



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)
FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS DE DOSIS BAJAS DE RADIACIÓN IONIZANTE EN LA PRODUCCIÓN
DE MICRONÚCLEOS EN SANGRE COMPLETA Y LINFOCITOS AISLADOS

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

PRESENTA:
JORGE ARTURO HERNÁNDEZ PULIDO

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBRO COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA ESTER BRANDAN SIQUÉS
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

MIEMBRO COMITÉ TUTOR
DR. LUIS BENÍTEZ BRIBIESCA
MAESTRÍA EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)

MÉXICO, D. F. OCTUBRE 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

Está bien documentado que la mayoría de las exposiciones a radiación ionizante (RI) que sufren los seres humanos son a dosis bajas (≤ 200 mGy), sin embargo, la información en la literatura sobre los efectos biológicos a estas dosis es limitada.

En el presente trabajo de tesis se expusieron sangre completa y linfocitos aislados de sangre periférica a dosis bajas de RI producidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ con el objetivo de determinar si dichas dosis producen un incremento en el número de micronúcleos (MN), determinado mediante la prueba de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

En el capítulo 1 se presentan las características de la RI, el decaimiento radiactivo y la interacción de la RI con la materia. En el capítulo 2 se describe a la célula eucariota y los riesgos de la exposición a RI.

En el capítulo 4 se presentan los criterios para evaluar células mediante el ensayo de MN, así como los criterios para determinar los MN.

En el capítulo 7 de materiales y métodos se describe el irradiador de muestras biológicas utilizado en los experimentos y la metodología de la aplicación del ensayo de MN, tanto para las muestras con sangre completa, como para las muestras con linfocitos aislados.

En el capítulo 8 se presentan los resultados experimentales y una comparación entre los resultados de los experimentos con sangre completa y los experimentos con linfocitos aislados. La discusión y las conclusiones se presentan en los capítulos 9 y 10 respectivamente.

Abstract

It is well documented that most exposure to ionizing radiation (IR) that humans are suffering from low dose (≤ 200 mGy) , however , information in the literature regarding the biological effects at these doses is limited.

In the present thesis were exposed whole blood and peripheral blood lymphocytes to low doses of RI produced by a source of $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ order to determine whether these doses produce an increase in the number of micronucleus (MN), determined by the micronucleus assay by blocking cytokinesis.

Chapter 1 presents the characteristics of the IR, the radioactive decay and the interaction of the IR with matter. Chapter 2 describes the eukaryotic cell and the risks of exposure to the IR.

Chapter 4 presents criteria for evaluating cells by micronucleus assay, and the criteria for determining the MN.

Chapter 7 of materials and methods, the irradiator of biological samples used in the experiments is described; the methodology of applying MN assay for whole blood samples and the samples with lymphocytes isolated is also described.

In Chapter 8 presents experimental results and a comparison between the results of experiments with whole blood and lymphocytes isolated experiments. The discussion and conclusions are presented in Chapters 9 and 10 respectively.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme las puertas y darme la oportunidad de crecer personal y profesionalmente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Instituto de Física por permitirme utilizar sus instalaciones y equipos que hicieron posible el desarrollo de este proyecto de tesis.

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

Esta tesis recibió financiamiento del CONACYT y de DGAPA-PAPIIT (UNAM).

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Ostrosky agradezco profundamente haberme aceptado en su laboratorio, ser mi tutora principal y todas las valiosas enseñanzas durante el tiempo que estuve realizando el proyecto de tesis.

A la Dra. María Ester Brandan por el constante apoyo, sus excelentes clases y su disponibilidad en todo momento.

Al Dr. Luis Benítez por ser parte de mi comité tutorial, por su disposición sus comentarios y sus observaciones.

A la Q.F.B. Moserrat Sordo por la asesoría técnica brindada para la realización de esta tesis. Gracias por sus consejos, su amabilidad y su apoyo incondicional.

A la Dra. Ana María Salazar por haberme enseñado a desarrollar las técnicas experimentales y a trabajar en el laboratorio. Gracias por sus consejos, su amabilidad y su apoyo incondicional.

A la M. en C. Ana Elena Buenfil por su apoyo y consejos para llevar a cabo la dosimetría.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A mis amigos Rodrigo Espartaco, Aztlán y Juan por su disponibilidad para apoyarme con las muestras para la realización de mis experimentos. Estoy eternamente agradecido con ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, por brindarme su apoyo y ensañarme un poco de todo. Gracias Monse, Ani, Juan, Tere, Sonia, Ana y Pablo.

A mis amigos Espartaco, Aztlán, Nini, Dey, María, Toño y Elena por todos los buenos momentos que pasamos juntos.

INDICE

Capítulo 1. Radiación ionizante

Radiación ionizante	1
Radiactividad y decaimiento radiactivo.....	2
Decaimiento alfa	3
Decaimiento beta.....	4
Conversión interna.....	6
Ley del decaimiento radiactivo.....	6
Interacción de la RI con la materia.	8
Interacción de partículas cargadas	9
Partículas cargadas pesadas (PCP).....	9
Partículas cargadas ligeras (electrones).....	9
Poder de frenado y LET	10
Alcance.....	12
Dosis y dosis equivalente.	13
Dosimetría.....	14
Dosímetros TLD.....	14

Capítulo 2. ADN

La célula	17
Ciclo celular.....	19
Daño al ADN por RI.....	20

Radiosensibilidad	23
Riesgos debido a la exposición a dosis altas de RI	23
Riesgo debido a la exposición a dosis bajas de RI	24

Capítulo 3. Sangre

Generalidades	27
Plasma sanguíneo	27
Eritrocitos.....	27
Leucocitos	28

Capítulo 4. Micronúcleos

Generalidades	29
Criterios para evaluar células por el ensayo de micronúcleos	30
Criterios para determinar micronúcleos.....	31

Capítulo 5. Antecedentes

Antecedentes	32
--------------------	----

Capítulo 6. Planteamiento del estudio

Hipótesis	34
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares	35

Capítulo 7. Materiales y métodos

Fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$	36
Antecedentes de la caracterización de la fuente	37
Comprobación de la tasa de dosis del irradiador de partículas beta.	38
Obtención de las muestras.....	42
Experimentos con sangre completa	42
Tratamiento	42
Cultivo celular	42
Experimentos con linfocitos aislados.....	43
Aislamiento de linfocitos.....	43
Conteo de linfocitos	44
Tratamiento	44
Cultivos celulares	45
Análisis estadístico.	46

Capítulo 8. Resultados

Sangre completa	47
Linfocitos aislados	51
Comparación entre ambos experimentos	53

Capítulo 9. Discusión

Discusión	58
-----------------	----

Capítulo 10. Conclusiones

Conclusiones	62
--------------------	----

1. Radiación Ionizante (RI)

Radiación ionizante

El término radiación se aplica a la emisión y propagación de energía a través del espacio o un medio material [1]. La radiación ionizante (RI) se caracteriza por la habilidad para ionizar y/o excitar a los átomos del medio con el que interacciona. Debido a que la energía necesaria para liberar un electrón de valencia del átomo es del orden de 4 – 25 eV, la radiación debe transportar energía cuántica o cinética mayor que tal valor para que se le pueda considerar como ionizante [2].

Actualmente los tipos de radiación ionizante más importantes son:

- Rayos γ (gamma): radiación electromagnética emitida por un núcleo o en reacciones de aniquilación entre materia y antimateria [2].
- Rayos X: radiación electromagnética emitida por partículas cargadas (usualmente electrones) cuando cambian entre los niveles energéticos del átomo (rayos X característicos) o cuando se aceleran al interactuar dentro de un campo de Coulomb (rayos X de bremsstrahlung). Cabe hacer mención que un rayo γ y un rayo X con la misma energía cuántica, tienen propiedades idénticas y sólo se diferencian por su origen.
- Electrones rápidos: si su carga es positiva, son llamados positrones. Cuando son emitidos por un núcleo, comúnmente se les denomina partículas β . Si son el resultado de colisiones entre partículas cargadas, se les llama rayos δ .
- Partículas cargadas pesadas: generalmente obtenidas de la aceleración de núcleos o iones pesados en un campo de Coulomb. Algunos núcleos radiactivos emiten partículas α (núcleos de He) que también se consideran como partículas cargadas pesadas. Algunos ejemplos de ellas son los protones, las ya mencionadas partículas α , iones de átomos, etc.

- Neutrones: Son partículas sin carga eléctrica obtenidas de reacciones nucleares como la fisión nuclear. [3]

Radiactividad y decaimiento radiactivo

Se denomina radiactividad al fenómeno consistente en la emisión espontánea de radiaciones ionizantes de un núcleo atómico.

Los núcleos radiactivos son inestables y tienden a buscar configuraciones más estables a través de la expulsión espontánea de partículas energéticas y es entonces cuando se dice que un núcleo emite radiación ionizante. A este proceso se le conoce como decaimiento radiactivo. Los núcleos radiactivos decaen escogiendo el camino más conveniente para lograr la combinación estable y pueden emitir una o varias de las radiaciones presentadas en la *tabla 1.1*

Tabla 1.1.- Radiaciones emitidas por lo núcleos radiactivos.				
Radiación	Símbolo	Estructura	Carga	Masa [uma]
Partícula alfa	α	2p + 2n	+2e	4.0015
Partícula beta negativa	β^-	e ⁻ (electrón)	-e	0.000549
Partícula beta positiva	β^+	e ⁺ (positrón)	+e	0.000549
Rayos gamma	γ	fotón	0	0

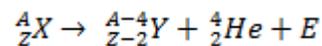
Así, mediante uno o varios decaimientos sucesivos, los núcleos radiactivos se van acercando a su condición estable. En realidad el núcleo no se desintegra sólo cambia el tipo o número de nucleones que tiene y por lo tanto se transforma en otro núcleo, del

mismo elemento o de otro elemento, al modificarse su número atómico y/o su número de masa.

En el proceso de decaimiento radiactivo se cumple el principio de conservación de la energía, del momento lineal, del momento angular y de la carga eléctrica. La energía total del átomo antes del decaimiento es igual a la energía total de los productos del decaimiento.

Decaimiento alfa

Ocurre principalmente en núcleos pesados y puede ser representado de la siguiente manera:



Donde X es el núcleo padre, Z el número atómico, A el número de masa, Y es el núcleo hijo, α es la partícula alfa (núcleo de He) y E es la energía de la transformación que procede de la diferencia de masas atómicas entre el padre y los productos (el núcleo hijo y la partícula alfa).

En el decaimiento la partícula alfa sale en una dirección y el núcleo hijo sufre un retroceso en dirección opuesta, la energía se reparte entre ambos, como la masa de la partícula alfa es mucho menor, sale con alta velocidad y una energía cinética prácticamente igual a la de la transformación, por lo que su espectro es discreto (el espectro es la curva de distribución de energía de las partículas), como se muestra en la figura 1.1.

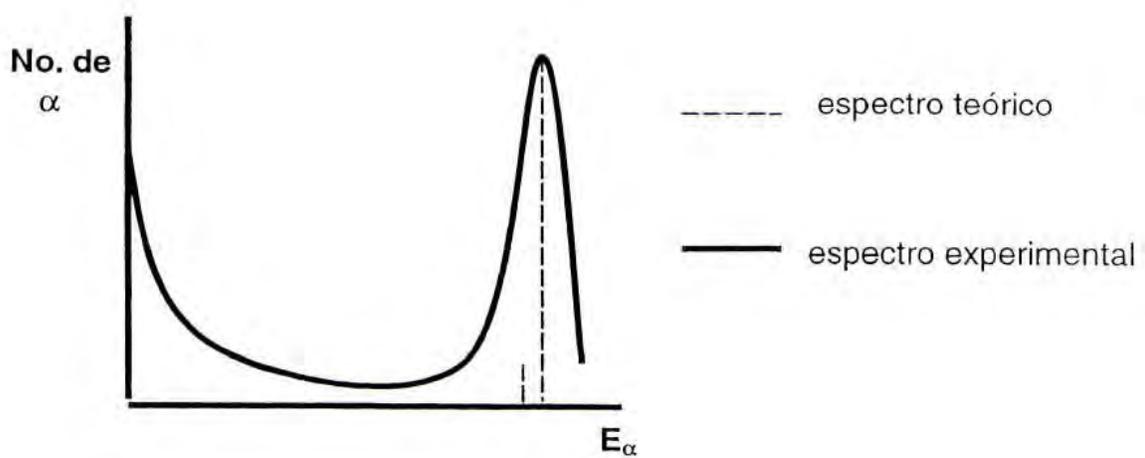
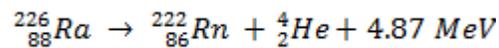


Figura 1.1. Espectro del decaimiento alfa del ^{226}Ra [4]. La línea punteada muestra el espectro teórico, mientras que la línea continua muestra el espectro que se obtiene experimentalmente.

Ejemplo de decaimiento alfa:

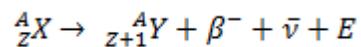


Decaimiento beta

El decaimiento beta tiene tres modalidades que se presentan a continuación:

Emisión beta negativa

La representación general para este tipo de transformación beta es:



Donde X es el núcleo padre, Z el número atómico, A el número de masa, Y es el núcleo hijo, β^- es la partícula beta (electrón), $\bar{\nu}$ es un antineutrino y E es la energía de la transformación. En este tipo de transformación un neutrón se transforma en protón y se

emite un electrón y un antineutrino, éste, así como su antipartícula el neutrino, no tiene carga eléctrica y su masa es insignificante.

La energía de la transformación se reparte entre la partícula beta y el antineutrino, cada uno de ellos puede tener una energía entre 0 y E pero siempre la suma será igual a E. Esto da lugar a que el espectro de radiación beta sea continuo, esto es, las betas emitidas podrán tener energía desde cero hasta E_{\max} que es la energía de la transformación (figura 1.2).

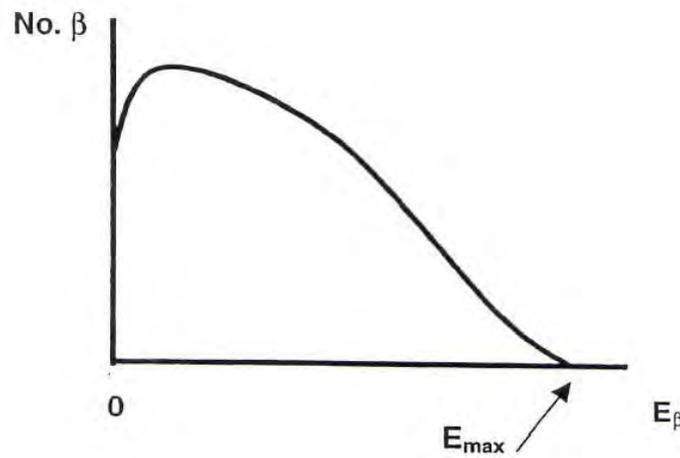
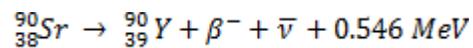


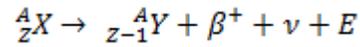
Figura 1.2. Espectro beta [4].

Ejemplo:



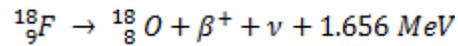
Emisión beta positiva

En este caso un protón se transforma en neutrón emitiendo un positrón (β^+) y un neutrino (ν). El proceso puede ser representado por:



El espectro de la beta positiva es bastante similar al de la beta negativa, sólo que está ligeramente desplazado hacia la derecha por la repulsión electrostática del núcleo sobre el positrón.

Ejemplo:



Existe otra alternativa para transformar un protón en neutrón, consiste en que el núcleo captura un electrón de la órbita más cercana (K o L), este proceso se conoce como **captura electrónica** (CE), la energía de la transformación se convierte en energía cinética del neutrino monoenergético emitido y al dejar una vacante en la capa K, los electrones orbitales ocupan las vacantes y se emiten los rayos X característicos.

Conversión interna

Es un proceso alternativo a la emisión de un fotón gamma, un núcleo excita, en lugar de emitir un rayo gamma, puede impartir toda o parte de su energía de excitación directamente a uno de sus electrones atómicos. Cuando esto ocurre el electrón escapa con una energía cinética igual a la diferencia entre la energía de excitación del núcleo y la energía de ligadura del electrón.

Ley del decaimiento radiactivo

Los núcleos radiactivos se transforman espontáneamente mediante los procesos mencionados anteriormente, sin embargo hasta hoy no es posible determinar cuál núcleo se va a transformar en el siguiente segundo, ya que es un proceso al azar, que es independiente de las condiciones físicas y químicas (temperatura, presión, composición, concentración etc.). Si se tiene un gran número **N** de núcleos radiactivos idénticos en una muestra, la fracción de núcleos que se transforman por unidad de tiempo es constante, esto se expresa matemáticamente como:

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

Donde dN es el número de núcleos que se transformaron en el intervalo de tiempo dt y λ es una constante característica de cada radionúclido (constante de decaimiento).

El número de transformaciones nucleares por unidad de tiempo que ocurre en una fuente radiactiva se denomina actividad y se representa con la letra **A**, se define matemáticamente como la rapidez de cambio con respecto al tiempo:

$$A = \frac{dN}{dt} = -N\lambda \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Si resolvemos la ecuación diferencial 1.2 obtenemos que:

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Lo que nos dice que la cantidad de núcleos restantes al tiempo t es una función que decae exponencialmente conforme avanza el tiempo. Así, la actividad (**A**) de una muestra radiactiva también se comporta como una función de decaimiento exponencial.

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Donde A_0 es la actividad inicial de la muestra radiactiva. La unidad en el Sistema Internacional de Unidades es el bequerel (Bq) que corresponde a un decaimiento por segundo por lo que está dado en s^{-1} . Anteriormente se usaba como medida de actividad el

Curie, que corresponde a aproximadamente la actividad de 1 g de ^{226}Ra y cuya conversión a bequerels es $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$.

De la última expresión se obtiene una cantidad importante denominada vida media ($t_{1/2}$) que indica el tiempo necesario para que la actividad de la muestra disminuya a la mitad, es decir, $A(t_{1/2})=A_0/2$. Si sustituimos esto en la ecuación 1.4 y despejamos obtenemos:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

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

De este modo, para calcular el decaimiento de una fuente es necesario hacer uso de la ecuación 1.5 de la cual se despeja λ y se sustituye en la ecuación 1.4 para así obtener:

$$A(t) = A_0 e^{-\frac{\ln(2)}{t_{1/2}} t} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Interacción de la RI con la materia.

Cuando la RI incide sobre algún material, la energía transportada se deposita en los átomos del material causando excitaciones o ionizaciones. La forma en que esto ocurre depende, en gran parte del tipo de RI; esto es, si la radiación está formada por partículas cargadas (PCP, electrones y positrones) o por partículas no cargadas (rayos γ y X o neutrones) [3].

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

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

Interacción de partículas cargadas

Partículas cargadas pesadas (PCP)

Son las que tienen una masa muy superior a la del electrón, mientras atraviesan el medio, cediendo energía cinética a los electrones y su velocidad disminuye gradualmente, sin sufrir desviaciones importantes de su trayectoria rectilínea, sólo en raras ocasiones, cuando se acercan mucho a un núcleo, son fuertemente desviadas o producen una reacción nuclear. En la mayoría de los casos la interacción se da simultáneamente con muchos electrones, lo que produce abundante ionización y excitación a lo largo de su trayectoria [4].

Partículas cargadas ligeras (electrones)

Los electrones acelerados y las partículas beta sufren una interacción bastante diferente a las PCP. A diferencia de las PCP la trayectoria de los electrones es tortuosa, pues su masa es igual a la de los electrones atómicos con los que interacciona, por lo que en cada una de ellas se desvía significativamente de dirección. Los núcleos de los átomos, debido a su gran carga eléctrica producen una fuerte desviación del electrón (aceleración centrípeta o centrífuga, según la carga del electrón), que le hace perder energía emitiéndola como fotones de rayos X de frenado o “bremmstrahlung”.

Poder de frenado y LET

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

$$S = - \left(\frac{dE_c}{dx} \right)_{Y,E,Z} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Donde E_c es la energía cinética de la partícula, X es la longitud de la trayectoria, Y es el tipo de PC y Z el número atómico del medio. Generalmente se expresa en unidades de MeVcm^{-1} .

La figura 1.3 muestra el poder de frenado para diferentes tipos de partículas en agua, en función de su energía; puede notarse que para PCP el valor aumenta al principio y luego disminuye conforme aumenta la velocidad de la partícula, así que mientras mayor es la carga de la partícula mayor es el poder de frenado. Para los electrones, el poder de frenado es mil veces menor que el de una partícula alfa.

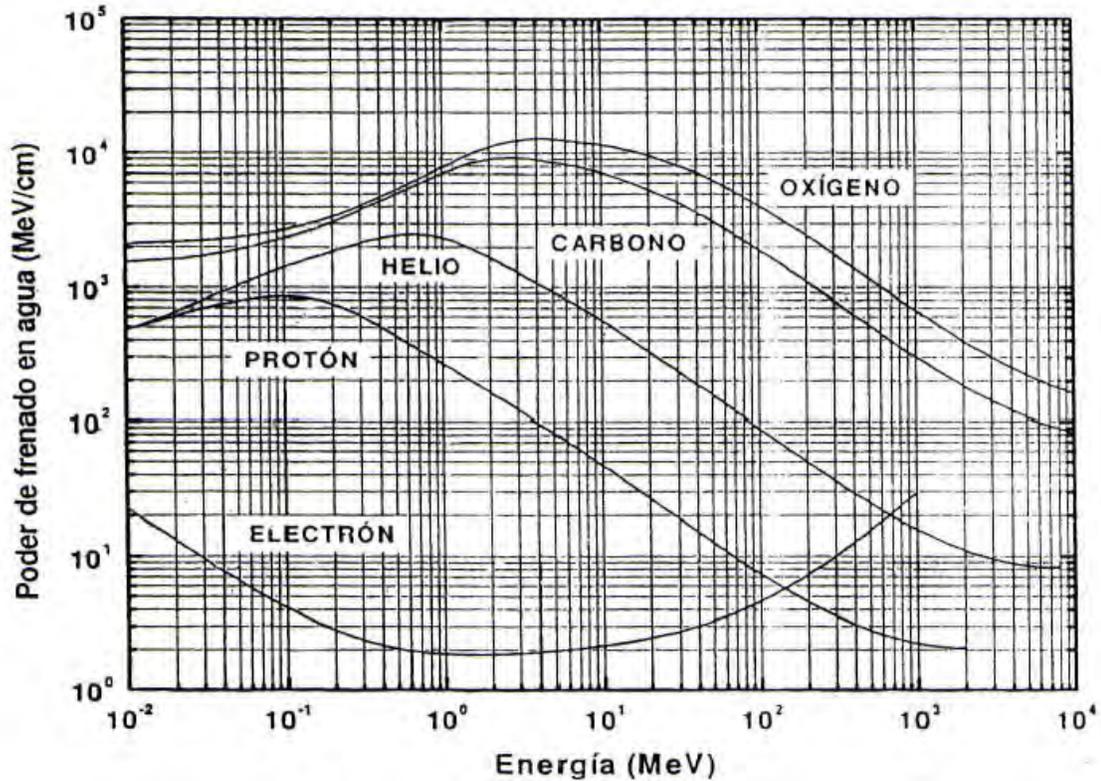


Figura 1.3.-Poder de frenado en agua para distintas partículas cargadas, en función de su energía [4].

La **transferencia lineal de energía (LET)** se define como el valor esperado de pérdida de energía en un volumen local por unidad de longitud de trayectoria de una partícula cargada con energía dada. Se expresa generalmente en unidades de energía sobre longitud (keV/ μm) [3]. El medio es agua.

$$L = \left(\frac{dE_c}{dx} \right)_{E,P} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

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

Alcance

El alcance (R) de una partícula cargada de un tipo y energía dados en un medio es el valor esperado de la longitud de la trayectoria recorrida en el material hasta detenerse. A la distancia total recorrida se le denomina **alcance**. Cuando la partícula se detiene en el medio se dice que es absorbida. Para los electrones la penetración (espesor de material que alcanzan a atravesar) y la longitud de su trayectoria son muy diferentes, si se construye una gráfica del número de partículas que atraviesan en función del espesor (curva de transmisión), se tendrían curvas como las presentadas en la figura 1.4. En ambos casos (los presentados en la figura 1.4) se llega a un espesor para el cual todos los electrones han sido absorbidos, a estas gráficas se les llama curvas de absorción. La forma de la curva dependerá de la energía de las partículas (espectro) y del material empleado como absorbente, para las partículas beta la curva cae de inmediato debido a su espectro continuo, los espesores pequeños absorben las partículas de menor energía. El valor del espesor máximo que atraviesan (alcance R), dependerá de la energía de las partículas cargadas así como de las características de material (del número atómico y la densidad).

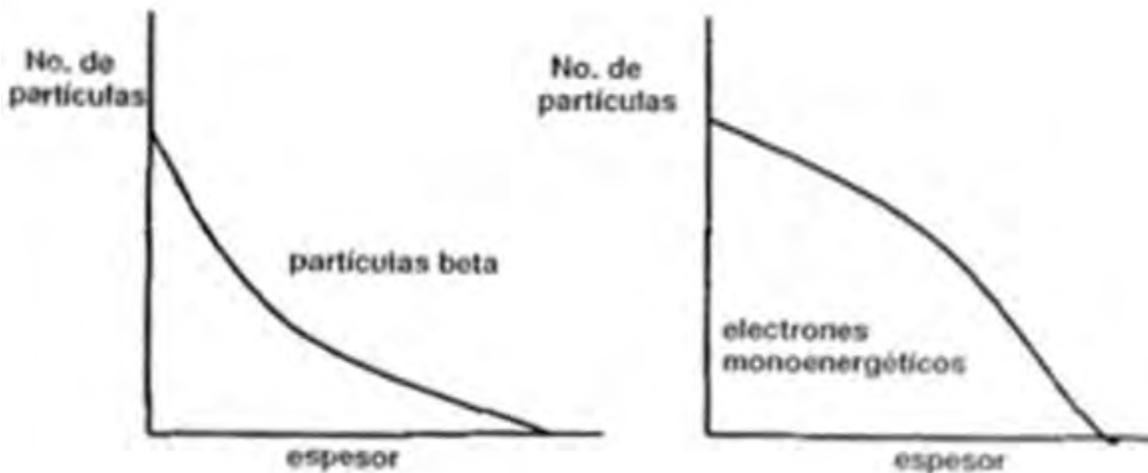


Figura 1.4.- Curvas de absorción para electrones [4].

Dosis y dosis equivalente

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

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (\text{Ec. 1.9})$$

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

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

$$H_T = W_R D_{T,R} \quad (\text{Ec. 1.10})$$

Donde D_T es la dosis promedio debida al tipo de radiación R en el tejido u órgano T y w_R es el factor de ponderación por el tipo de radiación [5]. Debido a la adimensionalidad de w_R la dosis equivalente tiene las mismas unidades que la dosis absorbida pero para distinguir entre ambas magnitudes se les asignó una unidad especial llamada el sievert (Sv). Para radiación de baja LET ($LET \leq 3 \text{ keV}/\mu\text{m}$) w_R es igual a la unidad y para radiación de alta LET ($LET \geq 3 \text{ keV}/\mu\text{m}$), w_R varía entre 5 y 20.

Dosimetría

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

Dosímetros TLD

Los dosímetros termoluminiscentes consisten en una pequeña masa (1-100 mg) de un material cristalino dieléctrico que contiene ciertas impurezas. Éstas pueden actuar como trampas para los portadores de carga (electrones y huecos) que se encuentran entre la banda de valencia y la de conducción. Al ser sometidos a un campo de radiación ionizante se producen ionizaciones que llevan a los electrones a la banda de conducción, dejando un hueco en la banda de valencia, ambos portadores de carga pueden emigrar a través del

cristal y caer en las “trampas” respectivas, aportadas por el activador y ubicadas en la región de energías prohibidas, para permanecer en ellas por un tiempo prolongado.

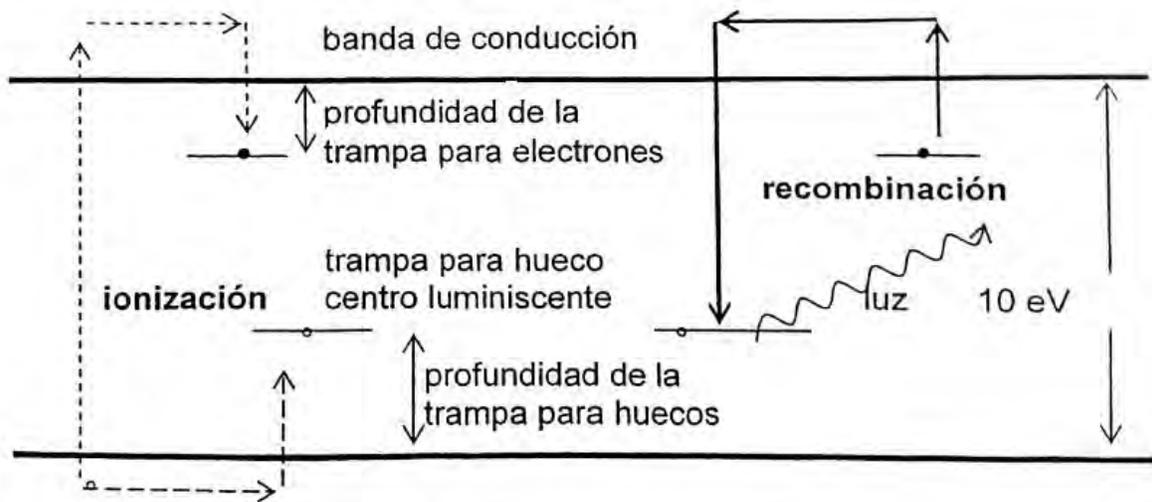


Figura 1.5. Diagrama de los niveles de energía del proceso termoluminiscente.

Cuando el cristal se calienta el electrón adquiere suficiente energía para salir de la trampa, moverse y recombinarse con un hueco, emitiendo entonces un fotón. Conforme la temperatura va aumentando, los electrones adquieren la energía correspondiente a la “profundidad” de la trampa y se liberan, entonces se empieza a emitir una cantidad de luz que va aumentando hasta un valor máximo y después disminuye, por el relativo agotamiento de los electrones que ocupan la trampa de esa profundidad (figura 1.5). Si se traza una curva de la cantidad de luz emitida (curva de brillo) en función de la temperatura se tendrá uno o más picos, según el número de trampas de diferente profundidad que existan en el cristal (figura 1.6).

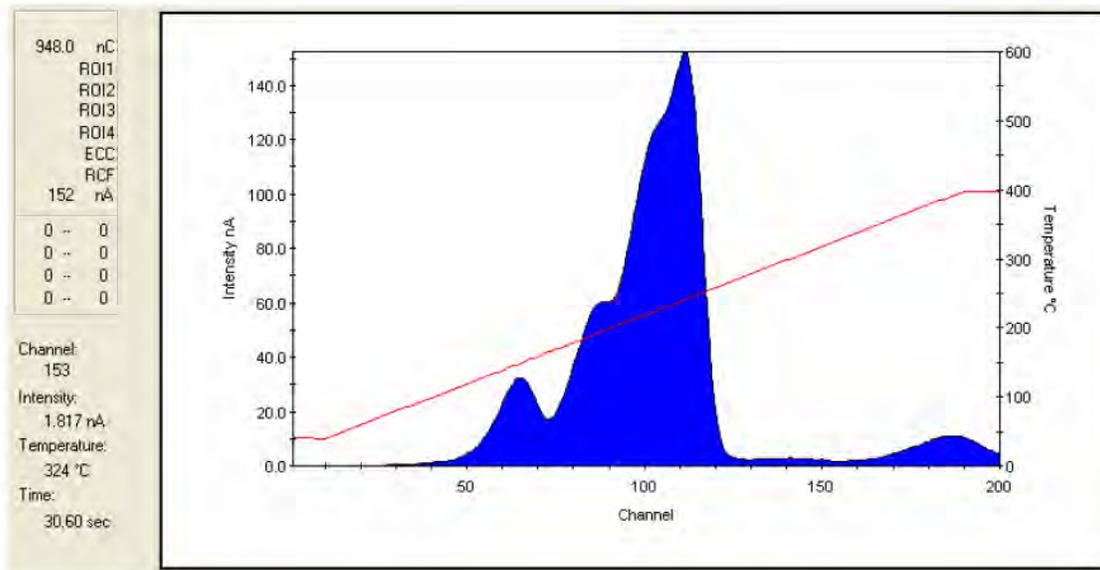


Figura 1.6. Curva de brillo para un dosímetro TLD-100 expuesto a un haz de radiación beta [3].

La cantidad de luz emitida (área bajo la curva de brillo) será proporcional a la dosis recibida por el cristal. Los TLD no son dosímetros absolutos por lo que es necesaria la calibración de los mismos con una fuente de radiación de referencia. Con irradiaciones a dosis conocidas se construye una gráfica de respuesta versus dosis que da como resultado la curva de calibración. Después durante el uso del dosímetro, para determinar la dosis que recibió, se va a la curva de calibración y se sustituye el valor de la lectura obtenida.

Previamente a su utilización los dosímetros termoluminiscentes deben ser sometidos a un tratamiento térmico, que tiene como objetivo borrar la señal acumulada durante su almacenamiento y dispersar las impurezas.

Para la lectura de los dosímetros se utiliza un equipo que consiste de una fuente de corriente que calienta una plancheta sobre la cual se colocan los TLD. La luz liberada al calentar hasta 300 °C es detectada y transformada en una señal eléctrica por un tubo fotomultiplicador.

2. ADN

La célula

Las células son el componente estructural principal de los tejidos y reflejan todas las características de la vida. Generalmente todas las células tienen estructuras similares. Sin embargo, se especializan de acuerdo al tejido al que pertenecen, es decir, de acuerdo a las funciones del tejido. Todas las células están rodeadas por una membrana celular, dentro de ésta, tienen una solución acuosa llamada citoplasma y organelos (figura 2.1). En humanos, hay aproximadamente 10^{14} células [6].

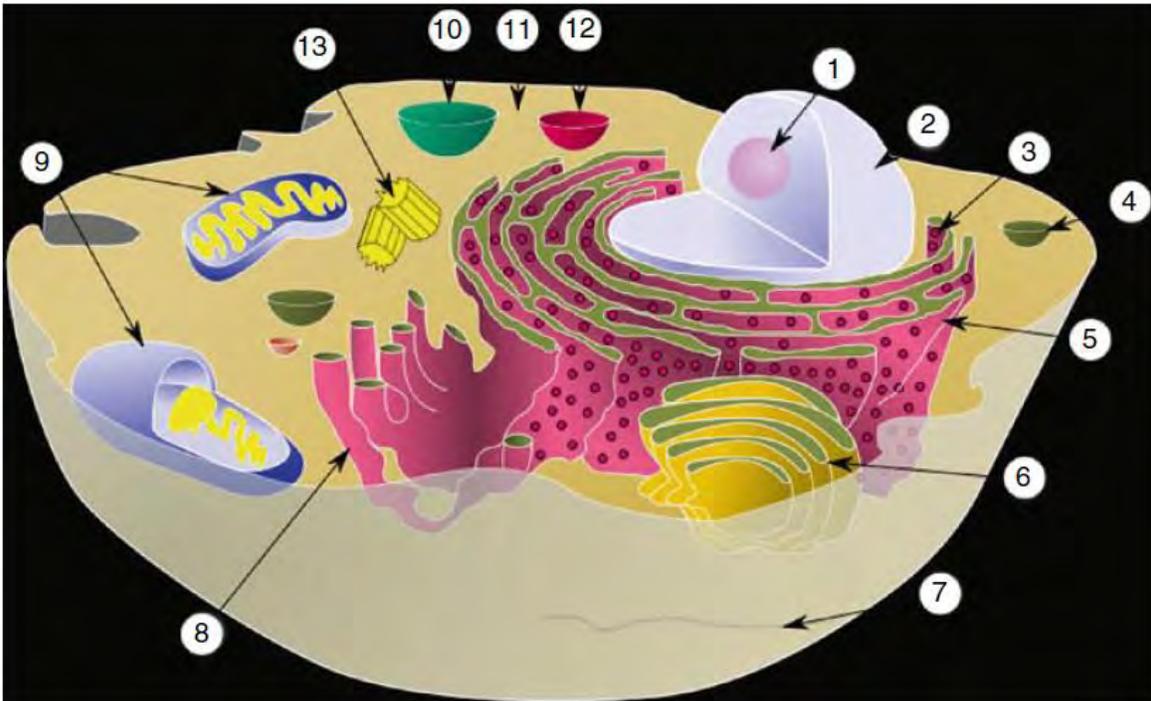


Figura 2.1. Ilustración esquemática de una célula eucariota. 1, Núcleolo; 2, núcleo; 3, ribosoma; 4, vesícula; 5, retículo endoplásmico rugoso; 6, aparato de Golgi; 7, citoesqueleto; 8, retículo endoplásmico liso; 9, mitocondria; 10, vacuola; 11, citoplasma; 12, lisosoma; 13, centriolos [6].

Localizada en el núcleo de toda célula eucariota se encuentra una macromolécula denominada ADN que almacena la información que la célula necesita para vivir. Por estudios de difracción de rayos X fue posible descifrar la estructura del ADN. Hoy en día sabemos que consiste de hebras que forman una doble hélice de 2 nm de ancho. Cada hebra está compuesta por una serie de nucleótidos, cuya secuencia específica contiene el código genético para la síntesis de proteínas. El soporte del ADN tiene porciones de azúcar (desoxirribosa) y grupos fosfatos que se encuentran entrelazados por bases nitrogenadas con las bases nitrogenadas correspondientes en la hebra contraria. Las bases son dos purinas: adenina (A) y guanina (G); y dos pirimidinas: timina (T) y citosina (C). Las bases deben ser complementarias; es decir, adenina sólo se aparea con timina mientras que la guanina lo hace con la citosina. Se sabe que cada vuelta completa de la hélice tiene 3.4 nm de altura lo que equivale a 10 pares de bases [3].

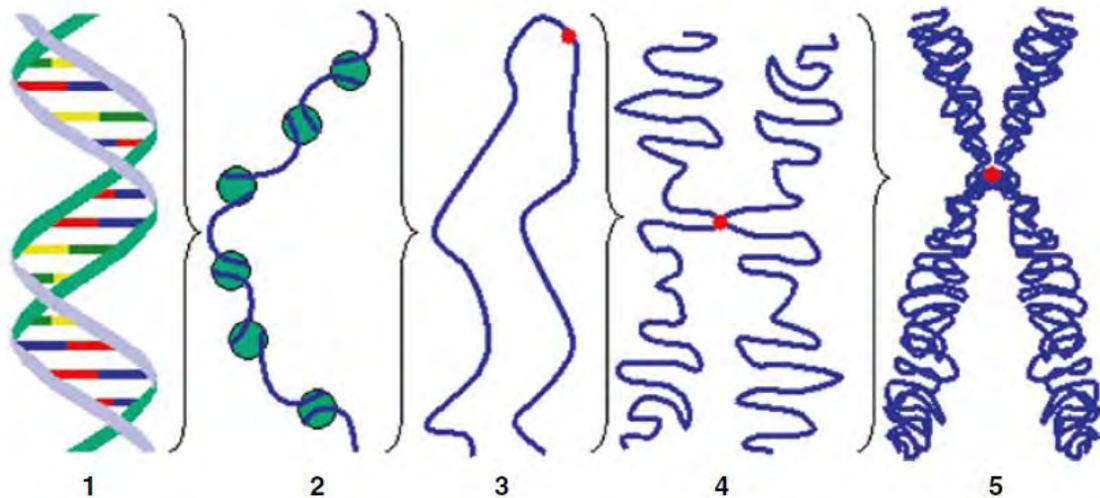


Figura 2.2. Relación entre ADN y cromosomas. 1, ADN; 2 ADN + proteínas; 3, cromatina; 4, cromátidas; 5, cromosoma [6].

Existen algunas estimaciones de que la cadena del ADN en células eucariotas puede llegar a medir dos metros de largo. La doble hélice se enrolla dando aproximadamente dos

vueltas a un conjunto de ocho proteínas moleculares llamadas histonas. Esta primera estructura se llama nucleosoma, los nucleosomas a su vez se enrollan formando una hélice apretada. La hélice se junta formando bucles que dan lugar a la cromatina. Finalmente, cuando el ADN se copia para ser heredado, la cromatina debe condensarse para formar cromosomas (figura 2.2).

Ciclo celular

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

Durante la primera fase aumenta la actividad de las enzimas requeridas para la síntesis del ADN [7]. Luego, en la fase de síntesis o fase S, se lleva a cabo la separación de la doble hélice del ADN mediante una serie de enzimas. Además se sintetizan las copias complementarias por polimerización de las bases nitrogenadas y se vuelven a sellar las cadenas sintetizadas para dar lugar a la nueva molécula de ADN. Este proceso se le conoce como replicación semiconservativa ya que una cadena de cada hélice se conserva y es el templete con el cual la nueva cadena es polimerizada. Finalmente, la célula entra en la fase G2 en la que ocurre un aumento en la síntesis de proteínas conforme se realizan los pasos finales de la preparación de la célula para la división. Antes de entrar a cada fase, el ADN puede, mediante enzimas específicas, verificar que la duplicación se ha llevado a cabo de manera correcta y si no existe algún daño que comprometa su integridad. Estos puntos de sondeo se conocen como “checkpoints” y juegan un papel muy importante durante la reparación celular [3].

La mitosis (fase del ciclo celular en la cual los cromosomas se distribuyen entre los núcleos hijos) se lleva a cabo en células somáticas y se pueden identificar cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase. Al final, se tienen dos células hijas con copias exactas de la secuencia de ADN de la célula madre. Por otro lado, las células gonadales deben poder

dividirse de forma que el número de cromosomas sea constante en generaciones sucesivas. Esto lo brinda el tipo de división celular llamado meiosis. Durante ésta, ocurre un proceso de recombinación genética y de separación de cromosomas homólogos para dar una célula haploide (sólo tiene un juego completo de cromosomas) que tiene una combinación virtualmente única de genes [7].

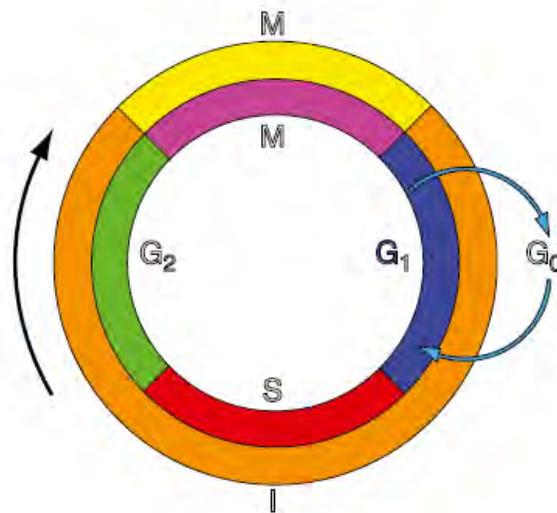


Figura 2.3. Fases del ciclo celular [6].

Daño al ADN por RI

Las primeras manifestaciones de los efectos de las radiaciones ionizantes sobre los tejidos humanos, se observaron poco tiempo después del descubrimiento de los rayos X (en el año 1895) y de la radiactividad natural (en el año 1896). Entre los años 1911 y 1914 se reportan 54 casos de muerte debido a enfermedades radioinducidas [8]. Por lo que la investigación sobre los efectos biológicos de la exposición a RI se hace relevante, naciendo así, la radiobiología.

Desde 1921 se inició la colaboración internacional para la protección contra radiaciones ionizantes, formalizándose en 1928 con la creación de la Comisión Internacional de Protección Radiológica, organismo no lucrativo, con subsidio internacional e independencia total, dedicado a generar recomendaciones basadas en los resultados de estudios e investigaciones más recientes de todo el mundo.

El primer efecto (físico) de la interacción de la RI con cualquier material es la ionización o la excitación de sus átomos o moléculas. Una molécula ionizada, por lo general, presenta propiedades distintas a aquellas que son neutras y por ende su funcionamiento se ve alterado. La radiación no solo puede dañar o cambiar una parte pequeña de la molécula del ADN sino que puede romper uno o varios lugares de la doble hélice del ADN. Debido a lo anterior se puede producir pérdida de información en el ADN o dar lugar una mutación que puede dar origen a la división celular descontrolada conocida como tumor.

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

- Directa: ocurre cuando la radiación afecta directamente a macromoléculas biológicas vitales, tales como el ADN, ARN, proteínas y enzimas, produciéndoles excitación o ionización en sus átomos. De un cuarto a un tercio del daño producido a las macromoléculas celulares por RI es debido al efecto directo [6].
- Indirecta: el haz de RI produce ionizaciones en otras estructuras de la célula, creando radicales libres que causarán daño al ADN. El fenómeno más común es la radiólisis del agua.

En particular, la RI puede causar roturas de una sola cadena (SSB) o de doble cadena (DSB) del ADN. Si el rompimiento ocurre en una sola de las hebras del ADN entonces es de poca relevancia biológica en cuanto a la muerte celular se refiere, ya que puede ser reparada usando la hebra intacta como templete. Si llega a ocurrir un rompimiento en ambas hebras y las lesiones están suficientemente separadas, entonces es posible la reparación, ya que aún hay suficiente ADN como templete. Pero si el rompimiento ocurre en el mismo lugar en ambas cadenas ocurre una rotura DSB [9]. La producción de SSB y de DSB depende en gran parte de la microdistribución espacial de la energía transferida o LET.

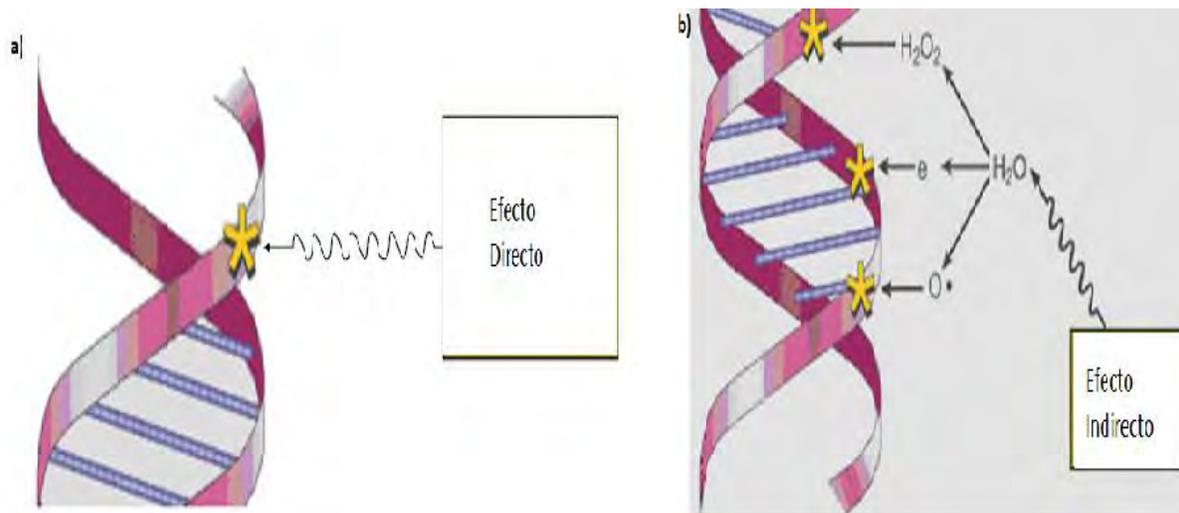


Figura 2.4. Efecto directo de la radiación ionizante (a), efecto indirecto de la radiación (b) [6].

Con todo lo anterior se ha adoptado una forma práctica de poder clasificar los efectos en seres humanos y que se utiliza con fines de protección radiológica [10]:

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

Radiosensibilidad

La radiosensibilidad está definida en términos de la rapidez con que se manifiestan los daños producidos por la RI. Se define como más sensible un elemento biológico en cuanto mayor es la respuesta a una dosis determinada de RI, y como radioresistente cuando necesita mayor dosis para alcanzar un efecto determinado [3].

La mitosis es la etapa del ciclo celular en que las células son más vulnerables a la RI. Células que se dividen poco o ya no se dividen son las menos sensibles, mientras que aquellas que tienen una alta tasa de división celular resultan ser las más radiosensibles [9].

Riesgos debido a la exposición a dosis altas de RI

Estimados de los riesgos a exposición a la RI se obtienen primordialmente de estudios epidemiológicos. Dichos estudios sólo pueden distinguir claramente los efectos biológicos a altas dosis [11].

El estudio más documentado es el de los sobrevivientes a las bombas atómicas en Japón donde algunos recibieron una dosis máxima de 1.2 Sv a cuerpo entero. Tan solo tres años después de las explosiones ya se había registrado una frecuencia de casos de leucemia superior a la normal y la máxima incidencia se registró 10 años después [12]. Se encuentra bien documentado que una exposición prolongada o dada una sola vez a dosis de radiación considerada alta e intermedia produce consecuencias nocivas en humanos, incluyendo, pero no exclusivamente, cáncer [13].

La documentación de que altas dosis de radiación pueden causar cáncer es extensa ya que se ha demostrado que la RI es un agente mutagénico y que las mutaciones en el ADN desempeñan un papel importante en la carcinogénesis. En sí, el proceso implica no sólo la exposición a un agente, si no la interacción de éste con el ADN, la reparación de la lesión (eficiente o ineficiente), la fijación del daño tras la replicación del ADN y el desarrollo de la lesión fijada para dar origen a una célula defectuosa que se replicará sin control formando un tumor [12].

Si se irradia por accidente el cuerpo entero a dosis mayores de 1 Sv de manera aguda se presentan síntomas que requieren de una vigilancia médica, pero si la dosis sobrepasa los 2 Sv, entonces resulta necesaria la hospitalización por aplasia medular [3].

Riesgo debido a la exposición a dosis bajas de RI

El ser humano recibe en promedio una dosis anual de 0.002 Gy debido al campo de radiación natural o radiación de fondo. Hasta el momento no existe evidencia alguna de que esta exposición constante implique un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer. Sin embargo, ya sea por trabajo o por salud, millones de personas en el mundo se exponen a pequeñas dosis de radiación artificial. Actualmente, dicha exposición se encuentra regulada por leyes acordadas por cada país, basadas en las recomendaciones de distintas organizaciones mundiales como la ICRP (Comisión Internacional de Protección Radiológica) y el UNSCEAR (Comité Científico de las Naciones Unidas en los Efectos de la Radiación Atómica), entre muchas otras. Así, el objetivo de la protección radiológica es permitir el aprovechamiento de la radiación, en todas sus formas conocidas, con un riesgo aceptable para los individuos que la manejan como para la población en general y generaciones futuras [12].

Según el UNSCEAR, una dosis baja de RI, es aquella en la que resulta muy improbable que ocurra más de un evento de absorción de energía en las partes críticas de la célula. Cuantitativamente se considera dosis baja si es menor que 0.2 Gy [14].

Para poder cuantificar los efectos biológicos debidos a la exposición a dosis bajas, deben realizarse estudios extraordinariamente amplios. Para cuantificar el riesgo a 1 Sv se necesita una muestra de 500 personas, por lo que para estimar el riesgo a 0.1 Sv se necesitaría una muestra de 50, 000 personas y 5 millones de personas sería lo óptimo para estimar el riesgo para 0.01 Sv. En otras palabras, para mantener la precisión estadística, el tamaño de la muestra incrementa aproximadamente como el inverso al cuadrado de la dosis [13]. De modo que se ha optado por hacer estimaciones basadas en lo que ha sucedido en exposiciones accidentales a altas dosis.

Hoy en día se proponen dos teorías opuestas sobre riesgos potenciales de la exposición a dosis bajas: (1) no hay dosis de radiación que pueda ser considerada completamente segura y el uso de RI deber ser determinado en la base de un estudio de tipo riesgo contra beneficio; (2) el riesgo debido a la exposición a dosis menores que una dosis umbral no es cuantificable y por ende podría ser inexistente [15].

La primera hipótesis que se expresa mediante el Modelo Lineal Sin Umbral (LNT por sus siglas en inglés) indica que no existe una dosis umbral a la cual ya no exista efecto alguno por exposición a la RI. Esto significa que se utilizan los datos obtenidos a dosis altas y se hace una extrapolación lineal para estimar riesgos a dosis bajas [3]. El concepto de relación lineal entre dosis y efecto surge de cuatro principios básicos de la radiobiología en 1950: (1) las mutaciones, espontáneas e inducidas, generalmente son dañinas; (2) cualquier dosis de radiación que llega a las células reproductiva conlleva un daño genético; (3) el número de mutaciones producidas es proporcional a la dosis (altas y bajas dosis); (4) el efecto es independiente de la tasa a la cual la radiación es depositada y el espaciamiento entre exposiciones [8].

Hoy las organizaciones internacionales se basan en el modelo LNT para sugerir los límites de dosis que protegen a la población. Sin embargo, con el advenimiento de la

genética molecular el modelo LNT se encuentra bajo constante debate entre argumentos a favor y en contra. Procesos como los mecanismos de reparación del ADN, apoptosis, efecto bystander, adaptación (hormesis), entre otros, eran desconocidos cuando se propuso este modelo por primera vez; modelos que pueden modificar significativamente la forma lineal hasta ahora aceptada [3].

Se dice que el modelo LNT puede subestimar los riesgos. Existe evidencia de que para individuos que son hipersensibles a la radiación dentro de una población dada que, al sumar su curva de riesgo con el modelo LNT (válido para el resto de la población) se obtiene una nueva curva que pasa por arriba de la lineal. El efecto bystander, puede ser una alternativa que explique la sobrestimación. El efecto se caracteriza por respuestas excesivas a bajas dosis debido a la aparición de daño en células no irradiadas adyacentes a las irradiadas. Ha sido observado para radiación de alta LET y no existe información concluyente para radiación de baja LET [13].

Por otro lado, también existe evidencia de lo contrario, es decir, que el modelo LNT sobrestima los riesgos. El proceso de adaptación o radioresistencia inducida en el que una dosis pequeña decrece a la radiosensibilidad de las células al ser posteriormente expuestas a altas dosis de RI, parece apuntar a que las bajas dosis de radiación pueden ser benéficas para el ser humano. Sin embargo, los datos a veces son limitados e inconsistentes [15].

El debate continúa y es preciso hacer más investigación *in vitro* e *in vivo* para entender los procesos internos y externos que la célula tiene para defenderse de agentes genotóxicos como la RI. De esta manera será posible hacer modelos cuantitativos más precisos para la estimación de riesgo a exposiciones de dosis bajas de RI.

3. Sangre

Generalidades

La sangre es clasificada como un tejido conectivo por que consta de células suspendidas en un fondo o matriz extracelular. Sin embargo, la sangre difiere de otros tejidos conectivos debido a que sus células no permanecen en una posición fija, sino que se mueven libremente en el plasma, la porción líquida de la sangre.

La sangre circulante sirve al cuerpo de tres maneras: Transportación, Regulación y protección. Transporta oxígeno, nutrientes y hormonas. Regula el pH de los fluidos del cuerpo y la presión homeostática. Transporta las células y los anticuerpos del sistema inmunológico que protegen contra los agentes patógenos.

La sangre está dividida en dos principales componentes. La porción líquida es el plasma. Los elementos formes, los cuales incluyen células y fragmentos celulares caen, caen en las siguientes tres categorías: Eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Plasma sanguíneo

El 55 % del volumen sanguíneo es plasma. Está constituido en un 91% de agua, 8% de proteínas albumina, anticuerpos, etc.) y en 1% de nutrientes, electrolitos y otros materiales que tienen que ser transportados [17].

Eritrocitos

Son los elementos formes cuantitativamente más numerosos de la sangre. Carecen de núcleo y de mitocondrias, por lo que deben obtener su energía metabólica a través de la fermentación láctica. Su objetivo es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo.

Leucocitos

Conocidos también como células blancas, se encuentran a una concentración de 5,000 a 10,000 por milímetro cúbico de sangre. Los diferentes tipos de células blancas son clasificadas por su tamaño, la forma del núcleo y la apariencia de gránulos en el citoplasma cuando las células son teñidas.

Los leucocitos granulares o granulocitos, son llamados así por que presentan gránulos en el citoplasma cuando son teñidos. Los granulocitos se dividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

Los linfocitos son el segundo tipo más numeroso de células blancas. Aunque los linfocitos se generan en la médula ósea, se desarrollan hasta la madurez en el tejido linfoide y se pueden multiplicar en éste. Circulan en el sistema linfático y son muy activos en la respuesta inmunitaria. Aunque estructuralmente iguales, mediante marcadores citoquímicos es posible distinguir 3 tipos de linfocitos: linfocitos B, T y nulos [17].

Los monocitos son el tipo de células blancas de mayor tamaño y representan aproximadamente el 5 % de estas.

Los leucocitos limpian el cuerpo de agentes externos y escombros celulares. Lo más importante, destruyen patógenos que pueden invadir el cuerpo.

4. MICRONÚCLEOS

Generalidades

Las anormalidades de los cromosomas son consecuencia directa y una manifestación del daño al ADN. Éstas pueden observarse a través del ensayo de micronúcleos (MN) [18].

El ensayo de micronúcleos es una de las técnicas más empleadas para el monitoreo del daño cromosómico inducido por agentes clastogénicos ó aneugénicos. En células humanas puede realizarse en sangre completa, en linfocitos aislados, fibroblastos, células epiteliales y células exfoliadas (epitelio bucal y de orina)[19].

Los MN son corpúsculos intracitoplasmáticos de cromatina separados del núcleo principal que se forman durante la transición de metafase a anafase. [20] Se originan en el citoplasma a partir de rompimientos de cromosomas que pueden ocurrir en la fase G1 ó G2 del ciclo celular, o bien por cromosomas que sufren rezago anafásico (daño del huso acromático) o inactivación del centrómero.

En el ensayo de MN por bloqueo de la citocinesis, las células son tratadas con Citocalasina-B, metabolito aislado del Hongo *Helminthosporium dematoideum* que inhibe la polimerización de actina, impidiendo la citocinesis durante la mitosis de manera que permite el análisis de células binucleadas que han sufrido una sola división [18,21]. La citocalasina B se utiliza con la finalidad de acumular prácticamente todas las divisiones celulares de la población de células en división. Permite distinguir fácilmente entre células mononucleadas las cuales no se han dividido y células binucleadas o polinucleadas, las cuales han completado una o más divisiones celulares [22].

Los factores que pueden alterar la frecuencia de micronúcleos son edad, sexo, en las mujeres la entrada a la menopausia y el posible desarrollo de osteoporosis, tabaco, deficiencia de ácido fólico y de vitamina B12 [23,24].

Comparado con otros ensayos citogenéticos, esta técnica tiene varias ventajas en la cuantificación de micronúcleos por su velocidad, precisión y es fácil de analizar, además de no requerir de la metafase de las células. Con esta técnica también se realiza el conteo de puentes nucleoplásmicos, gemaciones, células apoptóticas, necróticas y del índice de proliferación nuclear [21].

Criterios para evaluar células por el ensayo de micronúcleos

Las células con bloqueo de citocinesis que se utilizan para evaluar la frecuencia de micronúcleos deben tener las siguientes características:

- Deben ser células binucleadas.
- Los límites de la membrana de la célula binucleada deben de estar intactos y distinguibles.
- Los dos núcleos en una célula binucleada, deben tener su membrana nuclear intacta y encontrarse dentro del citoplasma.
- Los dos núcleos en una célula binucleada deben ser del mismo tamaño aproximadamente, y con una misma tinción. Los dos núcleos de una célula binucleada pueden estar cerca pero lo ideal es que no estén encimados. Una célula con dos traslapes de núcleos puede considerarse sólo si los límites de cada uno de los núcleos son distinguibles [21].

Criterios para determinar micronúcleos

Los MN son morfológicamente idénticos pero más pequeños que los núcleos principales.

Deben tener las siguientes características:

- El diámetro de un micronúcleo en linfocitos humanos por lo general está entre $1/16$ y $1/3$ de lo que mide el diámetro del núcleo principal.
- Los MN tienen una forma redonda u ovalada.
- Los MN no son refringentes y por lo tanto son fácilmente distinguibles de partículas de colorante.
- Los MN no deben estar unidos ni traslapados al núcleo principal.
- Si se encuentran muy cercanos al núcleo, el límite de los MN debe de ser distinguible al núcleo principal.
- Los MN deben de tener la misma intensidad de tinción que la del núcleo, aunque en ocasiones pueden ser más intensos o más claros. [21].

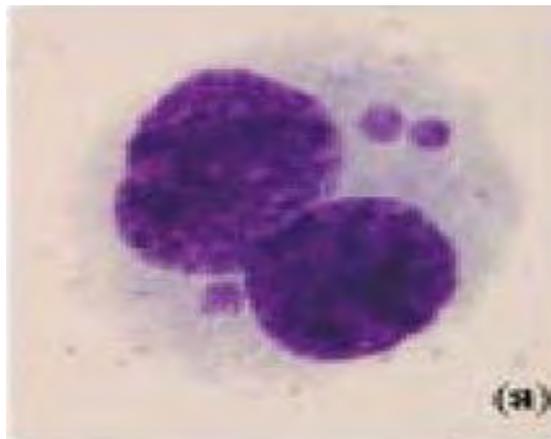


Figura 4.1. Célula binucleada con más de un micronúcleo.

5. Antecedentes

Antecedentes

Varios estudios han mostrado que el número de MN inducidos por radiación está fuertemente relacionado con la dosis de radiación y depende de la calidad de radiación [25,26]. Para radiación de baja LET, se han reportado funciones de dosis-respuesta de la forma $y=c+\alpha D+\beta D^2$, mientras que para radiación de alta LET, se observa una dependencia lineal ($y=c+\alpha D$), siendo ésta la más efectiva para generar micronúcleos. En las ecuaciones, y representa la producción de micronúcleos entre un cierto número de células binucleadas, c la frecuencia de fondo, α y β son los coeficientes que hacen referencia a los MN por célula binucleada por Gy y por Gy² respectivamente [27]. Para dosis más altas que 5 Gy, los niveles de respuesta desaparecen debido a que las células sufren tanto daño que ya no pueden entrar a mitosis.

He et al. [28] encontraron que el daño al ADN inducido por 50 mGy de radiación ionizante (rayos x) puede ser detectado a través del ensayo cometa, pero la tasa de micronúcleos no se incrementa significativamente hasta una dosis de 250 mGy.

Vral et al. [29] realizaron un estudio en líneas celulares CHO (células de ovario de hámster) y MCR-5 (fibroblastos de pulmón humano), las cuales fueron tratadas con una dosis de 50 mSv de rayos X. Encontraron que para las células MRC-5, el número de micronúcleos fue significativamente mayor en las células tratadas en comparación al grupo control. En el caso de las células CHO, la frecuencia de micronúcleos fue también mayor en células tratadas en comparación al grupo control, sin embargo, las diferencias fueron estadísticamente significativas sólo en las células analizadas al pasaje 16. Por lo que consideran que el daño citomolecular y citogénico puede ser inducido en células expuestas a dosis bajas de radiación y su progenie.

Atsuki Hiyama et al. [30] expusieron larvas y pupas de mariposa (*Zizeeria maha*) a 50 y 120 mSv de radiación de ^{137}Cs (uno de los mayores radionúclidos liberados de Fukushima Dai-ichi NPP) con la intención de representar las posibles dosis a las que fueron expuestas dichas mariposas en los alrededores de la central nucleoelectrónica de Fukushima Dai-ichi. En ambas dosis se observaron rasgos anormales y reducción del tamaño de las alas anteriores en ambos sexos. Los resultados sugieren que la radiación causó efectos adversos a nivel fisiológico y genético.

En el 2008, se realizó un estudio en el Laboratorio de Genética Toxicológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en el que se expuso una línea celular linfoblastoide homocigota recesiva para el gen ATM (células AT) a dosis bajas (≤ 160 mGy) de radiación ionizante de baja LET (partículas beta de una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$) y de alta LET (partículas alfa de una fuente de ^{241}Am) con el objetivo de verificar el principal tipo de daño inducido al ADN (rompimiento de una o ambas cadenas de la molécula de ADN). Dicho estudio mostró que la radiación beta induce principalmente roturas del tipo SSB a partir de una dosis de 120 mGy mientras que la radiación alfa induce roturas del tipo DSB desde una dosis de 80 mGy [3].

6. Planteamiento del estudio

No hay duda del riesgo debido a la exposición a altas dosis de radiación (dosis superiores a 200 mGy) y los efectos en la salud humana, dependiendo de la dosis estos pueden ser: esterilidad, las cataratas, el abatimiento de la función hematopoyética de la médula ósea, así como las lesiones con posteriores necrosis. Sin embargo, las exposiciones ambientales, de diagnóstico médico y ocupacionales, involucran generalmente dosis bajas de radiación ionizante. A pesar de que estas dosis no tienen un impacto inmediato en la salud humana, actualmente existe un gran interés en sus efectos biológicos a largo plazo. En el área de medicina nuclear y en la industria, el crecimiento en el uso de otros tipos de radiación como lo son la radiación beta y otras partículas cargadas pesadas hace relevante el estudio de los efectos biológicos que puedan ocurrir a nivel celular como consecuencia de una exposición a dosis bajas.

Hipótesis

Debido a que la radiación ionizante es un agente clastogénico, y por tanto un inductor de micronúcleos, se espera que dosis bajas de radiación ionizante sean capaces de producir un incremento en la frecuencia de micronúcleos.

Objetivo general

Verificar si dosis bajas de radiación ionizante (≤ 200 mGy) producidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ producen daño no reparable al ADN en sangre completa y linfocitos aislados, determinado mediante la prueba de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

Objetivos particulares

- Realizar la calibración de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$, para conocer la dosis impartida a las células.
- Determinar mediante la prueba de MN, si dosis bajas de radiación ionizante (de 50 a 200 mGy), producen un incremento en la frecuencia de MN, tanto en sangre completa como en linfocitos aislados.
- Comparar la frecuencia de micronúcleos en los experimentos con linfocitos aislados y con sangre completa.

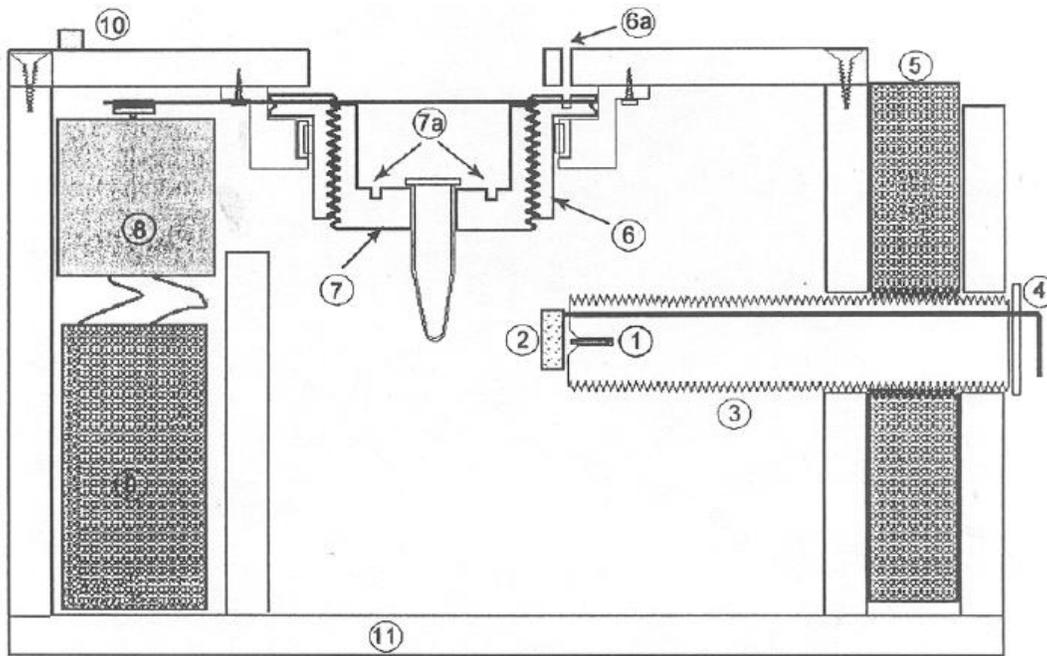
7. Materiales y métodos

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

La fuente radiactiva de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ fue construida en el Instituto de Ciencias Nucleares (ICNUNAM) y fue donada al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBUNAM) para la realización de trabajos de investigación. Consta de un cilindro metálico de aproximadamente 0.2 cm de diámetro y 1 cm de altura. El ^{90}Sr decae a ^{90}Y emitiendo partículas beta con una energía máxima de 0.546 MeV y tiene una vida media de 28.7 años. Posteriormente el ^{90}Y decae a ^{90}Zr emitiendo partículas betas con energía máxima de 2.28 MeV y su vida media es de 64 horas [3].

La fuente se encuentra dentro de un irradiador que fue construido por el M. en C. Alejandro Rodríguez como proyecto de tesis de licenciatura [31]. El irradiador tiene el fin específico de impartir una dosis entre 10 mGy y 2 Gy a una muestra biológica en un volumen mínimo de 100 μl con una uniformidad igual o mayor al 90%.

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



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

Figura 7.1. Irradiador de partículas beta [31].

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

Antecedentes de la caracterización de la fuente

Las características dosimétricas del irradiador fueron reportadas en diciembre del 2002. En esa fecha, se encontró que la fuente entregaba una dosis de 11.5 ± 0.3 mGy/min a una distancia de 1.6 cm. Este dato fue obtenido a través del uso de películas de tinte

radiocrómico (PTR) GafChromic MD-55-2 que fueron calibradas con otra fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ propiedad del instituto de Física (IFUNAM) [31]. En 2009 se reporta otra caracterización de la fuente, en este caso se reporta consistencia entre la tasa de dosis medida y la tasa de dosis reportada en 2002 (corregida por decaimiento) [3].

Comprobación de la tasa de dosis del irradiador de partículas beta.

Para caracterizar la fuente con la que se hicieron la irradiaciones de las muestras celulares se hizo uso de dosímetros termoluminiscentes TLD-100 (LiF: Mg, Ti) Harshaw-Bicron con dimensiones de $3 \times 3 \times 1 \text{ mm}^3$. El lector termoluminiscente Harshaw 3500 con flujo de N_2 fue utilizado para leer la respuesta termoluminiscente (carga) de cada TLD.

Este tipo de dosímetros no son absolutos, por lo que es necesaria su calibración. Dicha calibración se llevó a cabo utilizando una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ del IFUNAM cuya tasa de dosis impartida por partículas beta fue medida el 30 de Junio del 2005 y que ajustada por decaimiento natural de la fuente es:

$$\begin{aligned} \dot{D}_{06/2012} &= \dot{D}_{6/2005} \exp\left[-\left(\frac{0.693}{t_{1/2}}\right)t\right] = 13.61 \text{Gyh}^{-1} \exp[-(0.002 \text{mes}^{-1})(84 \text{mes})] \\ &= 11.50 \text{Gyh}^{-1} \end{aligned}$$

En la *tabla 7.1* se muestran las lecturas promedio de la calibración de los dosímetros TLD-100. En la *figura 7.2* se muestra la curva de calibración obtenida mediante los datos de la *tabla 1*. La curva ajustada por regresión lineal por el programa OriginPro 8, muestra una

dependencia lineal entre la respuesta (en μC) y la dosis entre 50 y 450 mGy. La ecuación está dada por:

$$R = (0.0083 \pm 1.12 \times 10^{-4} \mu\text{C mGy}^{-1})D + (0.035 \pm 0.016) \mu\text{C}$$

Con un $r^2 = 0.999$, donde R es la respuesta y D es la dosis.

Tabla 7.1. Resultados de la irradiación para la calibración de los TLD_100		
Dosis [mGy]	Tiempo	Lectura Promedio [μC]
50	16 s	0.454 \pm 0.034
150	47 s	1.251 \pm 0.053
250	1 min 18 s	2.041 \pm 0.225
350	1 min 50 s	2.961 \pm 0.225
450	2 min 21 s	3.754 \pm 0.131

Tiempos de irradiación y lecturas promedio de los dosímetros TLD-100 para la calibración con partículas beta de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ del IFUNAM.

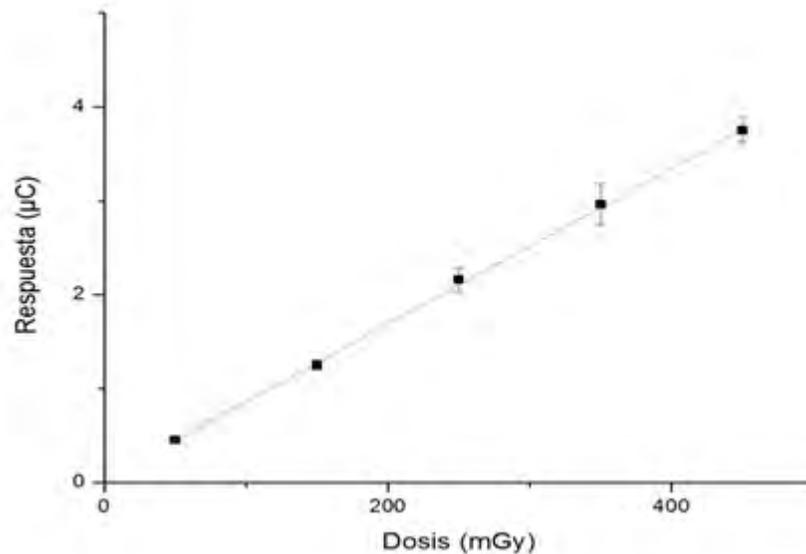


Figura 7.2. Curva de calibración de los dosímetros TLD. La curva se obtuvo por medio de una regresión lineal utilizando el programa OriginPro 8 y los datos presentados en la tabla 1. Las incertidumbres de la gráfica corresponden a una desviación estándar de los datos experimentales.

Una vez calibrados los dosímetros TLD_100 se procedió a exponerlos en la fuente del IIBUNAM en las mismas condiciones de la exposición de la muestra celular. Por lo tanto, cada dosímetro fue colocado en el fondo de un tubo cónico eppendorf (1.5 ml) de manera que estuviera perpendicular al haz de partículas beta. Posteriormente se agregó 150 µl de medio RPMI-1640 sin suplementar. Debido a que este tipo de dosímetros no pueden estar en contacto directo con el agua, fue necesario envolverlos cuidadosamente en pequeñas bolsas de plástico fabricadas especialmente para los dosímetros.

En la *tabla 7.2* se muestran las lecturas y las dosis correspondientes calculadas a partir de la curva de calibración de la figura 1; también se muestra la dosis nominal de la dosimetría

del M. en C. Alejandro Rodríguez y la diferencia entre la dosis nominal y la obtenida a partir de la curva de calibración.

Tabla 7.2. Comprobación de la tasa de dosis para una distancia de 2.5 cm.			
Dosis nominal [mGy]	Lectura promedio [μC]	Dosis obtenida a partir de la curva de calibración. [mGy]	Diferencia entre la dosis esperada y la dosis obtenida mediante la curva de calibración [%]
50	0.465\pm3.2%	51.76\pm3.2%	3.5
100	0.972\pm8.8%	112.93\pm8.8%	12.9
150	1.471\pm8.1%	173.1\pm8.1%	15.4
			Diferencia promedio = 10.6\pm6.2

Lecturas de los dosímetros TLD-100 al ser irradiados en el irradiador de IIBUNAM y la dosis correspondiente calculada con la curva de calibración de la figura 1. Las incertidumbres corresponden a una desviación estándar.

Como se puede ver en los datos de la *tabla 7.2*, la dosis nominal y las dosis obtenidas a partir de la curva de calibración varían en un 10.6%. Por lo que para la irradiación de las muestras se toma la tasa de dosis reportada en 2002 a 2.5 cm [31] y se corrige por decaimiento.

Obtención de las muestras

El estudio se llevó a cabo en linfocitos aislados y sangre completa proveniente de tres donadores masculinos sanos con rango de edad entre 20 y 27 años. Las muestras se obtuvieron en tubos vacutainer con heparina mediante venopunción. El mismo día que se obtenía la muestra se iniciaba el experimento con linfocitos aislados y el experimento con sangre completa. Los experimentos se realizaron en tres individuos por triplicado.

Experimentos con sangre completa

Tratamiento

En ambiente de esterilidad, se preparan 6 muestras en tubos eppendorf con 150 μ l de sangre completa cada uno. La muestra se coloca a una distancia de 2.5 cm de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ en donde se conoce la tasa de dosis, se hacen las correcciones correspondientes por decaimiento radiactivo de la fuente y se calculan los tiempos de irradiación. Las muestras se exponen a dosis de radiación de 0, 50, 120, 160 y 200 mGy. Para garantizar una dosis uniforme se siguieron los pasos dados en el manual de uso del irradiador [31]. La muestra restante se tomará como control positivo mediante la adición de bleomicina (radiomimético) a una concentración de 0.5×10^{-6} Molar.

Cultivo celular

Para llevar a cabo el ensayo de MN, la sangre se cultiva de acuerdo al método por bloqueo de la citocinesis y a los criterios establecidos por Fenech M. y colaboradores (2003), con algunas modificaciones [18].

Cada muestra de 150 μ l de sangre se siembra en 3 ml de medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con 1% de L-Glutamina (Sigma), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma) y 10 % de suero fetal bovino (SFB, PAA). La proliferación de linfocitos se estimula mediante la adición de 130 μ l de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma). Las células se incubaron a 37 °C.

A las 36 horas después del sembrado se agrega Citocalasina B (Cyt B, Sigma) a una concentración final de 6 μ g/ml, para bloquear la citocinesis y acumular células que se han dividido una sola vez. A las 60 horas después de iniciado el cultivo las células se cosechan, son fijadas y lavadas 8 veces (en el antepenúltimo lavado se agregan 500 μ l de tripsina a una concentración de 0.0025%) con una solución fría de fijador de Carnoy (metanol y ácido acético 3:1). Se preparan laminillas y se tiñen con tinción Hemacolor (Merck, Alemania) para su evaluación al microscopio (Olympus BH-2). Todas las laminillas son codificadas para su recuento.

Para determinar el efecto genotóxico de las dosis bajas de RI, se determinó la frecuencia de MN en 1000 linfocitos BN por tratamiento.

Experimentos con linfocitos aislados

Aislamiento de linfocitos

La separación de linfocitos de la sangre completa se lleva a cabo en esterilidad utilizando tubos cónicos de 15 ml conteniendo 6 ml de histopaque 1077 (Sigma) y 4 ml de sangre completa, la cual se deposita por estratificación. Se centrifuga durante 20 min a 1600 rpm. De esta manera se obtiene por gradiente, un anillo de células blancas, el cual se recupera cuidadosamente. Se lava con 10 ml de medio RPMI-1640 por centrifugación a 3000 rpm durante 20 min. Se retira el sobrenadante y se realiza el lavado por segunda ocasión. El botón de células obtenido se resuspende en 1 ml de medio RPMI-1640 para contar el número de células.

Conteo de linfocitos

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

Se toman 20 μ l de muestra celular y se mezclan con 900 μ l de solución RPMI-1640 y 80 μ l del colorante azul tripano al 0.4%. Se determina el número de células mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ Cel}}{\text{ml}} = \frac{\# \text{Células contadas}}{(\# \text{ cuadrantes})(\text{dilusión})(1/\text{Volumen del cuadrante})} \quad (\text{Ec. 7.1})$$

Hay cuatro cuadrantes en la cámara; la dilución tiene un valor de 50 (1000:20) y el volumen del cuadrante se considera de $0.1 \mu\text{l} = 1 \times 10^{-4}$ ml.

Tratamiento

En ambiente de esterilidad, se preparan 6 muestras en tubos eppendorf con 1.5×10^6 células y 150 μ l de medio RPMI-1640. La muestra se coloca a una distancia de 2.5 cm de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ en donde se conoce la tasa de dosis, se hacen las correcciones correspondientes por decaimiento radiactivo de la fuente y se calculan los tiempos de

irradiación. Las muestras se exponen a dosis de radiación de 0, 50, 120, 160 y 200 mGy. Para garantizar una dosis uniforme se siguieron los pasos dados en el manual de uso del irradiador [3]. La muestra restante se tomará como control positivo mediante la adición de bleomicina (radiomimético) a una concentración de 0.5×10^{-6} M.

Cultivos celulares

Para llevar a cabo el ensayo de MN, los linfocitos se cultivan de acuerdo al método por bloqueo de la citocinesis y a los criterios establecidos por Fenech M. y colaboradores (2003), con algunas modificaciones [20].

Cada muestra de 1.5×10^6 células se siembra en 3 ml de medio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con 1% de L-Glutamina (Sigma), 1% de aminoácidos no esenciales (Sigma) y 10 % de suero fetal bovino (SFB, PAA). La proliferación de linfocitos se estimula mediante la adición de 130 μ l de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma). Las células se incubaron a 37 °C.

A las 36 horas después del sembrado se agrega Citocalasina B (Cyt B, Sigma) a una concentración final de 6 μ g/ml, para bloquear la citocinesis y acumular células que se han dividido una sola vez. A las 60 horas después de iniciado el cultivo las células se cosechan, son fijadas y lavadas 4 veces con una solución fría de fijador de Carnoy (metanol y ácido acético 3:1). Se preparan laminillas y se tiñen con tinción Hemacolor (Merck, Alemania) para su evaluación al microscopio (Olympus BH-2). Todas las laminillas son codificadas para su recuento.

Para determinar el efecto genotóxico de las dosis bajas de RI, se determinó la frecuencia de MN en 1000 linfocitos BN por tratamiento.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa OriginPro 8. Todos los valores en este estudio se expresaron como promedios y desviación estándar. Para determinar las diferencias entre los tratamientos y sus controles se utilizó la prueba ANOVA de una vía con la prueba de Tukey para comparación múltiple. Para comparaciones entre sangre completa y linfocitos aislados se utilizó la prueba t para comparaciones entre dos medias. El nivel de significancia del estudio fue $\alpha=0.05$.

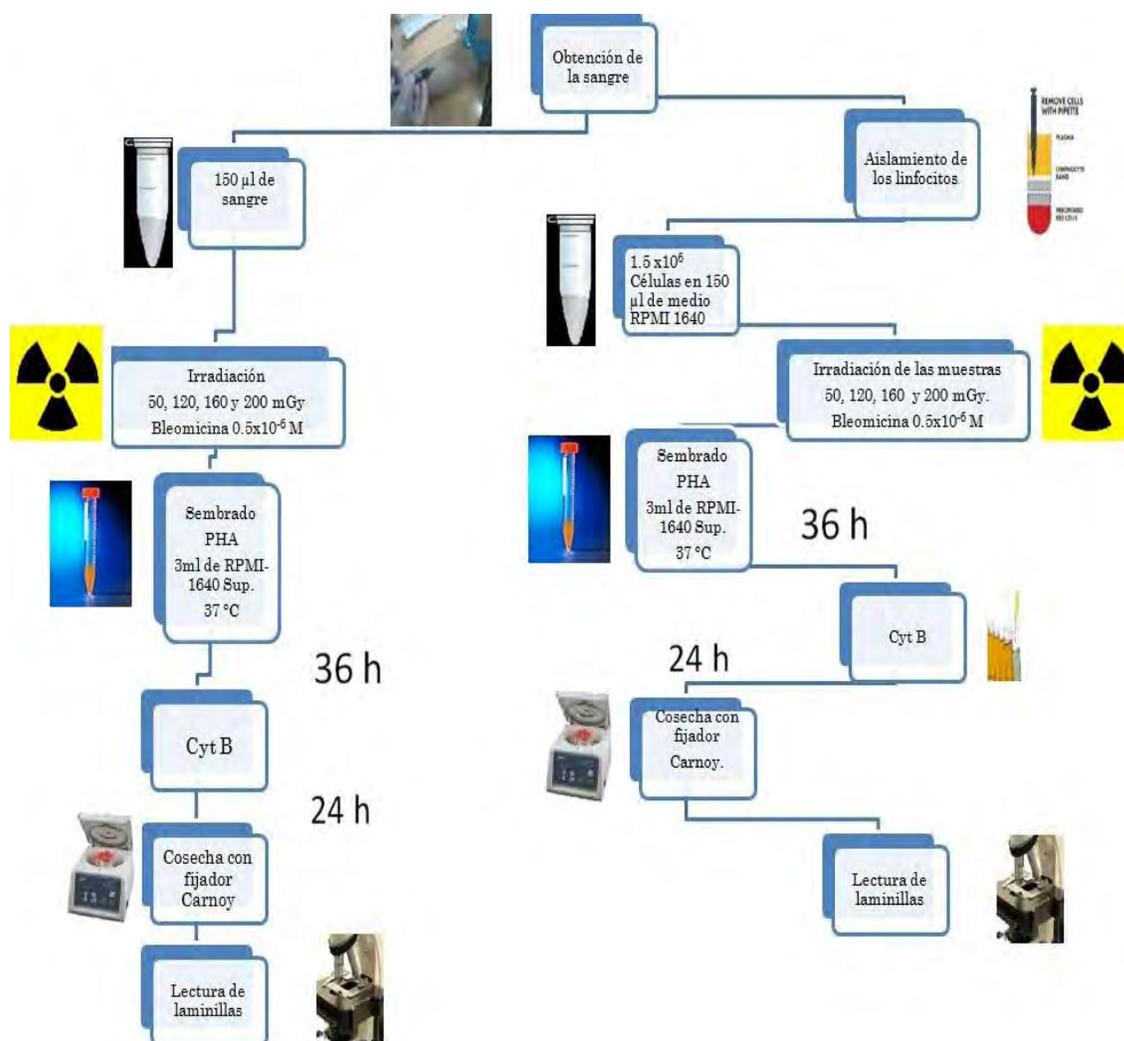


Figura 7.3. Representación esquemática de los experimentos con linfocitos aislados y sangre completa.

8. Resultados

Linfocitos aislados de sangre periférica y la sangre completa de tres donadores sanos se expusieron a partículas beta emitidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ a dosis de 0, 50, 120, 160 y 200 mGy. Se utilizó bleomicina como control positivo a una concentración final de 0.5×10^{-6} M, ya que esta es considerada un radiomimético. Las células irradiadas fueron sometidas al ensayo de micronúcleos mediante el bloqueo de la citocinesis con el objetivo de determinar el daño causado al ADN. Se prepararon laminillas, se tiñeron y se leyeron en un microscopio óptico para determinar el número de células binucleadas que presentaban micronúcleos (de un total de mil). Los experimentos fueron realizados por triplicado en cada uno de los tres individuos, tanto para sangre completa como para linfocitos aislados.

Sangre completa

La *tabla 8.1* muestra los resultados de la prueba de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis aplicada a las muestras de sangre completa que fueron previamente irradiadas con partículas beta. La *figura 8.1* muestra las graficas de los resultados de los experimentos realizados con sangre completa por donador. La *figura 8.2* muestra la gráfica del promedio de micronúcleos de los tres donadores.

Tabla 8.1. Resultados del ensayo de MN a las muestras de sangre completa previamente irradiadas con partículas beta.

Dosis [mGy]	MN/1000 CB Donador 1	MN/1000 CB Donador 2	MN/1000 CB Donador 3	MN/1000 CB Promedio general
0	3.66±1.52	3.66±0.57	2.33±0.57	3.22±1.09
50	5.66±0.57	4.33±1.52	2.66±2.08	4.22±1.85
120	6±3.46	5.33±1.52	3.33±0.57	4.88±2.26
160	7.33±4.16	5.66±2.08	2.66±0.57	5.22±3.11
200	8.66±2.04	8.33±2.08	4.66±1.52	7.22±2.53
Bleomicina 0.5X10 ⁻⁶ M	15.33±2.08	26.66±5.50	12.33±4.04	18.11±7.45

El número de micronúcleos que se reporta en esta tabla es el promedio del número de micronúcleos encontrados por cada 1000 células binucleadas por donador y el promedio general de los tres donadores. Las incertidumbres corresponden a una desviación estándar.

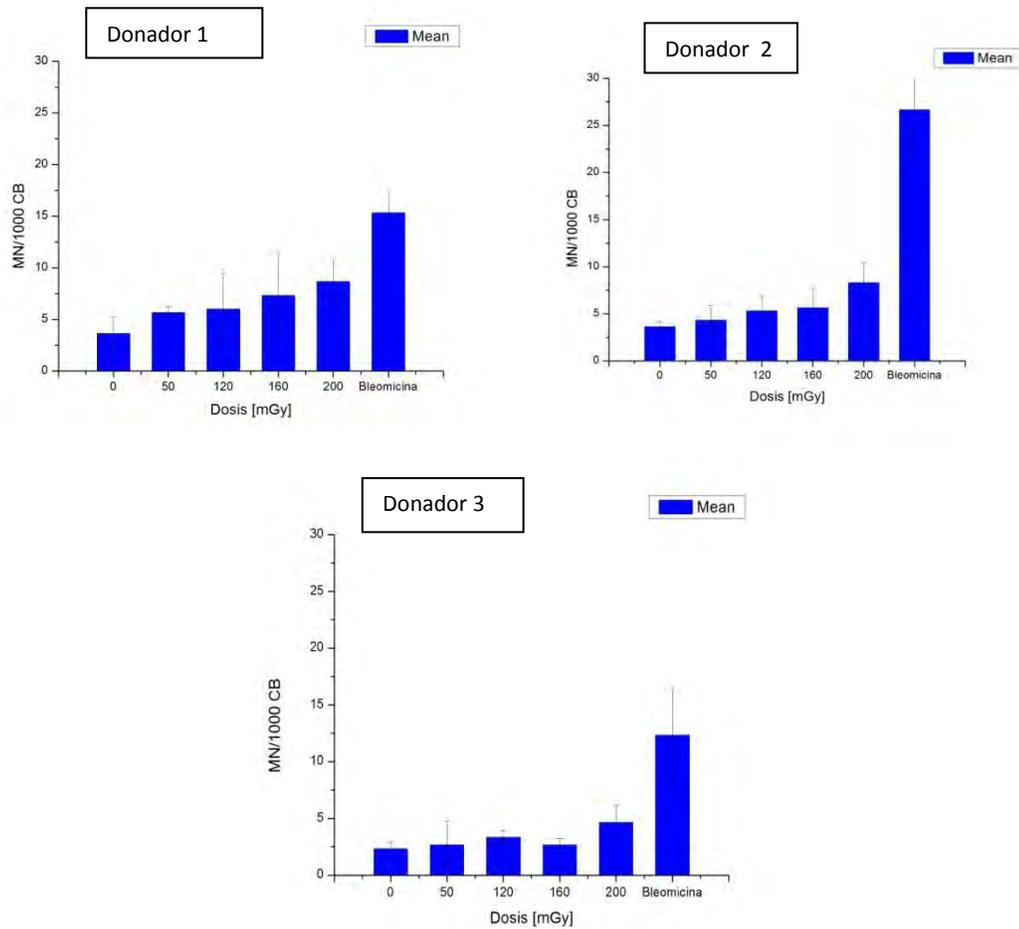


Figura 8.1. Resultados por donador de los experimentos realizados con sangre completa. Las barras de error corresponden a una desviación estándar.

Con el objetivo de validar las diferencias entre los diferentes tratamientos (dosis) se aplicó la prueba estadística ANOVA de una vía y la prueba estadística de Tukey; ambas con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Para comparar el control (dosis 0) con el control positivo (bleomicina) se utilizó la prueba estadística t-student pareada con un $\alpha=0.05$ y una $*P < 0.001$.

En la gráfica de la *figura 8.2* se observa que sí hay un incremento en el número de micronúcleos en relación al control (dosis 0) a medida que aumenta la dosis de radiación

ionizante. El aumento es estadísticamente significativo en el caso del control positivo (bleomicina) y la dosis de 200 mGy.

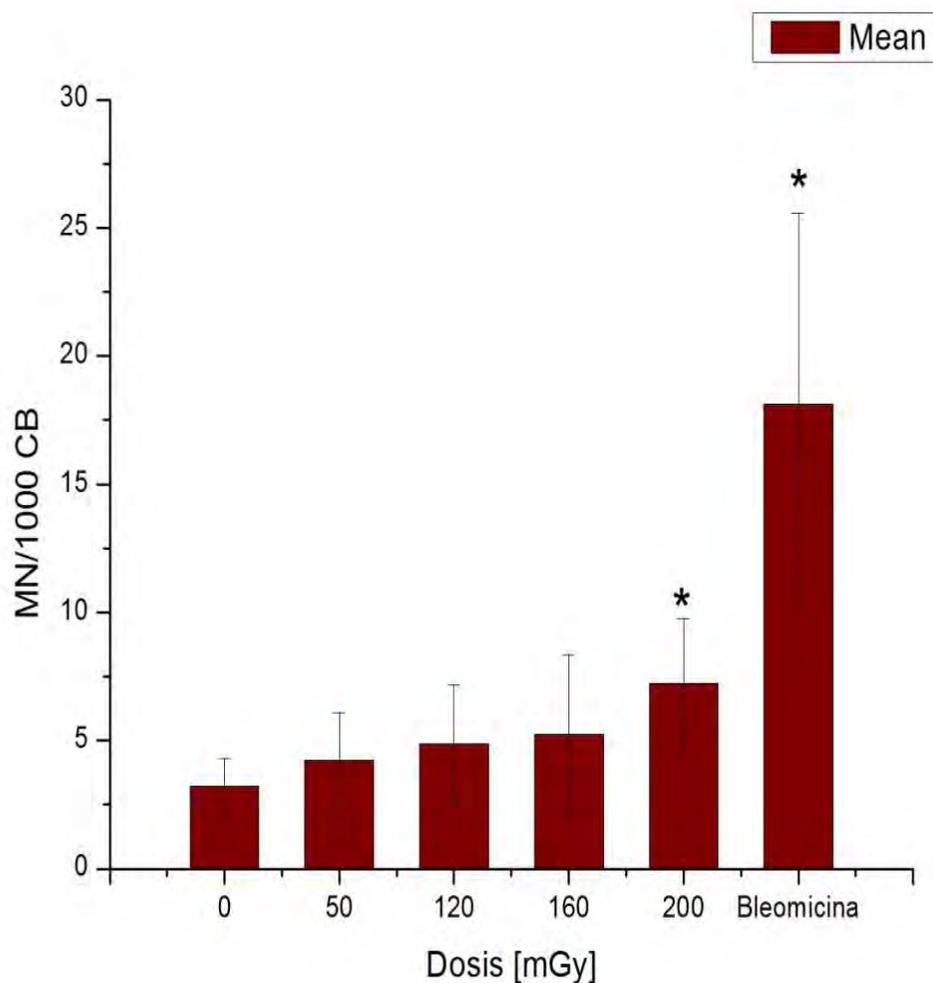


Figura 8.2. Gráfica del número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas en función de la dosis de radiación ionizante. Esta gráfica fue realizada con los datos promedio obtenidos de las muestras con sangre completa reportados en la tabla 8.1. La bleomicina se utilizó como control positivo. Las barras de error que se muestran corresponden a una desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos.

Linfocitos aislados

La *tabla 8.2* muestra los resultados de la prueba de micronúcleos aplicada a las muestras con linfocitos aislados que fueron previamente irradiadas con partículas beta. La *figura 8.3* muestra las graficas de los resultados de los experimentos realizados con sangre completa por donador. La *figura 8.4* muestra la gráfica del promedio de micronúcleos de los tres donadores.

Con el objetivo de validar las diferencias entre los diferentes tratamientos (dosis) se aplicó la prueba estadística ANOVA de una vía y la prueba estadística de Tukey; ambas con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Para comparar el control (dosis 0) con el control positivo (bleomicina) se utilizó la prueba estadística t-student pareada con un $\alpha=0.05$ y una $*P < 0.001$.

Tabla 8.2. Resultados del ensayo de MN a las muestras de linfocitos aislados previamente irradiadas con partículas beta.

Dosis [mGy]	MN/1000 CB Donador 1	MN/1000 CB Donador 2	MN/1000 CB Donador 3	MN/1000 CB Promedio
0	4±1	4.66±0.57	2.33±1.15	3.66±1.32
50	4±1	4.66±1.15	4.33±2.30	4.33±1.41
120	5±0	6±2.64	3.66±0.57	4.88±1.69
160	8±1	8±1	3±1	6.33±2.64
200	6.66±1.52	6.66±0.57	5±2	6.11±1.53
Bleomicina 0.5X10 ⁻⁶ M	23±1.73	23.66±5.68	26±2	24.22±3.41

El número de micronúcleos que se reporta en esta tabla, es el promedio del número de micronúcleos encontrados por cada 1000 células binucleadas por donador y el promedio general de los tres donadores. Las incertidumbres corresponden a una desviación estándar.

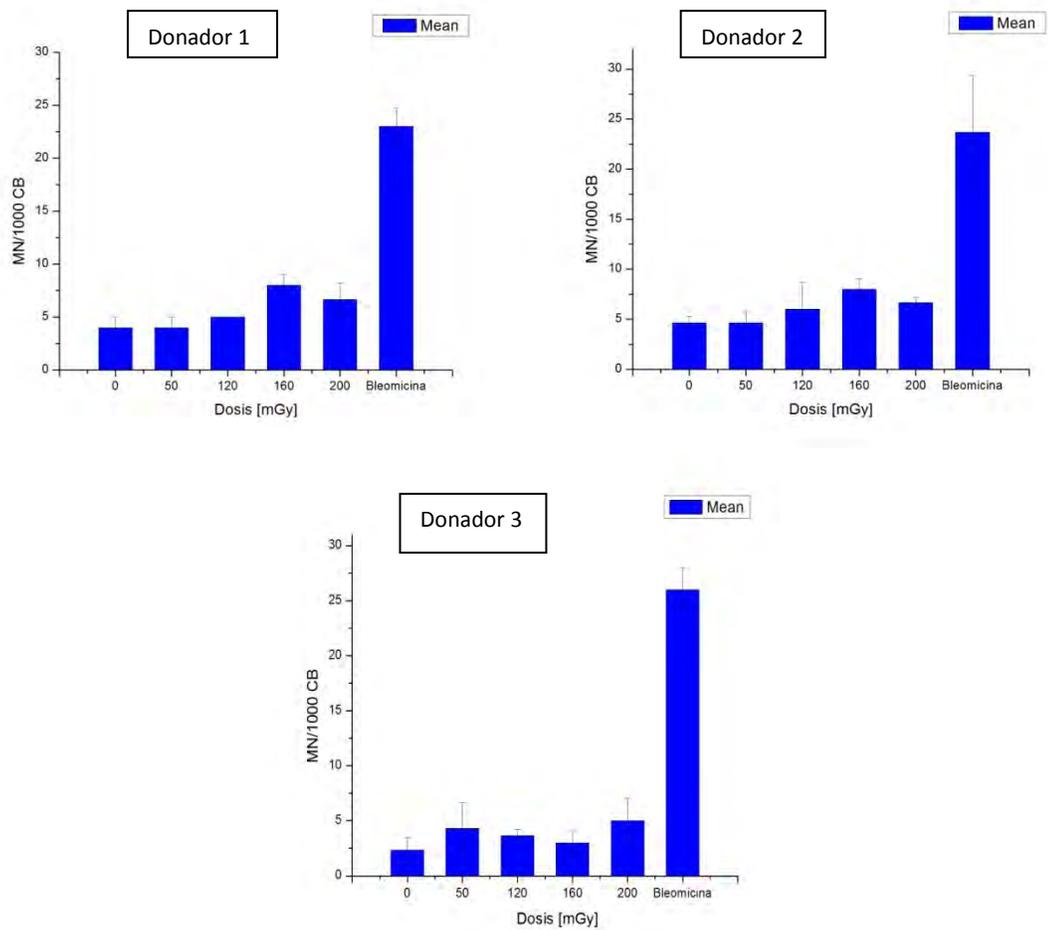


Figura 8.3. Resultados por donador de los experimentos realizados con linfocitos aislados. Las barras de error corresponden a una desviación estándar.

En la gráfica de la *figura 8.4* se observa que si hay un incremento en el número de micronúcleos en relación al control (dosis 0) a medida que aumenta la dosis de radiación ionizante. El aumento es estadísticamente significativo a partir de 160 mGy y en el caso del control positivo (bleomicina).

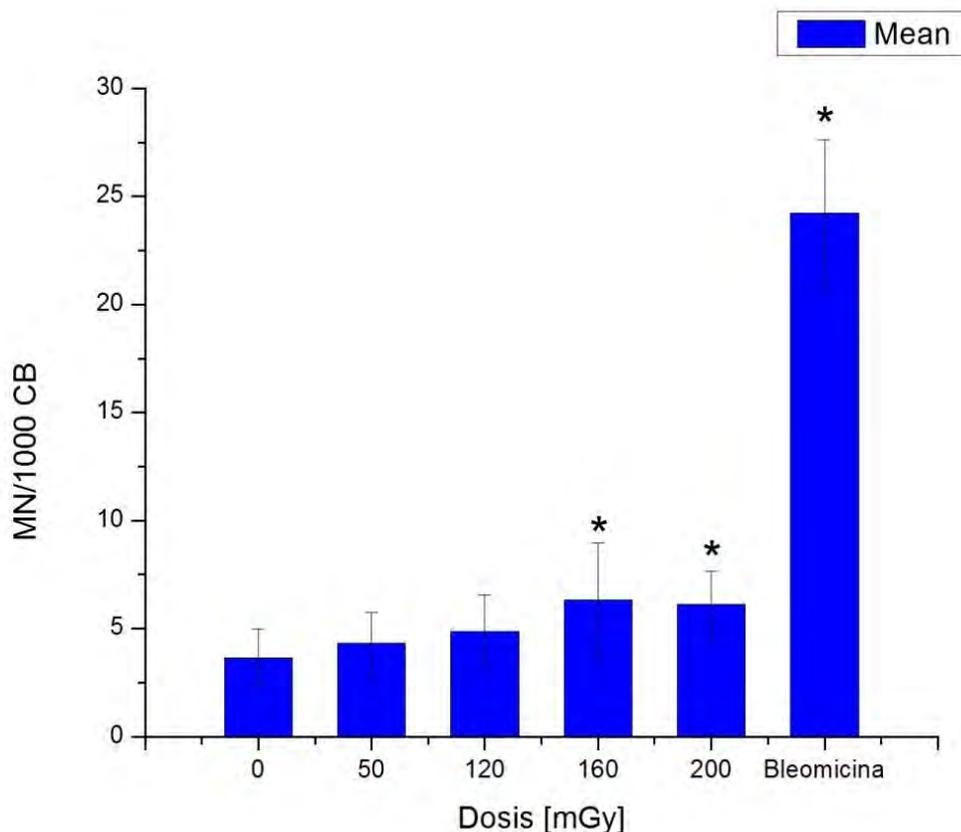


Figura 8.4. Gráfica del número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas en función de la dosis de radiación ionizante. Esta gráfica fue realizada con los datos promedio obtenidos de las muestras con linfocitos aislados reportados en la tabla 8.2. La bleomicina se utilizó como control positivo. Las barras de error que se muestran corresponden a una desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos.

Comparación entre ambos experimentos

La gráfica de la *figura 8.5* muestra la comparación en la producción de número de micronúcleos entre las muestras de los experimentos con sangre completa y linfocitos aislados. Para la comparación entre medias se aplicó la *prueba estadística t* entre dos grupos con un nivel de significancia de 0.05. No se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre el número de micronúcleos producidos en sangre completa y linfocitos aislados.

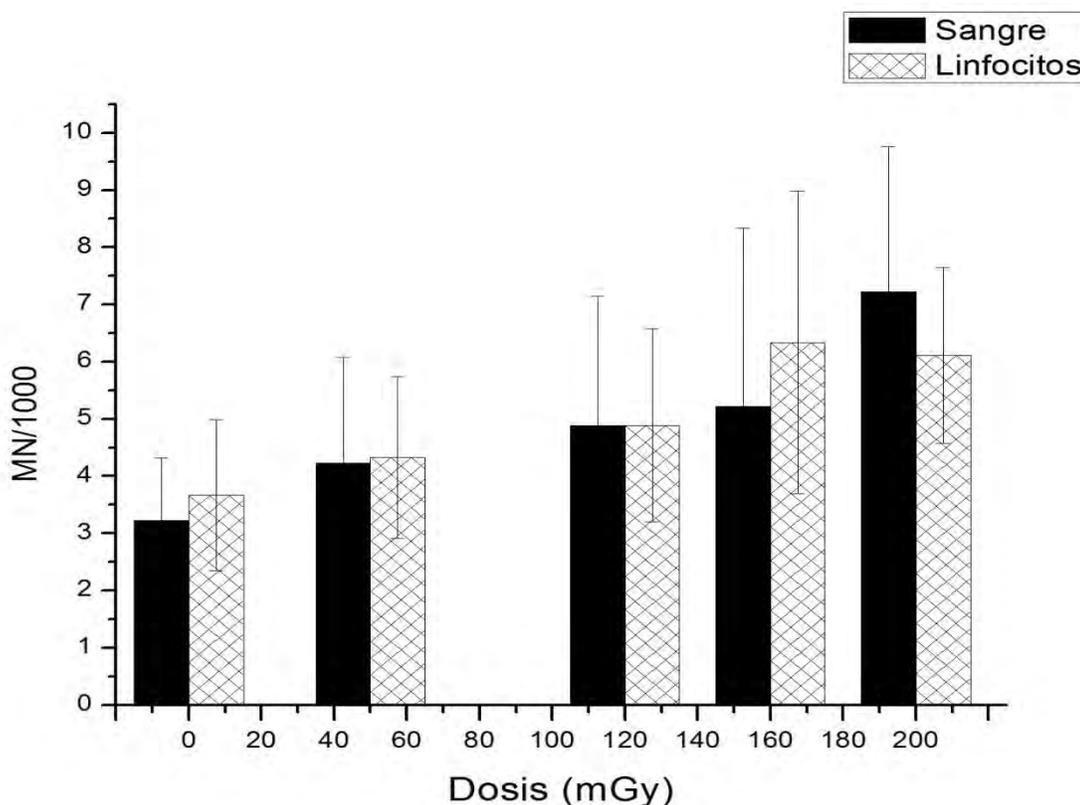


Figura 8.5. Gráfica del número de micronúcleos por cada 1000 células binucleadas en función de la dosis de radiación ionizante, tanto para linfocitos aislados (barras claras) como para sangre completa (barras oscuras). Las barras de error que se muestran corresponden a la desviación estándar de los datos obtenidos en los experimentos.

Para analizar la respuesta del número de micronúcleos en función de la dosis se realizó una regresión lineal a los resultados de los experimentos realizados tanto para sangre completa como para linfocitos aislados. La *figura 8.6* muestra el ajuste por regresión lineal del número de micronúcleos en función de la dosis para los experimentos con sangre completa. La ecuación de la recta que se obtiene es la siguiente:

$$MN = 0.017D[mGy] + 3.21 \quad (Ec. 8.1)$$

Donde MN es el número de micronúcleos y D es la dosis impartida a las muestras. El coeficiente de correlación lineal (R^2) obtenido en este caso fue:

$$R^2 = 0.92 \quad (Ec. 8.2)$$

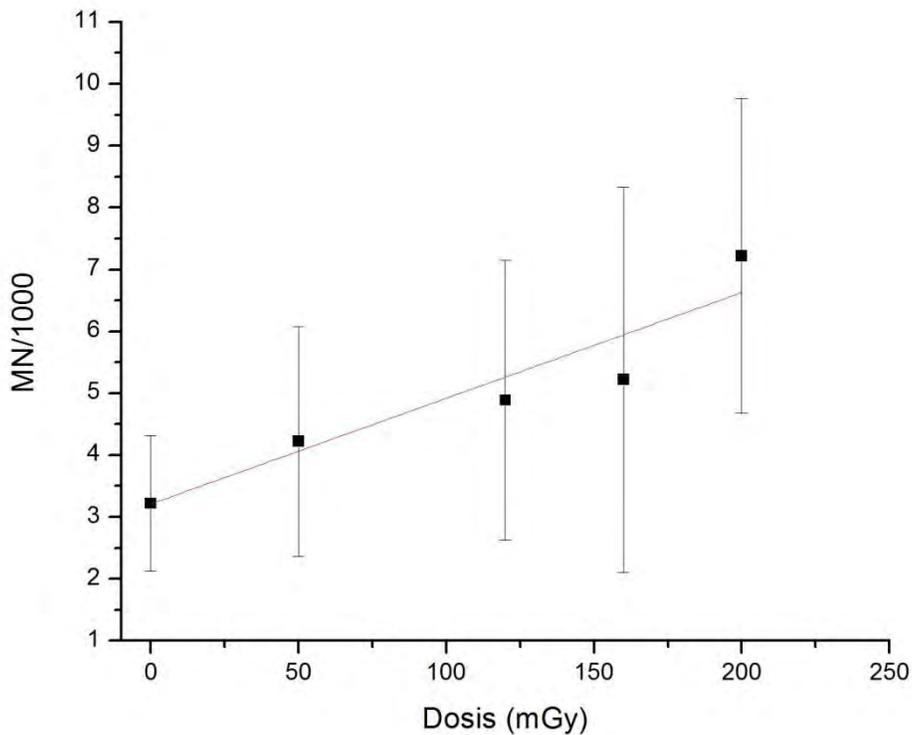


Figura 8.6. Ajuste lineal del número de micronúcleos en función de la dosis impartida a las muestras de los experimentos con sangre completa. Las líneas de error representan una desviación estándar.

La *figura 8.7* muestra el ajuste por regresión lineal del número de micronúcleos en función de la dosis para los experimentos con linfocitos aislados. La ecuación de la recta que se obtiene es la siguiente:

$$MN = 0.012D[mGy] + 3.66 \quad (Ec. 8.3)$$

Donde MN es el número de micronúcleos y D es la dosis impartida a las muestras. El coeficiente de correlación lineal (R^2) obtenido en este caso fue:

$$R^2 = 0.93 \quad (Ec. 8.4)$$

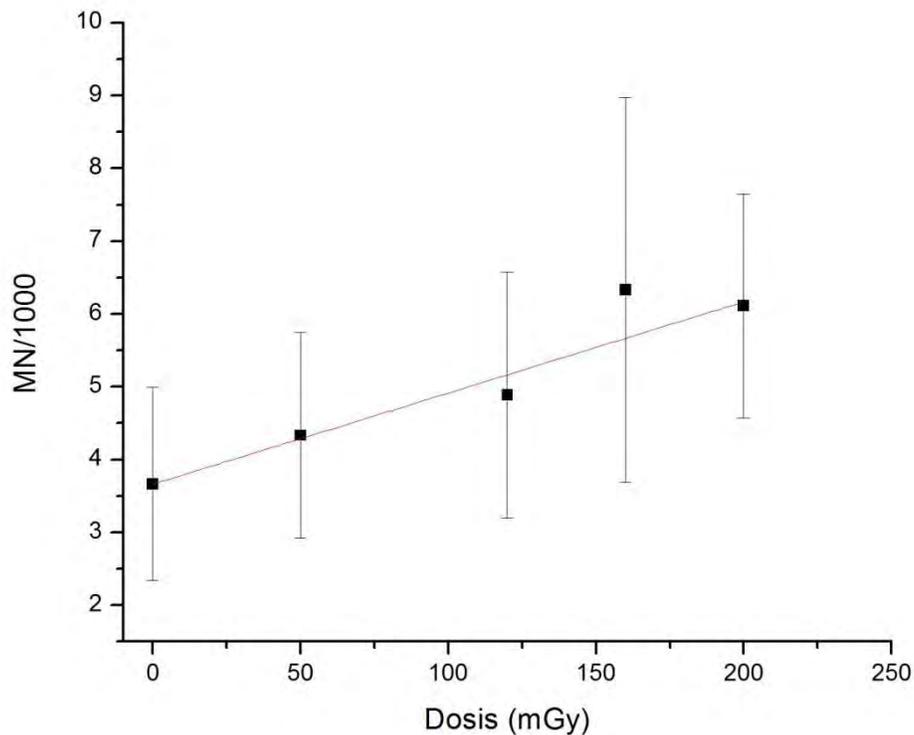


Figura 8.7. Ajuste lineal del número de micronúcleos en función de la dosis impartida a las muestras de los experimentos con linfocitos aislados. Las líneas de error representan una desviación estándar.

En la *tabla 8.3* se muestran las comparaciones de las pendientes y las intersecciones de las ecuaciones obtenidas por regresión lineal (Ec. 8.1 y 8.3). Se puede ver que las

pendientes entre ambas ecuaciones varían en un 29% una con respecto de la otra y las intercepciones un 5%.

Tabla 8.3. Pendientes e intersecciones de los ajustes lineales de los experimentos.		
	Pendiente	Intercepción
Sangre completa	0.017	3.21
Linfocitos aislados	0.012	3.36
Sangre c./Linfocitos a.	1.41	0.95

9. Discusión

Discusión

Está bien documentado que la mayoría de las exposiciones a radiación ionizante que sufren los seres humanos son a dosis bajas (≤ 200 mGy), la información en la literatura sobre los efectos biológicos a estas dosis es limitada. Sin embargo el objetivo de este trabajo fue determinar si dosis bajas de radiación ionizante producen un incremento en el número de micronúcleos en sangre completa y linfocitos aislados mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis.

Cabe destacar que aplicar el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis en sangre completa es más laborioso que aplicarlo en linfocitos aislados. El volumen máximo de sangre que se puede irradiar de manera uniforme, en el irradiador utilizado, es de 150 μl , lo que nos deja con aproximadamente 1/10 de las células que se ponen a cultivar cuando se realiza el ensayo con linfocitos aislados, por lo cual leer las laminillas preparadas con muestras de sangre completa en el microscopio toma más del doble de tiempo que leer laminillas preparada con muestras de linfocitos aislados. Además, la sangre completa requiere de 8 lavados con fijador tipo carnoy para preparar las laminillas, mientras que los linfocitos aislados requieren 3. En general, los linfocitos aislados y la sangre completa responden de manera similar al someterse al cultivo celular.

Existe variación individual en el número de micronúcleos producidos por la exposición de las muestras a la radiación ionizante, por lo tanto al realizar los promedios con los datos de los tres individuos, la desviación estándar es considerable. También existe variación entre cada uno de los experimentos que se realizaron al mismo individuo, no se obtiene siempre el mismo número de micronúcleos en cada uno de los experimentos (tabla 5.1 y 8.2).

Mill y col. [33] realizaron estudios en los que se mostró un incremento en el número de micronúcleos con respecto a la dosis beta de una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ usando células CHO-K1 y linfocitos humanos. He y col. [28] encontraron que el daño al ADN inducido por 50 mGy de radiación ionizante (rayos x) puede ser detectado a través del ensayo cometa, pero la tasa de micronúcleos no se incrementa significativamente hasta una dosis de 250 mGy. En el caso de los experimentos con linfocitos aislados, se encontró un incremento estadísticamente significativo en el número de micronúcleos a partir de los 160 mGy de radiación beta de una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. En el caso de los experimentos con sangre completa, el aumento en el número de micronúcleos fue estadísticamente significativo a partir de 200 mGy. Es posible que esta diferencia se deba a que en la sangre completa se encuentra además del plasma todos los elementos formes, los cuales pueden actuar como protectores de los linfocitos ante la radiación.

Sin embargo, realizando una comparación entre los resultados (medias), de los experimentos con sangre completa y los experimentos con linfocitos aislados, mediante la prueba estadística t (con un nivel de significancia del 0.05); no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

El riesgo de efectos estocásticos (cáncer y anomalías hereditarias) está convencionalmente relacionado con daño no reparado al ADN [34]. Para radiaciones débilmente ionizantes (tales como partículas beta de alta energía y los electrones secundarios producidos por la radiación gamma) el riesgo es primeramente considerado directamente proporcional al número de partículas que cruzan el núcleo cuando la exposición es a bajo nivel (i. e. una relación dosis-efecto lineal), y la curva hacia arriba correspondiente al término cuadrático es introducido para tomar en cuenta la interacción de las trayectorias separadas a altos niveles de exposición a nivel del ADN. Operacionalmente, una dosis baja es por lo tanto, una dosis que produce un efecto dentro de la región lineal de la curva de dosis- respuesta [35]. Mediante un ajuste por regresión lineal de los datos de los resultados obtenidos en los experimentos, obtenemos que la tendencia de la dosis- respuesta es lineal; con coeficiente de correlación lineal de 0.94 y 0.97 para sangre completa y linfocitos aislados respectivamente (Ecs. 8.2 y 8.4).

Una de las aplicaciones de la radiación ionizante en nuestros tiempos es en el área médica, principalmente en los estudios de diagnóstico como lo son las diferentes técnicas radiográficas, las tomografías computarizadas (CT) y los estudios de medicina nuclear por la técnica PET. En la *tabla 9.1* se muestran los valores de las dosis absorbidas en diferentes órganos por diferentes estudios radiográficos en adultos. En el caso de las tomografías computarizadas, los órganos en el haz pueden recibir dosis que van de los 10-100 mGy pero usualmente están en el rango de 15-30 mGy por secuencia [36]. En el caso de estudios PET las dosis dependen del radiofármaco empleado y dicha dosis está en un rango de 1-10 mGy por estudio [9].

Tabla 9.1. Dosis absorbida (mGy) en varios órganos por estudios radiográficos en adultos.

Estudio	Médula ósea	Tiroides	Pecho	Pulmones	Ovarios	Testículos
Cráneo (AP+Lat)	0.24	0.34	-	0.01	N	N
Pecho (AP+Lat)	0.04	0.07	0.16	0.19	N	N
Espina cervical (AP+Lat)	0.09	2.60	-	0.11	N	N
Espina torácica (AP+Lat)	0.17	0.30	1.00	1.10	N	N
Espina lumbar (AP+Lat)	1.10	N	-	1.70	3.70	0.06
Urografía	1.70	N	-	0.54	6.50	0.50
Mamografía de dos vistas	-	-	2.40	-	-	-

Las dosis presentadas en esta tabla pueden variar de acuerdo al tamaño del paciente, la tecnología empleada y los protocolos empleados por el radiólogo. N representa una dosis despreciable (<0.01 mGy) , “-“ implica que la estimación no fue hecha , AP indica una toma antero posterior y Lat indica una toma lateral [9].

Las dosis que se utilizaron en el desarrollo de esta tesis son mayores que las recibidas típicamente en estudios de imagenología que empleé radiación ionizante. Por ejemplo, la dosis a la que comenzamos a encontrar un incremento de micronúcleos estadísticamente significativo en linfocitos aislados fue una dosis de 160 mGy que equivale a aproximadamente a 67 mamografías de dos vistas, 7 tomografías computadas (suponiendo una dosis de 22 mGy por TC) y 16 estudios PET (suponiendo una dosis de 10 mGy por estudio).

Es importante considerar que sí hay un incremento en el número de micronúcleos a medida que aumenta la dosis, aunque sólo es estadísticamente significativo a partir de los 160 mGy para linfocitos aislados y a los 200 mGy para sangre completa. Por lo que el riesgo de daño por dosis bajas de radiación ionizante es solamente cuando los equipos no se encuentran bien calibrados, cuando se somete al mismo individuo a una serie de estudios imagenológicos o cuando los individuos irradiados presentan mutaciones que les confieren sensibilidad a la radiación, como es la mutación en el gen ATM o en los genes BRCA1 y BRCA2.

Un punto muy importante que debemos de tomar en cuenta es que la formación de un micronúcleo representa una rotura doble de la cadena del ADN, por lo que se considera daño irreparable.

10. Conclusiones

Conclusiones

En el presente trabajo se expusieron sangre completa y linfocitos aislados de sangre periférica a dosis bajas de radiación ionizante (≤ 200 mGy) producidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ con el objetivo de verificar si dichas dosis producen daño no reparable al ADN, determinado mediante la prueba de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis. De los resultados aquí mostrados se concluye lo siguiente:

- Las dosis bajas de radiación ionizante a las que fueron expuestos la sangre completa y los linfocitos aislados sí producen un incremento en la frecuencia de micronúcleos con respecto al control.
- En el caso de los linfocitos aislados, el incremento en la frecuencia de los MN es estadísticamente significativo a partir de los 160 mGy.
- En el caso de la sangre completa, el incremento en la frecuencia de los MN es estadísticamente significativo a la dosis de 200 mGy.
- Las curvas de dosis-respuesta tanto para linfocitos aislados como para sangre completa tiene una tendencia lineal.
- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias del número de micronúcleos en función de la dosis de los experimentos con sangre completa y linfocitos aislados.
- Resulta más fácil y rápido hacer el conteo de MN en linfocitos aislados que en sangre completa.

Bibliografía

- [1] Faiz M. Khan. *The Physics of Radiation Therapy, Fourth Edition*. Wolters Kluwer Health, USA (2010).
- [2] Attix, F. H. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. John Wiley & Sons, USA (1986).
- [3] Villegas Navarro M.F. *Daño Inducido en DNA por Exposición a Bajas Dosis de Radiación Ionizante de Baja y Alta Transferencia Lineal de Energía*. Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica). UNAM (2009).
- [4] Iturbe Hermann F. *Protección Radiológica*. ICN-UNAM, 2007.
- [5] Podgorsak, E. B. *Radiation Oncology Physics: A handbook for teachers and students*. IAEA. Vienna (2005).
- [6] Murat Berzadeoglu, Gokhan Ozyigit, Cuneyt Ebruli. *Basic Radiation Oncology*. Springer. USA (2010).
- [7] Ville, C. y col. *Biología de Ville*. McGraw-Hill Interamericana editores. 4ª. Edición traducida del inglés. México (1996).
- [8] Sankaranarayanan, K. Wassom, J.S. *Reflections on the impact of advances in the assessment of genetic risks of exposure to ionizing radiation on international radiation protection recommendations between the mid-1950's and the present*. *Mutat. Res.* 658:1-27 (2008).
- [9] Hall, E. J. *Radiobiology for the radiologist*. Lipponcott Williams & Wilkins. 4ª Ed. New York, USA (1994).
- [10] International Commission on Radiation Protection. *ICRP Publication 60* (1990).

- [11] Turrence, G. Paul, P. Laflair, B. *Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53*. *Oncogene*. 20: 5100-5110 (2001).
- [12] Brandan, M. E. Díaz R y Ostrosky, P. *La radiación al servicio de la vida*. SEP, FCE, CONACYT. La ciencia para todos. 3ª. Ed. México, D.F. (2003).
- [13] Brenner, D. J. y col. *Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: Assessing what we really know*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 25: 13761-13766 (2003).
- [14] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. *Sources and effects of ionizing radiation. Vol. II: Annex G biological effects at low radiation doses*. UNSCEAR (2000).
- [15] Prasad, K. N. Cole, W. C. Hasse, G. M. *Health risks of low dose ionizing radiation in humans: A review*. *Exp. Biol. Med.* 229: 378-382 (2004).
- [16] Brenner, D. J. Scahs, R.K. *Estimating radiation-induced cancer risks at very low doses: rationale for using a linear no-threshold approach*. *Radiat. Environ. Biophys.* 44: 253-256 (2006).
- [17] Memmler. *The Human Body in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, USA (2005).
- [18] Fenech M. *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*. *Mutat. Res*, 285: 35-44, (1993).
- [19] Zalacain, Sierrasesúмага L., Patiño A. *El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos*. *Anales Sis San Navarra*, 28:227-236 (2005).
- [20] Rigger M G. *Glossary of Genetics Classical and Molecular*. Alemania, Springer Verlag, (1981).

- [21] Fenech, M Chang, W.P., Kirsch-Volders, M, Holland, N, Bonassi, S. y Zeiger, E. *Human MicroNucleos project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. Mutation Research, 534: 65-75 (2002).
- [22] Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. Mutat. Res, 455:81-95 (2000).
- [23] Landi S., Lazzolino E., Barale R. *Are Baseline frecuencies of SCEs, Cas and MN in human lymphocytes related to haematological values?*. Mutat. Res, 469: 159-166 (2000).
- [24] Lee B., Lee S., Kim H. *Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonil contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, betacarotene and red ginseng)*. Cancer left, 132: 219.227 (1998).
- [25] Vral, A., Verhaegen F., Thierens. *Micronuclei induced by fast neutrons versus 60Co-rays in human peripheral blood lymphocytes*. Int. J. Radiant. Biol., 65: 321-328 (1994).
- [26] Williems P, August, L., Slabbert. *Automated micronucleus (MN) scoring for population triage in case of large radiations events*. Int. J. Radiat. Biol., 86: 2-11 (2010).
- [27] Vral A., Fenech M. and Hubert Thierens. *The mcicronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionizing radiation exposure*. Mutagénesis, 26: 11-17 (2011).
- [28] He J, Chen W, Jin L, Jin H. *Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation*. Mutat Res, 469: 223-31(2000).
- [29] Ponzinibbio V., Crudeli C. *Low-dose radiation employed in diagnostic imaging causes genetic effects in cultured cells*. Informa Healthcare, 51: 128-133 (2010).
- [30] Hiyma A., Nohara C., Kinjo S., Taira W. *The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly*. Scientific reports 2:570 (2012).

- [31] Rodríguez, A. *Diseño, construcción y caracterización dosimétrica de un irradiador de bajas dosis para muestras biológicas*. Tesis de licenciatura en física. Facultad de Ciencias, UNAM (2003).
- [32] Mettler F, Huda W, Yoshizumi T. *Effective doses in radiology and diagnostic nuclear medicine*. Radiology 248: 254-263 (2008).
- [33] Mill, A.J. Wells, J. Hall S.C. Butler A. *Micronucleus induction in human lymphocytes: Comparative effects of x rays, alpha particles, beta particles and neutrons and implications for biological dosimetry*. Rad. Res. 145: 575-585 (1996).
- [34] International Commission on Radiation Protection. *ICRP Publication 60* (2007).
- [35] Wakeford R., Tawn E. *The meaning of low dose and low dose rate*. J. Radiol. Prot. 30: 1-3 (2010).
- [36] Little M., Wakeford R., Tawn E. *Risks Associated with low doses and low doses rates of ionizing radiation*. Radiology. 251: 6-12 (2009).
- [37] Fazel R., Krumholz H., Wang Y. *Exposure to low-dose ionizing radiation from medical imaging procedures*. N Engl Med 361: 849-67 (2009).
- [38] Crasta K., Ganem J., Dagher Regina. *DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis*. Nature 428: 53-58 (2012).
- [39] Tubiana M., Aurengo A., Averbeck D., *The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses*. J. Radiol. Prot. 26: 317-324 (2006).
- [40] Salazar A. M., Sordo M., Ostrosky P. *Relationship between micronuclei formation and p53 induction*. Mutation research. 672 : 124-128 (2009).
- [41] <http://ie.lbl.gov/education/isotopes.htm> (tabla de isótopos).