



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS

EFFECTO DE DOSIS BAJAS DE RAYOS X DE MAMOGRAFÍA EN LÍNEAS
CELULARES CON DISTINTOS ESTATOS GÉNICOS

TESIS

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

PRESENTA:

JOSÉ ALEJANDRO JIMÉNEZ ACOSTA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA ESTER BRANDAN SIQUÉS,
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

M. EN C. CÉSAR GUSTAVO RUIZ TREJO,
INSTITUTO DE FÍSICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO 2017



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.

Para mis papás, José y Carmen.

Para mis hermanas, Lizeth y Denisse.

Para mi familia, por el gran apoyo incondicional que siempre me han dado.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme dado la oportunidad de ser un orgulloso miembro de su comunidad y permitirme crecer tanto personal como profesionalmente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Instituto de Física, por abrirme sus puertas y permitirme hacer uso de sus equipos e instalaciones en cada una de las etapas de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado a través del programa de Becas Nacionales, durante el periodo de mis estudios de posgrado.

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el apoyo económico brindado en distintos momentos de mis estudios.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT IN205116, por el apoyo económico otorgado para la elaboración de este trabajo.

Agradecimientos personales

A mi padre y a mi madre, por el amor y la educación que me han dado. A los dos, gracias por toda la motivación y la confianza que han depositado en mí.

A mis hermanas Lizeth y Denisse, por su ejemplo y las diversas lecciones que me han dado o hemos aprendido juntos. Así mismo, por todo el apoyo que me han dado siempre.

A mis amigos Andrea, Carlos, Dulce y Samanta, que a pesar de la distancia siempre han estado para mí en todo momento. A Cristhoper, Eddy, Edgar, Héctor e Ivan, por todos los momentos compartidos desde que decidimos estudiar una formación en física.

A la Dra. Patricia Ostrosky, por ser mi tutora y haberme aceptado en su laboratorio. Por toda las enseñanzas que he recibido y por animarme a conocer temas novedosos en otras áreas de la ciencia con las cuales un físico regularmente no está en contacto.

A la Dra. María Ester Brandan y al M. en C. César Ruiz, por ser parte de mi comité tutor. Por todo su apoyo, sus excelentes clases y sus valiosos comentarios que ayudaron a la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado de titulación: Dra. Patricia Ostrosky, Dra. Ana María Salazar, Dra. Isabel Gamboa, M. en C. Eduardo López y M. en C. Héctor Galván, por sus comentarios a mi trabajo.

A la Q.F.B. Lourdes Moserrat Sordo, por la asesoría técnica brindada para la elaboración de esta tesis. Por todos sus consejos, amabilidad y paciencia.

A la Dra. Ana María Salazar, por haberme enseñado el trabajo en el laboratorio. Por su consejo y apoyo en todo momento.

Al laboratorio de dosimetría TL y a su encargado, el M. en C. Eduardo López por la

asesoría, el apoyo técnico brindado durante los experimentos y por la disposición mostrada para que este trabajo se llevara a cabo.

A mis compañeros de maestría, por todos los momentos compartidos en las distintas etapas de nuestra formación profesional.

A mis compañeros de laboratorio, por haberme involucrado en áreas de la investigación en la cual nunca creí haber podido conocer; por el ambiente multidisciplinario que contribuyó a que todos aprendiéramos un poco de todo.

La gratitud da sentido a nuestro pasado, trae paz al presente y crea una visión para el mañana.

Autor desconocido

Contenido

Resumen	IV
Abstract	VI
Planteamiento del estudio	VII
1 Introducción	1
1.1. Interacción de la radiación con la materia	1
1.1.1. Tipos de radiación ionizante (RI)	1
1.1.2. Interacción de fotones con la materia	3
1.1.3. Atenuación de fotones en la materia	7
1.1.4. Absorción de energía de fotones	10
1.2. Producción de rayos X	12
1.2.1. El tubo de rayos X	13
1.2.2. Espectro de un tubo de rayos X	13
1.2.3. Tubo de rayos X para mamografía y filtración del haz	16
1.2.4. Capa hemirreductora y energía efectiva	17
1.3. Dosimetría termoluminiscente	18
1.3.1. Bandas de energía y niveles localizados	18
1.3.2. Trampas y centros de recombinación	20
1.4. Efectos biológicos de la radiación ionizante	21
1.4.1. Daño al ADN debido a la exposición a radiación ionizante	21
1.4.2. Reparación del daño al ADN	22
1.4.3. Radiosensibilidad	25
1.4.4. Riesgo debido a la exposición a radiación ionizante	26
1.5. Gen ATM	31
1.5.1. Función y mecanismos de activación de ATM	31

1.5.2.	Enfermedad ataxia telangiectasia y mutaciones en ATM	33
1.6.	Micronúcleos	35
2	Metodología	37
2.1.	Calibración de haces de rayos X para mamografía	37
2.1.1.	Rendimiento	38
2.1.2.	Capa hemirreductora	38
2.2.	Dosimetría termoluminiscente	39
2.2.1.	Irradiaciones en aire	39
2.2.2.	Irradiaciones en PMMA	42
2.3.	Cultivo, conteo y viabilidad de líneas celulares	44
2.3.1.	Cultivo celular	44
2.3.2.	Conteo celular	44
2.3.3.	Viabilidad celular	45
2.4.	Evaluación del efecto biológico de la dosis	45
2.4.1.	Irradiación de líneas celulares	45
2.4.2.	Genotoxicidad de las dosis de RI	46
2.5.	Análisis estadístico	48
3	Resultados	49
3.1.	Dosimetría de los haces de radiación	49
3.1.1.	Calibración de los haces de rayos X	49
3.1.2.	Irradiación de dosímetros termoluminiscentes en aire	50
3.1.3.	Irradiación de dosímetros termoluminiscentes en PMMA	53
3.2.	Evaluación del efecto biológico de la dosis	54
3.2.1.	Índice de división nuclear	54
3.2.2.	Frecuencia de micronúcleos	55
3.2.3.	Comparación entre líneas celulares	56
4	Discusión	59

5 Conclusiones	62
Bibliografía	64

Resumen

El gen ATM está involucrado en la reparación del daño en el ADN causado por agentes genotóxicos como la radiación ionizante (RI). Los estudios epidemiológicos y moleculares recientes han demostrado que los portadores monoalélicos (heterocigotos) de mutaciones de ATM muestran una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer de mama. Por lo tanto, en este grupo de riesgo, no es del todo bien conocido si los beneficios de la mamografía son mayores que los riesgos asociados a dicho estudio.

En este trabajo, se evaluó el efecto genotóxico de dosis bajas de rayos X mamográficos en una línea celular con estatus génico normal y una heterocigota recesiva para el gen ATM (ATM(+/-)). Se emplearon diferentes calidades de haz a partir de las combinaciones Mo/Mo/28 kV (convencionalmente usado en la clínica) y Rh/Rh/34 kV (empleado para mamas densas) provenientes del tubo de rayos X de un mastógrafo. Las células fueron irradiadas al interior de un maniquí de PMMA (diseñado y fabricado para este trabajo) con el cual se simulaban las condiciones de atenuación y dispersión de la radiación en una mama, empleando valores de dosis absorbida en agua de 5, 10, 20 y 40 mGy para la combinación Mo/Mo/28 kV, y 40 mGy para la combinación Rh/Rh/34 kV.

El efecto genotóxico de la dosis se evaluó empleando el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis. No se observó que las dosis empleadas produjeran un efecto citostático en alguna de las líneas celulares empleadas y sólo se produjo un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos a 40 mGy en el caso de la línea celular ATM(+/-) (la energía del haz no modificó tales conclusiones). Las curvas dosis-respuesta de ambas líneas celulares manifestaron una tendencia lineal, siendo mayor la pendiente asociada a la línea ATM(+/-) en un 65% respecto a la línea con estatus génico normal. No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las frecuencias de micronúcleos inducidas por 40 mGy en ambas líneas celulares por el hecho de irradiar con una calidad de haz diferente. Sin embargo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa de las medias del número de micronúcleos inducidos por 40 mGy, considerando ambas calidades de haz,

entre las dos líneas celulares.

Abstract

The ATM gene is involved in the repair of DNA damage induced by genotoxic agents such as ionizing radiation. Recent epidemiological and molecular studies have shown that monoallelic mutation carriers ATM (heterozygotes) increased susceptibility to developing breast cancer. Thus, in this risk group, is not all that well known whether the benefits of mammography are greater than the risks that such study may involve.

In this work, the genotoxic effect of low-doses of mammographic X-rays in a cell line with normal gene status and a recessive heterozygous for ATM gene (ATM (+/-)) were assessed. The beam qualities used were the combinations Mo/Mo/28 kV (conventionally used in clinic) and Rh/Rh/34 kV (used for dense breasts), from a mammography X-ray tube. The cells were irradiated inside a PMMA phantom (designed and manufactured for this work), simulating the attenuation and scattering of radiation within a breast, using values of water absorbed dose equal to 5, 10, 20 and 40 mGy for the Mo/Mo/28 kV combination, and 40 mGy for the Rh/Rh/34 kV combination.

The genotoxic effects of radiation doses in water were evaluated using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. The doses used did not produce a cytostatic effect in any of the cell lines used and a significant increase in micronucleus frequency was only observed at 40 mGy in the ATM(+/-) cell line (the beam energy not change these conclusions). The dose-response curves of both cell lines expressed a linear trend, being higher the slope associated with the ATM(+/-) line cell by 65% with respect to the line with normal genetic status. A statistically significant difference was not found between the mean frequency of micronuclei induced by 40 mGy in both cell lines by the fact of using a different beam quality. However, a statistically significant difference was found between the mean frequency of micronuclei induced by 40 mGy between the two cell lines, considering both beam qualities.

Planteamiento del estudio

Antecedentes

Debido a su frecuencia de incidencia, el cáncer de mama es considerado uno de los problemas de salud más graves tanto en México como en el mundo. A nivel mundial, el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común y es el más frecuente entre las mujeres, con un número estimado de 1.67 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012 (25 % de todos los cánceres) y ubicándose como la quinta causa de muerte por cáncer. En México, representa el 24.8 % de todos los casos de cáncer diagnosticados en mujeres y es su principal causa de muerte por cáncer (14.2 % de todas las muertes por cáncer en mujeres) [1].

Los estudios epidemiológicos y moleculares recientes han demostrado que las mutaciones que causan la ataxia-telangiectasia en los portadores bialélicos (homocigotos) confieren susceptibilidad al cáncer de mama en los portadores monoalélicos (heterocigotos). ATM es el quinto gen de reparación del ADN, junto con BRCA1, BRCA2, TP53 y CHEK2, que ha mostrado estar involucrado en la predisposición a cáncer de mama, donde ATM y CHEK2 se asocian a un riesgo moderado. Las razones de esto no se conocen y tampoco se sabe cómo las mutaciones de ATM interactúan con otros factores de riesgo, tanto genéticos como no genéticos [2–5].

En la actualidad existe poca información para guiar a conclusiones específicas acerca del componente genético común del riesgo asociado a cáncer inducido por dosis bajas de radiación ionizante (RI) [6]. A nivel *in vitro* se han realizado algunos trabajos vinculados a dosis bajas de rayos X. En particular, uno de ellos fue llevado a cabo por Stankevics y col. [7]. Ellos irradiaron una línea celular de mama cancerosa (MCF-7) y una no cancerosa (MCF-10A) con la calidad de haz empleada en mamografía. Manejaron tres dosis bajas (3, 12, 48 mGy), una dosis alta (5 Gy) y evaluaron su efecto 4 y 24 horas posteriores a la irradiación por medio del ensayo cometa en su versión alcalina (ensayo empleado para evaluar el daño al ADN). Encontraron un nivel de daño significativamente mayor 4 horas posteriores a la irradiación en ambas líneas celulares, siendo mayor para la línea MCF-10A que en la MCF-7.

Sin embargo, a las 24 horas las células de la línea MCF-10A recuperaron la integridad del ADN, por lo menos a dosis bajas, mientras que las células de la línea MCF-7 presentaron una persistencia de los daños del ADN. Esto está de acuerdo con los datos de Francisco y col., los cuales muestran que la línea celular MCF-7 tiende a acumular más lesiones del ADN que la MCF-10A después de la exposición a radiación γ [8].

Se sabe que no todas las radiaciones de bajo LET tienen la misma eficacia a dosis bajas. Se ha visto que dosis bajas de RI son capaces de producir daño al ADN de líneas celulares y linfocitos, siendo tal daño dependiente de la LET [9,10]. También se ha observado que la eficacia biológica relativa (RBE, por sus siglas en inglés¹) para la inducción de cromosomas dicéntricos a dosis bajas de rayos X de 200 kV, moderadamente filtrados, respecto a los rayos gamma de alta energía es aproximadamente de 2 a 3, mientras que la RBE para el mismo efecto para rayos X de mamografía de 29 kV respecto a rayos X de 200 kV, moderadamente filtrados, es un poco mayor que 1.5 [6].

Para efectos de protección radiológica, la ICRP considera que la información disponible, asociada a genes de susceptibilidad a cáncer, es insuficiente para proporcionar una estimación cuantitativa del riesgo a desarrollar un cáncer inducido por dosis bajas de RI en la población portadora de los mismos [11]. La investigación a futuro deberá identificar los factores que determinan la aparición del cáncer de mama en los portadores de mutaciones de ATM, los riesgos a otros tipos de cáncer, la sensibilidad con la dosis de radiación (particularmente dosis bajas) y la utilidad clínica de la aplicación de pruebas de mutación del gen ATM. Llegar a conocer cuáles individuos con mutaciones de ATM desarrollan cáncer será crucial para la aplicación clínica. La fase 2 del reporte BEIR VII hace énfasis en la necesidad de tal investigación [6].

Justificación

La mamografía es una técnica de radiodiagnóstico empleada en parte de la población femenina para la detección del cáncer de mama. Las dosis bajas de rayos X, similares a las

¹La RBE es el cociente entre la dosis absorbida de la radiación de interés y la dosis de rayos X de 200 kV que dan lugar al mismo nivel de efecto biológico [11].

impartidas por dicha técnica, han sido descritas como inductoras de rompimientos cromosómicos. Por ello, es de interés y preocupación dilucidar las consecuencias que dicha exposición pudiese conllevar, particularmente en personas portadoras de mutaciones en genes que participan en la reparación del ADN.

Hipótesis

Las dosis bajas de rayos X como las impartidas por estudios mamográficos producirán daño al ADN, en una línea celular con mutación en el gen ATM, que no será reparado, pero que será reparado en una línea celular con estatus génico normal.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto genotóxico de dosis bajas de rayos X como las impartidas por estudios mamográficos en una línea celular con mutación en el gen ATM, empleando el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis.

Objetivos específicos

- Estandarizar las condiciones de irradiación: calibración de haces de mamografía, calibración en aire de la respuesta de dosímetros termoluminiscentes y determinación de la tasa de dosis absorbida en agua al interior de un maniquí de PMMA.
- Estandarizar el uso de maniquís de PMMA para la irradiación de células.
- Irradiar dos líneas celulares con distinto estatus génico: normal y ATM(+/-).
- Evaluar el efecto citostático y genotóxico en las líneas celulares por las dosis de radiación empleadas.
- Analizar los resultados encontrados con cada una de las líneas celulares.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Interacción de la radiación con la materia

1.1.1. Tipos de radiación ionizante (RI)

En física se entiende a la radiación como la emisión, propagación y transferencia de energía en cualquier medio en forma de ondas electromagnéticas o partículas. En particular, la radiación ionizante (RI) se caracteriza, principalmente, por su habilidad para ionizar y excitar los átomos de la materia con la cual interacciona. Dado que la energía necesaria para provocar que un electrón de valencia escape de un átomo es del orden de 4-25 eV, la radiación debe poseer energía cinética o cuántica mayor que esa magnitud para poder ser llamada “*ionizante*” [12].

Los tipos más importantes de radiación ionizante son los siguientes [12]:

- *Rayos gamma* (γ): Radiación electromagnética o fotones emitidos desde un núcleo o desde una reacción de aniquilación entre materia y antimateria.
- *Rayos X*: Radiación electromagnética o fotones emitidos por partículas cargadas (usualmente electrones) al cambiar de un nivel de energía atómico a otro o al disminuir su velocidad dentro de un campo de fuerzas de Coulomb. La diferencia fundamental con los rayos γ es su origen.
- *Electrones rápidos*: Si su carga es positiva, son llamados positrones. Si son emitidos por un núcleo son llamados rayos β (positivos o negativos). Si son resultado de una colisión de una partícula cargada con átomos son llamados rayos δ .
- *Partículas cargadas pesadas (PCP)*: Son usualmente obtenidas de la aceleración por un campo de fuerzas de Coulomb en un acelerador Van de Graaff, en un ciclotrón o en un acelerador lineal de partículas pesadas. Algunos tipos son el protón, el deuterón

y las partículas alfa. Las partículas alfa también son emitidas por algunos núcleos radiactivos.

- *Neutrones*: Son partículas eléctricamente neutras obtenidas de reacciones nucleares (por ejemplo, (p, n) o la fisión nuclear).

La Comisión Internacional de Unidades y Medidas Radiológicas (ICRU, por sus siglas en inglés) ha recomendado cierta terminología al referirse a la RI, la cual hace énfasis en la gran diferencia entre las interacciones de la radiación cargada y la no cargada con la materia [12]:

- *Radiación directamente ionizante*: Partículas cargadas que entregan su energía directamente a la materia, a través de muchas pequeñas interacciones por fuerzas de Coulomb a lo largo de su trayectoria.
- *Radiación indirectamente ionizante*: Neutrones y fotones de rayos X o γ (es decir, partículas no cargadas) que primero transfieren su energía a partículas cargadas en la materia que atraviesan a lo largo de su trayectoria. Las partículas cargadas liberadas son las que entregan la energía a la materia.

Una distinción adicional es realizada en relación a la capacidad de ionización de la radiación. La transferencia lineal de energía (LET, por sus siglas en inglés) de una partícula cargada se define como la densidad espacial de la energía localmente transferida por la partícula al medio con el cual interacciona por unidad de longitud de su recorrido. Se expresa en keV/ μm y corresponde a las pérdidas energéticas por procesos de ionización y excitación. La LET es proporcional a la carga de la partícula incidente e inversamente proporcional a la energía de dicha partícula. El umbral entre radiaciones de alta y baja LET es 10 keV/ μm . Los fotones de alta energía (por ejemplo, rayos γ de ^{60}Co) liberan electrones Compton de alta energía y baja LET. Fotones de menor energía que el ejemplo anterior (por ejemplo, los rayos X empleados en radiodiagnóstico) producen electrones Compton de menor energía y con una LET más alta. Los neutrones se consideran densamente ionizantes y se asocian a alta LET, pues liberan protones rápidos y núcleos atómicos más pesados que tienen alta LET [6, 11].

1.1.2. Interacción de fotones con la materia

Los fotones carecen de masa en reposo y carga eléctrica. Al atravesar la materia, los fotones son dispersados, absorbidos o pueden penetrar sin interaccionar. Entre los principales tipos de interacción de los fotones con la materia se encuentran: la dispersión de Rayleigh, la dispersión Compton y la absorción fotoeléctrica [12, 13].

(a) Dispersión de Rayleigh

En la dispersión de Rayleigh (DR, también conocida como “*dispersión coherente*” o “*clásica*”), el fotón incidente interacciona con el átomo como un todo y lo excita, en oposición a lo que ocurre en la dispersión Compton o en el efecto fotoeléctrico¹. Esta interacción ocurre, principalmente, para rayos X de muy baja energía, como los usados en mamografía (de 15 a 30 keV). Durante dicho evento, la componente eléctrica de la onda electromagnética del fotón incidente cede energía, causando que todos los electrones en el átomo oscilen en fase. Los electrones del átomo pueden inmediatamente liberar esta energía, emitiendo un fotón de la misma energía pero en una dirección ligeramente diferente (figura 1.1). En general, el ángulo promedio de dispersión disminuye con el incremento de la energía de los rayos X. En esta interacción, no se liberan electrones, por lo que no se produce ionización [12, 13].

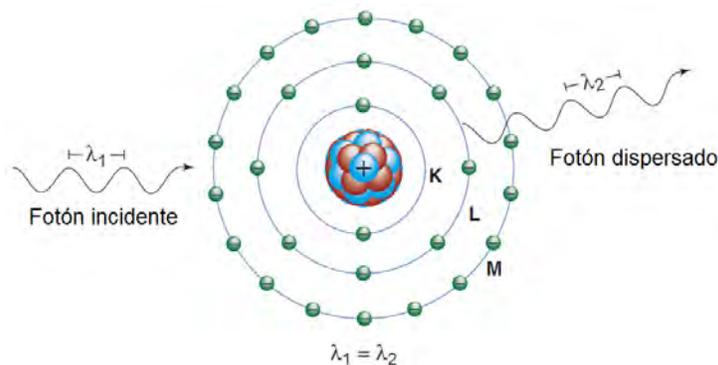


Figura 1.1: Un fotón incidente λ_1 interacciona con un átomo y se emite un fotón dispersado λ_2 con la misma energía. K, L y M son capas electrónicas [13].

En imagen médica, la detección de rayos X dispersos tiene un efecto perjudicial sobre la calidad de imagen. Sin embargo, este tipo de interacción tiene baja probabilidad de ocurrencia

¹En la dispersión Compton y en el efecto fotoeléctrico la interacción ocurre con electrones individuales.

en el rango de energía de diagnóstico (energía baja). En el tejido blando, la dispersión de Rayleigh puede representar hasta el 10% de las interacciones que sufren los rayos X de 30 keV [12, 13].

(b) Dispersión Compton

La dispersión Compton (DC, también conocida como “*dispersión inelástica*” o “*no clásica*”) es la interacción predominante para fotones con el tejido blando en el rango de energía de diagnóstico. Esta interacción ocurre con mayor probabilidad entre fotones y electrones de la capa de valencia (figura 1.2). El electrón es liberado del átomo, y el fotón dispersado es emitido con cierta reducción de energía en relación al fotón incidente. Como ocurre en todos los tipos de interacciones, la energía y el momento deben conservarse. Así, la energía del fotón incidente (E_0) es igual a la suma de la energía del fotón disperso (E_{dis}) y la energía cinética del electrón liberado (E_{e^-}), como se muestra en la ecuación 1.1. Aquí, la energía de ligadura (o de enlace) del electrón que fue liberado es relativamente pequeña y puede ser ignorada [12, 13].

$$E_0 = E_{dis} + E_{e^-} \quad (1.1)$$

La dispersión Compton da lugar a la ionización del átomo. El electrón liberado perderá su energía cinética a través de la excitación y la ionización de los átomos del medio circundante. El fotón disperso puede atravesar el medio sin interactuar o puede sufrir interacciones subsiguientes, tales como dispersión Compton, absorción fotoeléctrica o dispersión de Rayleigh. El valor de E_{dis} puede ser calculado a partir de su ángulo de dispersión (θ), con respecto a la trayectoria del fotón incidente, y de E_0 como:

$$E_{dis} = \frac{E_0}{1 + \frac{E_0}{m_0c^2} (1 - \cos \theta)} \quad (1.2)$$

donde m_0c^2 es la energía del reposo del electrón [12, 13].

A medida que aumenta E_0 , tanto el fotón dispersado como el electrón Compton son dispersados más probablemente hacia la dirección de avance. Además, para un valor de θ dado, E_{dis} disminuye con el incremento de E_0 , por lo que E_{e^-} aumenta. Las leyes de la conservación de la energía y el momento limitan el ángulo de dispersión y la transferencia de

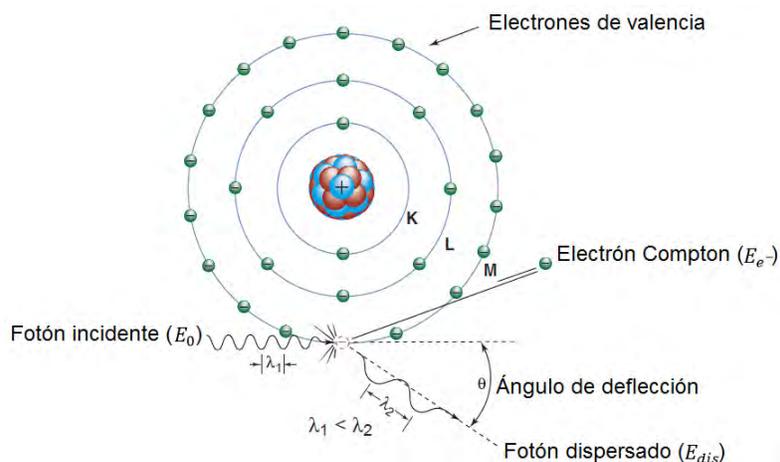


Figura 1.2: Un fotón incidente E_0 interacciona con un electrón de la capa de valencia, se libera un electrón E_{e^-} y se emite simultáneamente un fotón dispersado E_{dis} en un ángulo θ en relación a la trayectoria del fotón incidente. K, L y M son capas electrónicas [13].

energía al fotón y al electrón liberados. El ángulo de dispersión de dicho electrón no puede exceder 90° , mientras que para el fotón puede tomar cualquier valor, incluyendo retrodispersión (180°). La transferencia máxima de energía al electrón se produce cuando el fotón es retrodispersado [12, 13].

La probabilidad relativa de una interacción Compton aumenta, en relación a los otros tipos de interacción de fotones, con el incremento de E_0 . La probabilidad de la interacción Compton depende de la densidad electrónica². En tejido, el número total de electrones por unidad de masa es prácticamente constante³. Por tanto, la probabilidad de que la dispersión Compton se produzca en tejido, por unidad de masa, es independiente de Z ⁴. A su vez, dicha probabilidad, por unidad de volumen, es aproximadamente proporcional a la densidad del material [12, 13].

²Dada como (Número de electrones \times densidad)/masa.

³La ausencia de neutrones en el átomo de hidrógeno, en comparación con otros elementos, implica que la densidad electrónica se duplique, aproximadamente. Por ello, los materiales hidrogenados tienen mayor probabilidad de producir dispersión Compton que los materiales no hidrogenados de igual masa.

⁴ Z , llamado número atómico, es el número de electrones por átomo neutro de un elemento. Al número de electrones por molécula de un compuesto se le denomina Z_{ef} (Z efectivo).

(c) Absorción Fotoeléctrica

En la absorción fotoeléctrica (AF), toda la energía del fotón incidente (E_0) es transferida a un electrón, el cual es liberado del átomo (figura 1.3). La energía cinética del fotoelectrón expulsado (E_{ef}) es igual E_0 menos la energía de enlace del electrón orbital (E_b) [12, 13]:

$$E_{ef} = E_0 - E_b \quad (1.3)$$

Para que la absorción fotoeléctrica se produzca, E_0 debe ser mayor o igual que E_b . Es más probable liberar un electrón cuya unión energética sea más cercana (pero no mayor) a E_0 . Después de una interacción fotoeléctrica, el átomo es ionizado, provocando una vacancia en una de sus capas electrónicas. Esta vacancia es ocupada por un electrón de una capa con una energía de enlace menor, lo cual crea otra vacancia que es ocupada por otro electrón produciendo así una cascada electrónica hacia las capas internas. La diferencia entre las energías de enlace es liberada, ya sea como rayos X característicos o como electrones Auger [12, 13].

La probabilidad de que se produzca una absorción fotoeléctrica en un material, por unidad de masa, es aproximadamente proporcional a Z^3/E_0^3 . Por tanto, el efecto fotoeléctrico domina cuando los fotones de energías más bajas interactúan con materiales de Z alta. Aunque, en general, la probabilidad de que se produzca la absorción fotoeléctrica disminuye con el aumento de E_0 , dicha curva de probabilidad exhibe ciertas discontinuidades denominadas bordes de absorción. Para fotones con E_0 justo por encima del borde de absorción, la probabilidad de este tipo de interacción es mucho más grande que cuando E_0 está ligeramente por debajo de dicho borde [12, 13].

La absorción fotoeléctrica es el principal modo de interacción para rayos X de diagnóstico con receptores de imagen, materiales de contraste radiográfico y blindajes de la radiación (Z alta). Por el contrario, en materiales de Z baja (como el tejido y el aire), la dispersión Compton domina en un mayor rango de energías, incluyendo rayos X de diagnóstico y terapéuticos. A energías por debajo de 50 keV, las interacciones fotoeléctricas en los tejidos blandos desempeñan un papel importante en la formación de imágenes médicas. La absorción fotoeléctrica puede ser empleada para amplificar las diferencias en la atenuación entre teji-

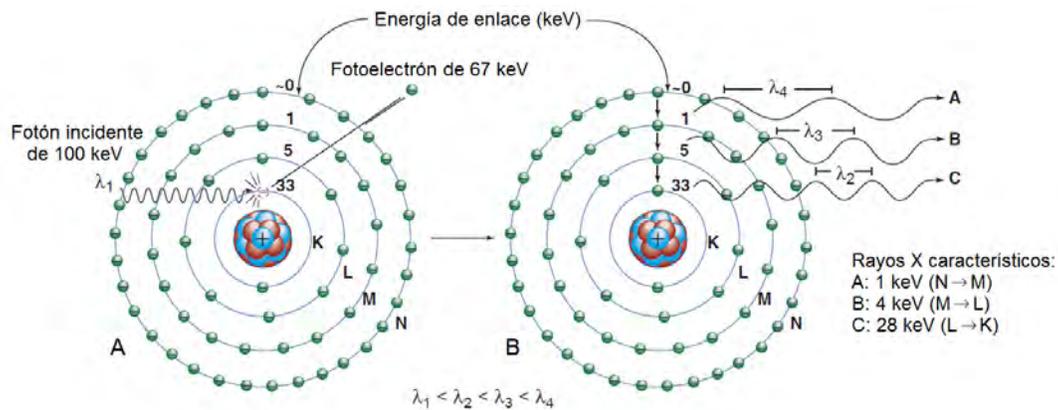


Figura 1.3: A. El fotón incidente sufre una absorción fotoeléctrica con un átomo de yodo. En este caso, un electrón de la capa K es expulsado. B. La vacancia creada produce la transición de un electrón de la capa L a la K. La diferencia en sus energías de enlace da origen a un fotón de 28 keV. Esta cascada electrónica continuará, dando origen a otros fotones de energías más bajas. Aunque no se muestra en este diagrama, electrones Auger de diversas energías podrían haber sido emitidos en lugar de fotones [13].

dos con valores de Z muy similares, mejorando así el contraste en la imagen. Esta absorción diferencial es explotada en la mamografía para mejorar el contraste en la imagen [12, 13].

1.1.3. Atenuación de fotones en la materia

La atenuación es la remoción de fotones en un haz a medida que éste pasa a través de la materia. Es causada por la absorción y la dispersión de los fotones primarios, participando, en mayor o menor grado, los mecanismos de interacción discutidos previamente [14].

1.1.3.1. Coeficiente lineal de atenuación

En la figura 1.4 se muestra un arreglo experimental diseñado para medir la atenuación de un haz de fotones monoenergéticos, el cual incide en un material atenuador de espesor variable. Se coloca un detector a una distancia fija lo suficientemente lejos del atenuador como para que sólo lleguen a él fotones primarios⁵. Es decir, se tiene una configuración experimental diseñada para excluir fotones dispersos de la medición del detector. A este arreglo se le conoce como geometría de haz angosto. Bajo estas condiciones, el número de fotones removidos del haz (dn) es proporcional al número de fotones incidentes (N_0) y al

⁵Los fotones primarios son aquellos fotones que pasan a través del material sin interactuar.

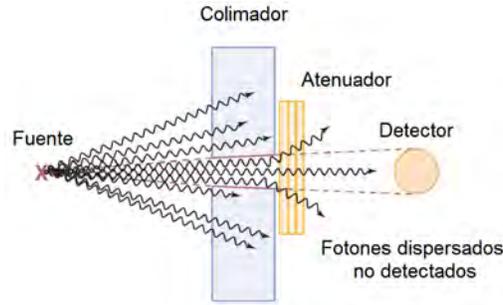


Figura 1.4: Arreglo experimental para el estudio de la atenuación de un haz angosto. La relación entre el detector y su blindaje es tal que casi no llegan fotones dispersos a él [13].

espesor del atenuador (dx). Matemáticamente, tenemos $dn \propto N_0 dx$, o:

$$dn = \mu N_0 dx \quad (1.4)$$

donde μ es una constante de proporcionalidad denominada coeficiente lineal de atenuación. En general, μ representa la fracción de fotones removidos de un haz monoenergético por unidad de espesor del material, normalmente expresado en cm^{-1} . Además, μ está dado por la suma de los coeficientes lineales de atenuación individuales para cada tipo de interacción (figura 1.5a) [13, 14]:

$$\mu = \mu_{DR} + \mu_{DC} + \mu_{AF} + \mu_{PP} \quad (1.5)$$

donde μ_{DR} , μ_{DC} , μ_{AF} y μ_{PP} son los coeficientes lineales de atenuación de los tipos de interacción de Rayleigh, Compton, fotoeléctrica y de producción de pares⁶, respectivamente.

En el rango de energía de diagnóstico, μ disminuye al aumentar la energía del haz de fotones, excepto en los “*bordes de absorción*” (figura 1.5b). Un borde de absorción es un incremento abrupto de μ debido al incremento de la probabilidad de absorción fotoeléctrica cuando la energía del fotón excede justo la energía de enlace de los electrones de las capas internas (por ejemplo, K, L, M), por lo que aumenta el número de electrones disponibles para la interacción. Este proceso es muy importante en los elementos de Z alta [13, 14].

La ecuación (1.4) puede ser escrita en términos del número de fotones que se transmiten a través de un atenuador (dN) como $dN = -\mu N_0 dx$, donde el signo menos indica que el

⁶En la producción de pares (PP), un fotón interacciona con el campo eléctrico del núcleo de un átomo y su energía se transforma en un par electrón-positrón. Dado que la energía en reposo de cada electrón es 0.511 MeV, la PP sólo puede ocurrir cuando la energía del fotón excede un umbral de 1.022 MeV.

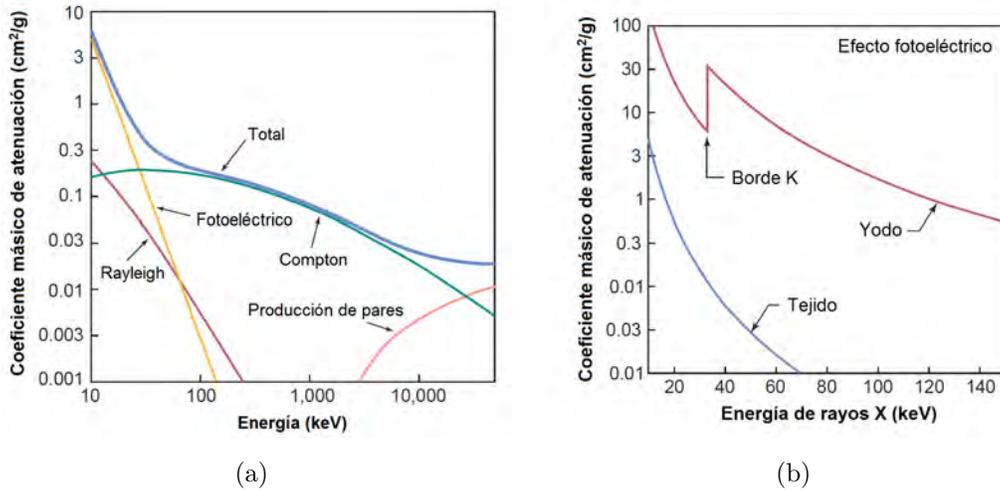


Figura 1.5: (a) Coeficientes atenuación, normalizados a la densidad del material (ρ), como función de la energía para los distintos tipos de interacción de fotones con el tejido ($Z_{Ef} = 7$). (b) μ_{AF} , normalizado a ρ , como función de la energía para tejido y yodo ($Z_{Ef} = 53$) [13].

número de fotones transmitidos y que llegan al detector disminuye a medida que aumenta el espesor del atenuador. Dicha ecuación diferencial puede ser resuelta para obtener:

$$N(x) = N_0 e^{-\mu x} \quad (1.6)$$

donde $N(x)$ es el número de fotones transmitidos a través de un espesor x [13, 14].

1.1.3.2. Coeficiente másico de atenuación

En general, μ depende de la energía del haz de fotones y de la naturaleza del material. En específico, μ depende de la densidad del material (ρ)⁷. Es posible eliminar esta dependencia si se normaliza μ respecto a ρ . El coeficiente obtenido se denomina coeficiente másico de atenuación (μ/ρ), cuya dependencia con la naturaleza del material está dada únicamente por la composición atómica del mismo. Suele expresarse en cm²/g y puede ser utilizado para calcular la atenuación, de tal manera la ecuación (1.6) puede ser reescrita como:

$$N(x) = N_0 e^{-(\mu/\rho)\rho x} \quad (1.7)$$

⁷Dado que la atenuación producida por un material de espesor x depende del número de electrones presentes en dicho espesor, μ depende de la densidad del material.

También, dicha expresión puede ser escrita en términos de la intensidad (I) como [13, 14]:

$$I(x) = I_0 e^{-(\mu/\rho)\rho x} \quad (1.8)$$

El uso de μ/ρ es tan común que se tiende a pensar en el espesor no como una longitud x (en cm), sino en términos del producto ρx (en g/cm²), el cual es llamado espesor másico [13, 14].

1.1.4. Absorción de energía de fotones

1.1.4.1. Fluencia, flujo y fluencia de energía

Se conoce como fluencia (Φ) al número de fotones o partículas (dN) que atraviesan cierta sección transversal por unidad de área (da). Normalmente se expresa en cm⁻²:

$$\Phi = \frac{dN}{da} \quad (1.9)$$

La tasa de fluencia se denomina flujo ($\dot{\Phi}$), el cual es simplemente la fluencia por unidad de tiempo. Por otro lado, la cantidad de energía que atraviesa cierta sección transversal por unidad de área se conoce como la fluencia de energía (Ψ). Para un haz de fotones monoenergético, Ψ es simplemente el producto de Φ y la energía por fotón (E), esto es:

$$\Psi = \Phi E \quad (1.10)$$

Las unidades de Ψ son energía por unidad de área, J·m⁻². La tasa de fluencia de energía o flujo de energía ($\dot{\Psi}$) es el flujo de energía por unidad de tiempo [12, 13].

1.1.4.2. Coeficientes másicos de transferencia y absorción de energía

La fracción de la energía del fotón transferida como energía cinética a las partículas cargadas, por unidad de espesor del material, está dada por el coeficiente de transferencia de energía (μ_{tr}). Este coeficiente está relacionado con μ a partir de:

$$\mu_{tr} = \frac{\bar{E}_{tr}}{h\nu} \mu \quad (1.11)$$

donde \bar{E}_{tr} es la energía promedio de los fotones transferida a las partículas cargadas como energía cinética por interacción. El coeficiente másico de transferencia de energía está dado

por (μ_{tr}/ρ) . Por otro lado, el coeficiente de absorción de energía (μ_{en}) es definido como:

$$\mu_{en} = \mu_{tr} (1 - g) \quad (1.12)$$

donde g es la fracción de la energía de las partículas cargadas secundarias que se pierde por interacciones de bremsstrahlung en el material. El coeficiente másico de absorción de energía está dado por (μ_{en}/ρ) y es igual a (μ_{tr}/ρ) cuando toda la energía transferida es absorbida localmente. Para la mayoría de las interacciones que implican tejidos blandos u otro material de bajo Z , donde los electrones pierden casi la totalidad de su energía por colisiones de ionización y excitación, g es despreciable, es decir, se tiene $\mu_{en} = \mu_{tr}$ [12, 13].

1.1.4.3. Kerma

El kerma (K) se define como la energía cinética transferida a partículas cargadas por la radiación indirectamente ionizante por unidad de masa. Su unidad de medida es el gray (Gy) y para un haz de fotones monoenergético de energía E incidente en un medio de número atómico Z está dado como:

$$K = \Psi \cdot \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad (1.13)$$

Por otro lado, si se tiene un espectro de fotones, K está dado como:

$$K = \int_{E=0}^{E_{max}} \Psi'(E) \cdot \left(\frac{\mu_{tr}}{\rho} \right)_{E,Z} dE \quad (1.14)$$

donde $\Psi'(E)$ es la distribución diferencial de la fluencia de energía de fotones y $(\mu_{tr}/\rho)_{E,Z}$ es una función de E [12, 13].

Dado que K incluye la energía cinética recibida por las partículas cargadas, tanto si es destinada a ser impartida por los electrones en interacciones de tipo colisión o radiativas, es posible subdividir K en dos partes, de acuerdo con si la energía es impartida en la vecindad del punto donde se dio origen a la ionización o excitación (K_c) o si es llevada lejos de la misma por los fotones (K_r): $K = K_c + K_r$, donde los subíndices se refieren a interacciones de “colisión” o “radiativas”, respectivamente. Para un haz de fotones monoenergético, la relación entre K_c y Ψ está dada por:

$$K_c = \Psi \cdot \left(\frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{E,Z} \quad (1.15)$$

Igualmente, si se tiene $\Psi'(E)$, la ecuación 1.14 puede ser reescrita en términos de K_c [12].

El K_c en aire, $(K_c)_{aire}$, puede ser estimado a partir de las mediciones de la exposición (X) realizadas con detectores llenos de aire, empleando la relación:

$$(K_c)_{aire} = X \cdot \left(\frac{\bar{W}}{e} \right)_{aire} \quad (1.16)$$

donde X es el cociente del valor absoluto de la carga total Q de los iones de un signo producidos por fotones en la masa de aire m al interior del detector y \bar{W} es la energía promedio gastada en un gas por par de iones formados, siendo $\bar{W}/e = 33.97$ J/C [13].

1.1.4.4. Dosis absorbida

La dosis absorbida (D) es definida como la cantidad de energía absorbida (dE) por un medio, en un volumen V , por unidad de masa (dm), esto es:

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (1.17)$$

A diferencia de K , D está definida para todos los tipos de RI. Sin embargo, la unidad para ambos es la misma. Si la energía impartida a las partículas cargadas se deposita localmente y la radiación de frenado producida por los electrones es despreciable, D es igual a K . Particularmente, para radiación indirectamente ionizante, bajo condiciones de equilibrio de partícula cargada (EPC) en un volumen infinitesimal, se tiene [13]:

$$D \stackrel{EPC}{=} K_c \quad (1.18)$$

1.2. Producción de rayos X

Los rayos X son creados a partir de la energía de los electrones y su conversión a fotones, lo cual tiene lugar al interior de un tubo de rayos X (TRX). La fluencia y la calidad del haz de rayos X producido (espectro) pueden ser controladas con el ajuste del voltaje (kV), la corriente (mA), los filtros y el tiempo de exposición (s) aplicados al TRX [15].

1.2.1. El tubo de rayos X

Un TRX es un convertidor de energía eléctrica a otras dos formas de energía distintas: rayos X y calor. Dado que el calor es un subproducto indeseable, los TRX se diseñan con el fin de maximizar la producción de rayos X y disipar el calor lo más rápidamente posible [15].

Básicamente, un TRX consiste de dos elementos principales: un cátodo y un ánodo dentro de un contenedor al vacío. El vacío al interior del TRX es necesario para evitar ionizaciones en el gas y el mejor control de la intensidad y la energía de los rayos X. El cátodo lo compone un filamento de tungsteno (W), el cual es sometido a una corriente eléctrica y libera electrones por emisión termoiónica⁸. El ánodo lo compone un material con punto de fusión alto, resistente y de vida útil larga (generalmente se emplea W). Debido a la diferencia de potencial en el sistema, los electrones liberados por el cátodo son acelerados, ganan energía e imparten la misma a los átomos que constituyen el ánodo cuando interactúan con ellos. La mayor parte de dicha energía se transforma en calor. Sólo una pequeña fracción (típicamente menor al 1%) se convierte en rayos X, de los cuales sólo aproximadamente el 5% son rayos X característicos [15].

1.2.2. Espectro de un tubo de rayos X

Existen dos tipos de interacciones por parte de los electrones con los átomos individuales del material blanco que producen radiación electromagnética: la interacción con las capas de electrones producen “*rayos X característicos*”, mientras que la interacción con los núcleos atómicos producen “*radiación de frenado*” o “*Bremsstrahlung*” [15].

1.2.2.1. Rayos X de frenado

El núcleo atómico posee una carga eléctrica positiva capaz de atraer a un electrón, desacelerarlo y cambiar su dirección. Esto provoca la pérdida de energía cinética por parte del electrón que es emitida como un fotón, cuya energía E dependerá de la distancia radial r entre el punto de interacción y el núcleo del material blanco (figura 1.6). Es decir, la probabilidad de que se produzca dicha interacción depende de r , lo que permite definir una

⁸Emisión de electrones desde un filamento calentado eléctricamente.

circunferencia $2\pi r$ tal que si r se incrementa, la circunferencia incrementa y por tanto la probabilidad de interacción incrementa, pero disminuye la energía de los rayos X. Por otro lado, si r disminuye, la energía de los rayos X incrementa dado que los electrones sufren una mayor desaceleración, pero la probabilidad de interacción disminuye. Los rayos X más energéticos son producidos en las interacciones más cercanas del electrón con el núcleo atómico. Sin embargo, la probabilidad de una interacción de este tipo es muy pequeña, y por lo tanto también lo es el número de rayos X [13, 15].

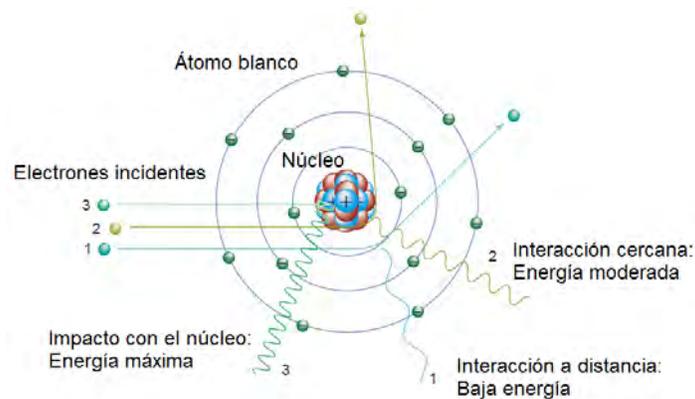


Figura 1.6: (1) La atracción coulombiana sobre el electrón incidente es débil si r es relativamente grande, por lo que este tipo de interacción produce rayos X de bajas energías. (2) Cuando r es pequeña, la fuerza que actúa sobre el electrón incrementa, provocando una mayor desaceleración; estas interacciones producen rayos X de energías más altas. (3) Un impacto casi directo del electrón con el núcleo blanco provoca la pérdida de casi toda su energía cinética. En esta rara situación, se producen los rayos X de más altas energías [13].

1.2.2.2. Rayos X característicos

Los electrones atómicos se distribuyen en capas, las cuales están caracterizadas por tener una energía de enlace para el electrón. La capa más interna se denomina como capa K y tiene la mayor energía de enlace. Le siguen las capas L, M y N, con energías progresivamente menores [13, 15].

Las energías de enlace de las capas electrónicas de cada elemento son diferentes (son “*características*” del mismo). Cuando la energía de un electrón incidente (dada por el voltaje aplicado al TRX) excede la energía de enlace de una capa electrónica en un átomo blanco, una interacción de colisión puede expulsar un electrón de su capa y crear una vacancia. Cuando sucede esto, un electrón de una capa más externa (con menor energía de enlace)

sufre una transición para ocupar la vacancia y es emitido un rayo X característico con una energía igual a la diferencia entre las energías de enlace de las dos capas electrónicas (Figura 1.7). Para W, la transición electrónica de la capa L (energía de enlace igual a 10.2 keV) para ocupar una vacancia en la capa K (energía de enlace igual a 69.5 keV) produce un rayo X de 59.3 keV [13, 15].

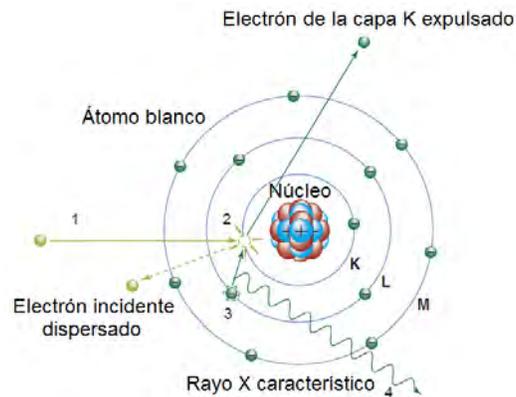


Figura 1.7: (1) El electrón incidente interacciona con un electrón de la capa K debido a una fuerza de repulsión eléctrica. (2) Si la energía del electrón incidente es mayor que la energía de enlace del electrón de la capa K, este último es liberado y deja una vacancia. (3) Un electrón de la capa L (o posiblemente una capa diferente) ocupa la vacancia. (4) Un fotón es emitido con energía igual a la diferencia entre las energías en enlace de las dos capas [13].

1.2.2.3. Formación del espectro de un TRX

El espectro de fotones de un TRX presenta dos componentes: una componente continua debida a la radiación de frenado y una componente discreta debida a los rayos X característicos (figura 1.8) [13]. La componente debida a radiación de frenado muestra una relación inversamente proporcional entre el número de rayos X producidos y su energía, siendo la energía más alta dada por el voltaje aplicado al TRX. Por otro lado, un espectro típico de radiación de frenado filtrado no presenta rayos X por debajo de 10 keV, el número de fotones aumenta hasta un máximo ubicado en un valor entre un tercio y un medio de la energía máxima de los rayos X, aproximadamente, y luego disminuye a cero conforme la energía de los rayos X incrementa. En este contexto, la filtración se refiere a la remoción de rayos X por la atenuación en materiales inherentes al tubo de rayos X (por ejemplo, la ventana de cristal del TRX) y en aquellos intencionalmente colocados frente al haz, tales como láminas

delgadas de aluminio y cobre [13,15].

En el caso de la radiación característica, las transiciones electrónicas dan lugar a varios picos característicos de energía discreta superpuestos en el espectro de radiación de frenado. Los rayos X característicos son nombrados según la capa donde se localiza la vacancia electrónica llenada. Para producir rayos X característicos de la capa K, el voltaje del TRX debe ser mayor que 69.5 kV para un blanco de W, 20 kV para un blanco de Mo y 23 kV para un blanco de Rh. En términos de intensidad, cuando el voltaje del TRX aumenta, también lo hace la proporción de radiación característica respecto a la de frenado [13,15].

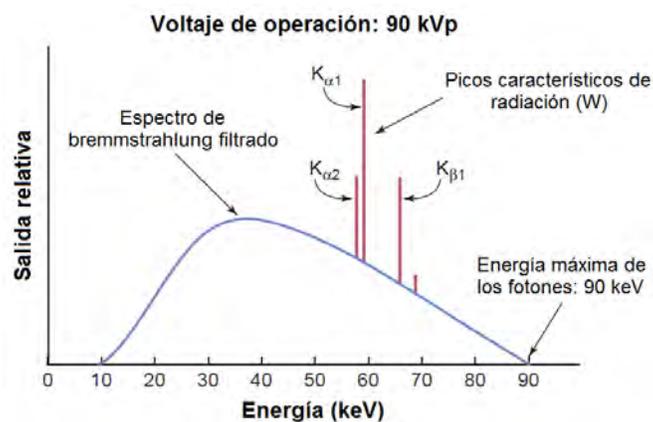


Figura 1.8: Espectro de radiación para un TRX con blanco de W y una diferencia de potencial de 90 kV. Se ilustran la radiación característica de las transiciones K_{α} y K_{β} (capa adyacente y no adyacente a la capa K) [13].

1.2.3. Tubo de rayos X para mamografía y filtración del haz

A diferencia de un TRX convencional, el voltaje de un TRX dedicado a mamografía es relativamente bajo (menor que 40 kV). El material blanco más usado en un TRX de mamografía es el Mo, pero también se emplean Rh y W. La razón principal para emplear Mo y Rh se debe a la producción de rayos X característicos, cuyas energías del borde K son 17.5 y 19.6 keV para el Mo y 20.2 y 22.7 keV para el Rh [13]. Como consecuencia del “*efecto talón*”, la intensidad de los rayos emitidos desde el punto focal no es uniforme en el plano del detector, siendo mayor en el campo proyectado al lado del cátodo y menor al lado del ánodo. La ventana de salida y los filtros añadidos al TRX juegan un papel importante en la formación del espectro de energía del haz. La ventana está hecha de berilio (Be). Su bajo

número atómico ($Z = 4$) y su pequeño espesor (de 0.5 a 1 mm) permiten la transmisión de casi toda la radiación de frenado, excepto la de más baja energía (menor que 5 keV). La filtración añadida al TRX mejora la distribución de la energía del espectro al eliminar los rayos X de frenado. Esto se logra utilizando materiales con energías del borde de absorción K entre 20 y 27 keV, como Mo, Rh y Ag. Nunca debe ser usado un filtro de Mo con un blanco de Rh dado que los rayos característicos del Rh son atenuados significativamente, pues sus energías son mayores que las del borde de absorción K del Mo. En la figura 1.9 se muestran las componentes del espectro de rayos X de un TRX con un blanco de Mo y ventana de Be operando a 30 kV [13].

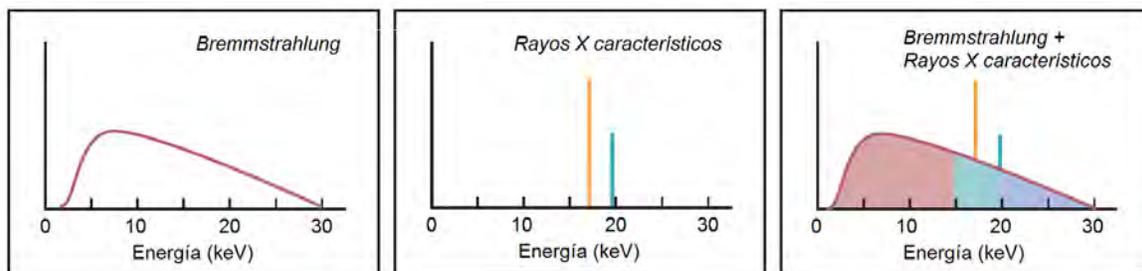


Figura 1.9: Componentes del espectro de rayos X de un TRX de mamografía operando a 30 kV, con blanco de Mo y ventana de Be [13].

1.2.4. Capa hemirreductora y energía efectiva

En ocasiones es necesaria una manera más práctica de caracterizar un haz de fotones, que el conocimiento de su espectro, por lo que se debe buscar una cantidad, estandarizada y medible, que lo describa.

La medición de la capa hemirreductora (CHR) es una manera de caracterizar la penetrabilidad de un haz de fotones. La CHR se define como el espesor requerido de cierto material atenuador estándar para reducir la medida del kerma en aire de un haz de fotones a la mitad de su valor inicial. La CHR, normalmente medida en milímetros de aluminio (mmAl), puede ser convertida a una cantidad denominada energía efectiva (E_{ef}). La E_{ef} de un haz de rayos X polienergético es una estimación de su poder de penetración, expresada como la energía de un haz monoenergético que tendría la misma penetrabilidad [13, 14].

1.3. Dosimetría termoluminiscente

La luminiscencia térmicamente estimulada o termoluminiscencia (TL) es la emisión de luz por parte de un material aislante o semiconductor cuando éste es calentado luego de haber sido expuesto a radiación, lo cual no debe ser confundido con la emisión espontánea de luz de una sustancia cuando ésta es calentada hasta la incandescencia [16]. De esta manera, el material no puede presentar termoluminiscencia por simple calentamiento y enfriamiento. Si la intensidad de la luz es graficada como función de la temperatura o el tiempo se obtiene una curva denominada curva de brillo o curva TL, la cual presenta uno o más máximos llamados picos de brillo o picos TL [17].

1.3.1. Bandas de energía y niveles localizados

La solución de la ecuación de Schrödinger para electrones sujetos a un potencial periódico muestra que los niveles energéticos permitidos se encuentran dentro de cierto rango de valores, los cuales son conocidos como zonas permitidas. Otros posibles valores de energía constituyen lo que se conoce como zonas o bandas prohibidas. La ocupación de cada zona o banda es descrita por la función de densidad de estados

$$N(E) = Z(E) f(E) \quad (1.19)$$

donde $N(E)$ es la densidad de niveles energéticos ocupados, $Z(E)$ es la densidad de estados de energía disponibles y $f(E)$ es la función de distribución de Fermi-Dirac dada por

$$f(E) = \frac{1}{e^{(E-E_f)/kT} + 1} \quad (1.20)$$

donde E_f es el nivel de Fermi o potencial químico. En el cero absoluto, los niveles de energía por debajo de E_f están completamente llenos, mientras que los que están por arriba están completamente vacíos. Para materiales cristalinos (semiconductores o aislantes), E_f se encuentra por encima de la energía de valencia, por lo que la banda de valencia se encuentra completamente llena. Esto significa que no puede haber conductividad eléctrica. La conductividad eléctrica se presenta únicamente cuando a los electrones de valencia se les da la suficiente energía para superar cierto valor E_{gap} y así alcanzar la siguiente banda vacía,

conocida como banda de conducción. La conductividad σ de estos tipos de materiales está caracterizada por una dependencia con la temperatura en la forma $\exp(-E_{gap}/kT)$, por lo que la conductividad va a cero cuando la temperatura va a cero [17].

Cuando un material cristalino presenta defectos estructurales o impurezas, la falta de periodicidad en su estructura hace posible que los electrones posean valores de la energía que están prohibidos en un cristal perfecto, es decir, se da lugar a niveles energéticos permitidos dentro de la banda prohibida. Un resultado de esto es la generación de nuevas bandas de absorción óptica [17].

Las bandas de valencia y conducción se extienden por todo el cristal, mientras que los estados de defectos se centran en ellos mismos, por lo tanto se denominan “*niveles de energía localizados*”. La posición de los niveles localizados dentro de la banda prohibida es dada por la energía requerida para liberar al electrón. El nivel energético referido a la vacancia de cationes está debajo del nivel de equilibrio de Fermi, siendo éste una potencial trampa de huecos. Por otro lado, el nivel energético referido a la vacancia de aniones está por arriba del nivel de la energía de Fermi, lo que significa que el nivel está vacío de electrones y el defecto es una potencial trampa de electrones. En la figura 1.10 se muestra un diagrama de las bandas de energía para un material cristalino en equilibrio en el cero absoluto. En este diagrama los niveles debajo de E_f están llenos de electrones, mientras los niveles que se encuentran por arriba están vacíos [17].

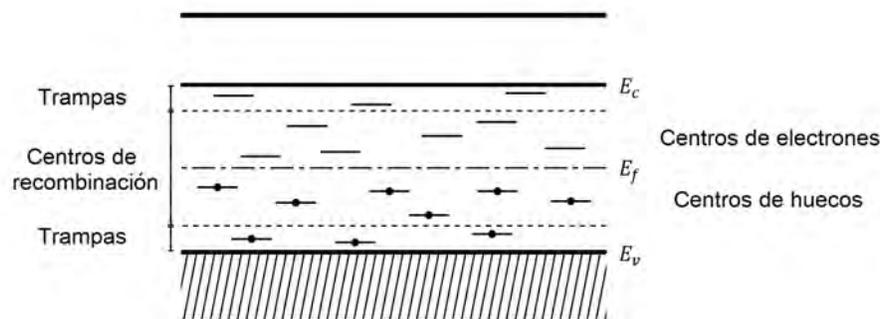


Figura 1.10: Bandas de energía para un material cristalino en equilibrio en el cero absoluto [17].

1.3.2. Trampas y centros de recombinación

Una característica esencial del proceso termoluminiscente es el cambio en la ocupación de los distintos estados de energía localizados del material. Este cambio está en función de las transiciones electrónicas de un estado de energía a otro. Muchos tipos de transiciones son posibles, algunos se muestran en la figura 1.11 [17].

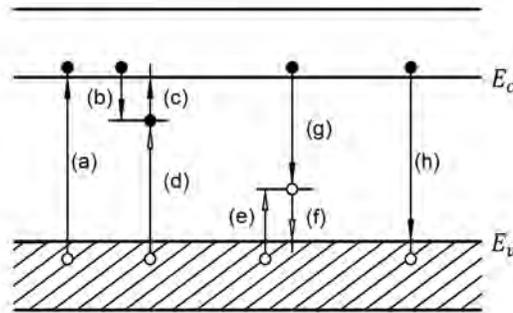


Figura 1.11: Transiciones electrónicas comunes en semiconductores (cristalinos) y aislantes: (a) es una ionización; (b) y (e) son un electrón y un hueco atrapados, respectivamente; (c) y (f) son un electrón y un hueco liberados, respectivamente; (d) y (g) son recombinaciones indirectas; (h) es una recombinación directa. Los electrones son los círculos sólidos, las transiciones electrónicas son las flechas sólidas, los huecos son los círculos abiertos y las transiciones de huecos son las flechas abiertas [17].

Cuando un material TL es irradiado, los electrones excitados de la banda de valencia pueden pasar a la banda de conducción (a). Cada electrón liberado en la banda de conducción deja un hueco libre en la banda de valencia, es decir, se crean pares electrón-hueco. Los electrones pueden desplazarse en la banda de conducción hasta ceder la energía suficiente para regresar a la banda de valencia. Cuando ocurre esto, los electrones pueden ser atrapados en defectos o impurezas del material (b). Por otra parte, los huecos pueden desplazarse a través de la banda de valencia hasta ser atrapados por impurezas del material en niveles cercanos a la banda de valencia (e) [17].

Los electrones y huecos localizados pueden ser liberados de sus trampas por excitación térmica. Cuando ella es suficiente, logrará liberar a los electrones (c) y huecos (f) de sus trampas para permitirles moverse una vez más a través del cristal [18–21]. Otra opción es que ellos puedan recombinarse con un portador de carga del signo opuesto, ya sea directa (h) o indirectamente con un portador de carga previamente atrapado (transiciones (d) y (g)). Si cualquiera de estos mecanismos de recombinación es acompañado por la emisión de luz, el

resultado es el fenómeno de la termoluminiscencia [17]. La intensidad de la luz emitida por el material cristalino dependerá considerablemente del tipo y concentración de impurezas o dopantes en el mismo [18].

La clasificación usada para catalogar un nivel localizado de energía como una trampa o un centro de recombinación está basada en las probabilidades relativas de recombinación y excitación térmica. Si la transición (c) es más probable que la transición (d), el centro de atrapamiento es considerado una trampa, mientras que, en el caso inverso, sería considerado un centro de recombinación. Algo análogo ocurre para los centros de atrapamiento de huecos y las transiciones (g) y (f) [17].

La probabilidad de que un portador de carga se libere térmicamente de su trampa está exponencialmente relacionada a E/kT , donde E es la profundidad de la trampa, es decir, la diferencia de energía entre el nivel de la trampa y el borde de la banda correspondiente. Así, para una temperatura dada, aquellos centros con E pequeña tienen mayor probabilidad de ser trampas que los centros con E grande. Por esta razón, los centros de recombinación están localizados al centro de la banda prohibida y las trampas hacia los bordes. De aquí, se observa que una trampa a una temperatura puede llegar a ser un centro de recombinación a una temperatura más baja, y viceversa [17, 22].

1.4. Efectos biológicos de la radiación ionizante

1.4.1. Daño al ADN debido a la exposición a radiación ionizante

Al incidir sobre la célula, la RI puede interactuar con cualquier molécula en su interior y causar ionizaciones. Por lo general, una molécula ionizada manifiesta propiedades diferentes a aquellas neutras y, por ende, su funcionamiento es alterado. En cuanto a efectos biológicos se refiere, hay evidencias directas que consideran al ADN como el principal blanco celular de los efectos de la RI [6]. No obstante, otros sitios como la membrana nuclear, la membrana celular, el citoesqueleto y los lisosomas también pueden ser blancos importantes para algunos efectos biológicos. Existe evidencia que sustenta que la frecuencia de los daños al ADN, debidos a RI, así como su complejidad dependen en gran medida de la LET [6, 11].

La interacción de la RI con el ADN se puede llevar a cabo de dos maneras: (1) de forma directa, produciendo ionizaciones directamente en la molécula de ADN; y (2) de forma indirecta, produciendo ionizaciones en otras estructuras de la célula, formando radicales libres que posteriormente causarán daño al ADN (figura 1.12). El efecto indirecto más común es la formación de radicales libres debido a la radiólisis del agua, pues las moléculas de agua conforman el 70 % del tejido humano. Debido a su vida relativamente larga (alrededor de 10^{-5} s), se cree que el radical OH^\bullet es la especie reactiva más eficaz en el daño al ADN [6, 23].

La RI puede dar lugar a la roturas de una sola cadena o de doble cadena del ADN (SSB o DSB, por sus siglas en inglés). En cuanto a muerte celular se refiere, el rompimiento SSB es de poca relevancia biológica pues el daño puede ser reparado usando como plantilla la hebra intacta. Si ocurre un rompimiento de ambas hebras pero las lesiones están lo suficientemente separadas, es posible que el ADN pueda ser reparado, pues hay suficiente ADN como plantilla. Sin embargo, si el rompimiento ocurre en el mismo lugar en ambas cadenas, entonces ocurre una DSB [23].

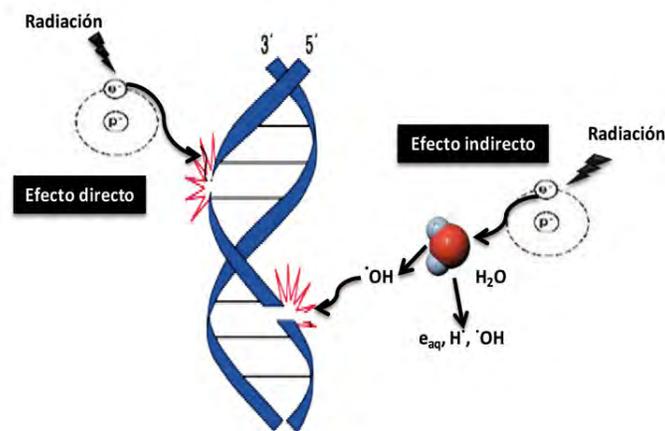


Figura 1.12: Representación del efecto directo e indirecto de la RI sobre el ADN [24].

1.4.2. Reparación del daño al ADN

En promedio, las células humanas experimentan más de 100,000 daños al día como consecuencia de errores de replicación del ADN, descomposición química de sus bases, ataque por

especies reactivas del oxígeno o la exposición a RI. Si los daños no son reparados, algunos pueden llevar a mutaciones o muerte celular [6, 23, 25].

Una mutación es una modificación en la secuencia de las bases del ADN. Todos los seres vivos sufren dichas modificaciones durante el transcurso de su vida. En ocasiones, las mutaciones se deben a un error en la replicación del ADN, otras se deben a la exposición a agentes genotóxicos. Los efectos de una mutación pueden ser variados y dependen del tipo de célula en la que ocurrieron: si es una célula de línea germinal, la descendencia es quien manifestará el efecto, mientras que si la célula es somática, es el individuo quien sufrirá las consecuencias [26].

La célula posee una variedad de mecanismos para detectar, responder y reparar o tolerar los daños al ADN antes de su fijación. Estos mecanismos son dependientes de la etapa del ciclo celular y su eficiencia es tal que, en un estado basal, la concentración de lesiones del ADN permanece en el genoma de las células con crecimiento normal. Esta concentración es distinta de cero y se sabe que puede contribuir a la mutagénesis. Aún no se ha entendido cómo la eficiencia de los sistemas de reparación del ADN es regulada con el fin de mantener dicho nivel basal. Sin embargo, se conoce que los sistemas de reparación proporcionan sólo una capacidad limitada para hacer frente a los daños adicionales que podrían ser infligidos por alguna amenaza externa, como la RI [6].

La evidencia experimental indica que la perturbación de la respuesta/reparación del daño al ADN, y del control de la apoptosis en el ciclo celular, está asociada con frecuencia al desarrollo tumoral [11]. Gran parte del conocimiento actual acerca de la reparación del ADN es resultado del estudio de la hipersensibilidad a la RI debido a genes individuales, de los cuales se sabe que existen más de 130 genes asociados a la reparación del ADN en el genoma eucariota [23, 25].

1.4.2.1. Reparación de roturas de una sola cadena (SSB)

Cuando se daña una de las dos cadenas del ADN, la cadena intacta puede ser empleada como plantilla para su corrección. Se conoce como reparación por escisión (rompimiento) a la reparación de lesiones basada en la eliminación de la base nitrogenada, nucleótido o

segmento de ADN defectuoso y su reemplazo por otro nuevo, de secuencia correcta. Éste es un proceso complejo que tiene lugar en varias fases, emplea varios tipos proteínas y conlleva siempre a la síntesis de un fragmento de ADN [23,27].

- *Reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés)*: Se encarga de reparar bases específicas; por lo tanto, reconoce y actúa en sitios concretos, reparando lesiones que son demasiado sutiles para distorsionar gravemente el ADN. Es iniciada por ADN glicosilasa, la cual reconoce el daño y disocia la unión glucosídica entre base y azúcar. Enseguida, el sitio AP es reconocido por la AP endonucleasa, disociando el extremo 5' de la cadena y AP⁹. Luego, la fosfodiesterasa disocia el extremo 3', la ADN polimerasa β rellena el hueco y la ADN ligasa forma enlaces covalentes entre 5' y 3'. De esta manera, se elimina el nucleótido con la base mutada y se introduce el nucleótido correcto uniéndolo con los nucleótidos adyacentes. Puede corregir daños por hidrólisis, oxidación por radicales libres o alquilación [25,27,29].
- *Reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés)*: Repara el ADN distorsionado espacialmente debido a la presencia de bases modificadas con grandes grupos químicos, dímeros de pirimidina o uniones intracadena. Este tipo de daño suele producirse por agentes químicos o por radiación. Intervienen endonucleasas que cortan de 24 a 29 nucleótidos alrededor del o de los nucleótidos dañados. Ocurre normalmente acoplado a la transcripción, donde uno de los factores de transcripción, con actividad helicasa, es el encargado de separar las dos cadenas. Después actúa una ADN polimerasa y una ADN ligasa. En humanos, es el sistema de defensa más importante contra el daño al ADN causado por el humo del tabaco, agente responsable de más del 30 % de las muertes por cáncer en el mundo [27,29].

1.4.2.2. Reparación de roturas de cadena doble (DSB)

Existe suficiente evidencia que cataloga como una lesión crítica a los daños al ADN tipo DSB inducidos por RI [11,23]. Este tipo de daño puede ser reparado a partir de dos procesos básicos:

⁹Un sitio AP es un punto del genoma que ha sufrido la pérdida espontánea de una base nitrogenada [28].

- *Reparación por recombinación homóloga (HRR, por sus siglas en inglés)*: Utiliza la homología de una copia no dañada de la secuencia del ADN, por lo que sólo puede operar en las fases S tardía o G2 del ciclo celular. Comienza por una remoción nucleolítica de los extremos rotos, la unión del complejo proteico NBS/MRE11/rad50 al extremo del ADN y un intercambio de cadenas facilitado por la unión de rad51/XRCC2. Enseguida, se sintetiza el ADN de los nucleótidos faltantes sobre la plantilla sana y se liga a la cadena dañada. Esto crea un complejo cruce entre cadenas dañadas y no dañadas conocido como formación de Holliday, que se resuelve antes de que la reparación se complete [11,23].
- *Reparación por recombinación no homóloga (NHEJ, por sus siglas en inglés)*: Está presente durante todo el ciclo celular, pero domina en las fases G1/S. Este proceso comete errores pues no toma en cuenta la homología de secuencias, es decir, une extremos no homólogos del ADN. Ocurre entre dos cortes francos de la molécula de ADN por ruptura de las uniones fosfodiéster. Las proteínas de reparación Ku70/Ku80 reconocen los extremos de la lesión uniando el heterodímero Ku a la DNA-PK. De esta manera, se activa XRCC4 ligasa para la unión de los extremos después de la disociación parcial de los extremos rotos por otras enzimas que participan en el proceso de reparación [11,23].

Actualmente se reconoce el potencial del mecanismo de reparación HRR. Sin embargo, dado su restricción a las últimas fases del ciclo celular, se considera improbable que su impacto en el riesgo global que involucra la exposición a la radiación sea grande [11]. Así mismo, los datos moleculares sugieren que NHEJ es la principal fuente de mutaciones y aberraciones cromosómicas inducidas por radiación debido a su función dominante durante el ciclo celular [6].

1.4.3. Radiosensibilidad

La radiosensibilidad se define en términos de la rapidez con que la cual se manifiestan los daños inducidos por la RI. Un elemento es más radiosensible cuando mayor es su respuesta a una dosis determinada de RI, es decir, necesita una dosis menor para alcanzar un efecto

determinado. En cambio, es más radiorresistente cuando la dosis que necesita es mayor [23].

Las células que se dividen poco o ya no se dividen se consideran de radiosensibilidad baja, mientras que aquellas que tienen una tasa alta de división se consideran de radiosensibilidad alta. La fase del ciclo celular en la cual las células son más radiosensibles es la mitosis, al igual que aquellas que se encuentran en la fase G2 tardía. Las células en la fase G1 son consideradas con una radiosensibilidad intermedia y aquellas en la transición de la fase S tardía a G2 temprana son más radiorresistentes. La radiorresistencia durante la fase S tardía ha sido asociada a la reparación HRR, cuando las cromátidas hermanas se han replicado [6].

La radiosensibilidad en tejidos biológicos suele clasificarse como baja, media o alta. Por ejemplo, el tejido linfoide y la médula ósea se consideran de radiosensibilidad alta, mientras que el tejido muscular y el neuronal se consideran de radiosensibilidad baja [23]. Los tumores tienen varios grados de radiosensibilidad. El melanoma y el carcinoma de células renales son considerados de radiosensibilidad baja, mientras que el linfoma es considerado de radiosensibilidad alta [30].

1.4.4. Riesgo debido a la exposición a radiación ionizante

El depósito de energía por parte de la RI es un proceso aleatorio. Incluso a dosis muy bajas es posible que se deposite suficiente energía en un volumen crítico dentro de la célula como para producir cambios celulares o muerte celular. La muerte de un número pequeño de células no tendrá, en la mayoría de los casos, consecuencias en los tejidos. Sin embargo, alteraciones en células individuales, tales como cambios genéticos o transformaciones malignas, pueden tener serias consecuencias [11].

La estimación de los riesgos debidos a la exposición a la RI se obtiene, principalmente, de estudios epidemiológicos. Mucha de la información actual proviene del estudio del seguimiento continuo de la salud de los sobrevivientes de las bombas atómicas de Japón en 1945 (LSS, del inglés *Life Span Study*). Sin embargo, también ha sido considerada la información procedente de otras poblaciones expuestas a radiación, como los pacientes expuestos con fines terapéuticos o diagnósticos, los trabajadores expuestos ocupacionalmente y las personas que han sufrido exposiciones ambientales [11].

Para fines de protección radiológica, los efectos biológicos de la radiación pueden ser agrupados en dos tipos [11,31]:

- *Efectos deterministas (reacciones tisulares)*: se deben principalmente a la muerte y/o defectos en el funcionamiento de una cantidad de células, tras dosis consideradas elevadas, que no puede compensarse por la reproducción y/o función de aquellas intactas, afectando con ello el funcionamiento del órgano o tejido en consideración. Se espera que exista un umbral de dosis por debajo del cual no se observen reacciones tisulares, el cual dependerá de la tasa de dosis, la LET, el órgano o tejido irradiado, el volumen irradiado y el efecto clínico de interés. Por encima de dicho umbral, la probabilidad de ocurrencia se elevará abruptamente a cerca del 100 % (es decir, toda persona expuesta mostrará el efecto) y la severidad de la lesión aumentará con la dosis. Ejemplos son: las cataratas y la esterilidad.
- *Efectos estocásticos (cáncer y efectos hereditarios)*: se deben a alteraciones en el código genético de las células debido a la radiación. No se espera la existencia de un umbral de dosis. Su probabilidad de ocurrencia aumenta con la dosis de radiación y, probablemente, a dosis bajas se estima dicha curva de probabilidad conserve tal comportamiento. Frecuentemente, a dosis y tasas de dosis más elevadas, su probabilidad de ocurrencia aumenta con la dosis de una forma más abrupta que con una relación de proporcionalidad simple. A dosis aún más altas, cercanas al umbral de las reacciones tisulares, su probabilidad de ocurrencia aumenta más lentamente y puede comenzar a disminuir, debido al efecto competitivo con la muerte celular. Su severidad no presenta relación con la dosis. Existe un periodo de latencia (periodo sin manifestarse o exteriorizarse) que depende de la tasa de dosis, la energía y el ambiente celular. Los efectos producidos pueden ser cáncer o efectos hereditarios, dependiendo de si se producen mutaciones en células somáticas o germinales, respectivamente.

En la actualidad, se reconoce que las reacciones tisulares no están necesariamente pre-determinadas y pueden ser modificadas tras la irradiación empleando modificadores de la respuesta biológica. Por lo tanto, se considera más apropiado referirse a ellas como reacciones tisulares o de órganos tempranas o tardías [11].

1.4.4.1. Riesgo debido a la exposición a dosis altas de radiación

Los estudios epidemiológicos sólo pueden distinguir claramente los efectos biológicos a dosis altas [32]. El estudio más documentado es el LSS, donde la población involucrada recibió una dosis máxima de hasta 1.2 Sv a cuerpo entero. Tan sólo 3 años después de las explosiones ya se tenía registro de una mayor frecuencia de casos de leucemia (cáncer en las células sanguíneas). La máxima incidencia se registró a los 10 años [33].

Dada su característica citotóxica, la RI puede ser empleada para destruir células cancerosas en tratamientos de radioterapia. El procedimiento consiste en irradiar la zona del tumor con altas dosis de radiación (del orden de Gy) durante tiempos determinados. La dosis total de radiación a ser impartida en un tratamiento a través de múltiples fracciones depende de la tolerancia del tejido sano y la eficiencia en el control tumoral. Así también, el fraccionamiento de la dosis en radioterapia considera la reparación del daño subletal de tejido normal, la reoxigenación de las componentes hipóxicas de tumores y el reordenamiento de las células tumorales, de menos radiosensibles a la fase más radiosensible del ciclo celular (G2-M), considerando además que el daño a la célula tumoral puede repararse, dependiendo del intervalo de tiempo entre fracciones. Basado en numerosos estudios clínicos e *in vitro*, cada tipo de tumor tiene un protocolo en función de las dosis máximas que pueden recibir los tejidos sanos que rodean al tumor. Los efectos secundarios al tratamiento pueden ser: falta de apetito, náuseas, vómito, diarrea, sensación de malestar, dolor de cabeza, cansancio, somnolencia y disminución de la cantidad de glóbulos rojos y blancos [34].

La evidencia estadística más fuerte sobre la inducción de enfermedades diferentes al cáncer a dosis efectivas del orden de 1 Sv deriva del análisis más reciente de la mortalidad en el estudio LSS, donde se observa una asociación con la dosis por parte de enfermedades del corazón, infartos, desórdenes digestivos y enfermedades respiratorias. Dichas observaciones corresponden con los estudios de pacientes de cáncer tratados con radioterapia. No es claro qué tipo de mecanismos celulares y tisulares podrían estar implicados en dicho grupo heterogéneo de desórdenes no cancerosos [11].

1.4.4.2. Riesgo debido a la exposición a dosis bajas de radiación

En promedio, el ser humano recibe una dosis anual de 2 mSv debida a radiación natural o de fondo. Hasta el momento, no existe evidencia de que tal 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 adicionales de radiación. Actualmente, dicha exposición se encuentra regulada por leyes acordadas por cada país, basadas en las recomendaciones de distintas organizaciones mundiales como la Comisión Internacional de Protección Radiológica (ICRP, por sus siglas en inglés) o el Comité Científico de Naciones Unidas sobre los Efectos de la Radiación Atómica (UNSCEAR, por sus siglas en inglés). En México, la regulación de dichas actividades es llevada a cabo por la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias (CNSNS). El objetivo de la protección radiológica es permitir el aprovechamiento de la radiación, en todas sus formas conocidas, con un riesgo aceptable tanto para los individuos que la manejan como para la población en general y las generaciones futuras [34].

Según el UNSCEAR, una dosis baja de RI es aquella en la que resulta 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 100 mSv [35]. Las diferentes características de la reparación de las lesiones simples y complejas del ADN son un factor importante para obtener conclusiones sobre los efectos en la salud de las dosis bajas de RI. La acumulación de datos relacionados con el desarrollo tumoral, inducido por radiación en células y animales, ha fortalecido la idea de que los procesos de respuesta al daño del ADN en células únicas son de importancia crítica. Estos datos, junto con los adelantos en el conocimiento de la carcinogénesis, refuerzan la idea de que la información detallada sobre la respuesta/reparación del daño al ADN y la inducción de mutaciones en genes/cromosomas puede contribuir significativamente a la estimación del incremento de la incidencia de cáncer a dosis bajas de RI [11].

Para dosis menores que 100 mGy (de alta o baja LET) no se estima que algún tejido exprese un deterioro funcional clínicamente relevante. Dicha estimación aplica tanto a dosis agudas únicas como a situaciones donde la dosis es recibida en forma prolongada como

exposiciones anuales repetidas. Aunque un examen radiológico único conlleve sólo un pequeño aumento en la probabilidad de inducción de cáncer en un paciente, en promedio, en los países industrializados cada miembro de la población se somete a tal examen. Sin embargo, el riesgo no está distribuido uniformemente en la población. Algunos grupos de pacientes se examinan con mayor frecuencia debido a su estado de salud y otros muestran una sensibilidad más alta que el promedio (por ejemplo los bebés, los niños pequeños y aquellas personas con susceptibilidad genética). Los tipos de cáncer que se manifiestan de forma temprana en la vida causan una mayor reducción de la esperanza de vida que aquéllos que se manifiestan a una edad mayor [31].

Aunque manifestando incertidumbre en sus resultados, los estudios epidemiológicos y experimentales han proporcionado evidencia del riesgo al desarrollo de cáncer a dosis aproximadas de 100 mSv o menores [11, 36]. La evidencia actual sugiere que los efectos de la radiación pueden aumentar o disminuir a dosis bajas debido a la respuesta adaptativa, la inestabilidad genómica y la señalización bystander. Sin embargo, en algunos casos, tal evidencia pareciera estar restringida a circunstancias experimentales especiales. La evidencia actual de los mismos es insuficiente para ser incorporada de manera significativa en los modelos de datos epidemiológicos [36]. Para los objetivos de la protección radiológica, el ICRP considera que la evidencia experimental sustenta la idea de que, en el rango de las dosis bajas, es científicamente aceptable suponer que la incidencia de cáncer o de efectos hereditarios aumentará en forma proporcional al aumento de la dosis equivalente en los órganos y tejidos en consideración, reconociendo la existencia de incertidumbre en tal conclusión. Por tanto, el sistema práctico de protección radiológica recomendado continúa estando basado en el modelo lineal sin umbral (modelo LNT, por sus siglas en inglés). La adopción del modelo LNT provee una base prudente para los propósitos prácticos de la protección radiológica, es decir, la gestión de los riesgos de la exposición a dosis bajas de radiación a partir de la extrapolación desde dosis altas. La validez del modelo LNT puede estar lejos de llegar a una resolución científica definitiva y es probable que sus consideraciones prácticas continúen en el futuro [11, 36].

1.5. Gen ATM

Los mecanismos NHEJ y HRR se activan principalmente por la acción de una única proteína cinasa llamada Ataxia Telangiectacia Mutada (ATM). Dicha proteína proviene del gen ATM, el cual se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11 en la región 11q22.3 y se extiende 150 kb de ADN, con una secuencia de codificación que consiste en 66 exones. Los dos primeros exones se utilizan en empalme alternativo, dando lugar a dos isoformas diferentes. El codón de iniciación se encuentra en el exón 4. La proteína de ATM se encuentra localizada en dímeros inactivos de las células, posee una longitud de 3056 aminoácidos y pesa 350.6 kDa [37, 38].

1.5.1. Función y mecanismos de activación de ATM

La proteína ATM participa, principalmente, en la detección de daños tipo DSB. Se autofosforila en respuesta al daño del ADN e inicia una cascada de señalización a través de la fosforilación de otros sustratos directamente relacionados con el ciclo celular, lo que conduce en última instancia a la activación de los puntos de control del ciclo celular y la modulación de las vías de reparación del ADN [38].

Cuando se presenta un daño al ADN celular o una alteración en la estructura de la cromatina, ATM sufre una autofosforilación intermolecular en serina 1981 (S1981), dando como resultado una disociación del dímero en monómeros activos [39]. Se han descrito otras modificaciones, incluyendo las fosforilaciones adicionales de S367 y S1893 necesarias para la completa activación de ATM y las vías de señalización correspondientes. La histona acetiltransferasa TIP60 es señalada como la encargada de acetilar a ATM en la lisina 3016 (Lys3016), en paralelo a la autofosforilación en S1981 [40].

ATM induce una amplia variedad de modificaciones postraduccionales en p53, las cuales promueven su activación y estabilización. ATM fosforila a la Chk2 quinasa, la cual a su vez fosforila a serina 20 en p53. Este residuo se localiza dentro del sitio principal para la unión MDM2 y como resultado de su fosforilación, la interacción MDM2-p53 se interrumpe, conduciendo a la estabilización de p53. Esta cascada culmina en el punto de control de la fase G1, en el cual p53 se activa e induce la expresión de su blanco transcripcional directo,

p21, causando el arresto del ciclo celular. No obstante, distintos trabajos han demostrado actividad de p53 independiente de p21 en la inducción del arresto del ciclo celular en las fases G1 y G2. MDM2, al igual que p53, está sujeto a modificaciones postraduccionales seguidas del daño al ADN [38]. Gannon y col. demostraron que la fosforilación de S394 sobre MDM2 mediada por ATM es importante en el aumento de la actividad y la posterior activación de los blancos de p53, por lo que ATM juega un papel clave en la regulación de la respuesta al daño del ADN vía p53 y MDM2 a fin de activar y estabilizar a p53 [41].

La proteína ATM también interacciona con c-Abl, activando una vía de transducción alterna que conduce a la inducción de genes de respuesta a estrés a través de c-Jun y la regulación de distintos puntos de control del ciclo celular de forma independiente a p53. I κ B- α es otro blanco de ATM. En condiciones fisiológicas normales, NF κ B se asocia a I κ B- α en el citoplasma. Después de la exposición a un agente genotóxico, I κ B- α se fosforila y se disocia de NF κ B, entrando al núcleo y actuando como un activador transcripcional de varios genes. La inhibición de NF κ B puede desencadenar la radiosensibilización de la célula [42].

Se ha reportado que ATM no cambia su peso molecular en respuesta a la fosforilación, lo que indica que su forma multimérica es inestable o dependiente de otros factores desconocidos dentro de la célula. También se ha reportado su relación con tres componentes proteicos: Mre11, Rad50, y Nbs1. Al unirse forman un complejo funcional conocido como MRN, el cual posee actividades helicasa y nucleasa. ATM puede asociarse directamente con MRN, controlando la señalización que inducen algunos sustratos, entre ellos la histona 2AX presente en la cromatina. De esta manera, el complejo MRN junto con BRCA1 puede identificar el lugar de una lesión, encendiendo otros mecanismos de reparación in situ [43].

Dado a lo anterior, ATM es esencial en el proceso de reparación del daño al ADN. Su ausencia o la de alguno de sus sustratos llevan a la inactivación de distintos puntos de control del ciclo celular y, por tanto, a la inestabilidad celular. En la figura 1.13 se presenta un esquema con algunas de las vías de acción de ATM.

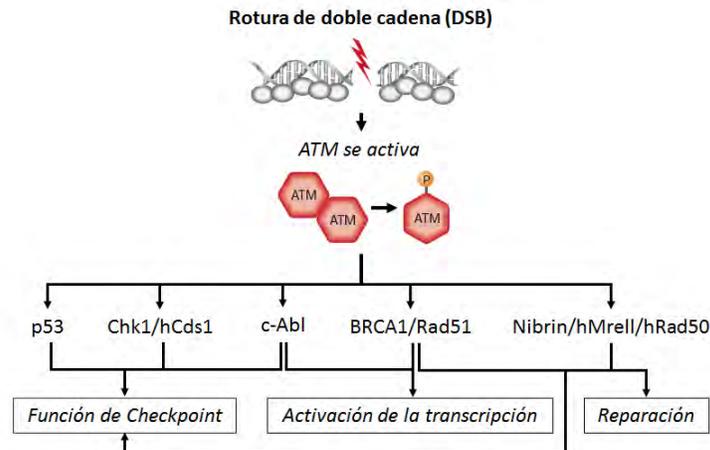


Figura 1.13: Esquema de las vías de acción de la proteína ATM. ATM se activa en respuesta a roturas tipo DSB del ADN y, como consecuencia de ello, diferentes proteínas blanco son fosforiladas por ATM para promover el arresto del ciclo celular en los puntos de control de las transiciones G1/S y G2/M del ciclo celular. ATM también participa en la cascada de señalización que activan la maquinaria de reparación celular a través de su interacción con los complejos BRCA1/Rad51 y Nibrin/Mre11/Rad50. BRCA1 y Nibrin también participan en la regulación de puntos de control del ciclo celular. La activación de c-Abl también es dependiente de ATM, donde c-Abl y BRCA1 participan en el control de la transcripción de los genes de respuesta a estrés [44].

1.5.2. Enfermedad ataxia telangiectasia y mutaciones en ATM

Durante muchos años se ha sabido que existen individuos y familias dentro de las poblaciones humanas que portan mutaciones hereditarias que pueden aumentar su probabilidad de desarrollar cáncer en forma espontánea. Los catálogos genéticos publicados muestran que alrededor del 6% de los trastornos humanos registrados y los genes mutantes tienen algún grado de asociación con el cáncer. El número de estos trastornos para los cuales la asociación es ambigüamente fuerte es pequeño (menor que 50) y tiende a limitarse a las raras enfermedades autosómicas dominantes y recesivas [6].

Para las enfermedades autosómicas dominantes, la herencia de un único gen mutado de cualquiera de los padres (es decir, en un estado heterocigoto) es suficiente para causar la enfermedad, mientras que para las enfermedades autosómicas recesivas se necesitan dos genes mutados, uno de cada padre, en el mismo locus (es decir, homocigosidad) para que se manifieste la enfermedad [11]. Por lo general, las enfermedades autosómicas dominantes altamente expresadas en la población se manifiestan como cáncer familiar y sin otras características

clínicas importantes. Las enfermedades autosómicas recesivas tienden a ser más extrañas y el cáncer generalmente es acompañado de otras características clínicas. La mayoría de los trastornos genéticos humanos asociados con la respuesta y reparación al daño del ADN caen en esta categoría [6].

La ataxia telangiectasia (AT) es una rara enfermedad autosómica recesiva con frecuencia estimada de 1 por cada 300,000 habitantes a nivel mundial y 1 por cada 40,000 habitantes en población caucásica [2]. Está caracterizada por distintas manifestaciones clínicas: neurodegeneración, inmunodeficiencia, hipogonadismo, hipersensibilidad a la RI, envejecimiento prematuro, retraso del crecimiento y una mayor susceptibilidad al cáncer [45]. Generalmente, esta enfermedad se diagnostica en bebés que presentan un gateo inestable (ataxia), lo cual refleja la degeneración cerebelar, y la dilatación de vasos sanguíneos de pequeño calibre (telangiectasia) en las conjuntivas y en otras partes de la cara. Aproximadamente, el 70 % de los niños con AT presentan inmunodeficiencia, lo cual los lleva a desencadenar infecciones respiratorias reincidentes [44, 46]. Se estima que las personas con AT tienen un riesgo 100 veces mayor a desarrollar cáncer en comparación con la población en general. Los cánceres linfoides predominan en infantes, mientras que los epiteliales, incluyendo el cáncer de mama, son los que predominan en adultos [2]. Por todo lo anterior, los pacientes con AT generalmente mueren durante su segunda década de vida o a principios de la tercera [44, 46].

La mayoría de los pacientes con AT son heterocigotos compuestos u homocigotos para mutaciones en ATM que les han sido heredadas¹⁰. Se han descrito más de 300 mutaciones distintas de ATM, de las cuales más del 80 % corresponden a sustituciones de bases o inserciones/deleciones que generan codones con terminación prematura o anomalías por empalme. Las especies truncadas suelen ser inestables y dan como resultado la ausencia o una muy reducida expresión de la proteína ATM [2]. Una pregunta de interés actual surge de la evaluación del riesgo de desarrollar cáncer de mama en individuos que son portadores heterocigotos de la mutación del gen ATM, es decir, ATM(+/-). Los portadores de ATM(+/-) podrían representar el 0.25-1 % de la población general y hay evidencia de un incremento modesto de la radiosensibilidad celular en genotipos ATM(+/-). Por lo tanto, es razonable considerar

¹⁰Un individuo heterocigoto compuesto tiene dos alelos anormales o mutados en un mismo locus, uno en cada cromosoma [47].

un mayor riesgo al cáncer de mama inducido por radiación en estos portadores [6].

1.6. Micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas (o cromosomas completos) extranucleares, rodeados de su propia membrana. Tradicionalmente, se ha analizado su presencia y su frecuencia en relación con la existencia de procesos cancerosos. Estudios recientes indican que los micronúcleos pueden persistir en las células durante varias generaciones, pero su información genética también puede ser enviada a los núcleos de las células hijas. De esta manera, errores en la segregación de cromosomas podrían conducir potencialmente a la aparición de mutaciones y reordenamientos cromosómicos que se podrían integrar en el genoma [48, 49].

El ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis es una herramienta que permite evaluar la citostasis (inhibición del crecimiento celular), la citotoxicidad (daño celular) y la genotoxicidad celular (daño del ADN). El ensayo es aplicado en la biomonitorización de la exposición *in vivo* a agentes genotóxicos, en pruebas de genotoxicidad *in vitro* y en diversos campos de investigación, como la nutrigenómica y la farmacogenómica. También es empleado como un biomarcador de riesgo a cáncer y de sensibilidad a la radiación por parte del tejido normal y tumoral [48]. Debido a que los micronúcleos sólo pueden ser expresados en células que han pasado por una división celular completa, el bloqueo de la citocinesis empleando citocalasina-B (Cyt-B) permite identificar tales células dado a su apariencia binucleada (figura 1.14). De esta manera, el ensayo permite mejorar la precisión pues los datos obtenidos no son confundidos por la alteración de la cinética de división celular causada por la citotoxicidad de los agentes probados o por condiciones de cultivo celular no óptimas [50].



Figura 1.14: Célula binucleada con un micronúcleo, teñida con el colorante Giemsa.

La frecuencia de micronúcleos es empleada como un biomarcador que evalúa la respuesta

a agentes genotóxicos [51]. Comparado con otros ensayos, el ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis posee las características de ser sensible, económico y preciso [52].

Las células empleadas en la evaluación de la frecuencia de micronúcleos deben tener las siguientes características morfológicas [52]:

- Deben ser binucleadas.
- Su membrana celular debe estar intacta y debe ser claramente distinguible de las células adyacentes.
- Los dos núcleos de la célula deben tener su membrana nuclear intacta y encontrarse dentro del citoplasma.
- Los dos núcleos de la célula deben tener, aproximadamente, el mismo tamaño y la misma intensidad de tinción.
- Los dos núcleos de la célula pueden traslaparse, pero los límites de cada uno deben ser distinguibles.

Los micronúcleos son morfológicamente idénticos a los núcleos principales, pero son más pequeños. Para poder ser tenidos en cuenta, los micronúcleos localizados al interior de las células binucleadas deben tener las siguientes características morfológicas [52]:

- Sus diámetros deben medir entre $1/16$ y $1/3$ de lo que mide el diámetro de los núcleos principales.
- Deben tener una forma redonda u ovalada.
- No deben ser refringentes.
- No deben estar unidos o traslapados a alguno de los núcleos principales.
- Deben presentar color e intensidad similares a los que presentan los núcleos principales.

2.1. Calibración de haces de rayos X para mamografía

Los haces de rayos X utilizados en este trabajo se generaron utilizando la unidad de mastografía marca GE modelo Senographe 2000D que se encuentra en el Instituto de Física de la UNAM (IFUNAM). El equipo cuenta con un TRX con ánodos y filtros de Mo y Rh (0.030 y 0.025 mm de espesor, respectivamente) y puede funcionar con voltajes de operación entre 22 y 49 kV. En este trabajo, se emplearon las calidades de haz Q obtenidas a partir de las siguientes combinaciones ánodo/filtro/kilovoltaje (kV): Mo/Mo/25 kV, Mo/Mo/28 kV, Mo/Rh/31 kV y Rh/Rh/34 kV.

La calibración para una calidad de haz Q consiste en establecer la tasa de kerma en aire como función de la carga (mAs) en un punto de interés (rendimiento) y su CHR (CHR_Q). Para esto, se utilizó una cámara de ionización (CI) diseñada para mamografía, marca Radcal, modelo 20X6-6M, conectada a un electrómetro, marca Radcal, modelo 2026C. El electrómetro se encarga de integrar la carga liberada en el volumen de aire de la CI y de corregir las lecturas por la influencia de la presión y la temperatura.

El punto efectivo de la CI fue colocado a 5 cm sobre el detector digital de la unidad de mastografía, centrado lateralmente y a 5 cm dentro del campo de radiación con respecto al borde del detector. El detector del mastógrafo se cubrió con una placa de hierro de 1.0 cm de espesor. Todas las mediciones se realizaron con la paleta de compresión puesta y colocada a la distancia más alejada posible del detector (37.5 cm) (figura 2.1).

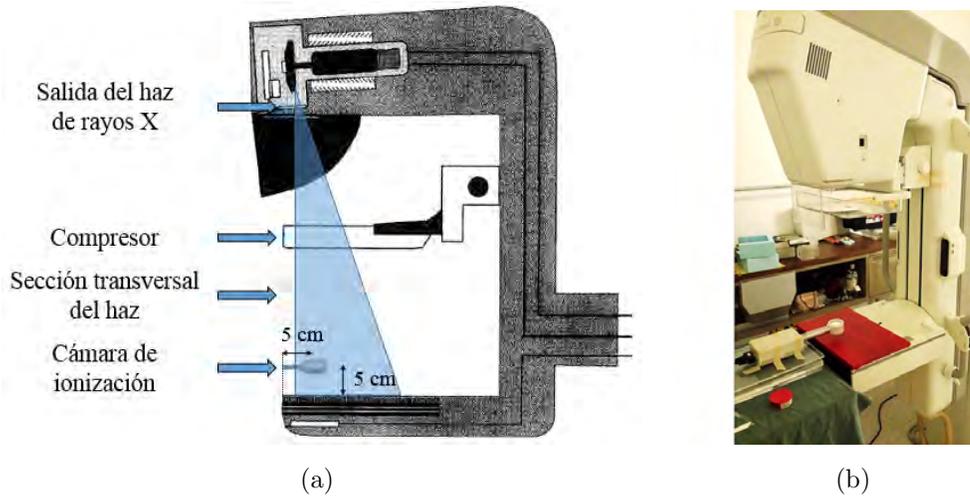


Figura 2.1: Ubicación de la cámara de ionización para la calibración del haz de rayos X. (a) Diagrama esquemático y (b) arreglo experimental.

2.1.1. Rendimiento

La curva de calibración para cada Q se midió utilizando 5 valores distintos de corriente integrada del TRX. Se obtuvo el kerma en aire ($K_{aire,Q}$) por medio de la ecuación

$$K_{aire,Q} = N_Q \cdot X \quad (2.1)$$

donde N_Q es el factor de calibración de la CI (en mGy/mR) y X es la exposición medida en mR por dicha cámara. Se graficaron los valores obtenidos de $K_{aire,Q}$ como función de la corriente integrada y se ajustaron a una recta de la forma

$$K_{aire,Q} = f_{aire,Q} \cdot I + b \quad (2.2)$$

donde I es la corriente integrada en mAs, $f_{aire,Q}$ es la tasa de $K_{aire,Q}$ por unidad de mAs (rendimiento) y b es un parámetro de ajuste.

2.1.2. Capa hemirreductora

La CHR_Q fue medida empleando filtros de aluminio (Al) ultra puro de 0.1 mm de espesor. Los filtros se colocaron sobre el compresor de tal manera que cubrieran todo el campo de radiación. Primeramente, se obtuvo el kerma en aire $K_{aire,0,Q}$ únicamente con la paleta de compresión entre la CI y la salida del haz. Luego, se agregaron filtros de Al y se obtuvieron

los valores de kerma en aire $K_{aire,l,Q}$ correspondientes a cada espesor total l de filtros de Al. El proceso se repitió hasta que $K_{aire,l,Q}$ tomó un valor menor que $K_{aire,0,Q}/2$. Finalmente, los valores de kerma en aire obtenidos, normalizados a $K_{aire,0,Q}$, fueron ajustados como función de l . Cada función de ajuste obtenida fue evaluada en $K_{aire,0,Q}/2$ para obtener el espesor l de filtros de Al correspondiente, es decir, las CHR_Q .

Conociendo la densidad del material atenuador (2.69 g/cm^3 para el Al), se determinó el coeficiente másico de atenuación efectivo $(\mu/\rho)_{ef,Q}$ para cada Q a partir de la relación:

$$\left(\frac{\mu}{\rho}\right)_{ef,Q} = \frac{\ln(2)}{\rho \cdot CHR_Q} \quad (2.3)$$

Enseguida, se consultó la energía correspondiente a $(\mu/\rho)_{ef,Q}$ en la base de datos para coeficientes másicos de atenuación de rayos X publicada por el Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) [53] y con ello se determinó la energía efectiva $E_{ef,Q}$ para cada Q empleada.

2.2. Dosimetría termoluminiscente

2.2.1. Irradiaciones en aire

2.2.1.1. Evaluación del kerma en aire empleando TLD-100

Se utilizaron dosímetros termoluminiscentes (TLD) de nombre comercial TLD-100 (LiF: Mg, Ti) del lote del 26/08/2006, propiedad del Laboratorio de Dosimetría TL del Grupo de Dosimetría y Física Médica (DOSIFICAME) del IFUNAM, seleccionados según su masa y su curva de brillo (señal TL integrada).

Los TLD fueron colocados en un bloque metálico y sometidos a un tratamiento térmico el cual consistió en un horneado en aire a $400 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora, seguido de un horneado en aire a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. Después de cada horneado, el bloque fue colocado sobre una placa de acero para que los TLD se enfriaran a una temperatura ambiente controlada de $18 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Su irradiación se realizó 24 horas después de terminado el tratamiento térmico. Para ello, se colocaron centrados con respecto a la ubicación del punto efectivo de la CI empleada en la calibración de cada Q , empleando un soporte y cinta adhesiva (figura

2.2). Se emplearon las calidades de haz Q anteriormente calibradas y distintos valores de $K_{aire,Q}$.

La lectura de los TLD se llevó a cabo, al menos, 24 horas posteriores a la irradiación. Previamente, fueron colocados en un bloque y sometidos a un horneado en aire a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, seguido por un enfriamiento a temperatura ambiente controlada de $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos sobre una placa de acero. Los TLD fueron leídos bajo una tasa de calentamiento de $8\text{ }^{\circ}\text{C/s}$, desde la temperatura ambiente hasta $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se obtuvo la señal TL integrada de cada uno. Se mantuvo siempre una referencia de las posiciones relativas de los TLD durante las irradiaciones y las lecturas. Todas las irradiaciones incluyeron dosímetros testigos (no irradiados) que fueron leídos bajo las mismas condiciones y cuya señal TL integrada fue restada a los dosímetros irradiados para obtener su señal TL integrada neta (STL_Q).

Para comparar la STL_Q de los TLD con el valor de $K_{aire,Q}$ al cual fueron expuestos, se realizó un ajuste por regresión lineal para cada Q de la forma:

$$K_{aire,Q} = F_Q \cdot STL_Q \quad (2.4)$$

donde F_Q es un factor de calibración que relaciona la STL_Q con el $K_{aire,Q}$ para la calidad Q . Así mismo, se realizó un ajuste por regresión lineal de F_Q como función de $E_{ef,Q}$ (obtenida a partir de la CHR_Q para cada Q).

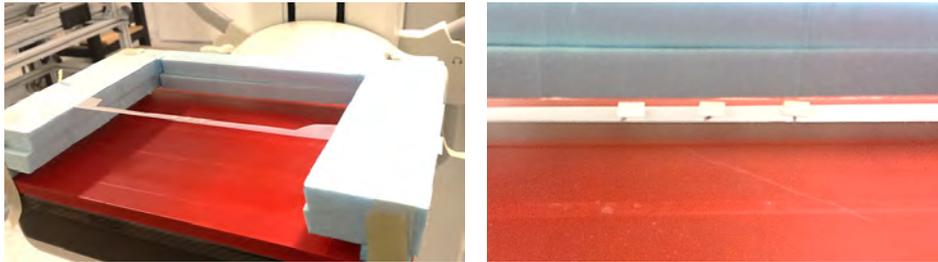


Figura 2.2: Arreglo experimental utilizado para la irradiación de dosímetros termoluminiscentes.

2.2.1.2. Evaluación de la energía efectiva empleando TLD-300

En su tesis de maestría, el M. en C. Ivan Domingo Muñoz estudió algunas de las propiedades de la curva de brillo de los dosímetros termoluminiscentes de nombre comercial TLD-300 ($\text{CaF}_2:\text{Tm}$) al ser expuestos a rayos X de baja energía [54, 55]. Este trabajo propone utilizar

el parámetro *HLTR* (*High-to-Low Temperature Ratio*, por sus siglas en inglés), asociado a los picos de alta y baja temperatura en la curva de brillo de dichos TLD, para estimar la energía efectiva del campo de fotones en el punto donde son irradiados. El *HLTR* está dado por el cociente

$$HLTR = \frac{P_5 + P_6 + P_7}{P_{3a} + P_3} \quad (2.5)$$

donde cada P_i corresponde al área bajo la curva del i -ésimo pico que conforma la curva de brillo, obtenida por medio de un proceso de deconvolución (descomposición de una curva de brillo en picos individuales) como el que se muestra en la figura 2.3.

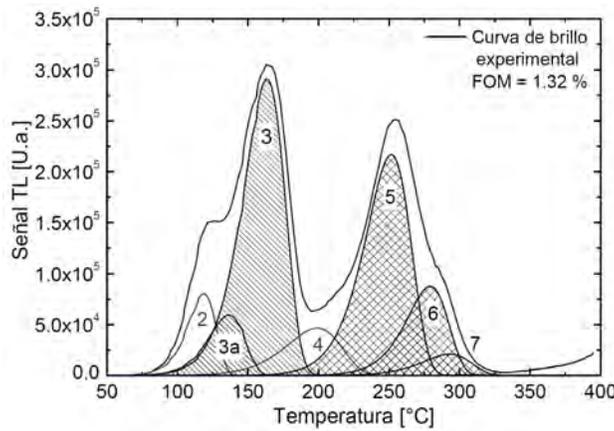


Figura 2.3: Curva de brillo del TLD-300 expuesto a un haz de rayos X de mamografía (Mo/Mo/28 kV). Se muestran los 7 picos obtenidos de la deconvolución. Se identifican los picos de baja (P_{3a} y P_3) y alta temperatura (P_5 , P_6 y P_7) [54].

Se utilizaron dosímetros TLD-300 del lote único propiedad del Laboratorio de Dosimetría TL del Grupo DOSIFICAME del IFUNAM. Los TLD fueron colocados en un bloque metálico y sometidos a un tratamiento térmico el cual consistió en un horneado en aire a 400 °C durante una hora. Después de dicho horneado, el bloque fue colocado sobre una placa de acero para que los TLD se enfriaran a una temperatura ambiente controlada de 18 °C durante 15 minutos. Su irradiación se realizó 24 horas después de terminado el tratamiento térmico. Para ello, se colocaron en una geometría análoga a la descrita en la sección 2.2.1.1. Se emplearon las calidades de haz Q anteriormente calibradas y un mismo valor de corriente integrada. La lectura de los TLD se llevó a cabo 48 horas posteriores a la irradiación, empleando una tasa de calentamiento de 8 °C/s, desde la temperatura ambiental hasta 400 °C. Al igual que lo realizado con los dosímetros TLD-100, se mantuvo siempre una referencia de las

posiciones relativas de los TLD durante las irradiaciones y las lecturas. Todas las irradiaciones incluyeron dosímetros testigos que fueron leídos bajo las mismas condiciones.

Una vez obtenidas las curvas de brillo de cada TLD, se realizó un proceso de deconvolución en 7 picos individuales más un fondo con comportamiento exponencial utilizando el programa GlowFit versión 1.3 [56]. Se restringieron las posiciones de los picos (T_m) y los valores de las energías de activación a los valores presentados en el trabajo citado anteriormente, ajustando los parámetros que mejor describieran a las curvas de brillo experimentales, en términos de la Figura de Mérito (FOM, por sus siglas en inglés)¹¹.

Con la información obtenida luego de la deconvolución, se determinó el parámetro $HLTR_Q$, correspondiente a la calidad de haz Q empleada en la irradiación. Luego, se realizó un ajuste por regresión lineal de $HLTR_Q$ como función de $E_{ef,Q}$.

2.2.2. Irradiaciones en PMMA

En la figura 2.4 se muestra uno de los 3 maniqués de PMMA diseñados y fabricados para este trabajo. El diseño está basado en placas cuadradas de 10 cm de lado. Cada maniqué consta de las siguientes tres partes:

- Base: 2 placas de PMMA con espesor de 1 cm y 2 cm.
- Soporte para TLD: placa de PMMA con espesor de 1 cm conteniendo 9 nichos circulares con diámetros de 0.5 cm y profundidades de 0.1 cm (figura 2.4b).
- Tapa: placa de PMMA con espesor de 0.5 cm.

La profundidad de PMMA a la cual pueden ser colocados los TLD en el maniqué es variable. En este trabajo se manejó 0 cm de profundidad, es decir, los TLD se irradiaron en la superficie del maniqué. Para dichas irradiaciones, las componentes del maniqué que se

¹¹Es un parámetro que describe la calidad del ajuste, calculado como:

$$FOM(\%) = \frac{\sum_{i=1}^n |y_i - y(x_i)|}{\sum_{i=1}^n y_i} \times 100\%$$

donde y_i es el valor contenido en el i -ésimo canal y $y(x_i)$ es el valor correspondiente a dicho canal por parte de la función ajustada [56].

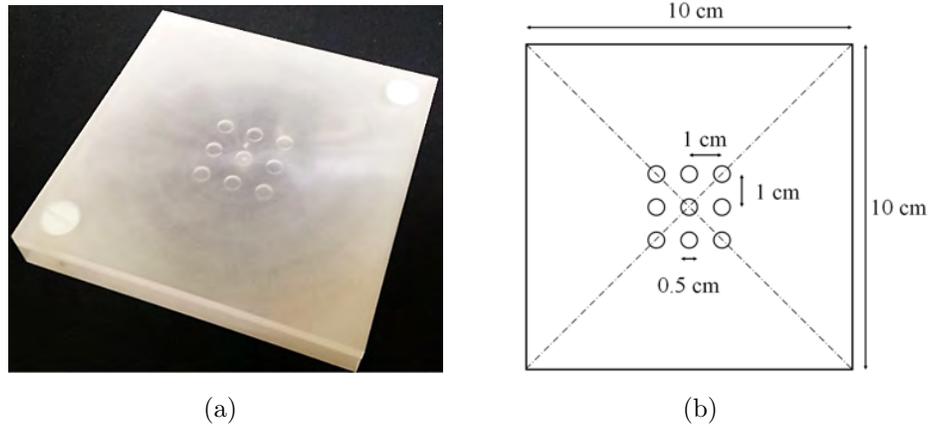


Figura 2.4: (a) Maniquí de PMMA. (b) Diseño del soporte para dosímetros TL, donde también serán depositadas las células para su irradiación.

emplearon fueron la base y el soporte para TLD, por lo que el espesor conjunto de las placas fue de 4 cm, lo que representa una mama equivalente comprimida de 45 mm de espesor con una glandularidad del 40 % [57].

En este trabajo interesó conocer la tasa de dosis en agua \dot{D}_{agua,E_n} (en mGy/mAs) en la superficie del maniquí (dado que se irradiaron células suspendidas en un medio equivalente a agua). El maniquí fue posicionado tomando como referencia su nicho central, el cual fue ubicado en el punto donde fueron calibradas las distintas calidades de haz. Se obtuvo la energía efectiva E_n en dicho punto a partir del parámetro $HLTR$ medido con dosímetros TLD-300 irradiados con las calidades de haz Mo/Mo/28 kV y Rh/Rh/34 kV (las empleadas en la irradiación de células) y el ajuste descrito en la sección 2.2.1.2. Luego, se obtuvo el factor de calibración $F_Q(E_n)$ de los dosímetros TLD-100 para la energía E_n a partir del ajuste descrito en la sección 2.2.1.1. De esta manera, se obtuvo \dot{D}_{agua,E_n} a partir de:

$$\dot{D}_{agua,E_n} = F_Q(E_n) \dot{S}TL_Q \left(\frac{\mu_{en}}{\rho}(E_n) \right)_{aire}^{agua} \quad (2.6)$$

para las calidades de haz Mo/Mo/28 kV y Rh/Rh/34 kV, donde $(\mu_{en}(E_n)/\rho)_{aire}^{agua}$ es el cociente que permite convertir dosis en aire a dosis en agua para la energía E_n y $\dot{S}TL_Q$ (en nC/mAs) es un parámetro evaluado a partir del cociente de STL_Q de dosímetros TLD-100 irradiados en la superficie del maniquí, empleando las combinaciones Mo/Mo/28 kV y Rh/Rh/34 kV, con los valores de corriente integrada empleados en dichas irradiaciones (200, 400 y 600 mAs).

2.3. Cultivo, conteo y viabilidad de líneas celulares

2.3.1. Cultivo celular

Se emplearon 2 líneas celulares de linfoblastos transformados por el virus de Epstein-Barr (VEB): linfocitos B proveniente de una mujer de 52 años de raza caucásica con estatus génico normal y linfocitos B proveniente de una mujer de 36 años de raza caucásica con el genotipo ATM(+/-). Fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado al 15 % con suero fetal bovino (Gibco), 1 % L-glutamina (Gibco) y 1 % antibiótico (Gibco). Cada línea celular fue sembrada en un frasco de cultivo que se mantuvo al interior de una incubadora con corriente de CO₂ bajo una condición ambiental controlada (37 °C con 5 % de CO₂). Su manipulación se llevó a cabo al interior de una campana de flujo laminar.

2.3.2. Conteo celular

Se empleó el ensayo de exclusión por azul de tripano. Para ello, el medio con células se centrifugó a 1200 rpm por 8 minutos y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo (V). Luego, se tomó una alícuota de 20 μ l de V y se resuspendió en 900 μ l de medio RPMI-1640 más 80 μ l del colorante azul de tripano al 0.4 %, es decir, se tiene un factor de dilución (f) de 50 (1000:20). Finalmente, se tomaron 10 μ l de la solución anterior y se depositaron en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), el cual se llevó a un microscopio óptico con objetivo de 20 \times y su condensador en 0 para realizar el conteo de células. Se contó el número de células vivas (refringentes) y muertas (azules) para luego calcular la concentración de células vivas c a partir de la expresión:

$$c = \frac{N \cdot f}{n \cdot v} \quad (2.7)$$

donde N es el número de células vivas contadas, f el factor de dilución de la solución preparada, n el número de cuadrantes contados en el hemocitómetro empleado y v el volumen de cada cuadrante. En este caso, la cámara cuenta con 4 cuadrantes con un volumen considerado de 0.1 μ l cada uno. El número total de células puede ser obtenido al multiplicar c por el volumen total del medio celular V del cual se tomó la alícuota.

2.3.3. Viabilidad celular

Se empleó el método diferencial de tinción de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA/BrEt) para evaluar la viabilidad celular (proporción de células vivas respecto al total)¹². Para ello, se tomó una alícuota de 20 μl del medio celular empleado en el conteo y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. El botón celular resultante fue resuspendido en 20 μl de una solución preparada con 600 μl de PBS 1 \times , 7 μl de FDA (5 mg/ml de acetona) y 30 μl de BrEt (0.2 mg/ml de PBS 1 \times). En oscuridad, las células fueron montadas sobre una laminilla y analizadas en un microscopio de fluorescencia donde fueron observadas bajo una luz de excitación de 530 nm. Las células vivas se observan de color verde, mientras que las muertas se observan de color rojo¹³. Se contaron, al menos, 200 células. La viabilidad celular se obtuvo al calcular el porcentaje de células vivas respecto al total de células contadas.

2.4. Evaluación del efecto biológico de la dosis

2.4.1. Irradiación de líneas celulares

Dos horas previas a su irradiación, se contó el número de células de la línea a ser irradiada y se evaluó su viabilidad. Todos los experimentos fueron realizados con una viabilidad mayor al 90%. Se tomó un volumen con el número de células requerido y se aforó empleando medio de cultivo para obtener un volumen final adecuado para la toma de alícuotas a una concentración fija (aproximadamente 5,500 células/ μl). Las células fueron depositadas en los nichos del soporte para TLD, el cual fue previamente esterilizado junto con la tapa de cada maniquí de PMMA (empleada sólo en el transporte de las células para su irradiación) por medio de radiación UV, y cubiertas por una película de parafina también estéril (empleada

¹²El colorante azul de tripano también puede ser empleado para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras, es decir, permite diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas [58]. Sin embargo, sólo tiñe las células que tienen muy dañada su membrana.

¹³El FDA permea la membrana y tiñe el lisosoma de la célula, el cual se encuentra distribuido en toda la célula y por eso se observa verde. En cambio, cuando la célula presenta una ligera rotura de la membrana, el BrEt entra y tiñe al ADN, por eso la célula se observa roja.

para mantener la esterilidad en los nichos con células). Se sembraron un total de 500,000 células en cada maniquí.

La preparación de cada maniquí se llevó a cabo en el Laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (IIB). Posteriormente, fueron transportados a la sala de irradiación con rayos X del Grupo DOSIFICAME del IFUNAM, donde se localiza el mastógrafo. Los valores de D_{agua} empleados fueron 5, 10, 20 y 40 mGy, aproximadamente, para la Q obtenida a partir de la combinación Mo/Mo/28 kV y 40 mGy para la combinación Rh/Rh/34 kV. Una vez irradiados, los maniquís se transportaron al IIB, se recuperaron las células y se colocaron en los pozos de una caja de cultivo con 1 ml de medio de cultivo, un pozo por cada condición de irradiación. Todas las irradiaciones incluyeron un control negativo no irradiado y un control positivo¹⁴, dado por una concentración fija (5.0 μ M) del agente radiomimético bleomicina (BLM)¹⁵. Ambos controles fueron tratados en las mismas condiciones que las células irradiadas. La caja de cultivo fue llevada a la incubadora para su posterior tratamiento.

2.4.2. Genotoxicidad de las dosis de RI

El efecto citostático (inhibición del desarrollo y multiplicación de las células) de las dosis de RI fue evaluado a partir de la cinética de proliferación celular, la cual es cuantificada a partir del índice de división nuclear (IDN). Por otro lado, su genotoxicidad se evaluó por medio del ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis, al contabilizar la frecuencia de micronúcleos (f_{MN}). Para ello, 2 horas después de haber dispuesto las células en los pozos de una caja de cultivo, se agregó a cada condición de cultivo una concentración fija de Citocalasina-B (Cyt-B), 3 μ l por cada 1 ml de medio completo. El emplear Cyt-B permite

¹⁴Un control negativo es un grupo control que no está expuesto al tratamiento experimental o a cualquier otro tratamiento que se espera tenga un efecto. Un control positivo es un grupo control que no está expuesto al tratamiento experimental pero que está expuesto a algún otro tratamiento que se sabe produce el efecto esperado [59].

¹⁵La bleomicina es un agente radiomimético que actúa produciendo roturas de doble cadena del ADN [60].

inhibir la división celular (citocinesis) pero no la nuclear¹⁶. Nuevamente, la caja fue llevada a incubación durante 24 horas y luego se llevó a cabo un proceso denominado “cosecha”, en el cual las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación y luego lavadas 3 veces en una solución 3:1 de metanol/ácido acético glacial con el fin de ser fijadas. Enseguida, se depositaron en un laminilla previamente humedecida con agua fría. Una vez seca, la laminilla se tiñó el colorante Giemsa (Merck). Después, se analizó a un microscopio óptico con objetivo de 100× y su condensador en 0 para su observación. El *IDN* fue calculado a partir de 200 células utilizando la ecuación

$$IDN = \frac{N_{Mo} + 2N_{Bi} + 3N_{Poli}}{200} \quad (2.8)$$

donde N_{Mo} es el número de células mononucleadas observadas, N_{Bi} el de binucleadas y N_{Poli} el de polinucleadas (figura 2.5). El *IDN* se encuentra en el rango de 1 a 3. La f_{MN} se determinó a partir del conteo del número de células con micronúcleo (N_{MN}) en una muestra de 1000 células binucleadas (CB) utilizando la ecuación

$$f_{MN} = \frac{N_{MN}}{1000 \text{ CB}} \quad (2.9)$$

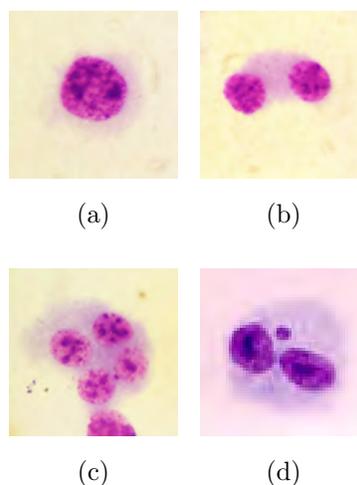


Figura 2.5: Imágenes de las células observadas en la evaluación del efecto de las dosis de RI: (a) célula mononucleada; (b) célula binucleada; (c) célula polinucleada; (d) célula binucleada con micronúcleo.

¹⁶La inhibición de la citocinesis permite, además de observar en qué división celular se encuentra la célula, no sobreestimar el número de células dañadas.

2.5. Análisis estadístico

Se realizaron cuatro repeticiones independientes de cada experimento para cada línea celular. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando los programas IBM SPSS Statistics 23 y GraphPad Prism 6. Dado que el número de repeticiones fue pequeño, se empleó el test de Shapiro-Wilk para contrastar la normalidad del conjunto de datos. La comparación de los tratamientos con el control no irradiado se llevó a cabo usando la prueba ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett para la comparación de cada uno de los tratamientos con el control no irradiado. Para la comparación entre las líneas celulares se utilizó la prueba t de Student para la comparación de las medias de dos grupos. El nivel de significancia de este trabajo fue de $\alpha = 0.05$, considerando los valores de $*p \leq 0.05$ (significativo) y $**p \leq 0.01$ (altamente significativo).

3.1. Dosimetría de los haces de radiación

3.1.1. Calibración de los haces de rayos X

En la figura 3.1 se muestran las medidas con los ajustes por regresión lineal obtenidos para el $K_{aire,Q}$ como función de la corriente integrada (Ec. 2.2). Para cada Q empleada, el coeficiente de determinación (R^2) fue igual a 1 dentro de 5 cifras significativas. En la tabla 3.1 se proporcionan los valores obtenidos para $f_{aire,Q}$ y b . Por otro lado, en la figura 3.2 se muestran las medidas con los ajustes obtenidos, según lo indicado en la sección 2.1.2, para la evaluación de las CHR_Q . En la tabla 3.1 también se presentan los valores obtenidos para la CHR_Q y la $E_{ef,Q}$ asociada.

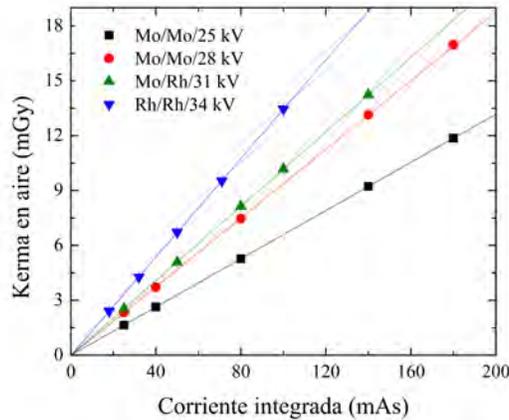


Figura 3.1: $K_{aire,Q}$ como función de la corriente integrada en mAs. Cada punto corresponde al promedio de 3 medidas. Las barras de incertidumbre son menores que el tamaño del símbolo de graficación.

Calidad de haz	$f_{aire,Q}$	b	CHR_Q	$E_{ef,Q}$
Ánodo/Filtro/kV	mGy/mAs	mGy	mmAl	keV
Mo/Mo/25	0.0659 ± 0.0005	-0.019 ± 0.010	0.329 ± 0.008	15.1 ± 0.3
Mo/Mo/28	0.0939 ± 0.0004	-0.015 ± 0.016	0.363 ± 0.006	15.6 ± 0.2
Mo/Rh/31	0.1018 ± 0.0007	-0.012 ± 0.011	0.445 ± 0.007	16.8 ± 0.3
Rh/Rh/34	0.1347 ± 0.0003	-0.021 ± 0.009	0.491 ± 0.010	17.4 ± 0.3

Tabla 3.1: Valores de $f_{aire,Q}$, b , CHR_Q y $E_{ef,Q}$ para las distintas calidades de haz calibradas.

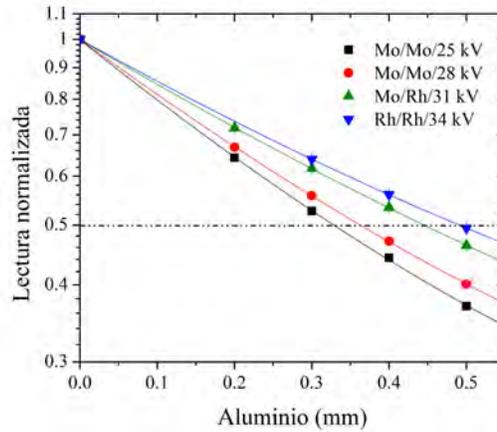


Figura 3.2: Valores de kerma en aire normalizados en función del espesor del material atenuador. Cada punto corresponde al promedio de 3 medidas.

3.1.2. Irradiación de dosímetros termoluminiscentes en aire

En la figura 3.3 se muestra la curva de brillo de uno de los dosímetros TLD-100 irradiados. Por otra parte, en la figura 3.4 se muestran las medidas con los ajustes por regresión lineal obtenidos empleando la ecuación 2.4 para cada Q calibrada. En la tabla 3.2 se presentan los valores de F_Q y los coeficientes R^2 asociados. En todos los casos, R^2 fue mayor que 0.996.

En la figura 3.5 se presentan los valores de F_Q y el ajuste por regresión lineal obtenido como función de $E_{ef,Q}$. En este caso, se obtuvo un valor de R^2 mayor que 0.996 y los valores de la pendiente y la ordenada al origen fueron -0.0042 ± 0.0005 (mGy/nC)·keV⁻¹ y 0.16 ± 0.01 mGy/nC, respectivamente.

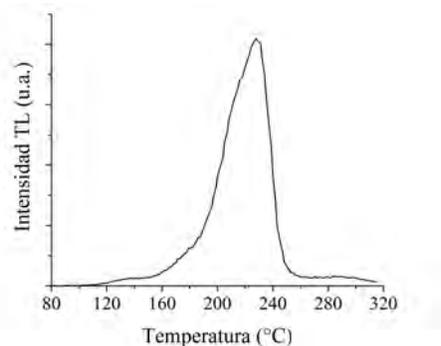


Figura 3.3: Curva de brillo obtenida de uno de los dosímetros TLD-100 irradiados.

Calidad de haz	Factor de calibración (F_Q)	Coefficiente R^2
Ánodo/Filtro/kV	mGy/nC	
Mo/Mo/25	0.100 ± 0.002	0.9965
Mo/Mo/28	0.097 ± 0.002	0.9972
Mo/Rh/31	0.092 ± 0.002	0.9975
Rh/Rh/34	0.090 ± 0.002	0.9996

Tabla 3.2: Parámetros de los ajustes por regresión lineal de $K_{aire,Q}$ como función de STL_Q para cada calidad de haz empleada.

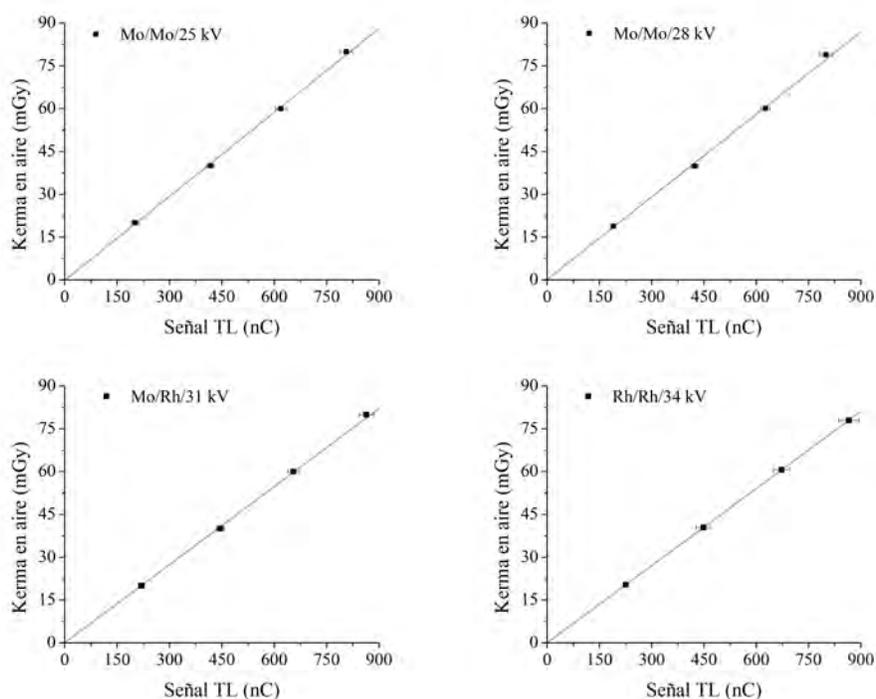


Figura 3.4: Medidas y ajustes por regresión lineal (Ec. 2.4) de $K_{aire,Q}$ como función de STL_Q para cada calidad de haz empleada. Cada punto corresponde al promedio de 5 medidas.

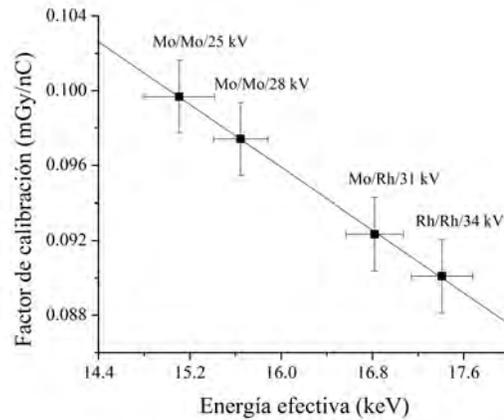


Figura 3.5: Medidas y ajuste por regresión lineal de F_Q como función de la energía efectiva del haz de fotones. Cada punto corresponde al promedio de 5 medidas y a una calidad de haz distinta.

En la figura 3.6 se muestran curvas de brillo obtenidas de los dosímetros TLD-300 irradiados con los haces de radiación calibrados, normalizadas al valor máximo de la señal de alta temperatura. Se observa un aumento de la señal de baja temperatura al aumentar la energía efectiva del haz de fotones. En la figura 3.7 se muestra la gráfica obtenida para $HLTR_Q$ (obtenido a partir de la ecuación 2.5) como función de $E_{ef,Q}$ para cada calidad Q . En este caso, R^2 fue mayor que 0.998 y los valores de la pendiente y la ordenada al origen fueron $-0.016 \pm 0.001 \text{ keV}^{-1}$ y 1.28 ± 0.04 , respectivamente.

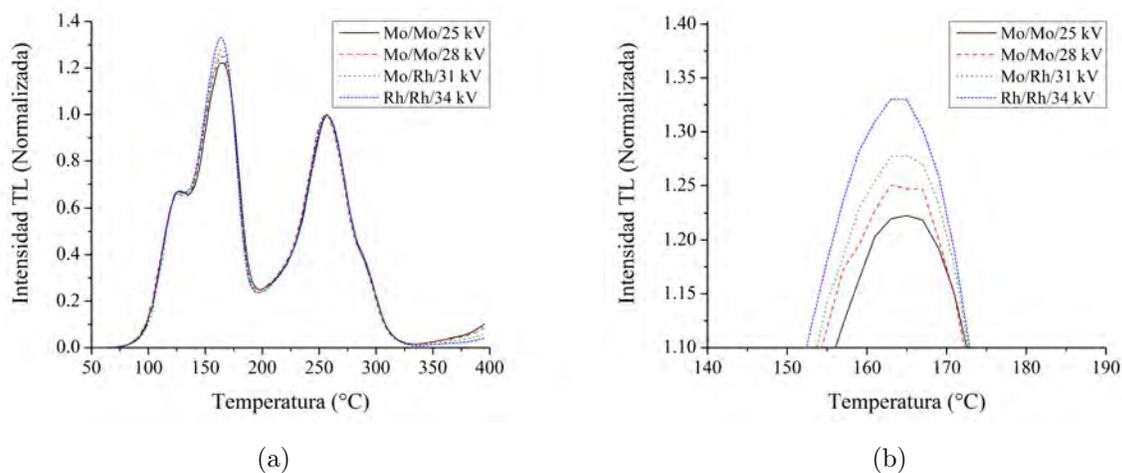


Figura 3.6: (a) Curvas de brillo obtenidas de los dosímetros TLD-300 irradiados bajo los haces de radiación calibrados, normalizadas al valor máximo de la señal de alta temperatura. (b) Se muestra un acercamiento al valor máximo de la señal de baja temperatura.

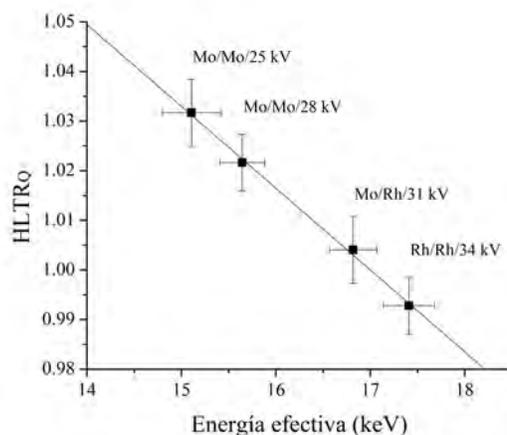


Figura 3.7: Medidas y ajuste por regresión lineal de $HLTR_Q$ como función de $E_{ef,Q}$. Cada punto corresponde al promedio de 5 medidas y a una calidad de haz distinta.

3.1.3. Irradiación de dosímetros termoluminiscentes en PMMA

Los valores del parámetro STL_Q descrito en la sección 2.2.2 fueron 1.053 ± 0.041 nC/mAs y 1.535 ± 0.045 nC/mAs para las calidades de haz obtenidas a partir de las combinaciones Mo/Mo/28 kV y Rh/Rh/34 kV, respectivamente. A partir de los valores obtenidos para $F_Q(E_n)$ y E_n (por medio de las curvas de calibración de las figuras 3.5 y 3.7, respectivamente), de la ecuación 2.6 se obtuvieron los valores de \dot{D}_{agua,E_n} para las combinaciones Mo/Mo/28 kV y Rh/Rh/34 kV, los cuales fueron 0.109 ± 0.014 mGy/mAs y 0.142 ± 0.021 mGy/mAs, respectivamente.

Con el fin de descartar la variación de los valores de \dot{D}_{agua,E_n} durante la irradiación de las líneas celulares, al finalizar el trabajo con las mismas se midió nuevamente la CHR_Q de las combinaciones Mo/Mo/28 kV y Rh/Rh/34 kV, encontrando diferencias del 1.19 % y 0.68 %, respectivamente. Tal diferencia es considerablemente pequeña e inclusive pudo deberse a la incertidumbre experimental en la colocación de la CI en la nueva medición de ambas CHR_Q .

3.2. Evaluación del efecto biológico de la dosis

3.2.1. Índice de división nuclear

En la figura 3.8 se presentan las gráficas del *IDN* promedio de (a) la línea celular con estatus génico normal y (b) la línea celular con mutación ATM(+/-), en función de los valores de D_{agua} , al irradiar con la calidad de haz obtenida a partir de la combinación Mo/Mo/28 kV. No se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las células irradiadas y el control no irradiado en ninguno de los casos. Sólo el control positivo (BLM) presenta una disminución significativa en la proliferación.

De manera análoga, en la figura 3.9 se presentan las gráficas del *IDN* al impartir una dosis de $D_{agua} = 40$ mGy a ambas líneas celulares con la calidad de haz obtenida a partir de la combinación Rh/Rh/34 kV. Tampoco se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las células irradiadas y el control no irradiado. Los resultados obtenidos indican que estos niveles de dosis no modifican la cinética de proliferación de las líneas celulares empleadas para las energías estudiadas.

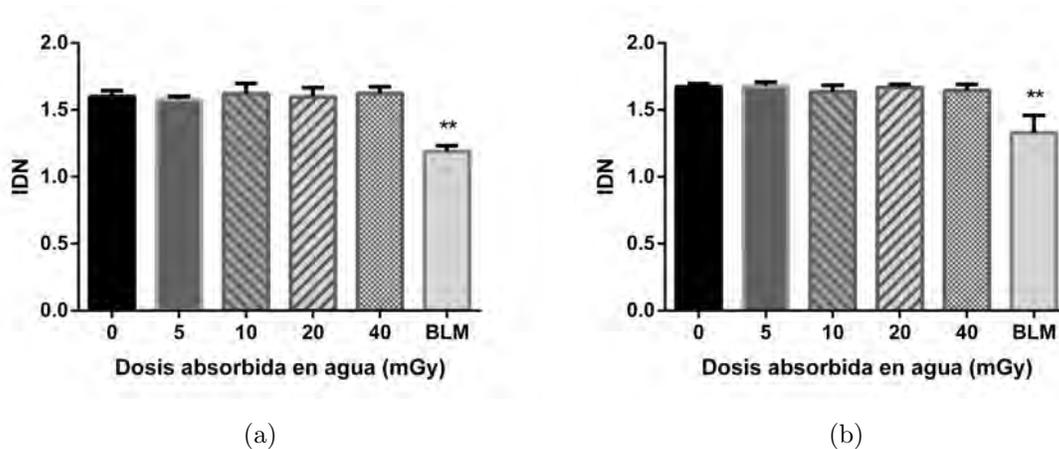


Figura 3.8: Índice de División Nuclear para (a) la línea normal y (b) la línea ATM(+/-), en función de los valores de D_{agua} , empleando la calidad de haz Mo/Mo/28 kV. BLM representa al control positivo. Se muestran el promedio la y desviación estándar de 4 repeticiones experimentales (Prueba ANOVA, ** $p \leq 0.01$).

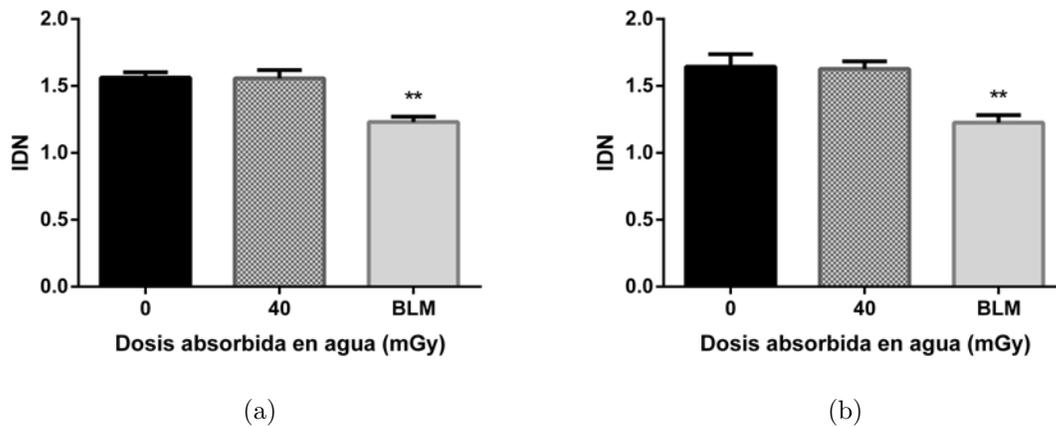


Figura 3.9: Índice de División Nuclear para (a) la línea normal y (b) la línea ATM(+/-), para $D_{agua} = 40$ mGy, empleando la combinación Rh/Rh/34 kV. BLM representa al control positivo. Se muestran el promedio y la desviación estándar de 4 repeticiones experimentales (Prueba ANOVA, ** $p \leq 0.01$).

3.2.2. Frecuencia de micronúcleos

En la figura 3.10 se presentan las gráficas de la frecuencia de micronúcleos promedio de (a) la línea celular con estatus génico normal y (b) la línea celular con mutación ATM(+/-), en función de los valores de D_{agua} , al irradiar con la calidad de haz obtenida con Mo/Mo/28 kV. En el caso de la línea celular con estatus génico normal, no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las células irradiadas y el control no irradiado. En cambio, para la línea celular con mutación ATM(+/-), se observa un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de micronúcleos en las células irradiadas a 40 mGy en relación al control no irradiado.

De manera análoga, en la figura 3.11 se presentan las gráficas de la frecuencia de micronúcleos promedio al impartir una dosis de $D_{agua} = 40$ mGy a ambas líneas celulares con Rh/Rh/34 kV. De igual forma, sólo se observa un aumento estadísticamente significativo para las células de la línea con mutación ATM(+/-) irradiadas en relación con el control no irradiado. Por lo tanto, se concluye que una dosis de $D_{agua} = 40$ mGy de rayos X de mamografía es capaz de provocar un daño cromosómico, en forma de micronúcleos, en la línea celular con mutación ATM(+/-) significativamente mayor al que presenta de manera basal, lo cual no se observa en la línea con estatus génico normal. Esta conclusión aplica a ambas calidades de haz.

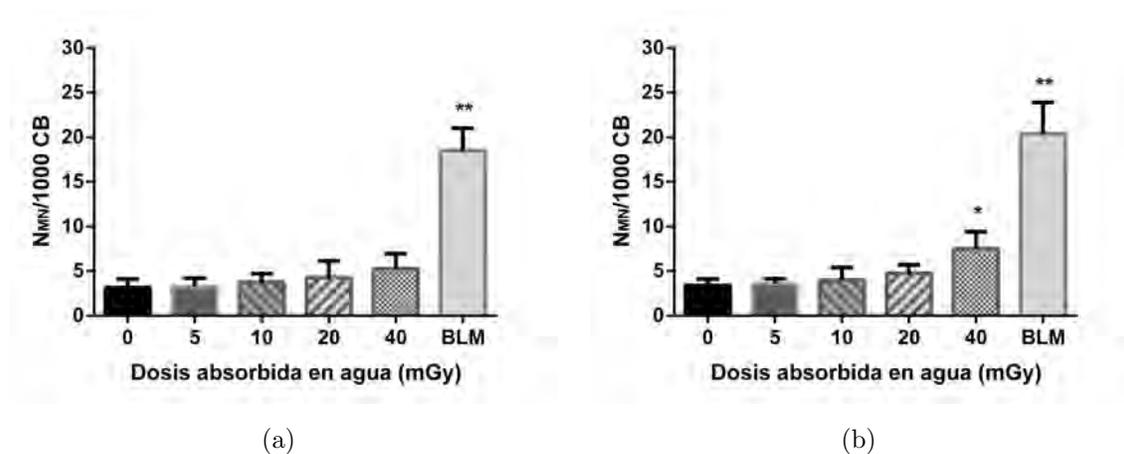


Figura 3.10: Frecuencia de micronúcleos para (a) la línea normal y (b) la línea ATM(+/-), en función de los valores de D_{agua} , empleando Mo/Mo/28 kV. BLM representa al control positivo. Se muestran el promedio y la desviación estándar de 4 repeticiones experimentales (Prueba ANOVA, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

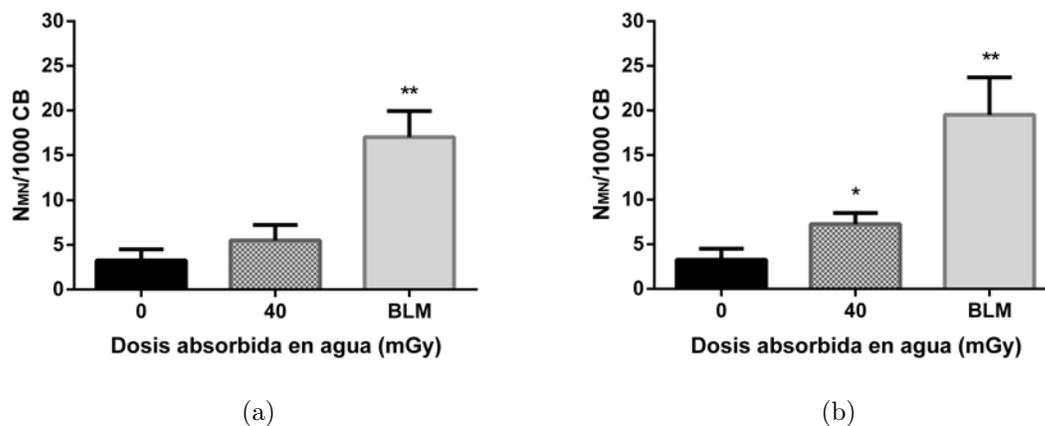


Figura 3.11: Frecuencia de micronúcleos para (a) la línea normal y (b) la línea ATM(+/-), para $D_{agua} = 40$ mGy, empleando Rh/Rh/34 kV. BLM representa al control positivo. Se muestran el promedio y la desviación estándar de 4 repeticiones experimentales (Prueba ANOVA, * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

3.2.3. Comparación entre líneas celulares

Para analizar la respuesta de cada línea celular a la inducción de micronúcleos por las diferentes dosis de RI, con la calidad de haz obtenida a partir de la combinación Mo/Mo/28 kV, se realizó una regresión lineal para (a) la línea celular con estatus génico normal y (b) la línea celular con mutación ATM(+/-) (figura 3.12). En la tabla 3.3 se muestran los valores de

las pendientes, las intersecciones y los coeficiente de determinación (R^2) obtenidos. Se puede observar que la pendiente de la regresión lineal para la línea celular con mutación ATM(+/-) es 1.66 veces mayor que la pendiente encontrada para la línea celular con estatus génico normal, lo que denota mayor sensibilidad a la dosis de la primera respecto a la segunda.

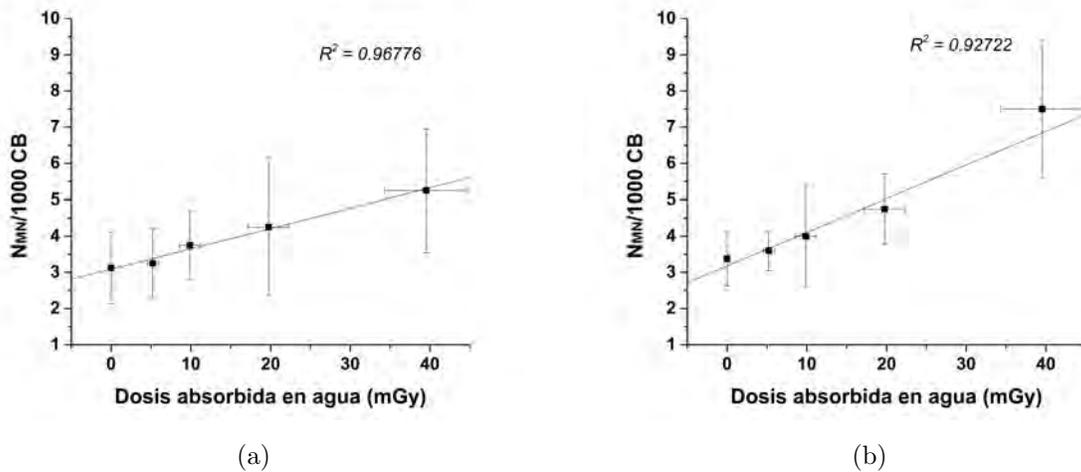


Figura 3.12: Frecuencia de micronúcleos para (a) la línea celular con estatus génico normal y (b) la línea celular con mutación ATM(+/-), en función de los valores de D_{agua} , para la calidad de haz obtenida a partir de la combinación Mo/Mo/28 kV.

Línea celular	Pendiente	Intersección	R^2
	$(N_{MN}/1000\text{ CB})/mGy$	$N_{MN}/1000\text{ CB}$	
Normal	0.056 ± 0.048	3.1 ± 0.7	0.96776
ATM(+/-)	0.093 ± 0.043	3.2 ± 0.5	0.92722

Tabla 3.3: Parámetros obtenidos de las regresiones lineales de la frecuencia de micronúcleos de las líneas celulares empleadas, en función de los valores de D_{agua} , para la calidad de haz obtenida a partir de la combinación Mo/Mo/28 kV.

En la figura 3.13 se presenta la comparación de la frecuencia de micronúcleos promedio, para cada línea celular, inducida por una $D_{agua} = 40\text{ mGy}$ y las dos calidades de haz utilizadas. No se observa una diferencia estadísticamente significativa en la generación de micronúcleos por el hecho de irradiar con una calidad de haz distinta.

Con base en el resultado anterior, en la figura 3.14 se presenta una comparación de la frecuencia de micronúcleos promedio inducida en las dos líneas celulares por una $D_{agua} = 40$

mGy, promediando los resultados encontrados con las dos calidades de haz. En este caso, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre la línea celular con estatus génico normal y la línea celular con mutación ATM(+/-), lo que denota el riesgo a nivel celular que confiere el genotipo ATM(+/-) a tal dosis respecto a un genotipo normal.

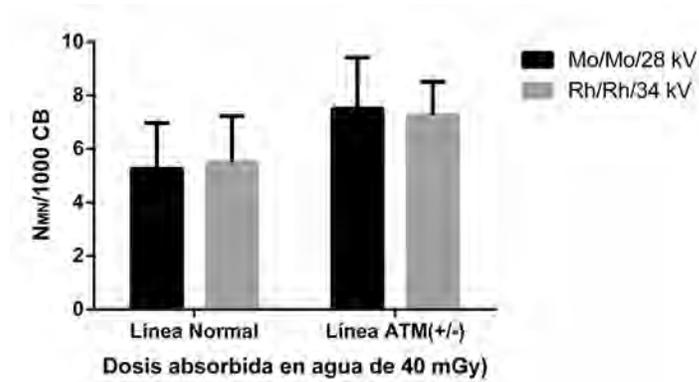


Figura 3.13: Frecuencia de micronúcleos promedio inducida en cada línea celular por una $D_{agua} = 40$ mGy y las dos distintas calidades de haz utilizadas. Se muestran el promedio y la desviación estándar de 4 repeticiones experimentales (Prueba t de Student).

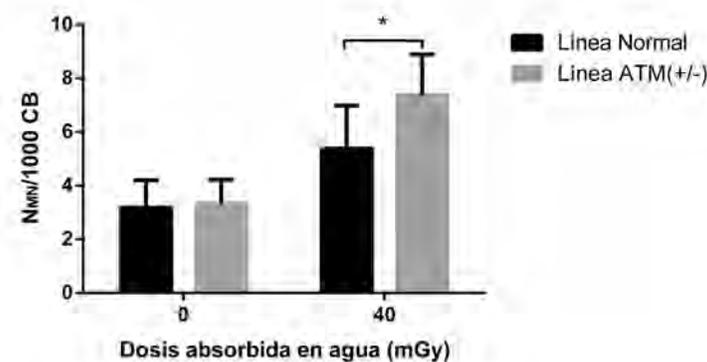


Figura 3.14: Frecuencia de micronúcleos promedio inducida por $D_{agua} = 40$ mGy, promediando los resultados encontrados con las dos calidades de haz. Se muestran el promedio y la desviación estándar de 8 repeticiones experimentales (Prueba t de Student, $*p \leq 0.05$).

Capítulo 4 | *Discusión*

Está bien documentado que la mayoría de las exposiciones a RI a las que se someten los seres humanos son a dosis bajas, como las provenientes de radiación ambiental y los procedimientos de imagenología con rayos X [6]. Sin embargo, la información en la literatura sobre los efectos biológicos debido a las mismas no es concluyente, especialmente en lo que respecta a personas portadoras de mutaciones de genes de susceptibilidad al cáncer. Para efectos de protección radiológica, la ICRP considera que los genes de susceptibilidad a cáncer son tan poco frecuentes como para causar una distorsión significativa de las estimaciones (basadas en la población general) del riesgo a desarrollar un cáncer inducido por dosis bajas de RI. Así mismo, considera que la información disponible sobre tales genes es insuficiente como para proporcionar una estimación cuantitativa [11]. La ICRP considera una posición prudente que el riesgo asociado a dosis bajas de RI para la población general expuesta continúe estando basado en el Modelo Lineal Sin Umbral (LNT, por sus siglas en inglés), obtenido de la extrapolación de los datos obtenidos a dosis altas para estimar los riesgos a dosis bajas, en el cual no existe una dosis de RI umbral por debajo de la cual no exista efecto alguno.

Con el fin de contribuir a la información existente del riesgo que conlleva la exposición, a dosis bajas de RI, por parte de personas portadoras de mutaciones en genes de susceptibilidad al cáncer, el objetivo de este trabajo fue evaluar si dosis bajas de rayos X, como los empleados en estudios mamográficos (cuya LET asociada se sabe es comparable o inclusive superior a la LET de protones con energías nominales de entre 25 y 40 MeV [54]), pueden producir un efecto genotóxico en células con estatus génico ATM(+/-). Este estudio ha simulado, en la medida de lo posible, las variables físicas implicadas cuando una paciente se somete a estudios de mamografía.

En este trabajo, las células no fueron sincronizadas para su irradiación en alguna etapa específica del ciclo celular. Sin embargo, se sabe que la radiosensibilidad celular es depen-

diente de la etapa del ciclo celular. Por ello, sería interesante evaluar si existe una variación en la respuesta biológica si las células fueran sincronizadas a su fase más radiosensible (G2-M). Así mismo, en este trabajo no se irradiaron células de tejido mamario. Sin embargo, tanto el tejido glandular (el tejido más radiosensible que compone a la mama) como el tejido linfoide se consideran de alta radiosensibilidad. Por ello, en primera instancia, es posible considerar que puedan encontrarse resultados similares en ambos casos. Por otro lado, para cada experimento las células debieron transportarse al laboratorio donde fueron irradiadas y regresarse al laboratorio donde se evaluó el efecto de las dosis de radiación empleadas. Tal hecho podría haber contribuido a la variación individual de cada experimento.

Es importante aclarar que los resultados obtenidos en este trabajo corresponden a dos líneas celulares obtenidas de los linfocitos B de sólo un par de donantes, por lo que antes de poder hacer una conclusión genérica acerca del genotipo ATM(+/-) sería conveniente evaluar lo que sucedería si se irradiaran otras líneas celulares con mutación en el mismo gen provenientes de individuos diferentes.

Sólo en pacientes sometidos a radioterapia y en la cohorte del estudio LSS se ha demostrado el riesgo de desarrollar un cáncer inducido por radiación. En lo que se refiere a un estudio de mamografía, la dosis glandular promedio (D_g) impartida a la mama (3.7 mGy para un estudio de mamografía digital y 4.7 mGy para uno de mamografía analógica, considerando una exploración estándar de 2 proyecciones [61]) se considera relativamente baja como para producir un cáncer inducido por la radiación [62]. Sin embargo, conforme la paciente es sometida a más estudios de mamografía, tal riesgo puede aumentar [63], especialmente si la paciente es portadora de una mutación que le puede conferir una susceptibilidad genética a la radiación.

Se consideran mujeres con alto riesgo de padecer cáncer de mama a las portadoras de mutaciones en el gen BRCA1 o BRCA2 (riesgo estimado del 50-80%), a sus familiares de primer grado (con BRCA desconocido) y aquellas con antecedentes familiares importantes, tales como casos de cáncer de mama en edades tempranas, bilaterales y/o coexistentes con cánceres de ovario (riesgo estimado del 30-50%) [64, 65]. Debido a la aparición más temprana del cáncer de mama en estos casos, respecto a los casos de cáncer de mama esporádicos,

la mayoría de las guías de seguimiento de dicha enfermedad recomiendan el cribado periódico, desde los 25 a 30 años en adelante [66]. Sin embargo, los estudios de mamografía a estas edades son menos sensibles, presentan tasas elevadas de cánceres de intervalo (aquellos detectados después de una mamografía de cribado considerada negativa y antes de la próxima mamografía programada) y conllevan al aumento en la probabilidad de provocar un cáncer radioinducido en la paciente, a lo largo de su vida, debido a la dosis de radiación acumulada [65].

La resonancia magnética se perfila como la modalidad diagnóstica adecuada para mujeres con alto riesgo de padecer cáncer de mama. Tanto las sociedades científicas de Estados Unidos como la europea recomiendan realizar una resonancia a la mama de las mujeres asociadas a un alto riesgo de padecer cáncer de mama junto a la mamografía anual [65]. Por otro lado, para las pacientes con un riesgo intermedio de desarrollar cáncer de mama (aquellas que presentan una probabilidad superior a la de la población general pero inferior al grupo de mujeres con alto riesgo), algunas guías también aconsejan adelantar el inicio del cribado, pero esto no está consensuado y varía según la sociedad consultada [65]. Las mujeres portadoras de mutaciones en el gen ATM(+/-) corresponden a esta categoría, pues se sabe que hasta un 30 % de las personas que lo poseen desarrollará algún tipo de cáncer en algún momento de su vida, sin dejar de recordar que los portadores de ATM(+/-) podrían representar el 0.25-1 % de la población general.

En el 2014, A. Kawaguchi y col. presentaron un estudio donde reportan el K_{aire} incidente y la D_g obtenidos a partir de maniqués de PMMA y la información de 300 pacientes sometidos a un estudio de mamografía [67]. Para un maniqué de PMMA de 40 mm de espesor, encontraron valores para el K_{aire} incidente y la D_g de 7.89 y 1.84 mGy, respectivamente (por proyección). De esta manera, a partir de dicha información y los valores obtenidos para el K_{aire} incidente en este trabajo, los resultados encontrados podrían ser descritos en términos del “*número de estudios equivalentes de mamografía*” (2 proyecciones). En este caso, se tendría que el genotipo ATM(+/-) empleado podría conferir mayor susceptibilidad a un efecto genotóxico con 2.5 estudios de mamografía, en promedio, en relación a un genotipo normal.

Capítulo 5

Conclusiones

En este trabajo se expuso una línea celular linfoblastoide con estatus génico normal y una heterocigota recesiva para el gen ATM a dosis bajas de radiación ionizante impartidas por el haz de rayos X de un mastógrafo, empleando las calidades de haz a partir de las combinaciones Mo/Mo/28 kV (convencionalmente usado en la clínica) y Rh/Rh/34 kV (empleado para mamas densas), y se evaluó si dichas dosis de radiación son capaces de producir un daño genotóxico, empleando el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

- Las dosis de RI empleadas, no produjeron un efecto citostático en las líneas celulares empleadas. Así mismo, la energía efectiva del haz no modificó tal hecho.
- Las dosis de RI empleadas produjeron un aumento en la frecuencia de micronúcleos de ambas líneas celulares respecto a su control no irradiado, pero tal aumento sólo fue significativo a 40 mGy en el caso de la línea celular ATM(+/-). Las características energéticas del haz no modificaron tal hecho.
- Las curvas dosis-respuesta de ambas líneas celulares poseen una tendencia lineal. La diferencia entre las pendientes es del 65 %, siendo mayor la correspondiente a la línea ATM(+/-) con respecto a la línea con estatus génico normal.
- No se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del número de micronúcleos inducidos por 40 mGy, tanto en la línea con estatus génico normal como en la línea con mutación ATM(+/-), por el hecho de irradiar con calidades de haz diferentes producidas por el mastógrafo.
- Se encontró una diferencia estadísticamente significativa de las medias del número de micronúcleos inducidos por 40 mGy, entre las dos líneas celulares, al promediar los resultados encontrados con las dos calidades de haz.

Por tal motivo, se tiene que la mutación en el gen ATM estudiada confiere mayor susceptibilidad a un efecto genotóxico en forma de micronúcleos, en comparación con un genotipo normal, causado por dosis bajas de rayos X como las impartidas por estudios mamográficos.

Bibliografía

- [1] Ferlay, J. y col.: *GLOBOCAN 2012 v1.0*, 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. International Agency for Research on Cancer. Visitado el 1 de junio de 2016 en *www.globocan.iarc.fr*.
- [2] Ahmed, M. y Rahman, N.: *ATM and breast cancer susceptibility*. *Oncogene*, 25(43):5906–5911, 2006.
- [3] Thompson, D. y col.: *Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers*. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(11):813–822, 2005.
- [4] Broeks, A. y col.: *ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility*. *The American Journal of Human Genetics*, 66(2):494–500, 2000.
- [5] Bernstein, J. L. y col.: *Radiation exposure, the ATM Gene, and contralateral breast cancer in the women’s environmental cancer and radiation epidemiology study*. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(7):475–483, 2010.
- [6] National Research Council. Committee to assess health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: *Health Risks from Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation: BEIR VII Phase II*. National Academic Press, 2006.
- [7] Stankevics, L. y col.: *MiR-34a is up-regulated in response to low dose, low energy X-ray induced DNA damage in breast cells*. *Radiation Oncology*, 8(1):1, 2013.
- [8] Francisco, D. C. y col.: *Induction and processing of complex DNA damage in human breast cancer cells MCF-7 and nonmalignant MCF-10A cells*. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(4):558–569, 2008.
- [9] Villegas, 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), Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

- [10] Hernández, J. A.: *Efectos de dosis bajas de radiación ionizante en la producción de micronúcleos en sangre completa y linfocitos aislados*. Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), Universidad Nacional Autónoma de México, 2013.
- [11] ICRP y Sociedad Española de Protección Radiológica: *Publicación 103: Las Recomendaciones 2007 de la Comisión Internacional de Protección Radiológica*. Ann. ICRP, 37(2-4), 2007.
- [12] Attix, F. H.: *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. John Wiley & Sons, 2008.
- [13] Bushberg, J. y col.: *The essential physics of medical imaging*. Lippincott Williams & Wilkins, 3ra. edición, 2011.
- [14] Khan, F. y Gibbons, J.: *The physics of radiation therapy*. Lippincott Williams & Wilkins, 4ta. edición, 2010.
- [15] Sprawls, P.: *Physical principles of medical imaging*. Aspen Publishers, 2da. edición, 1995.
- [16] Chen, R. y Kirsh, Y.: *The analysis of thermally stimulated processes*. Elsevier, 2013.
- [17] McKeever, S. WS.: *Thermoluminescence of solids*, volumen 3. Cambridge University Press, 1988.
- [18] Aramburu, X.O. y Bisbal, J. J.: *Radiaciones ionizantes: utilización y riesgos*, volumen 25. Univ. Politèc. de Catalunya, 1996.
- [19] Pagonis, V. y col.: *Numerical and practical exercises in thermoluminescence*. Springer Science & Business Media, 2006.
- [20] Lewellen, T. K.: *Radiation Detection and Measurement*. Radiology Residents Basic Science Course, Junio 2007.

- [21] De la Rosa, E. y col.: *Thermoluminescence and optically stimulated luminescence properties of nanocrystalline Er^{3+} and Yb^{3+} doped $Y_3Al_5O_{12}$ exposed to β -rays*. Journal of Physics D: Applied Physics, 38(21):3854, 2005.
- [22] Chen, R. y McKeever, S. WS.: *Theory of thermoluminescence and related phenomena*, volumen 200. World Scientific, 1997.
- [23] Hall, E. J. y Giaccia, A. J.: *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, 6ta. edición, 2006.
- [24] Montoro, A. y col.: *Evaluación de la radiosensibilidad del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones*. Seguridad y medio ambiente, 134:15–25, 2014.
- [25] Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo A. Ugalde”: *Daños, Mutaciones y Mecanismos de Reparación del ADN*. Clase 5, Marzo 2009.
- [26] Brusick, D.: *Principles of Genetic Toxicology*. Springer US, 2013.
- [27] Luque, J. y Herráez, A.: *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Elsevier, 2006.
- [28] Santiago, D. C.: *Biogerontología*. Textos Universitarios. Universidad de Cantabria, 2006.
- [29] Medicina molecular FIBAO: *Reparación del ADN*, 2007. Visitado el 1 de junio de 2016 en medmol.es/glosario/57/.
- [30] Joiner, M. y Van der Kogel, A.: *Basic Clinical Radiobiology*. Hodder Education, 4ta. edición, 2009.
- [31] ICRP: *Radiological Protection in Medicine. ICRP Publication 105*, volumen 37. Ann. ICRP, 2007.
- [32] Turenne, G. A. y col.: *Activation of p53 transcriptional activity requires ATM’s kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53*. Oncogene, 20(37):5100–5110, 2001.

- [33] Brenner, D. J. y col.: *Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(24):13761–13766, 2003.
- [34] Brandan, M. E. y col.: *La radiación al servicio de la vida*. Ciencia desde México. Fondo de Cultura Económica, 2009.
- [35] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: *Biological mechanisms of radiation actions at low doses*. United Nations Publications, 2012.
- [36] National Research Council. Committee to assess health risks from exposure to low levels of ionizing radiation: *Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiations: Time for Reassessment?* BEIR (Series). National Academies Press, 1998.
- [37] Centre for Arab Genomic Studies: *Ataxia-Telangiectasia Mutated Gene*, 2008. Visitado el 5 de junio de 2016 en www.cags.org.ae.
- [38] Menon, V. y Povirk, L.: *Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: multifaceted Roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ)*. En *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*, páginas 321–336. Springer, 2014.
- [39] Bakkenist, C. J. y Kastan, M. B.: *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 421(6922):499–506, 2003.
- [40] Vega, A.: *Caracterización molecular y celular de una cohorte de pacientes con ataxia-telangiectasia*. Universidad de Granada, 2014.
- [41] Gannon, H. S. y col.: *ATM phosphorylation of Mdm2 Ser394 regulates the amplitude and duration of the DNA damage response in mice*. Cancer cell, 21(5):668–679, 2012.
- [42] Angèle, S. y Hall, J.: *The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor?* Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 462(2):167–178, 2000.
- [43] McKinnon, P. J.: *ATM and ataxia telangiectasia*. EMBO reports, 5(8):772–776, 2004.

- [44] Khanna, K. K.: *Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate*. Journal of the National Cancer Institute, 92(10):795–802, 2000.
- [45] Canman, C. y col.: *Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53*. Science, 281(5383):1677–1679, 1998.
- [46] Savitsky, K. y col.: *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to Pl-3 kinase*. Science, 268(5218):1749, 1995.
- [47] MDICampus: *Glosario de genética y Medicina Individualizada*, 2016. Visitado el 5 de junio de 2016 en www.mdicampus.com.
- [48] Fenech, Michael: *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Nature protocols, 2(5):1084–1104, 2007.
- [49] Crasta, K. y col.: *DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis*. Nature, 482(7383):53–58, 2012.
- [50] Fenech, M.: *The in vitro micronucleus technique*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1):81–95, 2000.
- [51] Caraffa, E. y col.: *Determinación de la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de Bufo arenarum que habitan ambientes urbanizados*. Acta toxicológica argentina, 21(2), 2014.
- [52] Fenech, M. y col.: *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 534(1):65–75, 2003.
- [53] National Institute of Standards and Technology: *X-Ray Mass Attenuation Coefficients*, 2014. Visitado el 2 de diciembre de 2015 en www.nist.gov/pml/x-ray-mass-attenuation-coefficients.
- [54] Muñoz, I. D.: *Distribución espacial de dosis y evolución espectral al interior de la mama durante estudios mamográficos, determinadas con dosímetros TLD-300*. Tesis de Maestría en Ciencias (Física Médica), Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.

- [55] Muñoz, I. D. y col.: *Evolution of the CaF₂: Tm (TLD-300) glow curve as an indicator of beam quality for low-energy photon beams*. *Physics in medicine and biology*, 60(6):2135, 2015.
- [56] Puchalska, M. y Bilski, P.: *GlowFit—a new tool for thermoluminescence glow-curve deconvolution*. *Radiation Measurements*, 41(6):659–664, 2006.
- [57] Dance, D. R. y col.: *Additional factors for the estimation of mean glandular breast dose using the UK mammography dosimetry protocol*. *Physics in medicine and biology*, 45(11):3225, 2000.
- [58] Universidad Autónoma de San Luis Potosí: *Conteo y Evaluación de la Viabilidad de Células Mononucleares*, Mayo 2011.
- [59] Science, Understanding: *Frequently asked questions about how science works*, 2016. Visitado el 11 de noviembre de 2016 en <http://undsci.berkeley.edu/faqs.php>.
- [60] Grigaravičius, P. y col.: *A direct view by immunofluorescent comet assay (IFCA) of DNA damage induced by nicking and cutting enzymes, ionizing ¹³⁷Cs radiation, UV-A laser microbeam irradiation and the radiomimetic drug bleomycin*. *Mutagenesis*, página gen071, 2009.
- [61] Yaffe, M. J. y Mainprize, J. G.: *Risk of Radiation-induced Breast Cancer from Mammographic Screening*. *Radiology*, 258(1):98–105, 2011.
- [62] Young, K. C.: *Radiation doses in the UK trial of breast screening in women aged 40–48 years*. *The British journal of radiology*, 75(892):362–370, 2002.
- [63] Rodríguez, M. M. y Labrador, A. O.: *Cribado de cáncer de mama. Estado actual*. *Radiología*, 55(4):305–314, 2013.
- [64] Roy, R. y col.: *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection*. *Nature Reviews Cancer*, 12(1):68–78, 2012.
- [65] Brusint, B. y col.: *Actualización del cáncer de mama en Atención Primaria (II/V)*. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, 40(7):381–391, 2014.

-
- [66] Kuhl, C. y col.: *Prospective multicenter cohort study to refine management recommendations for women at elevated familial risk of breast cancer: the EVA trial*. Journal of Clinical Oncology, 28(9):1450–1457, 2010.
- [67] Kawaguchi, A. y col.: *Patient investigation of average glandular dose and incident air kerma for digital mammography*. Radiological physics and technology, 7(1):102–108, 2014.