau concluyeron en 1906 que las células presentan diferente radiosensibilidad de acuerdo a diversos factores:

- i) Las células que se encuentran en reproducción son más radiosensibles.
- ii) Las células menos diferenciadas presentan mayor radiosensibilidad.
- iii) Son más radiosensibles aquellas células que se dividen rápidamente y continúan dividiéndose por largos periodos.

Actualmente sabemos que la muerte celular después de la irradiación ocurre principalmente cuando las células tienden a dividirse. En tejidos con una alta tasa de proliferación (Figura 1.5), el daño es apreciable rápidamente mientras que en tejidos con baja tasa de proliferación celular el daño permanece latente por un largo periodo de tiempo.

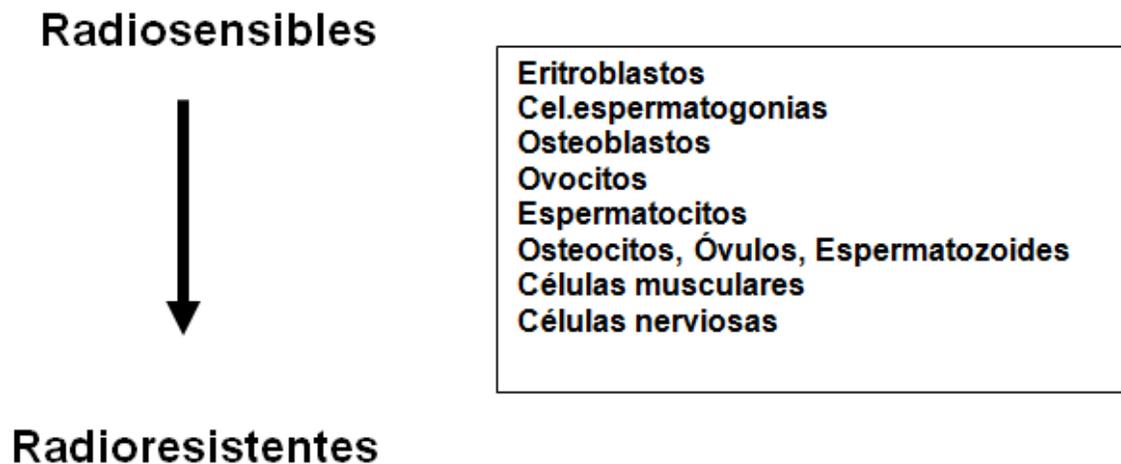


Figura 1.5.- Nivel de radiosensibilidad de diferentes células. Ley de Bergonié y Tribondeu, las células más radiosensibles son aquellas menos diferenciadas o con mayor actividad reproductiva.

La radiosensibilidad de los órganos es consecuencia de la sensibilidad del tipo de células que los conforman, por tanto los órganos más sensibles son la médula ósea, el tracto gastrointestinal, las mucosas y la piel.

CAPÍTULO II

RADICALES LIBRES, ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

2.1 Radicales libres (Roberfroid, 1995)

Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados lo que lo hace muy reactivo ya que tiende a capturar un electrón de otra molécula. Con base en esta definición, son radicales libres la molécula de oxígeno, el átomo de hidrógeno y los metales de transición (en estado iónico).

2.1.1 Reacciones de radicales

Las reacciones de los radicales generalmente se dan en cadena donde pueden distinguirse tres pasos: Iniciación, propagación y terminación donde finalmente son eliminados.

Iniciación:

Los radicales se producen en las células debido a fisión homolítica, fotólisis, radiólisis o reacciones redox aunque algunas enzimas actúan como catalizadores intermediarios y la exposición a especies moleculares muy reactivas también puede iniciar las reacciones de radicales.

Cualquier molécula que posea un número par de electrones de valencia puede separarse en dos radicales cuando un enlace covalente se rompe y cada uno de los electrones inicialmente apareados permanece con cada átomo (Ecuación 2.1).



La luz (UV en particular) puede romper enlaces químicos como resultado de la absorción de energía por las moléculas (Ecuación 2.2).



La radiación ionizante, principalmente de baja LET, causa radiólisis la cual es el resultado de la ruptura de uno o más enlaces interatómicos. Cuando el agua (o las soluciones acuosas) son irradiadas, se generan diferentes productos moleculares tales como radicales que pueden reaccionar con solutos orgánicos que a su vez pueden producir una gran cantidad de radicales secundarios.

La radiación ionizante también produce directamente radicales orgánicos a partir de las componentes celulares. Por ejemplo, puede iniciar auto-oxidación de lípidos insaturados que es un proceso importante del proceso de iniciación de radicales libres en seres vivos.

Propagación

En este tipo de reacciones, el número de radicales se conserva. Los tipos principales de propagación de radicales son los siguientes:

- a) Transferencia de átomo: Es la reacción más frecuente y consiste en la sustracción del átomo más externo de la molécula por parte del radical siendo este átomo usualmente un hidrógeno o un halógeno. Los hidroperóxidos orgánicos son los más susceptibles a estos ataques.
- b) Transferencia de electrón: Consiste en la transferencia de un electrón de un radical (R) o un anión radical (R)⁻ a un sustrato no radical. En los sistemas biológicos es de mucha importancia ya que al irradiar soluciones acuosas los electrones reaccionan con moléculas de oxígeno para formar superóxido (O₂^{•-}). También se tienen transferencias de electrón de iones metálicos a peróxidos que juegan un papel importante en la peroxidación de lípidos.

- c) Adición de radicales. Se debe a la adición de radicales a olefinas alifáticas, anillos aromáticos u oxígeno molecular

Terminación

Se puede terminar una cadena de reacción de radicales si dos radicales ponen juntos el electrón desapareado para formar una nueva molécula con un par de electrones apareados o con sustancias antioxidantes.

2.2 Oxígeno y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Halliwell & Gutteridge, 2000)

La molécula de oxígeno diatómica (O_2) posee dos electrones desapareados lo que hace que actúe como agente oxidante tomando el par de electrones faltantes de un átomo. Cuando la molécula acepta un electrón, se vuelve un radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) el cual al tener solamente un electrón desapareado se vuelve menos reactivo que el oxígeno. Al añadir un electrón al radical superóxido obtenemos el ion peróxido (O_2^{2-}) que ya no pertenece al grupo de radicales (ecuación 2.3).

En los sistemas biológicos al reducir con 2 electrones al oxígeno obtenemos peróxido de hidrógeno (ecuación 2.4) y la reducción con cuatro electrones produce agua (ecuación 2.5).



Al grupo formado por los radicales libres del oxígeno así como sus derivados se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS “reactive oxygen species”). En la tabla 2.1 se enlistan las ROS clasificadas en radicales y no radicales. Los radicales que forman este grupo poseen un electrón no apareado en su último orbital, mientras que los demás elementos de la tabla son moléculas precursoras de los radicales libres. Aunque todas son tóxicas para la célula, los radicales son más reactivos y difíciles de eliminar.

Tabla 2.1.- Especies reactivas del oxígeno (ROS).

| Radicales | No- radicales |
|------------------------------|--------------------------------|
| Superóxido $O_2^{\cdot-}$ | Peróxido de hidrógeno H_2O_2 |
| Hidroxilo OH^{\cdot} | Ácido hipocloroso $HOCl$ |
| Peróxido RO_2^{\cdot} | Ozono O_3 |
| Alcoxilo RO^{\cdot} | Oxígeno simple |
| Hidroperóxilo HO_2^{\cdot} | Peroxinitrito $ONOO$ |

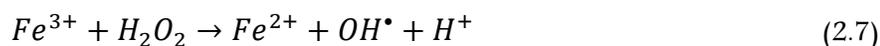
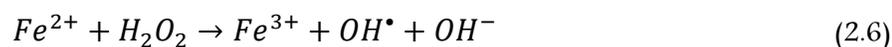
A nivel biológico, en formas de vida aeróbicas, estos radicales forman parte importante ya que las células de estos organismos han tomado ventaja del potencial de reacción de la molécula de oxígeno y sus productos de reducción. Debido a esto, las células tienen que tolerar niveles de fondo de radicales producto de estas reacciones y debe existir un equilibrio entre su producción y destrucción. Dado que su presencia se asocia a tasas metabólicas elevadas, muchas de estas especies reactivas se convierten en señales químicas para iniciar procesos de división, diferenciación y hasta muerte celular.

2.2.1 Reacción de Fenton

Todos los elementos clasificados como elementos de transición posicionados en la primera fila del bloque d (grupos 3 a 12) de la tabla periódica contienen pares de electrones desapareados en el orbital d y por tanto se consideran radicales libres (a excepción del zinc).

Los diferentes números de oxidación de los metales de transición los hacen catalizadores efectivos en reacciones de oxidación y reducción; sin embargo, esta capacidad lleva a que catalicen reacciones de radicales de libres.

La *reacción de Fenton* es un ejemplo ilustrativo de las reacciones de radicales libres catalizadas por metales de transición. Una mezcla de sales de hierro con agua oxigenada oxida muchas moléculas orgánicas de las cuales se generarán radicales OH^{\cdot} como se muestra en las siguientes reacciones.



El radical hidroxilo (OH^\bullet) es un compuesto formado por un átomo de oxígeno unido de forma covalente con un átomo de hidrógeno. Este radical puede ser formado por diferentes reacciones como las reacciones de Fenton o la fisión hemolítica del enlace O-O en la molécula del agua (Ecuación 2.8).



2.2.2 Biomoléculas blancos de radicales y ROS

Debido a su alta reactividad, los ROS reaccionan rápidamente con diferentes biomoléculas como substratos, metabolitos o productos de procesos bioquímicos (glucosa, ribosa, aminoácidos, colesterol, etc.); vitaminas (α tocoferol, ácido ascórbico, carotenos); péptidos (glutación) y lípidos; también con macromoléculas como las proteínas y ácidos nucleicos. Cuando reaccionan con biomoléculas orgánicas las dañan ya que modifican su estructura y propiedades químicas.

Estas reacciones pueden formar parte de la propagación o terminación de la cadena de reacción de radicales. Debido a la naturaleza de las biomoléculas orgánicas, este daño puede ser transitorio pero perjudicial.

Las biomoléculas de vitamina A, E y C, ácido úrico, carbohidratos, aminoácidos y colesterol han sido clasificadas como agentes neutralizantes y por tanto como antioxidantes naturales que ayudan al organismo a protegerse del deterioro de los efectos de los radicales.

2.3 Sistemas de defensa antioxidantes

Durante el metabolismo aerobio se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo radicales hidroxilo (OH^\bullet), aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ROS participan en muchos procesos celulares, como en la generación de

señales relacionadas con procesos como la proliferación celular y la apoptosis, la inmunidad, y la defensa contra microorganismos.

Los organismos aerobios están protegidos del ataque de especies reactivas de oxígeno y radicales libres por un arreglo de sistemas de defensa. Los componentes responsables de este sistema se llaman antioxidantes. Un antioxidante es una sustancia que retrasa o previene la oxidación de un sustrato. Los sistemas antioxidantes están compuestos por enzimas y por antioxidantes no enzimáticos.

Durante la evolución, se han desarrollado mecanismos complejos de defensa en contra de las ROS, pero a pesar de que los sistemas enzimáticos son muy efectivos en metabolizarlos, es evidente que no pueden asegurar su eliminación. Por ejemplo no existe una enzima específica que neutralice el radical OH^\bullet , como ocurre con el peróxido de hidrógeno o con el radical superóxido.

Las moléculas antioxidantes pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción:

- i) Enzimas antioxidantes: Ejemplo de estos son: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa, etc. Su mecanismo involucra una modificación química de su sustrato (v.g. $\text{O}_2^{\bullet-}$ es transformado en H_2O_2 por la acción de SOD). El agua oxigenada a su vez es degradada por las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa o peroxirredoxinas.
- ii) Moléculas antioxidantes no enzimáticas: Al reaccionar con un radical estos componentes forman un radical aducto que puede ser estable. Sus reacciones son estequiométricas que significa que la molécula antioxidante se consume y debe ser regenerada a través de otras moléculas. Están localizadas en diferentes compartimentos intracelulares de acuerdo a su polaridad; las vitaminas A y E se encuentran en la región hidrofóbica (membranas) mientras que la vitamina C y el glutatión (GSH) se encuentran en las zonas hidrofílicas (citosol).

La figura 2.1 presenta un resumen de los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y su funcionamiento dentro de la célula para la eliminación de ROS en el organismo.

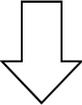
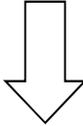
| Enzimáticas | No- enzimáticas |
|---|---|
| Citocromo oxidasa Superóxido dismutasa Glutación peroxidasa Catalasa Peroxirredoxinas  Modificación química del sustrato Productos no radicales Productos de menor toxicidad Actividad catalítica | Vitaminas (A,C,E) Glutación Ácido Úrico Tiorredoxina  Formación de radical aducto Reacción estequiométrica Polaridad |

Figura 2.1.- Mecanismos de acción enzimática y no enzimática de antioxidantes.

Una alta concentración o una eliminación inadecuada de ROS, dan lugar a un estrés oxidante, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas. Se ha demostrado que cuando la capacidad antioxidante es superada, la célula es capaz de responder aumentando la síntesis de antioxidantes y de proteínas de estrés, a través de la activación de vías de señalización específicas (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

Los niveles de defensas antioxidantes difieren de tejido a tejido y de tipo de célula a tipo de célula y están generalmente asociados a su tasa metabólica y consumo de oxígeno.

2.3.1 Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos principales son el glutatión (GSH), las tiorredoxinas (Trx) y la glutarredoxinas (Grx).

2.3.1.1 Sistema GSH

El GSH es el antioxidante celular más abundante y por lo tanto contribuye al mantenimiento redox celular. In vitro el GSH reacciona con OH^\cdot , OHCl , ONOO^- , RO^\cdot , RO_2^\cdot , $\text{CO}_3^{\cdot-}$, NO_2^\cdot , etc. Dado la elevada concentración intracelular del GSH (mM) es posible que también in vivo reaccione con estos metabolitos reactivos.

El glutatión oxidado (GSSG) es reducido por la enzima antioxidante glutatión reductasa (Deneke & Fanburg, 1989). Ya que la razón GSH a GSSG determina el potencial redox intracelular, en caso de estrés oxidante la célula tiene la capacidad de reducir GSSG en GSH (Lu, 2013).

2.3.1.2 Sistema Tiorredoxina (TRX)

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas de bajo peso molecular que tienen un sitio activo disulfuro redox y su función principal es reducir los puentes disulfuro en las proteínas blanco en una reacción de dos pasos cuyo producto final es liberar el blanco reducido y la proteína redoxina oxidada.

Las Trx están compuestas por Tiorredoxina Reductasa (TR), Tiorredoxina (Trx) y Peroxirredoxina siendo importante en la regulación del balance redox protegiendo células de tejido de daño por H₂O₂.

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

En la figura 2.2 se muestra una reacción antioxidante del sistema TRX. La tiorredoxina reductasa (TrxR) reduce el sitio activo disulfido en tiorredoxina (Trx) y otros sustratos directamente consumiendo NADPH. La tiorredoxina reducida es altamente eficiente en reducir disulfidos en proteínas y péptidos incluyendo peroxirredoxinas (Prx) y glutatión disulfido (GSSG).

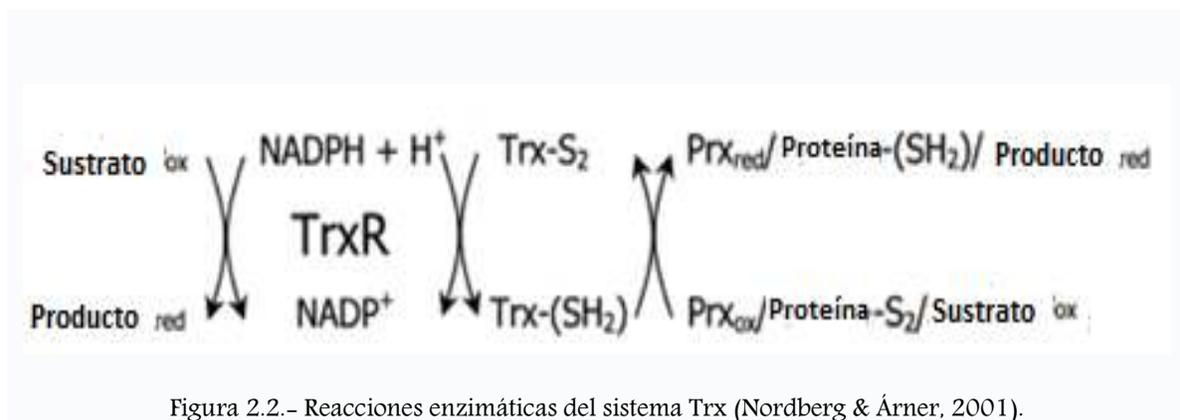


Figura 2.2.- Reacciones enzimáticas del sistema Trx (Nordberg & Årner, 2001).

2.3.1.3 Sistema Glutarredoxina (GRX)

Grx fue descubierta como un donador de hidrógeno GSH-dependiente para la ribonucleótido reductasa en mutantes carentes de Trx como en la bacteria Escherichia Coli. (Holgren, 1989) y es una oxirreductasa que al igual que Trx posee un sitio activo disulfuro redox.

Esta proteína comparte parcialmente la función sensora redox con Trx (Song y otros, 2002) y (Song & Lee, 2003), además de que muestra un rol importante en la protección contra el estrés oxidante (Luikenhuis y otros, 1998). Al igual que Trx, también existen dos Grxs: Grx1 que es una proteína en el citosol y Grx2 que es mitocondrial.

La Grx oxidada es reciclada por la forma reducida de GSH con la formación de glutatión disulfido (GSSG) y la regeneración de GSH acoplada con NADPH y GSSG reductasa. La figura 2.3 es un ejemplo del proceso antioxidante de los sistemas GSH-GRX. El H_2O_2 es reducido por la glutatión peroxidasa por oxidación de dos moléculas de glutatión (GSH) formando glutatión disulfido (GSSG) que posteriormente es reducido por glutatión reductasa (GR) consumiendo NADPH. La glutatión también reduce glutarredoxina (Grx) que a su vez reduce diferentes sustratos. La glutatión S-transferasa (GST) cataliza la conjugación de glutatión con otras moléculas funcionando así como un paso intermedio para la detoxificación de sustancias tóxicas. (Figura 2.3)

Esta interacción con el sistema GSH la distingue de la proteína Trx la cual favorece sustratos disulfuros y es independiente de GSH a través de tiorredoxina reductasa.

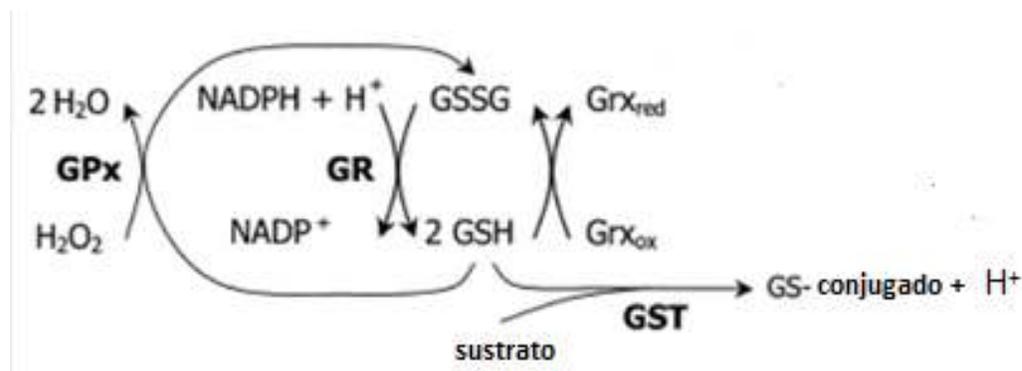


Figura 2.3.- Principal sistema antioxidante asociado a glutatión y glutarredoxina (GSH-Grx) (Nordberg & Årner, 2001).

2.3.2 Enzimas antioxidantes

Las células cuentan con diferentes enzimas antioxidantes específicas para una especie reactiva de oxígeno particular que permiten de una manera específica su eliminación.

Su ausencia o baja actividad se asocia con enfermedad y a veces es incompatible con la vida. Las más comunes son:

a) Superóxido dismutasa (SOD). El descubrimiento de las enzimas SOD llevó a la teoría “superóxido de la toxicidad del oxígeno”, la cual propone que $O_2^{\cdot-}$ es el mayor factor de toxicidad y que los SOD son la mayor defensa contra él. Siendo SOD un depurador (scavenger) de $O_2^{\cdot-}$, constituye la primera fase de defensa antioxidante ya que cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en H_2O_2 (ecuación 2.11). Los ratones que no tienen la SOD mitocondrial mueren al poco tiempo de nacer.



b) Catalasa (CAT): Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración, catalizando su conversión en H_2O y O_2 (ecuaciones 2.12 y 2.13), para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior.



Por lo tanto, el H_2O_2 es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la catalasa y otras peroxidasa. En animales, el peróxido de hidrógeno se desintoxica mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un papel importante

en la adquisición de tolerancia al estrés oxidante en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular. Dado que existen varias enzimas que son capaces de degradar el peróxido de hidrógeno, la ausencia o baja actividad de la catalasa no se asocia a padecimientos severos.

c) Glutación peroxidasa (GPX).- La GPX comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos ($ROOH$ y H_2O_2) usando glutación reducido (GSH) que es transformado en glutación oxidado (GSSG) tal como se muestra en la ecuación 2.14.



d) Glutación reductasa (GR): La reducción del GSSG a GSH es llevada a cabo por esta enzima que utiliza el poder reductor del NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida).

e) Tiorredoxina reductasa (TR): La reducción de las tiorredoxinas (Trx) oxidadas es catalizada por esta enzima utilizando el NADPH.

f) Peroxirredoxinas (Prx): Son una familia de peroxidases que reducen el peróxido de hidrógeno y orgánicos. Junto con la catalasa y las glutación peroxidases eliminan el H_2O_2 intracelular.

2.4 Síntesis de proteínas: Transcripción y Traducción (Alberts y otros, 2008)

La información para construir una proteína específica se almacena en el ADN de cada organismo. Un segmento determinado de ADN llamado gen contiene el código para una proteína específica. El ADN almacena la información genética y las moléculas del ácido ribonucleico (ARN) transmiten dicha información a los componentes celulares llamados ribosomas en donde se realiza la síntesis proteica. La célula puede modular la cantidad de proteína que sintetiza a través de factores de transcripción como los que se describirán en las secciones 2.5.1 y 2.5.2.

Durante este proceso se construye primero una molécula de ARN llamada ARN mensajero (ARNm) (transcripción) que se forma en el núcleo de la célula transcribiendo la secuencia de bases contenidas en el gen. Este ARNm migra del núcleo hacia el citoplasma celular, en donde sintetiza la proteína con ayuda de los ribosomas. Los ARN denominados moléculas ARN de transferencia (ARNt) se unen a los aminoácidos específicos codificados en la secuencia del ARNm de manera que se genera la cadena peptídica (traducción) tal como se ilustra de manera general en la figura 2.4. A continuación se describen estos procesos con más detalle.

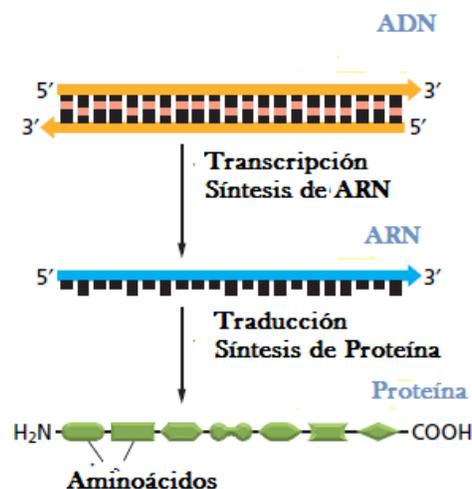


Figura 2.4.- Síntesis de proteínas. La información genética es copiada a partir de un gen mediante el proceso de transcripción utilizando como molde una de las cadenas de ADN formando así una molécula de ARN. Posteriormente esta molécula se dirige al ribosoma para iniciar el proceso de traducción donde moléculas de ARNt reconocen los nucleótidos para formar el polipéptido que dará lugar a la proteína. Tomado de (Alberts y otros, 2008).

2.4.1 Transcripción

El proceso de transcripción consiste en copiar una porción de ADN en una secuencia de nucleótidos de ARN. Este proceso produce una molécula de ARN complementaria de una cadena a partir de una molécula de ADN. La transcripción comienza con la abertura y desenrollamiento de una pequeña porción de ADN. Una de estas cadenas sirve de molde para la síntesis de una molécula de ARN (figura 2.5).

La secuencia de la cadena de ARN se determina por el apareamiento base por base entre los nucleótidos que llegan a unirse y el molde de ADN. Las enzimas que permiten la transcripción de ARN se llaman ARN polimerasas que se mueven a través de la cadena doble de ADN desenrollándola. Así la cadena de ARN crece nucleótido por nucleótido en la dirección 5' a 3'. Se denomina ARNm a las moléculas formadas de secuencias de genes que codifican aminoácidos de las proteínas y la lleva a cabo la enzima ARN polimerasa II (Las ARN polimerasas I y III codifican ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr)).

La ARN polimerasa identifica la región inicial o promotora para comenzar a copiar y se libera al reconocer la región final. Los ARNm deben ser encapsulados en la terminación 5' y poliadenilados en la terminación 3' que permite reconocer a la célula la presencia de este ARNm y trasladarlo del núcleo al citoplasma para convertirlo en proteína añadiendo un transportador que exporta el ARNm fuera del núcleo.

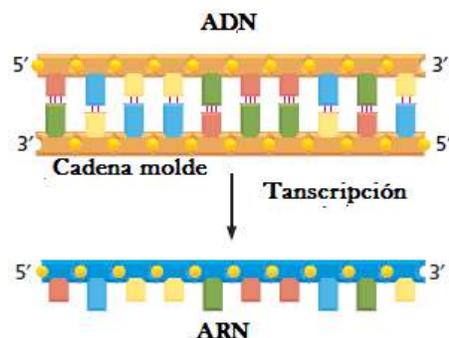


Figura 2.5.- El proceso de transcripción produce una molécula de ARN de una sola cadena complementaria a una cadena molde de ADN. Tomado de (Alberts, y otros, 2008).

2.4.2 Traducción

Una vez que se ha producido ARNm por el proceso de transcripción, la información contenida en la secuencia nucleotídica se utiliza para sintetizar una proteína. Aunque existen 4 nucleótidos se requieren 20 diferentes tipos de aminoácidos para formar las proteínas. Por tanto las secuencias se leen de tres en tres nucleótidos llamados codones formando así 64 posibles combinaciones. Cada codón especifica un aminoácido o detiene el proceso de traducción.

Los codones en una molécula de ARNm no traducen directamente los aminoácidos. Se necesitan moléculas que reconocen por interacciones de pares de bases a los codones denominadas moléculas de ARN de transferencia (ARNt). Un anticodón es complementario a cada codón de ARNm (figura 2.6).

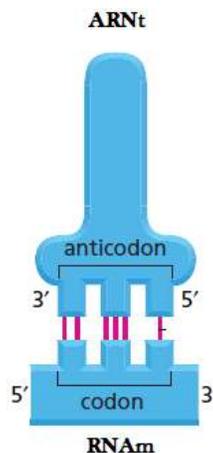


Figura 2.6.- Molécula de ARNt que se une a los codones del ARNm mediante el complemento de pares de bases (anticodón). Tomado de (Alberts, y otros, 2008).

La síntesis de proteínas se lleva a cabo en el citoplasma dentro del ribosoma que es una maquinaria compleja formada por 50 proteínas diferentes y moléculas de ARNr que permiten que las moléculas de ARNt unan los codones de ARNm. Para iniciar la traducción, una unidad ribosomal se une al ARNm en el codón de inicio (AUG) que es reconocido por una molécula iniciadora de ARNt. La molécula de ARNm entra codón por codón en el ribosoma en la dirección 5' a 3' hasta llegar a un codón que finaliza la traducción y libera la cadena polipeptídica.

Las moléculas de ARNr poseen un papel importante en el proceso de traducción ya que no solamente forman la estructura del ribosoma, también forman los sitios para los ARNt uniéndolos con los codones en el ARNm y creando el sitio activo para la enzima peptidil transferasa que liga los aminoácidos durante la traducción.

2.5 Vías de señalización en respuesta a estrés oxidante.

El estrés oxidante celular causado por radiación ionizante u otros factores químicos y biológicos activa vías de señalización involucradas en la respuesta antioxidante. Las especies reactivas como los peróxidos también participan en señales asociadas a la proliferación celular y mecanismos anti-apoptóticos, incluyendo receptores de factores de crecimiento, cambios en los niveles de Ca^{2+} citoplásmicos y cinasas que responden a estrés (Mikkelsen & Wardman, 2003).

La inducción de enzimas citoprotectoras en respuesta al estrés químico es regulada fundamentalmente a nivel de transcripción. Esta modulación ocurre a través de la presencia de una secuencia o elemento de modulación llamado “elemento de respuesta antioxidante” (ARE: antioxidant response element) encontrado inicialmente en las regiones promotoras de los genes que codifican enzimas de desintoxicación como la GSTA2 (Glutación S-transferasa A2), NQO1 (NADPH:quinona oxidoreductasa 1), (HO-1) hemoxigenasa y otras.

A la región ARE se unen factores de transcripción que son activados por compuestos químicos con la capacidad de reciclarse en forma redox, por tanto la alteración del estado redox celular debido a niveles altos de ROS o a la reducción de la capacidad antioxidante es una señal importante para activar la respuesta antioxidante.

2.5.1 Regulación Redox a través de Trx.

Trx regula negativamente a la señal de apoptosis a cargo de la cinasa -1 (ASK-1). Trx en su forma reducida se une a Ask-1 e inhibe su activación. Cuando Trx es oxidada por ROS, la unión entre Trx y Ask-1 se rompe y ASK-1 es activada para iniciar la señal de apoptosis (Saitoh y otros, 1998).

La unión a ADN del activador de proteína -1 (AP-1) es modificada por el factor redox-1 (Ref-1) y a su vez la actividad de (Ref-1) es modulada por Trx. Por tanto podemos asociar Trx directamente con el núcleo. Trx y Ref-1 promueven la reparación de ADN mediante la activación de p53 dependiente de p21 (Ueno y otros, 1999). En el caso de la unión factor nuclear κ B (NF- κ B), la cisteína 62 de NF- κ B es el sitio blanco para ser reducido por Trx que es importante para la unión de NF- κ B al ADN.

Una sobre-expresión de Trx en el citoplasma suprime la activación de NF- κ B mientras que una sobre-expresión en el núcleo promueve la unión de NF- κ B con ADN (Hirota y otros, 1999).

La síntesis de Trx1 puede ser inducida por estrés oxidante. Ello ocurre porque la secuencia promotora del gen Trx1 contiene elementos de respuesta antioxidante (ARE) (Kim y otros, 2001). La sobre-expresión de Trx1 en células HT-1080 aumentó la capacidad de neutralizar ROS inducidos por radiación γ , y la sensibilidad a la muerte por apoptosis (Byun & Cho, 2005).

2.5.2 Nrf2

La activación de la transcripción de genes a través de ARE está mediada principalmente por el factor de transcripción Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2). La actividad de Nrf2 es regulada por la proteína Keap-1, la cual actúa por unión y amarre al factor de transcripción dentro del citoplasma. La activación de Nrf2 en respuesta a señales de estrés

resulta en la ruptura de esta asociación, liberando a Nrf2 el cual transloca al núcleo para modificar la actividad de transcripción (Maher & Yamamoto, 2010).

Nrf2 pertenece a una familia de Nrf (Nrf1, Nrf2 y Nrf3) que son proteínas básicas con un cierre de leucinas (bZip) en la región C-terminal. La región básica corriente arriba de bZip es la responsable de la unión al ADN (Königsberg, 2007).

Nrf2 es una proteína inestable ($t_{1/2} \approx 15$ min), con peso molecular de 68 kDa sujeta a degradación proteolítica vía ubiquitinación. Nrf2 es constantemente degradada en células no estresadas lo que implica que keap-1 es una proteína activa que promueve la ubiquitinación de Nrf2 para su degradación. Cuando los niveles de ROS aumentan se oxidan cisteínas claves de keap-1, liberando a Nrf2 que puede trasladarse al núcleo celular y unirse a las regiones ARE de los genes antioxidantes (Nguyen, 2003) y (Stewart, 2003).

Esto indica que la interacción de las dos proteínas es un proceso dinámico que permite a Nrf2 controlar la expresión de sus propios genes tanto a nivel basal como inducidos (Figura 2.7) (Nguyen, 2005).

El Nrf2 endógeno interacciona con ARE en ausencia de estrés celular localizándose predominantemente en el núcleo bajo estas condiciones. La translocación de Nrf2 en el núcleo seguida de su biosíntesis en los ribosomas no es un proceso regulado sino un proceso de estabilización mediado por mecanismos que decrecen su tasa de degradación.

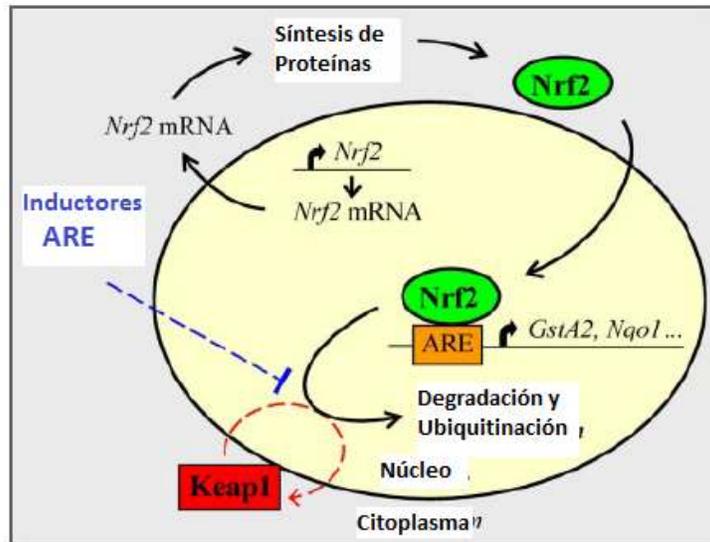


Figura 2.7.- Vía de señalización propuesta para Nrf2-ARE. Tomado de (Maher & Yamamoto, 2010).

En resumen, Nrf2 está expresado constitutivamente en la célula y transloca al núcleo en donde se une a la región ARE para inducir la transcripción de genes como tiorredoxina, glutarredoxina, hemo-oxigenasa, etc. y de sí mismo. Seguido de la transactivación de sus genes, Nrf2 es blanco para degradación por Keap1 en el núcleo. En estado de estrés oxidante, la estabilización de Nrf2 es dependiente de mecanismos que tanto previenen como reducen el acceso de Keap1 a Nrf2.

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO, OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la Ley de Bergonié–Tribondeau, los tejidos responden de forma diferente a la RI dependiendo de su actividad reproductiva y diferenciación; y congruente a esto se ha encontrado sobre-expresión de diferentes genes que lleva a apoptosis en órganos como intestino y bazo y en menor proporción en pulmón, corazón y cerebro para dosis bajas de 0.2 Gy (Lee y otros, 2006).

Existe la posibilidad de que las alteraciones en la expresión de genes inducidas por RI sean específicas para cada órgano. Se conoce una gran diversidad de estudios enfocados en los efectos producidos en el cerebro tras ser irradiados (Kojima, 1998), (Kojima, 1999), (Todorovic, 2006), etc.) pero poco se conoce de la respuesta antioxidante en órganos como el corazón, bazo e intestino.

Se han realizado estudios en los que se identifican en la célula proteínas de señalización tras estar expuesta a radiación ionizante, que modulan la activación de sistemas antioxidantes para proteger a la célula. Algunas de las proteínas sobre-expresadas encontradas son GSTP, citocromo C y Peroxirredoxina (Prx) que son proteínas relacionadas con ROS (Jeung, 2004). Proteínas como la Tiorredoxina (Trx), la γ -Glutamyl sintetasa y la Glutarredoxina (Grx) han sido poco estudiadas en su participación en el estrés oxidante por radiación ionizante así como el factor de transcripción Nrf2 que modula la respuesta antioxidante, así como la de sí mismo (Nguyen, 2009).

Ante un modelo Señal-Detector/Transductor-Activador-Respuesta como el mostrado en la figura 3.1 es posible identificar los participantes en la vía de señalización con las proteínas específicas para cada paso. La radiación ionizante produce principalmente radiólisis del agua cuyo resultado es un incremento de nivel de ROS celular que

reaccionan químicamente (reducción- oxidación) con moléculas como Keap-1 o Trx que sirven como transductores de la presencia de ROS. Este tipo de moléculas modulan la actividad de otro tipo de moléculas que funcionan como activadores (ASK-1, Nrf2) de la señal incidente provocando una acción de respuesta que conduce principalmente a la síntesis de proteínas antioxidantes para reparar daño o inducción a apoptosis.

Por tanto el presente trabajo permitirá obtener información de la expresión de las principales proteínas antioxidantes modulada por radiación ionizante en órganos poco estudiados, encontrar si existe diferencia en esta respuesta de acuerdo a la radiosensibilidad asociada a cada órgano y finalmente ajustar estos resultados con los efectos ya conocidos de la interacción de la RI con la célula en modelo que además permitirá generalizar el modelo a situaciones de estrés oxidante donde la producción de radicales libres sea mediante otro tipo de agentes tóxicos.

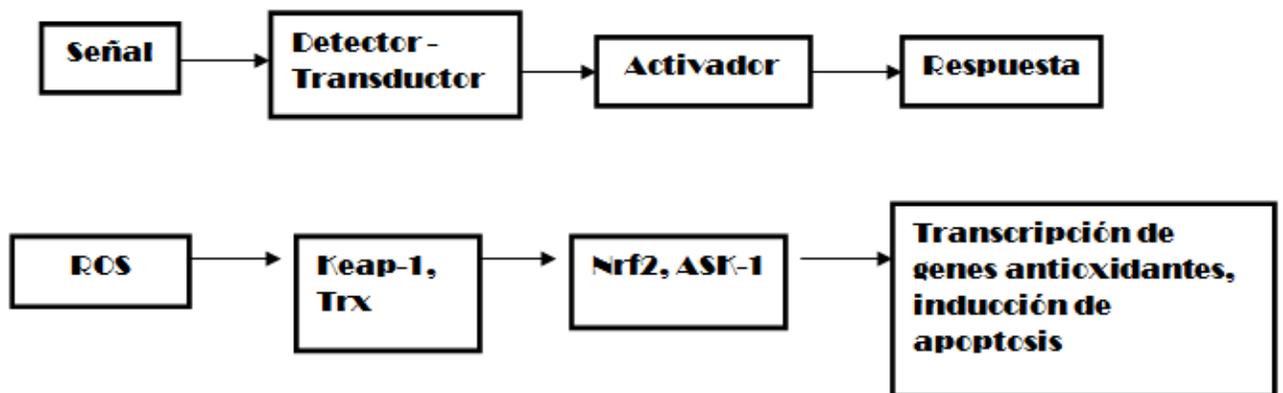


Figura 3.1.- Esquema señal- detector/transductor- activador-respuesta

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo General

- Encontrar si existe un aumento en la transcripción de genes de las proteínas Grx1, Trx1 y Nrf2 como respuesta al incremento de nivel de ROS celular debido a radiación ionizante en diferentes órganos de ratón de la cepa Balb-C.

3.2.2 Objetivos Particulares

- Verificar la tasa de dosis y distribución espacial de dosis del irradiador Gammacell 1000-Elite del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- Determinar los niveles de ARNm de *Trx1* y *Grx1* en diferentes órganos con tejidos de baja (cerebro y corazón) y alta (intestino delgado y bazo) tasa de división celular.
- Estudiar la respuesta en la expresión de genes antioxidantes debido a radiación ionizante a cuerpo entero para dosis baja (0.5 Gy), intermedia (2.5 Gy) y alta (4 Gy).
- Determinar la proporción de la proteína Nrf2 en núcleo y citoplasma en cerebro tras recibir diferentes dosis de radiación.

3.3 HIPÓTESIS

- La radiación ionizante induce la transcripción de *Grx1*, *Trx1* y la translocación de Nrf2 a núcleo en un modelo señal-detector-activador-respuesta en ratones sometidos a irradiación de cuerpo entero, siendo la respuesta diferente dependiendo del órgano irradiado y mayor conforme aumenta la dosis recibida.

Para esto se propone un modelo de esquema de señal–detector–activador–respuesta que se muestra en la figura 3.2. La señal que activa los mecanismos es la radiación ionizante, la principal especie reactiva generada por la RI en la célula es el radical hidroxilo (OH^\bullet), éste oxida a Keap-1 que sirve como detector provocando que la unión entre Keap-1 y Nrf2 desaparezca. Esto conlleva a la liberación de Nrf2 que funciona como transductor metiéndose al núcleo y pegándose en la región de elemento de respuesta antioxidante (ARE) la cual promueve la transcripción de genes antioxidantes.

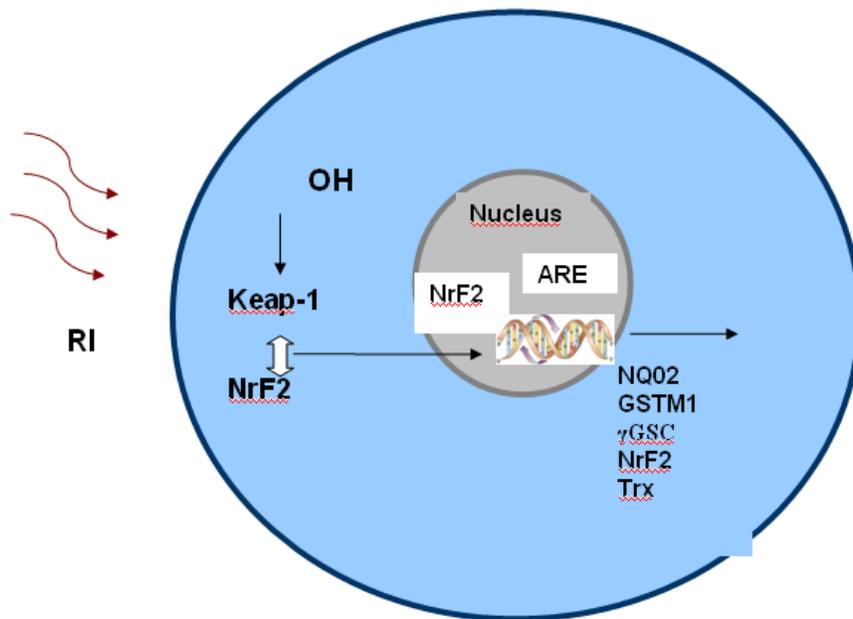


Figura 3.2.- Esquema de señalización en la transcripción de genes como respuesta a la radiación ionizante.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y METODOLOGÍA EMPLEADOS

4.1 Dosimetría

4.1.1 Descripción y calibración del irradiador

El dispositivo empleado como fuente de radiación fue un irradiador Gammacell 1000 Elite localizado en la antigua sede del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Esta unidad cuenta con una sola fuente de ^{137}Cs (decaimiento β^- , emite γ de 662 keV, $\tau_{1/2} = 30$ años), la cual se encuentra doblemente encapsulada en acero inoxidable. Las características de decaimiento del radionúclido se muestran en la Figura 4.1.

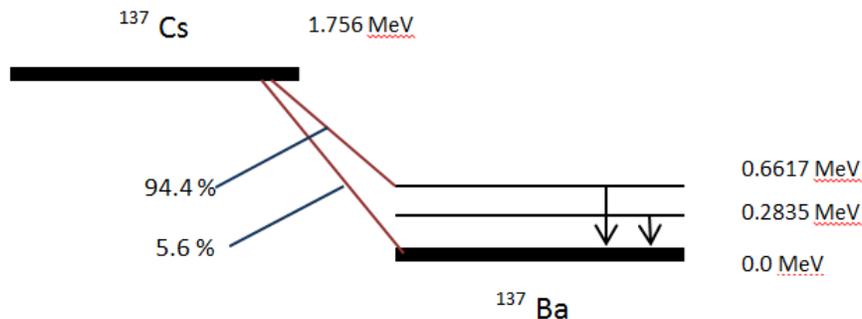


Figura 4.1.- Esquema de decaimiento del radionúclido ^{137}Cs localizado dentro del irradiador Gammacell 1000-Elite.

El irradiador Gammacell 1000 Elite cuenta con un cilindro de 16.5 cm de altura y 8.1 cm de diámetro interno en el cual se introduce el objeto de interés a irradiar (Figura 4.2). Los parámetros que deben ingresarse para poner en marcha el equipo son la fecha y el tiempo de irradiación (en min y s). Una vez cerrada la puerta el rotor de la muestra se mueve a la posición de irradiación. En modo automático el reloj funciona en cuenta regresiva y una vez transcurrido el tiempo de exposición, la muestra rota hacia afuera para poder ser extraída del contenedor.



Figura 4.2.- Fotografía del irradiador Gammacel 1000-Elite donde se muestra el contenedor de acero inoxidable donde se colocan las muestras a irradiar.

4.1.2 Medición de la tasa de dosis

Para medir la tasa de dosis del irradiador se utilizó un dosímetro absoluto acuoso (dosímetro Fricke, Apéndice A.1). Se prepararon dos muestras con 10 ml de solución Fricke cada una en un tubo de ensaye y se colocaron en el centro del contenedor a una altura de 3 cm desde el fondo del contenedor como se muestra en la figura 4.3.

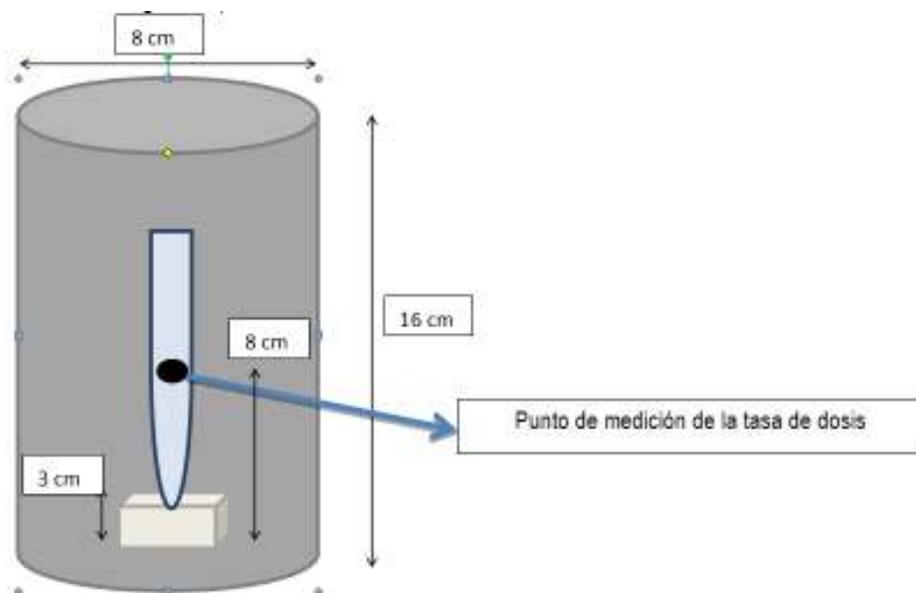


Figura 4.3.- Dispositivo experimental utilizado para la determinación de la tasa de dosis usando solución Fricke.

Los tiempos de irradiación de las muestras se calcularon a partir de la tasa de dosis reportada por el fabricante para obtener dosis aproximadas de 50 y 70 Gy, siendo estos tiempos de 18.18 y 25.45 min, respectivamente. Una vez irradiados se trasladaron al Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM (ICN) para ser leídos. Las soluciones se leyeron en

un espectrofotómetro UV-visible marca Varian modelo Cary 100 utilizando solución sin irradiar como referencia.

Los resultados de la lectura del cambio en la densidad óptica (ΔDO) obtenidos del espectrofotómetro aparecen en la tabla 4.1 y la dosis absorbida fue calculada mediante la ecuación 4.1 (Attix, 1986) que relaciona la dosis absorbida dentro de la solución respecto al cambio en la densidad óptica (A1.1).

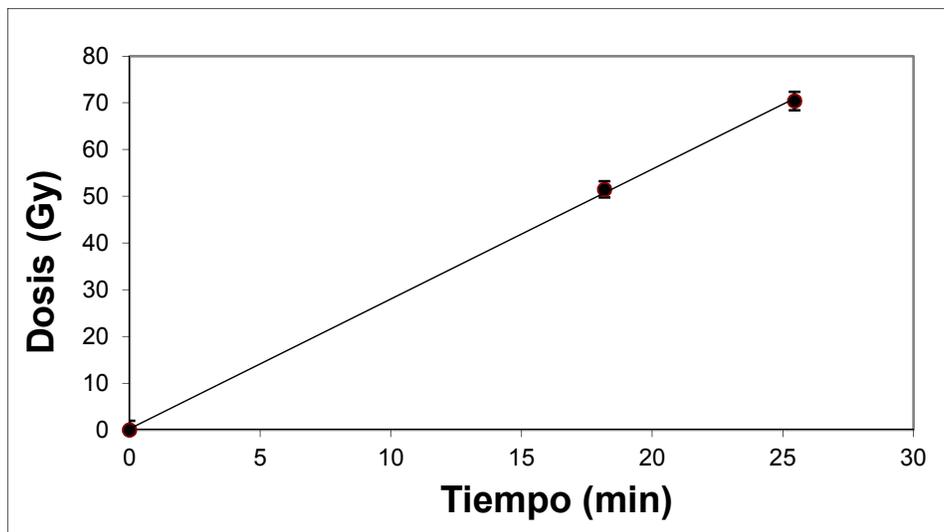
$$D(\text{Gy}) = 278(\Delta DO) \quad (4.1)$$

Tabla 4.1.- Valores de cambio en densidad óptica de las muestras de solución Fricke.

Se utilizó solución sin irradiar como blanco.

| Tiempo (min) | ΔDO | Dosis (Gy) |
|--------------------|-----------------|------------|
| 0 ±0.08 | 0.057 ± 0.006 | 0.0 ± 1.9 |
| 18.18 ±0.08 | 0.2417 ± 0.0014 | 51.5 ± 1.7 |
| 25.45 ±0.08 | 0.3098 ± 0.0009 | 70 ± 2 |

Con los valores calculados de dosis absorbida se construye la curva de calibración 4.1. Ésta muestra la dosis como función del tiempo de irradiación de la cual es posible obtener el valor de tasa de dosis a partir de la pendiente del ajuste debido a que la relación es lineal.



Gráfica 4.1.- Dosis como función del tiempo medida con solución Fricke.

A partir de la gráfica 4.1 se obtiene la ecuación de la recta 4.2 donde D es la dosis medida en Gy y t es el tiempo medido en minutos.

$$D = 2.8t + 0.24 \quad *$$
(4.2)

con $R^2 = 0.9997$. La pendiente de la ecuación 4.2 da el valor de la tasa de dosis en agua:

$$\text{Tasa de Dosis (08/6/2011)} = \dot{D}_0 = (2.78 \pm 0.10) \text{Gy}/\text{min}$$

Para obtener la tasa de dosis actual $\dot{D}(\text{Gy})$, se calcula mediante la ecuación 4.3

$$\dot{D} \left(\frac{\text{Gy}}{\text{min}} \right) = \dot{D}_0 e^{-\ln(2) \frac{t}{10950}} \quad (4.3)$$

*El ajuste de los puntos de la gráfica se realiza permitiendo que la recta pase por el origen, pero la ecuación obtenida solamente puede emplearse para dosis entre 40-400 Gy que es el intervalo de validez del dosímetro Fricke.

Donde \dot{D}_0 es el valor de tasa de dosis medido con la solución Fricke, t es el tiempo transcurrido en días desde la medición de este valor hasta el día de irradiación. Esta ecuación representa cuantitativamente el decaimiento de la fuente a través del tiempo.

4.1.3 Distribución espacial de la dosis

Ya que el dosímetro Fricke proporciona el valor de la tasa de dosis en un punto dentro del contenedor, se utilizó película de tinte radiocrómico (PTR, Apéndice A.2) HD-810 para medir la distribución espacial de la dosis dentro del contenedor. Para poder calibrar la película se cortaron cuadrados de 1 cm de lado y se irradiaron con una fuente de ^{60}Co ($E_\gamma = 1.25 \text{ MeV}$) con tasa de dosis conocida ((30/04/2010)= 0.327 Gy/min) en un intervalo de dosis 0-13 Gy. Posteriormente se digitalizaron en un escáner HP G4050 y se procesaron con el software Image J (versión 1.41) para poder descomponer la imagen en cada color RGB.

Con la imagen resultante en rojo se midió el tono de intensidad promedio de cada trozo de película para poder obtener la respuesta de la misma definida como

$$R = \log \left(\frac{T_{si}}{T_i} \right) \quad (4.4)$$

Donde T_{si} es el tono de color de la película sin irradiar y T_i el de la película irradiada.

Ya que la gráfica de calibración se construyó para una energía de 1.25 MeV y este tipo de dosímetro posee una respuesta dependiente de la energía de la radiación, se realizó una comparación entre las respuestas medidas para energías de 1.25 MeV y 0.662 MeV (Niroomand-Rad y otros, 1998) siendo ésta 3% mayor para ^{137}Cs , por tanto se realizó una corrección del mismo porcentaje en la respuesta de la PTR procesada (Tabla 4.2).

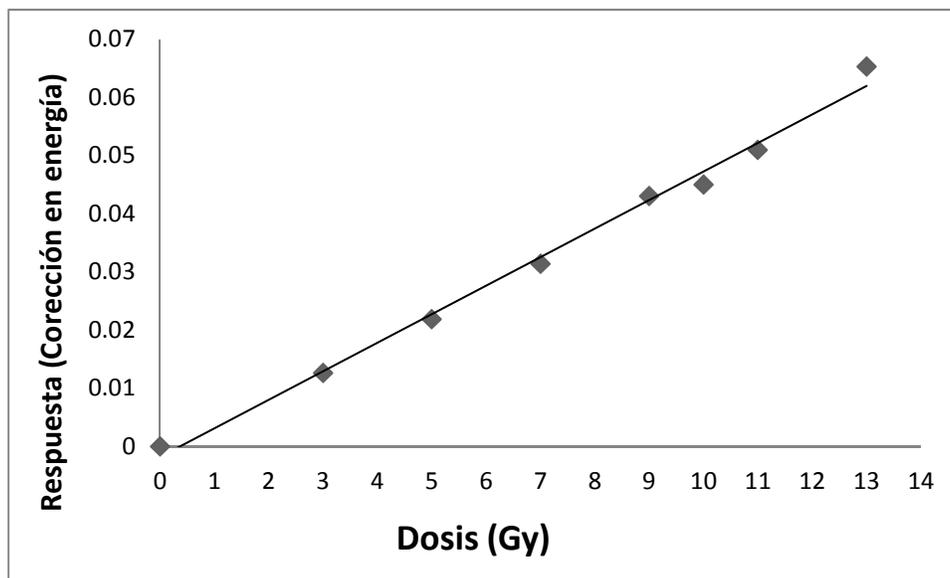
Tabla 4.2.-Datos de calibración de la película HD-810 (canal rojo) con una fuente de ^{60}Co .

Posteriormente se realizó una corrección en la respuesta del 3% debido a la dependencia

en energía para llevarla a ^{137}Cs .

| Dosis (Gy) | Tono de gris | Respuesta | Respuesta (Corrección E) |
|--------------|--------------|-----------|--------------------------|
| Blanco (Ref) | 255 | | |
| 0 | 237 | 0 | 0 |
| 3 | 230 | 0.0120 | 0.0126 |
| 5 | 225 | 0.0229 | 0.0219 |
| 7 | 220 | 0.0326 | 0.0313 |
| 9 | 214 | 0.0432 | 0.0430 |
| 10 | 213 | 0.0466 | 0.0449 |
| 11 | 210 | 0.0523 | 0.0509 |
| 13 | 203 | 0.0662 | 0.0652 |

Se realiza la gráfica 4.2 de la respuesta corregida por la dependencia en energía vs dosis y se realiza un ajuste lineal de los puntos.



Gráfica 4.2.- Calibración de la película HD-810 en dosis.

La ecuación de la curva de calibración indica la relación entre la respuesta (R) de la película y la dosis D(Gy).

$$R = 0.0049D - 0.0018 \quad (4.5)$$

o bien en términos de la respuesta

$$D(\text{Gy}) = 204.08R + 0.37 \quad (4.6)$$

Para medir la distribución espacial de la dosis dentro del contenedor, se introdujo verticalmente en el centro geométrico del mismo, una tira de película de 15 cm de largo y 3 cm de ancho cubierta por ambos lados con lucita de 1 cm de espesor y posteriormente se colocó en forma diametral otra película con dimensiones de 15 x 8 cm² sin cubrir. Las películas se expusieron a la radiación durante 3.63 min para obtener una dosis aproximada de 10 Gy.

Se realizó la digitalización y el procesamiento de la película utilizando la ecuación 4.6 obtenida de la calibración para determinar la dosis para cada punto de la película. Se graficaron las curvas de isodosis empleando el programa Surfer 7 para obtener la distribución del porcentaje de dosis a lo largo del cilindro contenedor (Figura 4.4). El valor correspondiente al 100% es el valor de dosis calculado a partir de la tasa de dosis medida con la solución Fricke, que en este caso correspondería a 10 Gy dado que el tiempo de irradiación fue de aproximadamente 3.63 min.

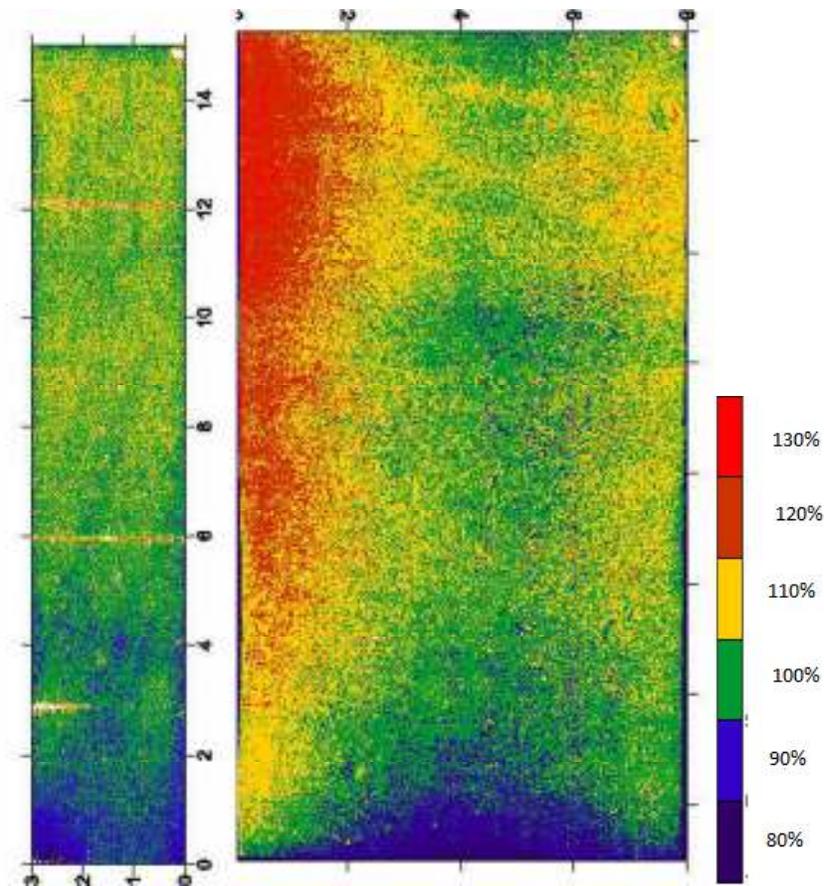


Figura 4.4.- Distribución espacial de la dosis dentro del contenedor. A la izquierda, distribución central en un ancho de 3 cm y a la derecha distribución completa dentro del cilindro. El porcentaje correspondiente al 100% representa la dosis esperada calculada a partir del tiempo de exposición con base en la tasa de dosis actual.

4.2 Irradiación de Ratones y Dosimetría a Órganos

4.2.1 Condiciones de irradiación a los ratones

Se irradiaron a cuerpo entero 20 ratones machos de la cepa Balb-C con un peso promedio de 24 g, los cuales fueron anestesiados con pentobarbital vía intraperitoneal a una dosis de 90 mg/kgw ($1.4 \mu\text{l/gw}$) adicionando 5 μl de solución salina estéril por inyección. Estos se dividieron en 4 grupos de 5 ratones (series 1 a 5) para ser irradiados a dosis de 0 (Control), 0.5, 2.5 y 4.0 Gy.

Los ratones se recogieron en el bioterio del IIB (Antigua sede) y dentro de las salas se manipularon para pesarlos e inyectarlos. Una vez sedados se trasladaron al irradiador GammaCell 1000-Elite. Ahí se colocaron en forma vertical en un cilindro de cartón con una base de madera de 3 cm y se pusieron en el centro del cilindro contenedor para ser introducidos en el irradiador como se muestra en la figura 4.5. Los ratones controles fueron sometidos anestesiados al mismo procedimiento sin ser irradiados.

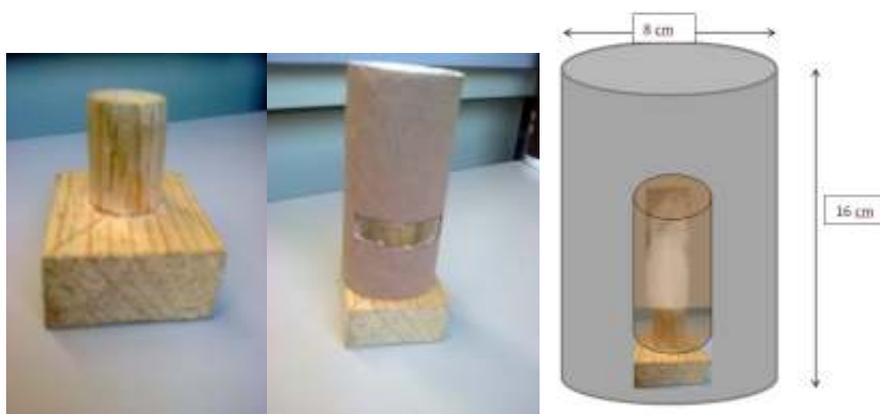


Figura 4.5.- Dispositivo para colocar en forma vertical a los ratones dentro del irradiador. A la izquierda se observa la base de madera de 3 cm de base, en el centro la manera en la que se acopla con el tubo de cartón. Por último a la derecha se observa la posición del dispositivo dentro del contenedor del Gammacell 1000-Elite simulando un ratón en su interior.

Una vez irradiados, los ratones se trasladaron al edificio del Instituto en Investigaciones Biomédicas (Laboratorio de Toxicología y Genómica Ambiental) y después de una hora de la irradiación se sacrificaron vía dislocación cervical siguiendo el protocolo de disección para principios de biología (Ward & Parsonneault). Se obtuvieron de cada ratón el cerebro, el corazón, el bazo y el intestino delgado (yeyuno) y se lavaron con solución salina estéril a 4°C.

Cada órgano se dividió simétricamente en tres partes, una de ellas se utilizó para extracción y determinación de proteínas (Nrf2) y los otros fueron congelados a una temperatura de -70°C para el análisis de cuantificación de ARNm de las proteínas Grx1, Trx1 y Nrf2. En el caso de cerebro la división se realizó conservando una porción de todas las regiones en las tres secciones.

4.2.2 Estimación de la dosis para los órganos.

Se realizaron medidas de la longitud y ancho de diferentes ratones anestesiados en posición supina considerando el origen en las extremidades inferiores del roedor. El promedio de la altura de los ratones fue de 8 cm y el ancho de 3.5 cm. De igual forma se realizaron medidas de la localización de los órganos de interés en diferentes ratones (Tabla 4.3 a). El promedio de estas medidas se utilizó para localizar al ratón dentro del contenedor del irradiador y estimar el porcentaje de dosis que recibió de acuerdo al esquema obtenido de la distribución de dosis medida con la PTR HD-810 (Tabla 4.3 b).

Tabla 4.3.- a) Posición vertical de cada órgano. b) Tabla de estimación de la dosis dentro del irradiador para cada órgano de ratón

a)

b)

| Órgano | Posición (cm) | Órgano | Posición vertical en el contenedor (cm) | Porcentaje Dosis Absorbida % |
|-----------|---------------|-----------|---|------------------------------|
| Cabeza | 7-8 | Cabeza | 10-11 | 100-105% |
| Corazón | 5-6 | Corazón | 8-9 | 100-105% |
| Bazo | 3-4 | Bazo | 6-7 | 95-100% |
| Intestino | 2-3 | Intestino | 5-6 | 90-95% |

4.3 Extracción y cuantificación de ARNm de Grx1, Trx1 Y Nrf2

Para poder determinar la cantidad de ARNm de un gen para los diferentes órganos es necesario extraer y cuantificar el ARN de los mismos, producir ADN complementando la doble cadena (ADNc) a partir del ARN y llevar a cabo una reacción específica de PCR para el gen de interés.

4.3.1 Extracción de ARN: Cuantificación, Pureza e Integridad

Se cortó un trozo pequeño de cada órgano congelado para extraer y cuantificar el ARN. El ARN se aisló utilizando el protocolo Trizol[®] Reagent, Invitrogen[®] de acuerdo al protocolo del fabricante (Apéndice A2.1).

La pureza del ARN se determina por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm (A260) y 280 nm (A280) de las muestras de ARN. El cociente A260/A280 indica la pureza del mismo y el intervalo aceptado es de 1.7 a 2.0. Este valor fue medido con un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000 con muestras de 2.5 µl de ARNm. Se utilizó agua inyectable como blanco comparativo.

Las muestras de ARN se sometieron a electroforesis durante 30 minutos a 80 V para determinar su integridad. El gel era de agarosa al 1.0% utilizando TAE 1x (del inglés: (Tris-Acetate-EDTA) como solución amortiguadora. El teñido se llevó a cabo mediante bromuro de etidio. El ARN se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260 nm tras haber sido teñido con bromuro de etidio.

La radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al bromuro de etidio, que a su vez reemite la radiación a 590 nm en la región rojo-naranja del espectro visible. Mediante un fotodocumentador (Gel Logic 200, Imaging System Kodak®), se tomaron fotografías para observar la integridad de las bandas con los coeficientes de sedimentación 18S y 28S de ARNm para descartar presencia de contaminación.

4.3.2 Síntesis de ADNc

Para poder cuantificar los niveles de ARNm se copian a ADN. La síntesis de ADN complementario (ADNc) se obtuvo utilizando como iniciador oligo dT (Promega®) y la enzima Transcriptasa Reversa M-MLV RT (Promega®) de acuerdo al protocolo descrito en el Apéndice A2.2.

4.4 PCR Cuantitativo

La amplificación del ADNc se llevó a cabo mediante la técnica PCR cuantitativo (q-PCR) (Apéndice A3.1), utilizando el kit comercial Syber®Green (Quiagen) para cuantificar la cantidad de copias de ARNm de *Trx1* y *GAPDH*, y el kit comercial Syber®Green (Kappa) para los genes *Grx1* y *Nrf2*. La tabla 4.4 muestra la secuencia de los oligonucleótidos (dirección 5' → 3') tanto en dirección "forward" o "reverse".

Se llevó a cabo una curva de calibración con una mezcla de ADNc de cerebro de todos los tratamientos utilizando seis diluciones 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125 y 1:15625 para cada gen (*Trx*, *Grx*, *Nrf2* y *GAPDH*) para verificar la eficiencia de amplificación. Todas las reacciones de q-PCR se llevaron a cabo para 20 µl (8 µl de muestra de ADNc, 1µl de Oligo F, 1µl de Oligo R y 10 µl de Mastermix de Syber® Green) por triplicado para cada muestra.

Tabla 4.4.- Secuencia de los oligonucleótidos empleados en la técnica PCR tiempo real para cada gen estudiado.

| Gen | Secuencia OLIGOS | Tamaño Amplicón (pb) | Marca |
|--------------|--|----------------------|------------|
| <i>GAPDH</i> | F 5' ACCACCAACTGCTTAGCCCC R 5' CAGCTCTGGGATGACCTTGC | 940 | Invitrogen |
| <i>Trx1</i> | F 5' CGCCAGCAACACTGTGTTAAATTCCGCCCT R 5' GGTCGGCATGCATTTGACTTCACAGTC | 160 | Invitrogen |
| <i>Grx1</i> | F 5' TGCAGSSSGACCCAAGAAATCCTCAGTCA R 5' TGGAGATTAGATCACTGCATCCGCCTATG | 190 | Sigma |
| <i>Nrf2</i> | F 5' CACCAGTGGATCCGCCAGCTA R 5' TATCCAGGGCAAGCGACTCA | | Sigma |

Las corridas de PCR cuantitativo para cada gen se realizaron con 40 ciclos de amplificación con una activación inicial de la enzima (Hold) de 15 minutos a 95°C. Cada ciclo constó de dos partes: una de 10 s a 95 °C y otra de 20 s a 60 °C siendo esta la parte de ciclo de adquisición de datos. El punto de fusión se registró en el intervalo de temperaturas de 60° a 95°C.

4.5 Extracción y Cuantificación de Proteínas

Se obtuvieron proteínas citoplásmicas y nucleares del cerebro mediante el protocolo detallado en el Apéndice A2.3. Mediante la técnica de Bradford se cuantificó la concentración de estas proteínas y finalmente se midió la concentración relativa de Nrf2 presente en las muestras tratadas respecto a los controles mediante la técnica de Western Blot (WB).

4.5.1 Método de Bradford

La cuantificación de proteínas tanto para núcleos como para citoplasma se llevó a cabo mediante la técnica de Bradford (Apéndice A3.2) con diluciones de 1:10 para núcleo y 1:80 para citoplasma. A partir de la curva estándar se cuantificó el resto de las muestras de cerebro de todos los tratamientos mediante la técnica de microplaca que emplea 10 µl por duplicado de cada muestra y 200 µl de solución filtrada de Bradford. La mezcla se lee en un espectrofotómetro y se mide la absorbancia a 595 nm.

4.5.2 Western Blot

La cuantificación de proteínas de Nrf2 se llevó a cabo mediante la técnica de Western Blot (Apéndice A3.3) llevando a cabo la electroforesis en un gel de acrilamida por 2 horas a 100 V. Se cargaron dentro del gel 30 µg de proteína para citoplasma y 40 µg para núcleo. Se empleó la técnica de electrotransferencia para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane, BIO-RAD).

Se emplearon como controles de carga las proteínas GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para la fracción citoplásmica y la proteína NPM (Núcleo Fosfomina) para la fracción nuclear.

Las membranas fueron bloqueadas con leche Blotto (non-fat dry milk, Santa Cruz) al 5% e incubadas una hora con anticuerpo primario en leche (salvo NPM que fue disuelto en BSA (albúmina de suero bovino)), posteriormente fueron incubados una hora con anticuerpo secundario en leche (Tabla 4.5) y reveladas con ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en placas. Las membranas fueron reutilizadas para diferentes proteínas eliminando los anticuerpos utilizados previamente con NaOH al 0.2 M por 15 minutos.

Las imágenes resultantes en las placas fueron adquiridas mediante el fotodocumentador (Gel Logic 200, Imaging System (Kodak®)) en imágenes en escala de grises de 16 bits. Para su análisis se realizó una densitometría de la banda referente al gen de interés con la aplicación de “análisis de geles” del software Image J (versión 1.41).

Tabla 4.5.- Marcas comerciales y diluciones empleadas con la técnica WB para las proteínas Nrf2, GAPDH, NPM y NF- κ B. También se muestran los pesos moleculares medidos en la densitometría para cada gen.

| Gen | Anticuerpo Primario (Marca) | Dilución | Peso Molecular | Anticuerpo secundario (Marca) | Dilución |
|----------------|---|-----------------|-----------------------|--|-----------------|
| Nrf2 | Anti-Nrf2, abcam #31163 | 1:2000 | 68 kDa | Goat anti-rabbit HRP-linked, Cell Signaling. | 1:3000 |
| GAPDH | Anti-GAPDH, Millipore #6c5 | 1:8000 | 36 kDa | HRP Rabbit anti-mouse, Invitrogen | 1:3000 |
| NPM | Anti- NPM, Cell Signaling Technology #3542 | 1:2000 | 38 kDa | Goat anti-rabbit HRP-linked, Cell Signaling | 1:3000 |
| NF- κ B | Anti- NF- κ B, Santa Cruz Biotechnology #109 | 1:2000 | 65 kDa | Goat anti-rabbit HRP-linked, Cell Signaling | 1:3000 |

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Cuantificación de ARNm de Trx1, Grx1 y Nrf2.

5.1.1 Aislamiento ARN

Los resultados obtenidos para el cociente de absorbancias A260/A280 medido para determinar la pureza de ARNm de las 80 muestras se presentan en la tabla 5.1 donde se muestra que todos los valores se encuentran dentro del intervalo 1.7-2.0 asegurando la pureza óptima para su uso en PCR tiempo real.

Tabla 5.1 Valores del cociente A260/A280 de ARNm de todos los tratamientos para cerebro, corazón, bazo e intestino.

| Órgano | Cerebro | | | | Corazón | | | |
|---------|---------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| Dosis | Control | 0.5 Gy | 2.5 Gy | 4.0 Gy | Control | 0.5 Gy | 2.5 Gy | 4.0 Gy |
| Serie 1 | 1.90 | 1.87 | 1.88 | 1.78 | 1.93 | 1.90 | 1.88 | 1.88 |
| Serie 2 | 1.71 | 1.86 | 1.90 | 2.00 | 1.91 | 1.56 | 1.85 | 1.76 |
| Serie 3 | 1.69 | 1.86 | 1.84 | 1.87 | 1.81 | 1.82 | 1.77 | 1.87 |
| Serie 4 | 1.95 | 1.89 | 1.80 | 1.87 | 1.90 | 1.85 | 1.85 | 1.91 |
| Serie 5 | 1.94 | 1.90 | 1.87 | 1.92 | 1.86 | 1.83 | 1.81 | 1.83 |
| Órgano | Bazo | | | | Intestino | | | |
| Dosis | Control | 0.5 Gy | 2.5 Gy | 4.0 Gy | Control | 0.5 Gy | 2.5 Gy | 4.0 Gy |
| Serie 1 | 1.75 | 1.79 | 1.85 | 1.88 | 2.00 | 1.89 | 1.92 | 1.89 |
| Serie 2 | 1.87 | 2.02 | 2.00 | 1.89 | 2.03 | 1.91 | 2.03 | 2.00 |
| Serie 3 | 1.86 | 1.87 | 1.88 | 1.88 | 1.91 | 1.90 | 1.83 | 1.97 |
| Serie 4 | 1.90 | 1.86 | 1.92 | 1.82 | 1.93 | 1.89 | 1.89 | 1.86 |
| Serie 5 | 1.93 | 1.88 | 1.91 | 1.93 | 1.88 | 1.85 | 1.74 | 1.83 |

La integridad del ARN aislado también fue verificada mediante las bandas 18S y 28S. Aquellas muestras contaminadas o carentes de ARN se sometieron nuevamente al protocolo de extracción descrito en las secciones 4.3.1 y 4.3.2 hasta observar los parámetros necesarios para su uso en PCR.

5.1.2 Curvas calibración PCR cuantitativo

Las curvas de calibración para cada gen se obtuvieron a partir de una mezcla de seis diluciones de ADNc. El umbral se determinó automáticamente con el programa Rotor Gene Q Series Software 1.7 e inmediatamente arrojó la eficiencia de la reacción. En la tabla 5.2 se muestran los valores de umbral, la ecuación del ajuste lineal para el valor umbral de ciclos (Ct) respecto a la concentración (a partir de la cual es posible obtener los valores de la eficiencia de la reacción), el valor de la pendiente, el valor de R^2 y la temperatura de desnaturalización del amplicón.

Para ser consistentes con los requerimientos del procedimiento de PCR tiempo real (Bustin, y otros, 2010) es necesario comprobar que la eficiencia de reacción es cercana a uno y que solamente se tiene un producto de amplificación. También es necesario emplear controles sin ADN llamados NTC (del inglés: No Template Control) y verificar que éstos no aumentan de señal (no amplifican) tras someterse a múltiples ciclos. A partir de la tabla 5.2 se puede corroborar que las eficiencias de reacción para todos los genes se encuentran dentro del intervalo 1.00 ± 0.05 y que el ajuste lineal se encuentra dentro de los límites requeridos con valores de R^2 cercanos a 1.

En la figura 5.2 se muestran las curvas de calibración considerando las tres repeticiones por dilución y las curvas de temperatura de desnaturalización (melting point) que asegura para cada gen, un único producto de amplificación correspondiente al gen de interés.

Para realizar el análisis de ARNm se obtuvo la cuantificación del mismo a partir del valor Ct correspondiente en la reacción propia de PCR con base en la ecuación obtenida en la curva calibración de dicho gen.

5.1.3 Cuantificación de ARNm mediante Método $\Delta\Delta Ct$.

La curva de calibración obtenida para cada gen (figura 5.2) cumple con los criterios necesarios para poder emplear la técnica $\Delta\Delta Ct$: eficiencia de reacción cercana a 1, un solo producto de amplificación y un porcentaje de diferencia entre eficiencias mayor que el 5%. Este método permite realizar una cuantificación relativa que implica comparar un ácido nucleico blanco respecto a una muestra referencia o calibrador (Livak & Schmittgen, 2001).

Se obtiene el primer ΔCt al restar los valores de Ct del control endógeno a los del blanco

(5.1)

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{blanco}}) - (Ct_{\text{endógeno}})$$

El segundo Δ se obtiene al restar el valor de ΔCt del calibrador al ΔCt al de la muestra tratada.

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{tratamiento}}) - (\Delta Ct_{\text{calibrador}}) \quad (5.2)$$

Por tanto el número de veces que un ARNm se expresa en una muestra con respecto al calibrador queda determinado por la ecuación 5.3.

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

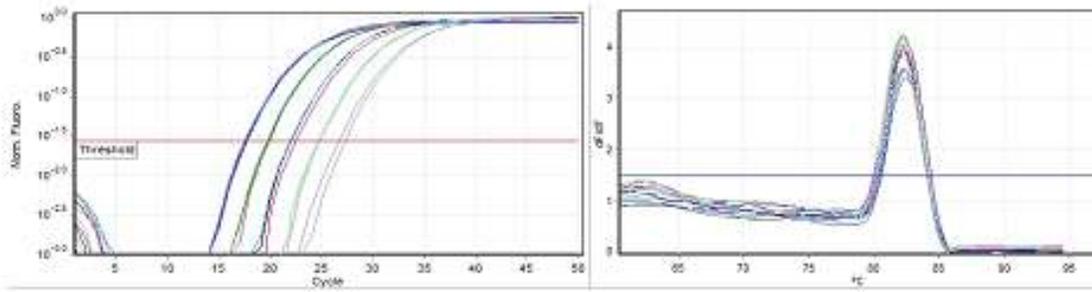
(5.3)

Tras llevar a cabo la reacción de PCR para los diferentes tratamientos en cada órgano, se utilizó el programa Rotor Gene Q para calcular el nivel de ARNm mediante el análisis por $\Delta\Delta Ct$ utilizando como Ct del gen endógeno los valores Ct de *GAPDH* y como el calibrador una mezcla de ADNc de controles de las series 1, 2 y 3.

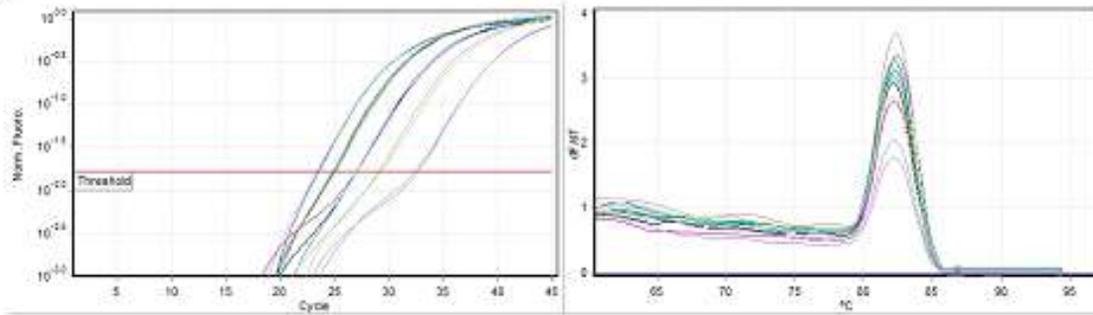
Tabla 5.2.- Datos obtenidos de las curvas de calibración de PCR tiempo real para los genes *Trx1*, *Grx1*, *Nrf2* y *GAPDH*: umbral de detección, ecuación de la curva, eficiencia de la reacción y temperatura de desnaturalización o melting point.

| Gen | <i>Trx1</i> | <i>Grx1</i> | <i>Nrf2</i> | <i>GAPDH</i> |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Umbral | 0.0276 | 0.0168 | 0.0104 | 0.045 |
| Curva Estándar | Ct = -3.405log(conc) + 15.131 | Ct = 3.23log(conc) + 20.61 | Ct = 3.34log(conc) + 17.41 | Ct = -3.28log(conc) + 12.12 |
| R ² | 0.99604 | 0.97737 | 0.99136 | 0.97956 |
| Melting Point (°C) | 82.5 | 82.5 | 83.5 | 87 |

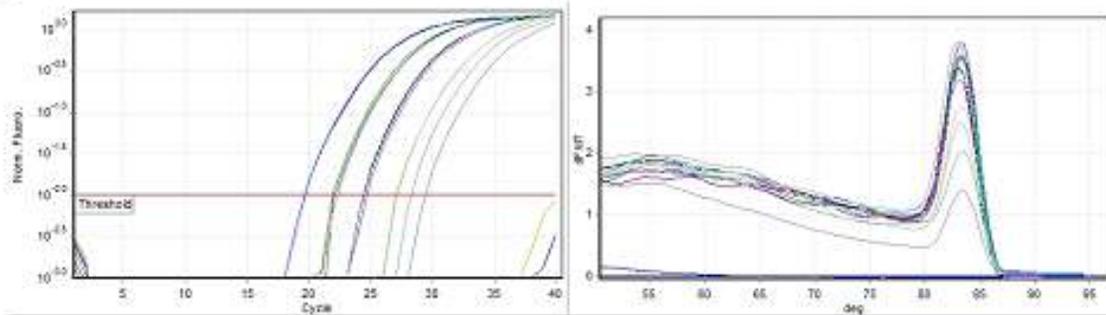
Trx1



Grx1



Nrf2



GAPDH

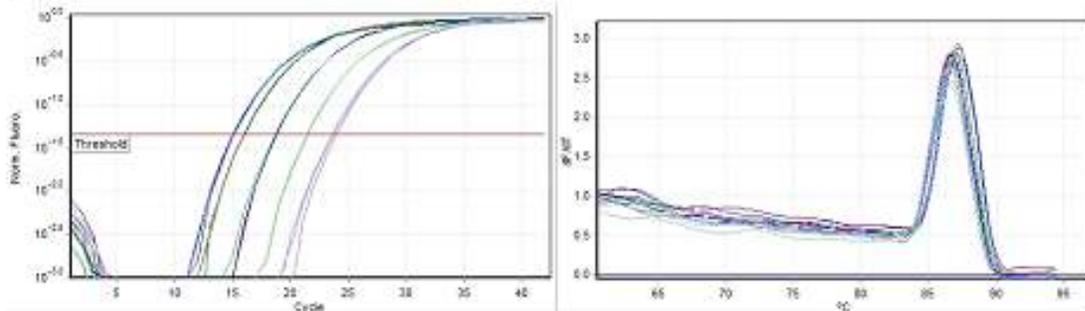


Figura 5.2) Curvas de calibración de los genes *Trx1*, *Grx1*, *Nrf2* y *GAPDH* (izquierda). A la derecha se presenta la curva de desnaturalización que muestra que sólo existe un amplicón y asegura que los NTC no están contaminados con ADN.

5.2 Niveles de expresión de ARNm de cada órgano

Los valores relativos de ARNm para cada gen se graficaron de acuerdo a la dosis recibida en comparación con el control de cada serie de ratones irradiados. Se obtuvo el promedio de estos valores y se graficó en formato de columnas junto con una desviación estándar (barras de error). Para cada gen (*Trx1*, *Grx1* y *Nrf2*) se aplicó una prueba estadística ANOVA de una vía y en caso de resultar positiva se aplicó una post prueba (Dunett) para determinar diferencias estadísticas con respecto al control. Se tomó positiva la prueba para un valor de $p < 0.05$.

5.2.1 Niveles de expresión de ARNm de Cerebro

El ARNm de *Trx1* en cerebro se mantiene prácticamente constante a través de los tratamientos con un incremento promedio máximo del 10% para la dosis de 2.44 Gy. Por otro lado la expresión del factor de transcripción *Nrf2* presenta un aumento promedio máximo en la dosis de 0.49 Gy del 30% y se mantiene constante para las dosis restantes. Finalmente los niveles correspondientes a *Grx1* muestran un incremento para la dosis de 0.49 Gy y presentan una tendencia a decrecer para las dosis siguientes (Figura 5.3).

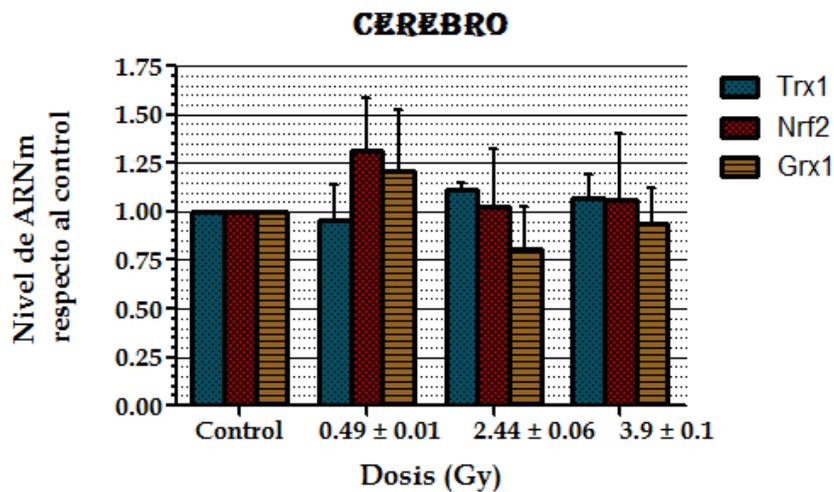


Figura 5.3) Niveles de expresión de ARNm de los genes *Trx1*, *Grx1* y *Nrf2* obtenidos mediante la técnica $\Delta\Delta Ct$ con respecto al control en cerebro para diferentes dosis de radiación.

5.2.2 Niveles de expresión de ARNm de Corazón

Las muestras de tejido de corazón se sometieron a cuantificación de ARNm solamente para la expresión de los genes *Grx1* y *Trx1*. El ARNm de ambas proteínas se mantiene constante para todas las dosis tal como se observa en la figura 5.4.

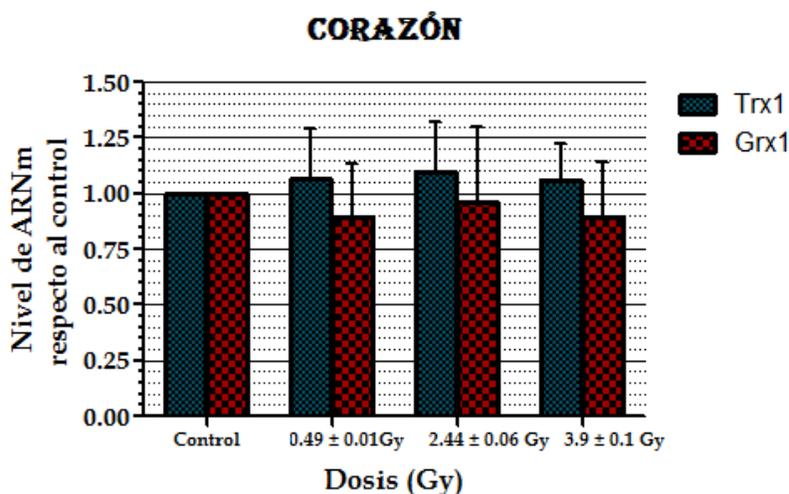


Figura 5.4) Niveles de expresión de ARNm de los genes *Trx1* y *Grx1* obtenidos mediante la técnica $\Delta\Delta C_t$ con respecto al control en corazón para diferentes dosis de radiación.

5.2.3 Niveles de expresión de ARNm de Bazo

El bazo presenta un claro aumento de los niveles de expresión de los genes antioxidantes *Trx1* y *Grx1*, e igualmente del factor de transcripción *Nrf2* para todas las dosis. El nivel de ARNm de *Trx1* es el que presenta mayor incremento (>200%) para las tres dosis de radiación obteniendo diferencias significativas respecto al control tras realizar la prueba estadística. Se obtiene un incremento similar del nivel de expresión de esta proteína para las dosis de 0.46 y 3.7 Gy ($p < 0.5$) y un mayor aumento en la dosis intermedia de 2.31 Gy ($p < 0.001$).

En el caso del factor de transcripción Nrf2, también se visualiza un incremento para las tres dosis (>30%) obteniendo una diferencia significativa con $p < 0.05$ para 2.31 Gy. Por último, la expresión de ARNm de *Grx1* presenta un ligero aumento para las dosis de 0.46 y 3.7 Gy (alrededor del 25%) y para la dosis de 2.31 Gy alrededor del 50% pero no presenta un cambio estadísticamente significativo respecto al control observándose únicamente una tendencia a aumentar la transcripción de esta proteína antioxidante para fortalecer el sistema de defensa antioxidante en conjunto con el sistema Trx.

Ya que la síntesis de Trx1 está modulada por Nrf2, podemos inferir entonces que el factor de transcripción translocó al núcleo para promover en la región ARE la síntesis de dicho gen como respuesta a los radicales libres generados en el bazo a dosis bajas, intermedias y altas. En particular, para la dosis de 2.31 Gy la síntesis de Nrf2 es evidente la forma en la que los sistemas antioxidantes se encuentran funcionando a lo máximo incluyendo sistemas alternos como el de Grx.

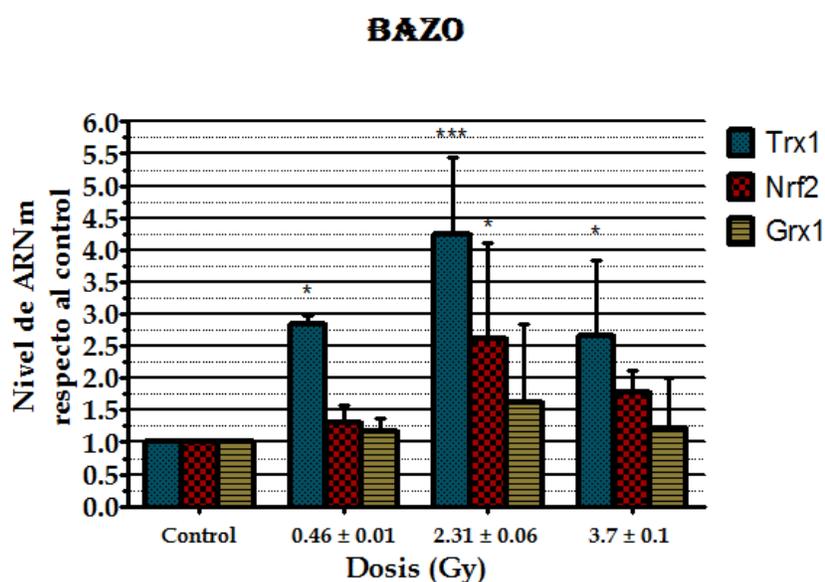


Figura 5.5) Niveles de expresión de ARNm de los genes *Trx1*, *Grx1* y *Nrf2* obtenidos mediante la técnica $\Delta\Delta Ct$ con respecto al control en bazo para diferentes dosis de radiación. *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$

5.2.4 Niveles de expresión de ARNm de Intestino

El intestino muestra un comportamiento constante de la expresión del gen *Trx1* para las tres dosis. En el caso de *Grx1* existe un incremento de su expresión conforme aumenta la dosis recibida siendo máxima para 3.5 Gy. Finalmente el gen del factor *Nrf2* muestra un decremento en su expresión respecto al nivel basal conforme aumenta la dosis de radiación recibida. En los tres genes para las tres dosis recibidas la prueba ANOVA no arrojó diferencia significativa, pero los datos sugieren una tendencia a incrementar la expresión de *Grx1* principalmente (Sistema GRX) en comparación con el sistema TRX en este órgano.

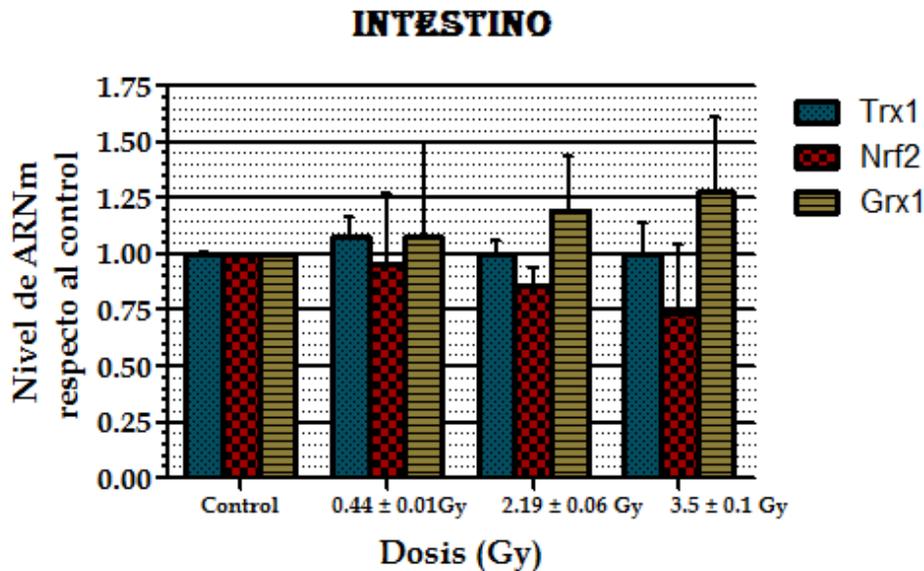
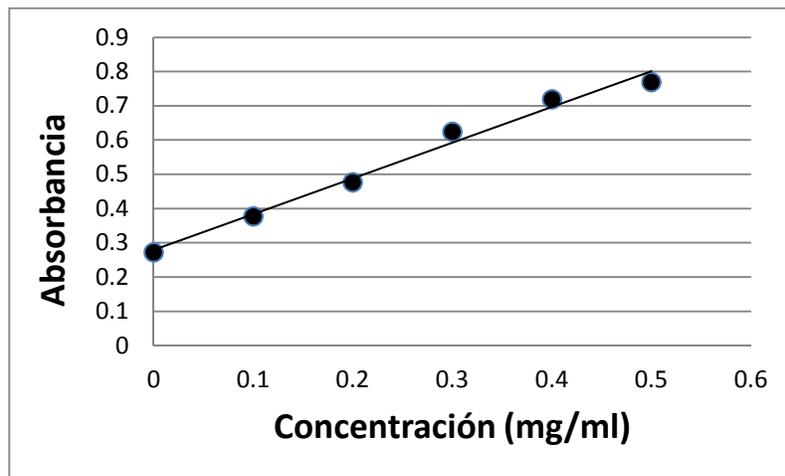


Figura 5.6) Niveles de expresión de ARNm de los genes *Trx1*, *Grx1* y *Nrf2* obtenidos mediante la técnica $\Delta\Delta Ct$ con respecto al control en intestino delgado (Yeyuno) para diferentes dosis de radiación.

5.3 Western Blot

5.3.1 Curva patrón y cuantificación de proteínas de Cerebro (Bradford)

Las muestras de proteína de cerebro fueron diluidas en 1:10 para el núcleo y 1:80 para el citoplasma a partir de la concentración inicial obtenida de la extracción de proteínas. Estas diluciones permiten tener un valor de concentración de proteínas dentro del intervalo de concentraciones de la curva estándar con el cual son cuantificadas. Se realizó dicha cuantificación a través de la técnica de Bradford mediante la curva patrón con cinco diluciones de proteína con concentración conocida (0-0.5 mg/ml) y a una longitud de onda de 595 nm. Esta curva se muestra en la figura 5.7 junto con el ajuste lineal (ecuación 5.5) entre la absorbancia medida y la concentración.



Curva patrón de proteínas para las muestras de cerebro obtenidas mediante la técnica de Bradford.

$$Absorbancia = 1.045(\text{concentración}) + 0.2785 \quad (5.5)$$

con $R^2 = 0.9857$.

Al despejar la ecuación 5.5 obtenemos la concentración (mg/ml) de proteínas como función de la absorbancia medida (ecuación 5.6). Esta relación se aplica al promedio de la absorbancia medida en las dos réplicas por muestra colocadas en la microplaca para obtener el valor de la concentración (mg/ml) de proteínas totales para las 40 muestras de cerebro (Tabla 5.3).

$$\text{Concentración} = 0.957 * \text{Absorbancia} - 0.2665 \quad (5.6)$$

A partir de los valores de la tabla 5.3 se calculó el volumen necesario para cargar el gel empleado para la técnica de Western Blot. Una vez realizado el WB y revelado las placas, éstas se escanearon para realizar un análisis de densitometría que determina la relación relativa de concentración de la proteína Nrf2 en el cerebro para las diferentes dosis de radiación gamma.

Tabla 5.3.- Valores de la concentración de cada muestra (núcleo y citoplasma) calculadas a partir de la ecuación 5.6.

| Muestras Citoplasma | Absorbancia 1 | Absorbancia 2 | Absorbancia Promedio | Concentración (mg/ml) | Muestras Núcleo | Absorbancia 1 | Absorbancia 2 | Absorbancia Promedio | Concentración (mg/ml) |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1.80 | | | | | 1.10 | | | | |
| Control 1 | 0.4334 | 0.435 | 0.4342 | 0.149 | Control1 | 0.561 | 0.556 | 0.5585 | 0.2679 |
| Control 2 | 0.4172 | 0.4224 | 0.4198 | 0.1352 | Control2 | 0.473 | 0.4705 | 0.4718 | 0.1849 |
| Control 3 | 0.5098 | 0.5001 | 0.505 | 0.2167 | Control3 | 0.5621 | 0.5514 | 0.5568 | 0.2662 |
| Control 4 | 0.4928 | 0.4872 | 0.49 | 0.2024 | Control4 | 0.6516 | 0.652 | 0.6518 | 0.3572 |
| Control 5 | 0.5183 | 0.5162 | 0.5173 | 0.2284 | Control5 | 0.5302 | 0.5456 | 0.5379 | 0.2482 |
| 0.5 Gy 1 | 0.4757 | 0.4686 | 0.4722 | 0.1853 | 0.5 Gy 1 | 0.5784 | 0.57 | 0.5742 | 0.2829 |
| 0.5 Gy 2 | 0.4827 | 0.4798 | 0.4813 | 0.194 | 0.5 Gy 2 | 0.5636 | 0.5785 | 0.5711 | 0.2799 |
| 0.5 Gy 3 | 0.5229 | 0.5213 | 0.5221 | 0.2331 | 0.5 Gy 3 | 0.5967 | 0.5883 | 0.5925 | 0.3004 |
| 0.5 Gy 4 | 0.5136 | 0.4667 | 0.4902 | 0.2025 | 0.5 Gy 4 | 0.578 | 0.5963 | 0.5872 | 0.2953 |
| 0.5 Gy 5 | 0.5152 | 0.5066 | 0.5109 | 0.2224 | 0.5 Gy 5 | 0.5621 | 0.5549 | 0.5585 | 0.2679 |
| 2.5 Gy 1 | 0.4556 | 0.4444 | 0.45 | 0.1641 | 2.5 Gy 1 | 0.4793 | 0.4721 | 0.4757 | 0.1887 |
| 2.5 Gy 2 | 0.4396 | 0.4206 | 0.4301 | 0.1451 | 2.5 Gy 2 | 0.6176 | 0.6084 | 0.613 | 0.3201 |
| 2.5 Gy 3 | 0.4959 | 0.4878 | 0.4919 | 0.2041 | 2.5 Gy 3 | 0.6327 | 0.6274 | 0.6301 | 0.3364 |
| 2.5 Gy 4 | 0.5026 | 0.4948 | 0.4987 | 0.2107 | 2.5 Gy 4 | 0.6204 | 0.632 | 0.6262 | 0.3327 |
| 2.5 Gy 5 | 0.5034 | 0.5037 | 0.5036 | 0.2153 | 2.5 Gy 5 | 0.6194 | 0.5994 | 0.6094 | 0.3166 |
| 4.0 Gy 1 | 0.2678 | 0.5376 | 0.4027 | 0.1188 | 4.0 Gy 1 | 0.6864 | 0.6989 | 0.6927 | 0.3963 |
| 4.0 Gy 2 | 0.4398 | 0.4416 | 0.4407 | 0.1552 | 4.0 Gy 2 | 0.611 | 0.6072 | 0.6091 | 0.3163 |
| 4.0 Gy 3 | 0.5062 | 0.5067 | 0.5065 | 0.2181 | 4.0 Gy 3 | 0.6305 | 0.6249 | 0.6277 | 0.3341 |
| 4.0 Gy 4 | 0.5315 | 0.537 | 0.5343 | 0.2447 | 4.0 Gy 4 | 0.6274 | 0.6154 | 0.6214 | 0.3281 |
| 4.0 Gy 5 | 0.5352 | 0.5308 | 0.533 | 0.2435 | 4.0 Gy 5 | 0.5559 | 0.5494 | 0.5527 | 0.2623 |

5.3.2 Cuantificación de la proteína Nrf2 en el núcleo y el citoplasma

El control de carga empleado para el citoplasma fue GAPDH mientras que en la fracción nuclear se utilizó NPM. Las placas escaneadas muestran en la parte citoplásmica (Figura 5.8a) una tendencia a disminuir la concentración del factor de transcripción Nrf2 conforme aumenta la dosis de radiación recibida. Por el contrario, en la fracción nuclear (figura 5.8b) se muestra una acumulación para las dosis de 2.44 y 3.9 Gy.

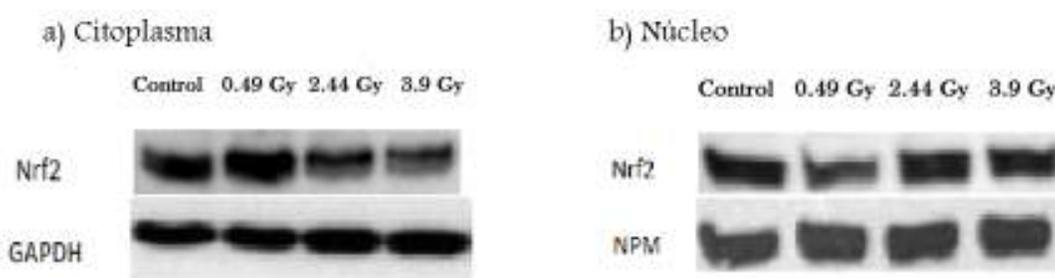


Figura 5.8) Placas escaneadas de WB para las muestras de cerebro para Nrf2 y su control de carga GAPDH (citoplasma) y NPM (núcleo). a) Muestras de citoplasma para diferentes dosis de radiación gamma. Conforme aumenta la dosis disminuye la concentración del factor de transcripción. b) Muestras de núcleo donde se observa una acumulación de Nrf2 para las dosis de 2.44 y 3.9 Gy.

La densitometría de las placas de WB para todas las muestras nucleares y citoplásmicas de cerebro se muestra en la figura 5.9. La densitometría se normalizó respecto al control de carga y para cada dosis se expresó en términos relativos al control. Los resultados se muestran en columnas que representan el promedio de las medidas y una desviación estándar. Se realizó una prueba estadística (ANOVA de una vía) y una post prueba (Dunett) para determinar las diferencias entre poblaciones.

Los resultados presentados en la figura 5.9 muestran una ligera tendencia a disminuir la concentración de Nrf2 en el citoplasma, encontrando una diferencia significativa

($p < 0.05$) en la dosis de 3.9 Gy. En cuanto al promedio encontrado en núcleo se encuentra una tendencia a aumentar para la dosis de 2.44 Gy pero no se exhibe un cambio estadísticamente significativo.

La gráfica 5.9 al estar en forma agrupada para citoplasma y núcleo, permite comparar el promedio de la concentración de Nrf2 en cada fracción celular para las diferentes dosis. En el caso de la dosis baja (0.49 Gy) la proporción global de la concentración de Nrf2 es mayor en el citoplasma mientras que para las dosis de 2.44 y 3.9 Gy existe mayor concentración del factor de transcripción en el núcleo. Sin embargo; esta comparación no exhibe la translocación de Nrf2 al núcleo debido a la radiación ionizante ya que para esto se requiere relacionar la concentración Nrf2 núcleo-citoplasma para cada individuo (Figura 5.10).

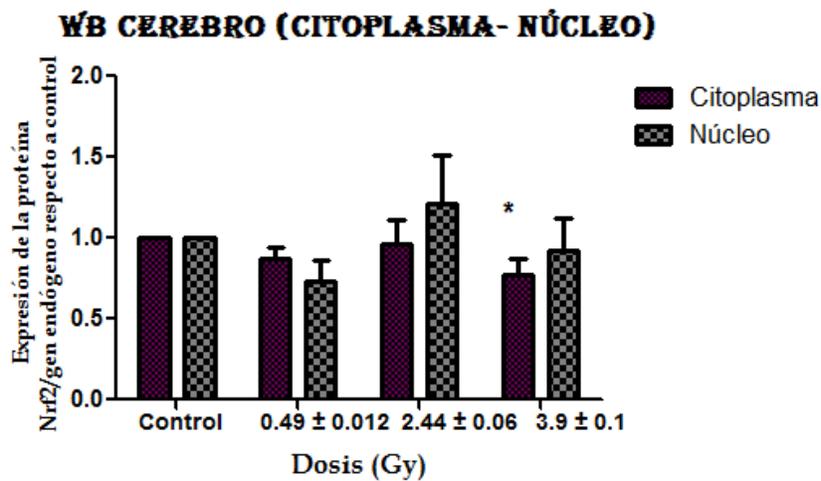


Figura 5.9) Densitometría de la proteína Nrf2 de muestras de cerebro para el citoplasma y el núcleo. En el citoplasma existe una tendencia a disminuir el factor conforme aumenta la dosis de radiación siendo significativo ($p < 0.05$) el cambio para 3.9 Gy. La dosis intermedia de radiación (2.44 Gy) muestra una acumulación del factor de transcripción Nrf2 en núcleo.

La relación de la expresión de la proteína NRF2 núcleo/citoplasma muestra la tendencia de translocación de Nrf2 del citoplasma al núcleo. En la figura 5.10 se presentan los datos de esta relación de las muestras conservadas para el análisis anterior. Los resultados se

presentan en una gráfica donde el promedio se representa con una línea horizontal. De estos datos podemos ver que para las dosis intermedias y altas se ve una tendencia de migración del factor de transcripción al núcleo como acción de defensa antioxidante para dosis intermedias y altas.

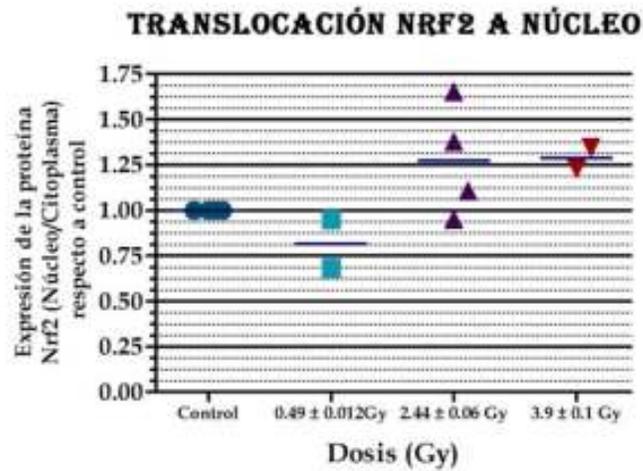


Figura 5.10) Relación de la expresión de la proteína NRF2 núcleo/citoplasma para las muestras irradiadas de cerebro. Cada punto de la gráfica representa el cociente de la concentración de Nrf2 en núcleo y citoplasma para cada animal tratado y la línea horizontal representa el promedio por grupo. El promedio obtenido para 2.44 y 3.9 Gy respecto al control sugiere la translocación de Nrf2 del citoplasma al núcleo como acción de defensa antioxidante para dosis intermedias y altas.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Para investigar la respuesta órgano específica inducida por la radiación ionizante en los sistemas TRX, GRX, y el factor de transcripción Nrf2, se irradiaron roedores machos de la cepa BALB/c a cuerpo entero en un irradiador GammaCell 1000 Elite con rayos gamma provenientes de ^{137}Cs (0.662 MeV) a 0, 0.5, 2.5 y 4 Gy consideradas dosis baja, intermedia y alta, respectivamente.

La tasa de dosis del irradiador se determinó en el centro geométrico del contenedor empleando solución Fricke y la distribución espacial de dosis se estimó con película de tinte radiocrómico (PTR HD-810) que permitió realizar la dosimetría respectiva para cada órgano de acuerdo a su localización espacial.

La transcripción de los genes de las proteínas *Trx1* y *Grx1* así como la del factor de transcripción *Nrf2* se cuantificó en cuatro órganos de interés: cerebro, corazón, bazo e intestino delgado mediante la técnica PCR cuantitativo empleando la transcripción del gen de la enzima GAPDH como control interno para el análisis semicuantitativo $\Delta\Delta C_t$.

Los resultados encontrados para el cerebro mediante PCR indican que a una hora de irradiación no existe sobre-expresión significativa de la transcripción de los genes *Trx1*, *Grx1* o *Nrf2*. Sin embargo a la dosis más baja parece haber una tendencia al aumento de la transcripción de *Nrf2* y *Grx1* como proteínas de defensa para el cerebro. A las dosis más altas *Nrf2* se mantiene constante y *Grx1* tiende a disminuir dentro del intervalo de tiempo estudiado.

Existe evidencia de que para dosis bajas de radiación (0.5 Gy), la concentración de la proteína Trx1 en el cerebro disminuye la primera hora y posteriormente aumenta a las tres horas. (Kojima y otros, 1999). Esto indicaría que la proteína Trx1 probablemente se está utilizando para censar daño en el tejido. Por ejemplo, una disminución de Trx1

promovería la activación de NF- κ B (Nuclear Factor Kappa Beta) desencadenando otras vías de respuesta temprana a la radiación como la de inflamación (Lee y otros, 2010). Ya que Trx1 aumenta a las tres horas, entonces es posible encontrar una sobre-expresión del ARNm de esta proteína en un intervalo de tiempo mayor al estudiado en este trabajo por lo menos para dosis bajas. De igual forma, siendo TRX y GRX los principales sistemas de defensa antioxidante para ROS, sería factible que éstos se activaran en un tiempo mayor que 1 hora y habría que estudiar si existe sobre-expresión de los genes *Trx1* y *Grx1* en tiempos mayores.

Por otro lado, la técnica WB de Nrf2 para cerebro muestra una tendencia de translocación de este factor al núcleo para dosis intermedias y altas. Esto indicaría que aunque la vía de Nrf2 está activa, *Trx1* no es modulado por la radiación dentro del intervalo de tiempo examinado. Así, sería conveniente estudiar otros genes modulados por Nrf2 para verificar que la vía Nrf2 efectivamente está activando otros mecanismos de defensa, o sería conveniente estudiar vías de respuesta diferentes observando otros factores de transcripción tales como NF- κ B (Lee y otros, 2010) o NGF (Nerve Growth Factor que es una neurotrofina involucrada en el desarrollo, sobrevivencia, diferenciación de neuronas sensoriales y en la respuesta antioxidante del sistema nervioso central), para el cual un estudio muestra una sobre-expresión de ARNm en el cerebro mediante PCR tiempo real para dosis de 2.5 y 4.0 Gy una hora después de la irradiación del ratón con rayos gamma (Albarrán-Ponce y otros, datos aún no publicados).

Otro punto a considerar para este órgano, es que se presupone que la respuesta a diferentes agentes tóxicos es específica para cada región. Para ratas, el estudio de las regiones hipocampo y corteza irradiadas a 3 Gy mostraron diferencias en la radioinducción de MnSOD (Super óxido dismutasa manganeso) para diferentes horas, siendo regulada por diferencias en la transcripción de la síntesis de la proteína (Todorovi y otros, 2006). Por tanto, aunque el cerebro es considerado un órgano radio-resistente, las diferentes regiones del mismo se ven perjudicadas en diferente medida y las acciones de respuesta al daño activa diferentes mecanismos, por tanto deberían ser tratadas y estudiadas en forma particular. Existe un estudio donde se demuestra que el giro dentado del hipocampo podría ser un evaluador más efectivo y sensible a radiación que la cripta

intestinal para estimar el grado de exposición a la radiación, ya que esta región del cerebro exhibe curvas de apoptosis con pendientes más altas que la del intestino, mostrando así que las regiones del cerebro poseen diferente radiosensibilidad. (Kim y otros, 2012). Ya que la técnica PCR para cerebro se realizó del tejido completo sin diferenciar la región de estudio, es posible que la falta de visualización de la activación de estos sistemas se deba al estudio no específico de regiones que nuevamente indica que, como un todo, el cerebro no es un órgano radiosensible.

Otro órgano clasificado como radiorresistente al estar conformado mayoritariamente por tejido muscular es el corazón. El estrés oxidante y la inflamación son factores que se encuentran relacionados con enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, hipertensión y falla de corazón. El aumento de los niveles de ROS que lleva al estrés oxidante en el corazón contribuye a la disfunción endotelial y contráctil, la apoptosis y la necrosis de miocitos (Ichihara, 2012). Estas especies reactivas activan diferentes factores de transcripción redox que juegan un papel importante en la fisiología y patología de las enfermedades cardiovasculares.

La exposición a la radiación ionizante produce formación de ROS y por tanto conlleva a un estado de estrés oxidante en el corazón que puede desencadenar estas enfermedades cardiovasculares a largo plazo. Los resultados obtenidos mediante PCR tiempo real revelaron que no existe sobre-expresión de ARNm de *Trx1* y *Grx1* para ninguna dosis de radiación. Esto podría indicar que los sistemas TRX y GRX no actúan como defensa del órgano ante la formación de ROS dentro de la primera hora tras la exposición a radiación. Tal parecería que las enfermedades asociadas al corazón se generan debido al constante ataque de ROS que va afectando y degenerando el tejido y su funcionalidad conforme pasa el tiempo.

Un análisis del daño debido a la RI se observó en tejido cardíaco en un modelo murino (C57BL/6) irradiado a una dosis de 3 Gy observado 5 y 24 horas tras la exposición. (Azimzadeh y otros, 2011). El análisis de las vías metabólicas indicó que inmediatamente se inducen respuestas biológicas como inflamación, defensa antioxidante y reorganización de la estructura de las proteínas. En particular, el análisis muestra que de

las proteínas sobre-reguladas, aquellas correspondientes a los procesos de oxidación-reducción exhiben un incremento del 18% a las 5 h y del 23% a las 24 h. Dentro de estas proteínas positivamente reguladas se encuentran la ferritina (proteína de captura de metales) y el glutatión S transferasa 2 (captura nucleofílica) que son proteínas moduladas por Nrf2.

A partir de esta información, es posible determinar de las proteínas sobre-expresadas encontradas previamente y de la falta de activación de los principales sistemas de defensa antioxidante (TRX y GRX) encontrada en el presente trabajo, que la función principal de defensa del corazón ante la RI no está ligada a contrarrestar el aumento de ROS sino a proteger la movilidad, integridad y correcta función del tejido muscular. Sin embargo; ya que Nrf2 se encuentra activa, es posible determinar para un trabajo posterior un intervalo de tiempo de observación y estudio de la modulación en la transcripción de genes antioxidantes como *Trx1* en el corazón tras la exposición a la radiación ionizante dentro de 4-24 h.

Contrastando los resultados obtenidos para cerebro y corazón, el presente trabajo de investigación indica que la vía de respuesta de Nrf2 y del sistema TRX forma parte de los sistemas de defensa antioxidante en el bazo ante los efectos producidos por la radiación ionizante en una fase casi inmediata. El análisis de los resultados reveló una correlación clara entre los niveles de expresión de ARNm de los genes de *Trx1* y *Nrf2* y la dosis absorbida, encontrando un aumento de dichos niveles en todos los tratamientos pero teniendo una clara diferencia de la respuesta del órgano al recibir dosis bajas, intermedias o altas.

Ya que se encontró una alta sobre-expresión del gen *Trx1* para las tres dosis recibidas y debido a que esta proteína se encuentra modulada por Nrf2, es posible que también se encuentre positivamente modulada la transcripción de genes como hemo-oxigenasa 1 (HO-1), superóxido dismutasa 3 (SOD 3), peroxirredoxina, etc. que también son regulados por este factor de transcripción (Ma, 2013) y son proteínas que mantienen el estado redox de la célula claramente afectado por la exposición del tejido a la radiación ionizante. El ARNm para Nrf2 también se encontró ligeramente sobre-expresado para la dosis baja

(0.46 Gy) y aumentado aproximadamente en un 200% para las dosis media (2.31 Gy) y alta (3.7 Gy), lo cual corrobora que ante situaciones de estrés oxidante celular, este factor tiene la capacidad de autorregularse.

En cuanto a *Grx1*, no se encontró modulada de forma alguna, manteniéndose en niveles comparables con el control. Por tanto el sistema GRX no parece estar involucrado como sistema de defensa inicial en el bazo para la exposición a la radiación ionizante (aunque podría estar modulada a tiempos mayores) y sustenta la hipótesis de que *Grx1* no se encuentra modulada por *Nrf2*.

Entonces el bazo, siendo un órgano radiosensible, posee la capacidad de disparar en gran escala sistemas de defensa antioxidante como los encontrados aquí y en otros estudios v.g. catalasa, Mn-SOD, etc. (Otsuka y otros, 2006), para contrarrestar las ROS formadas por la radiólisis del agua; sin embargo, también se demostró en el trabajo antes mencionado, que el daño al núcleo es dosis dependiente en este órgano aún para dosis bajas y tasa de dosis bajas por tanto el sistema de defensa activado no es suficiente para proteger al tejido por completo como en el resultado aquí encontrado para la dosis alta de 3.7 Gy donde los niveles de ARN mensajero de *Trx1* y *Nrf2* tienden a disminuir en comparación a los encontrados para la dosis media (2.31 Gy). Esto supondría que se ha superado ya la capacidad de neutralizar las ROS circundantes y por consiguiente se observaría un aumento en el nivel de apoptosis que depende de la dosis.

El intestino es considerado un órgano altamente radiosensible. El tracto intestinal está formado por una capa delgada de células epiteliales que se regeneran rápidamente (4-5 días) siendo el órgano más proliferativo del organismo. Esta capacidad de regeneración le sirve como barrera de defensa pero a su vez lo hace vulnerable ante la radiación.

Los sistemas redox correspondientes a tioles-disulfuros son los encargados de preservar la homeostasis de este tejido así como de mantener funciones metabólicas y la integridad de la célula. Los sistemas principales involucrados son tres: Sistema GSH/GSSG (glutatió-n-glutatió-n disulfido), Trx/TrxSS (tiorredoxina reducida y oxidada) y Cys/Cyss (cisteína-cistina) (Circu & Aw, 2011).

En este trabajo se encontró que *Trx1* no es modulada en el intestino delgado después de la exposición a rayos gamma para ninguna dosis dentro de un intervalo de tiempo corto (1 h), por lo que el conjunto TRX pudiera no estar involucrado inicialmente como sistema de defensa contra la radiación ionizante.

En cuanto a *Grx1*, se encontró una tendencia a aumentar su síntesis conforme aumenta la dosis de radiación recibida y por tanto el daño al tejido. Esto indicaría que el sistema de defensa GSH/GRX es el primero en actuar en este órgano.

El estudio del ARNm de *Nrf2* para este órgano indica que existe una tendencia a disminuir su síntesis conforme la dosis recibida es incrementada. Esto admitiría la idea de que la síntesis de la proteína del factor, que a su vez desencadenaría nuevamente la producción de genes antioxidantes, ya no es de utilidad dentro de la célula, dando así lugar a otros sistemas de defensa como GRX (que corroboran los resultados encontrados en la respuesta dosis-dependiente de *Grx1*), o dirigiéndose hacia vías metabólicas como inflamación o apoptosis. Por tanto sería de relevancia investigar si el factor de transcripción NF- κ B se encuentra aumentado en las células desencadenando vías de protección ante inflamación en el tejido y estudiar proteínas relacionadas con muerte celular o apoptosis tal como la catalasa 3.

La ley de Bergonie-Tribondeau establece la diferente respuesta de los tejidos ante RI (radiosensibilidad) en términos del daño sufrido por las células que lo componen; sin embargo, este trabajo muestra que la respuesta en términos de protección antioxidante también es diferente según la naturaleza del tejido (tejido-dependiente) y responde según la dosis recibida (nivel de daño producido).

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante PCR para los diferentes niveles de ARNm de *Trx1*, *Grx1* y *Nrf2* muestran una dependencia del tejido a la respuesta a la radiación gamma, para diferentes dosis. Esto queda manifestado al no encontrar sobre-expresión en el ARNm de las principales proteínas antioxidantes *Trx1* y *Grx1* en corazón y cerebro considerados como órganos radio-resistentes, a diferencia del bazo que mostró una clara y rápida respuesta a la radiación aumentando la expresión de ARNm de *Trx1* para las

dosis baja, intermedia y alta; sin embargo, el aumento de la expresión de Trx1 para la dosis alta parece ser menor que para la dosis de 2.31 Gy sugiriendo así que tal vez el daño al tejido ha sobrepasado la capacidad de defensa antioxidante del tejido en particular. Según la ley de Bergonié-Tribondeau, el intestino delgado es un órgano altamente radiosensible y no presentó evidencia de un aumento de los principales sistemas de defensa antioxidante a la primera hora de ser irradiado.

La concentración a nivel basal de las proteínas antioxidantes cambia respecto al tejido estudiado, debido a que los cuatro órganos estudiados están formados por diferentes tipos de células que les confieren una respuesta diferente. El nivel de Trx1 basal es mayor en riñón, seguido de pulmón, hígado, bazo, corazón y en menor medida el cerebro. En cuanto a Grx1 la concentración en forma descendente lo conforman riñón, hígado, bazo, corazón, cerebro y pulmón. (Jurado, Prieto-Álamo, Madrid-Rísquez, & Pueyo, 2003).

El nivel basal de transcripción de los genes *Trx1* y *Grx1* para los órganos estudiados es mayor en bazo respecto a corazón y cerebro, y puesto que en condiciones sin estrés oxidante los diferentes tejidos poseen sistemas preferenciales de defensa antioxidante para los niveles de ROS producidos durante la respiración celular y el metabolismo, es posible especular que las proteínas antioxidantes más abundantes sean las principalmente activadas para situaciones de estrés oxidante. Tal sería el caso del bazo donde el sistema TRX funciona como defensa al registrar un evidente aumento en la transcripción de la proteína Trx1 en todas las dosis. El corazón posee niveles bajos de estas proteínas ya que la contractibilidad adecuada del músculo es primordial para este tejido sobre la protección inmediata de las ROS formadas por RI. En el caso del intestino el primer sistema en activarse parece ser el de GRX/GSH sobre el sistema TRX y la vía de respuesta Nrf2.

Finalmente se puede decir que el modelo señal-detector-activador- respuesta propuesto en la sección 3.3 nos sirve para explicar los resultados obtenidos en este trabajo mediante la técnica PCR semicuantitativo para el bazo tal como se muestra en la figura 6.1. La formación del radical OH• tras la radiólisis de agua sirve como disparador de la señal dentro de la célula, la unión de las moléculas Keap-1 y Nrf2 funciona como un

transductor de la señal recibida dando lugar a la translocación de Nrf2 al núcleo siendo éste el activador de la sobre-expresión del gen antioxidante Trx1 y del mismo Nrf2 (respuesta).

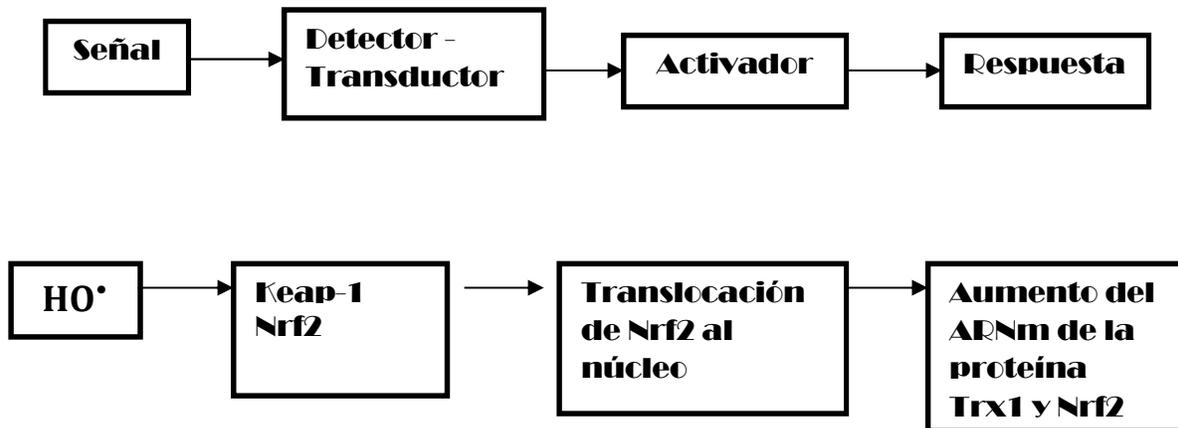


Figura 6.1) Modelo señal-detector-activador-respuesta ajustado a los resultados obtenidos para bazo.

En el caso de cerebro, donde se pudo aplicar la técnica de Western Blot para analizar la translocación de Nrf2 a núcleo, se observó que algunas muestras presentan un aumento de la concentración de la proteína en núcleo corroborando que la vía Nrf2 también está activa dentro de algunas regiones del cerebro, tal vez junto con otras vías de señalización que actúan simultáneamente dentro de la célula pero validando también el modelo propuesto dentro del intervalo de tiempo estudiado dentro del presente trabajo.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- a) Debido a que no observamos la modulación de las principales proteínas de defensa en cerebro y corazón, sería conveniente estudiar la expresión de las proteínas Trx1 y Grx1 en un curso temporal a partir de 1 h, incluyendo a otros factores de transcripción diferentes de Nrf2 como NF- κ B, etc. en cerebro y para corazón otras proteínas moduladas por Nrf2.
- b) Asimismo sería importante aumentar el número de animales estudiados ya que en el caso de bazo e intestino por ejemplo, se observó una tendencia al aumento de los niveles de ARNm de *Grx1*.
- c) El curso temporal serviría para verificar la respuesta temprana en bazo y observar su duración, ya que comprobamos la activación de Nrf2 una hora después de la irradiación. Asimismo se podría investigar los cambios de expresión de otras enzimas antioxidantes como peroxirredoxina (Prx1), hemo-oxigenasa (HO-1), gamma-glutamyl-cistein-sintetasa (γ GCS) para investigar si éstas también están presentes para defender el órgano ante la exposición de RI.
- d) Para el intestino, sería de interés estudiar proteínas relacionadas con apoptosis como la activación de la Caspasa 3 para identificar muerte celular y corroborar lo encontrado con la falta de activación de sistemas de defensa. De igual forma, un estudio del factor de transcripción NF- κ B brindaría información de la respuesta inflamatoria del órgano ante RI.

APÉNDICES

A1 Fundamento físico de dosímetros

A1.1 Dosímetro Fricke (Attix, 1986)

El dosímetro Fricke de sulfato ferroso es un dosímetro absoluto químico para las aplicaciones de dosis en el rango de 40 a 400 Gy. Así un cambio químico dentro de la solución permite medir la dosis promedio absorbida. Está basado en el cambio de valencia (oxidación, $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) que se produce en una solución ácida de sal ferrosa por acción de la radiación ionizante. La cantidad de ion férrico (Fe^{3+}) producido es proporcional a la dosis de radiación recibida por la muestra.

La espectroscopía de absorción empleada para medir el cambio de longitud producido requiere una muestra pequeña ($\sim 1 \text{ cm}^3$) donde una celda de absorción de 1 cm de trayectoria es utilizada a una longitud de onda de 304 nm en una cámara de temperatura constante.

Por tanto, la medida del cambio en densidad óptica de la muestra irradiada respecto a la no irradiada nos permite conocer la dosis absorbida en la solución mediante la fórmula A.1.1:

$$\bar{D} = 278\Delta(DO)Gy \quad (A.1.1)$$

A2.2 Películas de tinte radiocrómico (PTR) (Attix, 1986)

Las películas de tinte radiocrómico al estar compuestas por un monómero de diacetileno que posee la propiedad de polimerizarse si es expuesto a un niveles altos de energía (en este caso a radiación ionizante), presentan un cambio de color ya que la sustancia activa de la película es un gel de cristales.

La respuesta de las películas a la radiación ionizantes está definida como el cambio en su densidad óptica (DO), leída a una longitud de onda específica. Si se comparan respuestas de películas de diferentes espesores éstas deben normalizarse por su espesor.

Cuando se mide el cambio en la densidad óptica con un espectrofotómetro o densitómetro, la respuesta está definida como:

$$R = (DO_i - DO_{si}) \quad (\text{A.2.1})$$

Donde DO_i y DO_{si} son las densidades ópticas de la película irradiada y sin irradiar respectivamente.

Cuando se digitaliza la imagen con un escáner de cama plana, la respuesta se define en términos de tono de gris (cuando se digitaliza en blanco y negro) y en tonos de color (cuando se digitaliza en color) y la imagen se descompone en los tres colores componente (rojo, verde y azul, RGB por sus siglas en inglés).

Para los tonos de color se tiene:

$$R = \log(TC_{si} - TC_i) \quad (\text{A.2.2})$$

Donde TC_{si} y TC_i es el tono de color de la película sin irradiar e irradiada respectivamente.

A2 Protocolos empleados en laboratorio

A2.1 Protocolo de extracción de ARN Invitrogen ®

Este procedimiento consta de cinco pasos para su extracción:

- a) Homogenización: Se homogenizan las muestras de tejido en 1ml de Trizol ® Reagent. Se incuban las muestras homogenadas por 5 minutos a 15-30 °C y se remueve el material insoluble del homogenado después de centrifugarlas a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C.
- b) Separación de fase: Se añaden 0.2 ml de cloroformo e incuban por 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugan a 12000 x g por 15 minutos.
- c) Precipitación de ARN: El ARN es precipitado mezclándolo con 0.5 ml de alcohol isopropileno. Se incuban las muestras a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugan a 12000 x g por 10 minutos.
- d) Lavado de ARN: Se remueve el sobrenadante y se lava el pellet de ARN con 1 ml de etanol al 75%. Finalmente se centrifuga a 7500 x g por 5 minutos.

A2.2 Protocolo de síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc a partir de ARN se realiza de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Se realiza una mezcla de 1 µl de oligo (dT), 1 µg de ARN y H₂O inyectable para llevar a un volumen de 15 µl.

- b) La mezcla se calienta a 67 °C por 5 minutos para su desnaturalización y rápidamente se colocan en hielo para evitar que se formen estructuras secundarias.
- c) Se añade una mezcla de 5 µl de buffer de primera cadena (5x), 1 µl de dNTP (10 mM)+1 µl de enzima retrotranscriptasa a cada muestra.
- d) Se incuban las muestras 50 minutos a 37 °C para llevar a cabo la síntesis y posteriormente 10 minutos a 70 °C para la correcta desnaturalización de la enzima. Las muestras se diluyen hasta 40 µl y el ADNc se guarda a una temperatura de -20 °C.

A2.3 Protocolo de extracción de proteínas nucleares y citoplásmicas.

Las células de las muestras recién disectadas son homogenizadas en buffer A (10mM HEPES (pH7.9), 10mM KCl, 10mM EDTA, 1mM DTT, 0.4% v/v IGEPAL, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF y 10 mg/ml aprotinina y leupeptina) por 10 min en hielo. Se centrifugan por 15 min a 4000 x g. Las fracciones sobrenadantes (proteínas citoplásmicas solubles) son colectadas y almacenadas en congelación a -70°C.

El pellet nuclear se lava con buffer A y se centrifuga a 5000 x g por 5 minutos (4°C). Posteriormente se homogeniza en buffer C (20mM HEPES (pH7.9), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 5% v/v glicerol, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, 1mM PMSF y 10 mg/ml aprotinina y leupeptina). Los lisados deben ser incubados en hielo por dos horas y centrifugados a 20000 x g por 10 min (4°C).

A3 Técnicas de laboratorio

A3.1 PCR Cuantitativo (Walker, 2001)

La técnica PCR (Polimerase Chain Reaction) es un método *in-vitro* de la síntesis de ADN que permite que un segmento particular de ADN sea copiado y amplificado. La muestra de ADN es desnaturalizada con alta temperatura. La temperatura es disminuida y dos primers de oligonucleótidos que rodean el fragmento de ADN que se requiere amplificar son alineados a las secuencias complementarias en los extremos opuestos de la secuencia blanco. Mediante una solución con polimerasa ADN, la temperatura se incrementa ligeramente para activarla y la doble cadena de ADN desalineadas, los primers son extendidos y la región entre ellos sintetizada. Las cadenas son de nuevo desnaturalizadas y el proceso repetido entre 20 y 50 veces siendo así amplificado el segmento de ADN necesitado.

La modificación de la PCR convencional en un sistema de cuantificación en tiempo real aprovecha la combinación de tecnologías de fluorescencia (reactivo SYBR Green) y amplificación en ciclos rápidos. Durante la reacción de la PCR la cantidad de producto aumenta de forma exponencial únicamente en unos pocos ciclos de amplificación, y es durante esta fase logarítmica lineal del proceso cuando la cuantificación de los productos es más precisa.

En la fase final de la reacción la cuantificación del producto acumulado no permite realizar valoraciones concluyentes de las concentraciones de partida. El monitoreo de la reacción de PCR se realiza añadiendo al amortiguador de reacción el colorante SYBR Green, que emite su máximo de fluorescencia cuando se encuentra unido al ADN de doble cadena.

El SYBR Green se une al ADN a través del surco menor de la doble hélice. Durante las distintas fases de la PCR se detectan diferentes intensidades de fluorescencia dependiendo de la cantidad de ADN de doble cadena que está presente en la mezcla de reacción. Después de la desnaturalización, el ADN es de banda simple y el SYBR Green no se encuentra unido al mismo siendo baja la intensidad de la fluorescencia detectable.

Durante la hibridación de los "primers", se producen pequeños fragmentos de ADN de doble cadena en las secuencias reconocidas por "primers", con el consiguiente aumento de la intensidad de la señal fluorescente. En la fase de elongación aumenta paulatinamente la cantidad de ADN de doble cadena de nueva síntesis, incrementándose la fluorescencia cuantificable. El seguimiento ciclo a ciclo del proceso, permite la valoración cuando el producto se duplica en cada ciclo, dando lugar a la fase logarítmica lineal. El inicio de la fase se produce a partir de n determinado número de ciclos, lo que dependerá directamente de la cantidad inicial de molde.

El seguimiento del proceso permite observar la cinética de desnaturalización de la población de los ADN de doble cadena, ya que el SYBR Green es liberado del ADN produciéndose un descenso paulatino de la fluorescencia. Esto nos permite conocer la homogeneidad de la población de ADN generados durante la reacción y la temperatura de desnaturalización.

El "*baseline*" o línea base son los ciclos iniciales de la PCR en donde el cambio en la señal de fluorescencia es mínimo. Para efectuar los ensayos de cuantificación, dentro de la fase geométrica es necesario definir el punto de intensidad de fluorescencia o umbral de detección (Threshold), en el cual todas las muestras pueden ser comparadas entre sí. Este umbral de detección se establece basándose en la fluorescencia del fondo y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de emisión de la línea base.

Al ciclo en el cual cada muestra consigue llegar a este umbral de detección, se le conoce como Ct (threshold cycle, ciclo de umbral de detección). De esta forma, el Ct es el número fraccional que indica cuantos ciclos le tomó a cada muestra generar una cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección.

A3.2 Técnica de Bradford (Bradford, 1976)

El método de ensayo para proteínas de Bradford es un procedimiento para la determinación de proteínas solubles que se basa en el cambio diferencial de color de un colorante ácido en respuesta a varias concentraciones de proteína. El colorante empleado es el azul brillante de Coomassie® (G-250) el cual presenta el cambio de color de café-rojizo (465 nm) a azul (595 nm) indicando la unión de la proteína al colorante. El colorante se enlaza principalmente a residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la Arginina

El coeficiente de extinción del complejo Albúmina-colorante en solución es constante por encima hasta de un intervalo de concentraciones de 10 veces. Con ello, la ley de Beer's puede ser aplicada para la cuantificación precisa de la proteína por la selección de un apropiado volumen del colorante y la concentración de la muestra.

La concentración de proteína se expresa como mg/ml de proteína total. A partir de las absorbancias de la microplaca (Figura A3.2), se grafican los datos de absorbancia de la curva estándar y se calcula la ecuación de la curva

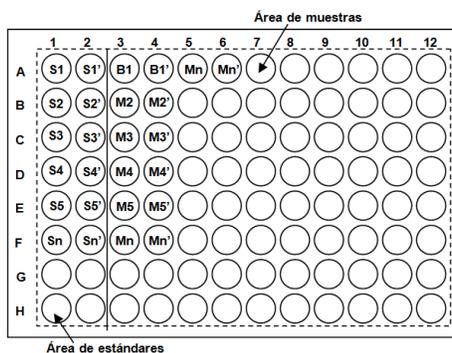


Figura A3.2) Disposición de los estándares de la curva y de las muestras en la microplaca. S: estándares; B: blanco; M: muestras.

A3.3 Técnica Western Blot (WB) (Barker, 1998)

Este procedimiento hace uso de técnicas electroforéticas e inmunoquímicas para identificar una proteína específica en una mezcla compleja y además determinar la cantidad relativa de ésta en una preparación biológica y estimar su peso molecular.

La figura A3.3 ilustra el procedimiento de la técnica WB:

- 1) Las muestras a estudiar son sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil-sulfato-sodio (SDS-PAGE). SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga negativa. Si se corre en condiciones desnaturalizantes, la carga no es un factor determinante y la migración sólo depende del peso molecular de la proteína.
- 2) El gel es una matriz delgada que dificulta su manejo dentro del laboratorio o incubación, por tanto las proteínas separadas se transfieren a un pedazo de membrana de nylon o nitrocelulosa. La transferencia electroforética requiere una fuente de poder de voltaje con gran amperaje, ya que utiliza la corriente para mover las moléculas del gel en dirección del ánodo hacia la membrana.

- 3) Los sitios activos dentro de la membrana son boqueados para prevenir uniones no específicas de los anticuerpos en la membrana lo cual se logra al incubarla en soluciones con alta concentración de proteínas.
- 4) La membrana se incuba en un anticuerpo primario (antígeno y anticuerpo).
- 5) Posteriormente se incuba con un anticuerpo secundario.
- 6) El inmuno-complejo puede ser visualizado con procedimientos apropiados como fluorescencia.

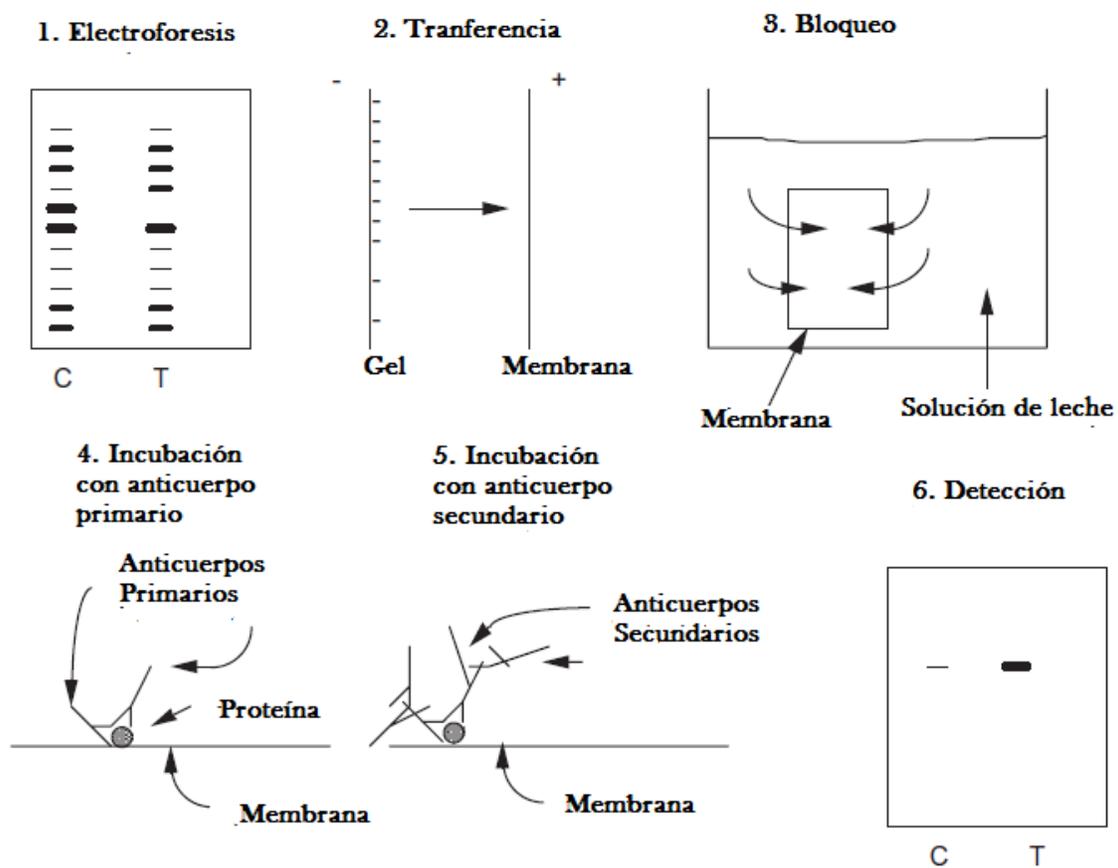


Figura A3.3 Diagrama que representa el procedimiento de la técnica Western Blot

Bibliografía

- Albarrán-Ponce, L. A., Fajardo-Miranda, R. M., I. G. d., Valdovinos-Flores, C., Vázquez-Vázquez, M. A., & Gonsebatt, M. E. (datos aún no publicados). Modulation of Nerve Growth Factor expression by ionizing radiation in mouse tissues.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the cell*. EUA: Garland Science.
- Attix, F. (1986). *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. USA: John Wiley & Sons.
- Azimzadeh, O., Scherthan, H., Sarioglu, H., Barjaktarovic, Z., Conrad, M., Vogt, A., Tapio, S. (2011). Rapid proteomic remodeling of cardiac tissue caused by total body ionizing radiation. *Proteomics*, 3299–3311.
- Barker, K. (1998). *At the bench. A laboratory navigator*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bradford, M. (1976). A Rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brandan, M. E., Díaz-Perchez, R., & Ostrosky, P. (1990). *La Radiación al Servicio de la Vida*. México: La ciencia desde México.
- Bustin, S. A., Beaulieu, J.-F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S., Olsvik, P. A., Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11(74).
- Byun, S., & Cho, W. (2005). Thioredoxin overexpression in HT-1080 cells induced cellular senescence and sensitization to gamma radiation. *579*, 4055–4062.

- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2011). Redox biology of the intestine. *Free Radical Research*, *45*, 1245–1266.
- Deneke, S. L., & Fanburg, L. (1989). Regulation of cellular glutathione. *The American Journal of Physiology*, 163–173.
- Hall, E. (1982). *Radiobiology for the radiologist*. USA: Lippincott-Raven.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2000). *Free radicals in biology and medicine* (3era ed.). USA: Oxford.
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., & Yodoi, J. (1999). Distinct roles of Thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A Two step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*, *274*, 27891–27897.
- Holgren, A. (1989). Thioredoxin and Glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry*, *264*, 3963–3966.
- Ichihara, S. (2012). The Pathological roles of environmental and redox stresses In Cardiovascular Diseases. *Environmental Health and Preventive Medicine*.
- Jeung, H., Jiyoung, K., & Jinsil, S. (2004). Redox signaling by ionization radiation in mouse Liver. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1030*, 86–94.
- Jurado, J., Prieto-Álamo, M.-J., Madrid-Risquez, J., & Pueyo, C. (2003). Absolute gene expression patterns of Thioredoxin and Glutaredoxin redox systems in mouse. *The Journal Of Biological Chemistry*, *278*(46), 45546–45554.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (marzo de 2001). DNA Double-Strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, *27*.

- Kim, J. S., Yang, M., J. Kim², D. L., Kim, J. C., Shin, T., Kim, S. H., & Moon, C. (2012). Comparison of the dose–response relationship of radiation–induced apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and intestinal crypt of adult mice. *Radiation Protection Dosimetry*, *198*, 492–497.
- Kim, Y., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Itoh, K., Yamamoto, M., & Yodoi, J. (2001). Hemin–Induced Activation of the Thioredoxin Gen by Nrf2. A Differential Regulation of the Antioxidant Responsive Element by a Switch of its Binding Factors. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 18399–18406.
- Koháryová, M., & Kollárová, M. (2008). Oxidative stress and thioredoxin system. *General Physiology and Biophysics*, *27*, 71–84.
- Kojima, S., Matsuki, O., Nomura, T., Yamaoka, K., Takahashi, M., & Niki, E. (1999). Elevation of antioxidant potency in the brain of mice by low–dose ray irradiation and its effect on 1–Methyl–4–Phenyl–1,2,3,6–Tetrahydropyridine (MPTP)–induced brain damage. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*, 388–395.
- Königsberg, M. (2007). La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, *26*, 18–25.
- Lee, W. J., Majumder, Z. R., Jeoung, D. I., Lee, H. J., Kim, S. H., Bae, S., & Lee, Y. S. (2006). Organ–specific gene expressions in C57BL/6 mice after exposure to low–dose radiation. *Radiation Research*, *165*, 562–569.
- Lee, W. J., Sonntag, W. E., Mitschelen, M., Yan, H. & Lee, Y.W. (2010). Irradiation induces regionally specific alterations in pro–inflammatory environments in rat brain. *International Journal of Radiation Biology*, *86*(2), 132–144.
- Limón–Pacheco, J., & Gonsébat, M. (2009). The Role of Antioxidants and Antioxidants Related Enzymes in Protective Responses to Environmentally Induced Oxidative Stress. *Mutation Research*, *674*, 137–147.

- Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, *25*, 402–408.
- Lu, S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3143–3153.
- Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I., & Grant, C. (1998). The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell*, *9*, 1081–1091.
- Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress. *Annual Review of Pharmacology Toxicology*, *53*, 401–426.
- Maher, J., & Yamamoto, M. (2010). The rise of antioxidant signaling. The evolution and hormetic actions of Nrf2. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *244*, 4–15.
- Mikkelsen, R., & Wardman, P. (2003). Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*, *22*, 5734–5754.
- Nguyen, T., Pickett, C., & Nioi, P. (2009). The Nrf2–antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *284*, 13291–13295.
- Nguyen, T., Sherrat, P. J., Nioi, P., Yang, C. S., & Pickett, C. B. (2005). Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *Journal of Biological Chemistry*, *280*, 3285–3292.
- Nguyen, T., Sherrat, P., Huang, H., & Pickett, C. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. *Journal of Biological Chemistry*, *278*, 4536–4541.

- Niroomand-Rad, A., Blackwell, C. R., Coursey, B., Gall, K. P., Galvin, J. M., McLaughlin, W. L., Soares, C. G. (1998). Radiochromic film dosimetry: Recommendations of AAPM Radiation Therapy Committee Task Group 55. *Medical Physics*, 25(11), 2094-2115.
- Nordberg, J., & Årner, E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian Thioredoxin. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 1287-1312.
- Otsuka, K., Koana, T., Tauchi, H., & Sakai, K. (2006). Activation of antioxidative enzymes induced by low-dose rate whole-body irradiation. Adaptive response in terms of initial DNA damage. *Radiation Research*, 166, 474-478.
- Roberfroid, M. (1995). *Free radicals and oxidation phenomena in biological systems*. USA: Marcel Dekker Inc.
- Saitoh, H., Nishitoh, H., Fujii, M., K.Takeda, Tobiurne, K., Sawada, Y., H.Ichijo. (1998). Mammalian Thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal regulating kinase ASK-1. *EMBO Journal*, 17, 2596-2606.
- Song, J. J., & Lee, Y. J. (2003). Differential role of glutaredoxin and thioredoxin in metabolic oxidative stress-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochemical Journal*, 373, 845-853.
- Song, J., Rhee, J., Suntharalingam, M., Walsh, S., Spitz, D., & Lee, Y. (2002). Role of Glutaredoxin in metabolic oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46566-46575.
- Stewart, D., Killen, E., Naquin, R., Alam, S., & Alam, J. (2003). Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *Journal of Biological Chemistry*, 28, 2396-2402.

Todorovi, A., Peji, S., Kasapovi, J., Stojiljkovi, V., Pajovi, S., & Kanazir, D. (2006). Regional differences in antioxidative response of rat brain after cranial irradiation. *Acta Physiologica Hungarica*, 93, 341-346.

Ueno, M., Masutani, H., R.J. A., Yamauchi, A., K.Hirota, T.Sakai, Nikaido, T. (1999). Thioredoxin-dependent redox regulation of p53 mediated p21 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 35809-35815.

Walker, N. J. (2001). Real-time and quantitative PCR: Applications to mechanism-based toxicology. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15(3), 121-127.

Ward, J., & Parsonault, E. (s.f.). Obtenido de <http://biology.about.com/gi/dynamic/offsite.htm>