



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

γ -H2AX COMO MARCADOR PREDICTIVO DE
RADIOSENSIBILIDAD POR DOSIS BAJAS DE
RADIACIÓN IONIZANTE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Guillermina Vázquez Estrada

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ana María Salazar Martínez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Diana María Escalante Alcalde
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Emilio Rojas del Castillo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Ana María Salazar Martínez, con financiamiento de PAPIIT-DGAPA (UNAM, proyecto IN205116).

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado el apoyo económico dentro del programa de Becas Nacionales para cursar mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (UNAM, proyecto IN205116), por haberme otorgado una beca de apoyo para continuar con mis estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana María Salazar Martínez, por su invaluable apoyo durante toda mi maestría y por su guía para la realización de este trabajo, gracias por toda la confianza que me brindó durante mi estancia en el laboratorio y por sus palabras para alentarme a continuar.

A la Dra. Patricia Ostrosky Shejet, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y por sus comentarios tan acertados.

A mi comité tutorial, la Dra. Diana Escalante Alcalde y al Dr. Emilio Rojas del Castillo, por su contribución a mi trabajo con sus conocimientos y consejos.

A mi comité de evaluación los Dres. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, José Pedraza Chaverri, Ernesto Soto Reyes Solís, Alejandro Manuel García Carrancá y Alejandro Zentella Dehesa, por sus acertadas correcciones y su disponibilidad.

A la QFB. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño, por todo su apoyo técnico para la realización de este trabajo, por todo su cariño, sus consejos y su amistad.

Al M. en C. Carlos Castellano Barba, por su apoyo técnico en las técnicas que se realizaron mediante citometría de flujo.

A mis amigos del laboratorio:

A Pau, por tu invaluable amistad y por tus múltiples consejos, también te agradezco por el apoyo técnico e intelectual que me brindaste. Tienes una vibra que aleja todo lo malo, me contagias tu optimismo, eres de las personas más divertidas que conozco, siempre para adelante.

A Alberts, porque esas tardes y noches de diversión hacían menos pesado el mundo.

Fueron una parte importante en este camino lleno de altibajos, espero que tengan mucho éxito y suerte, y recuerden que nosotros todo perfecto, ganando como siempre.

A Alejandro, Zeltzin, Andrea, Juan Pablo y todos los que pasaron alguna vez por ahí, porque de todos me llevo irremediabilmente algo.

A Francisco Alberto Verdín Betancourt, mi gran amigo, gracias por creer en mi y porque siempre estuviste ahí en las buenas y en las malas. Este trabajo es tan tuyo como mío, sin tu apoyo incondicional y los ánimos que me dabas, no lo hubiera logrado.

A mi querida amiga Ivone, gracias por todo el apoyo que me das en la vida y en lo académico, te apoyaré y deseo que cumplas tus metas y sueños.

A Diana, eres una gran persona, gracias por estar conmigo cuando colapsaba, te deseo lo mejor de este mundo, que cumplas tus sueños y que hagas siempre lo que quieras, el camino podrá ser pesado, pero sé que lo lograrás, estaré para ti siempre, como maestra o como amiga.

También a aquellas personas que se unieron en distintas partes del camino que de alguna manera me alentaron a seguir con mi trabajo.

Y a todas aquellas personas que se cruzaron en mi camino por una u otra razón, ya sea para enseñarme cosas de la vida o para simplemente darme cuenta que jamás querría ser, ni seré como ellos.

DEDICATORIA

A mis padres, porque lo que soy es gracias a ustedes. Este trabajo y todo lo que hago es para y por ustedes, son todo para mi, los quiero inmensamente.

A mis hermanos Luanda, Chelo, Zitzi y Eligio, por haber estado de alguna manera, gracias por su apoyo.

A mis hermanos Lupita y Gollo que de alguna u otra forma siempre estuvieron ahí.

A mis pequeños sobrinitos, que cuando los veo, me comparten esa inocencia y esa sonrisa sincera en este mundo lleno de cosas.

A mi tía Lupe que también siempre me ha apoyado, es un ejemplo a seguir para mi.

Les dedico mi trabajo, porque sin ustedes a mi lado, no lo hubiera logrado.

Aprendí que la mejor manera de apreciar algo es carecer de ello por un tiempo.

Aprendí que nada de valor se obtiene sin esfuerzo.

Aprendí que si tu vida está libre de fracasos es porque no te estás arriesgando lo suficiente.

Aprendí que cada cosa que logré, la había considerado antes como un imposible.

Aprendí que proyectar te proyecta.

Aprendí que la honestidad es la mejor propaganda.

Aprendí que debo ganar el dinero antes de gastarlo.

Aprendí que no debo discutir mi éxito con personas con menos éxito que yo.

Aprendí que la fama está escrita en el hielo y el sol derrite el hielo.

Aprendí que a menudo me olvido de lo que aprendo, por tanto, debo escribirlo y repasarlo.

Aprendí a no dejar de mirar hacia el futuro.

Aprendí a valorarme sin sobrestimarme.

Aprendí que debo darme ánimo y pensar que:

*Todavía hay muchos buenos libros que leer, puestas de sol que ver, estrellas que admirar,
amigos que visitar...*

*Helados de dulce de leche con nueces por saborear, manos firmes que estrechar, sonrisas que
regalar, pensamientos que expresar...*

Árboles que plantar y un perro fiel...

*Aprendí... **que todavía tengo mucho que aprender.***

Autor desconocido

*No te preocupes, solo cae quien está de pie.
Los que nunca han caído,
es porque probablemente se han arrastrado toda su vida.*
Anónimo

*Mantente alejado de aquellas personas
que tratan de menospreciar tus ambiciones.
Las personas pequeñas siempre lo hacen,
pero los verdaderamente grandes
hacen sentirte que tú también puedes ser grande.*
Mark Twain

RESUMEN

La radiación ionizante (RI) se caracteriza por su capacidad para excitar e ionizar átomos de la materia con la que interacciona, ya que, al interaccionar directa o indirectamente con la célula, es capaz de provocar cambios a nivel molecular que pueden llegar a dañar su integridad. La RI es ampliamente utilizada en estudios radiológicos, por ejemplo, en la mamografía, procedimiento que se usa para detectar el cáncer de mama. La evidencia sugiere que algunos de los métodos radiológicos, a largo plazo, inducen al desarrollo de cáncer de mama, como un efecto secundario. La ataxia telangiectasia (AT) es un síndrome de inestabilidad cromosómica. Los pacientes con AT se caracterizan por una elevada sensibilidad a la RI y tienen hasta un 25% de riesgo de desarrollar cáncer, entre ellos leucemia linfocítica aguda, linfomas y cáncer de mama. La proteína ataxia telangiectasia mutada (ATM) participa en el mantenimiento de la estabilidad genómica, la reparación del DNA y el control de puntos de monitoreo del ciclo celular. El objetivo de este estudio fue evaluar las rupturas de doble cadena (DSB) mediante la detección de γ -H2AX y demostrar su utilidad como indicador de radiosensibilidad a dosis bajas de radiación ionizante en células normales y heterocigotas para el gen *ATM*. Las líneas celulares de linfoblastos transformados^{EBV} con estatus génico normal y heterocigotas para el gen *ATM*, se expusieron a dosis bajas únicas y repetidas de RI (25, 50 y 100 mGy, 3 veces, una cada 24 horas). La citotoxicidad se evaluó mediante la doble tinción con anexina V y 7-amino actinomicina D (7-AAD). El efecto genotóxico se analizó mediante la inducción de micronúcleos y por la formación de DSB en el DNA, evidenciadas por γ -H2AX, y el aumento de los niveles de la proteína p53 como marcador de estrés celular. Se encontró que las dosis bajas de IR no son citotóxicas. Los parámetros de genotoxicidad se observaron aumentados únicamente bajo el esquema de dosis repetidas; específicamente, la frecuencia de micronúcleos con la dosis de 100 mGy, en ambas líneas celulares y los puentes nucleoplásmicos a partir de la dosis de 50 mGy, en la línea celular heterocigota para el gen *ATM*. Además, las dosis bajas de RI, no generaron apoptosis, ni necrosis y no alteraron la

proliferación celular. No se encontraron cambios en la proteína γ -H2AX, aunque, se observó un aumento en los niveles de la proteína p53 en las células heterocigotas para el gen *ATM*, con un esquema de dosis repetidas. Bajo nuestras condiciones experimentales, las dosis bajas de RI no fueron de relevancia biológica, ya que no se detectaron DSB mediante la fosforilación de la proteína H2AX. Sin embargo, las células heterocigotas para el gen *ATM* mostraron más sensibilidad a los efectos genotóxicos de la RI con dosis repetidas, sugiriendo un potencial riesgo para las personas con este estatus génico que se exponen a RI, de desarrollar diversos tipos de cáncer.

ABSTRACT

Ionizing radiation (IR) is characterized by its ability to excite and ionize atoms of the matter with which it interacts. When IR interacts directly or indirectly into the cell, it is able to produce alterations at the molecular level, damaging its integrity. The IR is widely used in radiological studies, e.g. mammography procedure; which is used to detect breast cancer. There is evidence that some of the radiological methods are able to induce breast cancer development, as a secondary side effect. Ataxia telangiectasia (AT) is a chromosomal instability syndrome. AT patients are characterized by a high sensitivity to IR and an increased risk of developing various types of cancers until 25%, such as acute lymphocytic leukemia, lymphoma, and breast cancer. Ataxia telangiectasia mutated protein (ATM) is involved in maintaining genomic stability, DNA repair and checkpoints of the cell cycle. The aim of this study was to evaluate the double strand breaks (DSB) by γ -H2AX protein measuring and to demonstrate their potential as a marker of radiosensitivity by low doses of IR in normal and heterozygous *ATM* gene cells. EBV-transformed lymphoblasts cell lines with normal and heterozygous *ATM* gene cells, were exposed to single and repeated low doses of RI (25, 50 and 100 mGy, 3 times, one each 24 hours). Cytotoxicity was evaluated by double staining with annexin V and 7-aminoactinomycin D (7-AAD). The genotoxic effect was analyzed by micronucleus induction, and DSB of DNA formation evidenced by γ -H2AX and the increase of p53 protein levels as a cellular stress marker. The results showed that low doses of IR were non-cytotoxic. Genotoxicity parameters were risen with repeated doses, particularly, micronuclei frequency in both cell lines with 100 mGy dose and nucleoplasmic bridges in heterozygous *ATM* gene cells from the 50 mGy dose. In addition, low doses did not induce cell death by apoptosis or necrosis and did not alter cell proliferation. We did not found changes in γ -H2AX protein, although, a p53 protein levels increment was observed in the heterozygous *ATM* gene cells under doses repeated treatment. Under our experimental conditions, low doses of IR have not biological relevance, since DSB were not detected by H2AX phosphorylation. However, heterozygous *ATM* gene cells showed more

sensitivity to genotoxicity effects using repeatedly low doses of IR, suggesting that could be a risk condition of cancer for people with this genetic status.

ÍNDICE GENERAL	Página
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1) Radiación ionizante.....	1
a) Tipos de radiación ionizante.....	1
b) Dosis bajas de radiación ionizante.....	3
2) Efectos de la exposición a radiación ionizante.....	4
a) Efectos biológicos de la radiación ionizante.....	5
3) Genes y proteínas involucradas en mantener la integridad del DNA .	7
a) El gen <i>ATM</i>	7
b) La proteína H2AX.....	10
c) La proteína p53.....	11
d) Respuestas celulares inducidas por radiación ionizante.....	12
II. JUSTIFICACIÓN.....	16
III. HIPÓTESIS.....	16
IV. OBJETIVO GENERAL.....	16
1) Objetivos específicos.....	16
V. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	18
1) Reactivos.....	18

2) Características de las líneas celulares.....	18
3) Cultivos celulares.....	19
a) Exposición de las células a radiación ionizante.....	19
b) Cálculo de la dosis por decaimiento radiactivo.....	21
4) Análisis de la citotoxicidad por citometría de flujo.....	21
5) Ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis.....	22
a) Tinción de laminillas.....	23
b) Análisis de micronúcleos en laminillas.....	23
c) Conteo de índice de división nuclear.....	26
6) Determinación de la inducción de las proteínas γ -H2AX y p53 por citometría de flujo.....	26
a) Permeabilización de las células.....	26
b) Marcaje con anticuerpos y lectura.....	27
7) Análisis estadístico.....	27
VI. RESULTADOS.....	28
1) Citotoxicidad.....	28
2) Parámetros de genotoxicidad.....	30
3) Inducción de proteínas γ -H2AX y p53.....	37
VII. DISCUSIÓN.....	42
VIII. CONCLUSIÓN.....	50
IX. RESUMEN DE RESULTADOS.....	50
X. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Efectos de la RI en el DNA.....	5
Figura 2. Vía de señalización de la proteína ATM.....	9
Figura 3. Localización de H2AX en el nucleosoma	11
Figura 4. Participación de proteínas en respuesta al daño al DNA.....	14
Figura 5. Imágenes representativas de células con micronúcleo, gemación y puente nucleoplásmico, apoptosis, y necrosis	25
Figura 6. Imágenes representativas de células mononucleada, binucleada y polinucleada	26
Figura 7. Ausencia de efecto citotóxico 1 hora después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	28
Figura 8. Ausencia de efecto citotóxico 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	29
Figura 9. Ausencia de efecto citotóxico después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	29
Figura 10. Evaluación de la genotoxicidad, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	31
Figura 11. Evaluación de la genotoxicidad, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	31

Figura 12. Evaluación de la frecuencia de gemaciones, 24 horas después de la exposición a dosis única de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	32
Figura 13. Evaluación de la frecuencia de gemaciones, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	32
Figura 14. Evaluación de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	33
Figura 15. Evaluación de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	33
Figura 16. Evaluación de muerte celular por apoptosis, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	34
Figura 17. Evaluación de muerte celular por apoptosis, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	34
Figura 18. Evaluación de muerte celular por necrosis, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	35
Figura 19. Evaluación de muerte celular por necrosis, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	35

Figura 20. Evaluación de la proliferación celular, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	36
Figura 21. Evaluación de la proliferación celular, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	36
Figura 22. Evaluación de las rupturas de doble cadena, 1 hora después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	38
Figura 23. Evaluación de las rupturas de doble cadena, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	38
Figura 24. Evaluación de las rupturas de doble cadena, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	39
Figura 25. Análisis de los niveles de la proteína p53, 1 hora después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	40
Figura 26. Análisis de los niveles de la proteína p53, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados ^{EBV}	40
Figura 27. Análisis de los niveles de la proteína p53, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados ^{EBV}	41

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Características de las líneas celulares utilizadas	19
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

·OH	Radical hidroxilo.
53BP1	Proteína de unión a p53-1.
7-AAD	7-amino-actinomicina D.
AT	Ataxia telangiectasia.
ATM	Gen/proteína mutado/a en el gen de ataxia telangiectasia.
ATR	Proteína relacionada con ATM y Rad3.
BER	Reparación por escisión de bases.
BN	Binucleada.
BRCA1/2	Gen/ proteína asociado al cancer de mama 1/2.
CBMN	Micronúcleos por bloqueo de citocinesis.
CK2	Proteína caseína cinasa 2.
Cyt-B	Citocalasina-B.
DDR	Respuesta al daño al DNA.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNA-PK	Proteína.
DSB	Rupturas de doble cadena.
FD	Factor de dilución.
Gy	Gray.
H₂O	Agua.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno.

IDN	Índice de división nuclear.
LET	Transferencia de energía lineal.
LNT	Lineal sin umbral.
MDC1	Proteína mediadora del punto de control de daño al DNA1.
mGy	mili Gray.
MN	Micronúcleo.
MRN	Complejo Mre11/Rad50/NBS1.
mSv	mili Sievert.
NER	Reparación por escisión de nucleótidos.
NHEJ	Recombinación por unión de extremos no homólogos.
PBS	Amortiguador de fosfato salino.
PCP	Partículas cargadas pesadas.
PN	Puentes nucleoplásmicos.
RI	Radiación ionizante.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
SSB	Rupturas de simple cadena.
UNSCEAR	Cómité Científico de las Naciones Unidas para el Estudio de las Radiaciones Atómicas.

I. INTRODUCCIÓN

1) Radiación ionizante

La radiación es energía en movimiento que puede ser transportada tanto por ondas electromagnéticas como por partículas. La radiación ionizante (RI), se caracteriza por la habilidad para ionizar y/o excitar átomos de la materia con la que interactúan (Attix, 1986; Harley, 2008).

La RI se clasifica como:

Directamente ionizante: Son partículas cargadas, las cuales liberan su energía directamente en la materia, a través de muchas interacciones en un espacio pequeño, por fuerza Coloumbiana a lo largo de su trayectoria.

Indirectamente ionizante: Son los rayos X, Rayos gamma (γ) o neutrones, los cuales primero transfieren su energía a partículas cargadas de la materia mediante relativamente pocas interacciones, pero en un gran espacio. El resultado son partículas cargadas que en su momento liberan energía al medio (Attix, 1986).

Existen fuentes naturales y artificiales de radiación. Los rayos cósmicos e isótopos radiactivos como el radón, constituyen las principales fuentes naturales de radiación a las que los seres vivos se encuentran expuestos.

La radiación artificial se obtiene mediante equipos como los usados en las actividades terapéuticas: Tubos de rayos X y aceleradores lineales de radioterapia; y de diagnóstico: estudios de imagenología (radiografías y tomografías) (ATSDR, 1999; IARC, 2012; Hoel, 2013).

a) Tipos de radiación ionizante

Los diferentes tipos de RI son:

Electrones rápidos: Si son de carga positiva, son llamados positrones, si son emitidos por un núcleo son referidos como partículas β (positivos o negativos) y si son el resultado de colisiones entre partículas cargadas son referidos como rayos δ (Attix, 1986).

Partículas β : son emitidas por núcleos radiactivos cuando se transforman. Son electrones cuando poseen carga eléctrica negativa (β^-) y positrones cuando su carga eléctrica es positiva (β^+). Son mucho más ligeras y penetrantes que las partículas alfa. Su poder de penetración en una muestra determinada, depende de su energía, la cual, si es suficiente, pueden atravesar algunos centímetros del tejido. Cuando la partícula β^- interactúa con el tejido y deposita toda su energía cinética (un electrón), se anula su capacidad de producir un daño al organismo. Por otro lado, la partícula β^+ es antimateria y cuando se une con su antipartícula (el electrón) se forma un par electrón/positrón, que es transformado en un par de rayos γ llamados radiación de aniquilación, que pueden interactuar con otras moléculas en el cuerpo (ATSDR, 1999).

Partículas cargadas pesadas (PCP): Por lo general, son obtenidas por la aceleración de átomos pesados ($>He$) mediante campos eléctricos en ciclotrones y aceleradores lineales del tipo Van de Graaff (Attix, 1986). Algunos ejemplos son: los protones, partículas alfa, iones de átomos, entre otros.

Neutrones: Partículas neutras obtenidas de reacciones nucleares (por ej. la fisión nuclear) (Attix, 1986).

Rayos gamma (γ): Son fotones (radiación electromagnética) emitidos en decaimientos nucleares y en la aniquilación de la materia con la antimateria. Por ser fotones, los rayos γ no poseen carga ni masa. Se movilizan a una distancia tanto más larga que las partículas cargadas antes de interactuar con la materia, es decir, son más penetrantes (Attix, 1986).

Rayos X: Son fotones emitidos cuando los electrones cambian entre los niveles energéticos del átomo (rayos X característicos) o cuando electrones se

desaceleran al interaccionar dentro del campo de Coulomb del núcleo atómico (rayos X de frenado o bremsstrahlung). Cabe mencionar que un fotón de rayos X y uno de rayos γ con la misma energía cuántica, tienen propiedades idénticas y sólo se diferencian por su origen (Attix, 1986).

b) Dosis bajas de radiación ionizante

Para el año de 1994, El Comité Científico de las Naciones Unidas para el Estudio de las Radiaciones Atómicas (UNSCEAR), definió como dosis bajas de radiación de baja transferencia de energía lineal (LET), a las dosis de 200 mGy o menos.

En radiobiología, una dosis baja y una tasa de dosis baja, se refieren a la exposición en la que resulta muy improbable que ocurra más de un caso de absorción de energía de la radiación en la célula (González, 1994; UNSCEAR, 1994). Mientras que las dosis altas de RI producen daños clínicamente detectables.

La incidencia del cáncer asociada con la exposición a RI, se ha obtenido a partir de estudios realizados con sobrevivientes de las bombas atómicas, grupos expuestos a radiaciones en el entorno laboral o personas que reciben tratamientos médicos. En lo que se refiere a los efectos de la exposición a tasas de dosis bajas, se han mostrado datos controversiales. Por ejemplo, algunos de los estudios sobre exposiciones ocupacionales han revelado un riesgo significativo de leucemia en los trabajadores expuestos, lo que está de acuerdo con las estimaciones derivadas de estudios relativos a tasas de dosis altas, pero con otros estudios no se ha podido demostrar una correlación positiva (González, 1994).

Actualmente se reconocen las limitaciones de la potencia estadística de los análisis epidemiológicos y de la interpolación de la relación dosis-respuesta, lo que ha llevado a un nuevo planteamiento para definir una dosis baja de RI como ≤ 100 mGy (UNSCEAR, 2012). Es evidente que las consecuencias de la exposición a dosis bajas de RI requieren ser estudiadas con más profundidad.

2) Efectos de la exposición a radiación ionizante

Durante la exposición de un sistema biológico a RI, ésta atraviesa a la célula ionizando al azar átomos y biomoléculas (agua, DNA, proteínas, lípidos) que dan lugar a iones y radicales libres que rompen los enlaces químicos provocando cambios moleculares dañinos para la misma (daño al DNA, lipoperoxidación, entrecruzamiento DNA-DNA y DNA-proteínas) (ATSDR, 1999; Harley, 2008; Jeggo y Lavin, 2009).

Una alta dosis a cuerpo completo de radiación ionizante (>1 Gy) produce un daño de tipo agudo y crónico. Dentro de los efectos agudos se encuentran: irritación y descamación de la piel, incluso dermatitis severa, e hinchazón de extremidades y dedos. Mientras que dentro de los efectos crónicos que ocasiona una alta dosis se encuentran: carcinomas y defectos congénitos, esto último si la exposición fue durante la gestación. Los efectos más comunes y clínicamente visibles son: daño al sistema gastrointestinal (deshidratación, diarrea, infección, choque séptico), daño al sistema hematopoyético (apoptosis de células madre endoteliales microvasculares), daño cerebral y la muerte (Jeggo y Lavin, 2009).

Actualmente, un gran porcentaje de los diferentes tipos de tumores pueden ser detectados por estudios de imagen como la mastografía, ultrasonido y resonancia magnética y son tratados con medicina nuclear, radioterapia, quimioterapia o combinaciones de las anteriores, especialmente si se detectan en una fase temprana (Arce *et al.*, 2011; OMS, 2015).

Aunque los datos son escasos, existe evidencia que tratamientos de radioterapia o medicina nuclear, en los cuales (por la complejidad de su planeación) el tejido sano recibe dosis altas de RI, que conllevan al individuo a un cáncer radioinducido a mediano o largo plazo (Drooger *et al.*, 2015).

El riesgo de la inducción de cáncer de mama por radiación, aumenta cuando se da el monitoreo radiográfico continuo y cuando se expone a la persona desde edades tempranas (<40 años). Además, comparado con los cánceres de mama

esporádicos, se presentan con un peor pronóstico (Preston *et al.*, 2007; Drooger *et al.*, 2015). El riesgo de desarrollar un cáncer de mama radioinducido puede aumentar cuando se poseen factores de susceptibilidad, tales como mutaciones en genes encargados de la reparación de rupturas de doble cadena (DSB), por ejemplo: el gen de ataxia telangiectasia mutado (*ATM*) y los genes asociados a cáncer de mama *BRCA1* y *BRCA2* (Chun y Gatti, 2004; Drooger *et al.*, 2015).

a) Efectos biológicos de la exposición a radiación ionizante

Los efectos que la RI provoca en la célula, se clasifican como directos e indirectos (Jeggo y Lavin, 2009) (**Figura 1**).

El DNA es una de las biomoléculas que es afectada por la RI, ya que al tener una gran densidad electrónica, es susceptible a rupturas y modificaciones en su estructura.

Efectos de la RI en el DNA

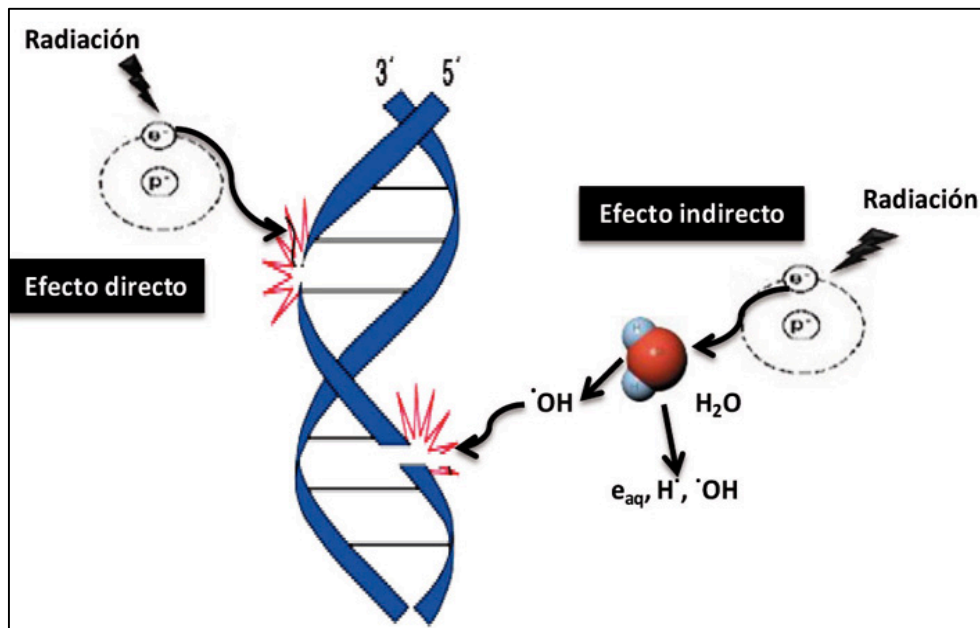


Figura 1. Representación del efecto directo e indirecto provocado por la radiación ionizante sobre el DNA (Modificado de Montoro, 2014).

Efecto directo

El efecto directo se observa cuando la radiación ioniza directamente a la molécula del DNA causando rupturas de cadena simple (SSB) y DSB. Los electrones pareados de enlaces se excitan, por lo que se separan y rompen el enlace, este tipo de daño representa el 30% del daño total a la célula que se induce por radiación. Es importante resaltar que se ha comprobado que las células que se encuentran en la fase tardía S/G2 de su ciclo celular son radioresistentes, probablemente debido a la doble cantidad de DNA que poseen en ese momento (Jeggo y Lavin, 2009).

Efecto indirecto

Los efectos indirectos son mediados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por ionización del agua, generando radicales libres. También son mediados por la ionización de algunas macromoléculas, como proteínas y lípidos de membrana, que como consecuencia, generan radicales libres y pueden provocar SSB o DSB en el DNA y entrecruzamientos DNA-proteínas. Estos efectos indirectos representan el restante 70% del daño total a la célula (**Figura 1**) (Jeggo y Lavin, 2009).

Los efectos indirectos también se extienden a las células vecinas, a esto se le conoce como efecto 'bystander', debido a que las células dañadas liberan factores solubles señalizadores que se difunden y llegan a otras células o bien, mediante uniones de comunicación intercelular. Si bien éste podría ser un mecanismo de daño a células no afectadas por la radiación, también se conoce que puede ser protector ya que se inducen los mecanismos de reparación (Koturbash *et al.*, 2006).

La célula al verse afectada por las múltiples causas antes mencionadas, promueve una serie de acciones para reparar y contrarrestar la mayor parte de los efectos que se generaron por la exposición a RI.

3) Genes y proteínas involucradas en mantener la integridad del DNA

Los rompimientos de doble cadena son la forma más citotóxica de daño al DNA. Éstos pueden ser generados no solo por RI, sino también por el estrés celular y por la acción de radiomiméticos como el antibiótico bleomicina o estreptonigrina (Povirk, 1996; Kan y Zhang, 2015). La importancia de los rompimientos de doble cadena en el DNA, radica en el hecho de que los defectos en la respuesta al daño al DNA y en la reparación se encuentran estrechamente vinculados con el desarrollo de cáncer debido a la pérdida de estabilidad genómica (Kan y Zhang, 2015).

Las células eucariotas han desarrollado un sofisticado sistema regulador de la respuesta a daño al DNA (DDR), compuesto de una serie de proteínas que contribuyen a la detección y reparación de estas lesiones de manera eficiente, las que incluyen la activación de la reparación directa, los puntos de control del ciclo celular, la alteración de la transcripción, y en algunos tipos de células, la inducción de la muerte celular por apoptosis (Kan y Zhang, 2015). Algunas de las proteínas que conforman el sistema de DDR son ATM, H2AX y p53.

a) El gen *ATM*

El gen *ATM*, cuyo producto es la proteína cinasa ATM, desempeña un papel importante en la reparación del daño al DNA a través de la regulación del ciclo celular. Es un gen de ~150 kb que se encuentra en el cromosoma humano 11 en la región q22-23 e incluye 69 exones de los cuales 65 son codificantes (Savitsky *et al.*, 1995; Bernstein *et al.*, 2017).

Las mutaciones en el gen *ATM* causan la enfermedad autosómica recesiva ataxia telangiectasia (AT) (Savitsky *et al.*, 1995). En pacientes con AT, se han reportado más de 1345 mutaciones en el gen *ATM*, de las cuales más del 85% genera la proteína trunca (Bernstein *et al.*, 2017). La AT es una enfermedad rara, con una frecuencia aproximada de 1/40,000-100,000 (Clouaire *et al.*, 2017). Sin embargo,

los portadores heterocigotos presentan una frecuencia de aproximadamente 0.5-1/100 individuos (Ahmed y Rahman, 2006). Aunque la enfermedad AT es recesiva, los estudios epidemiológicos han sugerido que los AT portadores, tienen una menor esperanza de vida y hasta un 25% de probabilidades de padecer cáncer, como por ejemplo leucemia linfocítica aguda, linfomas, cáncer de mama, entre otros. Algunos estudios han revelado que las personas con AT presentan una mayor radiosensibilidad, sugiriendo que se debe a que las células no pueden detectar el daño y no a defectos en la capacidad de reparar las DSB en el DNA o por el excesivo daño en el mismo (Swift *et al.*, 1987, 1991; Athma *et al.*, 1996; Broeks *et al.*, 2000; Lavin *et al.*, 2004).

De algunos estudios se ha estimado que los portadores de AT tienen cinco veces mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, en comparación con los individuos sin esta mutación. De los pacientes con cáncer de mama, se atribuye a los heterocigotos para el gen AT, un 8-18% (Swift *et al.*, 1976; Watts *et al.*, 2002).

Inmediatamente después de la inducción de rompimientos de doble cadena del DNA, la proteína ATM puede actuar como reclutador de proteínas adicionales, así como de andamiaje para que se ensamblen los complejos activos (Harper y Elledge, 2007) (**Figura 2**). En el sitio de la ruptura, la proteína ATM, activa mediante fosforilación a la histona H2AX en el extremo amino terminal de la serina 139, dando lugar a la forma γ -H2AX. De hecho, la proteína γ -H2AX se ha utilizado ampliamente no sólo como un marcador de daño al DNA, sino también como un indicador de la eficacia de la reparación después de daño en el DNA (Gemenetzidis *et al.*, 2015).

Vía de señalización de la proteína ATM

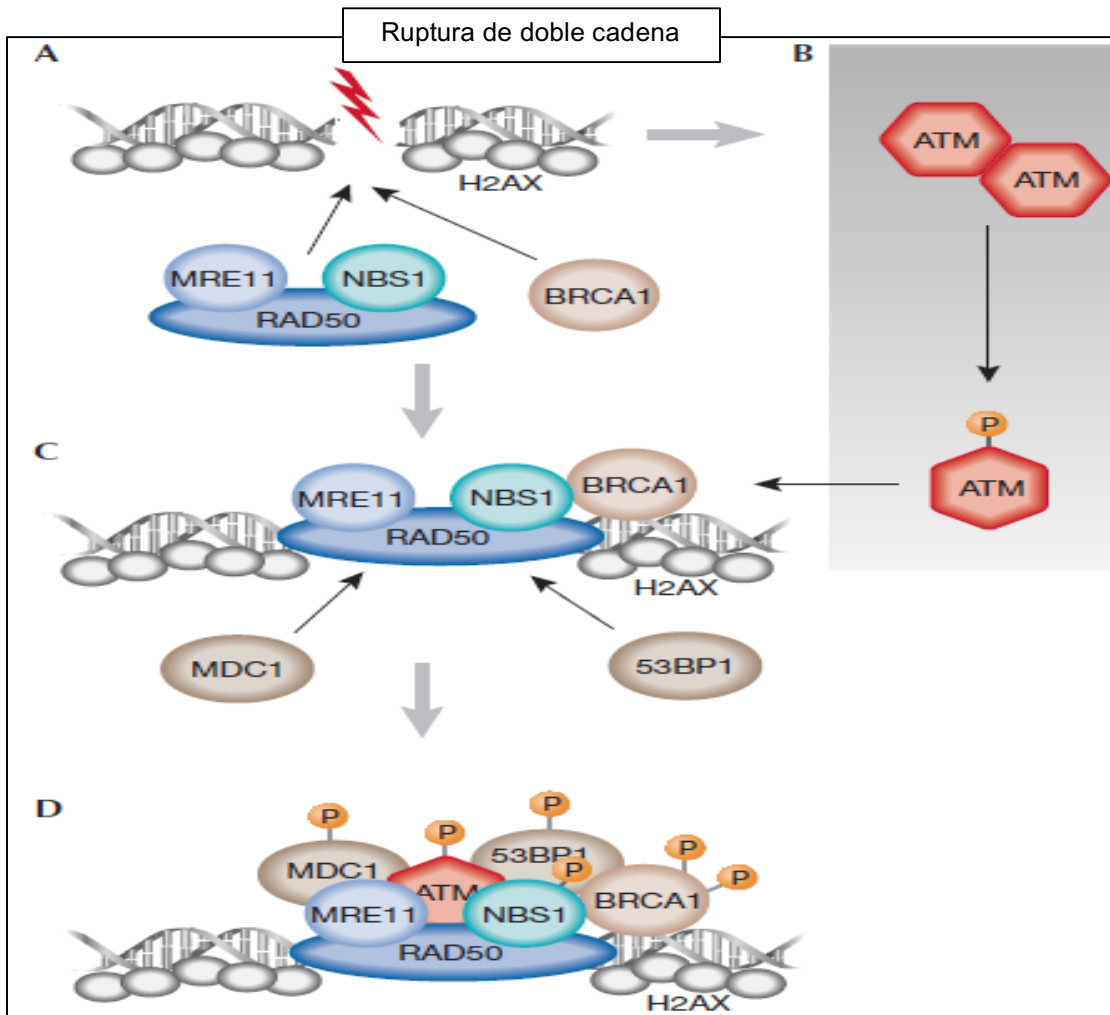


Figura 2. Vía de señalización de la proteína ATM, por ruptura de doble cadena. A) Se produce una DSB, B) La proteína ATM se encuentra como un complejo dimérico inactivo que, en respuesta al daño del DNA, se autofosforila en la serina 1981 y da lugar a un monómero activo. C) Lo anterior da lugar a la fosforilación de la histona H2AX y sirve de plataforma para el reclutamiento de otras proteínas de reparación. El complejo MRN localiza la lesión del DNA, junto con BRCA1. D) El ensamblaje de este complejo facilita la co-localización de ATM activo junto con otros factores, incluyendo MDC1/NFBD1 y 53BP1. Las proteínas BRCA1, MDC1 y 53BP1 también son fosforiladas de una forma dependiente de ATM. El montaje de este complejo multiprotéico facilita la respuesta celular ante una DSB. ATM: mutado en ataxia telangiectasia, DSB: ruptura de doble cadena, DNA: ácido desoxirribonucleico, MRN: complejo MRE11-RAD50-NBS1, MRE11: proteína de recombinación meiótica, RAD50: proteína de reparación del DNA RAD50, NBS1: proteína del síndrome de ruptura de Nijmegen, BRCA1: proteína de cáncer de mama 1, MDC1: proteína mediadora del punto de control de daño al DNA1, NFBD1: factor nuclear con dominios BRCT, 53BP1: proteína de unión a p53-1 (Modificado de McKinnon, 2004).

b) La proteína H2AX

La proteína H2AX es un miembro de la familia de la histona H2A, una de las cinco familias de las histonas que empaquetan y organizan el DNA eucariota en la cromatina. La subunidad básica de la cromatina, el nucleosoma, consiste en un núcleo de ocho proteínas, dos de cada una de las familias de H2A, H2B, H3 y H4, que son rodeadas con aproximadamente 147 pb de DNA, y una quinta histona de la familia de las H1 (**Figura 3**). Ésta última actúa como un puente enlazador de DNA entre los nucleosomas (Bonner, 2008).

La variante H2AX constituye del 10-15% del total de H2A y difiere de H2A debido a una región extendida en el C-terminal de la proteína. La proteína γ -H2AX se localiza en la cromatina que flanquea un rompimiento de doble cadena, provocando la movilización de las proteínas de señalización que llevan a cabo la reparación del daño hacía ese sitio. Por lo anterior, se asume que la eficiencia de los mecanismos de reparación está comprometida cuando la funcionalidad de H2AX se encuentra afectada (Bassal y El-Osta, 2005; Watters *et al.*, 2009; Gemenetzidis *et al.*, 2015).

Durante los 30 minutos posteriores a la formación de la DSB, se activa una proteína H2AX (γ -H2AX) alrededor del sitio de cada ruptura creando un llamado *foci*, sitio en el que adicionalmente, se acumulan las proteínas responsables de la reparación del DNA y la remodelación de la cromatina. Esta amplificación se extiende varios pares de megabases desde el sitio del rompimiento, lo cual en la práctica hace posible su detección y visualización indirecta con un anticuerpo que reconoce a la proteína γ -H2AX (Bonner, 2008; Jeggo y Lavin, 2009).

Localización de H2AX en el nucleosoma

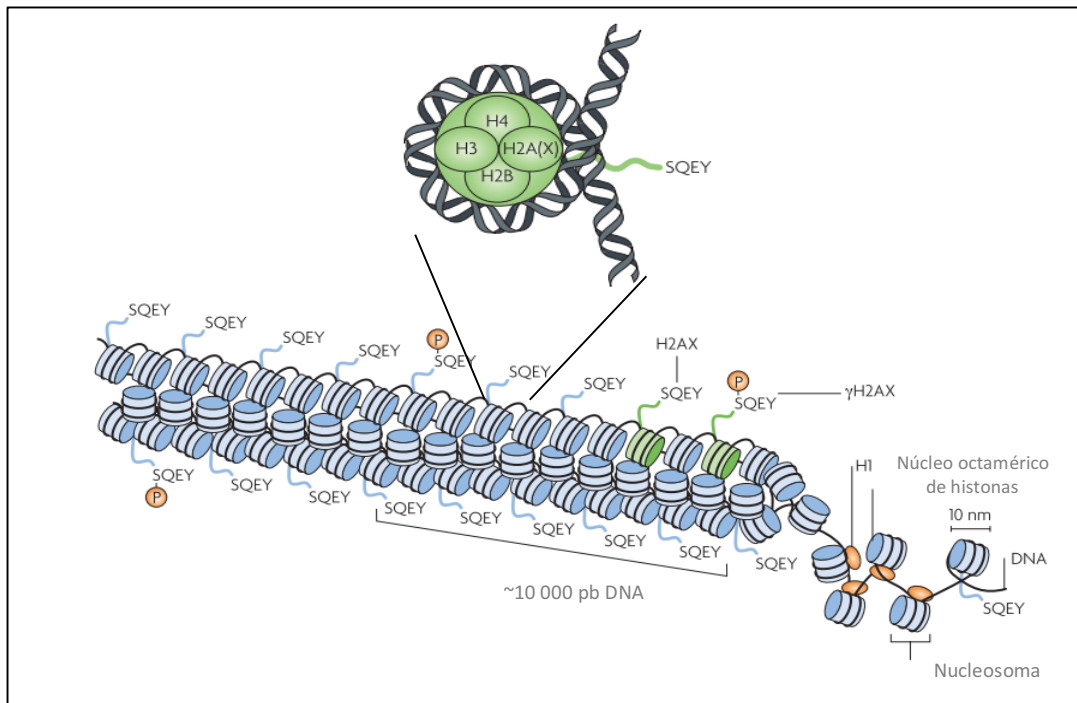


Figura 3. Modelo representativo de la organización de las histonas en el nucleosoma. (Modificado de Bonner *et al.*, 2008).

c) La proteína p53

La proteína p53 desempeña un papel importante en la regulación del destino de la célula, en respuesta a diferentes tipos de estrés, ya sea genotóxicos (daño al DNA inducido por radiación ionizante, radiación UV, agentes carcinógenos o citotóxicos) o no genotóxicos (hipoxia, carencia de nucleótidos, activación de oncogenes, perturbación de los microtúbulos o pérdida de comunicación normal de la célula). Esta proteína es codificada por el gen *TP53* localizado en el cromosoma humano 17 en la región p13, éste contiene 11 exones y se extiende a 20 kb (Lacroix *et al.*, 2006).

La proteína p53 puede ser considerada como enlace con las señales de estrés, ya que es un factor de transcripción. Esta proteína ejerce su acción antiproliferativa mediante la inducción de apoptosis o la detención reversible o irreversible del ciclo celular; también optimiza la reparación del DNA e inhibe la angiogénesis. La función de p53 está frecuentemente alterada durante el cáncer. Se ha visto que

cuando hay pérdida de la actividad de p53, se interrumpe la apoptosis y se acelera la aparición de tumores (Lacroix *et al.*, 2006).

En células normales y no expuestas a estrés, el nivel y la actividad de p53 es muy baja. En respuesta al estrés celular que involucra daño en el DNA, la proteína p53 se activa mediante una serie de modificaciones postraduccionales y se estabiliza (Lacroix *et al.*, 2006). El primer evento en la vía de activación de p53 es a través de ATM que no permite la interacción de p53 con sus reguladores negativos (MDM2 o MDM4) (Menon y Povirk, 2014). Así como también, si el daño al DNA es por DSB causadas por RI o agentes radiomiméticos, la proteína ATM se activa y fosforila diversos blancos moleculares, entre ellos a la proteína p53 (Sancar *et al.*, 2004).

La funcionalidad de p53 depende de su integridad génica y de las modificaciones postraduccionales que se inducen ante la activación de las vías de señalización por estrés celular (Lacroix *et al.*, 2006).

d) Respuestas celulares inducidas por radiación ionizante

Posterior a la exposición a RI, se inducen una serie de respuestas celulares para la detección y reparación del daño. Como se mencionó, un importante regulador de la respuesta al daño al DNA, es la fosforilación de H2AX (Paull *et al.*, 2000). Ésta fosforilación se lleva a cabo a través de la proteína ATM que detecta de manera eficiente las DSB en el DNA. La proteína γ -H2AX es fosforilada por las cinasas ATM, Rad3, ATR, y DNA-PK, dependiendo del tipo de estrés al que esté expuesta la célula (Sancar *et al.*, 2004). El mecanismo que contribuye a la detección rápida del daño, es la actividad de la proteína ATM, que se asocia a las regiones del DNA que flanquean las rupturas, donde es autofosforilado para su activación. Adicionalmente, un conjunto de proteínas mediadoras como, la proteína mediadora del punto de control de daño al DNA1 (MDC1), la proteína de unión a p53-1 (53BP1), BRCA1 y el complejo Mre11/Rad50/NBS1 (MRN), que activan y retienen a ATM en el sitio de la ruptura. Existe evidencia que el complejo

MRN es uno de los sensores principales para detectar DSB (Jeggo y Lavin, 2009). Sin embargo, para que el mecanismo se lleve a cabo, es necesario que el factor 53BP1 reconozca a las histonas modificadas en el sitio de la DSB, de tal manera que se acumula donde ocurrió la ruptura que generó la fosforilación de la histona (Jeggo y Lavin, 2009; Hu *et al.*, 2012; Ivashkevich *et al.*, 2012).

El papel de la forma fosforilada de la histona H2AX en la reparación del DNA está en discusión, pero se sabe que esta modificación permite que el DNA esté menos condensado, dejando espacio para el reclutamiento de las proteínas necesarias para la reparación de los rompimientos de doble cadena del DNA.

El punto de control del ciclo celular dependiente de ATM ocurre durante las fases G1/S y G2/M temprana. Ésta se activa a dosis bajas de RI y conforme aumenta la dosis, continua el arresto, lo que da más tiempo para su reparación antes de la progresión en la fase S y de la mitosis y por lo tanto una mayor supervivencia celular (Jeggo y Lavin, 2009).

Los efectos producidos por la RI de manera directa, pueden resolverse a través de la reparación y activación de eventos de transducción de señales, para la detención de los puntos de control del ciclo celular y el inicio de la apoptosis.

El mecanismo principal de reparación de las DSB en el DNA en la fase G0 y G1 del ciclo celular, es la recombinación por unión de extremos no homólogos (NHEJ), en la que participan las proteínas: Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, XLF, DNA ligasa IV, polinucleótido cinasa, polimerasas μ y ϵ y la endonucleasa Artemisa, y durante la fase tardía S y G2 la recombinación homóloga es la vía responsable de la reparación del daño anteriormente mencionado (Sudprasert *et al.*, 2006; Jeggo y Lavin, 2009) (**Figura 4**).

Participación de proteínas en respuesta al daño al DNA

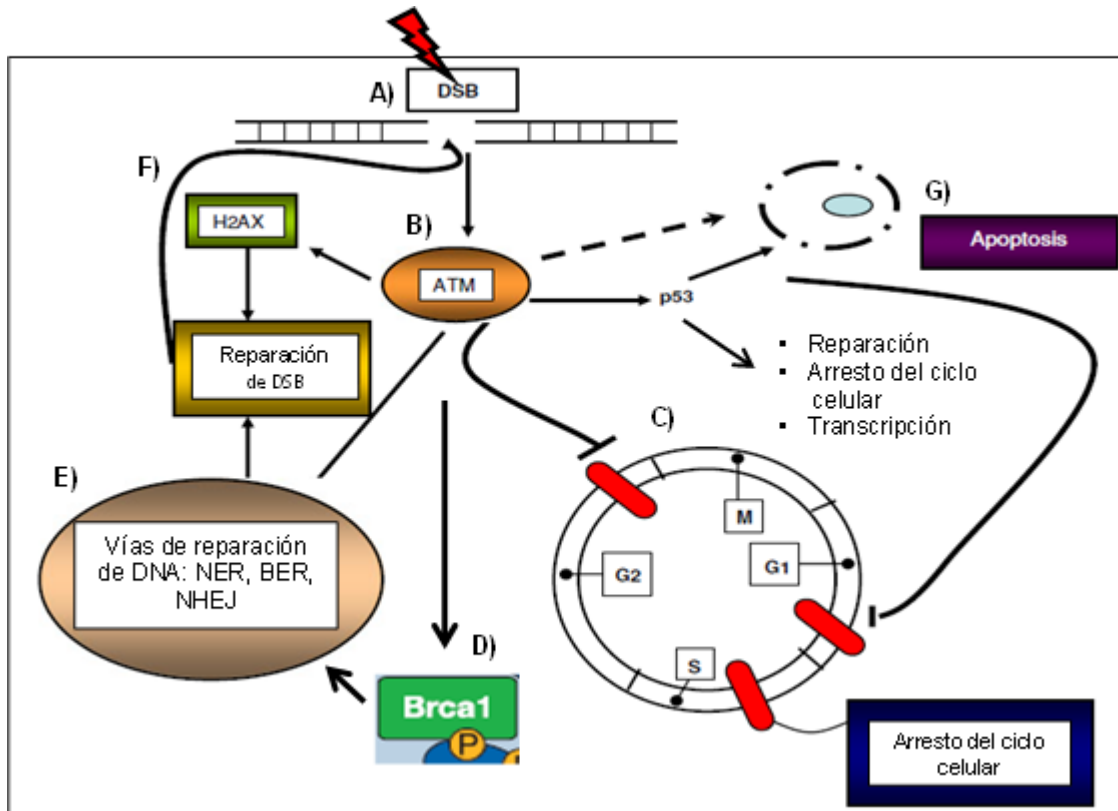


Figura 4. Activación de blancos celulares y sus consecuencias por DSB en el DNA. A) DSB, B) Activación de ATM, C) Arresto del ciclo celular, D) Activación de BRCA1, E) Activación de los mecanismos de reparación, F) Fosforilación de H2AX por ATM, que desempeña un papel en el reconocimiento del daño y promueve la reparación de DSB y la señalización para reclutar proteínas al sitio dañado, G) Apoptosis. NHEJ: Reparación por extremos no homólogo (Adaptado de Alarcon-Vargas, and Ronai, 2002; Bakkenist y Kastan, 2003 y de Bassal y El-Osta, 2005).

Los daños que se generan de manera indirecta se contrarrestan principalmente por la acción de enzimas antioxidantes. Estas pueden actuar atrapando diversas especies reactivas, algunas de ellas son: la superóxido dismutasa, que dismuta el ión superóxido y genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2); catalasa y glutatión peroxidasa, que ambas convierten el H_2O_2 en H_2O y en oxígeno (O_2) y un antioxidante no enzimático, el tripéptido glutatión que reduce al $\bullet OH$. Adicionalmente, algunos antioxidantes de bajo peso molecular como lo son tiorredoxina y metalotioneína ayudan en la captura de H_2O_2 y de $\bullet OH$, respectivamente.

Como efectos secundarios de los radicales libres se pueden generar rompimientos de cadena sencilla y sitiosapurínicos/apirimidínicos en el DNA que se reparan mediante una DNA ligasa o mediante los sistemas de reparación por escisión de bases (BER), mediante endonucleasas AP o DNA glicosilasas o mediante reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Sudprasert *et al.*, 2006; Haton *et al.*, 2007; Hirayama *et al.*, 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con la enfermedad de ataxia telangiectasia tienen una elevada sensibilidad a la radiación ionizante y un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer de mama. Se ha determinado que el 18% de los portadores heterocigos de mutaciones en el gen *ATM*, son susceptibles de presentar este tipo de cáncer. Dado que se ha propuesto que los estudios radiográficos de prevención podrían ser un factor de riesgo para desarrollar cáncer de mama en los portadores, resulta importante validar el uso de marcadores de radiosensibilidad para detectar personas sensibles a los efectos de dosis bajas de radiación ionizante. Un modelo experimental para investigar estos aspectos lo constituye la línea celular *ATM* que presenta de manera heterocigota el alelo asociado a ataxia telangiectasia.

III. HIPÓTESIS

Las células heterocigotas para el gen *ATM* serán más susceptibles a tener rupturas de doble cadena en el DNA por dosis bajas de radiación ionizante.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las rupturas de doble cadena mediante la detección de γ -H2AX y demostrar su utilidad como indicador de radiosensibilidad a dosis bajas de radiación ionizante en células normales y heterocigotas para el gen *ATM*.

1) Objetivos específicos

- Evaluar la citotoxicidad, genotoxicidad y la inducción de apoptosis en células normales y heterocigotas para el gen *ATM* ante la exposición a dosis bajas de radiación ionizante.

- Determinar la correlación entre la genotoxicidad inducida por dosis bajas de radiación ionizante y el genotipo de la línea celular.
- Evaluar la fosforilación de H2AX como indicador de rupturas de doble cadena, inducidas por dosis bajas de radiación ionizante en células normales y heterocigotas para el gen *ATM*.
- Evaluar la inducción de la proteína p53 como indicador de estrés celular por dosis bajas de radiación ionizante en células normales y heterocigotas para el gen *ATM*.

V. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

1) Reactivos

Anticuerpos: γ -H2AX marca Millipore (Temecula, CA, USA); Alexa Fluor 488 conejo anti-cabra marca Invitrogen (Eugene, OR, USA); Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo marca Invitrogen (Eugene, OR, USA); p53 (DO-1) marca Santa Cruz Biotechnology (OR, USA). Reactivos: 7-amino actinomicina D (7-AAD) marca BD Biosciences (San Diego, CA, USA); Aceite de inmersión marca Golden Bell (Zapopán, Jalisco, México); Ácido acético marca J.T. Baker (Edo. de México, México); Albúmina Sérica Bovina marca Santa Cruz Biotechnology (Dallas TX, USA); Amortiguador Guava 10X marca Guava Technologies, Inc. (Hayward, CA, USA); Anexina V marca BD Pharmingen™ (San Diego, CA, USA); Antibióticos y antimicóticos marca Gibco (Grand Island, NY, USA); Bleomicina marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Citocalasina-B marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Cloruro de Potasio (KCl) marca J.T. Baker (Edo. de México, México); Cloruro de Sodio (NaCl) marca Merck Millipore (Billerica, MA, USA); Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) marca J.T. Baker (Edo. de México, México); Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4) J.T. Baker (Edo. de México, México); Kit Hemacolor marca Merck Millipore (Billerica, MA, USA); L-glutamina marca Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA); Medio de cultivo RPMI-1640 marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Metanol marca J.T. Baker (Edo. de México, México); Perm Buffer III marca BD Phosflow™ (San Diego, CA, USA); *p*-formaldehído marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Suero Fetal Bovino (SFB) marca Gibco (Grand Island, NY, USA).

2) Características de las líneas celulares

Las líneas celulares de linfoblastos transformados con virus de Epstein-Barr se adquirieron del banco de líneas celulares del Instituto Coriell (USA). Todas las

líneas adquiridas son provenientes de mujeres, con las características descritas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características de las líneas celulares utilizadas.

Línea celular	Nombre de identificación	Mutación	Características de la paciente
Normal	ND05338		Mujer caucásica de 52 años, sana ¹
Heterociga para el gen <i>ATM</i>	GM03188	8266A>T en el gen <i>ATM</i>	Mujer caucásica de 36 años, fenotípicamente normal

Coriell Institute, 2015.

3) Cultivos celulares

Las líneas celulares descritas anteriormente, se propagaron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado (15% SFB, 1% antibióticos y antimicóticos y 1% de L-glutamina) y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, una vez que formaron grumos macroscópicos se procedió al conteo celular en citómetro de flujo (ATTUNE, Applied Biosystem).

a) Exposición de las células a radiación ionizante

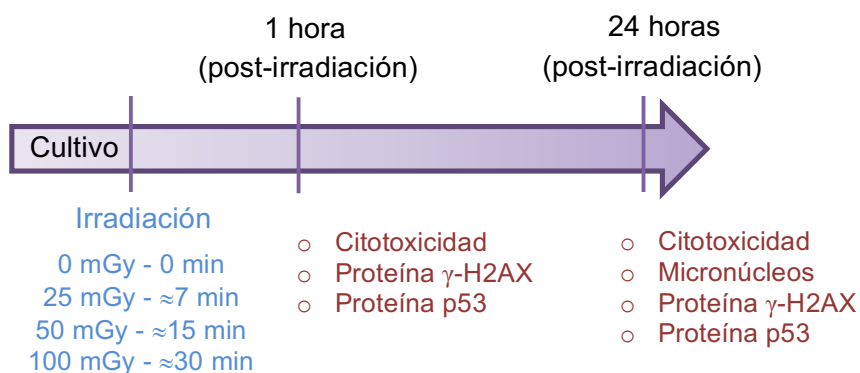
Para la exposición a dosis bajas de RI se utilizó un irradiador diseñado por el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM, cuya fuente radiactiva es ⁹⁰Sr/⁹⁰Y, que emite partículas beta. Las dosis que se usaron fueron 0, 25, 50 y 100 mGy

¹ La línea celular proviene de de una persona neurológicamente normal. Se le realizó una entrevista detallada para obtener su historia clínica, y refirió no tener ningún familiar en primer grado con esclerosis lateral amiotrófica, ataxia, autismo, aneurisma cerebral, distonía, enfermedad de Parkinson ni esquizofrenia.

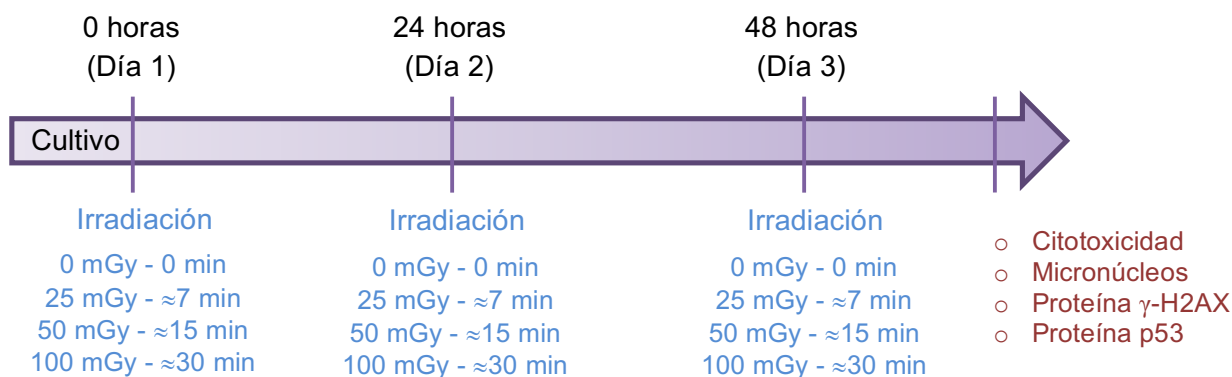
(≈7, ≈15 y ≈30 min, respectivamente), incluido un control positivo de bleomicina (5 y 25 μM). Se colocaron 1×10^6 células en 150 μL de medio de cultivo RPMI-1640 no suplementado a temperatura ambiente en el irradiador y se impartió la dosis correspondiente. Posteriormente, se centrifugaron a 1258 g durante 5 minutos para descartar el sobrenadante y se resuspendieron en 1500 μL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado. Las células irradiadas se colocaron en incubación durante 1 y 24 horas cada dosis, para el ensayo de citotoxicidad y para expresión de proteínas; y 24 horas para el ensayo de MN. Debido a que el monitoreo de las personas que acuden a realizarse una mamografía es periódico y no sólo se realizan el procedimiento una vez, se llevó a cabo la evaluación de los parámetros anteriores en dosis repetidas (25, 50 y 100 mGy, 3 veces, una cada 24 horas).

Línea de tiempo

Dosis únicas



Dosis repetidas



b) Cálculo de la dosis por decaimiento radiactivo

En el mes de abril de 2008, Villegas (2009) calculó que la tasa de dosis de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ utilizada en este trabajo, a una distancia de 2.5 cm de la muestra, fue de $3.78 \text{ mGy} \pm 4\% / \text{min}$. De este modo, la tasa de dosis al tiempo t transcurrido (en meses) desde abril de 2008 hasta el momento del experimento, ajustada por decaimiento radiactivo, está dada por la **Ecuación 1.1**.

$$\dot{D}(t) = \dot{D}(\text{abril de 2008}) \exp\left[\frac{-\ln(2) \cdot t}{t_{1/2}}\right] \quad \text{Ec. 1.1}$$

Donde:

\dot{D} = Tasa de dosis

$t_{1/2}$ = vida media de la fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ = 28.7 años = 344.4 meses

A continuación se muestra un ejemplo del cálculo de la tasa de dosis en uno de los meses en el que se llevó a cabo el presente trabajo.

Ejemplo:

t = tiempo desde abril de 2008 hasta enero de 2014 = 69 meses

$$\dot{D}(\text{enero 2014}) = \left(3.78 \frac{\text{mGy}}{\text{min}}\right) \exp\left[\frac{-\ln(2) \cdot 69 \text{ meses}}{344.4 \text{ meses}}\right] = 3.289 \frac{\text{mGy}}{\text{min}} \pm 4\%$$

Es importante recalcar que para cada mes se realizaba la corrección de la tasa de dosis, siguiendo la **Ecuación 1.1**.

4) Análisis de la citotoxicidad por citometría de flujo

La citotoxicidad y la apoptosis se evaluaron mediante anexina V para detectar fosfatidilserina en la membrana externa de las células apoptóticas. Las células también se marcaron con 7-AAD como un indicador de la integridad estructural de la membrana. Para la realización de la técnica se centrifugaron las células a 1258 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en amortiguador

de anexina [amortiguador guava 1X, anexina V (1:100) y 7-AAD (30 μ L/mL)], se incubaron las muestras a temperatura ambiente, cubiertas de la luz durante 25 minutos. Se analizaron 10,000 eventos por muestra en citómetro de flujo (ATTUNE, Applied Biosystem) utilizando el software de análisis FlowJo X.

5) Ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis

El ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis (CBMN), es de gran utilidad para determinar la naturaleza clastogénica o aneugénica (capaz de causar rupturas en el cromosoma, o pérdida de cromosomas completos, respectivamente) de xenobióticos (Fenech y Morley, 1985; 1986; Watters *et al.*, 2009).

Los micronúcleos (MN) son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que no se incorporaron en el núcleo principal durante la división celular (Fenech y Morley, 1985). Se originan a partir de rompimientos de cromosomas que pueden ocurrir en la fase G1 o G2 del ciclo celular, debido a rompimientos de doble cadena del DNA que no fueron reparados exitosamente, por reordenamiento cromosómico, por cromosomas que sufren rezago anafásico (daño del huso mitótico) o bien por la inactivación del centrómero (Fenech, 2000).

Con esta técnica también se puede determinar el índice de proliferación nuclear, así como realizar el conteo de células apoptóticas, necróticas, así como gemaciones las cuales se han relacionado con amplificaciones de DNA, y puentes nucleoplásmicos, los cuales representan cromosomas dicéntricos (Fenech, 2002). Cabe mencionar que la inducción de cromosomas dicéntricos ha sido validada como biomarcador de exposición a RI (Fenech *et al.*, 2011).

Las células expuestas a RI se mantuvieron en cultivo durante 24 horas en incubadora a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Se adicionó al cultivo citocalasina B (Cyt-B, metabolito aislado del hongo *Helminthosporium dematoideum*, que inhibe la polimerización de la actina) para inhibir la citocinesis, pero no la cariocinesis, logrando así obtener las células binucleadas para realizar la evaluación de la frecuencia de MN. Al término del tiempo de cultivo, las células se centrifugaron a

177 g por 10 min, se pre-fijaron y se lavaron tres veces con metanol-ácido acético 3:1, para eliminar restos y detritus celulares.

a) Tinción de laminillas

Se colocó gota a gota el precipitado del último lavado en portaobjetos con borde esmerilado. Una vez secas las laminillas, se tiñeron con el kit hemacolor (azul de metileno y eosina) y se realizó el análisis en microscopio óptico de campo claro a 100X.

b) Análisis de micronúcleos en laminillas

La frecuencia de MN, al igual que el análisis del citoma (**Figura 5**) (gemaciones, puentes nucleoplásmicos, apoptosis y necrosis), se determinó en 1000 células binucleadas usando un microscopio óptico con el objetivo de 100 X.

Las células que se utilizan para evaluar la frecuencia de MN deben tener las siguientes características:

- Deben ser células binucleadas.
- Los límites de la membrana de la célula binucleada deben de estar intactos y distinguibles.
- Los dos núcleos en una célula binucleada, deben tener su membrana nuclear intacta y encontrarse dentro del citoplasma.
- Los dos núcleos en una célula binucleada deben ser del mismo tamaño aproximadamente, y con una misma tinción, pueden estar cerca pero lo ideal es que no estén encimados. Una célula con dos traslapes de núcleos puede considerarse sólo si los límites de cada uno de los núcleos son distinguibles (Fenech *et al.*, 2003).

Los MN son morfológicamente idénticos, pero más pequeños que los núcleos principales y deben cumplir con las siguientes características:

- El diámetro de un MN en linfocitos humanos por lo general está entre 1/16 y 1/3 de lo que mide el diámetro del núcleo principal.
- Deben tener una forma redonda u ovalada.
- No deben ser refringentes, por lo tanto, son fácilmente distinguibles de partículas de colorante.
- No deben estar unidos ni traslapados al núcleo principal.
- Si se encuentran muy cercanos al núcleo, el límite de los MN debe de ser distinguible al núcleo principal.
- Deben tener la misma intensidad de tinción que la de los núcleos principales, aunque en ocasiones pueden ser más intensos o más claros (Fenech *et al.*, 2003).

Las gemaciones son estructuras celulares que se asemejan a un MN, pero no se clasifica como tal ya que se propone que estos provienen de la eliminación de DNA amplificado, y posiblemente, de la eliminación de los complejos de reparación del DNA. Cumplen algunas características de los MN, solo que estos no se encuentran totalmente separados de cualquiera de los núcleos principales en el que se presente, si no que están unidos con una delgada franja de material genético (Fenech *et al.*, 2003).

Los puentes nucleoplásmicos (PN) se pueden observar en las células binucleadas tras la exposición a clastógenos y se cree que se originan a partir de reordenamientos cromosómicos, que el cromosoma tenga más de un centrómero, por ejemplo, cromosomas dicéntricos, cuyos centrómeros se separan a los polos opuestos de la célula en la anafase. Los PN tienen las siguientes características:

- El PN es un enlace continuo entre los núcleos de una célula binucleada.
- La anchura del PN puede variar considerablemente, pero por lo general no debe ser superior a la cuarta parte del diámetro de los núcleos dentro de la célula.
- El PN debe tener las mismas características de tinción de los núcleos principales.
- Se puede encontrar más de un PN dentro de una célula binucleada (Fenech *et*

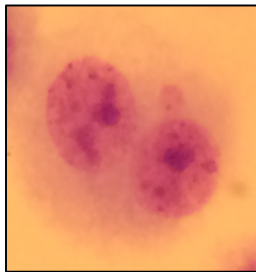
al., 2003).

Los criterios que debe cumplir una célula apoptótica para considerarse dentro del conteo, son los siguientes:

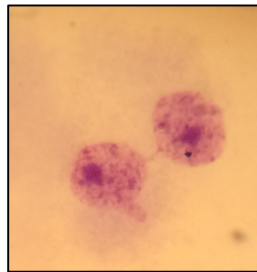
- Debe existir condensación de la cromatina dentro del núcleo y los límites citoplasmáticos y nucleares deben observarse intactos.
- Se debe observar fragmentación nuclear en cuerpos nucleares más pequeñas dentro de la membrana citoplasmática intacta.
- La intensidad de la tinción de los fragmentos nucleares debe ser generalmente mayor que en las células viables (Fenech *et al.*, 2003).

Las células necróticas se pueden identificar de la siguiente manera:

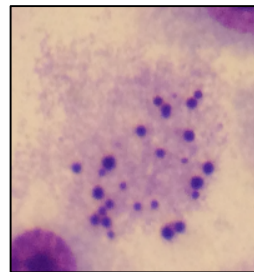
- Por la presencia de un citoplasma pálido con numerosas vacuolas (principalmente en el citoplasma y algunas en el núcleo).
- La membrana citoplasmática se encuentra dañada y su interior se observa expuesto al exterior de la célula, la membrana nuclear se aprecia dañada e irregular con algunas estructuras nucleares parcialmente intactas, y a menudo, los materiales nucleares se escapan de los límites nucleares.
- La intensidad de la tinción del núcleo y el citoplasma es generalmente menor que la observada en las células viables (Fenech *et al.*, 2003).



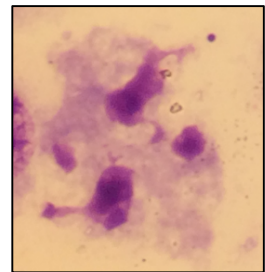
A) Célula con micronúcleo



B) Célula con gemación y puente nucleoplásmico



C) Célula en apoptosis



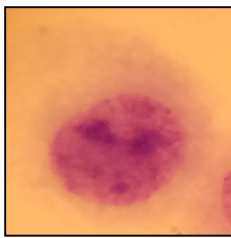
D) Célula en necrosis

Figura 5. Imágenes representativas de células con: A) Micronúcleo, B) Gemación y puente nucleoplásmico, C) Apoptosis, D) Necrosis. Imágenes tomadas de experimentos de éste trabajo de tesis.

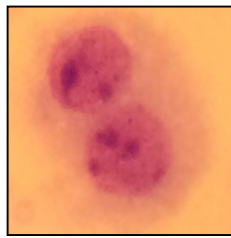
c) **Conteo del índice de división nuclear**

En las mismas laminillas se evaluó adicionalmente el índice de división nuclear (IDN), usando un microscopio óptico con el objetivo de 100X. El IDN se basa en la relación de células mononucleadas (mono, un solo núcleo), binucleadas (BN, dos núcleos en la misma célula) y polinucleadas (poli, más de dos núcleos en la misma célula) que existen en la laminilla (**Figura 6**) (Eastmond y Tucker, 1989). El IDN se contó conforme se encontraron las células en toda la laminilla, en un total de 200 células y se calculó con la siguiente fórmula:

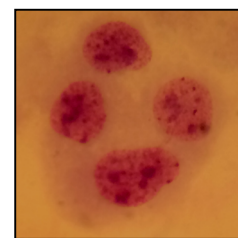
$$IDN = \left[\frac{1(mono) + 2(BN) + 3(poli)}{200} \right]$$



A) Célula mononucleada



B) Célula binucleada



C) Célula polinucleada

Figura 6. Imágenes representativas de células: A) Mononucleada, B) Binucleada y C) Polinucleada. Imágenes tomadas de experimentos de éste trabajo de tesis.

6) **Determinación de la inducción de las proteínas γ -H2AX y p53 por citometría de flujo**

a) **Permeabilización de las células**

Una vez que pasó el tiempo post irradiación, las células se centrifugaron a 1817 g por 5 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Se les colocó *p*-formaldeído 1% durante 10 min a 4 °C como método de fijación de las células, se centrifugaron nuevamente bajo las condiciones anteriores y se retiró el sobrenadante. Las células se separaron en cuatro partes (250, 000 células por anticuerpo, por duplicado) y se lavaron con amortiguador de fosfato salino (PBS) 1X. Posteriormente, se les colocó el amortiguador permeabilizador perm buffer III

durante 30 min a 4 °C, para generar poros en la membrana celular y así hacerla permeable a los anticuerpos.

b) Marcaje con anticuerpos y lectura

Posteriormente se incubaron las células con el anticuerpo específico para γ -H2AX con un factor de dilución (FD) de 1:1000 y p53 con FD de 1:10 en una solución de PBS1X-albúmina 0.5%, durante 30 min a 4 °C. Después de la incubación, se lavaron con PBS 1X-albúmina 0.5% y se centrifugaron a 1817 g durante 5 min a 4 °C para retirar el anticuerpo primario. Posteriormente se incubaron con su respectivo anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo para la proteína γ -H2AX) y ratón para la proteína p53, en una solución de PBS1X-albúmina 0.5%, durante 30 min a 4 °C. Después de la incubación se lavaron nuevamente con PBS 1X-albúmina 0.5% y se centrifugaron a 1817 g, durante 5 min a 4 °C para retirar el anticuerpo secundario y se resuspendieron en PBS 1X para realizar la lectura.

Se analizaron 10,000 eventos por muestra en citómetro de flujo (ATTUNE, Applied Biosystem) utilizando el software de análisis FlowJo X.

7) Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism versión 6.0 para Mac (San Diego California, USA), mediante pruebas paramétricas o no paramétricas de acuerdo a la distribución de las variables. Se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía y Kruskal-Wallis y las pruebas de comparación múltiple Dunnett y Dunn, respectivamente. Los valores de $p < 0.05$ obtenidos, se consideraron como estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS

1) Citotoxicidad

Las dosis bajas de RI no fueron citotóxicas en dosis únicas (1 y 24 horas) y repetidas (3 veces, una cada 24 horas) en ninguna de las líneas celulares utilizadas (normal y $ATM^{+/-}$) (**Figura 7, 8, y 9**). Además, se corroboró la ausencia de citotoxicidad con el análisis de la muerte celular por apoptosis (temprana y tardía), y necrosis, mostrando que dichos parámetros no cambiaron con respecto a las células sin irradiar (gráficas no mostradas).

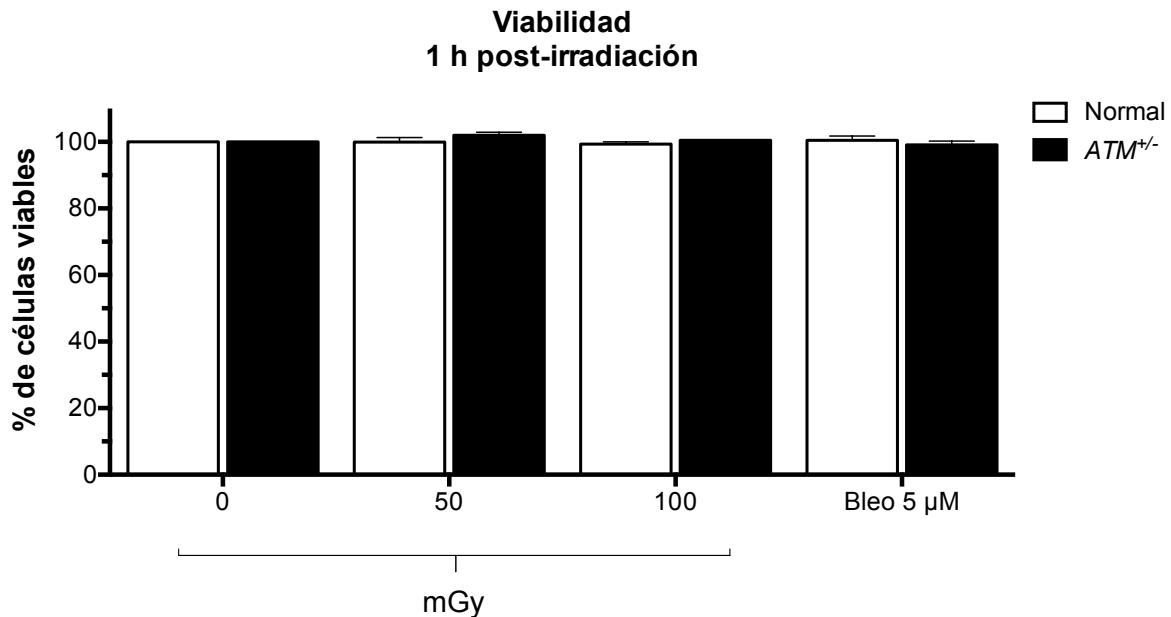


Figura 7. Ausencia de efecto citotóxico 1 hora después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Bleo 5 μ M: bleomicina 5.0 μ M, $ATM^{+/-}$: heterocigas para el gen ATM . * $p < 0.05$ respecto a las células sin irradiar.

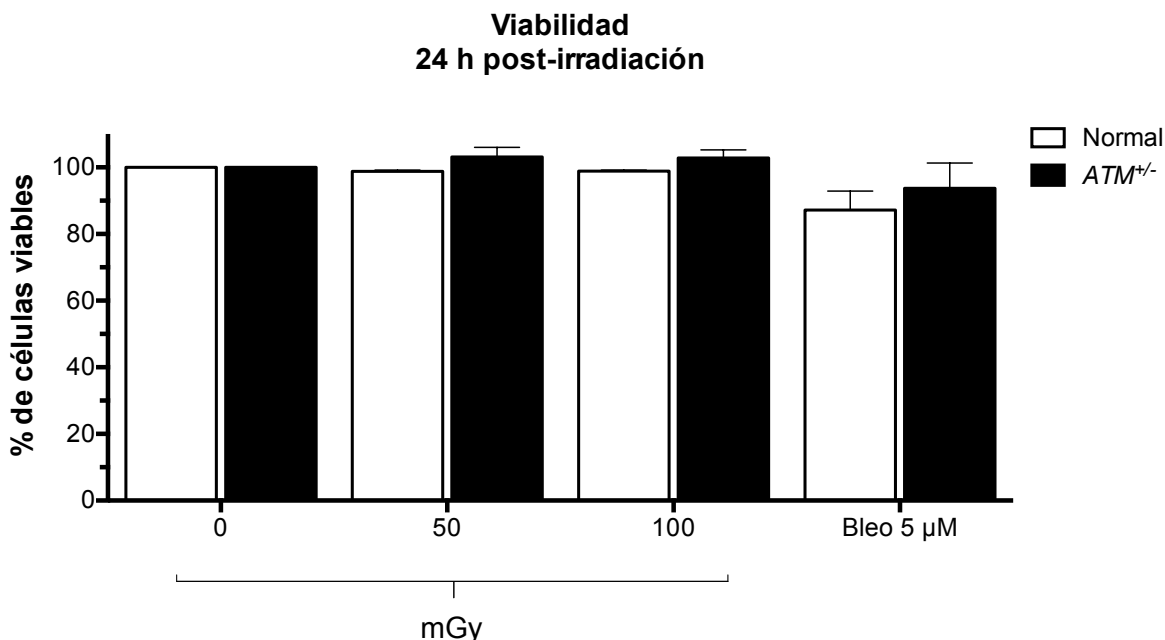


Figura 8. Ausencia de efecto citotóxico 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Bleo 5 μ M: bleomicina 5.0 μ M, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

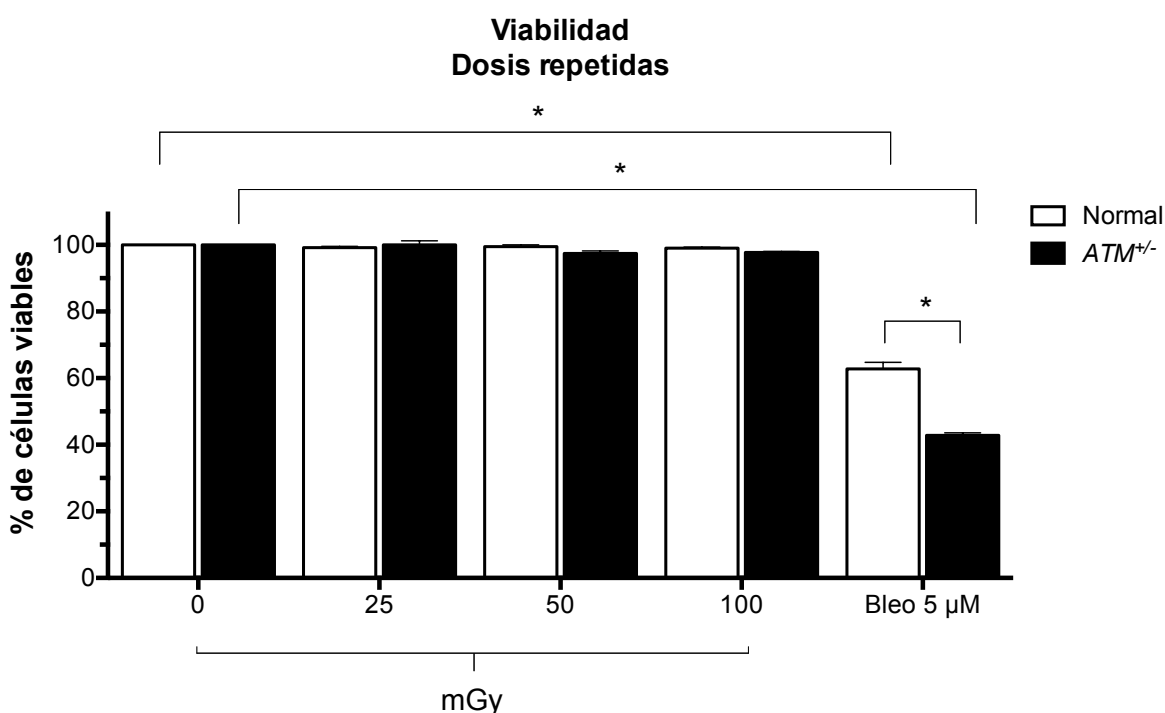


Figura 9. Ausencia de efecto citotóxico después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Bleo 5 μ M: bleomicina 5.0 μ M, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

2) Parámetros de genotoxicidad

Para determinar si las dosis bajas de RI generan daño permanente/no reparable al DNA se realizó la técnica de CBMN, con la cual además de observar la formación de MN, también se pueden determinar otros parámetros asociados al daño genético. En las **Figuras 10-21**, se presentan los datos obtenidos a partir de la determinación de la frecuencia de MN, gemaciones, puentes nucleoplásmicos, apoptosis y necrosis, en las líneas celulares estudiadas (normal y $ATM^{+/-}$). También se presenta el índice de división nuclear, un parámetro que permite estimar la proliferación celular.

Las células normales y heterocigotas para el gen *ATM* no presentaron radiosensibilidad evaluada con la técnica de MN a dosis únicas, sin embargo, sí presentaron un aumento significativo en la frecuencia de MN bajo dosis repetidas, a partir de la dosis de 100 mGy. Interesantemente, la línea celular heterociga para el gen *ATM* presenta una mayor frecuencia basal de MN comparada con las células normales. Esta tendencia se mantuvo con la exposición a RI usando dosis repetidas (**Figura 11**).

Otros parámetros como gemaciones, apoptosis y necrosis se observaron elevados significativamente de manera basal en las células heterocigas para el gen *ATM*.

En las células heterocigotas para el gen *ATM*, se observó un aumento en la frecuencia de puentes nucleoplásmicos con dosis repetidas de 50 y 100 mGy (**Figura 15**). Cabe mencionar que se ha propuesto que una gemación puede dar lugar a un MN, así como también que los puentes nucleoplásmicos son consecuencia de un cromosoma dicéntrico.

La proliferación celular medida por el índice de división nuclear no fue alterada en ninguna de las condiciones (**Figuras 20 y 21**).

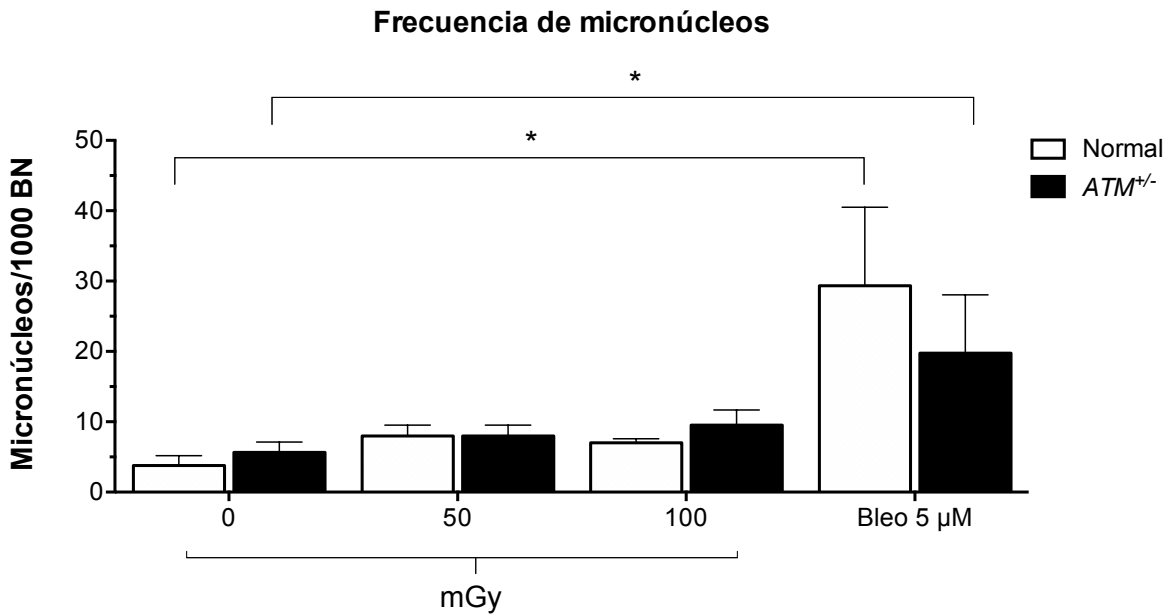


Figura 10. Evaluación de la genotoxicidad, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

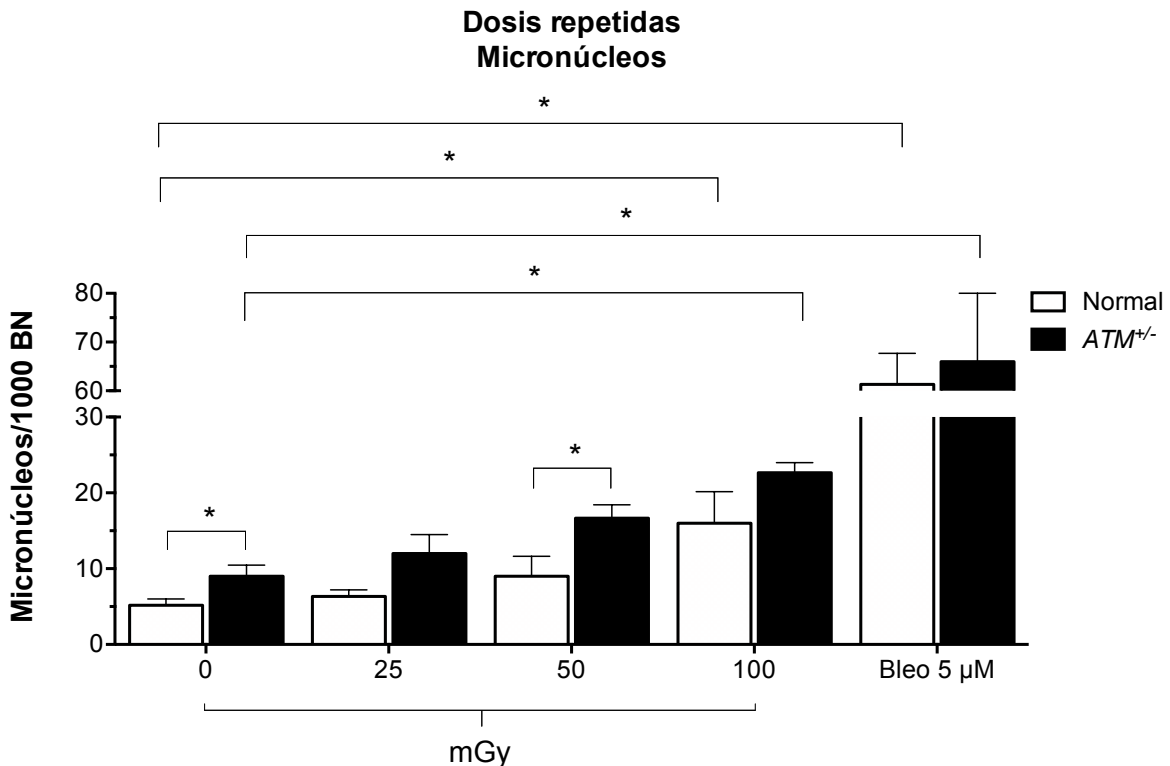


Figura 11. Evaluación de la genotoxicidad, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

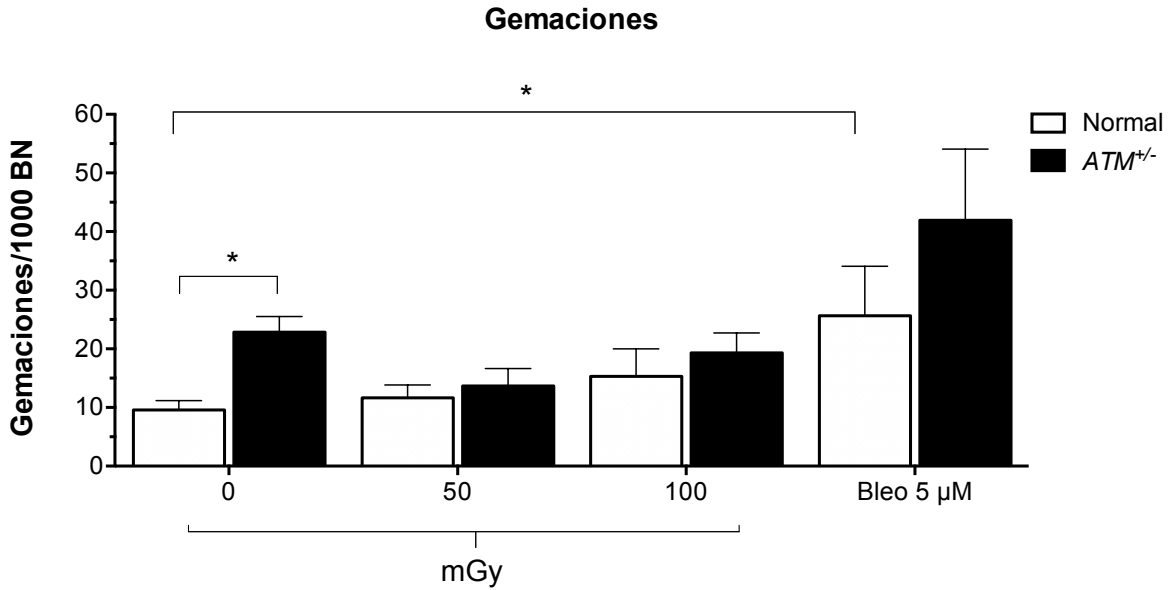


Figura 12. Evaluación de la frecuencia de gemaciones, 24 horas después de la exposición a dosis única de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: bleomicina 5.0 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

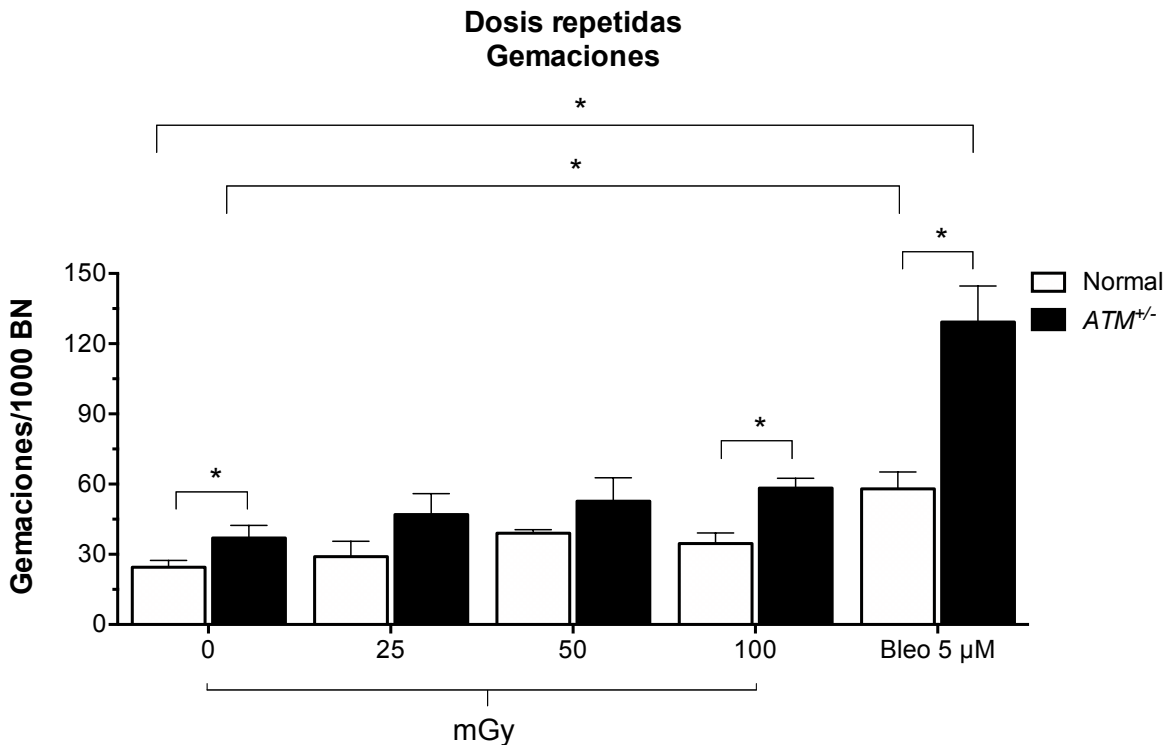


Figura 13. Evaluación de la frecuencia de gemaciones, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

Puentes nucleoplásmicos

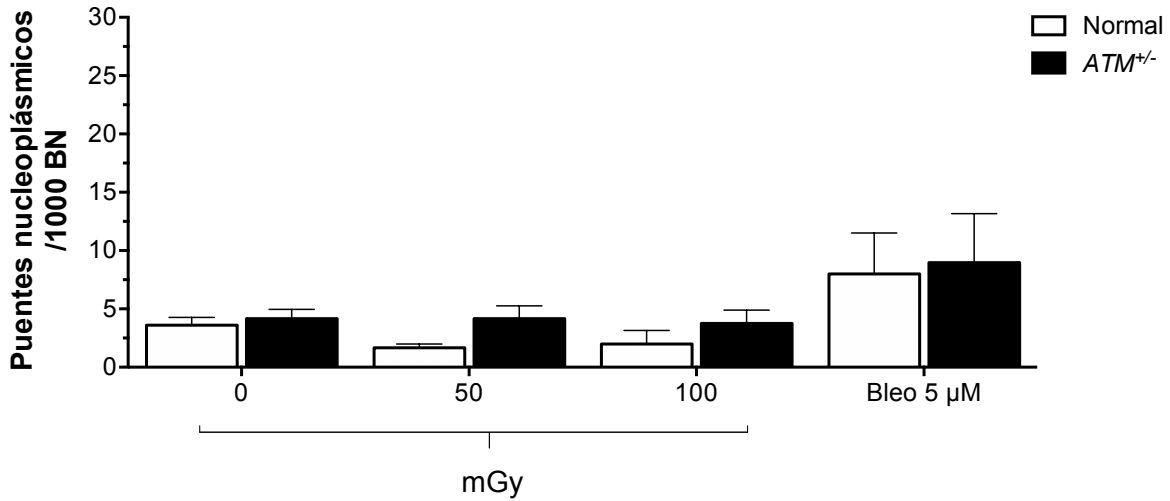


Figura 14. Evaluación de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

Dosis repetidas Puentes nucleoplásmicos

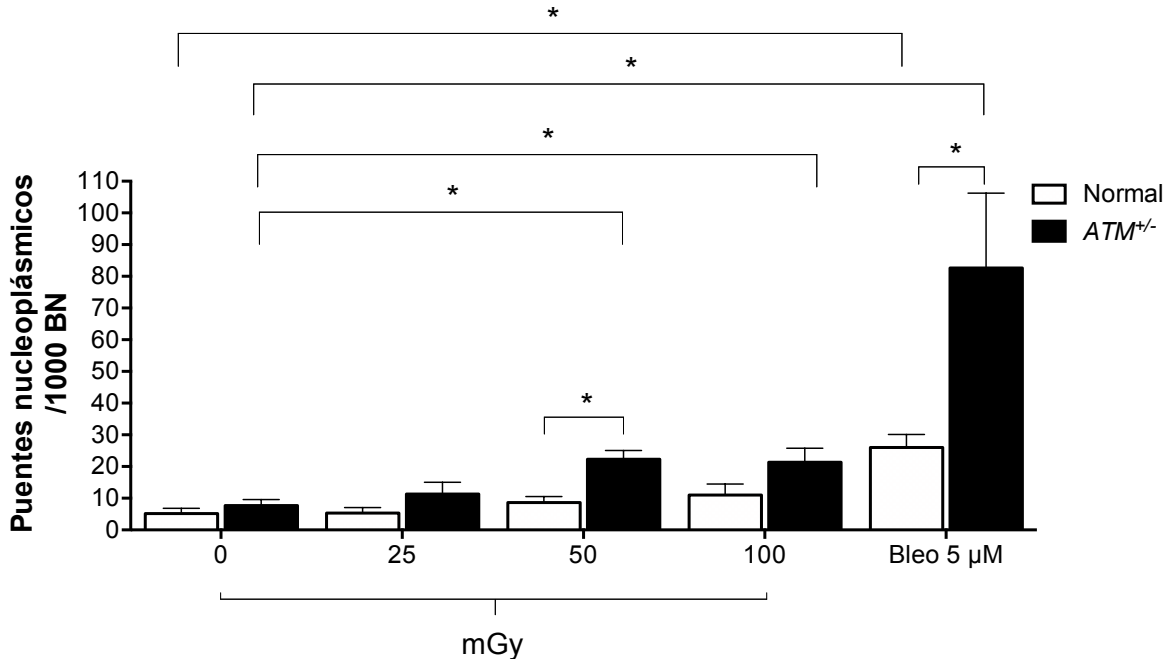


Figura 15. Evaluación de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

Apoptosis

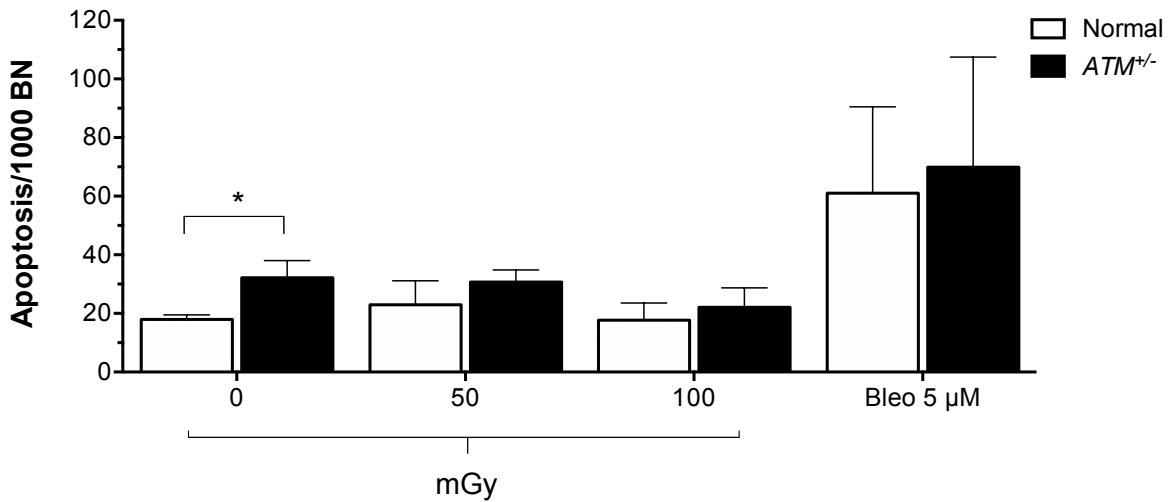


Figura 16. Evaluación de muerte celular por apoptosis, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μM: Bleomicina 5.0 μM, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * p<0.05 respecto al control sin irradiar.

Dosis repetidas Apoptosis

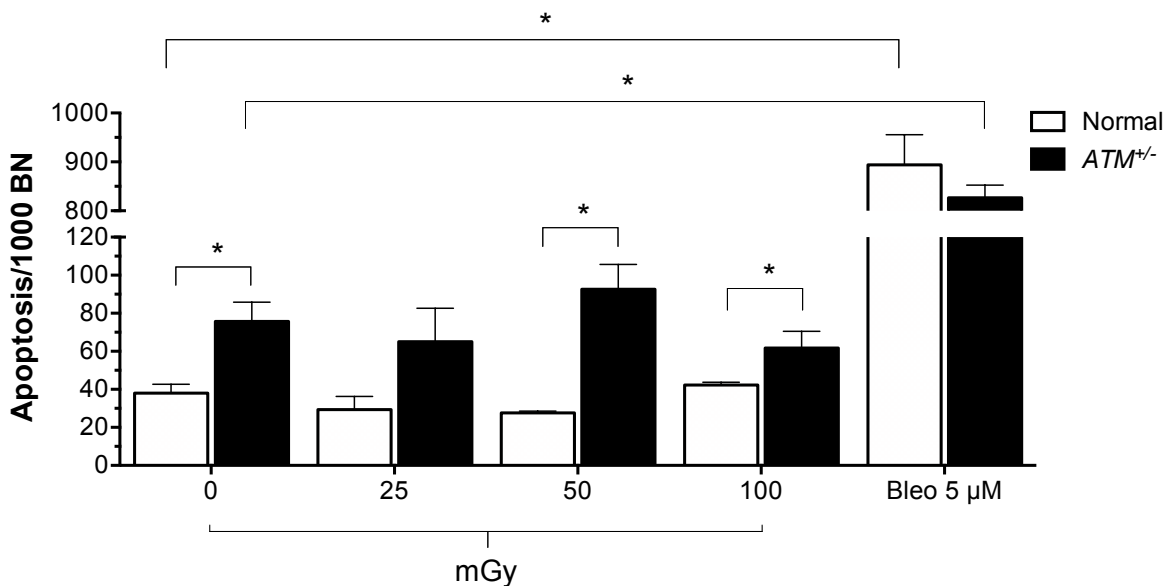


Figura 17. Evaluación de muerte celular por apoptosis, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μM: Bleomicina 5.0 μM, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * p<0.05 respecto al control sin irradiar.

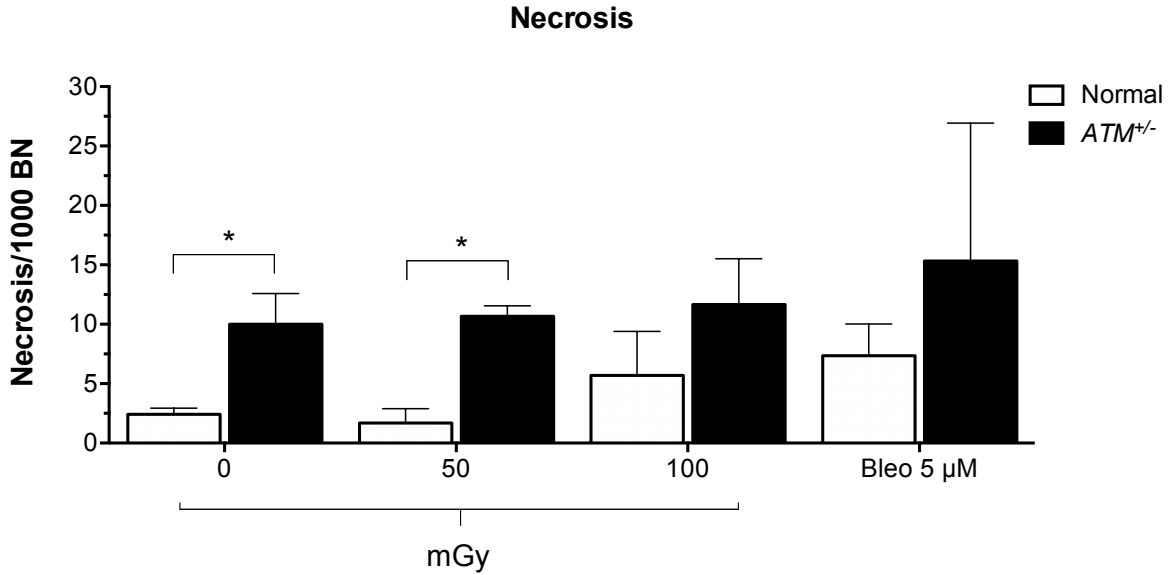


Figura 18. Evaluación de muerte celular por necrosis, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

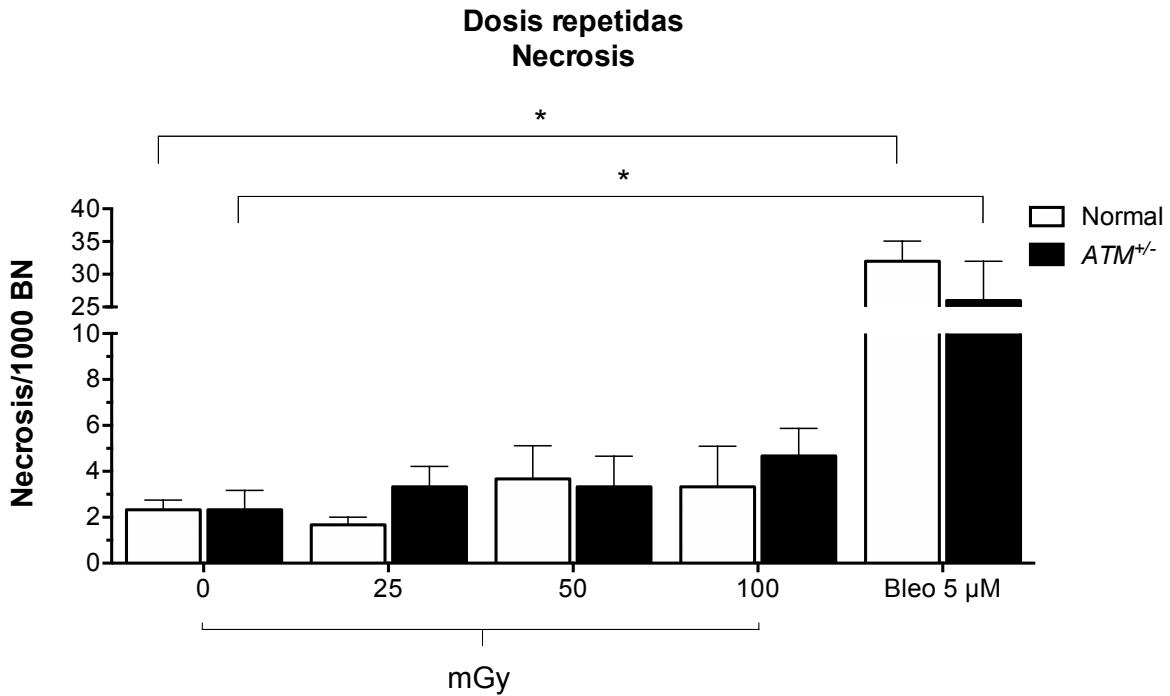


Figura 19. Evaluación de muerte celular por necrosis, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes. BN: células binucleadas, Bleo 5 μ M: Bleomicina 5.0 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

Índice de división nuclear

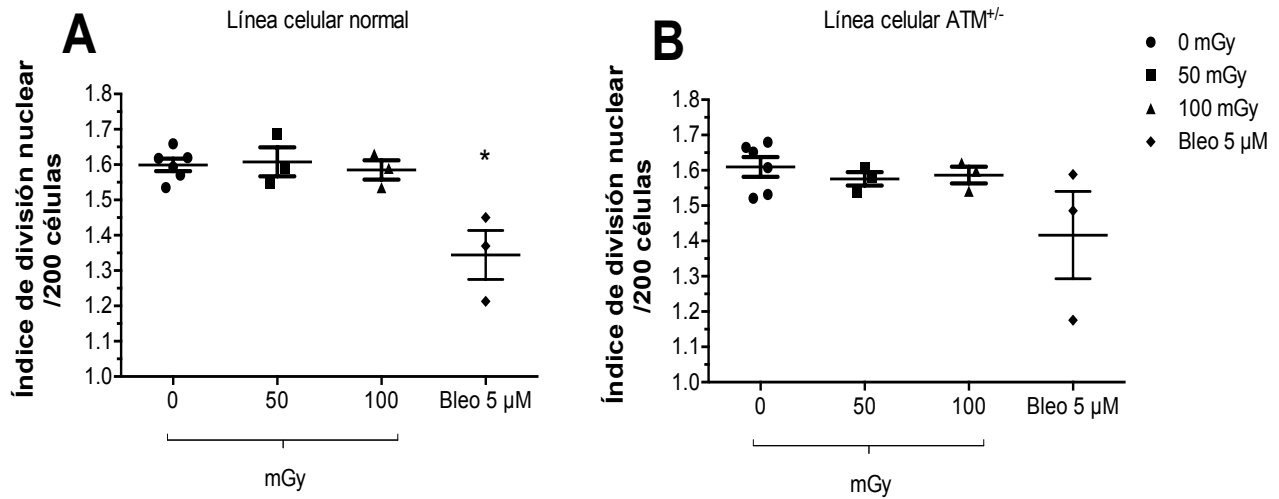


Figura 20. Evaluación de la proliferación celular, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes. Bleo 5 μM: Bleomicina 5.0 μM. * p<0.05 respecto al control sin irradiar.

Dosis repetidas Índice de división nuclear

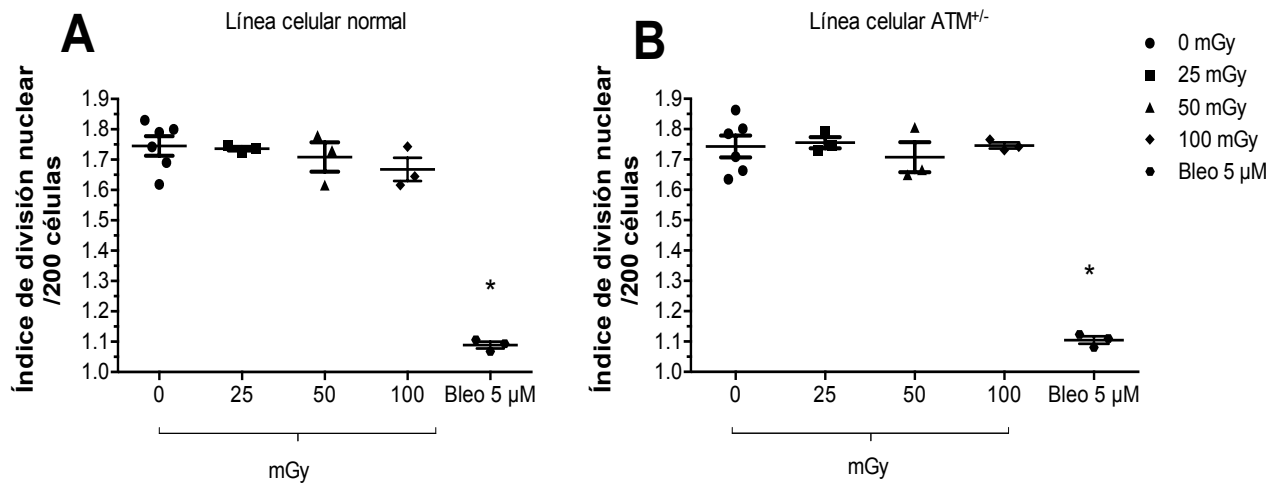


Figura 21. Evaluación de la proliferación celular, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes. Bleo 5 μM: Bleomicina 5.0 μM. * p<0.05 respecto al control sin irradiar.

3) Inducción de proteínas γ -H2AX y p53

Las líneas celulares normal y heterociga para el gen *ATM* se expusieron a dosis bajas de RI y se analizaron las proteínas γ -H2AX y p53 después de dosis únicas 1 y 24 horas post-irradiación y repetidas (3 veces, una cada 24 horas). En cuanto a la fosforilación de la proteína H2AX, no se observó una diferencia significativa respecto a las células no irradiadas (**Figura 22 y 23**). De igual manera no se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína p53, en la línea celular normal, en ninguno de los tiempos probados. En contraste, en la línea celular heterociga para el gen *ATM*, se observó un aumento de los niveles de p53 con la dosis de 100 mGy, 1 hora post-irradiación (**Figura 25**). Sin embargo, no hubo cambios inducidos por dosis bajas de radiación después de las 24 horas (**Figura 26**).

En la **Figura 24 y 27** se presentan los resultados obtenidos de la irradiación de manera repetida (3 veces, una cada 24 horas). En cuanto a la línea celular normal, no se observaron cambios en ninguna dosis, en las proteínas γ -H2AX y p53. Sin embargo, en la línea celular heterociga para el gen *ATM* se observó un incremento de los niveles de p53 con 25, 50 y 100 mGy.

El análisis comparativo entre ambas líneas celulares mostró que las células heterocigas para el gen *ATM* expuestas a 100 mGy, tienen significativamente más niveles de p53, 1 hora post-irradiación; se observó el mismo comportamiento con 25, 50 y 100 mGy, bajo la exposición a dosis repetidas.

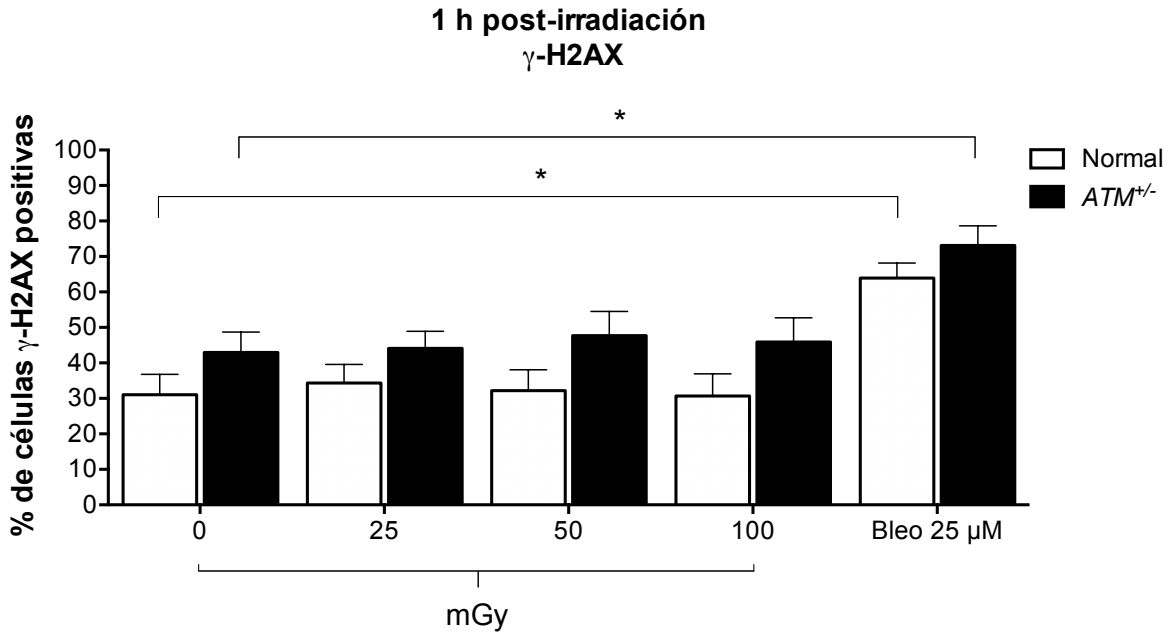


Figura 22. Evaluación de las rupturas de doble cadena, 1 hora después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Se muestra el porcentaje de células γ-H2AX positivas como marcador indirecto. Cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Bleo 25 μM: bleomicina 25 μM, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * p<0.05 respecto al control sin irradiar.

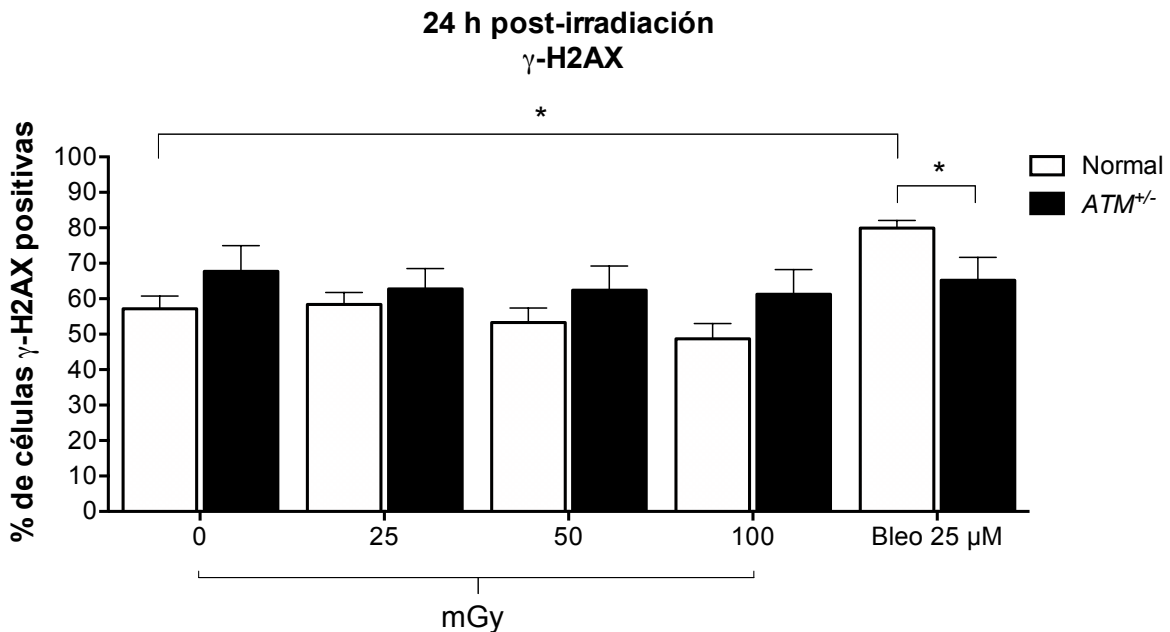


Figura 23. Evaluación de las rupturas de doble cadena, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Se muestra el porcentaje de células γ-H2AX positivas como marcador indirecto. Cada barra representa la media ± SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Bleo 25 μM: bleomicina 25 μM, ATM^{+/-}: heterocigas para el gen ATM. * p<0.05 respecto al control sin irradiar.

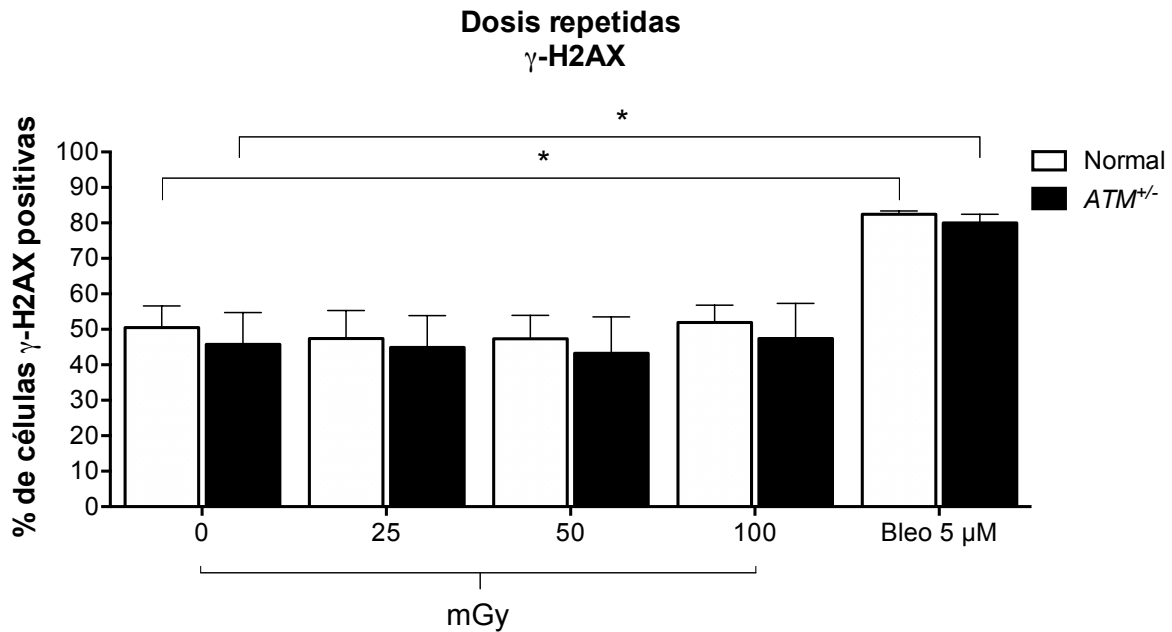


Figura 24. Evaluación de las rupturas de doble cadena, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Se muestra el porcentaje de células γ -H2AX positivas como marcador indirecto. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Bleo 5 μ M: bleomicina 5 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

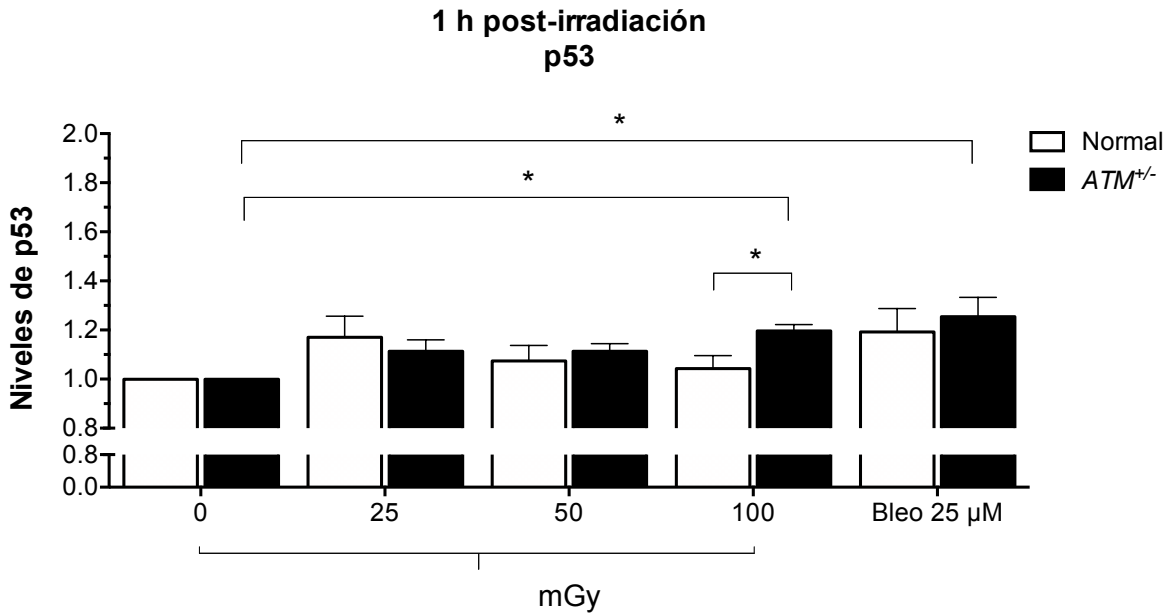


Figura 25. Análisis de los niveles de la proteína p53, 1 hora después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Bleo 25 μ M: bleomicina 25 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

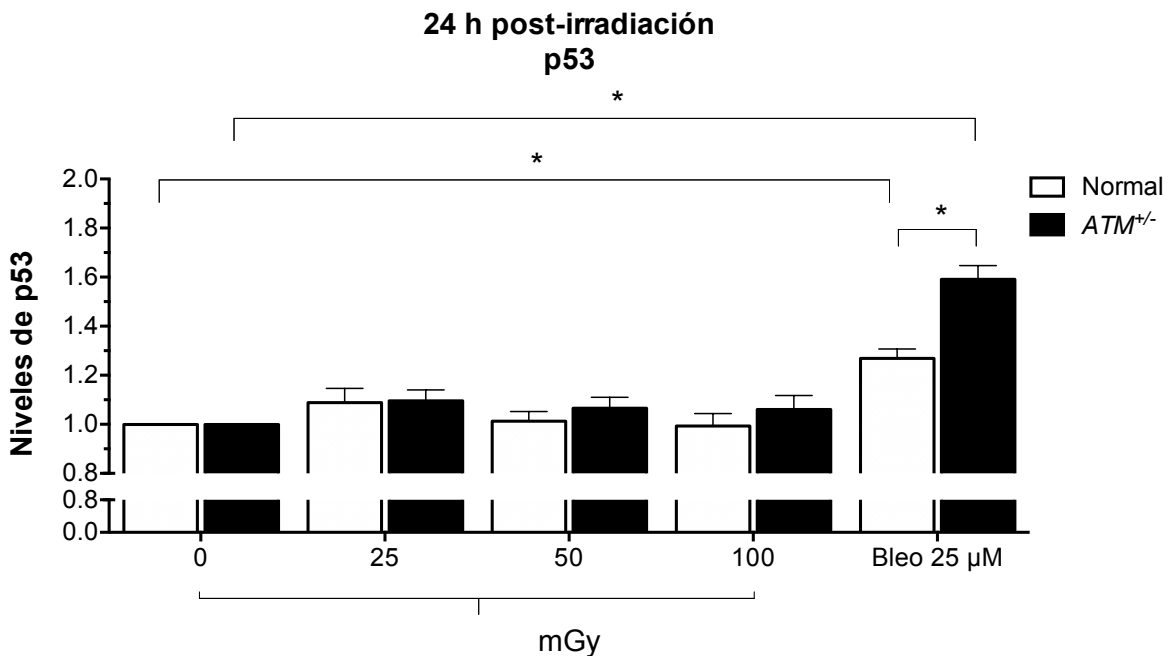


Figura 26. Análisis de los niveles de la proteína p53, 24 horas después de la exposición única a dosis bajas de radiación ionizante, en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Bleo 25 μ M: bleomicina 25 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

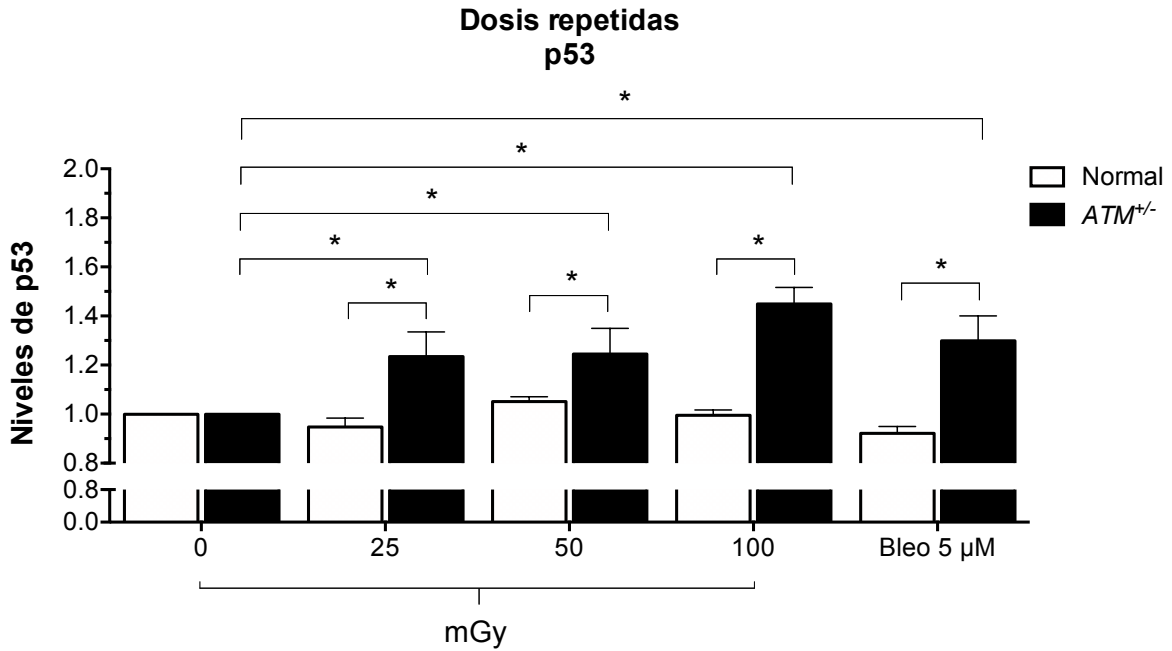


Figura 27. Análisis de los niveles de la proteína p53, después de la exposición repetida a dosis bajas de radiación ionizante (3 veces, una cada 24 horas), en linfoblastos transformados^{EBV}. Cada barra representa la media \pm SEM de tres experimentos independientes por duplicado. Bleo 5 μ M: bleomicina 5 μ M, *ATM*^{+/-}: heterocigas para el gen *ATM*. * $p < 0.05$ respecto al control sin irradiar.

VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo se realizó con células normales y heterocigotas para el gen *ATM*, cuya importancia es que la mutación afecta al 0.5-1% de la población, dicha mutación genera radiosensibilidad en los portadores, debido a que las células no reconocen que su DNA ha sufrido daño (Broeks *et al.*, 2000; Ahmed y Rahman, 2006).

Nosotros evaluamos el efecto de dosis bajas de RI impartidas por partículas beta, que son emitidas por una fuente de $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$. Este tipo de partículas colisiona con los átomos del material receptor y de esa manera transfiere su energía causando ionización durante la trayectoria que recorre. La RI impartida por partículas beta es utilizada en tratamientos de radioterapia interna (braquiterapia) y como emisión de radiación indirecta durante una tomografía (Attix, 1986; ATSDR, 1999; ACS, 2015).

Se sabe que las dosis altas de RI (>100 mGy) causan efectos deleterios en humanos, incluyendo cáncer. Actualmente, los efectos por la exposición a dosis bajas de radiación ionizante, permanecen en constante discusión, ya que los estudios realizados hasta la fecha son controversiales. Sin embargo, se conoce que la radiación puede causar un daño biológicamente relevante o aumentar la predisposición a patologías como el cáncer (Brenner *et al.*, 2003).

Desde los años 70's, la comunidad de protección ante la radiación ha estimado el riesgo de dosis bajas por la extrapolación del riesgo evaluado a dosis altas, usando el modelo líneal sin umbral (LNT). La relación del modelo LNT asume que la respuesta celular opera eficientemente igual a dosis altas y a dosis bajas, lo que implica una proporcionalidad entre la dosis y el riesgo de cáncer. Este enfoque está basado en que la relación entre la dosis y el daño al DNA *in vivo* parece líneal desde la dosis de 0.001-100 Gy; lo cual considera que cada DSB en el DNA tiene la misma probabilidad de inducir transformación de la célula, independientemente

de la cantidad de DSB's que se encuentren simultáneamente en la célula; y que cada célula transformada tiene la misma probabilidad de generar un cáncer invasivo, independientemente de la dosis que se liberó en el tejido (Tubiana *et al.*, 2009).

En este contexto, Brenner y colaboradores (2003) han descrito cinco posibles modelos con extrapolaciones de datos epidemiológicos: a) el primer modelo propone una relación lineal sin umbral que corresponde a una curva dosis-respuesta; b) el segundo modelo esquematiza una curva decreciente, dicha respuesta celular puede deberse a un efecto de hipersensibilidad en una determinada cantidad de células o individuos del total de la muestra, a un efecto de radioresistencia, por adaptación o por mecanismos de reparación en extremo eficientes, o por efecto "bystander", provocado porque las células irradiadas excretan factores que se difunden a células vecinas que no se expusieron a RI, generando un daño en éstas solo por comunicación celular; c) el tercer modelo describe una curva sin umbral desde el cual se podrá observar un efecto; d) el cuarto modelo indica que existe un umbral desde el cual se podrá observar un efecto; y por último e) el quinto modelo asume una respuesta de hormesis, que a partir de una primera dosis de RI impartida, se reduce la probabilidad de incidencia de algunos efectos adversos en una exposición subsecuente.

El análisis de los cromosomas dicéntricos se ha utilizado desde hace más de 40 años en la dosimetría biológica para evaluar el daño que la RI provoca en el material genético. Dicha prueba se ha convertido en la prueba estándar para la evaluación de la exposición accidental a RI (dosis altas), en el marco de los programas de protección radiológica. En los últimos años se ha demostrado que el ensayo de MN es un buen dosímetro biológico por exposición a RI, importante clastógeno y por lo tanto inductor de MN, ésta ha sido una técnica ampliamente validada y estandarizada en el área de la radiobiología (IAEA, 2001; Vral *et al.*, 2011).

En este estudio se evaluó el efecto genotóxico de dosis bajas de RI mediante la frecuencia de MN y se encontró que la exposición a RI impartida una sola vez (dosis única), no aumentó los MN en las líneas celulares utilizadas. Sin embargo, con exposiciones repetidas se observaron diferencias en la sensibilidad a la RI dependiente del genotipo, siendo más sensible la línea celular heterociga para el gen *ATM*. Encontramos que la frecuencia de MN aumentó a partir de la dosis de 100 mGy en ambas líneas celulares. Cabe señalar que las dosis repetidas de 100 mGy, provocaron daño probablemente debido a la acumulación de la dosis, que fue equivalente a 300 mGy. No obstante, de acuerdo a la UNSCEAR (2012), ésta no es considerada como una exposición a dosis baja.

Tomando en cuenta que la funcionalidad de la proteína ATM en las células heterocigotas está comprometida, es probable que no fueran capaces de sensar el daño, dejando fragmentado el DNA y manifestándose como un aumento en la frecuencia de MN después de una división celular, tras la exposición a dosis bajas de RI de manera repetida.

La ausencia de daño en la línea celular heterocigota con una dosis única, podría deberse a que aún con una baja funcionalidad de la proteína ATM, la célula es capaz de iniciar cascadas de señalización alternas que contribuyen a mantener la integridad del DNA.

Por otro lado, en ocasiones los efectos provocados por la RI son cambios celulares de respuesta rápida y sensibles, por ejemplo, la fosforilación de la histona H2AX (γ -H2AX) se produce rápidamente por acción de la proteína ATM en respuesta a la presencia de DSB en el DNA y se plantea que es una señal clave para reclutar enzimas de reparación a estos sitios. Sin duda, el motivo de las diferencias en la respuesta, es multifactorial, pero sigue siendo esencial la identificación y validación de las pruebas de funcionalidad que integran estas respuestas; en el caso de nuestro estudio, la proteína γ -H2AX se utilizó como un marcador indirecto de rupturas en el DNA provocadas por la RI. La formación de γ -H2AX ha sido utilizada para medir la sensibilidad del tejido normal a la RI y la radiosensibilidad tumoral. Se ha observado que dosis entre 10 y 20 Gy de RI

generan un aumento considerable de la fosforilación de H2AX como respuesta a la exposición (Olive *et al.*, 2003).

En el presente estudio se emplearon dosis bajas de RI en la escala de mGy (25, 50 y 100) y no se observaron cambios en la fosforilación de esta proteína. Las razones por las que no se pudo evidenciar este aumento en la fosforilación de H2AX, podría deberse a que no se generaron DSB por la exposición a dosis bajas de RI. No obstante, cabe señalar, que la proteína γ -H2AX depende principalmente de la función de la proteína ATM. Como se mencionó anteriormente, si dicha proteína no se encuentra funcional en las células por algún mecanismo genético, es de esperarse que no se genere la respuesta necesaria para detectar el daño, lo que probablemente sería el caso del modelo celular utilizado en este estudio. Sin embargo, tampoco se puede descartar que otra de las razones, sea porque el tiempo post-irradiación no fue el idóneo para observar una respuesta.

Dado que se ha observado que después de algunas divisiones celulares, se formaban casi la misma cantidad de focos de γ -H2AX en las células irradiadas, pero más MN y células apoptóticas que en las células no irradiadas, sugiriendo que las células que no repararon las DSB son eliminadas del cultivo celular. Por lo que otra explicación a la ausencia de γ -H2AX es que en nuestro ensayo, las células tuvieron el tiempo suficiente para activar sus mecanismos de reparación del daño al DNA causado por la RI, sugiriendo que la falta de reparación de DSB's no incrementó el riesgo genotóxico por la exposición a bajas dosis de RI, pero es probable que activara un mecanismo alterno de protección para reducir el daño (Rothkamm y Löbrich, 2003).

Rothkamm y Löbrich (2003), evaluaron la formación de focos de γ -H2AX en fibroblastos primarios humanos de pulmón y piel, mediante inmunofluorescencia, 3 minutos después de la exposición a 0.2 y 2 Gy de rayos X encontrando un aumento de focos lo cual es notable evidencia tanto de que existe una correlación dosis-respuesta entre el número de focos y la inducción de DSB en el DNA

provocadas por la RI, como de que la desfosforilación de γ -H2AX en el sitio de la ruptura coincide en temporalidad con la reparación de ésta.

Un mecanismo de reparación acelerado evita que se pueda observar a γ -H2AX en los tiempos analizados, sería interesante analizar la proteína con tiempos de recuperación más cortos, lo anterior con la finalidad de comprobar si realmente es efecto de la mutación o por la ventana de tiempo en la que se analizó la proteína. Otra posibilidad es realizar la evaluación con otra técnica, una de las técnicas podría ser la inmunofluorescencia, tal como lo describe Borràs y colaboradores (2015), la detección de γ -H2AX mediante las técnicas de citometría de flujo e inmunofluorescencia puede arrojar resultados reproducibles. Aunque los investigadores opinan que con la técnica de citometría de flujo se obtienen mejores resultados con dosis altas de RI, ya que con la inmunofluorescencia, es posible que los focis se sobrelapen debido al daño extenso que provocan las dosis altas de RI lo que hace más difícil su conteo y da como resultado una subestimación del daño. Por otro lado, cuando las dosis son bajas, la detección y el conteo de focis mediante inmunofluorescencia es más preciso que con la citometría de flujo.

Nuestros resultados muestran que las dosis bajas de RI no generaron citotoxicidad, muerte celular por apoptosis, ni por necrosis, en ninguna de las dosis utilizadas, probablemente debido a que éstas no son suficientes para generar un daño celular. De igual manera Evans y colaboradores (2001) observaron que la supervivencia celular disminuyó solo cuando se expusieron a dosis mayores de 500 mGy en dos líneas celulares de linfoblastos (una de ellas radiosensible por mutaciones en el gen p53). Suzuki y colaboradores (2001) también postularon que las dosis de RI <1 Gy en células diploides normales (HE49), no provocan muerte celular cuando su estudio se llevó a cabo con dosis de 0.01-6 Gy, los autores también observaron que la proliferación celular se aumentó a las dosis de 20 y 50 mGy de RI posiblemente por la activación de genes que estimulan el crecimiento y la proliferación. Con nuestras condiciones, no se observó alteración en la sobrevivencia celular o en la proliferación y se mantuvo sin diferencias.

Se sabe que la RI induce DSB en el DNA y que puede causar peroxidación lipídica y oxidación de proteínas en la membrana celular, el citoplasma y el núcleo, por lo tanto, son activadas múltiples vías de transducción de señales simultáneamente. Una de las vías que se activan en la célula es mediada por la proteína p53, ésta es producto de un gen supresor de tumores que dentro de sus funciones se encuentra el arresto del ciclo celular, apoptosis, reparación del daño al DNA y senescencia celular prematura (Suzuki *et al.*, 2001).

En células normales la proteína p53 se encuentra inactiva, en bajas concentraciones y se degrada rápidamente. Sin embargo, ante un estímulo genotóxico o de estrés, los niveles de ésta aumentan debido a su estabilización por modificaciones postraduccionales. Diversos estudios han mostrado que los niveles de la proteína p53 aumentan a partir de las 3 horas después de un estímulo genotóxico o de estrés celular, alcanzando su pico máximo a las 12-24 horas (Salazar *et al.*, 1997; Liang y Clarke, 2001; Lacroix *et al.*, 2006). Sería interesante evaluar los niveles de la proteína p53 en condiciones que incluyan estos cursos temporales.

En nuestro trabajo, en las células heterocigas para el gen *ATM* aumentaron los niveles de la proteína p53 en la condición de dosis repetidas, probablemente estas células pueden inducir otras vías de respuesta al daño al DNA, como se mencionó anteriormente. A diferencia de la proteína γ -H2AX, la proteína p53 puede ser activada por la proteína ATM y por la proteína caseína cinasa 2 (CK2) (Sancar *et al.*, 2004; Shiloh y Ziv, 2013). Por lo tanto, sugerimos que alguna vía alterna se activó para hacer frente al daño, ya que se observó un aumento significativo en los niveles de la proteína p53 en la exposición a RI con dosis repetidas (3 veces, una cada 24 hrs).

Se ha observado que la proteína p53 se acumula y se activa después de la RI y actúa como un regulador de la transcripción. Además, se ha demostrado que la fosforilación juega un papel crucial en la regulación de la acumulación y de la actividad de p53 y las proteínas ATM y CHK2/Cds1, las cuales son proteínas cinasas, fosforilan a las serinas 15 y 20 de p53. Suzuki y colaboradores (2001), encontraron que la acumulación de la proteína p53 no ocurre con dosis menores a

0.5 Gy de rayos X, indicando que es dependiente principalmente de las rupturas en el DNA, pero con una dosis de 0.1 Gy de rayos X produjo aproximadamente cinco DSB iniciales por núcleo que fueron reparadas dentro de los 10 min de la irradiación, mientras que las SSB en el DNA fueron reparadas en un tiempo menor (Suzuki *et al.*, 2001). Al igual que en nuestros resultados de citotoxicidad, que sugiere que la mayoría del daño es reparable. Aunque es difícil estimar el número exacto remanente de rupturas en el DNA posterior a la reparación, las células irradiadas con 0.1 Gy en nuestro estudio pudieron no haberse reparado o haberse reparado ineficientemente, lo cual en el mejor de los casos, la proteína p53 ejercería una serie de funciones necesarias para la integridad de la célula y su DNA, ya que es la encargada de detener el ciclo celular si la célula se encuentra amenazada por un agente genotóxico, provocar apoptosis o inducir la transcripción de genes necesarios para la reparación del daño (Suzuki *et al.*, 2001).

Se ha observado que la colisión de un electrón producido por una partícula beta es más eficiente al producir genotoxicidad, evaluada mediante aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, ya que una colisión de partículas beta provocó dos lesiones, a diferencia de una colisión de rayos X (Vulpis, 1984). El autor sugiere que la diferencia entre la cantidad de aberraciones cromosómicas provocadas por 0.25-7 Gy de partículas beta y rayos X, refleja las diferencias en la LET de ambos tipos de radiación. Sus resultados muestran que las partículas beta fueron más efectivas que los rayos X, especialmente en exposiciones bajas. Bajo el contexto anterior, planteamos que las partículas emitidas por la fuente de radiación del presente trabajo podrían ser comparables con otros estudios de RI.

En resumen, con base en los datos obtenidos proponemos que la proteína H2AX no se fosforiló debido a que la proteína ATM, responsable de dicho proceso funciona deficientemente y probablemente las células afectadas tuvieron que depender de mecanismos alternos, como lo es la activación de p53. Por lo tanto, sugerimos que las células con estatus génico normal, no requirieron la activación

de la proteína p53, debido a que la proteína ATM se encuentra funcional para iniciar el mecanismo de reparación correspondiente, una vez que γ -H2AX se acumuló en los sitios afectados por la RI.

Los resultados obtenidos son relevantes debido a que las personas heterocigotas para el gen *ATM*, son radiosensibles y presentan un 8% de probabilidad de padecer cáncer de mama, y dicho porcentaje se podría elevar. Si bien en nuestro estudio no se observó radiosensibilidad por dosis bajas de RI con un esquema de dosis únicas en las células heterocigotas para el gen *ATM*, existen otros factores que pudieran influir en la radiosensibilidad, como factores genéticos por la presencia de alteraciones en genes de susceptibilidad al cáncer (p53 y BRCA1). Aunque también se debería considerar la exposición ambiental a diversos xenobióticos que podrían potenciar los efectos genotóxicos de la RI.

VIII. CONCLUSIÓN

Se concluye que bajo nuestras condiciones experimentales, las dosis bajas de RI no fueron de relevancia biológica, ya que no se detectaron DSB mediante la fosforilación de la proteína H2AX.

Sin embargo, las células heterocigas para el gen *ATM* mostraron más sensibilidad a los efectos genotóxicos de la RI con dosis repetidas, sugiriendo un potencial riesgo para las personas con este estatus génico que se exponen a RI, de desarrollar diversos tipos de cáncer.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

Las dosis bajas de RI utilizadas en este estudio, bajo un esquema de dosis única:

- No fueron citotóxicas, no indujeron apoptosis celular y necrosis, ni alteraron la proliferación celular en las células utilizadas.
- No activaron a la proteína γ -H2AX en las células utilizadas.
- No incrementaron los niveles de la proteína p53 en las células utilizadas.

Las dosis bajas de RI utilizadas en este estudio, bajo un esquema de dosis repetidas:

- No fueron citotóxicas, no indujeron apoptosis celular y necrosis, ni alteraron la proliferación celular en las células utilizadas.
- Generaron genotoxicidad, mostrando mayor sensibilidad las células heterocigotas para el gen *ATM* con un aumento en la frecuencia de MN, gemaciones, puentes nucleoplásmicos, apoptosis y necrosis, a partir de la dosis de 50 mGy.
- No activaron a la proteína γ -H2AX en las células utilizadas.
- Incrementaron los niveles de la proteína p53 en las células heterocigotas para el gen *ATM*.

X. REFERENCIAS

- ACS.** (2015). Radioterapia interna (braquiterapia). American Cancer Society. Atlanta, Georgia. [Consultado en junio de 2016]. Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/servicios/tratamientosyefectossecundarios/radioterapia/radioterapia-una-guia-para-los-pacientes-y-sus-familias-internal-radiation-therapy>
- Ahmed M., Rahman N.** (2006). ATM and breast cancer susceptibility. *Oncogene*, 25:5906-5911.
- Alarcon-Vargas D., Ronai Z.** (2002). p53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis*, 23(4):541-547.
- Arce C., Bargalló E., Villaseñor Y., Gamboa C., Lara F., Pérez-Sánchez V., Villarreal P.** (2011). Oncoguía: cáncer de mama. *Cancerología*, 6:77-86.
- Athma P., Rappaport R., and Swift M.** (1996). Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 92:130-134.
- ATSDR.** (1999). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Ionizing Radiation. *Toxicological Profiles*. Atlanta, Georgia: Public Health Services, 1-438.
- Attix F.** (1986). Introduction to radiological physics and radiation dosimetry. John Wiley & Sons, USA.
- Bakkenist C., Kastan M.** (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421:499-506.

- Bassal S.** y **El-Osta A.** (2005). DNA damage detection and repair, and the involvement of epigenetic states. *Human Mutation*, 25:101-109.
- Bernstein L.**, **WECARE Study Collaborative Group** & **Patrick Concannon** (2017). ATM, radiation, and the risk of second primary breast cancer, *International Journal of Radiation Biology*, 1:1-8.
- Bonner W.**, **Redon C.**, **Dickey J.**, **Nakamura A.**, **Sedelnikova O.**, **Solier S.**, **Pommier Y.** (2008). γ -H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(12):957-967.
- Borràs M.**, **Armengol G.**, **De Cabo M.**, **Barquinero J.**, **Barrios L.** (2015). Comparison of methods to quantify histone H2AX phosphorylation and its usefulness for prediction of radiosensitivity. *International Journal of Radiation Biology*, 91(12):915-24.
- Brenner D.**, **Doll R.**, **Goodhead D.**, **Hall E.**, **Land C.**, **Little J.**, **Lubin J.**, **Preston D.**, **Preston J.**, **Puskin J.**, **Ron E.**, **Sachs R.**, **Samet J.**, **Setlow R.**, **Zaider, M.** (2003). Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24):13761-13766.
- Broeks A.**, **Russell N.**, **Floore A.**, **Urbanus J.**, **Dahler E.**, **van 'T Veer M.**, **Hagenbeek A.**, **Noordijk E.**, **Crommelin M.**, **van Leeuwen F.**, **van 'T Veer L.** Increased risk of breast cancer following irradiation for Hodgkin's disease is not a result of ATM germline mutations. *International Journal of Radiation Biology*. 76(5): 693-698.
- Chun H.**, **Gatti R.** (2004). Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair*, 3:1187-1196.

Clouaire T., Marnef A., Legube G. (2017). Taming tricky DSBs: ATM on duty. *DNA Repair*, 56:84-91.

Coriell Institute (2015). Coriell Institute for Medical Research. [Consultado en Marzo de 2015]. Disponible en: <https://catalog.coriell.org/>

Drooger J., Hooning M., Seynaeve C., Baaijens M., Obdeijn I., Sleijfer S., Jager A. (2015). Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: A critical review of the literature. *Cancer Treatment Reviews*, 41:187-196.

Eastmond D., Tucker J. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 13(1):34-43.

Evans H., Horng M-F., Evans T., Jordan R., Schwartz J. (2001). Genotoxic effects of high-energy iron particles in human lymphoblasts differing in radiation sensitivity, 156:186-194.

Fenech M., Morley A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147:29-36.

Fenech M., Morley A. (1985). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, 161:193-198.

Fenech M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455:81-95.

Fenech M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*, 7(22):1128-1137.

Fenech M., Chang W., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534:65-75.

Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan, A., Surralles J., Crott J., Parry J., Norppa H., Eastmond D., Tucker J., Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1):125-132.

Gemenetidis E., Gammon L., Biddle A., Emich H., Mackenzie I. (2015). Invasive oral cancer stem cells display resistance to ionizing. *Oncotarget*, 6(41): 43964- 43977.

González A. (1994). Los efectos biológicos de las dosis bajas de radiación ionizante: Una visión más completa. *Boletín del Organismo Internacional de Energía Atómica*, 4:37-45.

Harley N. (2008). En: Klaassen C. Casarett And Doull's Toxicology The Basic Science Of Poisons. 7 ed. Kansas: McGraw Hill. p. 1056.

Harper J., Elledge S. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*, 28(5):739-745.

Haton C., François A., Vandamme M., Wysocki J., Griffiths N., Benderitter M. (2007). Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure. *Radiation Research*, 167:445-453.

- Hirayama R.**, Ito A., Noguchi M., Matsumoto Y., Uzawa A., Kobashi G., Okayasu R., Furusawa Y. (2013). OH Radicals from their indirect actions of X-Rays induce cell lethality and mediate the majority of the oxygen enhancement effect. *Radiation Research*, 180:514-523.
- Hoel D.** (2013). En: Klaassen C. Casarett And Doull's. *Toxicology the basic science of poisons*. 8 ed. Kansas: McGraw Hill. p. 1113-1114.
- Hu X.**, Paul A., Wang B. (2012). Rap80 protein recruitment to DNA double-strand breaks requires binding to both small ubiquitin-like modifier (SUMO) and ubiquitin conjugates. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(30):25510-25519.
- IAEA.** (2001). International Atomic Energy Agency. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment: a manual*. Vienna. p. 127.
- IARC.** (2012). International Agency for Research on Cancer. *A review of human carcinogens: Part D: Radiation*. Lyon, France: Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1:1-362.
- Ivashkevich A.**, Redon C., Nakamura A., Martin R., Martin O. (2012). Use of the γ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, 327:123-133.
- Jeggo P.**, Lavin M. (2009). Cellular radiosensitivity: How much better do we understand it?. *International Journal of Radiation Biology*, 85(12):1061-1081.
- Kan C.**, Zhang J. (2015). BRCA1 mutation: A predictive marker for radiation therapy?. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 93(2):281-293.

- Koturbash I.**, Rugo R., Hendricks C., Loree J., Thibault B., Kutanzi K., Pogribny I., Yanch J., Engelward B., Kovalchuk. (2006). Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue *in vivo*. *Oncogene*, 25:4267-4275.
- Lacroix M.**, Toillon RA., Leclercq G. (2006). p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, 13:293-325.
- Lavin M.**, Scott S., Gueven N., Kozlov S., Peng C., Chen P. (2004). Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair*, 3:1197-1205.
- Liang S-H.**, Clarke M. (2001). Regulation of p53 localization. *European Journal of Biochemistry*, 268:2779-2783.
- McKinnon P.** (2004). ATM and ataxia telangiectasia. *European Molecular Biology Organization*, 5(8):772-776.
- Menon V.**, Povirk L. (2014). 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: Tchelebi L., Ashamalla H., Graves P. Mutant p53 and MDM2 in cancer. *Sub-Cellular Biochemistry*, 85:133-159.
- Montoro A.**, Sebastià N., Rodrigo R., Hervás D., Nacher O., Martí L., Jambrina E., Sarrias A., Pérez-Calatayud J., García T., Gras P., Villaescusa J., Soriano J., León Z. (2014). Evaluación de la radiosensibilidad del personal sanitario en procedimientos de tratamiento o diagnóstico médico con radiaciones. *Seguridad y Medio Ambiente*, 34(134). [Consultado en agosto de 2015].

Disponible

en:

<http://www.seguridadypromociondelasalud.com/n134/es/articulo2.html>

OMS. (2015). Organización Mundial de la Salud. Cáncer. [Consultado en mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>

Paul T., Rogakou E., Yamazaki V., Kirchgessner C., Gellert M., Bonner W. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10:886-895.

Povirk L. (1996). DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 355(1-2):71-89.

Preston D., Ron E., Tokuoka S., Funamoto S., Nishi N., Soda M., Mabuchi K., Kodama K. (2007). Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. *Radiation Research*, 168(1):1-64.

Rothkamm K., Löbrich M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9):5057-62.

Salazar AM., Ostrosky-Wegman P., Menéndez D., Miranda E., García-Carrancá A., Rojas E. (1997). Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mutation Research*. 381:259-265.

Sancar A., Lindsey-Boltz L., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1):39-85.

Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D., Smith S., Uziel T., Sfez S., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali SR., Simmons A., Clines G., Sartiel A., Gatti R., Chessa L., Sanal O., Lavin M., Jaspers N., Taylor A., Arlett C., Miki T., Weissman S., Lovett M., Collins F., Shiloh Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268(5218):1749-1753.

Shiloh Y., Ziv Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Molecular Cell Biology*, 14:197-210.

Sudprasert W., Navasumrit P., Ruchirawat M. (2006). Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209:503-511.

Suzuki K., Kodama S., Watanabe M. (2001). Extremely low-dose ionizing radiation causes activation of mitogen-activated protein kinase pathway and Enhances proliferation of normal human diploid cells. *Cancer Research*, 61:5396-5401.

Swift M., Sholman L., Perry M., Chase C. (1976). Malignant neoplasms in the families of patients with ataxia-telangiectasia. *Cancer Research*, 36(1):209-15.

Swift M., Reitnauer P., Morrell D., Chase C. (1987). Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *The New England Journal of Medicine*, 316(21):1289-1294.

Swift M., Morrell D., Massey R., Chase C. (1991). Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *The New England Journal of Medicine*, 325(26):1831-1836.

Tubiana M., Feinendegen L., Yang C., Kaminski J. (2009). The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. *Radiology*, 251(1):13-22.

UNSCEAR. (1994). Sources and effects of ionizing radiation. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. New York.

UNSCEAR. (2012). Biological mechanisms of radiation actions at low doses. Report of the United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation to the General Assembly. New York.

Villegas M. (2009). Daño inducido en DNA por exposición a bajas dosis de radiación ionizante de baja y alta transferencia lineal de energía. Tesis de maestría en ciencias (física médica). UNAM.

Vral A., Fenech M., Thierens H. (2011). The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionizing radiation exposure. *Mutagenesis*, 26(1):11-17.

Vulpis N. (1984). The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by *in vitro* irradiation with β -particles from tritiated water. *Radiation Research*, 97(3);511-518.

Watters G., Smart D., Harvey J., Austin C. (2009). H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679(1-2):50–58.

Watts J., Morley M., Burdick J., Fiori J., Ewens W., Spielman R., Cheung V. (2002). Gene expression phenotype in heterozygous carriers of ataxia telangiectasia. *The American Journal of Human Genetics*, 71(4):791-800.