



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DE LA PROTEINA P53 POR EXPOSICION A
RADIACION IONIZANTE.

796512

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

F I S I C A

P R E S E N T A :

CAROLINA SALVADOR MORALES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA ESTER BRANDAN SIQUES



2001

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
 REPUBLICA NACIONAL
 GOBIERNO FEDERAL
 MEXICO

DR. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
 Profesora de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
 "Expresión de la proteína P53 por exposición a radiación ionizante"

Elaborado por Carolina Salvador Morales

Identificación número de cuenta 9219070-4, pasante de la carrera de Física

El presente trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

DRA. MARIA ESTER BRANDAN SIQUES

Propietario

DRA. ANA MARIA SALAZAR MARTINEZ

Propietario

DRA. MARIA ISABEL GAMBOA DE BUEN

Presidente

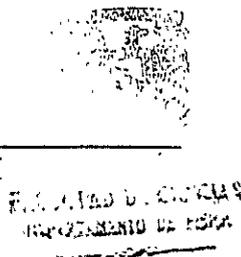
DRA. GERTRUDIS HORTENSIA GONZALEZ GOMEZ

Presidente

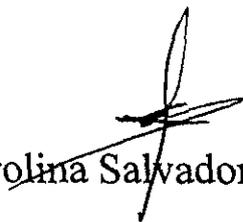
DR. JORGE RICKARDS CAMPBELL

Consejo Departamental de Física

DRA. PATRICIA GOLDSTEIN MENCACHE
 Coordinadora de Licenciatura



La Parte biológica de este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), bajo la codirección de la Dra Ana María Salazar Martínez.


Carolina Salvador Morales

Dedico este trabajo a:

A la memoria de mi Padre

A mi madre, la persona más importante en mi vida

A mi hermana Claudia Salvador Morales quien toda la vida me ha brindado su apoyo
incondicional

A mi muy querido amigo y profesor Dr. Luis Fernando Magaña Solís quien con su actitud
día a día me ha enseñado que el éxito no es una opinión exterior sino un estado interior

A mi amigo y profesor César Gustavo Ruiz Trejo quien con sus consejos me ha enseñado a
crecer cada vez más como ser humano

A Beatriz Talayero Gárate por compartir conmigo la realización de mis metas

A Hilda Josefina Mercado Uribe quien a lo largo de todo este tiempo me ha mostrado su
amistad y su apoyo

A mi muy amado Toti por todo el amor y ternura que me ha dado

A mis amigos: Silvia, Claudia, Hilda, Beatriz, Tutzuy, Carmen, Karina, Alejandra, Diego,
César y Miguel por su invaluable amistad

A la Fundación Telmex por ser una Institución que impulsa y reconoce el esfuerzo
académico en México

A la Universidad Nacional Autónoma de México quien me acogió en sus entrañas cuando
apenas era una adolescente y de quien ahora que soy adulta me siento profundamente
orgullosa de haberme formado en ella

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras las Dras. Ana María Salazar Martínez y María Ester Brandan Siqués por sus acertadas sugerencias para la realización de este trabajo.

A la Dra Patricia Ostrosky Wegman por abrirme las puertas de su laboratorio y por sus comentarios acerca de este trabajo.

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental (Daniel Menéndez, Monserrat Sordo, Aurora Castillo, Beatriz Talayero, Tutzuy Ramirez, Carmen Acuña, Mayra, Andrea Díaz y Andres Bendesky) por brindarme en todo momento su apoyo.

A la M en C Ana Elena Buenfil Burgos por sus valiosas sugerencias.

A la M en C (Física Médica) Guerda Massillon Jacques Louis por su ayuda en la edición de las figuras de esta tesis.

Al M. en C Epifanio Cruz y al Fis. Francisco Flores, por todas las facilidades otorgadas para el uso del irradiador Gammacell-200 del Instituto de Ciencias Nucleares.

Al instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), al Instituto de Física (UNAM) y al Instituto de Ciencias Nucleares (ICN) por permitirme usar sus instalaciones.

A la Dirección de Apoyo a Proyectos Académicos (DGAPA -IN101399- IN211599 y Conacyt J31085-M) y a la Fundación Telmex por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

CONTENIDO

Introducción.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO I

Conceptos básicos de Física de Radiaciones y de Dosimetría

1.1 Radiación ionizante.....	4
1.2 Interacción de los fotones con la materia	
1.2.1 Efecto Compton.....	5
1.2.2 Efecto Fotoeléctrico	6
1.2.3 Producción de Pares	6
1.3 Atenuación y absorción de la radiación electromagnética	7
1.4 Principios de dosimetría	
1.4.1 Definiciones	8
1.4.2 Dosímetros	9
1.4.2.1 Película de Tinte Radiocrómico.....	11
1.4.2.2 Dosímetros TL	12
1.4.3 Equilibrio de partícula cargada	14
1.5 Acción directa e indirecta de la radiación con la materia viva	14

CAPÍTULO II

Conceptos básicos de Biología celular

2.1 Estructura y composición química de una célula eucarionte.....	22
2.2 Control del ciclo celular	24
2.3 Efecto que produce la radiación ionizante en el material genético	25
2.3.1 Aberraciones cromosómicas estructurales	25
2.4 El gen p53.....	26
2.4.1 Funciones de p53	27
2.4.1.1 Arresto del ciclo en la fase G ₁	27
2.4.1.2 Arresto del ciclo celular en el punto de control G ₂	27
2.4.2 Apoptosis mediada por P53	28
2.4.3 Detención del ciclo celular o muerte celular, una decisión de p53.....	29

CAPÍTULO III

Fundamentos para el análisis de la proteína P53

3.1 Principio fotográfico	37
3.1.1 Formación de la imagen latente	37
3.1.2 Proceso de revelado	38
3.1.3 Proceso de fijación	39
3.2 Sensitometría de una película radiográfica	39
3.3 Componentes de la curva característica	41

CAPÍTULO IV

Diseño experimental

4.1 Diseño Experimental (Parte física)	
4.1.1 Caracterización dosimétrica del irradiador Gammacell-200	46
4.1.2 Irradiación de los dosímetros TLD-100.....	46
4.1.3 Irradiación de la película HD810.....	47
4.2 Diseño experimental (Parte biológica)	
4.2.1 Cultivo de linfocitos.....	48
4.2.2 Extracción de la proteína	49
4.2.3 Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford.....	49
4.2.4 Detección de la expresión de la proteína P53 en linfocitos de sangre periférica humana por medio de la técnica de Western Blot.....	49
4.3 Sensitometrías	49

CAPÍTULO V

Resultados

5.1 Resultados de la caracterización dosimétrica del irradiador Gammacell-200.....	56
5.2 Resultados de las sensitometrías	56
5.3 Resultados (Parte Biológica).....	61
5.3.1 Efectos de la radiación ionizante (rayos gamma de 1.25 MeV) en linfocitos humanos.....	61

INTRODUCCIÓN

El cáncer en la actualidad es una de las enfermedades que presenta un alto índice de mortalidad en México y en el mundo. En la última década esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada por las Ciencias Biomédicas.

La hipótesis genética del cáncer implica que una masa tumoral se produce por la expansión clonal de una única célula progenitora que ha sufrido un daño genético. Este daño genético (o mutación) puede ser adquirido (en las células somáticas) por la acción de agentes ambientales como radiación, productos químicos y virus o puede ser heredado en la línea germinal (Cotran, 1996).

Se plantea que una célula cancerosa se forma por múltiples alteraciones genéticas, tales como el daño en genes claves que regulan el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Existen tres clases de genes reguladores: los proto-oncogenes (promotores del crecimiento), los genes supresores del cáncer y los genes que participan en la reparación de ADN (Hesketh, 1997).

Uno de los genes más estudiados en los últimos años es el gen supresor de tumores llamado p53. La importancia de su estudio radica en el hecho de que este gen está mutado en aproximadamente el 70% en el cáncer de colon, en el 30% a 50% en el cáncer de mama y el 50% en el cáncer de pulmón (Cotran, 1996). p53 participa en muchas funciones celulares como reparación de ADN, apoptosis, diferenciación y arresto del ciclo celular. Por todo esto, se le ha considerado como el guardián del genoma humano (Lane, 1992).

La proteína P53 es un factor de transcripción específico que, para llevar a cabo su actividad supresora requiere la activación de otros genes (Pietenpol et al., 1994). Algunos de estos genes se encargan de detener el ciclo celular en los puntos de control G₁/S y G₂/M, otros se encargan de efectuar el proceso de apoptosis que se lleva a cabo en las células que han sufrido un daño irreparable en su ADN. Estos procesos regulados por P53 sirven para controlar la población de las células normales (Donehower y Bradley, 1993; Ko y Prives, 1996; Levine, 1997).

En numerosos estudios se ha mostrado una rápida acumulación de la proteína P53 en los núcleos de linfocitos humanos que han sido irradiados o tratados con agentes físicos y químicos que dañan el ADN (Kastan et al., 1992). Este tipo de células ha sido irradiado por diferentes tipos de radiación ionizante (RI) tales como partículas cargadas (electrones), rayos X, rayos gamma y neutrones entre otros.

La RI es un agente físico que produce como daño primario el rompimiento de una o ambas cadenas del ADN (Cole et al., 1975; Matsudaire et al., 1977). Este daño puede ser completamente reparado en un lapso de 1 a 2 hr en células de mamíferos (Turner et al., 1981; Bryant et al., 1984; Singh et al., 1988; Mayer et al., 1989). Otro mecanismo por el cual la RI induce daño celular es a través de la producción de oxígeno libre y radicales hidroxilos, los cuales a su vez producen daño químico oxidativo en muchos constituyentes

de la célula, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Han et al.,1995). Si estas lesiones no son reparadas, pueden producirse aberraciones cromosómicas y deleciones (Hutchinson, 1993).

La expresión del gen p53 se evalúa a través de la proteína P53 la cual puede ser evaluada a través de diferentes métodos como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y el método de inmunodetección (Western Blot). En este último se utiliza un anticuerpo que se acopla a las proteínas P53, las cuales son reconocidas por un segundo anticuerpo IgG acoplado a una enzima llamada peroxidasa, que en presencia de peróxido de hidrógeno, oxida al luminol, el cual emite luz por fluorescencia al decaer a su estado base.

En estudios de líneas celulares expuestas (HeLa y RKO⁺) a arsénico se encontraron diferencias individuales de expresión de la proteína P53. Estas diferencias también se observaron al tratar linfocitos humanos con arsénico (As) y actinomicina (AcD).

De ahí, el presente trabajo surge de la necesidad de entender si las diferencias observadas, en el patrón de expresión se deben a factores biológicos o si están influenciadas por factores físicos que intervienen en el proceso de detección de la proteína P53 como por ejemplo, el tiempo de exposición en el método quimioluminiscente y/o como el tiempo de revelado de la película radiográfica.

El objetivo general de este trabajo es estandarizar el proceso de detección de la proteína P53 en linfocitos humanos irradiados con rayos gamma de 1.25 MeV y tratados con AcD, para tratar de conocer la participación de factores físicos en el proceso de detección de la proteína P53. Para lograr este objetivo se realizó, en primer lugar, la caracterización dosimétrica de un irradiador de ⁶⁰Co, en segundo lugar se hizo el control de calidad del proceso quimioluminiscente y de revelado, y por último se hizo la comparación de los niveles de inducción de P53 entre los linfocitos irradiados y los tratados con AcD.

Se usaron rayos gamma de alta energía (1.25 MeV) para irradiar homogéneamente a los linfocitos humanos. Para la irradiación de dichas muestras se utilizó el irradiador Gammacell 200 del ICN de la UNAM. Para el control de calidad del proceso de revelado se hizo la sensitometría en dos tipos de películas autoradiográficas (Hiperfilm y Kodak).

En el primer capítulo de este trabajo se describen las principales formas de interacción de la radiación con la materia, así como los conceptos básicos relacionados con dosimetría de la radiación.

En el segundo capítulo se hace un recordatorio de la estructura de la célula, así como de las generalidades del gen p53.

En el tercer capítulo se establecen los fundamentos para el análisis de la proteína P53. También se hace una descripción del proceso fotográfico mediante el cual se desarrolla una

imagen latente en las emulsiones fotográficas, así mismo se describe la sensitometría de una película radiográfica.

En el capítulo cuarto se describe el método experimental de la parte física como de la parte biológica. La parte física comprende la realización de la dosimetría del irradiador Gammacell-200 para la irradiación de linfocitos de sangre periférica de humano, así como el establecimiento de un protocolo de trabajo para llevar a cabo la detección de la proteína P53. El método experimental correspondiente a la parte biológica consistió en realizar los cultivos de los linfocitos y la detección de la proteína P53 a través del método Western Blot.

En el capítulo cinco se muestran los resultados de la caracterización dosimétrica del irradiador, las curvas características de las películas Hiperfilm y Kodak procesadas con un revelador de dos temperaturas diferentes (20 °C y 27 °C) para diferentes tiempos de revelado. Además se muestra el cambio en la densidad óptica en las películas Hiperfilm y Kodak cuando se usa un revelador nuevo y usado. Con respecto a los resultados de la parte biológica, se presentan las bandas de inducción de la proteína P53 de los linfocitos de tres donadores sanos que fueron expuestos a diferentes dosis de radiación (2,4 y 6 Gy) y a una sola dosis de AcD (30 µg/ml). Para obtener estos resultados se aplicó un protocolo de trabajo para la detección de la proteína, el cual consistió en utilizar un tiempo de exposición de 30 minutos y dejar la placa en el revelador durante 2 minutos.

Por último en el capítulo seis y siete se hacen la discusión y conclusión de este trabajo.

CAPITULO I

Conceptos básicos de Física de Radiaciones y de Dosimetría

1.1 Radiación ionizante

La radiación ionizante es aquella con suficiente energía para extraer un electrón del átomo del medio con el que interacciona. Es en este momento cuando ocurre la ionización, que se produce un par de iones; el negativo (electrón que se desprende del átomo) y el positivo (átomo sin uno de sus electrones) (Attix, 1986).

Los tipos de radiación ionizante más importante son:

Rayos Gamma (γ). Los rayos gamma son emitidos desde el núcleo de algunos átomos inestables que se encuentran eliminando su exceso de energía o se producen en reacciones de aniquilación entre materia y antimateria.

Rayos X. Los rayos X son radiación electromagnética generada por partículas cargadas como el electrón, debido a un cambio entre niveles energéticos en las órbitas atómicas (llamados rayos X característicos o fluorescentes). Estos rayos también son creados por la aceleración de partículas cargadas al pasar por un campo eléctrico y al chocar con un blanco (rayos X continuos o Bremsstrahlung).

Electrones rápidos. A los electrones rápidos emitidos por el núcleo se les conoce como partículas betas. Estas partículas pueden ser positivas (positrones) o negativas.

Partículas Cargadas Pesadas (PCP). Las partículas cargadas pesadas son todas aquellas que tienen una masa mayor que la del electrón. Estas partículas, comúnmente son aceleradas en aceleradores electrostáticos (Van de Graff) o lineales. Sin embargo, existen PCP como las alfa que provienen de núcleos radiactivos.

Neutrones. Los neutrones son partículas que no tienen carga y que por lo tanto no pueden ser acelerados por un acelerador electrostático ni lineal.

Con el propósito de entender y diferenciar los mecanismos de interacción de la radiación ionizante con la materia, la radiación ionizante ha sido dividida en dos grandes grupos: Radiación Directamente Ionizante y Radiación Indirectamente Ionizante.

Radiación Directamente Ionizante. Son las partículas cargadas que transmiten directamente su energía a la materia a través de pequeñas interacciones coulombianas con los electrones y con los núcleos que la componen a lo largo de su trayectoria. Por ello, en la célula este tipo de radiación actúa directamente sobre moléculas tales como el agua y el oxígeno.

Radiación Indirectamente Ionizante. Son las partículas no cargadas, tales como rayos gamma, rayos x y neutrones, que ceden primero su energía a partículas cargadas de la materia mediante interacciones. Esto implica que la radiación indirectamente ionizante no produce cambios químicos y biológicos por sí misma, sino que, cuando es absorbida por el material que atraviesa en su camino, deposita en él su energía.

1.2 Interacción de los fotones con la materia

Los fotones son eléctricamente neutros y pierden su energía sólo cuando interactúan con la materia. La penetración del fotón en la materia se rige estadísticamente por la probabilidad de interacción por unidad de distancia recorrida. Dicha distancia depende de la composición del medio atravesado y de la energía del fotón.

El fotón, al interactuar con la materia, puede ser absorbido o dispersado con o sin pérdida de energía. Tal interacción es descrita por el efecto Compton, efecto fotoeléctrico y producción de pares.

1.2.1 Efecto Compton

La cantidad de energía que el fotón transfiere al electrón depende tanto de la energía $E_\gamma = h\nu$ del fotón incidente como del número atómico (Z) del material absorbente. Para fotones de energía media (desde 20 keV hasta 30 MeV), predomina el efecto Compton, en el cual el fotón choca con un electrón considerado como libre, cuya energía de amarre es mínima comparada con la energía del fotón. En este proceso, el fotón transfiere parte de su energía al electrón, el cual se desvía a un ángulo θ de su posición original, mientras que el fotón incidente a un ángulo ϕ de su trayectoria inicial (Fig 1). Energía y momento se conservan.

El análisis de la cinemática del proceso anterior, basado en la conservación del momento y la energía, determina tres ecuaciones que describen la energía y la dirección de las partículas después de la colisión:

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + (h\nu/m_0c^2)(1 - \cos\phi)} \quad (1)$$

$$T = h\nu - h\nu' \quad (2)$$

$$\cot\theta = \left(1 + \frac{h\nu}{m_0c^2}\right) \tan\left(\frac{\phi}{2}\right) \quad (3)$$

donde, $h\nu'$ es la energía del fotón dispersado, T es la energía cinética del electrón dispersado, y m_0c^2 (energía en reposo del electrón) es 0.511 MeV. T , $h\nu$, $h\nu'$, también están expresadas en MeV.

La fracción de energía que el fotón pierde durante este proceso y que le transmite al electrón, puede variar, de 0 al 80% de su energía inicial, dependiendo del ángulo de salida del fotón incidente y del ángulo del electrón expulsado de su órbita (Hall, 1994). Los electrones en movimiento, a su vez, pueden ionizar otros átomos del material absorbente, romper uniones químicas e iniciar procesos que finalmente producen daños biológicos (Hall, 1994).

Para medios de Z baja, tales como el carbono, aire, agua y tejido humano, el efecto Compton tiene una amplia región de acción (Fig 2).

1. 2. 2 Efecto Fotoeléctrico

Para fotones de baja energía (Fig 2), con mayor frecuencia ocurre el efecto fotoeléctrico. En éste, el fotón de energía $E_\gamma = h\nu$ choca con un electrón que está ligado a un átomo con energía de amarre E_b , como consecuencia este electrón sale con un ángulo θ respecto de la dirección del fotón incidente que es absorbido (Fig 3). Para conservar el momento, el átomo residual retrocede y su energía cinética T_a es prácticamente cero. Por lo tanto, la energía cinética transmitida al electrón, independiente del ángulo de dispersión θ , está dada por:

$$\begin{aligned} T &= h\nu - E_b - T_a \\ &\cong h\nu - E_b \end{aligned} \quad (4)$$

El espacio vacante dejado en la órbita del electrón puesto en movimiento, es llenado por otro electrón de una órbita más periférica y, en este proceso, se libera un fotón de energía que se conoce como característica, porque es la diferencia que existe entre la órbita del electrón expulsado y la órbita del electrón a la que llega. Dicha energía es característica del átomo en cuestión.

1.2. 3 Producción de Pares

La producción de pares es un proceso de absorción en el que se crean un positrón (+) y un electrón (-) a partir de la desaparición de un fotón incidente de energía $h\nu$ que interacciona con el campo de fuerza coulombiana de un núcleo atómico (Fig 4). Para que este proceso tenga lugar, dicho fotón debe tener una energía mayor que $2 m_0c^2$ (1.022 MeV). El positrón y el electrón tienen energías T^+ y T^- respectivamente y no necesariamente son las mismas, sin embargo su energía promedio se puede estimar con la ecuación 5.

Es importante mencionar que la producción de pares también puede ocurrir en el campo de un electrón atómico pero la probabilidad de que esto suceda es muy baja ya que la energía umbral necesaria para que tal evento ocurra es $4m_0c^2$.

$$\bar{T} = \frac{hv - 1.022MeV}{2} \quad (5)$$

Estas partículas cargadas que han recibido energía, pueden producir nuevas ionizaciones y en algún momento el e^+ se aniquilará, lo que da origen a 2 fotones de energía de 0.511 MeV. La presencia de producción de pares aumenta con la energía, este hecho lo hace ser el mecanismo por el cual se absorbe la mayor cantidad de número de fotones cuando la energía es muy alta.

1.3 Atenuación y absorción de la radiación electromagnética

Cuando la radiación gamma y los rayos X inciden sobre la materia, parte de los fotones son absorbidos por cualquiera de los procesos mencionados. La ecuación que describe la atenuación de los rayos gamma es la siguiente:

$$N = N_0 e^{-\mu x} \quad (6)$$

donde:

N_0 es el número de fotones incidentes

N es el número de fotones que se tiene después de atravesar un espesor x de material

X es el espesor del material atravesado por la radiación

μ es el coeficiente lineal de atenuación que representa la probabilidad total de interacción de una partícula por unidad de longitud que entra en un medio. Dicha probabilidad dependerá de la manera en que interactúa la radiación con el medio y esto se refleja en los coeficientes parciales de atenuación (Attix, 1996). μ está dado como:

$$\mu = \tau + \sigma + \kappa + \dots \quad (7)$$

donde:

τ , σ y κ son los coeficientes de atenuación por el efecto fotoeléctrico, Compton y producción de pares, respectivamente.

1.4 Principios de dosimetría

1.4.1 Definiciones

La dosimetría tiene como principal objetivo detectar y medir la energía que la radiación incidente imparte en la materia. Para su comprensión es importante introducir algunas cantidades, las cuales están dadas en términos del valor esperado para una esfera infinitesimal en el punto de interés. Tales cantidades son útiles para la descripción de la interacción del campo de radiación con la materia. Las cantidades son:

Kerma (K). El Kerma puede ser definido en términos de la energía transferida ϵ_{tr} (Attix, 1979, 1983) y la energía radiante R. La energía que la radiación ionizante imparte en un volumen V es:

$$\epsilon_{tr} = (R_{in})_u - (R_{out})_{nonr} + \Sigma Q \quad (8)$$

donde $(R_{in})_u$ = Energía radiante de las partículas no cargadas que entran en V

$(R_{out})_{nonr}$ = Energía radiante de las partículas no cargadas que salen de V, pero que no incluyen las pérdidas radiativas de energía cinética de las partículas cargadas mientras éstas se encontraban en V.

ΣQ = Es la energía neta que se deriva de las conversiones de masa en energía en V y viceversa ($m \rightarrow E$ positivo, $E \rightarrow m$ negativo).

La energía radiante está definida como la energía cinética de las partículas emitidas, transferidas o recibidas.

Con base en lo anterior, el kerma se define en un punto de interés P ubicado en un volumen V como:

$$K = \frac{d\epsilon_{tr}}{dm} \quad (9)$$

donde ϵ es el valor esperado de la energía transferida en un volumen finito V durante algún intervalo de tiempo, $d\epsilon_{tr}$ es el valor esperado de la energía transferida en un volumen infinitesimal dv en un punto P y dm es la masa de dv .

Dosis (D). El concepto fundamental de la dosimetría es la dosis. La dosis absorbida es una cantidad que puede ser definida a través de otra cantidad llamada dosis impartida ϵ . Ésta se define como la energía que permanece dentro de un volumen dado de materia con masa m después de que sobre ésta incide radiación ionizante. De aquí que la energía impartida por la radiación ionizante a un volumen V de materia con masa m está definida como:

$$\epsilon = (R_{in})_u - (R_{out})_u + (R_{in})_c - (R_{out})_c + \Sigma Q \quad (10)$$

donde: $(R_{in})_u$ es la energía radiante de las partículas no cargadas que entran a V
 $(R_{out})_u$ es la energía radiante de las partículas no cargadas que salen de V
 $(R_{in})_c$ es la energía radiante de las partículas cargadas que entran a V
 $(R_{out})_c$ es la energía radiante de las partículas que salen de V
 ΣQ es la energía neta que se resulta de las conversiones de masa en energía en V y viceversa ($m \rightarrow E$ Positivo, $E \rightarrow m$ negativo). Con base en lo anterior la dosis absorbida D en cualquier punto P dentro de V se define como:

$$D = \frac{d\epsilon}{dm} \quad (11)$$

El sistema internacional de unidades (SI) acepta al Gray (Gy) como la unidad de la dosis. Cabe mencionar que

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/Kg} = 6.24 \times 10^{18} \text{ eV/kg}$$

Tasa de Dosis (D). Es la dosis depositada por unidad de tiempo:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{d\epsilon}{dm} \right) \quad (\text{Gy/s}) \quad (12)$$

1.4.2 Dosímetros

Un dosímetro es un dispositivo que experimenta un cambio medible y reproducible al ser irradiado. A este cambio se le llama respuesta y su magnitud depende de la dosis de radiación impartida. El cambio en la respuesta debido a las diferentes dosis de radiación administrada, define la relación de dosis- respuesta.

Hasta el momento se conocen dos tipos de dosímetros, el absoluto y el secundario. El primer tipo, se caracteriza porque mide directamente la dosis depositada por la radiación en su volumen sensible. Este tipo de dosímetros no requiere una calibración radiológica. El segundo tipo, necesita para su uso ser calibrado radiológicamente con un dosímetro absoluto. Generalmente los dosímetros secundarios son más fáciles de manejar, entre éstos se puede mencionar a las películas de tinte radiocrómico (PTR) y los dosímetros termoluminiscentes (TL).

Se debe mencionar que no todos los instrumentos que son sensibles a la radiación ionizante pueden servir como dosímetros. Para que un material desempeñe la función de dosímetro debe cumplir con las siguientes características:

- *Intervalo útil de dosis.* El intervalo de dosis útil para un dosímetro depende de:
 - *Sensibilidad del dosímetro.* Ésta se define como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{dr}{dD_g}$$

donde r es la respuesta del dosímetro y D_g es la dosis absorbida por el mismo.

- *Límite inferior útil.* Es la dosis mínima que el dosímetro puede medir confiablemente.
- *Límite superior útil.* Es la máxima dosis que el dosímetro puede medir confiablemente.
- *Dependencia de la respuesta con la tasa de dosis.* Se requiere que el dosímetro sea independiente de la tasa de dosis porque en caso contrario, ésta restringiría su límite de uso.
- *Dependencia con la energía.* Esta dependencia es la más importante ya que refleja la eficiencia del dosímetro (Attix, 1986), es decir es la habilidad que tiene éste para dar una misma lectura a una cantidad de energía absorbida en su propio volumen sensible sin importar el tipo de radiación o calidad de haz.
- *Geometría.* Una condición ideal sería que la geometría del dosímetro fuera parecida a la del volumen del material de interés.

Aún cuando los dosímetros actuales no cumplen con todas las características mencionadas, sí satisfacen la mayoría de ellas.

1.4.2.1 Película de Tinte Radiocrómico

Las películas de tinte radiocrómico (PTR) están constituidas por un plástico y un precursor de tinte radiocrómico que es la sustancia que se activa cuando la película es irradiada (Attix, 1986). Este tipo de películas tiene la propiedad de adquirir una cierta coloración cuando sobre ellas incide radiación ionizante. La dosis absorbida por las películas se puede conocer a través de su respuesta que a su vez está dada en términos de la densidad óptica (DO). Ésta está relacionada con el desarrollo de centros de color que se generan cuando la radiación ionizante rompe el enlace de una cierta molécula dentro de la película. Esta acción además produce un nuevo arreglo de las cargas que generan la coloración. Dentro de un intervalo de dosis, la intensidad del color desarrollado por la película es proporcional a la dosis.

La respuesta (R) de las PTR a la radiación ionizante se determina mediante las ecuaciones (13) ó (14) dependiendo de si las densidades ópticas se determinan con un espectrofotómetro o si el tono de gris (TG) de la película es medido con un escáner, respectivamente.

$$R = \frac{DO_f - DO_i}{\text{espesor}} = \frac{\Delta DO}{mm} \quad (13)$$

$$R = \text{Log}\left(\frac{TG_f}{TG}\right) \quad (14)$$

En la ecuación (13) DO_f es la densidad óptica de la película irradiada, mientras que DO_i es la densidad óptica de la película sin irradiar. La respuesta de las películas se obtiene mediante el cociente entre las diferencias de estas densidades ópticas y el espesor de la película. En la ecuación (14) la respuesta de la PTR está dada como el logaritmo Base 10 del cociente del tono de gris de fondo (TG_f), es decir el tono de gris de la película sin irradiar entre el tono de gris de la película irradiada (TG).

Como todo dosímetro, las películas de tinte radiocrómico tienen sus ventajas y desventajas respecto de los dosímetros TL. Las ventajas son:

- Muestran una respuesta lineal a la radiación en un intervalo de dosis muy amplio.
- Su respuesta no depende de la tasa de dosis
- La película queda coloreada después de la irradiación por un tiempo prolongado, lo cual permite hacer lecturas del tono de gris a tiempos posteriores a la irradiación.

- Están fabricadas con materiales de número atómico bajo, por lo que interactúan con la radiación en una forma muy similar a como lo hace el tejido humano.

Las desventajas de las películas de tinte radiocrómico son:

- Sensibilidad a la luz ultravioleta
- Cambios en su respuesta debido a condiciones ambientales
- No son reusables

La película de tinte radiocrómico utilizada en este experimento para evaluar la homogeneidad del campo de radiación es la llamada Gafchromic HD810. Esta película posee un sustrato de 96 μm cubierto con una capa sensible de 6.5 μm y sobre ésta una superficie delgada gelatinosa de 0.75 μm . La HD810 es incolora y adquiere un color azul cuando es expuesta a radiación ionizante. Su intervalo de dosis útil comprende desde 50 Gy a 2500 Gy.

1.4.2.2 Dosímetros TL

Un dosímetro termoluminiscente (TL) es un cristal que posee activadores como Magnesio (Mg) y Ti(Ti) (a los dosímetros TL comerciales de Fluoruro de litio dopados con Mg y Ti se les llama TLD-100) y es adecuado para producir el fenómeno de termoluminiscencia. Ésta consiste en la emisión de luz visible cuando el cristal irradiado es calentado (Attix, 1986). La cantidad de luz es proporcional a la dosis de radiación recibida.

En la red cristalina, los activadores que se encuentran en cantidades pequeñas forman dos tipos de centros o imperfecciones (Attix, 1986):

- *Trampas para electrones o huecos* los cuales pueden capturar y sostener por períodos prolongados a los portadores de carga.
- *Centros luminiscentes* que están localizados ya sea en trampas para electrones o en trampas para huecos. Los centros luminiscentes emiten luz cuando se recombinan con electrones o huecos.

El proceso termoluminiscente tiene lugar cuando la radiación ionizante que incide sobre el cristal le cede la energía suficiente a un electrón de la red cristalina para pasar de la banda de valencia a la banda de conducción del cristal, produciéndose así una vacancia en la primera. Una vez estando ahí, el electrón se mueve hasta caer en una de las trampas para electrones que se encuentran ubicadas en bandas de niveles prohibidos de energía. Paralelamente, el hueco que se generó a raíz de la vacancia, se mueve en la banda de valencia hasta que se encuentra con una trampa para huecos. La profundidad de las trampas (E) debe ser lo suficientemente grande para que los electrones que se encuentran en las trampas o huecos permanezcan allí por un período prolongado.

Los electrones pueden ser liberados a través de procesos térmicos por medio de los cuales llegan a la banda de conducción y fortuitamente caen en un centro luminiscente o en una trampa para huecos. Éstos, se supone, tienen acoplado muy cerca un centro luminiscente que se recombina con un electrón. Tal recombinación da como resultado la emisión de un fotón luminoso. Todo este proceso es la base de la termoluminiscencia (Fig 5).

La probabilidad de que los electrones atrapados escapen de las trampas y de los huecos está dada por la siguiente expresión en términos de la temperatura T:

$$P = 1/\tau = \alpha e^{(-E/kT)} \quad (15)$$

donde τ es la vida promedio en la trampa, α es el factor de frecuencia, E es la energía de la trampa (en eV) y k es la constante de Boltzman ($1.3807 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$). En esta ecuación se observa que cuando la temperatura aumenta, la probabilidad de escape de los electrones incrementa y que a una temperatura máxima ocurre que la mayoría de los electrones puedan escapar de las trampas o huecos. Es precisamente es este instante cuando se observa un pico de brillo, este pico puede ser el resultado de que conforme aumente la temperatura del cristal, la intensidad de la luz emitida sea proporcional al número de electrones que escapan. Después de un máximo, el número de electrones que se encontraban atrapados en los huecos o trampas disminuye considerablemente, por lo que la curva de brillo decae severamente después de un máximo. Los fotones emitidos están en la región del visible y son la base de la señal TL. Entonces, un tubo multiplicador que es un aparato que transforma una señal luminosa a eléctrica, puede transformar y amplificar a la señal TL. Los dosímetros TL muestran las siguientes ventajas y desventajas respecto de las películas de tinte radiocrómico.

Ventajas

- Tienen un amplio intervalo de dosis útil (10^{-4} hasta 10^2 Gy)
- Su respuesta es independiente de la tasa de dosis (0 a 10^9 Gy/s)
- Son reusables

Desventajas

- Sensibilidad a la luz
- Pérdida de la información con la lectura
- Almacenamiento de información residual o memoria de lecturas anteriores

1.4.3 Equilibrio de partícula cargada

Supongamos que dentro de un volumen v existe un material el cual es irradiado con un haz homogéneo de radiación. Cuando dicho haz atraviesa el volumen v se producen partículas secundarias que son capaces de salirse de tal volumen (Fig 6). Esto implica que no toda la energía incidente se depositará sobre el material. Para evitar este problema, se rodea al volumen v con otro medio contenido en un volumen V de forma tal que la distancia entre el borde del volumen v y el borde del volumen V sea igual o mayor al alcance máximo de la partícula secundaria que sale de V , cuando esto se logra se dice que existe EPC.

1.5 Acción directa e indirecta de la radiación con la materia viva

Los efectos biológicos de la radiación ionizante resultan de su acción directa e indirecta de la radiación sobre la célula. Los efectos directos son producidos por la acción inicial de la radiación misma mientras que los efectos indirectos son causados por la acción posterior de los radicales libres y otros productos de la radiación (Turner, 1995).

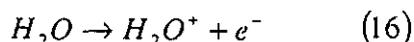
Las células de mamífero típicamente están constituidas de un 70% a 85% de agua, de 10 a 20% de proteínas, 10 % de carbohidratos y de 2 a 3 % de lípidos (Turner, 1995). La ionización que se genera cuando la radiación incide sobre la célula interacciona con moléculas blanco, tales como oxígeno y agua. Dicha interacción trae como consecuencia cambios a nivel molecular y por consiguiente permite la creación de sustancias potencialmente dañinas para la propia célula y para el material genético. De hecho, el daño primario que genera la radiación sobre la célula se atribuye, principalmente, al daño que ocurre a nivel del ADN por lo que se le considera como el blanco que es alterado. Además, el daño biológico que la célula puede sufrir depende principalmente de la dosis absorbida, de la tasa de dosis, y del tipo de radiación que la célula recibe (Turner, 1995).

La interacción de la radiación ionizante con la célula puede ser estudiada a partir de dos etapas:

1. Etapa física o inicial
2. Etapa química

1. Etapa física

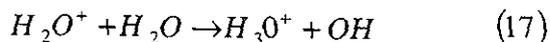
La etapa física o inicial dura aproximadamente 10^{-16} s y es en este lapso cuando se deposita la energía en la célula causando excitación y ionización (Turner, 1995). Debido a que la célula está formada en mayor porcentaje por agua, se puede describir el proceso como:



donde el superíndice indica el ión positivo y el ión negativo, respectivamente.

La duración de la etapa fisicoquímica es el orden de 10^{-6} s. La absorción de energía por el agua, resulta en la producción de radicales libres que son altamente reactivos y además son químicamente tóxicos. Un radical libre es una especie química que contiene uno o más electrones desapareados ya sea por pérdida o ganancia de ellos (Zentella de Piña y Saldaña 1996). Estos electrones están libres en sus órbitas, de allí el origen de su nombre. La aparición de los electrones no apareados en las capas más alejadas del núcleo atómico cambia la reactividad química de un átomo o de una molécula, lo que ocasiona que ésta sea más reactiva que su correspondiente no radical. A pesar de esto, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy diversa.

Existen también, los llamados radicales iónicos que son electrones cargados no apareados, por ejemplo, el H_2O^+ que se encuentra en el agua. Éste reacciona con otras moléculas de agua para formar un radical extremadamente reactivo llamado hidroxilo (OH). La reacción química que se lleva a cabo durante este proceso es la siguiente:



2. Etapa química

La etapa química ocurre cuando el H^+ , el OH^- , el H y el OH interaccionan con moléculas importantes de la célula. Este proceso dura muy poco tiempo, del orden de segundos. En la misma etapa puede ocurrir que los RL y agentes oxidantes ataquen a moléculas complejas cuya función es formar a los cromosomas, si esta acción se lleva a cabo se origina el rompimiento de algún eslabón en dichas moléculas formadas por largas cadenas (Turner, 1995).

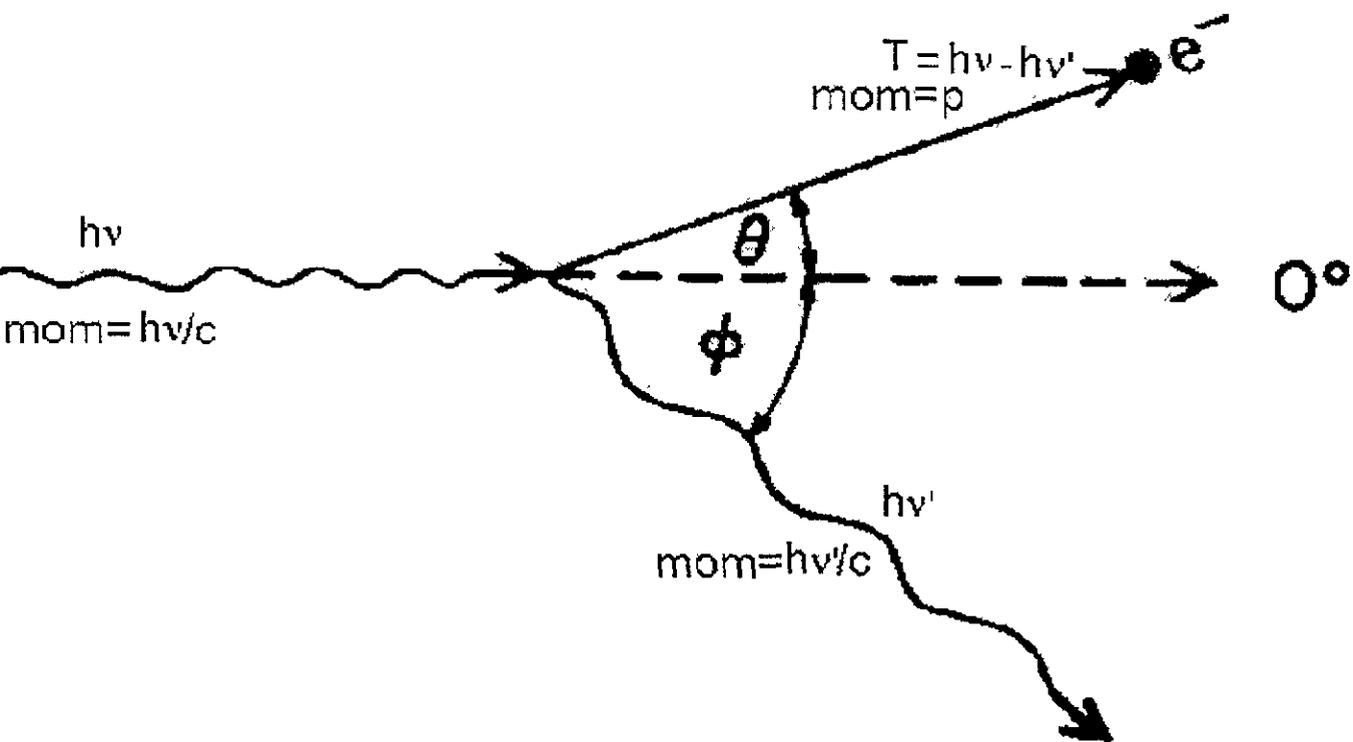


Fig. 1 Cinemática del efecto Compton

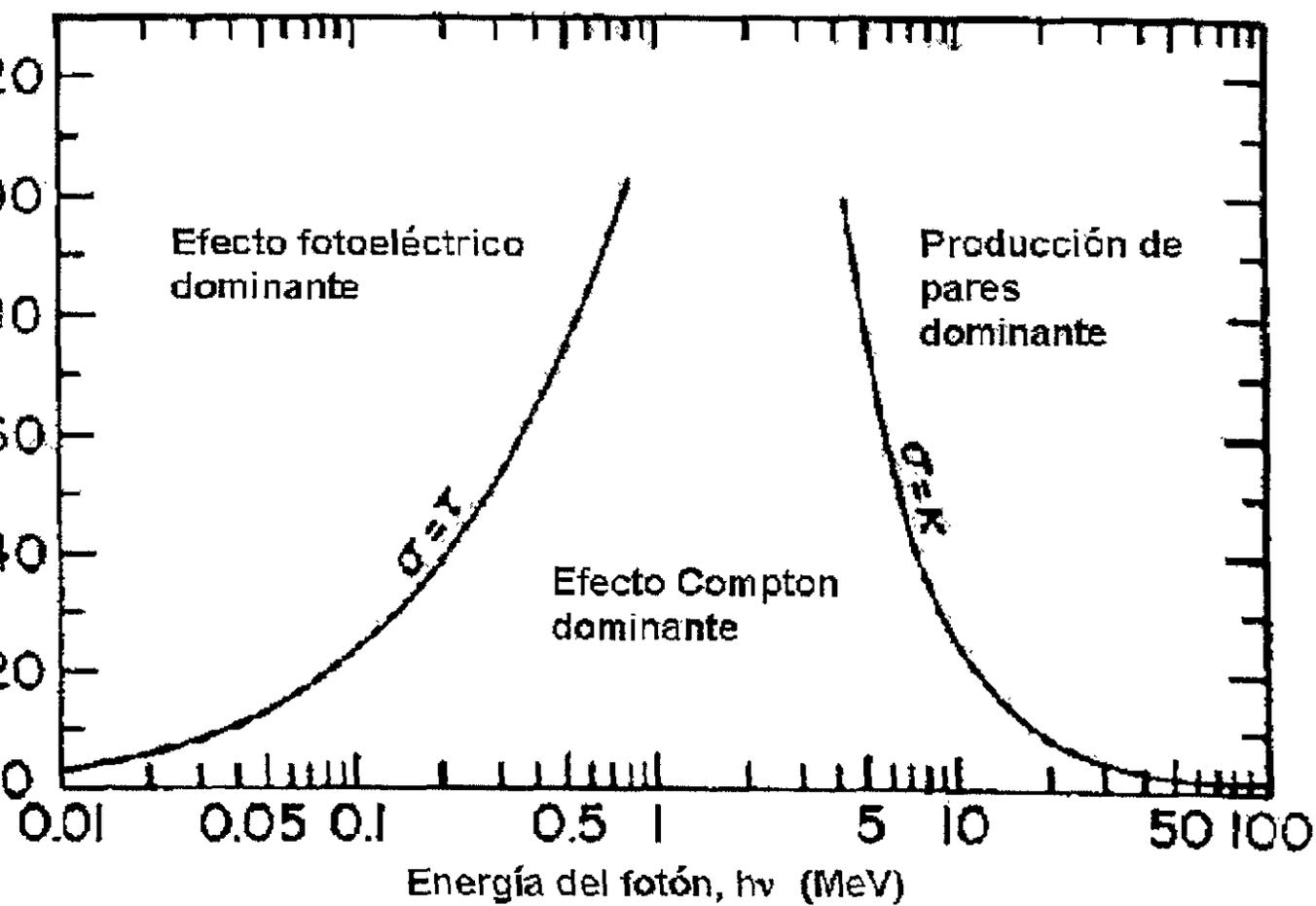


Fig. 2. Importancia relativa de los tres tipos principales de interacciones de los fotones con la materia (Attix, 1986)

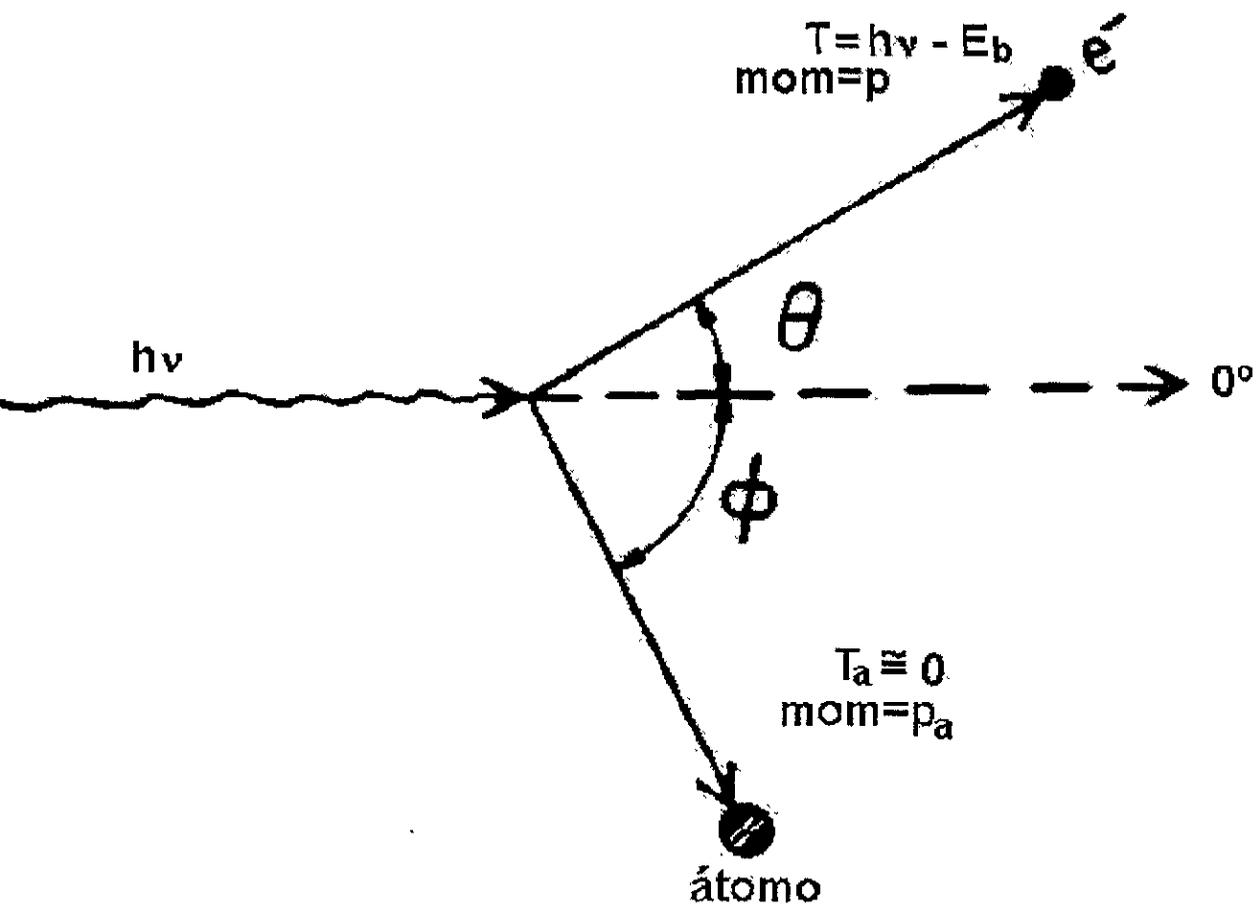


Fig. 3. Cinemática del efecto fotoeléctrico

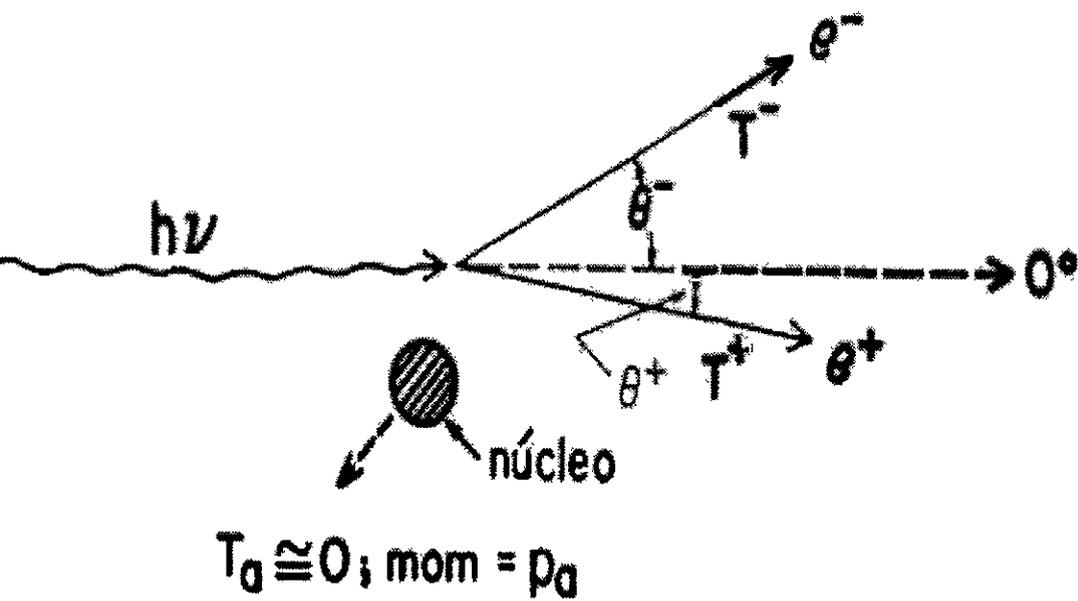
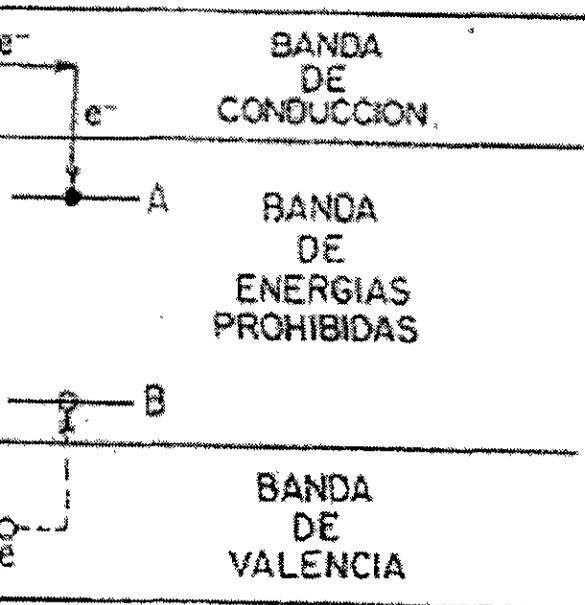
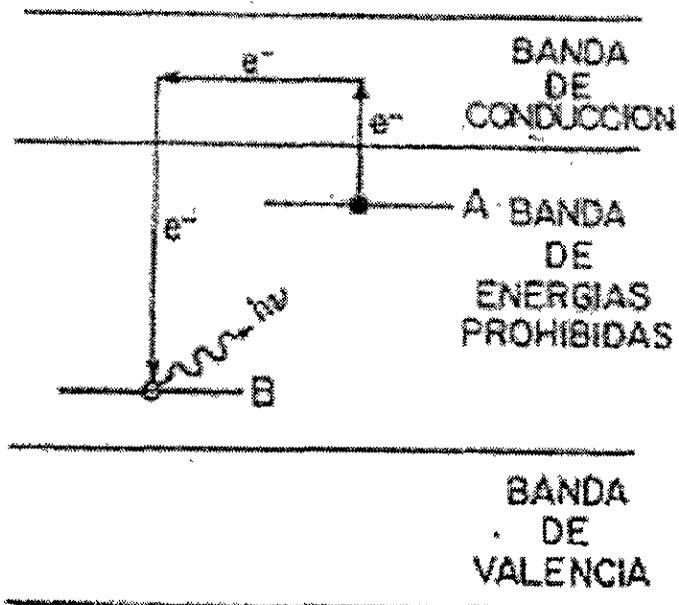


Fig. 4. Producción de pares en el campo de fuerza Coulombiana de un núcleo atómico



Mecanismo de excitación de los electrones y huecos que se encuentran en un cristal TLD-100, explicado a través del modelo de bandas



Mecanismo de recombinación de los electrones y huecos excitados en un cristal TLD-100, explicado a través del modelo de bandas

Fig 5. Proceso Termoluminiscente

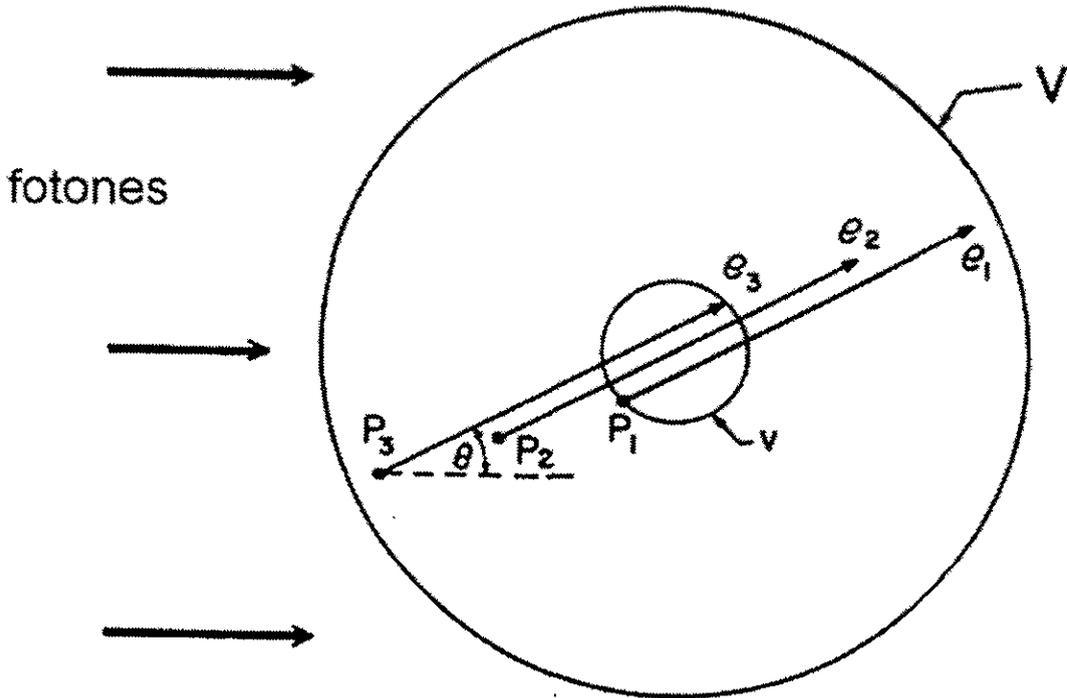


Fig 6. El volumen V contiene un medio homogéneo que es irradiado uniformemente por la radiación directamente ionizante. Las partículas cargadas secundarias se producen por la presencia de V . Si la distancia que separa el borde v del borde V es mayor o igual al máximo alcance de las partículas secundarias se alcanza el equilibrio de partícula cargada (EPC).

CAPITULO II

Conceptos básicos de la Biología celular

En el ser vivo, los daños producidos por la radiación ionizante ocurren fundamentalmente a nivel celular, por lo que para entenderlos es necesario conocer la morfología y fisiología de la célula. En este capítulo se describen los conceptos básicos de la Biología Celular y su relación con agentes externos (físicos o químicos) que son capaces de alterar la información genética del núcleo de la célula.

2.1 Estructura y composición química de una célula eucarionte

La célula es la estructura básica que constituye a los organismos (Bruce et al, 1994). Esta unidad muestra diferentes características en su forma, tamaño, componentes y velocidad de división, de acuerdo con el tejido al que pertenece y a la función que realiza, no obstante, todo tipo de célula eucarionte está formada por una membrana citoplasmática, un citoplasma y un núcleo (Bruce et al, 1994). En la figura 7 se muestra la estructura de una célula eucarionte en estado no proliferativo (sin dividirse).

El núcleo contiene el genoma principal y es lugar de síntesis de ADN y de ARN. El citoplasma que lo circunda consiste en el citosol y los orgánulos citoplasmáticos suspendidos en él. El citosol constituye un poco más de la mitad del volumen total de la célula y es el lugar donde no sólo tiene lugar la síntesis de proteínas sino también donde se desarrollan la mayoría de las reacciones del metabolismo. Aproximadamente la mitad del área total de membrana de una célula se utiliza para englobar los espacios laberínticos del retículo endoplasmático (RE). Éste presenta muchos ribosomas unidos a su superficie citoplasmática, los cuales sintetizan proteínas integrales de membrana y proteínas solubles destinadas a ser segregadas o a ser transportadas a otros orgánulos. El RE también produce los lípidos del resto de la célula y también actúa como almacén de iones Ca^{2+} . El complejo de Golgi consiste en una serie de compartimientos organizados en forma de sacos discoidales llamados cisternas del Golgi; recibe lípidos y proteínas del RE y las distribuye hacia diferentes destinos intracelulares. Las mitocondrias y (en las plantas) los cloroplastos, generan la mayor parte de Trifosfato de Adenosin (ATP) que se utiliza para desplazar las reacciones biosintéticas que requieren un aporte de energía libre. Los lisosomas presentan enzimas digestivas que degradan tanto orgánulos muertos como macromoléculas y partículas captadas del exterior de la célula (Bruce et al, 1994).

Las células eucariontes contienen una gran cantidad de ADN. Éste es una macromolécula formada de dos largas cadenas compuestas por azúcar pentosa (desoxirribosa) y fosfatos que se enrollan en cada una de las cadenas que forman una doble hélice. Dichas hebras están sostenidas por un par de bases nitrogenadas, pirimidinas (timina y citosina) y purinas (adenina y guanina) (ver figura 8).

Cada molécula de ADN se empaqueta en un cromosoma, el total de información genética contenida en los cromosomas de un organismo constituye su genoma. El genoma humano está formado por 3×10^9 parejas de nucleótidos, en 24 cromosomas (22 autosomas diferentes y 2 cromosomas sexuales diferentes). Una célula humana somática contiene 46 cromosomas y 6×10^9 parejas de nucleótidos de ADN.

El ARN controla la síntesis de las proteínas en todo los organismos vivos y su estructura es similar a la del ADN (Dowd et al.,1999), sin embargo esta compuesto de una sola hélice y las bases uracilo remplazan a la estructura de las timinas del ADN. La síntesis de una proteína implica copiar regiones específicas del ADN (los genes) en otro tipo de polionucleótido química y funcionalmente diferente, conocido como ácido ribonucleico (ARN). Al igual que el ADN, el ARN está compuesto por una secuencia lineal de nucleótidos, pero presenta dos pequeñas diferencias químicas respecto al ADN (1) el esqueleto de azúcar fosfato del ARN contiene ribosomas en lugar de desoxirribosa y (2) la base de timina (T) está sustituida por uracilo (U).

El ARN contiene toda la información de la secuencia de ADN de la que ha sido copiado y mantiene las propiedades del ADN de apareamiento de bases. Las moléculas de ARN se sintetizan a través de un proceso conocido como transcripción del ADN en el que una de las hebras actúa como patrón sobre el que se examinan las posibilidades de apareamiento de bases de los ribonucleótidos. A los transcritos de ARN que dirigen la síntesis de moléculas de proteínas, se les llama moléculas de ARN mensajero (ARNm). Otros transcritos de ARN actúan como ARN de transferencia (ARNt) o bien forman los componentes del ARN ribosómico (ARNr) o partículas ribonucleoproteicas más pequeñas involucradas en el procesamiento o corte del ARN (sARN "small nuclear").

Las células se reproducen duplicando su contenido y luego dividiéndose en dos. El ciclo de división es el medio fundamental a través del cual todos los seres vivos se propagan. Los detalles de la división celular puede variar, pero existen algunos requerimientos universales. Lo primero y principal para que se produzcan un par de células hijas genéticamente idénticas es que el ADN se duplique exactamente y que los cromosomas se segreguen en dos células distintas. El ciclo celular comprende, como mínimo, el conjunto de procesos que una célula debe de llevar a cabo para cumplir estas funciones.

El ciclo celular de una célula eucarionte tradicionalmente se divide en varias fases distintas, una de las fases es la mitosis. Durante la mitosis la envoltura del núcleo se descompone, los contenidos del núcleo se condensan formando cromosomas visibles, y los microtúbulos se reorganizan formando el huso mitótico que finalmente separará a los cromosomas. Mientras tiene lugar el proceso de la mitosis, la célula parece detenerse brevemente en un estado llamado metafase, en el cual los cromosomas, ya duplicados, se alinean en el huso mitótico, preparados para la segregación. La separación de los cromosomas duplicados señala el inicio de la anafase, durante la cual los cromosomas se trasladan a los polos del huso, donde se descondensan y forman un nuevo núcleo. En la mayoría de las células, toda la fase M sólo dura una hora aproximadamente, lo cual es sólo una pequeña fracción de la duración total del ciclo. El período que transcurre entre una fase M y la otra fase siguiente es mucho

más largo y se conoce como la interfase. Esta fase es un período muy activo para la célula en división, durante la cual tienen lugar, siguiendo una secuencia muy ordenada, complicados procesos de preparación para la división celular. Particularmente en la interfase tiene lugar la duplicación del ADN en el núcleo y la síntesis de proteínas necesarias para la división de la célula.

2.2 Control del ciclo celular

La maquinaria que controla el ciclo celular en los eucariontes está compuesta de complejos proteicos que son activados siguiendo un orden y desencadenando eventos tales como la duplicación del ADN, la formación del huso mitótico y la segregación de los cromosomas. Para su fácil entendimiento, el ciclo de las células eucariontes se divide en cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M (Fig 9). La fase S es el período de síntesis del ADN durante el cual de una cadena, se origina una segunda copia del genoma. En la mitosis (M) las dos copias del ADN ya como cromosomas condensados se segregan y la célula se divide en dos hijas genéticamente iguales. Los períodos G_1 y G_2 son espacios temporales de preparación previos a la duplicación del ADN y a la división celular, respectivamente.

Existe además, un estado de “reposo” de las células que no se encuentran en proliferación, denominado G_0 , en donde el metabolismo principal de la célula se encuentra disminuido, incluyendo muchos de los procesos usualmente activos como el de la transcripción y de la síntesis de proteínas. La falta de factores de crecimiento puede causar la salida de las células del ciclo y su entrada a G_0 , la estimulación con factores de crecimiento a su vez, puede inducir nuevamente la entrada al estado de proliferación (Graña y Reddy, 1995; Weinstein y Zhou, 1997).

Para asegurar la integridad de la célula y de su material genético, los eventos que ocurren durante el ciclo celular deben seguir una secuencia definida, el término de ciertos eventos debe preceder al comienzo de otros. Por ejemplo, la replicación del ADN debe completarse antes de que la mitosis inicie, para asegurar que ambas células reciban una copia completa del genoma. Dentro del ciclo celular existen una serie de puntos de vigilancia o control para verificar que el orden y el tiempo de los eventos sea el correcto (Murray, 1992). Estos puntos de control, son los sensores que detectan problemas durante la progresión del ciclo y que mediante una cascada de señales este mensaje llega a factores específicos que detienen el ciclo celular, en algunos de estos puntos, el daño puede ser corregido o bien se toman las decisiones que llevan a la eliminación de las células dañadas (Hung et al, 1996; Murray, 1992).

2.3 Efectos que produce la radiación ionizante en el material genético

La luz ultravioleta y especialmente varios tipos de radiación ionizante son agentes que inducen rompimientos en el ADN. En este contexto, se han estudiado los efectos de un amplio rango de radiaciones, como rayos x, radiación gamma, partículas alfa y beta y neutrones. El rompimiento de las hebras del ADN ocasionado por la incidencia de la radiación ionizante en la célula se manifiesta en la ruptura de los cromosomas. La radiación ionizante causa rompimientos cromosómicos en cualquier estado del ciclo celular mitótico o durante la meiosis, sin embargo es sumamente variable la vulnerabilidad de las diferentes fases. Los resultados también son diferentes si la dosis de radiación es aplicada durante un tiempo corto o un período largo, o si esta dosis es fraccionada.

2.3.1 Aberraciones cromosómicas estructurales

El estudio de los rompimientos en los cromosomas esta íntimamente conectado con la investigación de mutaciones génicas y con la capacidad carcinogénica. Los fragmentos que se derivan del rompimiento cromosómico tienen la posibilidad de reunirse en su posición original tomando su configuración normal o pueden no reunirse y los extremos de los cromosomas con alto grado de adhesión inespecífica pueden reunirse a otros fragmentos, lo que puede dar origen a un alteración en la próxima mitosis (Fig 10).

Dependiendo de la fase en el ciclo celular donde se origina el daño, la radiación ionizante puede producir en la estructura de los cromosomas dos tipos principales de alteraciones: aberraciones de tipo cromosómico y aberraciones de tipo cromatídico.

a) Rompimientos y rearrreglos cromosómicos

Si el DNA se rompe durante la fase G_1 (en la interfase temprana), cuando el cromosoma consiste de una sola cromátida y el daño puede ser perpetuado en S, en la siguiente metafase ambas cromátidas serán afectadas (Geard, 1987). Un solo rompimiento puede originar un cromosoma con un fragmento eliminado (deleción) y un fragmento acéntrico (sin centrómero) que podría perderse en la siguiente mitosis, o si es incluido en el núcleo y es duplicado, en la siguiente mitosis podría observarse como un doble fragmento.

Dos rompimientos en el mismo cromosoma podrían resultar en la formación de un anillo céntrico (incluye al centrómero) y un fragmento acéntrico (sin centrómero) o en un anillo acéntrico y una deleción intersticial. En la metafase siguiente, el fragmento que no tiene centrómero probablemente se perderá durante la mitosis, debido a que no será atraído a ninguno de los polos de la célula (Bender, 1963).

La formación de dicéntricos comprende el intercambio de dos cromosomas separados. Si un rompimiento se produce en cada uno de los cromosomas durante la interfase temprana y los fragmentos de cromosomas con capacidad de adhesión inespecífica están cerca uno de otro, éstos pueden reunirse. Este intercambio se replicará durante la interfase de la síntesis del

ADN y resultará un cromosoma con dos centrómeros (de aquí el nombre de dicéntrico) y habrá también un fragmento acéntrico (Revell, 1983).

Otro tipo de cambio cromosómico es la traslocación simétrica que comprende un rompimiento de dos cromosomas antes de replicarse y los extremos de los cromosomas rotos se intercambian entre los dos cromosomas. Esta alteración ha sido asociada con varios tipos de cáncer atribuibles a la activación de un oncogen (Hall et al., 1994).

Cuando hay una deleción intersticial la cual resulta de dos rompimientos en el mismo brazo del mismo cromosoma, se pierde información genética y esta alteración está relacionada con el desarrollo de cáncer, ya que material genético eliminado puede incluir a un gen supresor (Hall et al., 1994).

b) Rompimientos y rearrreglos cromatídicos

Cuando un rompimiento tiene lugar durante G_2 (interfase tardía), involucra solamente a una de las dos cromátidas. Un solo rompimiento produce un cromátida rota y un fragmento acéntrico. Algunas consecuencias posibles del rompimiento de cromátidas en dos cromosomas involucra a intercambios entre las cromátidas para formar configuraciones llamadas cuadriradiales (Evan, 1962).

Los rompimientos que ocurren al final del ciclo celular en la fase G_2 , después de que los cromosomas se han replicado, pueden también formar un puente anafásico, este ocurre cuando en las dos cromátidas del mismo cromosoma y los fragmentos adheribles pueden reunirse en forma incorrecta para formar una unión de cromátidas. Así, durante la anafase, los dos juegos de cromosomas se mueven hacia a los polos opuestos, la sección de cromatina entre los dos centrómeros es estirada a través de la célula ente los dos polos. Los dos fragmentos pueden reunirse pero al no tener centrómero, es muy probable que se pierdan durante la mitosis. Estas aberraciones son casi siempre letales para la célula (Hall et al., 1994).

2.4 El gen p53

El gen p53 es un gen supresor que está expresado en todas las células del cuerpo humano. Este gen se localiza dentro del genoma humano en el brazo corto del cromosoma 17, en la banda p13.1. Tiene una extensión de aproximadamente 20 kilobases.

El gen supresor p53 esta mutado en la mitad de casos de cánceres humanos (Hollstein et al, 1991; Greenblatt et al, 1994). La inactivación del gen puede resultar en la división descontrolada y finalmente conducir a enfermedades como el cáncer (Vogelstein y Kinzler, 1992). Se ha encontrado que en la mayoría de los tumores tanto humanos como inducidos en modelos experimentales, existe la inactivación de la proteína por mutación en un locus acompañada generalmente por la pérdida de la función del alelo restante (Greenblatt et al, 1994).

2.4.1 Funciones de p53

El gen p53 participa en muchas funciones celulares como la reparación del ADN, el proceso de apoptosis, la diferenciación, la división y la regulación del ciclo celular (Levine, 1997). Por estas funciones y por ser un componente importante en la respuesta ante la generación de un daño en la célula, principalmente a nivel nuclear, se le ha considerado como un gen “centinela” de la proliferación celular del genoma humano.

El arresto del ciclo celular en los puntos de control G_1/S y G_2/M , así como la apoptosis que se lleva a cabo en las células con daño irreparable en su ADN son dos procesos claves regulados por p53 para controlar la población de células, tanto normales como cancerosas (Donehower y Bradley, 1993; Ko y Prives, 1996; Levine, 1997).

2.4.1.1 Arresto del ciclo en la fase G_1

Varios experimentos han demostrado que p53 está involucrado en la interrupción del ciclo en la fase G_1 como respuesta a daños al ADN causados por la exposición a agentes como las radiaciones, sustancias químicas o especies reactivas de oxígeno. Estos agentes producen un incremento en los niveles de la proteína P53 y en su actividad de unión al ADN, que coincide con la inhibición del ciclo en G_1 y la consiguiente inhibición de la síntesis del ADN (Doehower y Bradley, 1993). Estos fenómenos no son observados cuando las células tienen p53 mutado, ni cuando las células son tratadas con agentes que no dañan al ADN. La interrupción del ciclo celular en el punto de control G_1/S le da tiempo a la célula para reparar el daño antes de iniciar la replicación del ADN. P53 activo (funcional) logra detener el ciclo, mediante su unión al ADN y mediante la transcripción de genes que son los que detienen el ciclo.

2.4.1.2 Arresto del ciclo celular en el punto de control G_2

p53 también participa en el bloqueo G_2 , sin embargo su intervención ha sido recientemente definida (Zoe et al, 2001). Se sabe hasta el momento, que la detención del ciclo celular en G_2 se debe a la convergencia de cascadas de señales que inhiben la activación de Cdc2. Después del daño producido en el ADN, los miembros de la familia PI-3K incluyendo ATM y ATR son activados e inician la transactivación de señales que regulan la detención del ciclo celular en G_2 . ATM fosforila y activa Chk2 después de que las células han sido expuestas a radiación ionizante. En recientes investigaciones se ha mostrado que las células que tienen deficiente al gen p53 se mantienen en arresto en G_2 lo cual sugiere que las señales mandadas por p53 no regulan los puntos de monitoreo en G_2 . No obstante, la expresión de p53 en ausencia de estrés celular induce la detención del ciclo celular tanto en los puntos de monitoreo G_1 como en G_2 . Además los genes p53 y p21 son necesarios para la detención de G_2 después de producirse un daño en el ADN de las células. El mecanismo de dependencia de p53 y de detención de G_2 involucra la inhibición inicial de la actividad de la ciclina B1- Cdc2 por p21 seguido de la reducción de la ciclina B1 y de la de los niveles de las proteínas Cdc2.

2.4.2. Apoptosis mediada por p53

Actualmente se ha descrito la participación de p53 en una de las vías hacia la apoptosis, que es inducida por la radiación o por el tratamiento con agentes quimioterapéuticos o agentes que dañan al ADN. Los mecanismos por los que p53 induce apoptosis en una célula, son objeto de un intenso estudio ya que aun no son del todo claro, de hecho esta actividad de p53 es la más controvertida y discutida.

Cuando se tratan los cultivos de células con radiación o con ciertos fármacos de forma tal que causen un daño masivo en el material genético, lo que se trata es de reproducir a condiciones ambientales *in vivo* el daño que tales agentes son capaces de producir en la integridad del genoma y de los procesos celulares basales. La mejor opción para proteger al resto del organismo es llevar a la célula a un estado apoptótico, ya que un daño genético de tal magnitud puede provocar la aparición de estados patológicos como es el caso del cáncer (Smith y Fornace, 1996; Weinberg, 1985). Si las células neoplásicas formadas logran evadir el proceso de apoptosis asegurarán su supervivencia y como consecuencia se desarrollará un tumor.

P53 puede producir apoptosis de varias formas para lo cual utiliza las siguientes vías de señales:

- **Expresión elevada de la proteína P53.** Los niveles altos de la proteína P53 comparados con sus niveles basales se asocia con la muerte de las células llevada a cabo por el proceso de apoptosis.
- **Genes activados por P53.** Se sugiere que la muerte celular inducida por P53 en algunos tipos celulares (Sabbatini et al, 1995; Attardi et al, 1996; Ko y Prives, 1996), al menos involucra la activación transcripcional de los genes *bax* e *igf-bp3*. El gen *bax* produce una proteína apoptótica que inhibe el gen *bcl-2* y como consecuencia se produce el proceso de apoptosis. El gen *igf-bp3* codifica para una proteína que es un inhibidor del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)., éste mitógeno estimula de forma general la progresión del ciclo celular y al ser anulada su actividad, se podría anular toda señal de sobrevivencia (Gottlieb y Oren, 1996; Ko y Prives, 1996).
- **Interacción de la proteína P53 con proteínas de reconocimiento al daño y reparación del ADN.** Se ha planteado que la interacción de P53 con otras proteínas es necesaria para inducir apoptosis y muy probablemente también la detención del ciclo celular. P53 puede interaccionar con las siguientes proteínas:
 - *c-Abl*, que tiene acción de tirosina-cinasa, cuya expresión detiene el ciclo celular.

- ERCC2 Y ERCC3, son proteínas que forman parte del complejo del factor de transcripción basal TFHII. Estas proteínas están involucradas en sistemas de reparación del ADN.
- Atm, es una proteína que pertenece al sistema de reparación del ADN en daño producido por radiación ionizante; esta proteína se encuentra alterada en la enfermedad genética Ataxia Telangiectasia (Levine, 1997; Bourden et al, 1997).
- Csb, es otra proteína que se encuentra involucrada en la reparación de ADN.

2.4.3 Detención del Ciclo celular o muerte celular, una decisión de p53

En la actualidad se intenta resolver el dilema al que se enfrentan las células cuando responden al daño, ya sea induciendo un alto en el ciclo o la muerte celular. Esto significa que P53 puede interactuar con blancos específicos en G₁ y que en ciertas circunstancias generan un bloqueo en la progresión del ciclo celular y en otras activan el programa suicida (cuando el daño al genoma es muy grande para ser reparado) por la activación de genes requeridos para la inducción de la apoptosis (como bax), o por la represión de genes (como bcl-2) cuyos productos suprimen el proceso apoptótico.

Varios estudios están de acuerdo de que la decisión depende del tipo de células en estudio y de que pueden existir distintos programas de trans-activación de transcripción de genes o interacción con otras proteínas, que colaboran a su vez con otros mecanismos bioquímicos y así favorecer a una de las dos opciones (Gottlieb y Oren, 1996; Hansen y Braithwaite, 1996; Levine , 1997).

Diversos estudios se han realizado para resolver el dilema sobre qué vía es elegida. Parece que las proteínas apoptóticas y antiapoptóticas (Núñez y Clarke, 1994; Smith y Fornace, 1996) constituyen la vía principal de decisión entre la vida y la muerte.

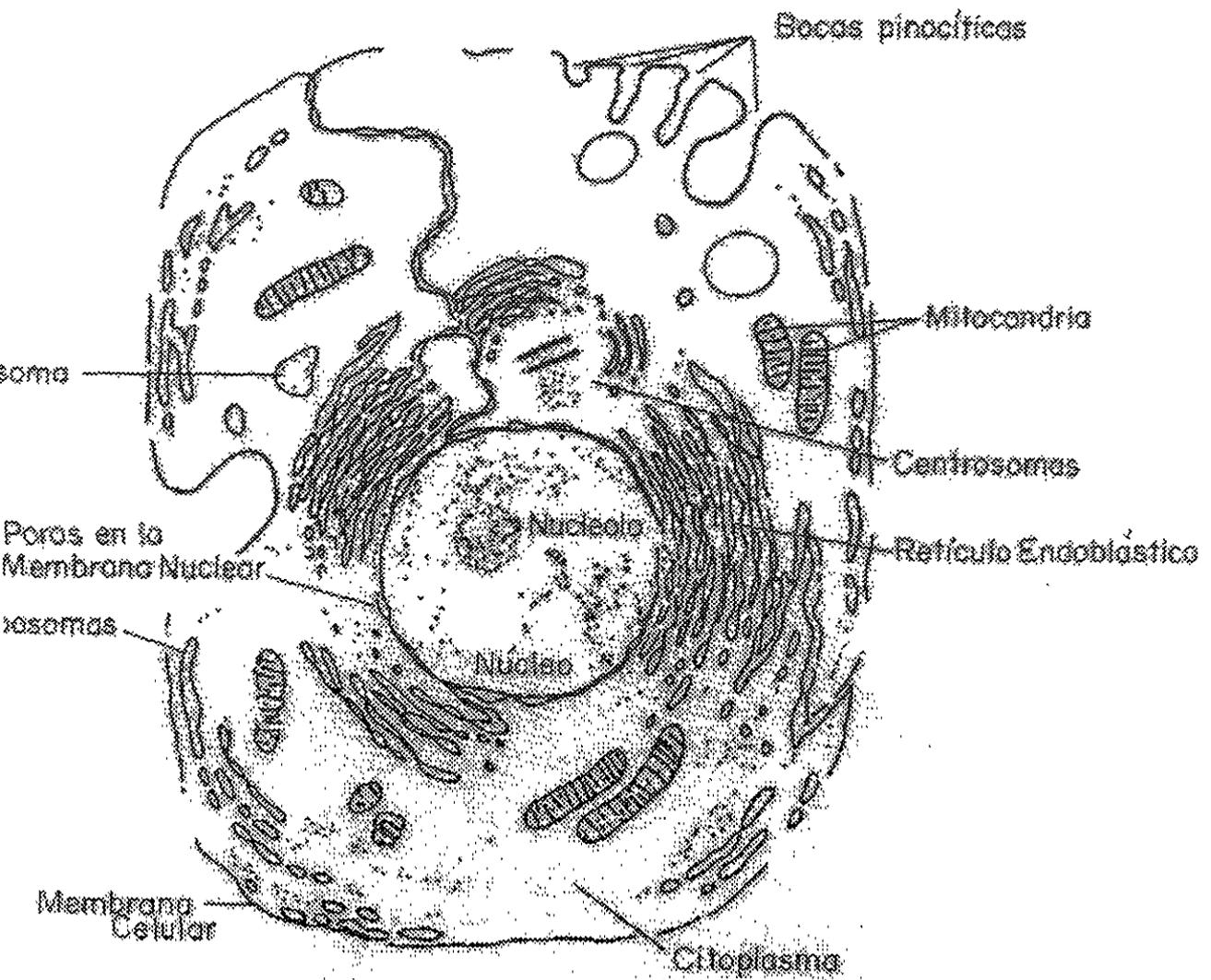


Figura 7 Célula Animal

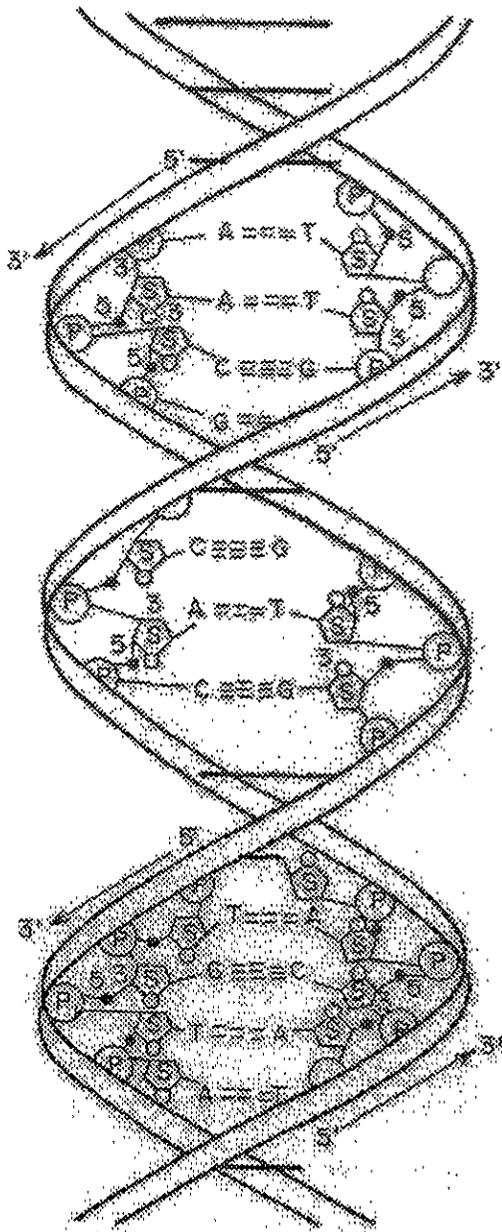


Figura 8 Doble hélice del DNA. Los pares de bases son perpendiculares a lo largo del eje longitudinal y descansan agrupadas una sobre otra. A=adenina, G=guanina, C=citosina y T=timina

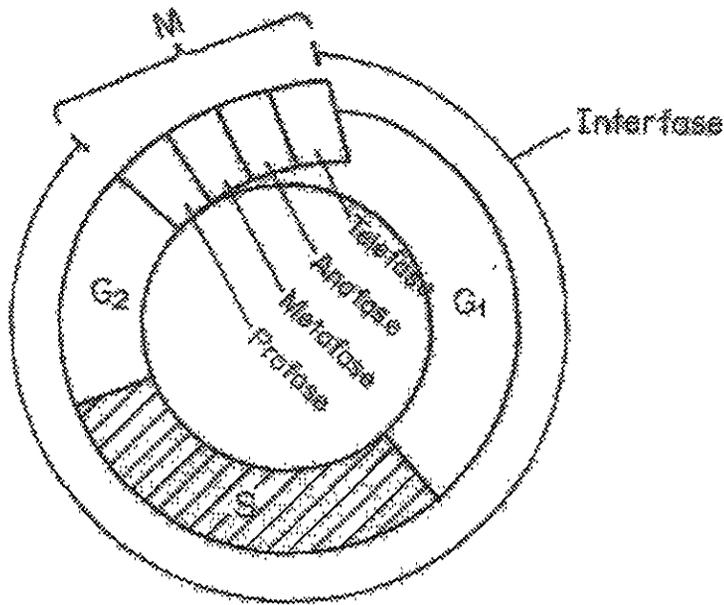


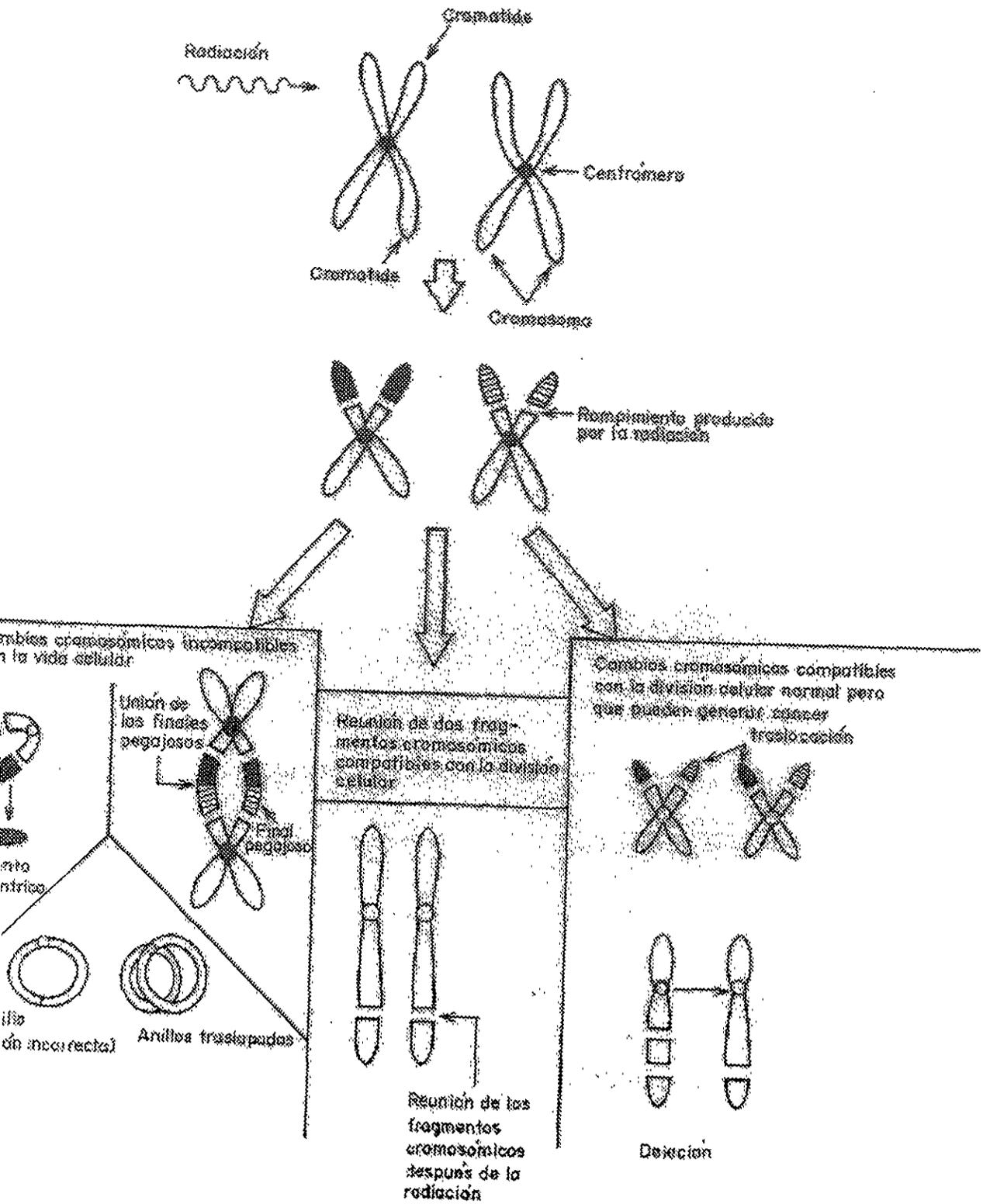
Figura 9 Ciclo Celular. Note que la célula pasa el mayor tiempo del Ciclo Celular en la interfase.

M Mitosis

Interfase {

- G₁ Transcripción del DNA - Traducción, Crecimiento
- S Replicación del DNA - Creación de nuevos Cromosomas
- G₂ Transcripción del DNA - Traducción, Proteínas en forma de huso.

Fig 10. Efectos de la radiación sobre los cromosomas



CAPITULO III

Fundamentos para el análisis de la proteína P53

Frecuentemente, los linfocitos de sangre periférica de humano son usados como modelo para evaluar genotoxicidad (daño al ADN causado por factores físicos o químicos) ya que resulta fácil tanto su manejo *in vitro* como en la obtención de las muestras.

Los linfocitos pertenecen a una clase de glóbulos blancos que son las células responsables de la especificidad inmunitaria. Se encuentran en grandes cantidades en la sangre, en la linfa (el líquido incoloro de los vasos linfáticos que conectan los nódulos linfáticos del cuerpo) y en los órganos linfoides especializados como el timo, los nódulos linfáticos, el bazo y el apéndice (Bruce, 1996).

En el año de 1960 se descubrió que la respuesta inmunológica está mediada por dos clases diferentes de linfocitos: las células T que se originan en el timo y son responsables de la inmunidad celular, y las células B, que en los adultos se originan en la médula ósea y en el feto en el hígado y producen los anticuerpos que son los responsables de la inmunidad (Bruce, 1996).

El cultivo de los linfocitos es el primer paso para el análisis de la proteína P53. Éste consiste en su cuantificación mediante alguno de los métodos colorimétricos conocidos, Bradford o Lowry, en la separación de las proteínas por sus pesos moleculares a través del proceso de electroforesis y en la detección de la proteína mediante el método de inmunodetección (Western Blot).

A continuación se describe el proceso global que se lleva a cabo para la detección de la proteína P53.

- **Proliferación celular de los linfocitos.** El progreso de las células T estimuladas por mitógenos (sustancias que inducen a la célula a dividirse) a través del ciclo celular, requiere muchos eventos moleculares que aún no son totalmente conocidos. Sin embargo, los datos indican que después de la estimulación con mitógenos, las células en estado G_0 entran a la fase G_1 del ciclo celular cuando estas poblaciones celulares producen y expresan receptores para la interleucina tipo 2 (IL-2). La interacción de la IL-2 con el receptor de IL-2, se requiere para la expresión del receptor transferina, así la unión de la transferina a su receptor durante la fase G_1 tardía permite a las células T realizar la transición de G_1 a S. Se ha reportado que la expresión del protooncogene *c-myc* representa un evento temprano en la activación de los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina y que puede tener un papel importante en la transición de G_0 a G_1 (Reed et al, 1985). La fitohemaglutimina es una glicoproteína de origen vegetal (frijol)

y es específicamente mitogénica para los linfocitos de tipo T. Esta sustancia se une a la N-acelgalactosamina de los carbohidratos presentes en la membrana celular.

El análisis y la detección de la proteína P53 se realiza a través de los siguientes pasos. Los dos primeros pertenecen al análisis de la proteína mientras que los restantes forman parte del proceso de detección de la misma.

- **Cuantificación de las proteínas a través del método de Bradford.** El método de Bradford es uno de los métodos colorimétricos más usados para determinar la concentración de la proteína. Dicho método cuantifica la unión de una sustancia de color azul llamada azul de coomassie con una proteína desconocida y compara dicha unión con aquella que resulta de diferentes cantidades de proteína estandarizada (Bruce, 1996).
- **Separación de los pesos moleculares de las proteínas mediante un proceso de electroforesis.** Las proteínas suelen tener una carga neta positiva o negativa, que refleja la de los aminoácidos cargados que contienen. Si se aplica un campo eléctrico a una solución que contenga una molécula proteica, la proteína migrará a una velocidad que dependerá de su carga neta, de su tamaño y de su forma. Esta técnica es conocida como electroforesis (Bruce, 1996).

A mediados de 1960 se desarrolló una versión modificada de este método conocido como electroforesis en gel de poliacrilamida. Este procedimiento es más poderoso que cualquier otro método anterior de análisis de proteínas, principalmente debido a que puede utilizarse para separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las que sean insolubles en agua. Debido a que el método separa las proteínas en función de su tamaño, también proporciona información sobre el peso molecular y la composición de subunidades de cualquier complejo proteico (Bruce, 1996).

Las proteínas que se encuentran en un gel de poliacrilamida se separan por su peso molecular en respuesta a un campo magnético. Las proteínas se detectan fácilmente tiñendo el gel con un colorante como el azul de coomassie. Las diferentes proteínas se observan en forma de bandas. Éstas pueden ser identificadas por anticuerpos, sin embargo resulta difícil para los anticuerpos difundirse en los geles de poliacrilamida, por lo que las proteínas deben transferirse a membranas de nitrocelulosa (Bruce, 1996).

- **Transferencia de las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa.** Es necesario transferir las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa (Blotting), donde las proteínas son más fácilmente reconocidas por un anticuerpo específico.
- **Bloqueo de todas las proteínas excepto de la proteína P53.** Mediante la electroforesis se llevo a cabo la separación de todas las proteínas. Debido a que P53 es la proteína de interés se utiliza una solución que bloquea el resto de las proteínas.

- **DetECCIÓN DE LA PROTEÍNA P53 A TRAVÉS DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS.** Consiste en usar un anticuerpo que se acopla a las proteínas P53 que a su vez son reconocidas por un anticuerpo anti IgG (inmunoglobina G) unida a una enzima llamada peroxidasa.
- **DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA A TRAVÉS DEL MÉTODO QUIMIOLUMINISCENTE.** La Luminiscencia se define como la emisión de luz que resulta de la disipación de energía de una sustancia que se encuentra en un estado excitado. En la quimioluminiscencia, la excitación es el resultado de una reacción química. El luminol es una sustancia cuya oxidación se produce cuando la enzima peroxidasa se encuentra en presencia del peróxido de hidrógeno, dicha oxidación coloca al luminol en un estado excitado que al decaer al estado base emite luz. Esta señal quimioluminiscente, puede ser intensificada 1000 veces y es posible que se prolongue su tiempo de emisión al hacer que la oxidación del luminol ocurra en presencia de los intensificadores llamados fenoles. El máximo de emisión ocurre entre 5 y 20 min después de la reacción química entre el luminol y los fenoles; después, decae lentamente con una vida media de 60 minutos. La máxima emisión de luz ocurre a una longitud de onda de 428 nm. La luz emitida por la reacción quimioluminiscente se capta en una placa radiográfica que está en contacto con las membranas de nitrocelulosa dentro de un chasis. Inmediatamente después, se hace el revelado y fijado de la imagen en la película. La cuantificación de dicha proteína se hace mediante la lectura de la densidad óptica de la película radiográfica utilizando un densitómetro.

Con base en lo anterior, es necesario mencionar que en experimentos anteriores de la detección de la proteína P53 a través del proceso quimioluminiscente, realizados en el laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, se encontraron variabilidades en la densidad óptica en los estudios de diferentes individuos.

Tales variabilidades pueden deberse, no sólo a factores biológicos intrínsecos de los donadores, sino también a parámetros físicos de la técnica de detección que no fueron controlados. La temperatura del revelador, el tiempo de revelado, el uso de un revelador nuevo o el sobreuso del mismo, así como el tipo de películas autoradiográficas, pueden ser factores importantes que deben ser tomados en cuenta para tener una mayor confiabilidad en la interpretación biológica de cualquier resultado obtenido por este método.

Con el objetivo de reducir las variabilidades observadas en las densidades ópticas, se estableció en el laboratorio un protocolo de trabajo del proceso de detección de la proteína P53. Básicamente se estudiaron en detalle los factores que determinan la densidad óptica de la película radiográfica: el tiempo de exposición de la película autoradiográfica (contacto con las membranas de nitrocelulosa), la temperatura del revelador y el tiempo de revelado

Para entender la importancia que tiene el control de estos parámetros es necesario conocer el principio físico de la formación de la imagen en la película radiográfica.

3.1 Principio fotográfico

La formación de la imagen latente es uno de los conceptos fundamentales que ayudan a entender el principio fotográfico.

Base

Toda película radiográfica consta de una base de poliéster, cuyo espesor es de aproximadamente 150 μm . Este material es el que da la estructura de soporte a los otros componentes de la película y no participa en el proceso de formación de la imagen (Dowsett, 1999).

Emulsión

La emulsión es el componente activo en el cual la imagen es formada y consiste de muchos cristales pequeños de halogenuros de plata suspendidos en un medio gelatinoso. El halogenuro de plata es un compuesto sensible a la luz que posee una estructura cúbica cristalina. Dichos halogenuros resultan de la reacción química entre nitratos de plata y halogenuros alcalinos (Dowsett, 1999).

Los diferentes halogenuros de plata tienen propiedades fotográficas, pero una sustancia que es usada típicamente en las películas de imagenología clínica, es el bromuro de plata. El bromuro de plata se presenta en forma de cristales y granos y cada uno contiene del orden de 10^9 átomos. Los granos de halogenuros de plata son figuras irregulares parecidas a pequeñas piedras o granos de arena (Dowsett, 1999).

3.1.1 Formación de la imagen latente

La formación de la imagen latente se lleva a cabo en 2 etapas.

La primera tiene lugar cuando, la luz al incidir sobre la película radiográfica excita a los átomos de ésta. El fotón incidente arranca electrones de los átomos de la película. Estos electrones se mueven a las imperfecciones de la red cristalina ocasionando que ésta adquiera carga negativa. Las imperfecciones a su vez atraen a los iones de plata, los cuales tienen carga positiva. Cuando tales iones se aproximan a las imperfecciones, son neutralizados por los electrones. Esto hace que los iones de plata se conviertan en átomos de plata metálica. Si este proceso se repite varias veces dentro de un solo grano, el conglomerado de plata metálica en las imperfecciones del cristal, llega a formar un arreglo permanente. El número de granos en la emulsión que alcanzan este estado dependerá de la exposición total de la película. Los granos que reciben suficiente exposición para formar cambios permanentes no son visiblemente distinguibles de los granos no expuestos, pero resultan ser más sensibles a la acción del revelador químico, entonces las imperfecciones se convierten en concentraciones de átomos de plata, los cuales son centros potenciales de revelado que contienen la información en la forma de una imagen latente (Dowsett, 1999). (Fig 11).

La segunda etapa consiste en el proceso químico que convierte la imagen latente, en una imagen visible, dentro de un intervalo de tono de gris. Dicha etapa esta formada de tres procesos, el proceso de revelado, fijación y lavado (Dowsett, 1999).

3.1.2 Proceso de revelado

La imagen latente no visible es convertida en una imagen visible por el proceso químico de revelado. La solución reveladora provee electrones que migran a los granos sensibilizados y convierten a los iones de plata en átomos de plata metálica. El conjunto de varios átomos de plata se observa como manchas negras visibles en la imagen (Dowsett, 1999).

Las películas radiográficas, generalmente son reveladas en procesadores automáticos. En un procesador convencional, la película permanece en el revelador de 20 a 25 segundos.

Aunque existen diferencias en la composición química de los reveladores ofrecidos por varios fabricantes, la mayoría contiene los mismos reactivos químicos. Cada reactivo tiene una función específica en el proceso de revelado. El revelador realiza las siguientes funciones (Dowsett, 1999):

Reduce

La reducción química de los granos de bromuro de plata expuestos a la luz es el proceso que los convierte en granos de plata metálica. Esta reacción comúnmente es llevada a cabo por dos sustancias químicas, fenidona e hidroquinona. La primera es la más reactiva y produce principalmente la mitad de la porción más baja de la escala de gris. La segunda genera las áreas más oscuras en la imagen.

Activa

La función primaria del activador, carbonato de sodio, es suavizar y dilatar la emulsión para que los reductores puedan alcanzar los granos expuestos.

Restringe

El bromuro de potasio se usa generalmente como moderador. Su función es regular y controlar la tasa de revelado.

Preserva

El sulfato de sodio es uno de los preservadores mas usados, ayuda a proteger a los agentes reductores de la oxidación ya que los agentes están en contacto con el aire. También reacciona con los productos de oxidación para reducir su actividad.

Endurece

La glutaraldehído es usada como endurecedor para retardar la dilatación de las emulsiones.

3.1.3 Proceso de fijación

Después del revelado, la película se sumerge en una solución fijadora. El fijador es una mezcla de varios químicos que desarrollan las siguientes funciones.

Neutralizar

Cuando la película es retirada de la solución reveladora, el proceso de revelado continúa porque la solución fue absorbida por la emulsión. Es necesario detener este proceso para evitar un sobrerivelado y la formación de niebla en la película.

Aclarar

El fijador también aclara los granos de halogenuros de plata no revelados en la película. Se usa amonio y tiosulfato de sodio para este proceso.

Preservar

Se usa sulfito de sodio en el fijador como preservador.

Endurecer

El cloruro de aluminio se usa comúnmente como endurecedor. Su función primaria es encoger y endurecer la emulsión.

Lavado

Una vez que la película ha pasado por el fijador, se debe lavar para quitar el tiosulfato que pudo haber quedado.

Secado

El secado es la última fase del proceso de revelado y consiste en hacer pasar la película por un flujo de aire.

3.2 Sensitometría de una película radiográfica

La respuesta cuantitativa de una película fotográfica al ser expuesta a un tipo de luz, así como varias propiedades asociadas a la calidad de una imagen se puede conocer a través de su curva característica (Sprawls, 1987). Cuando la película es expuesta a la fuente de luz de un sensitómetro calibrado quedara impresa la imagen de una escala graduada que está formada por 21 pasos ópticos que se diferencian entre sí por su opacidad. Cada paso óptico representa un incremento del 0.15 en el logaritmo de la exposición. Ésta se define como el número de fotones por unidad de área (intensidad de la luz). Este cambio en la exposición prolonga el intervalo de la densidad óptica típica de la película radiográfica. Por

consiguiente, los 21 pasos cubrirán el intervalo LogE desde 0 a 3. Los diferentes pasos son medidos usando un densitómetro calibrado.

El densitómetro calcula la densidad óptica a través de la siguiente expresión:

$$DO = \text{Log}_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (18)$$

donde:

DO= Densidad óptica

I_0 = Intensidad de la luz incidente

I = Intensidad de la luz transmitida en el área de la región de la película expuesta a la luz del sensitómetro.

Esta ecuación resulta del siguiente principio físico:

Sea a el área promedio (cm^2/grano) que se oscurece por un cada grano de plata desarrollado, y n es el número de granos desarrollados por cm^2 de la película (Attix, 1986), entonces se tiene que:

$$I = I_0 e^{-an} \quad (19)$$

Al aplicar la función logarítmica de ambos lados de la igualdad de la ecuación 19 se obtiene la densidad óptica:

$$DO = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = an \log_{10} e = 0.4343an \quad (20)$$

Esta igualdad se cumple siempre que $n \ll N$, donde N es el número de granos de AgBr por unidad de área en la película no irradiada.

3.3 Componentes de la curva característica

Al graficar las densidades ópticas de los diferentes pasos de la imagen como función de la exposición se obtiene la curva característica de la película radiográfica, en la cual se observan las partes más importantes que la constituyen (Dowsett, 1999) (Fig 12).

Base + niebla. Es la densidad óptica correspondiente al “ruido” en la película, causado principalmente por efectos térmicos.

Valor umbral. Este valor marca la exposición más baja que da un valor de densidad óptica mayor que el de base+ niebla.

Punta. La region punta es la porción no lineal de exposición más baja de la curva .

Pendiente. La pendiente de la curva en la región lineal describe las propiedades más importantes de la película. La pendiente de la curva determina el contraste de la película.

Hombro. Esta es otra región de respuesta no lineal, cuando todos los granos de la película han sido saturados y donde cambios en la exposición ya no inducen cambios en la densidad óptica.

Otra importante característica de las películas radiográficas es la sensibilidad. Ésta se define como la capacidad de respuesta de la película al ser expuesta a una determinada cantidad de luz. En la figura 13 se observan dos curvas características A y B, ésta última se encuentra más desplazada hacia la derecha que la curva A, es decir, responde a niveles de exposición mayores a los que responde la película de la curva A. Por consiguiente, las curvas características de las películas más sensibles (A) se desplazarán hacia la izquierda mientras que las curvas pertenecientes a películas menos sensibles (B) se desplazarán hacia la derecha sobre el eje de las X (Dowsett, 1999).

Los parámetros que pueden ser medidos en una curva característica son:

- Base + niebla
- Pendiente (contraste)
- Posición de la curva (sensibilidad)

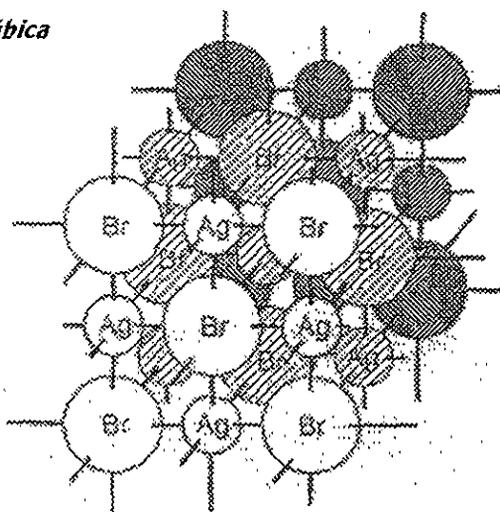
Estos parámetros se modifican cuando los tiempos de revelado y de temperatura cambian.

Para optimizar el contraste y la sensibilidad de cada tipo de película es recomendable trabajar a la temperatura del revelador y el tiempo de revelado que el fabricante sugiere. Para diferentes temperaturas la pendiente de la curva , la sensibilidad y la base+ niebla cambian (Dowsett, 1999).

Es importante mencionar que la curva obtenida de los pasos sensitométricos puede ser utilizada rutinariamente para examinar la calidad de los procesos de revelado para el

mismo tipo de película o para evaluar las diferencias entre varios tipos de películas bajo condiciones de procesos semejantes (Dowsett, 1999).

ctura cúbica



Iones de plata

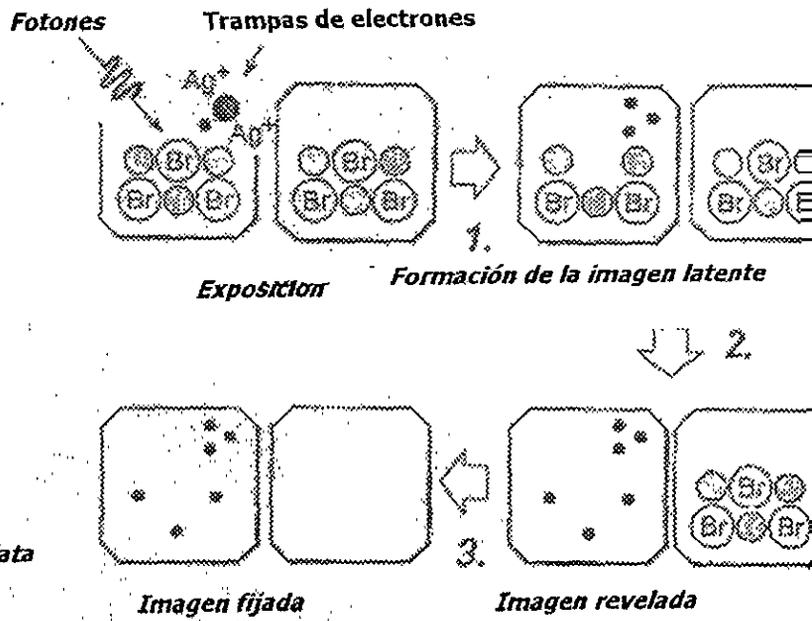


Fig 1 . Principio Fotográfico

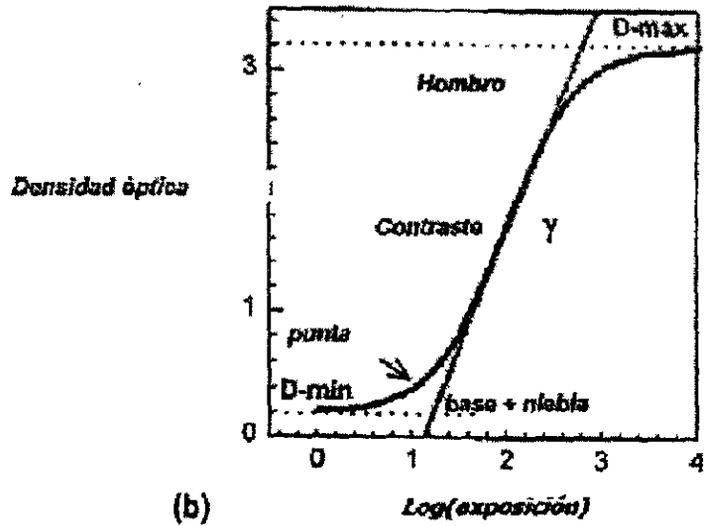
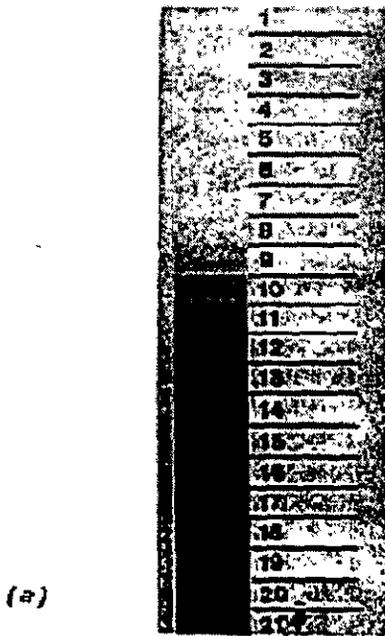


Fig.12. (a) Escala sensitométrica obtenida de un densitómetro calibrado, (b) Componentes de la curva característica.

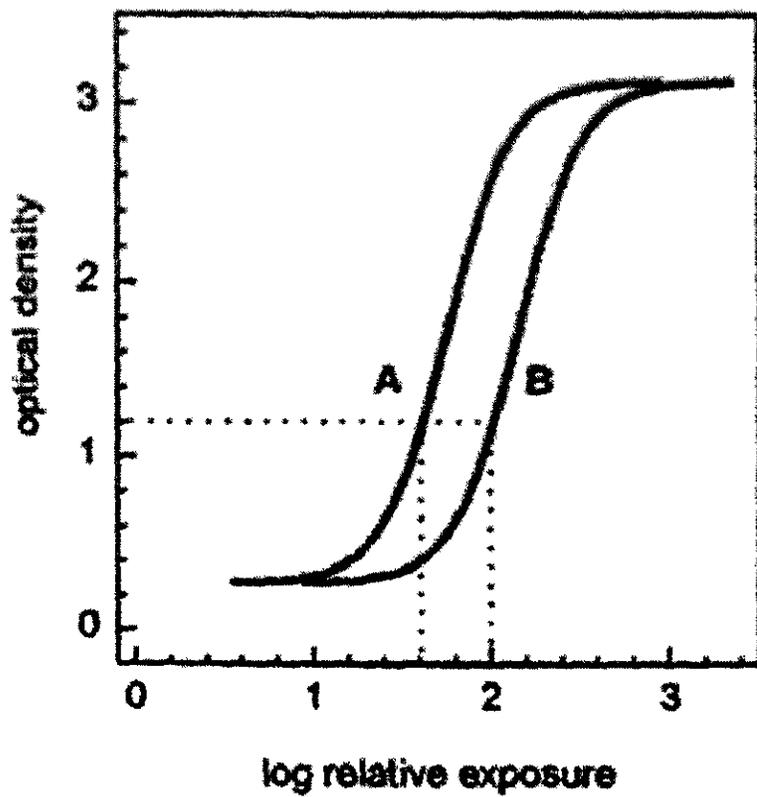


Fig.13 Curvas características de dos películas radiográficas con diferente sensibilidad: (A) más sensible y (B) menos sensible

CAPÍTULO IV

Diseño experimental

4.1 Diseño Experimental (Parte física)

4.1.1 Caracterización dosimétrica del irradiador Gammacell-200.

Los linfocitos humanos fueron irradiados en el Gammacell -200 del Instituto de Ciencias Nucleares (ICN), UNAM. Este irradiador está formado por 24 fuentes de ^{60}Co que emiten rayos gamma con energías de 1.17 y 1.33 MeV, en el 100% de las desintegraciones. Las fuentes son de forma cilíndrica y tienen una altura de 32 cm. Cada fuente contiene 5 pequeñas barras de ^{60}Co encapsuladas individualmente con acero inoxidable y soldadas al cilindro. Las fuentes se encuentran distribuidas en un contenedor anular que se localiza en el interior de la unidad (Fig 14). La mitad de la altura de la cámara de irradiación coincide con la mitad de la altura de la fuente.

Las muestras son irradiadas dentro de una cavidad llamada cámara de irradiación, cuyo diámetro y altura son: 8.6 cm y 14 cm, respectivamente. Esta cavidad se localiza en la parte central de un émbolo cilíndrico de acero inoxidable que se puede mover verticalmente a través del centro de la fuente hasta la posición de irradiación. Esto se hace mediante un motor eléctrico accionado por controles automáticos localizados en la parte frontal del irradiador (Fig 15)

La calibración dosimétrica del irradiador Gammacell-200 para la irradiación de linfocitos humanos consistió en medir la tasa de dosis a diferentes alturas en la cámara de irradiación. Esto se hizo usando dosímetros TLD-100 y utilizando la película de tinte radiocrómico HD810. Es importante mencionar que la calibración de la fuente de cobalto 60 que pertenece a la unidad Gammacell-200 fue realizada con base en la determinación de la razón de dosis en la parte central de la cámara de irradiación utilizando el dosímetro Fricke (García, 1979), además de considerar la información que se puede obtener de las curvas de isodosis de la cámara de irradiación (Manual de irradiador Gammacell-200, 1975).

4.1.2 Irradiación de los dosímetros TLD-100

Previamente a la irradiación, 9 dosímetros TLD-100 se hornearon durante 1 hr a 400 °C en un horno automático para borrar cualquier señal capturada por los dosímetros antes de su uso. Un día después, 4 de estos dosímetros se colocaron uno por uno entre dos placas de lucita de 7 mm de espesor para asegurar equilibrio de partícula cargada (EPC) durante la irradiación. Cada una de las lucitas se colocó a 3 cm de la cámara de irradiación y se irradió a 2, 4, 6 y 8 Gy. Luego, con el propósito de conocer la tasa de dosis a diferentes alturas, se irradiaron 5 dosímetros TLD-100 del mismo lote, a 4 Gy. Éstos se colocaron en el centro del interior del tubo cónico y a lo largo de éste. Los dosímetros se sostuvieron en el centro

del tubo con pedazos de algodón. El tubo cónico se colocó en el interior de una funda cónica de lucita de 2.5 mm de espesor y 12 cm de altura. Esto se hizo con la finalidad de asegurar EPC (Fig 16). Dicho tubo fue irradiado en el centro de una base de unigel de 3 cm de altura y 8.6 cm de diámetro. La base de unigel se colocó en la base de la cámara de irradiación. Al día siguiente todos los dosímetros irradiados se leyeron en el equipo lector Harshaw 3500. Este equipo posee una plancheta, zona donde se colocaron y se calentaron uno por uno los cristales. La luz emitida por el dosímetro al ser calentado llegó a un tubo fotomultiplicador que la convirtió en una señal eléctrica, la amplificó e integró en el tiempo y se obtuvo la carga total. Para integrar la señal se fijó la rapidez con la cual fueron calentados los dosímetros, es decir, la tasa de calentamiento (q) constante, así como un intervalo de temperatura, ventana de integración, para integrar la señal desde una temperatura inicial (T_1) hasta una temperatura (T_2). La señal emitida por debajo de T_1 y por arriba de T_2 no contribuyeron a la señal integrada.

Las condiciones de operación del equipo 3500 fueron:

Tasa de calentamiento: 10 C/s

Voltaje de operación: 891V

Suministro de gas nitrógeno

Temperatura promedio del laboratorio: 19 C

El parámetro dosimétrico medido en este trabajo es la cantidad total de luz emitida transformada a carga eléctrica (μC) por el tubo fotomultiplicador.

Se hizo la curva de calibración de los dosímetros TLD 100 irradiados con rayos gamma de 1.25 MeV a 2, 4, 6 y 8 Gy.

4.1.3 Irradiación de la película HD810

Se usó la película HD810 para medir la tasa de dosis a diferentes alturas en la cámara de irradiación. En el interior de un tubo cónico se colocó una tira de 12 cm de largo x 0.5 cm de ancho de dicha película. Dicha tira estaba marcada a diferentes alturas (3, 5.3, 6.4, 7.7, 10, 11.1, 12.4, 14 cm). Se puso algodón en los lados de esta tira para mantenerla fija dentro del tubo. Éste también se irradió con la funda de lucita para cumplir con el EPC (Fig 16) y se colocó sobre la base de unigel en el centro de la cámara de irradiación. La película fue irradiada a 100 Gy y su respuesta se determinó 48 hrs después de la irradiación. Para determinar la respuesta de la película irradiada se utilizó un escáner y con el programa Osiris se delimita en la pantalla de la computadora las regiones previamente marcadas y escaneadas. Dicho programa proporciona el tono de gris de la región que se marca. Es importante mencionar que el programa Osiris se utiliza bajo condiciones y parámetros ya establecidos, tales como el nivel de filtro azul, verde y rojo, así como el número de píxeles en los que se escanea la imagen. Dicha condiciones son las mismas cada vez que se escanea una película. Una vez que se conoce el tono de gris de cada región de la película se determina su respuesta individual mediante la ecuación 14.

Para determinar la dosis correspondiente a la respuesta de cada región delimitada en la película, se utilizó una curva de calibración de las películas HD810 irradiadas con rayos gamma de 1.25 MeV. Finalmente se graficaron los valores de la respuesta vs dosis y se hizo un ajuste lineal de los puntos experimentales. Con los valores de las variables de la recta $y = mx + b$ y despejando a la variable x , se obtienen los valores de la dosis recibida en cada una de las regiones marcadas en la película. En el caso de este experimento se tiene que:

$$Y(\mu C) = 0.0017X(Gy) \quad (21)$$

donde Y = respuesta y X = dosis.

El comportamiento de la tasa de dosis a lo largo del eje Y obtenidos de la dosimetría hecha con la película HD810 y con la de los dosímetros TL se compararon con el comportamiento que muestran las curvas de isodosis que ofrece el manual del fabricante (Figura 17).

4.2 Diseño experimental (Parte biológica)

4.2.1 Cultivo de linfocitos

Los linfocitos humanos se obtuvieron de tres donadores sanos. En tubos cónicos estériles, 3×10^6 linfocitos en promedio fueron incubados en medio RPMI-1640 suplementado con aminoácidos no esenciales, glutamina y 15 % de suero fetal bovino (SFB). Se adicionó a los cultivos 200 μ l de Fitohemaglutimina (PHA) en un volumen total de 5 ml. Después de 24 hrs de cultivo, las células se irradiaron a las dosis de 2, 4 y 6 Gy. Después de hacer el cultivo de los linfocitos que serían irradiados, se congelaron linfocitos en estado G_0 (G_01) para hacer después la extracción de su proteína. Al mismo tiempo se realizó también un cultivo de linfocitos (G_02) al cual no se le adicionó fitohemaglutimina y permaneció en la incubadora 48 hrs (24 hrs de proliferación y 24 hrs después de darle tratamiento al resto de los cultivos).

Dado que los tubos irradiados estarían fuera de la incubadora durante un lapso promedio de 40 min (tiempo que dura el desplazamiento al ICN y el de la irradiación de las muestras) se utilizaron dos tubos como controles (C1 y C2), el C1 permaneció en la incubadora durante el tiempo que duró la irradiación junto con el tubo al que se le daría tratamiento con AcD, mientras que el C2 permaneció bajo las condiciones de los tubos irradiados. Los cultivos de linfocitos se irradiaron de la misma forma como se irradiaron los dosímetros TL y la película HD810. Después de la irradiación y del tratamiento con AcD, los cultivos se metieron a la incubadora y 24 hrs después se centrifugaron durante 10 min a 3200 rpm, se descartó el sobrenadante (líquido que resulta después de la centrifugación).

4.2.2 Extracción de la proteína

El botón celular se resuspendió en 1 ml de PBS con azida. Los linfocitos se pasaron a tubos eppendorf y se centrifugaron a 10000 rpm durante 3 min. El botón celular se resuspendió en una solución de inhibidores de proteasas (aprotinina, PMSF, ortovanadato y azida), luego se dejaron incubar en hielo durante 1 hr. Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min. El sobrenadante fue recuperado, se tomaron 5 μ l de esta muestra para hacer la cuantificación de la proteína por el método de Bradford.

4.2.3 Cuantificación de la proteína por el método de Bradford

Para la cuantificación de la proteína por el método de Bradford, se hizo en primer lugar una curva estándar de albúmina. Esta curva se obtuvo colocando en diferentes tubos eppendorf 0, 10, 20, 40 y 80 μ l de albúmina. Después, a cada uno de los tubos se le agregó 1 ml de colorante Bradford y se incubó durante 2 min. En una celdilla de cuarzo se midió la absorbancia (595nm) en el espectrofotómetro. A las muestras que contenían 5 μ l de la resuspensión de proteínas se les adicionó 95 μ l de cloruro de sodio y se midió la absorbancia. Luego, con el programa estadístico Graphplot se graficó la absorbancia de cada una de las concentraciones de la curva de albumina vs la concentración y se ajustó una recta a estos datos. Con esta curva de calibración y dando los valores de absorbancia al programa estadístico de cada una de las muestras, se obtuvo la concentración de proteína.

4.2.4 Detección de la expresión de la proteína P53 en linfocitos de sangre periférica humana por medio de la técnica de Western Blot.

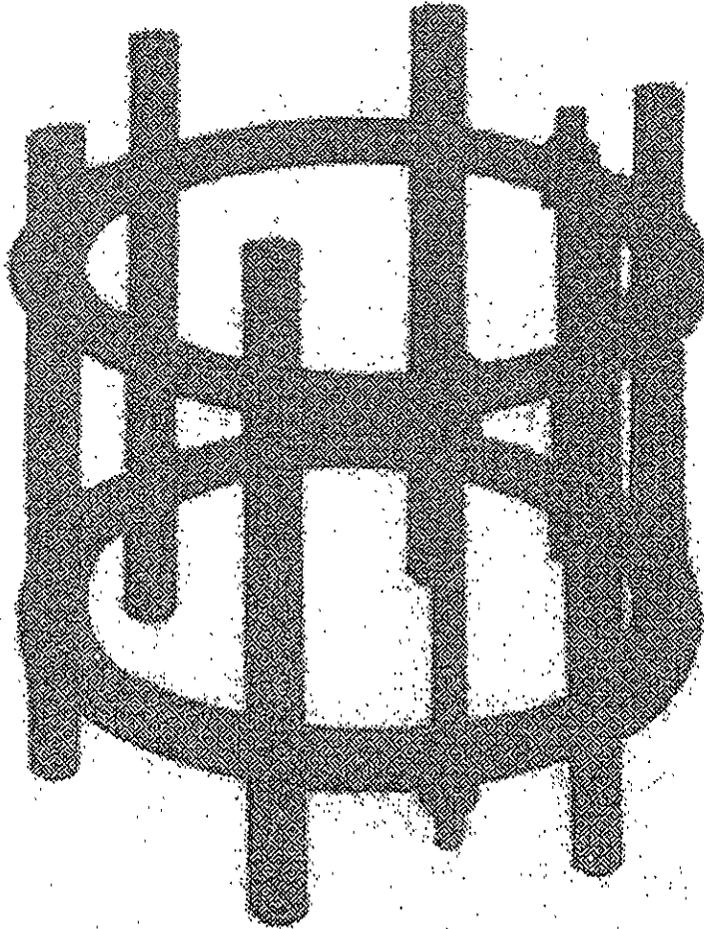
Para la realización de las inmunodetecciones, se calentaron 40 μ g del lisado total de proteínas durante 5 minutos en una solución amortiguadora de muestra para corrimiento (2 % de SDS, 80 Mm DE Tris PH 6.8, 10 % de glicerol, 5% de mercaptoetanol y 0.01 % de azul de bromofenol). Posteriormente, las proteínas fueron separadas en un minigel al 12% de SDS-policrilamida (Mini Protean, Bio Rad) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Mini Trans-Blot). La membrana fue bloqueada con leche en polvo baja en grasas (1 %) y en albúmina sérica (1%), se incubó durante 24 hrs con 1 μ g/ml del anticuerpo anti-p53 nuevo (Santa Cruz Biotechnology). El blot fue lavado tres veces durante 15 minutos con una solución de tween al 0.1 % en TBS, finalmente la membrana fue incubada por 1 hr con un anticuerpo anti- IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Amersham) diluido 1: 3000. La membrana nuevamente fue lavada tres periodos de 15 minutos, el blot fue revelado con el método de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Paralelamente, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-actina. La detección de la proteína actina se usó como control de expresión constitutiva y cargado del gel.

4.3. Sensitometrías

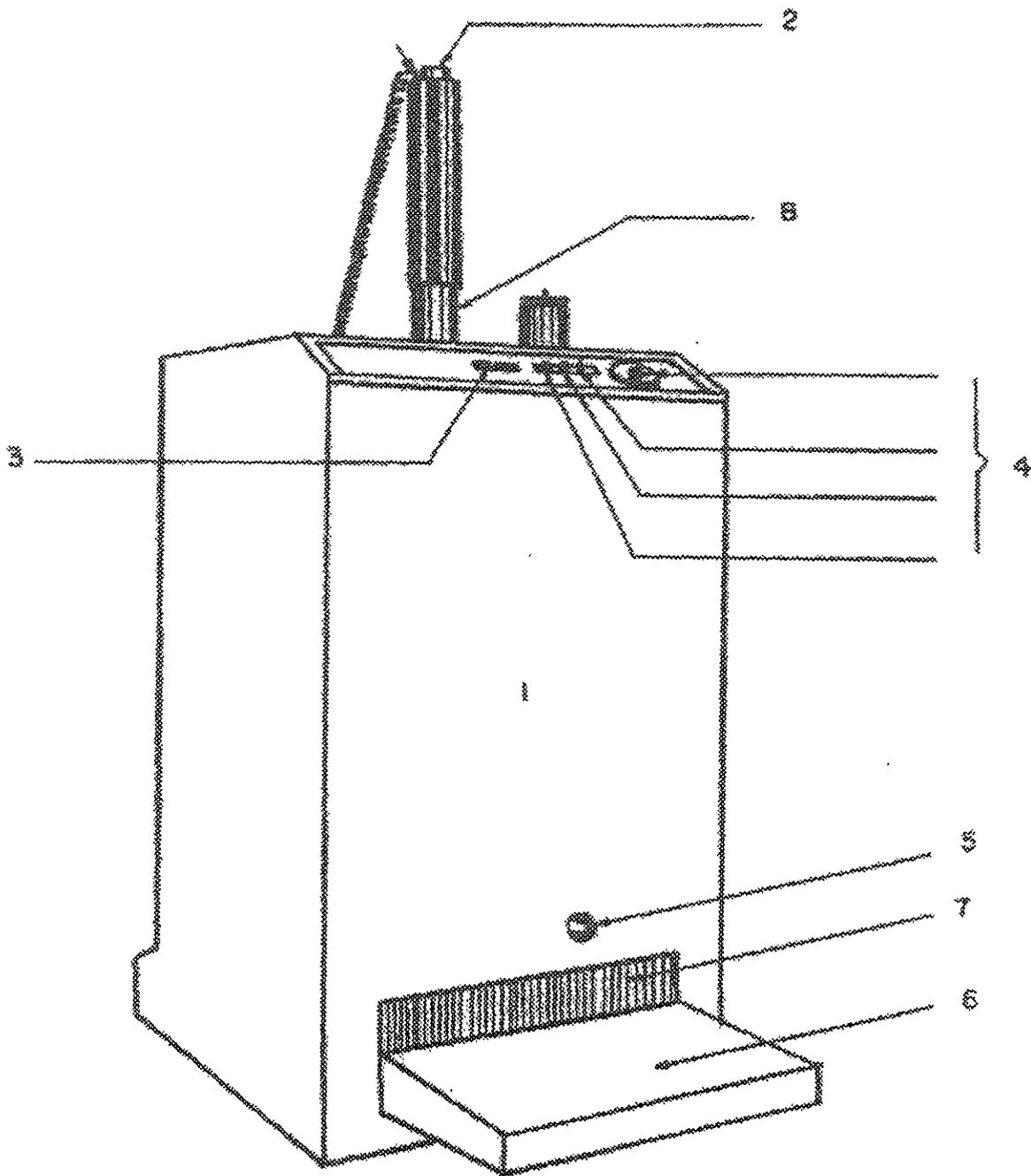
Para llevar a cabo el protocolo de trabajo del proceso de revelado, la sensitometría de las películas Kodak e Hiperfilm se hizo variando el tiempo de revelado y la temperatura del revelador. Las sensitometrías se hicieron utilizando un sensitómetro dual. Estas películas

fueron expuestas a la luz azul del sensitómetro cuya longitud de onda es de 455 nm. Las primeras permanecieron en el revelador durante 12 seg, 15 seg , 18 seg, 4 min, 5 min y 6 min, mientras que las segundas se mantuvieron en el revelador durante 12 seg, 15 seg, 30 seg, 1 min y 2 min. Todas las cintas sensitométricas se dejaron en el fijador durante 5 min y después se hizo el lavado de la película dejando caer un chorro continuo de agua sobre la película. Este procedimiento se aplicó a todas las películas en las que se usó un revelador nuevo cuya temperatura era de 20 °C y 27 °C. La temperatura de éste se midió con un termómetro digital. Se utilizó aire acondicionado para que tanto el cuarto de revelado como el revelador alcanzaran una temperatura de 20 °C.

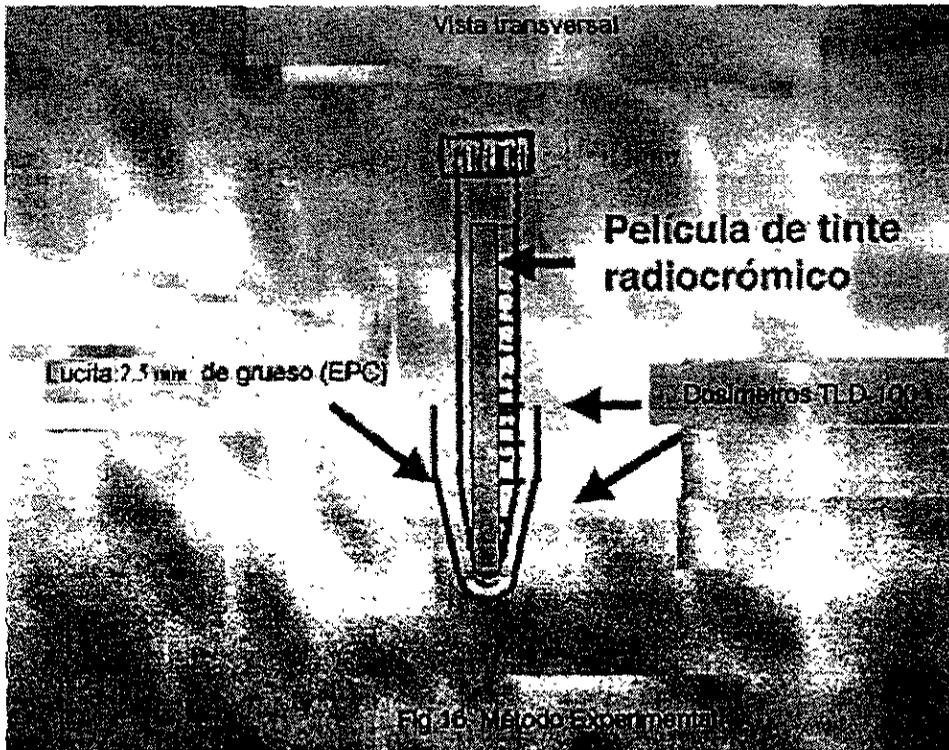
La temperatura del revelador se controló sumergiendo en agua a la temperatura deseada la solución reveladora. Posteriormente, con un densitómetro calibrado se determinó la densidad óptica de cada una de las bandas de la tira sensitométrica y después se graficó la curva característica.



14. Arreglo de las fuentes radiactivas de ^{60}Co en el irradiador Gammacell-200. a consta de 24 fuentes sólidas en forma de lápices, distribuidas en geometría drica.



. Irradiador Gammacell 200 (Instituto de Ciencias Nucleares UNAM). La lista de un conjunto de fuentes de ^{60}Co que se encuentran en el interior del). El émbolo en donde está la cavidad tiene un orificio (2) donde es posible cables o tubos delgados para la irradiación de líquidos a flujo continuo o en discontinuos. En el tablero (3) de la unidad se encuentran los controles (4), tanto para mover el émbolo, como para la medición automática del tiempo de irradiación. En control manual del émbolo (5), un escalón de acceso (6), un interruptor de (7) y la tapa de la cavidad (8). Figura tomada de la tesis de Licenciatura de García Colín Cristina 1995



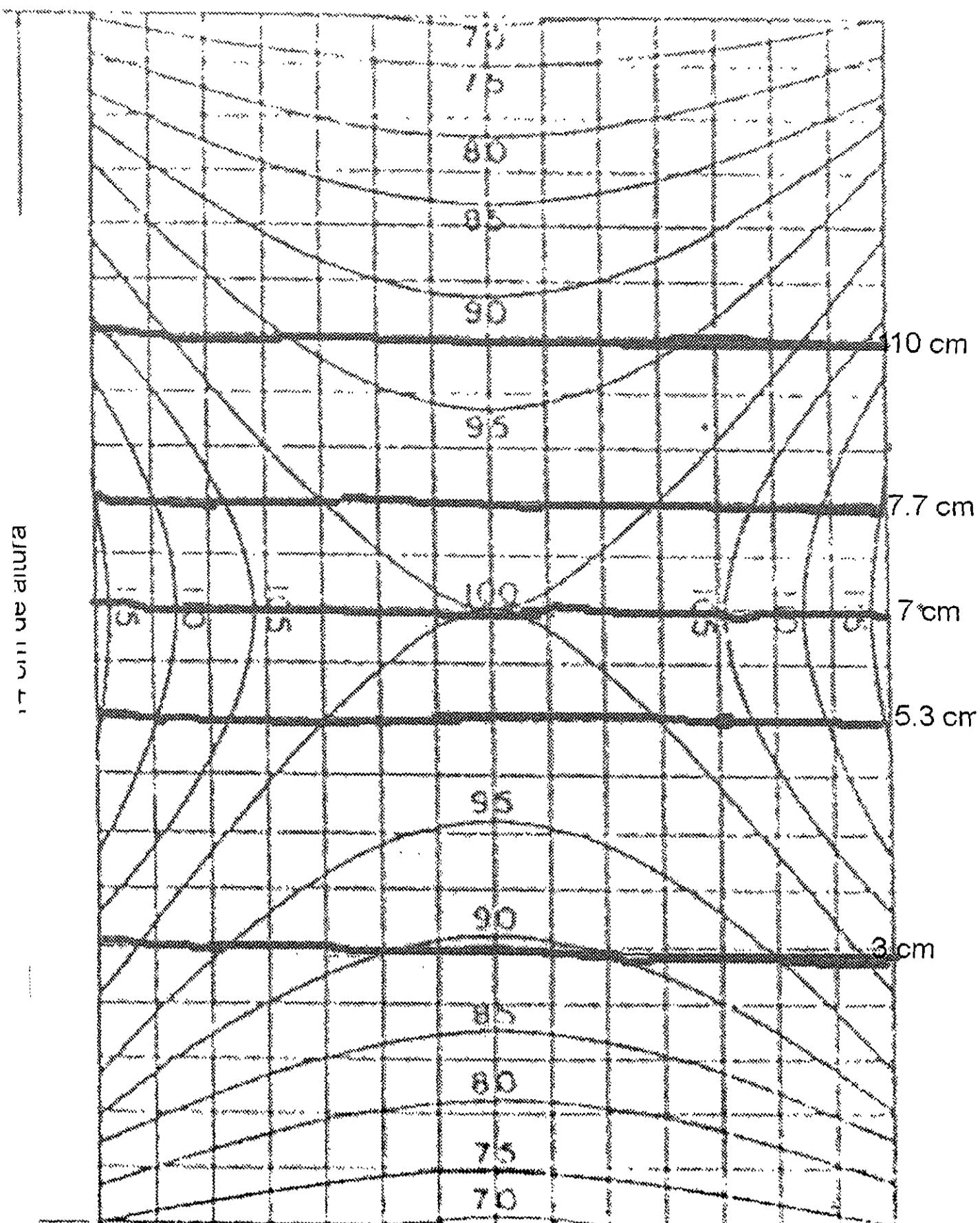
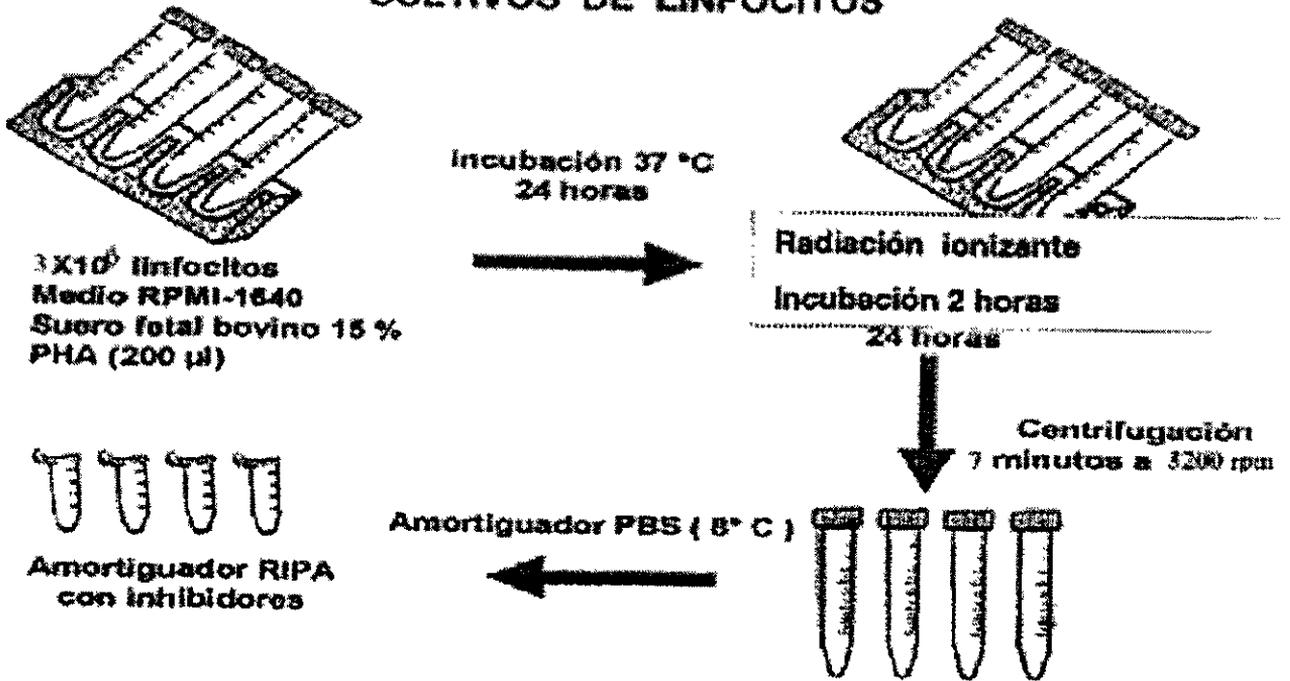


Fig 17. Curvas de isodosis del Gammacell-200

CULTIVOS DE LINFOCITOS



INMUNODETECCION

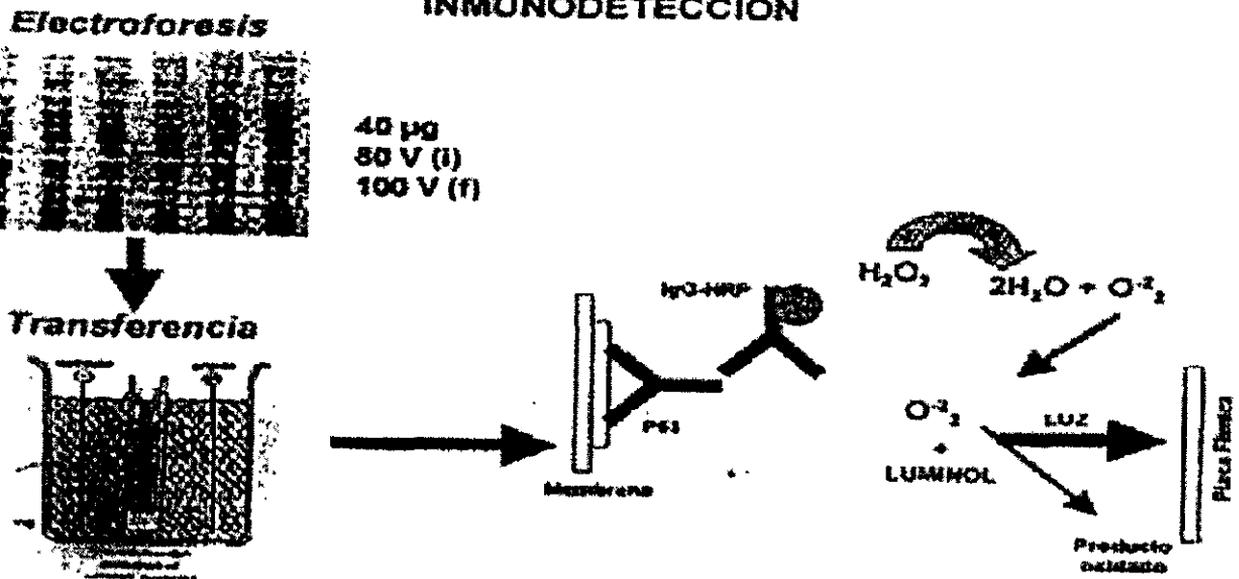


Figura 18. Método experimental

CAPITULO V

Resultados

5.1 Resultados de la caracterización dosimétrica del irradiador Gammacell-200

En la figura 19 se comparan los valores experimentales de la tasa de dosis respecto de los valores nominales. En esta figura se observa que la tasa de dosis aumenta a medida que se incrementa la altura en el eje vertical de la cámara de irradiación. La tasa de dosis máxima se obtiene a 7 cm de la base de dicha cámara. Estos resultados corroboran que la tasa de dosis máxima se alcanza a una altura igual a la mitad del largo de cada fuente. Las medidas experimentales (HD810, TLD-100) resultan ser consistentemente mayores que las nominales, sin embargo la dependencia de la dosis con la altura es la esperada.

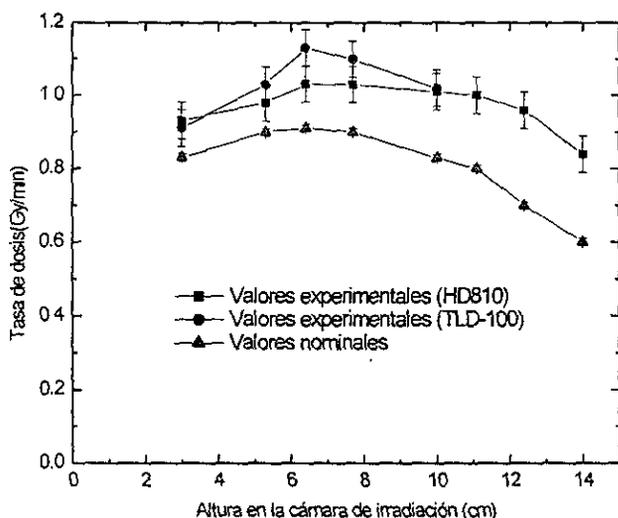


Fig. 19. Comparación de los valores experimentales y nominales de la tasa de dosis.

5.2 Resultados de las sensitometrías

Se encontró que la densidad óptica de la película Kodak al revelar durante 12 segundos puede reducirse a la tercera parte de la densidad óptica que se obtiene con 2 min de revelado, si la temperatura del revelador es de 27 °C (Fig 20).

La Fig 21 muestra resultados para la película Kodak revelada a 20 °C. En este caso, acortar el tiempo de revelado por debajo de 20 seg produce densidades ópticas que son inferiores a la mitad del máximo valor posible. Para la película Kodak la máxima densidad óptica se obtiene a 27 °C y a un tiempo de 2 min.

Un efecto similar se observa con la película Hiperfilm. A 20 °C (Fig. 22) grandes diferencias en densidad óptica se observan para tiempos de revelado largo y corto. En un factor de seis difiere la densidad óptica si se revela sólo durante 12 seg respecto de 6 minutos. A 27 °C (Fig. 23) la dependencia es mucho más débil apreciándose una disminución del 20% al reducir el tiempo de revelado de 2 min a 12 seg.

Estos resultados sugieren que el revelado de la película Hiperfilm a 27 °C presenta menos variabilidad en la densidad óptica como función del tiempo de revelado.

La figura 24 muestra el efecto de usar un revelador usado (en promedio seis veces) para procesar la película Kodak. La densidad óptica se reduce en un 20% con este uso de los líquidos.

En la figura 25 se observa que los valores en la densidad óptica no cambian al procesar la película Hiperfilm con un revelador nuevo o usado.

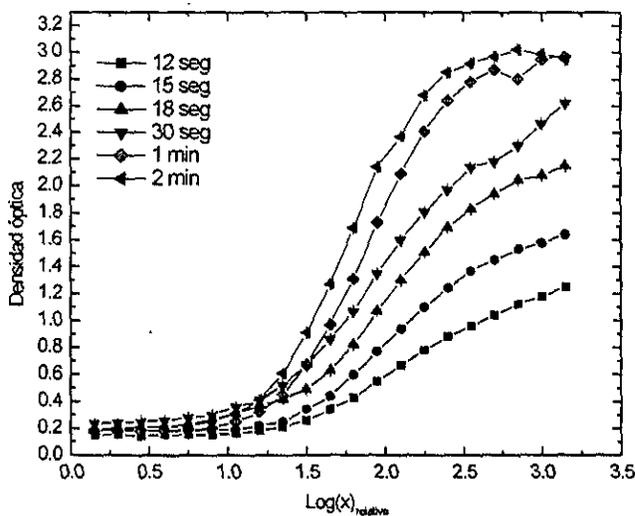


Fig. 20. Sensitometría de la película Kodak. Para el revelado de estas películas se usó un revelador nuevo cuya temperatura era de 27 °C. La cinta sensitométrica se dejó en el revelador el tiempo que se indica en la figura.

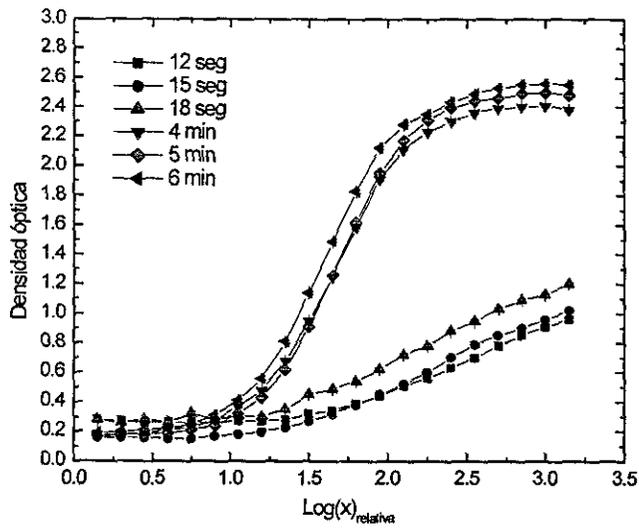


Fig. 21. Sensitometría de la película Kodak. Para el revelado de estas películas se usó un revelador nuevo cuya temperatura era de 20°C. La cinta sensitométrica se dejó en el revelador el tiempo que se indica en la figura.

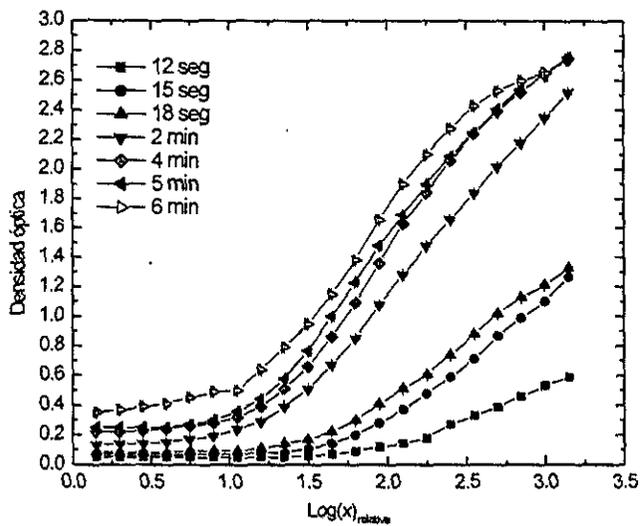


Fig 22. Sensitometría de la película Hiperfilm. Para el revelado de estas películas se usó un revelador nuevo cuya temperatura era de 20 °C. La cinta sensitométrica se dejó en el revelador el tiempo que se indica en la figura.

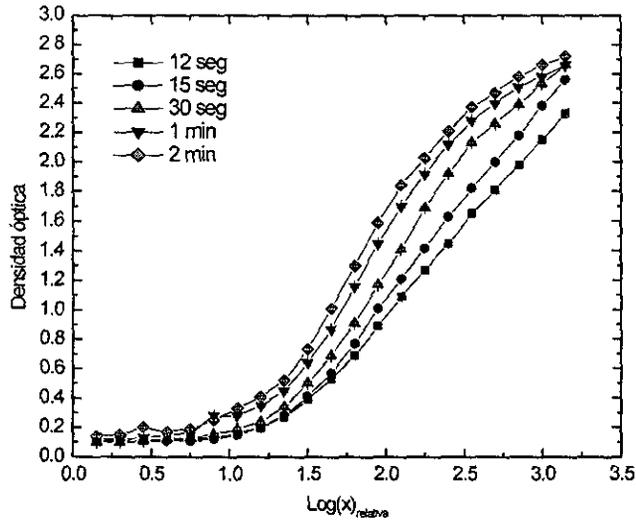


Fig. 23. Sensitometría de la película Hiperfilm. Para el revelado de estas películas se usó un revelador nuevo cuya temperatura era de 27 °C. La cinta sensitométrica se dejó en el revelador el tiempo que se indica en la figura.

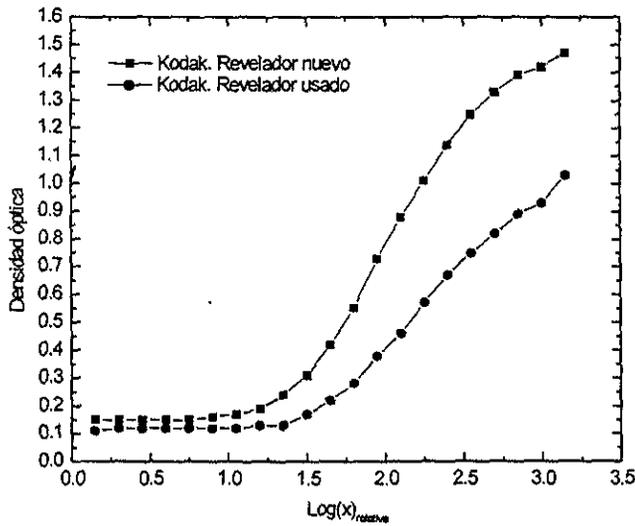


Fig 24. Sensitometría de las películas Kodak cuando se usa un revelador nuevo y usado.

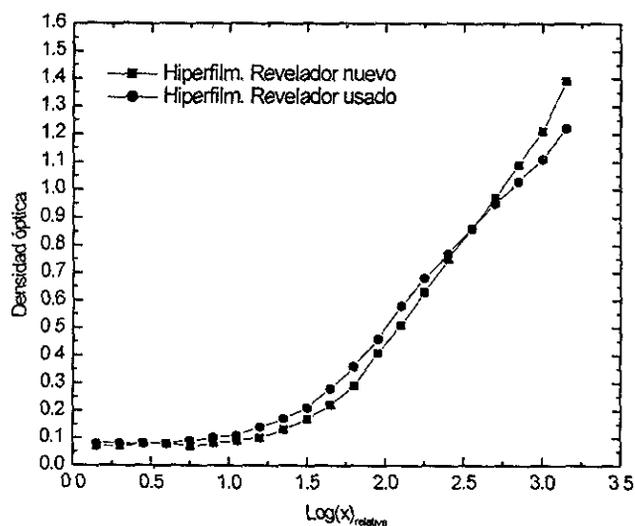


Fig. 25. Sensitometría de las películas Hiperfilm cuando se usa un revelador nuevo y usado.

En la tabla siguiente se pueden apreciar los valores de las pendientes de cada una de las curvas características de las figuras 20-24.

Tabla 1. Pendientes de las curvas características de las películas Kodak e Hiperfilm. Las pendientes se calcularon a través de la ecuación: $m = \Delta y / \Delta x$. Los dos puntos que se tomaron en el eje de las Y pertenecen a la parte lineal de la curva característica.

Tiempo de revelado (27 °C)	Pendiente		Pendiente relativa	
	Kodak	Hiperfilm	Kodak	Hiperfilm
12 seg	0.8	1.3	0.3	0.8
15 seg	1.1	1.3	0.4	0.8
18 seg	1.5		0.8	
30 min	1.9	1.6	0.5	0.9
1 min	2.8	1.7	1.0	1.0
2 min	2.8	1.7	1.0	1.0

Tabla 2. Pendientes de las curvas características de las películas Kodak e Hiperfilm. Las pendientes se calcularon a través de la ecuación: $m = \Delta y / \Delta x$. Los dos puntos que se tomaron en el eje de las Y pertenecen a la parte lineal de la curva característica.

Tiempo de revelado (20 °C)	Pendiente		Pendiente relativa	
	Kodak	Hiperfilm	Kodak	Hiperfilm
12 seg	0.5	0.1	0.2	0.1
15 seg	0.5	0.6	0.2	0.3
18 seg	0.7	0.6	0.3	0.3
2 min		1.3		0.7
4 min	2.3	1.6	0.9	0.9
5 min	2.4	1.7	1.0	0.9
6 min	2.4	1.8	1.0	1.0

Los resultados de la sensitometrías sugieren que las condiciones óptimas para la detección de la proteína P53 en la parte del método quimioluminiscente son:

Temperatura del revelador: 27° C

Tipo de película radiografía: Kodak

Tiempo de revelado: 2min

Con estas condiciones, la pendiente de la curva sensitométrica es máxima. Esto asegura el máximo contraste en la imagen.

5. 3 Resultados (Parte biológica)

5.3.1 Efectos de la radiación ionizante (rayos gamma del 1.25 MeV) en linfocitos humanos

Se irradiaron los linfocitos de sangre periférica de tres donadores sanos. El protocolo para la detección de la proteína P53 consistió en exponer 25 minutos las membranas de nitrocelulosa en contacto con la placa fotográfica Kodak dentro de un chasis y fue revelada durante 2 min en una solución reveladora nueva. La temperatura del revelador en cada experimento fue de $23\text{ °C} \pm 2$.

En la figura 26 se presentan las inmunodetecciones de los tres donadores. Se observa lo siguiente:

La banda $G_0/1$ no se detecta porque es el estado en el que el metabolismo principal de la célula se encuentra disminuido. En este estado las células no están proliferando y por consiguiente se espera que no aparezca banda de P53.

La banda de G₀2 que corresponde a los cultivos de los linfocitos sin PHA pero que permanecieron en cultivo hasta la extracción de la proteína, no se detecta en el donador 1 y donador 3 lo cual coincide con lo esperado ya que a este cultivo no se le adicionó PHA, sustancia que estimula la proliferación de los linfocitos; sin embargo tal banda si aparece en el donador 2.

En el donador 2 y 3 se observa que la expresión de P53 se incrementa con las dosis de radiación ionizante. En estos donadores, el nivel de inducción de P53 producido por la AcD es comparable cualitativamente con el nivel de inducción generado con la dosis de 6 Gy. En cambio, bajo las mismas condiciones, en el donador 1, se observa que en las células irradiadas y tratadas con AcD, la inducción de la proteína P53 es menor y no presenta una relación dosis-respuesta de P53.

Por otro lado se puede notar que en el donador 1 y donador 3 no se detecta la banda correspondiente al cultivo que estuvo sujeto a las mismas condiciones de los cultivos irradiados. En dichos cultivos (C2) se esperaba detectar una banda basal de P53, sin embargo, se puede especular que se afectó la proliferación de los linfocitos al estar fuera (aproximadamente 45 minutos) de una atmósfera de dióxido de carbono y oxígeno y al no permanecer bajo temperatura controlada (37 °C).

Cabe señalar que los donadores 1 y 2 fueron previamente analizados en el Departamento de Medicina y Toxicología Ambiental y se observaron diferentes patrones de expresión de P53 en cultivos de linfocitos. En el donador 1, con 7 minutos de exposición no se detectó la proteína P53 bajo ninguna condición (C1, As y AcD). Con este mismo tiempo de exposición en el donador 2, se detectó P53 en las células estimuladas y sin tratamiento (C1) y la banda se incrementó bajo la acción del As y la AcD.

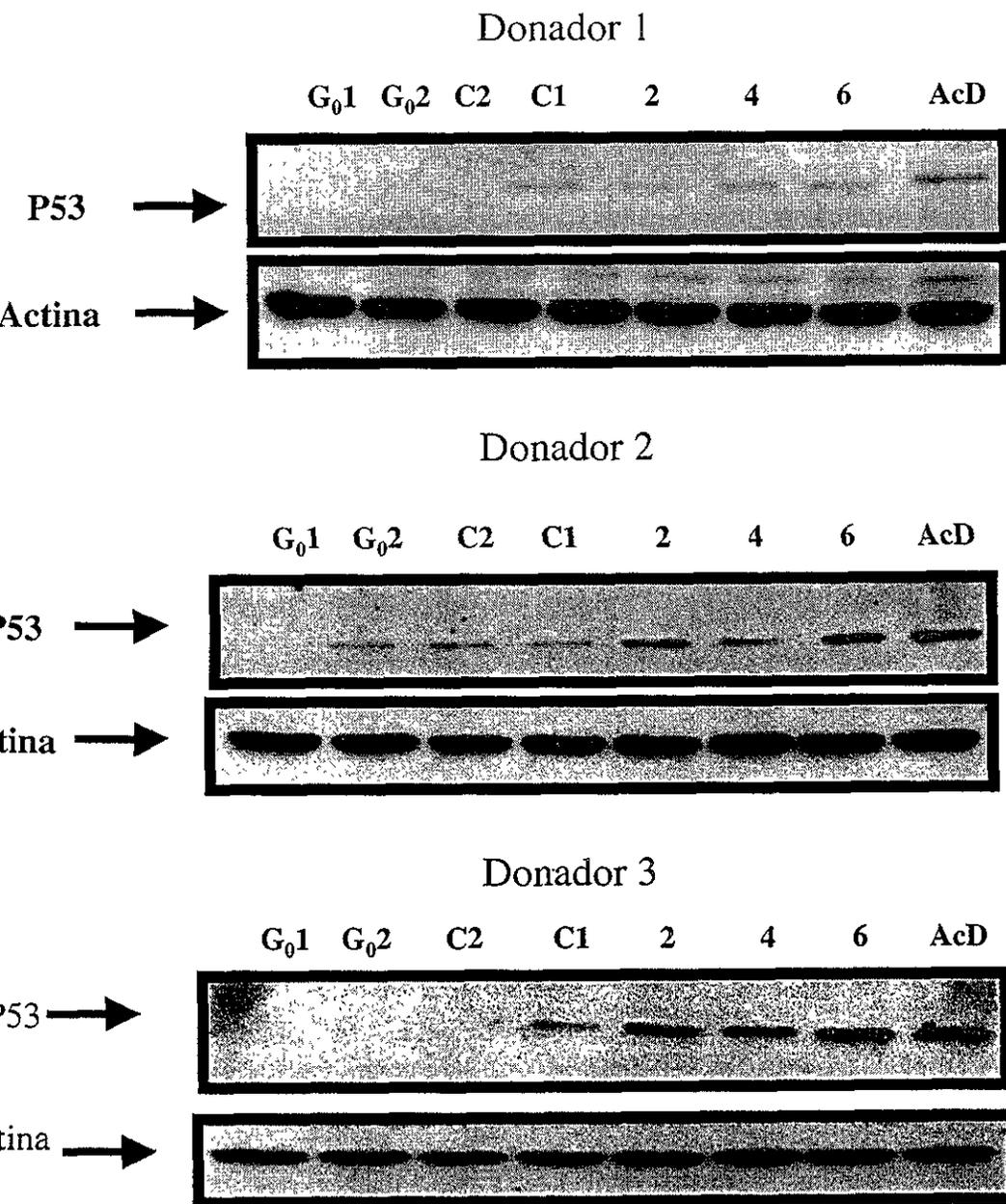


Fig 26. Expresión de la proteína P53 en linfocitos de tres individuos. Los linfocitos fueron irradiados a 2, 4 y 6 Gy y tratados con AcD (30 μ g/ml). Se analizó la proteína P53 por el método Western Blot 24 hrs después del tratamiento. El cultivo G₀1 corresponde a las células sin PHA, G₀2 corresponde al cultivo de los linfocitos sin PHA pero que permanecieron en cultivo hasta la extracción de la proteína, C2 es el control que permaneció bajo las condiciones de los cultivos irradiados y C1 es el control que permaneció bajo las mismas condiciones de los cultivos con AcD. Las inmunodetecciones se realizaron a un tiempo de exposición de 25 minutos. Se detectó la proteína actina como control de la concentración de la proteína en cada carril del gel.

CAPITULO VI

Discusión de los resultados

Se realizaron sensitometrías de las películas radiográficas, con el propósito de explorar si las diferencias en el patrón de P53 encontradas previamente en donadores sanos estaban influenciadas por factores físicos como la calidad de la imagen obtenida en el proceso de detección quimioluminiscente. Para esto se utilizaron dos tipos de películas: Kodak e Hiperfilm.

Se realizó la comparación de la respuesta de cada película radiográfica a diferentes tiempos de revelado, así como a dos temperaturas distintas del revelador. Además, se compararon las curvas características entre las películas Hiperfilm y las películas Kodak (Figs. 20-24).

Al comparar las pendientes de las curvas características correspondientes a los tiempos cortos de revelado de las sensitometrías de las películas Hiperfilm y Kodak usando un revelador nuevo de 20 °C y 27 °C de temperatura, se observa, que tales pendiente aumentan y por lo tanto, el contraste aumenta conforme incrementa el tiempo de revelado.

De ahí, el control de la temperatura del revelador, así como el tiempo de revelado son algunos de los parámetros físicos que deben de ser controlados para obtener reproducibilidad en las medidas de la densidad óptica. Asimismo, es esencial que las películas radiográficas sean utilizadas en la región útil entre la punta y el hombro. De otra forma se estarán utilizando en regiones de pobre contraste. Si no se optimiza el proceso de revelado de modo de trabajar con la máxima densidad óptica y pendiente posible no se está aprovechando todo el potencial que ofrece este producto comercial.

En relación a las condiciones óptimas de irradiación, se encontró que la tasa de dosis aumenta conforme se incrementa la altura en la cámara de irradiación hasta que la dosis máxima se obtiene a 7 cm de la base de la cámara, lo cual coincide con la posición de la máxima dosis registrada en las curvas de isodosis del manual del irradiador gammacell-200.

Con respecto a la homogeneidad del campo de radiación dentro del volumen que ocupa el tubo cónico, se encontró usando TLD-100 y PTR, una diferencia del 10% en la tasa de dosis medida a 7cm de la base de la cámara de irradiación respecto de la tasa de dosis registrada a 3 cm de altura, medidas que son consistentes con la inhomogeneidad nominal a lo largo del eje y de la cámara de irradiación. La Figura 19 muestra esta comparación. En esta figura se observa que los valores de la tasa de dosis obtenidos utilizando HD810 y TLD-100 coinciden, dentro de las incertidumbres de sus valores.

Con base en lo anterior los linfocitos se deben irradiar de forma tal que la mayoría de ellos queden en la posición de máxima tasa de dosis. En este trabajo se logró colocando la punta del tubo cónico a 3 cm de la base de la cámara.

Una vez caracterizado el Gammacell-200 se procedió a irradiar a los linfocitos de tres donadores sanos con la finalidad de detectar la proteína P53 mediante la técnica de Western Blot. Dado que el mecanismo de acción de daño de la radiación ionizante en las células eucariontes es conocido, se pensó que este agente físico podría servir como una herramienta para entender las diferencias observadas en el patrón de expresión de la proteína P53 en los linfocitos de sangre periférica de varios donadores. Con el propósito de alcanzar este objetivo primero se estableció un protocolo de trabajo tanto para la detección de la proteína P53 a través del método quimioluminiscente como del proceso de revelado.

Dado que se sabe que la intensidad máxima de la reacción quimioluminiscente es de 5 a 20 min (Amersham Life Science, protocols), el primer protocolo de trabajo para las inmunodetecciones consistió en colocar las membranas y la placa fotográfica en el chasis durante varios tiempos (5, 10 y 25 min). Con estos experimentos se determinó que el tiempo de exposición adecuado para capturar la máxima intensidad de la señal quimioluminiscente es de 25 min. Las inmunodetecciones mostradas en la figura 26 se hicieron bajo las condiciones de este protocolo.

La placa radiográfica que se utilizó en cada experimento fue Kodak ya que, de acuerdo a las sensitometrías mostradas en las figuras 20 y 21, resultó ser más sensible que las películas Hiperfilm.

Considerando los resultados de las sensitometrías se decidió revelar las placas radiográficas durante 2 minutos ya que es el tiempo medio entre el tiempo de revelado anteriormente usado (del orden de segundos, y determinado por la experiencia) y el tiempo que el fabricante de la película recomienda.

Las inmunodetecciones se realizaron a la temperatura del cuarto de revelado (23° C). En este lugar, el revelador y el fijador permanecen todo el tiempo y su temperatura siempre fue vigilada antes de usarse en los experimentos. En cada uno de estos se usó un anticuerpo P53 y peroxidasa nuevo, así como una solución reveladora nueva.

Es importante remarcar que este protocolo de trabajo tiene como propósito detectar las bandas de la proteína P53 para cada condición del experimento y no cuantificarlas aún cuando los resultados de las sensitometrías permitan hacerlo. En este trabajo tal cuantificación no fue posible realizarla por la ausencia de un sistema automatizado de temperatura en el cuarto de revelado. Además, la comparación cuantitativa de los niveles de inducción de P53 generados por RI respecto de los niveles de inducción producidos por la AcD no se llevó a cabo debido a la falta de un densitómetro que sirva para hacer el análisis de P53 correspondiente a muestras biológicas; sin embargo, en los resultados mostrados al parecer el daño causado por la RI a 6 Gy en los linfocitos de sangre periférica de los diferentes donadores es de la misma magnitud que el producido por la AcD. El hecho de

que el nivel de inducción de P53 a 6 Gy sea más notorio comparado con el nivel basal de P53 (controles) puede asociarse con la muerte de células efectuada por el proceso de apoptosis.

Aún cuando el tiempo de exposición de 25 min es grande comparado con los comúnmente usados (7 y 15 min) es el tiempo de exposición que asegura la determinación de la presencia o ausencia de la proteína P53.

CAPITULO VII

Conclusiones

La caracterización dosimétrica del irradiador de ^{60}Co nos ha permitido conocer la posición en la que se deben irradiar los tubos cónicos a lo largo del eje y de la cámara de irradiación para obtener la dosis requerida al menor tiempo posible y con máxima homogeneidad.

De los resultados de las sensitometrías se ha concluido que es fundamental tener un control sobre la temperatura del revelador, el tiempo de revelado, así como el tipo de placa radiográfica, ya que la falta de control de estos factores puede conducir a una interpretación biológica errónea.

Con respecto al control de calidad del proceso de revelado, los resultados de las sensitometrías tanto de las películas Kodak como los de las películas Hiperfilm, muestran que la temperatura del revelador y el tiempo de revelado influyen en la obtención del máximo contraste de la película radiográfica. Si se quiere utilizar la técnica del Western Blot como un método semicuantitativo para la detección de la proteína P53 se sugiere implementar un sistema automatizado para el control de temperatura en el cuarto de revelado.

Se recomienda que los experimentos de Western Blot se realicen bajo el protocolo de detección y de revelado ya establecido (25 min de exposición y 2 minutos de revelado) ya que esta metodología asegurará una interpretación confiable de los resultados biológicos. Es importante destacar que estas condiciones sólo son válidas para la detección de P53, para otras proteínas como el caso de la actina el tiempo de exposición y de revelado es mucho menor (del orden de 2 min de exposición y 1 min de revelado).

Por otro lado, se puede concluir que la radiación ionizante puede servir como un control positivo alternativo a la actinomicina D ya que la radiación ionizante daña directamente el ADN de las células, acción que conduce a la activación del gen p53. Por lo tanto, se espera que los linfocitos de todos los individuos sanos sean capaces de inducir a la proteína P53 en respuesta al daño.

Este trabajo experimental nos ha permitido, mediante la caracterización dosimétrica del irradiador Gammacell-200 para la irradiación de linfocitos y el establecimiento del protocolo de trabajo y de revelado para la detección de P53, saber que efectivamente los diferentes patrones de inducción de la proteína P53 observados en experimentos anteriores en diferentes donadores, no sólo pueden deberse a variaciones intrínsecas de los individuos sino también que posiblemente se deban a la falta de un protocolo de trabajo que homogeneizará el tiempo de exposición en el proceso quimioluminiscente y el tiempo de revelado. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que las diferencias

observadas en experimentos pasados sean producto de la susceptibilidad individual de las personas.

PERSPECTIVAS

Con el propósito de seguir entendiendo los diferentes patrones de expresión de la proteína P53 observados en varios individuos, se sugiere que las placas radiográficas Kodak correspondientes se procesen con solución reveladora a diferentes temperaturas (18-27 °C), manteniendo fijo el tiempo de exposición (25 min). De esta forma se podrían conocer los patrones de inducción de P53 de cada individuo a una temperatura de revelador diferente. La información obtenida de estos experimentos permitiría tener mayor reproducibilidad entre experimentos independientes.

Los resultados de este proyecto podrían permitir evaluar los factores *intrínsecos* y *extrínsecos* en la expresión de P53 para obtener los conocimientos básicos que validen su uso como un indicador biológico de susceptibilidad en la vigilancia (monitoring) de individuos en riesgo o expuestos de manera ocupacional o ambientalmente a sustancias tóxicas.

REFERENCIAS

- Attardi L, Lowe S, Brugarolas J, Jacks T (1996). Transcriptional activation by p53, but not induction of p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J*, 15: 3693-3701.
- Attix,F.H.(1979). The partition of kerma to account for bremsstrahlung. *Health Phys.* 36, 347; 36, 536.
- Attix.F.H. (1983). Energy imparted, energy transferred, and net energy transferred. *Phys. Med.Biol*, 28: 1385.
- Attix.F.H. (1986). Introduction to radiological physics and radiation dosimetry. John Wiley & sons, 4^a ed.
- Bender M (1963). Induced aberrations in human chromosomes. *Am J Pathol*, 43:26-44.
- Bourden JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P (1997). Further characterization of the p53 responsive element-identification of new candidate genes for transactivation by p53. *Oncogen*, 14: 85-94.
- Bruce et al (1994). *Biología Molecular de la célula*. Ediciones Omega, S.A, 3^a ed.
- Bryant, P.E., R.Warring and G. Ahnstrom (1984). DNA repair kinetics after low doses of X ray: a comparison of results obtained by the unwinding and nucleoid sedimentation methods. *Mutation Res.*, 131: 19-26.
- Cole et al. (1975). *Molecular Mechanism for repair of DNA*, Plenum Press, 2^a ed.
- Cornforth MN, Bedford JS (1983). X-ray-induced breakage and rejoining of human interphase chromosomes. *Science*, 222: 1141-1143.
- Cotran K et al. (1996), *Patología estructural y funcional*. Mcgraw-Hill interamericana, 5^a ed
- Dokomey, E., and J Franzke (1986). DNA repair Kinetics after exposure to X-radiation and to internal beta -rays in CHO cells. *Radiat Environ Biophys*, 25: 189-194.
- Donehower LA, Bradley A (1993). The tumor suppressor p53. *Biochimica Biophysica Acta*, 1155: 181-205.
- Dowsett, S (1994). *Practical Radiation Protection and applied Radiobiology*. Saunders Company, 2^a ed.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ECL Western Blotting protocols Amersham LIFE SCIENCE.

Elkind MM, Sutton H (1960). Radiation response of mammalian cells grown in culture: Repair of x-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Radiat Res*, 13: 556-593.

Evans HJ: (1999). Chromosome aberrations induced by ionizing radiation. McGraw-Hill Interamericana, 4^a ed.

García, L (1979) Calibración de fuentes de cobalto 60 de alta intensidad por medio de un dosímetro químico. Facultad de Ciencias, UNAM.

Geard C (1987). Effects of radiation on chromosomes. FL CRC Press, 3^a ed.

Gottlieb T, Oren M (1996). p53 in growth control and neoplasia. *Biochimica Biophysica Acta*, 1287: 77-102.

Graña X, Reddy P (1995). Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent Kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKIs) *Oncogene*, 11: 211-219.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994). Mutation in the p53 tumor suppressor Gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 53: 5377-5381

Hall, E (1994). Radiobiology for the Radiologist . Lippincott Company, 4th ed.

Han Z et al. (1995). Evidence for a G2 Checkpoint in p53-Independent Apoptosis Induction by X-irradiation *Mol and cell biology* 15: 5849-5857.

Hansen RS, Braithwaite AW (1996). The growth-inhibitory function of p53 is separable from transactivation, apoptosis, and suppression of transformation by E1a and Ras. *Oncogene*, 13: 995-1007.

Hesketh R. (1997). The Oncogene and Tumor suppressor Gene, 2nd ed.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris C (1991). p53 mutation in human cancers *Science*, 253:49-53.

Hung DT, Jamison TF, Schreiber SL (1996). Understanding and controlling the cell cycle with natural Products. *Chem Biol*, 3: 623-639.

Hutchinson, F (1993). Molecular biology of mutagenesis of mammalian cells by ionizing radiation. *Semin Cancer Biol*, 4: 85-92.

Castan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in Ataxia Telangiectasia. *Cell*, 71: 587-597.

Ko L, Prives C (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Development*, 10: 1054-1072.

Lane, D.P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358: 15-16.

Levine AJ (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331.

Manual del irradiador Gammacell-200, 1975.

Matsudaira, M., I. Furuno, A.M. Ueno, K. Shinomara and K. Yoshizawa (1977) Induction and repair of strand breaks and 3'-hydroxy terminals in the DNA of mammalian cells in culture following γ -ray irradiation. *Biochim Biophys Acta*, 476: 97-107.

Mayer, P J., C S Lange, M.O Bradley and W.W. Nichols (1989). Age-dependent decline in rejoining of X-ray-induced DNA double-strand breaks in normal human lymphocytes. *Mutation Res*, 219. 95-100.

Murray AW (1992). Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature*, 359: 599-604.

Núñez G, Clarke M (1994) The Bcl2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trend Cell Biology*, 4: 399-404.

Oren M, Prives C (1996). Meeting Report p53: upstream, downstream and offstream (review of the 8th p53 workshop). *Biochimica Biophysica Acta*, 1288: 13- 19.

Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry W, Kinzler KW, Vogelstein B (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci*, 91: 1988-2002.

Reed et al, (1985) Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci*, 82:4221-4224

Revell S (1983) Relationship between chromosome damage and cell death. In Ishihara T, Sasaki MS (eds): *Radiation-Induced chromosome Damage in Man*, 3rd ed.

Sabbatini P, Lin J, Levine AJ, White E (1995). Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Development*, 9: 2184-2192.

Sprawls, Jr (1987), *Physical Principles of Medical Imaging*. An Aspen Publication, 1sted.

- Schmid E, Regulle D, Guldbakke S, Schlegel D and Bauchinger M (2000). The effectiveness of Monoenergetic neutrons at 556 keV in producing Dicentric Chromosome in human Lymphocytes at low doses. *Rad Res*, 154: 307-312.
- Singh N, Danner D, Tice R, Brant L, Schneider E (1990). DNA damage and repair with age in individual Human lymphocytes. *Mut Res*, 237: 123-130.
- Singh, N.P, M.T. McCoy, R.R., Tice and E.L. Schneider (1988). A single technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.
- Smith M, Fornace A (1996). Mammalian DNA damage-inducible genes associated with growth arrest and apoptosis. *Mutation Res*, 340: 109-124.
- Turner J.E.,(1995). *Atoms, radiation and radiation protection*, John Wiley & Sons.
- Vogelstein B, Kinzler K (1992). p53 function and dysfunction. *Cell*, 70: 523-526.
- Weinberg RA (1985) The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. *Science*, 230: 770-776
- Weinstein IB, Zhou P (1997). Cell cycle control gene defects and human cancer. in. *Encyclopedia of Cancer*. Academic Press Inc. USA, 1: 256-267.
- Zentella de Piña M y Saldaña Y (1996). Papel Fisiológico de los radicales libres. *Boletín Educativo de Bioquímica*.