



Unidad Académica de Estudios Nucleares
Maestría en Ciencias Nucleares



**“DAÑO AL ADN Y SOBREEXPRESIÓN DE P53 Y HSP70
EN LEUCOCITOS MONONUCLEARES HUMANOS
EXPUESTOS A RAYOS X”**

**Tesis que en cumplimiento parcial de los requisitos
para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias Nucleares
con opción terminal en Ingeniería Nuclear**

presenta

Q.F.B. DIEGO CANO SÁNCHEZ

Director de tesis

Dra. Consuelo Letechipía de León (UAEN-UAZ)

Dr. Héctor René Vega Carrillo (UAEN- UAZ)

Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez (UACB-UAZ)

Zacatecas, Zac., México 2018



Consortio de
Universidades
Mexicanas

Asunto: Asignación de tema de tesis

Q.F.B. Diego Cano Sánchez
Alumno MCN
Presente

En relación a su comunicado, por medio del cual solicita el tema que deberá desarrollar como su tesis de maestría para obtener el grado de Maestro en Ciencias Nucleares, manifiesto lo siguiente.

Con esta fecha, se reunieron los señores Dra. Consuelo Letechipía de León y Dr. Fernando Mireles García, Responsable del Programa de Posgrado de la UAEN y estuvieron acordes en fijar a usted el siguiente

TEMA

“EVALUACIÓN DE DAÑO AL ADN MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE P53 Y HSP70 EN LEUCOCITOS MONONUCLEARES HUMANOS EXPUESTOS A RAYOS X”

Lo que comunico a usted para su conocimiento, manifestándole que para la presentación de la TESIS, esta no deberá ser impresa hasta en tanto no envíe siete copias de la misma, para ser revisada por la comisión que se nombra en su oportunidad para su aprobación o en su caso indicarle las correcciones que fueren pertinentes.

ATENTAMENTE
Zacatecas, Zac., a 13 de junio del 2018


Dr. Fernando Mireles García
Responsable Posgrado UAEN
uaen
Maestría en
Ciencias
Nucleares

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS “FRANCISCO GARCÍA SALINAS”

UNIDAD ACADÉMICA DE ESTUDIOS NUCLEARES

Calle Cipres # 10, Fraccionamiento La Peñuela, Col. Centro, Zacatecas, Zac., CP. 98000, Tel. 01(492) 922 70 43, Ext. 102
Correo Electrónico: idavila@uaz.edu.mx

**EVALUACIÓN DE DAÑO AL DNA MEDIANTE LA
EXPRESIÓN DE P53 Y HSP70 EN LEUCOCITOS
MONONUCLEARES HUMANOS EXPUESTOS A RAYOS X.**

Aprobada por el jurado:

Dra. Consuelo Letechipía de León

Dr. Héctor René Vega Carrillo

Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez

Dr. Jose Luis Pinedo Vega

Dr. Valentín Badillo Almaraz

Dedicatoria

A mi esposa Diana Cecilia y a mis hijos Diego y Natalia.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por contribuir a la realización de este trabajo a través del apoyo No. 406413.

A la UAEN, por brindarme el espacio para desarrollarme como alumno de maestría.

Dra. Chelo Letechipia por darme la oportunidad de trabajar en el proyecto de maestría, por su confianza, guía y asesoría durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. René Vega por su asesoría, observaciones y su apoyo a lo largo de la elaboración de la tesis y experimentación.

Al Dr. Sergio Hugo Sánchez por permitirme trabajar en el proyecto de maestría en su laboratorio, por su confianza y asistencia durante los experimentos.

A la QFB Jennifer Ortiz Letechipía y al QFB David Alejandro García López por su gran apoyo y asistencia durante el desarrollo de la parte experimental.

A mi hermano José Cano Sánchez por su apoyo y sus observaciones.

RESUMEN

Los rayos X empleados en medicina son una herramienta importante en el radiodiagnóstico, estas representan una fuente artificial significativa de exposición a la radiación ionizante para la población en general. Sin embargo, aunque las radiografías de diagnóstico brindan grandes beneficios, su uso implica un riesgo para desarrollar cáncer, generalmente aceptado por las dosis y el número de exposiciones que han sido consideradas no despreciadas principalmente para trabajadores de la salud. Se sabe que p53 es una molécula que dirige la corrección de daño al ADN y hsp70 es una proteína correctora de daño molecular cuando las células son sometidas a estrés. El objetivo del trabajo fue evaluar el daño al ADN así como la expresión de p53 y Hsp70 en leucocitos mononucleares humanos expuestos a Rayos X. El modelo biológico utilizado fue leucocitos mononucleares humanos de sangre periférica (LMHSP) y aislados por ensayo de exclusión de pacientes clínicamente sanos, la viabilidad celular y la cantidad celular inicial fueron evaluadas para cada dosis de exposición, se tomaron 14 alícuotas para el protocolo de exposición. Los leucocitos fueron expuestos a una fuente de rayos X provenientes de un equipo Marca Corix®, de 70 KVp-8mA y tiempo de exposición de 0.15s para diferentes dosis absorbida de: 2.3, 4.6, 9.1 y 13.7 mGy por triplicado. La respuesta del daño al ADN se cuantificó mediante electroforesis con gel de agarosa, la expresión de la p53 y Hsp-70 se realizó mediante PAGE-SDS Western Blot., para la identificación de p53 y Hsp70 se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos y se revelaron con DAB y H₂O₂, o bien con ECL. Los resultados para viabilidad celular inicial fueron del 100% y la cantidad celular fue de 88,333±4784 LMHSP. El comportamiento de viabilidad en el protocolo de irradiación se observó una diferencia significativa de disminución en comparación con el control negativo para las primeras tres exposiciones y en el comportamiento de la cantidad celular se observó un decremento significativo para las dos últimas exposiciones. Para el daño al ADN se observó un daño proporcional a la dosis de radiación recibida, aunque significativo solo para las dosis de 9.1, 13.7 mGy y control positivo (muestra sometida a estrés calórico, 44°C/1hr). Además, se observó una expresión basal de p53 y Hsp70 en el control negativo, y una sobreexpresión en las dosis de 9.1 y 13.7 mGy para p53 y Hsp70, así como para el control positivo (44°C/1hr). Conclusión: los hallazgos permitieron estimar una respuesta de daño molecular y que se pueden utilizar las proteínas p53 y hsp70 como bioindicadores por exposición para usuarios de equipos de rayos X con esas características y asume una importancia significativa en protección radiológica.

Palabras clave: Daño al ADN, p53, hsp70, leucocitos mononucleares, rayos X.

ABSTRACT

X-rays used in medicine are an important tool in radiodiagnosis, they represent a significant artificial source of exposure to ionizing radiation for the general population. However, although diagnostic radiographs offer great benefits, their use implies a risk to develop cancer, generally accepted by the doses and the number of exposures that have been considered not to be disregarded mainly for health workers. It is known that p53 is a molecule that directs the correction of damage to DNA and hsp70 is a protein that corrects molecular damage when cells are subjected to stress. The objective of the work was to evaluate the damage to the DNA as well as the expression of p53 and Hsp70 in human mononuclear leukocytes exposed to X-rays. The biological model used was peripheral blood human mononuclear leukocytes (PBHML) and isolated by clinical exclusion of patients. healthy, the cell viability and the initial cell quantity were evaluated for each exposure dose, 14 aliquots were taken for the exposure protocol. The leucocytes were exposed to a source of X-rays from a Corix ® equipment, of 70 KVp-8mA and exposure time of 0.15s for different absorbed doses of: 2.3, 4.6, 9.1 and 13.7 mGy. The response of DNA damage was quantified by agarose gel electrophoresis, p53 expression and Hsp-70 was performed by SDS-Western Blot PAGE, specific monoclonal antibodies were used for the identification of p53 and Hsp70 and revealed DAB and H₂O₂, or with ECL. The results for initial cell viability were 100% and the cellular amount was 88.333 ± 4784 LMHSP. The feasibility behavior in the irradiation protocol was observed a significant difference of decrease in comparison with the negative control for the first three exposures and in the behavior of the cell quantity a significant decrease was observed for the last two exposures. For damage to the DNA, damage was observed proportional to the dose of radiation received, although significant only for the doses of 9.1, 13.7 mGy and positive control (sample subjected to heat stress, 44 ° C / 1hr). In addition, a basal expression of p53 and Hsp70 was observed in the negative control, and an overexpression in the doses of 9.1 and 13.7 mGy for p53 and Hsp70, as well as for the positive control (44 ° C / 1hr). Conclusion: the findings allowed estimating a molecular damage response and that p53 and hsp70 proteins can be used as bioindicators for exposure to users of X-ray equipment with these characteristics and assumes a significant importance in radiological protection.

Keywords: DNA damage, p53, hsp70, mononuclear leukocytes, X-rays.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimientos.....	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tablas	xii
I INTRODUCCIÓN.....	1
Pregunta Científica.....	5
Hipótesis.....	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos.....	6
II REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Radiación	7
2.1.1 Radiación ionizante.....	8
2.1.2 Fuentes de radiación.....	8
2.1.3 Rayos X.....	9
2.1.3.1 Producción de rayos X.....	10
2.1.3.2 Acelerador lineal.....	13
2.2 Exposición a la radiación ionizante.....	14
2.2.1 Exposición interna y externa.....	14
2.2.2 Exposición a rayos X.....	16
2.3 Efectos de la radiación ionizante en la salud.....	17
2.3.1 Interacción con la materia.....	17
2.3.1.1 Ionización.....	17

2.3.1.2	Excitación	17
2.3.1.3	Radiólisis	17
2.3.2	Magnitudes y unidades dosimétricas.....	18
2.3.2	Efectos en la salud	20
2.3.3	Limites de dosis.....	22
2.4	Daño al ADN.....	23
2.4.1	Generalidades de la célula	23
2.4.2	Características de la célula	25
2.4.3	Generalidades del ADN.....	26
2.4.4	Efectos biológicos por radiaciones ionizantes	27
2.4.4.1	Daño directo e indirecto	28
2.5	Biomarcadores.....	30
2.5.1	Aplicaciones en investigación.....	31
2.5.2	Clasificación de los biomarcadores	32
2.5.3	biomarcadores de daño al ADN.....	32
2.5.4	Leucocitos mononucleares de sangre periférica	32
2.5.4.1	Clasificación de las células en la hematopoyesis	34
2.5.4.2	Función de los leucocitos y monocitos.....	35
2.5.4.3	Radiosensibilidad biológica.....	35
2.5.5	Proteínas	36
2.5.5.1	Proteínas de choque térmico (hsp)	36
2.5.5.2	p53.....	37
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.1	Caracterizar LMHSP a partir de la muestra obtenida.....	40
3.1.1	Obtención del material biológico.....	40
3.2	Aislamiento de linfocitos por ficoll-histopaque.....	41
3.3	Determinación de la viabilidad celular por ensayo de exclusión de azul tripano...42	

3.4 Exposición celular a rayos X.....	44
3.4.1 Arreglo experimental	44
3.4.2 Curva de calibración dosis-respuesta.....	45
3.5 Lisis celular.....	46
3.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	47
3.7 Determinación de niveles proteínicos de hsp-70 y p53 por western blot.....	49
3.8 Cuantificación de ADN.....	51
3.9 Evaluación de fragmentación al ADN mediante electroforesis.....	53
3.10 Análisis de gel de agarosa.....	53
3.11 Análisis estadístico.....	54
IV. RESULTADOS.....	55
4.1 Supervivencia celular a distintas dosis de rayos X.....	55
4.2 Viabilidad de LMHSP expuestos a distintas dosis de rayos X.....	56
4.3 Relación del número de células y viabilidad de distintas muestras frente a dosis...57	
4.4 Análisis de la integridad de ADN en LMHSP expuestos distintas dosis de rayos X.58	
4.5 Expresión de Hsp70 y p53 en linfocitos humanos expuestos a rayos X.....	59
V. DISCUSIÓN.....	61
VI CONCLUSIONES.....	64
VII PERSPECTIVAS.....	66
REFERENCIAS.....	67
ANEXOS.....	73
8.1 Biometría hemática completa mediante citometría de flujo.....	73
8.2 Soluciones utilizadas en niveles proteínicos de p53 y hsp70.....	74
8.3 Soluciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular.....	75
CURRICULUM VITAE.....	76

Índice de Figuras

FIGURA 1. Radiografía tomada por Wilhelm Röntgen en 1896.....	9
FIGURA 2. Generador convencional de rayos X.....	10
FIGURA 3. Tubo de rayos X tipo Coolidge de objetivo inmóvil.....	12
FIGURA 4. Ilustración del principio de operación de un acelerador lineal.....	13
FIGURA 5. Estructuras químicas de los componentes de los ácidos nucleicos.....	27
FIGURA 6. Clasificación del daño al ADN.....	28
FIGURA 7. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	29
FIGURA 8. Diferentes niveles de severidad del estrés oxidativo.....	30
FIGURA 9. Destino potencial de la célula en el ciclo celular.....	30
FIGURA 10. Linfocitos humanos de sangre periférica.....	33
FIGURA 10. Monocitos humanos de sangre periférica.....	33
FIGURA 11. Evolución de una célula sanguínea.....	34
FIGURA 12. Mecanismo de acción de las hsp's.....	37
FIGURA 13. Modelo que representa la detención del ciclo celular por radiación.....	38
FIGURA 14. Funciones más importantes de la proteína p53.....	39
FIGURA 15. Obtención de tejido sanguíneo (punción venosa).....	41

FIGURA 16. Distribución de las células linfoides en alícuotas para su proceso.....	42
FIGURA 17. Microscopio óptico y cámara de Neubauer.....	43
FIGURA 18. Dimensiones del área de conteo celular del hemocitómetro.....	43
FIGURA 19. Arreglo experimental transporte de células.....	44
FIGURA 20. Arreglo experimental exposición a Rayos X.....	45
FIGURA 21. Curva de calibración dosis absorbida-respuesta TLD.....	46
FIGURA 22. Curva de calibración para Bradford.....	48
FIGURA 23. Corrimiento de proteína en SDS-PAGE.....	49
FIGURA 24. Transferencia por vía semi-seca.....	50
FIGURA 25. Lavado de membrana de nitrocelulosa.....	51
FIGURA 26. Medición de las concentraciones de DNA en espectrómetro.....	52
FIGURA 27. Preparación de gel de Agarosa.....	52
FIGURA 28. Corrimiento de DNA en gel de Agarosa.....	53
FIGURA 29. Gel de agarosa en lámpara de UV.....	53
FIGURA 30. Fotodocumentador Chemidoc™ BioRad™.....	54
FIGURA 31. Supervivencia celular a distintas dosis de Rayos X.....	55
FIGURA 32. Viabilidad celular frente a distintas dosis de exposición a Rayos X.....	56
FIGURA 33. Fragmentación del DNA a distintas dosis de Rayos X.....	58
FIGURA 34. Expresión de Hsp70 en LHMSP expuestos a Rayos X.....	59
FIGURA 35. Expresión de p53 en LHMSP expuestos a Rayos X.....	59

Índice de Tablas

TABLA 1. Dosis efectivas para los estudios de rayos X comunes.....	16
TABLA 2. Relación de dosis y número de disparos en rayos X.....	45

TABLA 3.	Procedimiento para hacer la curva de calibración Bradford.....	48
TABLA 4.	Cantidad de proteína calculada para cargar SDS-PAGE.....	48
TABLA 5.	Concentraciones de DNA (ng/mL).....	51
TABLA 6.	Relación de No. de células y viabilidad frente a dosis.....	57

I INTRODUCCIÓN

Los seres humanos están constantemente expuestos a bajos niveles de radiación ionizante (RI) de fuentes naturales. Este tipo de radiación se conoce como radiación de fondo natural, y sus principales fuentes son: materiales radiactivos en la superficie de la tierra contenidos en carbón, granito, etc., gases radiactivos que se escapan del tierra (radón), rayos cósmicos del espacio exterior que entran en la atmósfera terrestre a través de la ionosfera y la radioactividad natural en el cuerpo humano ([Zamanian and Hardiman, 2005](#)).

También, la exposición humana a la radiación proviene de fuentes artificiales que van desde la generación de energía nuclear hasta el uso médico, para fines de diagnóstico o terapéutico, como los equipos de Rayos X. De acuerdo a la teoría de Maxwell de la radiación electromagnética, la energía cinética de los electrones es convertida en rayos X debido a la desaceleración abrupta de los electrones ([Basheerudeen et al., 2017](#)).

Existen dos principales vías para la exposición a la radiación ionizante en humanos, la exposición “externa” por materiales radiactivos fuera del cuerpo y la exposición “interna” por la ingesta e inhalación de materiales contaminados ([Shimura et al., 2015](#)).

Tenemos que, las radiografías de diagnóstico son la mayor fuente artificial de exposición a la radiación para la población en general ($\approx 98\%$) además, contribuyen con alrededor del 14% de la exposición anual total mundial de todas las fuentes de exposición. Sin embargo, brindan grandes beneficios, su uso implica un pequeño riesgo de desarrollar cáncer, tomándolo en consideración desde el punto de vista de bienestar para la salud. Así, el riesgo para un individuo es probablemente pequeño porque las dosis de radiación suelen ser bajas (<10 mGy), pero la gran cantidad de personas expuestas anualmente significa que

incluso los riesgos individuales pequeños podrían traducirse en un número considerable de casos de cáncer por ser considerados además acumulativos tanto para grupos como individuos (de [González and Darby, 2004](#)).

Además, las personas en riesgo de exposición recurrente a la radiación como los trabajadores de la salud y la industria nuclear, generalmente son monitoreados y restringidos a dosis efectivas de 100 mSv cada 5 años (es decir, 20 mSv por año), con un máximo de 50 mSv permitido en un año determinado, y para el público en general el límite de dosis efectiva anual recomendado es de 1 mSv por año ([Durham, 2006](#)).

La radiación ionizante contiene suficiente energía electromagnética para despojar los electrones de a los átomos y de moléculas que forman las células convirtiendo las moléculas total o parcialmente en iones ([Immel, 2016](#)). Por consiguiente, el material más vulnerable en la célula, es el ADN, porque simplemente no puede ser reemplazado además, el daño puede ocurrir debido a la hidrólisis de bases. En la mayoría de los casos, esta radiación proviene de fuentes exógenas ([Roos and Kaina, 2006](#)). Los riesgos de la exposición a la radiación han sido bien documentados entre los agentes ambientales. Sin embargo, los mecanismos de radiación ionizante a dosis bajas a largo plazo indujeron efectos sobre la salud aún poco conocidos ([Tang and Loke, 2015](#)). También, la evidencia experimental y epidemiológica ha vinculado la exposición a bajas dosis de radiación ionizante con el desarrollo de cánceres sólidos y leucemia ([Fazel et al., 2009](#)).

Para fines de protección radiológica, existe una relación dosis-respuesta lineal reportada en la literatura. Sin embargo, los cánceres que aparecen en el individuo irradiado ocurren después de un período latente de 5 a 50 años. Así mismo, el daño es consecuencia de las modificaciones moleculares producidas en el momento en que las células son expuestas a radiación ionizante. Los efectos deterministas (antes no estocásticos) son efectos cuya severidad varía con la dosis y se asume un umbral, dentro de estos se incluyen cataratas en la lente del

ojo, eritema de la piel (enrojecimiento), agotamiento celular en la médula ósea que causa deficiencias hematológicas, daño celular a las gónadas que conduce a deterioro de la fertilidad y daño a los vasos sanguíneos o tejido conectivo en muchos órganos ([Durham, 2006](#)).

Por otro lado, los efectos biológicos a bajas dosis de radiación se han investigado y debatido durante más de 100 años, esto ha propiciado incertidumbre en relación a exposiciones intermedias y altas de radiación ionizante (>100 mSv), administradas de forma aguda o durante un período prolongado, produciendo consecuencias perjudiciales en los seres humanos, en las que se incluye, el cáncer. Para dosis más bajas, los efectos son menos claros, como: en la mayoría de los exámenes radiológicos producen dosis en el rango de 3 a 30 mSv. Comprender los riesgos de dosis bajas de radiación aún son consideradas significativamente importantes para la sociedad, en relación con cuestiones tan variadas como las pruebas de detección del cáncer, futuro de la energía nuclear, riesgos de viajeros frecuentes, exposición ocupacional a la radiación, exploración espacial tripulada y terrorismo radiológico ([Brenner et al., 2003](#)).

Como respuesta a la exposición por la radiación como parte de la vida cotidiana, no existe un límite umbral establecido para la dosis mínima segura, que no pueda presentar daño alguno para el genoma humano ([Cardoso et al., 2001](#)). Por consiguiente, una característica ineludible en la vida es la exposición a la radiación ionizante ([Mahmoud Pashazadeh et al., 2014](#)). Sin embargo, los seres humanos estamos expuestos de manera continua al estrés oxidativo, alrededor de 50 000 modificaciones por lesiones al DNA son inducidas diariamente en cada célula por las especies reactivas de oxígeno (ROS) ([Lomax et al., 2013](#)) producidas por el metabolismo aeróbico y por factores como la radiación ionizante, que causa daño indirecto por radiólisis en las moléculas de agua, donde especialmente el radical hidroxilo es conocido por causar peroxidación lipídica y daño proteico así como rompimiento de la cadena sencilla y doble del DNA ([Cheki](#)

et al., 2016), así mismo, esta acción indirecta es responsable de aproximadamente el 70% del daño (Nakamura et al., 2017).

Para el diagnóstico clínico y la determinación de exposición a la radiación ionizante se ha vuelto una necesidad el desarrollo de herramientas biodosimétricas que sean críticas en la evaluación para un tratamiento inmediato o a largo plazo (Rashi-Elkeles et al., 2011). Se habla de marcadores biológicos para referirse a señales fisiológicas inducidas que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida (Silbergeld y Davis, 1994). En sentido estricto, la palabra biomarcador haría referencia a la respuesta biológica del organismo que muestra la ausencia, presencia o condición de una patología, que puede ser utilizado para determinar el estado de un individuo. Los biomarcadores se pueden medir a nivel molecular, bioquímico o celular (Brooks et al., 1993).

Los leucocitos mononucleares humanos de sangre periférica (LMHSP) han resultado una herramienta celular muy útil para su utilización como modelo biológico *in vitro* de exposición a radiación ionizante mediante diversas técnicas (Ainsbury et al., 2009). Los linfocitos son células específicas del sistema inmunitario que forman parte de los glóbulos blancos o leucocitos, y representan cerca del 25% de estos, debido a que se encuentran diferenciados y a su fácil obtención, son óptimos para su utilización como biomarcadores celulares (Welsch y Sobotta, 2008). Todos los organismos están expuestos a dosis bajas de RI de origen natural, de igual manera es ampliamente utilizado en procedimientos médicos como radiografías y radioterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer (Vega-Carrillo et al., 2011). La radiación ionizante (RI) daña el ADN por deposición directa de energía y también indirectamente por ionización de moléculas de agua para producir radicales hidroxilo que atacan el ADN. La RI induce múltiples formas de daño en el ADN, incluido el daño a las bases y la escisión de la estructura de ADN para formar ADN RCS (rupturas de cadena simple) (Mahaney et al., 2009), así como también se conoce que, la RI induce en

células de mamífero alrededor de 850 lesiones de pirimidina, 450 lesiones de purina, 1000 ADN RCS y 20×10^{40} ADN rupturas de cadena doble (RCD) / célula / Gy con baja transferencia de energía lineal (LET) (Lomax et al., 2013).

Por otro lado, el mantenimiento de la estabilidad e integridad del genoma es esencial para la homeostasis celular y la prevención de la muerte celular indebida o neoplasia (Negri et al., 2010). Las rupturas de cadena doble se consideran la forma más letal de daño en el ADN. Pueden ser introducidos por agentes exógenos tales como RI, venenos de topoisomerasa, fármacos radiomiméticos (por ejemplo, bleomicina y neocarzinostatina), y por procesos celulares tales como recombinación de cambio de clase, horquillas de replicación estancadas y reacciones que generan ROS (Mahaney et al., 2009). Sin embargo, el daño al ADN causado por agentes dañinos internos y externos es un objetivo primordial para la integridad del genoma celular. El fracaso en la reparación de las lesiones en el ADN puede resultar en la obstrucción de la replicación y transcripción o mutagénesis, conduciendo a disfunción celular, muerte celular indebida o cáncer (Halazonetis et al., 2008). Por esta razón, es importante la medición de biomarcadores moleculares para tener información del daño al ADN donde la proteína p53 se ha utilizado ampliamente en investigación por su papel como “protector del genoma” promoviendo la reparación de mutaciones causantes de tumores o previniendo su propagación permanentemente deteniendo o eliminando las células que contienen dichas mutaciones (Jackson and Bartek, 2009; Braithwaite et al., 2005) así como de las hsp's, chaperonas moleculares descubiertas originalmente en base a su regulación ascendente en respuesta al estrés térmico pero que también participan en otros distintos tipos de estrés celular (Yu et al., 2015). Con base a la literatura revisada anteriormente se plantea la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta Científica

¿Existe daño al ADN y sobreexpresión de p53 y hsp70 en leucocitos mononucleares humanos expuestos a bajas dosis (<1Gy) por rayos X?

Hipótesis

Se genera daño al ADN y sobreexpresión de p53 y hsp70 en leucocitos mononucleares humanos expuestos a bajas dosis (<1Gy) por rayos X.

Objetivo general

Evaluar el daño al ADN así como la expresión de p53 y hsp70 en leucocitos mononucleares humanos expuestos a diferentes dosis de rayos X.

Objetivos específicos

- 1) Obtener leucocitos mononucleares humanos de sangre periférica a partir de la muestra obtenida utilizando gradientes de ficoll.
- 2) Exponer leucocitos mononucleares humanos *in vitro* a dosis bajas (<1Gy) de una fuente calibrada de rayos X.
- 3) Exponer leucocitos mononucleares humanos *in vitro* a estrés por calor a 44°C.
- 4) Analizar la viabilidad celular antes y después del ensayo experimental.
- 5) Determinar la fragmentación del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa.
- 6) Determinar la expresión de hsp70 y p53 mediante PAGE-SDS Western Blot.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Radiación

La mayoría de nuestro conocimiento acerca de la física del átomo y su núcleo comenzó con el descubrimiento de la radiactividad en 1896 por Henri Becquerel ([Arya, 1966](#)). La palabra radiación fue utilizada hasta cerca de 1900 para describir a las ondas electromagnéticas. Posteriormente fueron descubiertos los electrones, los neutrones, los rayos-x y la radiactividad natural, y fueron incluidos también bajo el término de radiación. Esta radiación recientemente descubierta mostraba características de partículas, en contraste con la radiación electromagnética, la cual era tratada como una onda. En los años de 1920, DeBroglie desarrollo su teoría de la dualidad de la materia, la cual pronto se demostró ser correcta, por medio de experimentos de difracción de electrones, y la distinción entre partículas y ondas dejó de ser importante. Hoy en día la radiación incluye a todo el espectro electromagnético así como a las partículas atómicas y subatómicas que han sido descubiertas; y se refiere a la energía emitida en procesos subatómicos ([Tsoufanidis, 1995](#)).

La radiación se clasifica en ionizante y no-ionizante. El término ionizante se refiere a la habilidad de la radiación para ionizar un átomo o una molécula del medio que atraviesa, es decir, sacar un electrón de su orbital y provocando que este sea más reactivo. La radiación no-ionizante es radiación electromagnética que incluye a las ondas de radio, microondas, luz visible y luz ultravioleta. La radiación ionizante produce pares iónicos e incluye a los rayos-x, rayos-γ y a todas las partículas atómicas y subatómicas, tales como electrones, positrones, protones, alfas, neutrones, iones pesados y mesones ([Tsoufanidis, 1995](#)).

2.1.1 Radiación ionizante

La radiación ionizante es un tipo de energía liberada por los átomos en forma de ondas electromagnéticas (rayos gamma o rayos X) o partículas (partículas alfa y beta o neutrones). La desintegración espontánea de los átomos se denomina radiactividad, y la energía excedente emitida es una forma de radiación ionizante. Los elementos inestables que se desintegran y emiten radiación ionizante se denominan radionúclidos.

Cada radionúclido se caracteriza por el tipo de radiación que emite, la energía de la radiación y su semivida. La actividad, utilizada como medida de la cantidad de un radionúclido, se expresa en una unidad llamada becquerel (Bq): un becquerel corresponde a una desintegración por segundo. La semivida es el tiempo necesario para que la actividad de un radionúclido disminuya por la desintegración a la mitad de su valor inicial. La semivida de un elemento radiactivo es el tiempo que tarda la mitad de sus átomos en desintegrarse, y puede variar desde una fracción de segundo a millones de años (por ejemplo, el Yodo-131 tiene una semivida de 8 días mientras que el Carbono-14 tiene una semivida de 5730 años) (Cember, 2008).

2.1.2 Fuentes de radiación

Las personas están expuestas a diario tanto a la radiación de origen natural o antropogénico. La radiación natural proviene de muchas fuentes, como los más de 60 materiales radiactivos naturales presentes en el suelo, el agua y el aire. El radón es un gas natural que emana de las rocas y la tierra y es la principal fuente de radiación natural. Diariamente inhalamos e ingerimos radionúclidos presentes en el aire, los alimentos y el agua. Asimismo, estamos expuestos a la radiación natural de los rayos cósmicos, especialmente a gran altura. Por término medio, el 80% de la dosis anual de radiación de fondo que recibe una persona procede de fuentes de radiación natural, terrestre y cósmica. Los niveles de la radiación de

fondo varían geográficamente debido a diferencias geológicas. En determinadas zonas la exposición puede ser más de 200 veces mayor que la media mundial.

La exposición humana a la radiación proviene también de fuentes artificiales como en el diagnóstico médico (rayos X), procedimientos terapéuticos, material radiactivo resultante de las pruebas con armas nucleares incluyendo la generación de energía nuclear, eventos no planeados como accidentes en plantas nucleares sucedidos en Chernóbil en 1986 y el terremoto del este de Japón con el consiguiente tsunami en Marzo del 2011 ([UNSCEAR, 2014](#)).

2.1.3 Rayos X

Los rayos X, así como, los rayos gamma, microondas, ondas de radio y la luz visible forman parte de un espectro electromagnético continuo y que difieren entre sí solo por sus longitudes de onda y sus frecuencias ([Tsoulfanidis, 1995](#)). Los rayos x fueron descubiertos por serendipia por el físico Alemán Wilhelm Conrad Röntgen en 1895, usando la luz emitida por un tubo de vacío de Crookes, a través del cual se hizo pasar una corriente eléctrica para hacerla incidir sobre una placa fotográfica ordinaria. Estos rayos invisibles tenían la peculiaridad de parecer transparentes para la madera y la materia orgánica, pero no para el metal y el hueso (**fig. 1**)([Dunn, 2001](#)).



Figura 1 Radiografía tomada por Wilhelm Röntgen en 1896

2.1.3.1 Producción de rayos X

La radiación útil también se puede generar en varios tipos diferentes de máquinas. La primera máquina era el diodo del vacío alto, llamado un tubo de Crooke, que Roentgen estaba usando en un experimento de laboratorio en el año 1895. En el tubo de Crookes, los electrones fueron acelerados a través de aproximadamente 25.000 V a una velocidad alta y luego fueron detenidos abruptamente cuando golpearon el ánodo. De acuerdo con la teoría de Maxwell de radiación electromagnética, parte de la energía cinética de los electrones se convirtió en energía electromagnética en forma de rayos X debido a la abrupta desaceleración de los electrones (**Fig. 2**). Este método de generación de rayos X es el precursor del moderno tubo de rayos X utilizado en radiología diagnóstica, odontología y en radiografía. El mismo tipo de generadores de rayos X se utilizan en espectrómetros de rayos X y difractómetros en química analítica y cristalografía, y en inspección y dispositivos de control. La mayoría de los rayos X de este tipo de generador se emiten en ángulo recto con la trayectoria del electrón acelerado. En este tipo de generador de rayos X, la tensión de aceleración completa debe aplicarse a través de los electrodos del tubo. Esta limita la energía cinética máxima de los electrones a varios cientos de miles de electrones-volt ([Cember, 2008](#)).

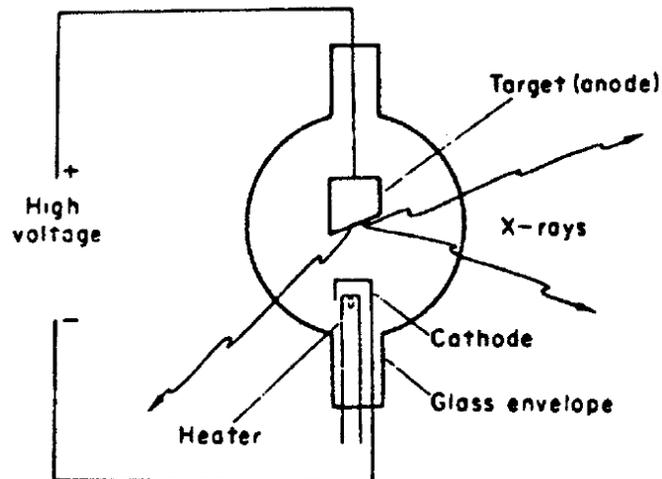


Figura 2. Generador convencional de rayos X, en el que los electrones que son emitidos por un cátodo caliente son acelerados por el fuerte campo eléctrico y emiten rayos X después de ser bruscamente paró al golpear al blanco. El haz de rayos X útil emerge a través de un metal que se abre en el alojamiento del tubo (blindaje).

Cuando un haz de electrones monoenergéticos que habían sido acelerados a través de un a alta diferencia de potencial se desacelera abruptamente parando el haz de electrones (como en el caso de un tubo de rayos X, un tubo de rayos catódicos o un generador de microondas klystron), una pequeña fracción de la energía en el haz de electrones (Ec. 1) se convierte en rayos X:

$$f_e = 1 \times 10^{-3} \times ZE,$$

dónde:

f_e = fracción de la energía en el haz de electrones que se convierte en rayos X

Z = número atómico del blanco en el tubo de rayos X o lo que sea el electrón impacte en cualquier otro dispositivo

E = voltaje a través del tubo de rayos X u otro dispositivo (mega voltios, MV). El valor numérico del voltaje E es igual a la energía cinética del electrón, expresado

en eV, cuando golpea al objetivo. Así, un electrón que se ha acelerado a través de una tensión de 0,1 MV ha adquirido una energía cinética de 0,1 MeV (o 100 keV).

Éste es el principio de funcionamiento del diagnóstico tradicional, industrial y analítico del tubo de rayos X (Fig. 3). El físico estadounidense William D. Coolidge inventó este tipo de tubo de rayos X en 1913 (Tsoulfanidis, 1995).

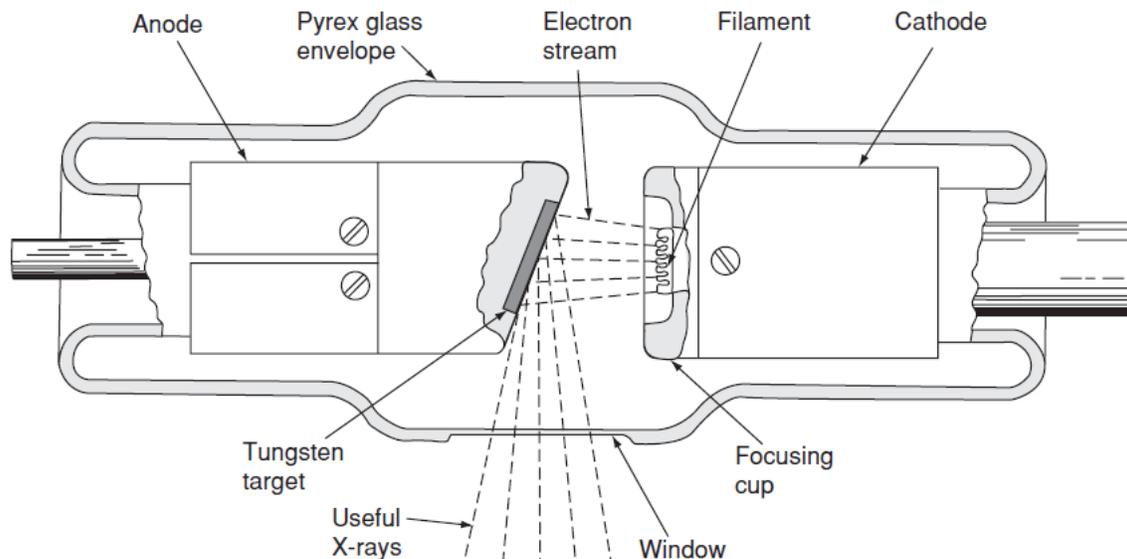


Figura 3. Tubo de rayos X tipo Coolidge de objetivo inmóvil. Un haz de rayos X útil es producido por el Bremsstrahlung que pasa a través de un puerto abierto en el blindaje que encierra el tubo de rayos X.

Un haz de electrones, usualmente del orden de miliamperios, se genera calentando el cátodo. Una diferencia de voltaje del orden de decenas a cientos de kilovoltios a través del tubo acelera los electrones para formar un haz monoenergético en el que la energía cinética de los electrones en los electronvolts es numéricamente igual al voltaje a lo largo del tubo. Los electrones de alta velocidad son detenidos por un objetivo metálico de alto número atómico que está incrustado en el ánodo. Parte de la energía cinética en el haz de electrones son convertidos en rayos X (bremsstrahlung) cuando los electrones son detenidos repentinamente (Tsoulfanidis, 1995).

2.1.3.2 Acelerador lineal

Otros métodos de aceleración de electrones se utilizan para superar esta limitación de alto voltaje para generar rayos X de muy alta energía. El método más común es con el acelerador lineal (Fig. 3). El acelerador lineal, en principio, consiste de una serie de electrodos tubulares, llamados tubos de deriva, con una fuente de electrones en un extremo y un objetivo en el otro extremo para detener los electrones de alta energía. Los electrodos están conectados a una fuente de tensión alterna de alta frecuencia cuya frecuencia es tal que la polaridad del electrodo cambia a medida que el electrón sale de un tubo de deriva por lo tanto, se atrae al siguiente tubo de deriva. Cada tubo de deriva sucesivo tiene mayor voltaje que el anterior. Ganancia del electrón en energía cinética en eV es por lo tanto igual a la diferencia de tensión entre los tubos de deriva sucesivos. Estas ganancias en energía cinética son acumulativas. Así, si tuviéramos una serie de 30 bandas de electrodos con 100 kV diferencias entre ellos, y si el electrón se inyecta en el sistema con una energía cinética de 100 keV, el electrón emergería en el otro extremo con una energía cinética de:

$$E_k = 100 + (30 \times 100) = 3100 \text{ keV} = 3.1 \text{ MeV}.$$

El gradiente de energía en aceleradores lineales es típicamente 2-4 MeV / ft. A estas energías tan altas, la velocidad de un electrón es casi la de la velocidad de la luz.

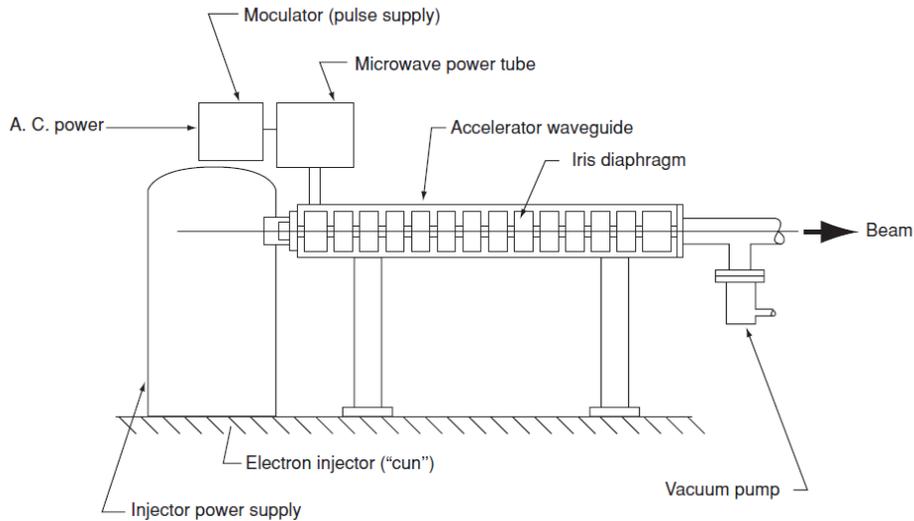


Figura 4. Ilustración del principio de operación de un acelerador lineal.

2.2 Exposición a la radiación ionizante

El daño que causa la radiación en los órganos y tejidos depende de la dosis recibida, o dosis absorbida, que se expresa en una unidad llamada gray (Gy). El daño que puede producir una dosis absorbida depende del tipo de radiación y de la sensibilidad de los diferentes órganos y tejidos (OMS, 2016).

2.2.1 Exposición interna y externa

La exposición a la radiación puede ser interna o externa y puede tener lugar por diferentes vías:

La exposición interna a la radiación ionizante se produce cuando un radionúclido es inhalado, ingerido o entra de algún otro modo en el torrente sanguíneo (por ejemplo, inyecciones o heridas). La exposición interna cesa cuando el radionúclido se elimina del cuerpo, ya sea espontáneamente (por ejemplo, en los excrementos) o gracias a un tratamiento (IAEA, 2007).

La exposición externa se puede producir cuando el material radiactivo presente en el aire (polvo, líquidos o aerosoles) se deposita sobre la piel o la ropa. Generalmente, este tipo de material radiactivo puede eliminarse del organismo por simple lavado, sin embargo, la exposición a la radiación ionizante también puede resultar de la irradiación de origen externo, por ejemplo, la exposición médica a los rayos X, la cual se detiene cuando la fuente de radiación está blindada o la persona sale del campo de irradiación (IAEA, 2007).

Las personas pueden estar expuestas a la radiación ionizante en circunstancias diferentes, en casa o en lugares públicos (exposiciones públicas), en el trabajo (exposiciones profesionales) o en un entorno médico (como los pacientes, cuidadores y voluntarios) (Cember, 2008).

Las situaciones de exposición a la radiación ionizante pueden clasificarse en tres categorías. La primera, la exposición planificada, es el resultado de la introducción y funcionamiento deliberados de fuentes de radiación con fines concretos, como en el caso de la utilización médica de la radiación con fines diagnósticos o terapéuticos, o de su uso en la industria o la investigación. La segunda, la exposición existente, se produce cuando ya hay una exposición a la radiación y hay que tomar una decisión sobre su control, como en el caso de la exposición al radón en el hogar o en el lugar de trabajo, o de la exposición a la radiación natural de fondo existente en el medio ambiente. La tercera categoría, la exposición en situaciones de emergencia, tiene lugar cuando un acontecimiento inesperado requiere una respuesta rápida, como en el caso de los accidentes nucleares o los actos criminales.

El uso médico de la radiación representa el 98% de la dosis poblacional con origen en fuentes artificiales y el 20% de la exposición total de la población. Cada año se realizan en el mundo más de 3600 millones de pruebas diagnósticas radiológicas, 37 millones de pruebas de medicina nuclear y 7,5 millones de tratamientos con radioterapia (OMS, 2016).

2.2.2 Exposición a rayos X

Los rayos X utilizados en la radiobiología intervencional son una herramienta vital para diagnóstico, detección y tratamiento (High Energy X Ray) de enfermedades complejas contando con ventajas no invasivas, tiempo de intervención breve, confiabilidad y daño mínimo al paciente (IARC & WHO, 2002). Uno de los principales lineamientos que se han de seguir en el diagnóstico por imágenes es el de intentar obtener una imagen confiable y de calidad adecuada para un correcto diagnóstico, pero aplicando en el paciente la menor dosis posible (Andisco et al., 2014).

Todos los estudios imagenológicos con radiaciones ionizantes deben ser realizados con dosis conocidas, para poder trabajar con temas de optimización para bajar las dosis tanto como sea razonablemente posible, manteniendo, a la vez, una calidad de imagen adecuada, como lo indica el concepto ALARA (As Low As Reasonably Achievable). Para cada tipo de estudio se establecen dosis que se conocen en función del órgano irradiado, con el fin de administrar mínimas dosis. En la **tabla 1** pueden observarse valores representativos (estadísticos) de dosis efectivas de diferentes estudios para su comparación y equivalencia con la cantidad de placas de tórax (Andisco et al., 2014).

Tabla 1. Dosis efectivas representativas para los estudios de rayos X comunes.

Tipo de estudio	Dosis efectiva (mSv)	Cantidad equivalente de placas de tórax
Radiografía de extremidades	<0.01	<0.5
Radiografía de tórax PA	0.02	1
Radiografía de cráneo	0.07	3.5
Radiografía de cadera	0.3	15
Radiografía de columna dorsal	0.7	35
Radiografía de columna lumbar	1.3	65
Radiografía de pelvis	0.7	35
Radiografía de abdomen	1.0	50
esofagograma	1.5	75
TC de cabeza	2.3	115
TC de tórax	8	400

TC de abdomen o pelvis	10	500
Ventilación pulmonar (Xe-133)	0.3	15
Perfusión pulmonar (Tc-99m)	1	50
Renal (Tc-99m)	1	50
Tiroidea (Tc-99m)	1	50

mSv: sievert; PA: posteroanterior; TC: tomografía computada.

2.3 Efectos de la radiación ionizante en la salud

2.3.1 Interacción con la materia

La radiación interacciona con el núcleo del átomo o con las orbitas electrónicas, la probabilidad de que ocurra un cierto mecanismo de interacción y el poder de penetración de los diversos tipos de radiación, depende tanto del tipo y energía de la radiación así como de la naturaleza de la materia con la que interacciona ([Azorín y Azorin, 2010](#)).

2.3.1.1 Ionización

La ionización se produce cuando uno o más electrones atómicos reciben la energía suficiente para ser arrancados del átomo ([Zubeldia, 2005](#)).

2.3.1.2 Excitación

En el momento en el que existe transferencia de energía por parte de la partícula cargada o radiación ionizante al electrón, y ésta no es suficiente para que el electrón sea expulsado del átomo, como sucede con la ionización, puede ser suficiente como para permitir al electrón pasar a ocupar un nivel superior de energía, lo que se conoce como estado excitado del átomo o molécula. Por lo general, el átomo excitado tiende a volver a su estado basal emitiendo energía electromagnética, como ocurre en los fenómenos de fosforescencia y fluorescencia ([Ortega y Jorba, 1996](#)).

2.3.1.3 Radiólisis

El fenómeno de radiólisis o disociación ocurre cuando la energía transferida por la radiación es suficiente para producir la ruptura de los enlaces químicos

moleculares, y esta a su vez produce transformaciones químicas en las sustancias irradiadas. Los efectos más intensos de la radiólisis se producen en las moléculas con uniones covalentes cuya disociación crea radicales libres.

2.3.2 Magnitudes y unidades dosimétricas

No existe una unidad de radiación precisa que sea adecuado para usar en los distintos conceptos de dosis. Para propósitos de protección radiológica los inicios de dosimetría incluyen la película dental para determinar la “sombra” como dosis máxima permisible y para dosis más altas en algunas ocasiones se tomaba en cuenta la unidad “eritema”.

Las magnitudes dosimétricas están relacionadas con la medida de la energía absorbida y su distribución, la primera magnitud de interés es la exposición, y está definida por la relación (Durham, 2006):

$$X = \frac{\Delta Q}{m_{air}}$$

Donde ΔQ es la carga de un solo signo producido en una masa de aire por fotones. La unidad del SI para exposición es C/kg y en el sistema inglés es el Roentgen (R), donde la relación de las dos unidades es:

$$1R = 2.58 \times 10^{-4} \text{ c/kg de aire}$$

La exposición es una magnitud dosimétrica definida por la International Commission on Radiation Units (ICRU) y fue desarrollada mediante la cuantificación de la cantidad de radiación administrada a los pacientes tratados con rayos X. Sin embargo, en el campo de la protección radiológica se interesa más por los efectos que la radiación tiene sobre los tejidos y se requiere cuantificar el impacto de otras fuentes radiactivas junto con el impacto de los fotones. Como consecuencia de esto, el concepto de “dosis absorbida” se fue desarrollando y que se puede entender mediante el concepto de “energía

impartida” (E) que se define como la radiación ionizante de la materia en un volumen y se establece por la relación:

$$E = R_{in} - R_{out} + \Delta Q,$$

Donde R_{in} es la suma de las energías (excluyendo las energías en reposo) de todas las partículas ionizantes cargadas y sin carga que entran en un volumen, R_{out} es la suma de las energías (excluyendo las energías en reposo) de todas las partículas ionizantes cargadas y sin carga que salen del volumen, y ΔQ es la suma de todos los cambios de la masa energética en reposo del núcleo y partículas elementales en cualquiera de las interacciones que ocurren en el volumen. La unidad de la energía impartida es el Joule (J).

La dosis absorbida está definida como:

$$D = \frac{de}{dm},$$

Donde de es el promedio de la energía absorbida por masa de tejido dm . La unidad SI para dosis absorbida es el Gray (Gy), definida como 1 J/kg, y la unidad para el sistema inglés es el rad, donde (Durham, 2006):

$$1\text{Gy} = 100 \text{ rad.}$$

El daño que causa la radiación en los órganos y tejidos depende de la dosis recibida, o dosis absorbida, que se expresa en una unidad llamada Gray (Gy). El daño que puede producir una dosis absorbida depende del tipo de radiación y de la sensibilidad de los diferentes órganos y tejidos. (IARC & WHO, 2002).

Para medir la radiación ionizante en términos de su potencial para causar daños se utiliza la dosis efectiva. La unidad para medirla es el Sievert (Sv), que toma en consideración el tipo de radiación y la sensibilidad de los órganos y tejidos. El sievert es una unidad muy grande, por lo que resulta más práctico utilizar unidades

menores, como el milisievert (mSv) o el microsievert (μ Sv). Hay 1000 μ Sv en 1 mSv, y 1000 mSv en 1 Sv. Además de utilizarse para medir la cantidad de radiación (dosis), también es útil para expresar la velocidad a la que se entrega esta dosis (tasa de dosis), por ejemplo en microsievert por hora (μ Sv/hora) o milisievert al año (mSv/año).

2.3.2 Efectos en la salud

La radiación puede afectar el funcionamiento de órganos y tejidos, y producir efectos agudos tales como enrojecimiento de la piel, caída del cabello, quemaduras por radiación o síndrome de irradiación aguda. Estos efectos son más intensos con dosis más altas y mayores tasas de dosis. Por ejemplo, la dosis liminar para el síndrome de irradiación aguda es de aproximadamente 1 Sv (1000 mSv) ([Cember, 2016](#)).

Si la dosis de radiación es baja o la exposición a ella tiene lugar durante un periodo prolongado (baja tasa de dosis), el riesgo es considerablemente menor porque hay más probabilidades de que se reparen los daños. No obstante, sigue existiendo un riesgo de efectos a largo plazo, como el cáncer, que pueden tardar años, o incluso decenios, en aparecer. No siempre aparecen efectos de este tipo, pero la probabilidad de que se produzcan es proporcional a la dosis de radiación. El riesgo es mayor para los niños y adolescentes, pues son mucho más sensibles a la radiación que los adultos ([IARC & WHO, 2002](#)).

Los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones expuestas a la radiación, como los supervivientes de la bomba atómica o los pacientes sometidos a radioterapia, han mostrado un aumento significativo del riesgo de cáncer con dosis superiores a 100 mSv. Estudios epidemiológicos más recientes efectuados en pacientes expuestos por motivos médicos durante la infancia (TC pediátrica) indican que el riesgo de cáncer puede aumentar incluso con dosis más bajas (entre 50 y 100 mSv).

La radiación ionizante puede producir daños cerebrales en el feto tras la exposición prenatal aguda a dosis superiores a 100 mSv entre las 8 y las 15 semanas de gestación y a 200 mSv entre las semanas 16 y 25. Los estudios en humanos no han demostrado riesgo para el desarrollo del cerebro fetal con la exposición a la radiación antes de la semana 8 o después de la semana 25. Los estudios epidemiológicos indican que el riesgo de cáncer tras la exposición fetal a la radiación es similar al riesgo tras la exposición en la primera infancia ([IARC & WHO, 2002](#)).

La radiación ionizante no solo a altas dosis, sino también a bajas dosis crónicas, se conoce como un agente mutagénico y carcinogénico en mamíferos, incluidos los humanos. El personal médico que usa radiación con fines diagnósticos y terapéuticos tiene un riesgo potencial de sobreexposición. Afortunadamente, debido a la aplicación de los principios de protección radiológica, los niveles de exposición del personal médico a la radiación ionizante han disminuido y, por lo general, están por debajo del límite de 20 mSv / año. Sin embargo, varios estudios han demostrado una mayor frecuencia de micronúcleos, aberraciones cromosómicas y rupturas de cadenas de ADN en trabajadores expuestos a bajas dosis de radiación ionizante. Algunos usos médicos de la radiación, como la medicina nuclear, pueden causar la exposición del personal a dosis más altas. Los empleados de medicina nuclear están continuamente expuestos a la radiación ionizante en el lugar de trabajo a pesar del uso de dispositivos de protección contra la radiación. Debido a su uso, rtyuio|1de la radiación ionizante, el campo de la medicina nuclear es una parte única y significativa del diagnóstico médico y el tratamiento del paciente. Según la Sección de Protección Radiológica de la Comisión Europea (CE), alrededor del 4 al 14% de las exposiciones a la radiación recibidas por los pacientes como resultado de exámenes médicos son causadas por técnicas de medicina nuclear ([Dobrzynska et al., 2014](#)).

2.3.3 Límites de dosis

La radiación es parte de nuestra vida diaria y no existe un límite umbral establecido para la dosis mínima segura que no pueda presentar daño alguno para el genoma humano (Cardoso et al., 2001). Sin embargo, los límites de dosis no han sido constantes a lo largo de la historia de la protección radiológica. Arthur Mutscheller propuso una "dosis de tolerancia" como límite para la exposición a la radiación en 1925. La dosis de tolerancia fue de aproximadamente 0.2 R / día y representa 1/100 de la dosis que produciría eritema (600 R / mes) (Durham, 2006).

La dosis de radiación es una medida de la energía depositada por ésta en un blanco tal como el tejido. Esto es importante puesto que la absorción de energía es lo que ocasiona el efecto de la radiación en el tejido y el riesgo asociado de desarrollar cáncer por exposición a la radiación. Dado que los exámenes de rayos X llegan a un cierto número de tejidos, se utiliza la dosis efectiva para expresar la cantidad total de dosis de radiación. Se calcula a partir de la dosis a diferentes tejidos expuestos y toma en cuenta la radiosensibilidad de los tejidos involucrados que reciben dosis. La unidad de dosis efectiva es el millisievert (mSv). Por ejemplo, la dosis de las fuentes de radiación del fondo natural es en promedio de 2,4 mSv por año (UNSCEAR) y la dosis efectiva de una radiografía PA de tórax es de 0,02 mSv (valor medio típico) (UNSCEAR, 2014).

La ICRP ha publicado recomendaciones para los límites de dosis para la exposición ocupacional y el público en general. Para exposiciones ocupacionales, el límite de dosis efectiva recomendado es de 20 mSv por año como promedio durante cinco años (dosis acumulada de 100 mSv) que no exceda los 50 mSv en un año determinado. Se recomiendan límites adicionales para órganos específicos porque el riesgo de efectos deterministas es mayor que el riesgo de efectos estocásticos para algunos órganos. Para el cristalino del ojo, el límite anual de dosis equivalente recomendada es de 150 mSv. Para las áreas localizadas de la piel, el límite de dosis equivalente anual recomendado es de 500 mSv como promedio sobre 1 cm², independientemente del área de irradiación. Para los pies y

las manos, el límite de dosis equivalente anual recomendado es de 500 mSv (ICRP, 1990).

Para el público en general, el límite de dosis efectiva anual recomendado es de 1 mSv / a. En circunstancias especiales, se podría permitir un mayor valor de dosis efectiva siempre que la dosis efectiva promediada durante cinco años no exceda 1 mSv / a. Los límites de dosis equivalente anual recomendados para el público en general son de 15 y 50 mSv para la lente del ojo y las áreas localizadas de la piel, respectivamente. Para mujeres embarazadas declaradas, se recomienda un límite de dosis ocupacional equivalente al abdomen de 2mSv. Además, la ICRP recomienda que las mujeres embarazadas se empleen en trabajos que no conlleven una probabilidad significativa de altas dosis accidentales (ICRP, 1990).

En 1993, la NCRP también proporcionó recomendaciones sobre límites de dosis (NCRP, 1993). Se usaron los mismos factores de riesgo, pero el NCRP también estableció un factor de riesgo que no fue específicamente establecido por la ICRP para el embrión-feto de $\sim 10^{-2} \text{ Sv}^{-1}$. Los límites de dosis recomendados por el NCRP fueron idénticos a los de la ICRP en su mayor parte con algunas diferencias clave. La dosis efectiva acumulada para exposiciones ocupacionales recomendada por la NCRP es 10mSv x edad en años en lugar de 100mSv en cinco años. Se estableció un límite de dosis efectiva para el público general de 5mSv para la exposición infrecuente, y la NCRP recomendó el límite de dosis equivalente a la lente del ojo de 50mSv (Durham, 2006; ICRP,2007).

2.4 Daño al ADN

2.4.1 Generalidades de la célula

No se sabe con exactitud cuándo el ser humano descubrió por primera vez la notable propiedad de una superficie curva de vidrio para inclinar la luz y formar imágenes. Los anteojos se fabricaron por primera vez en Europa en el siglo XIII y el primer microscopio compuesto (de dos lentes) fue construido a fines del siglo XVI. A mediados del siglo XVII algunos científicos pioneros habían utilizado sus

microscopios caseros para descubrir un mundo que nunca se había revelado al ojo desnudo. Sin embargo, el descubrimiento de las células generalmente se acredita a Robert Hooke, microscopista inglés quien a los 27 años de edad fue premiado con el puesto de Guardián de la Royal Society, la academia científica más antigua de Inglaterra. Examinando un corcho derivado del árbol de alcornoque al microscopio, el observo que tenía una superficie porosa parecida a un panal de abejas. Hooke llamó a los poros *celdillas* debido a que le recordaban las celdas habitadas por los monjes que vivían en un monasterio. En realidad, Hooke había observado las paredes vacías de un tejido vegetal muerto, paredes que originalmente fueron producidas por las células vivas que las rodeaban, por esta circunstancia, se le considera como el descubridor de la célula (Karp, 2011).

La célula es la unidad estructural, anatómica y fisiológica que compone a los seres vivos (materia viva), y dentro de los diferentes niveles de complejidad biológica, una célula puede ser suficiente para constituir un organismo completo, ésta contiene la información genética del individuo y es el origen de la creación biológica (Karp, 2011).

La célula es el vehículo a través del que se transmite la información hereditaria que define cada especie, además y determinada por esta información, la célula contiene la maquinaria necesaria para obtener materiales del ambiente y generar una nueva célula idéntica a sí misma, que contendrá una nueva copia de información hereditaria, solo la célula dispone de esta capacidad. Todas las células vivas en la tierra, sin excepción conocida, guardan su información hereditaria en forma de moléculas de ADN (Karp, 2011).

Cada organismo vivo sobre la tierra, desde una bacteria hasta el agregado de 10^{13} células que forman el cuerpo humano, se ha originado por división celular a partir de una sola célula. Por lo tanto, la célula es el vehículo a través del que se transmite la información hereditaria que define cada especie, además y determinada por esta información, la célula contiene la maquinaria necesaria para

obtener materiales del ambiente y generar una nueva célula idéntica a sí misma, que contendrá una nueva copia de información hereditaria. Solo la célula dispone de esta capacidad. Todas las células vivas en la tierra, sin excepción conocida, guardan su información hereditaria en forma de moléculas de DNA de doble cadena, dos largos polímeros paralelos no ramificados formados por cuatro tipos de monómeros (A, T, C y G) que están unidos entre si formando una larga secuencia lineal que codifica la información genética de la célula (Alberts, 2009).

2.4.2 Características de la célula

Existen organismos formados por una única célula (unicelulares), como las bacterias, las levaduras y las amebas. Hay otros más complejos, formados por muchas células (pluricelulares), como las plantas y animales, por ejemplo. En estos organismos, las células se ordenan en tejidos, los que su vez forman los órganos. Aunque pueden tener formas, tamaños y funciones diferentes, todas las células comparten características muy importantes como las que se exponen a continuación:

- a) Están rodeadas de una membrana celular o plasmática que las separa del exterior pero a la vez permite el intercambio con el medio externo. Algunas células, como las bacterias y las células de hongos y plantas, presentan una pared celular por fuera de la membrana plasmática.
- b) La membrana plasmática rodea al citoplasma, una solución acuosa viscosa donde están inmersas las organelas, y donde ocurren importantes procesos metabólicos.
- c) El material genético o hereditario de todas las células es el ADN, o ácido desoxirribonucleico.
- d) Metabolismo: Las células se alimentan por sí mismas, toman los nutrientes del medio, los transforman en otras moléculas, producen energía y excretan los desechos de estos procesos.
- e) Reproducción: las células se originan por división de otras células ya existentes.

- f) Diferenciación: durante el desarrollo de los organismos pluricelulares muchas células pueden cambiar de forma y función, diferenciándose del resto. La diferenciación celular hace que una célula comience a fabricar algo que antes no fabricaba y esto está asociado a una función particular. Una neurona, por ejemplo, es una célula especializada en la transmisión del impulso nervioso.
- g) Señalización química. Las células responden a estímulos químicos y físicos y suelen interactuar y comunicarse entre sí, como ocurre en los organismos pluricelulares complejos a través de las hormonas, los neurotransmisores y los factores de crecimiento (Karp, 2011).

2.4.3 Generalidades del ADN

Los ácidos nucleicos son grandes polímeros formados por la repetición de monómeros denominados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Los ácidos nucleicos almacenan la información genética de los organismos vivos y son los responsables de la transmisión hereditaria. Existen dos tipos básicos, el ADN y el ARN.

Friedrich Miescher, quien en el año 1869 aisló de los núcleos de las células una sustancia ácida a la que llamó nucleína, nombre que posteriormente se cambió a ácido nucleico. En 1953, James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura del ADN, empleando la técnica de difracción de rayos X.

Las unidades que forman los ácidos nucleicos son los nucleótidos. Cada nucleótido es una molécula compuesta por la unión de tres unidades:

1. Un monosacárido de cinco carbonos (una pentosa desoxirribosa en el ADN)
2. Una base nitrogenada purínica (adenina, guanina) o pirimidínica (citosina, timina)
3. Un grupo fosfato (ácido fosfórico).

Tanto la base nitrogenada como los grupos fosfato están unidos a la pentosa.

Las bases nitrogenadas conocidas son:

- a) Adenina, presente en ADN y ARN
- b) Guanina, presente en ADN y ARN
- c) Citosina, presente en ADN y ARN
- d) Timina, presente exclusivamente en el ADN
- e) Uracilo, presente exclusivamente en el ARN

Las estructuras químicas de los componentes de los ácidos nucleicos se presentan en la **figura 5** a continuación:

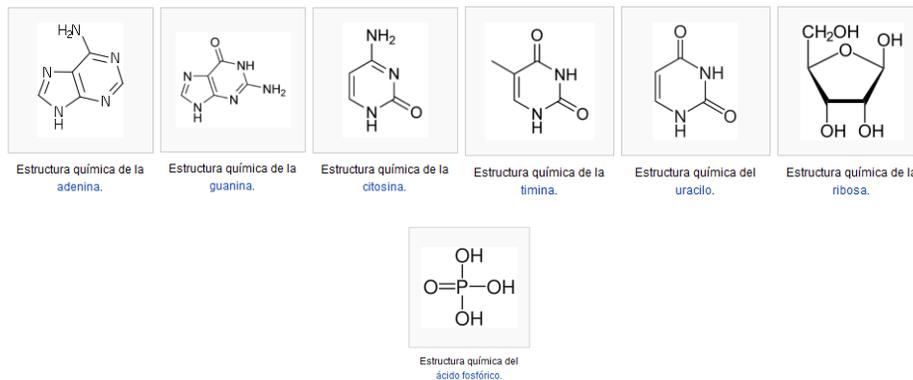


Figura 5. Estructuras químicas de los componentes de los ácidos nucleicos.

2.4.4 Efectos biológicos por radiaciones ionizantes

La exposición a la radiación ionizante (RI) induce leucemia y otros cánceres, y el daño al ADN en el núcleo de una sola célula probablemente represente un evento iniciador para la carcinogénesis. Las estimaciones del riesgo de cáncer por exposición a RI se basan en estudios epidemiológicos de poblaciones humanas expuestas, principalmente los sobrevivientes de la bomba atómica de Hiroshima y Nagasaki. Este enfoque ha proporcionado estimaciones relativamente fiables del riesgo de exposiciones a altas dosis y tasas de dosis altas, sin embargo, es el efecto de dosis bajas y bajas tasas de dosis que es de gran importancia para la población en general (Rothkamm and Lobrich, 2003).

Los efectos dañinos que pueden incidir sobre la materia viva son consecuencia de la transferencia de energía de las radiaciones a las moléculas constitutivas de las células.

Existe un equilibrio entre la tasa de crecimiento neto y la tasa de muerte celular. Tras la exposición a estrés celular esta homeostasis fisiológica está en peligro. Dependiendo del tipo de estrés y gravedad, la respuesta de la célula puede ser variada. Si el estímulo de estrés no va más allá de un cierto umbral, la célula puede hacer frente a ella mediante el montaje de una respuesta celular de protección apropiado, que asegura la supervivencia de la célula. El fracaso para activar o mantener una respuesta protectora, los resultados en la activación de cascadas de señalización de estrés lleva a desencadenar vías de muerte celular. También existen factores que agravan o ejercen daño a la par al ADN, como se considera que el envejecimiento y la senescencia replicativa, son el resultado de la interacción de factores ambientales (estilo de vida), intrínsecos (cadena respiratoria, hormonas y respuestas inflamatorias) y replicativos (límite de Hayflick) (Clancy, 2008).

La radiación daña las células por muchos mecanismos, el mecanismo más importante en las células tumorales es el daño al ADN. Este daño puede ocurrir debido al efecto directo de la radiación en las moléculas de ADN, que representa el 30% -40% de las lesiones, o por la generación de radicales libres que a su vez dañan el ADN, que representa el 60% -70%. (Lomax et al., 2013):

2.4.4.1 Daño directo e indirecto

El daño al ADN se pueden clasificar en 2 tipos: daño directo e indirecto.

El daño directo (30% -40% de las lesiones) se produce cuando el fotón deposita su energía en la estructura del ADN de manera directa causando daños tanto en las bases nitrogenadas como en los enlaces que mantienen unido a los nucleótidos. Ocasionando rupturas tanto en la cadena simple como la doble del ADN en bajas y altas concentraciones de eventos de ionización como se muestra en **la figura 6** (Lomax et al., 2013):

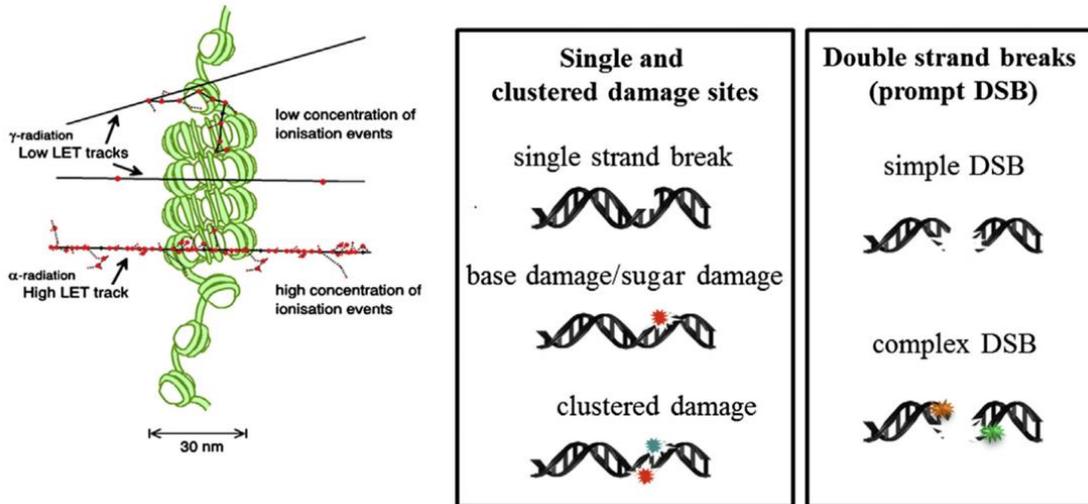


Figura 6. Clasificación del daño al ADN

El daño indirecto (60% -70%) se produce por Radiólisis de las moléculas de agua, y el cual produce las especies reactivas de oxígeno (ROS) (**figura 7**), que atacan de forma crítica a través de una variedad de mecanismos que incluyen el daño de la base, la liberación de la base, la despolimerización, el entrecruzamiento y la rotura de la cadena sencilla y doble (**figura 8**), (Lomax et al., 2013), así como, a las macromoléculas que componen la membrana celular (peroxidación y daño proteico).

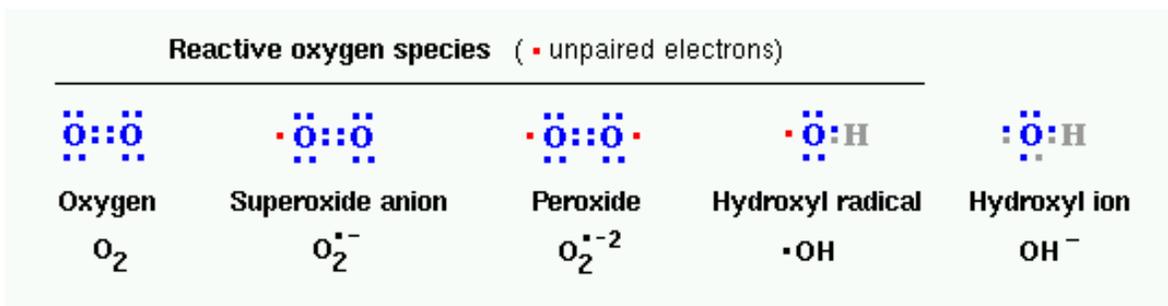


Fig. 7 Especies reactivas de oxígeno (ROS).

A pesar de los posibles daños, las células han desarrollado los procesos de reparación para lidiar con el daño inducido a través del daño directo y es vital para la respuesta celular para el mantenimiento de la integridad y estabilidad del

genoma y así minimizar los procesos potenciales de tumoración y envejecimiento celular (Mitchell et. al., 2005). Sin embargo, cuando la tasa de daño es muy alta el estrés oxidativo termina por conducir a la célula a su muerte (figura 8). Para lo cual se tiene establecido el destino potencial de la célula en el punto de control del ciclo celular. Representación esquemática de los posibles comportamientos celulares determinados por la maquinaria del punto de control del ciclo celular, que incluyen la progresión, la apoptosis y la mutación (figura 9) (Roots & Okada, 1975).

L.-J. Yan / Redox Biology 2 (2014) 165–169

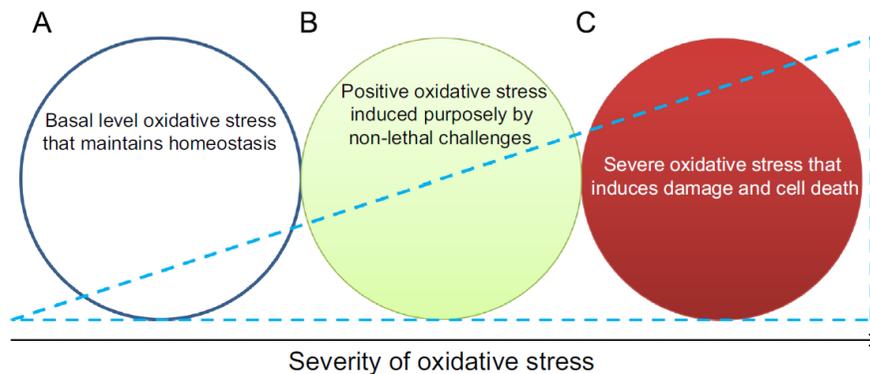


Fig. 8 Diferentes niveles de severidad del estrés oxidativo.

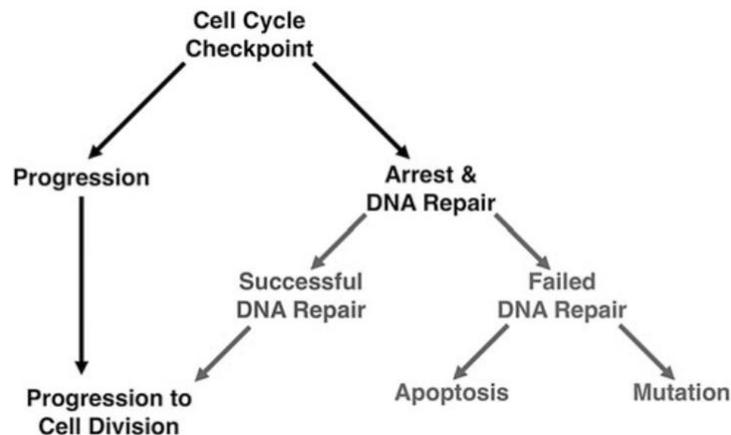


Fig. 9 Destino potencial de la célula en el punto de control del ciclo celular.

2.5 Biomarcadores

Está establecido que las radiaciones, aunque sean pequeñas en dosis, provocan rupturas de cadenas dobles e individuales en el genoma humano y la recuperación de ADN depende de la naturaleza y cantidad de daño del ADN causado. El daño genético que ocurre debido a la radiación absorbida por cualquier ser humano es importante para predecir exposiciones futuras y para evaluar retrospectivamente la causa de la genotoxicidad.

Un mecanismo útil para evaluar cierto tipo de agentes (radiación) que alteran al organismo son denominados biomarcadores. El concepto de biomarcador o bioindicador se define como la respuesta (bioquímica, fisiológica o morfológica) usada para el estudio de la situación de una o más especies típicas de un ecosistema (estrés celular). Según McCarthy & Shugart un biomarcador se puede definir como: “Medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes, y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante” (McCarthy & Shugart,1990).

2.5.1 Aplicaciones en investigación

La identificación de biomarcadores pronósticos tiene el potencial de proporcionar una indicación temprana de los síndromes inducidos por la radiación antes de la aparición del daño específico del órgano y podría utilizarse de forma prospectiva para un cribado masivo rápido posterior a un evento radiológico.

La identificación de biomarcadores ligados a radiación debe abarcar no solo las firmas de pronóstico sino también las firmas de diagnóstico. En otras palabras, cuando los biomarcadores pronósticos tienen el poder predictivo de etapa temprana de ser clínicamente relevante especialmente en el caso de un evento radiológico masivo, los biomarcadores diagnósticos que reflejan el estado biológico en tiempo real tienen el potencial de proporcionar detalles mecanísticos que sustentan la biología detrás de la lesión de la radiación inducida.

2.5.2 Clasificación de los biomarcadores

Los biomarcadores se pueden clasificar en 4 clases: marcadores de exposición, de susceptibilidad, de respuesta o de efecto y de dosis.

Los marcadores de exposición permiten medir la dosis interna mediante el análisis químico del compuesto o metabolito tóxico en fluidos corporales o excrementos como sangre, orina y aire exhalado. Los marcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de una sensibilidad particular de los individuos al efecto de un xenobiótico o a los efectos de un grupo de tales compuestos. Los biomarcadores de respuesta o efecto son indicativos de cambios bioquímicos dentro de un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Los marcadores de dosis son aquellos que aumentan su concentración conforme la dosis de exposición se eleva.

2.5.3 biomarcadores de daño al ADN

Algunas biomoléculas (hemoglobina, albúmina sérica, etc.) tienen grupos reactivos carboxilo, amino y sulfhidrilo que pueden interactuar con compuestos electrofílicos.

2.5.4 Leucocitos mononucleares de sangre periférica

Los leucocitos mononucleares de sangre periférica son un tipo de célula que proviene de la diferenciación linfoide de las células madre hematopoyéticas ubicadas en la médula ósea y que completa su desarrollo en los órganos linfoides primarios y secundarios (médula ósea, timo, bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a las mucosas). Se dividen en linfocitos y monocitos. Los linfocitos circulan por todo el organismo a través del aparato circulatorio y el sistema linfático. Los monocitos comparten con los neutrófilos la función de “aspiradora” (fagocitosis), pero viven mucho un tiempo mucho más largo ya que tienen un papel adicional: presentan piezas de patógenos a las células T de modo que los agentes patógenos pueden ser reconocidos de nuevo y eliminados, o de manera que se un anticuerpo pueda hacer una respuesta.

Los linfocitos Son los leucocitos de menor tamaño (entre 9 y 18 μm), y representan aproximadamente el 30 % del total en la sangre periférica (**fig 10**). Su morfología es variable, de acuerdo con la cual se clasifican en linfoblastos, prolinfocitos y linfocitos propiamente tal, ya sea inactivos o activados (como los plasmocitos).



Fig. 10 Linfocitos humanos de sangre periférica

Los monocitos son el leucocito de mayor tamaño, llegando a medir 18 μm , y representa del 2 al 8 % de los leucocitos en la sangre (**fig 11**). El sistema fagocítico mononuclear (SFM) está constituido por los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares. Los promonocitos de la médula ósea, al madurar salen de ella, diferenciándose en monocitos circulantes, que al cabo de unas 8 horas emigran a distintos tejidos, donde se convierten en macrófagos.

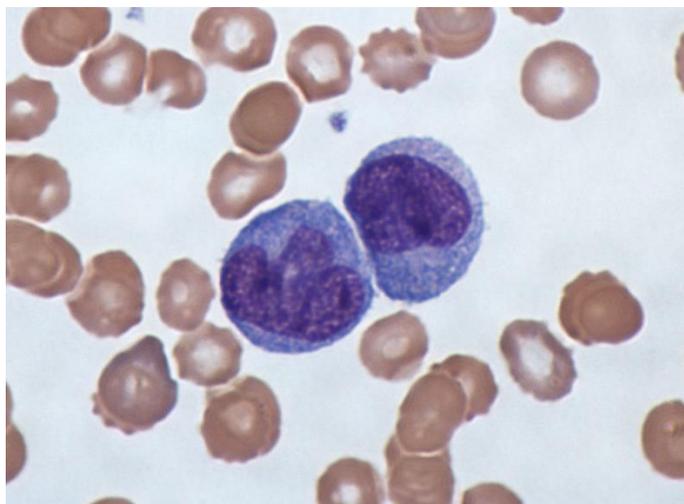


Fig. 11 Monocitos humanos de sangre periférica

2.5.4.1 Clasificación de las células en la hematopoyesis

La célula hematopoyética es una célula inmadura que se puede transformar en todos los tipos de células sanguíneas, como glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Las células madre hematopoyéticas se encuentran en la sangre periférica y en la médula ósea (**fig 12**). También se llama célula madre sanguínea (Santivasi and Xia, 2014).

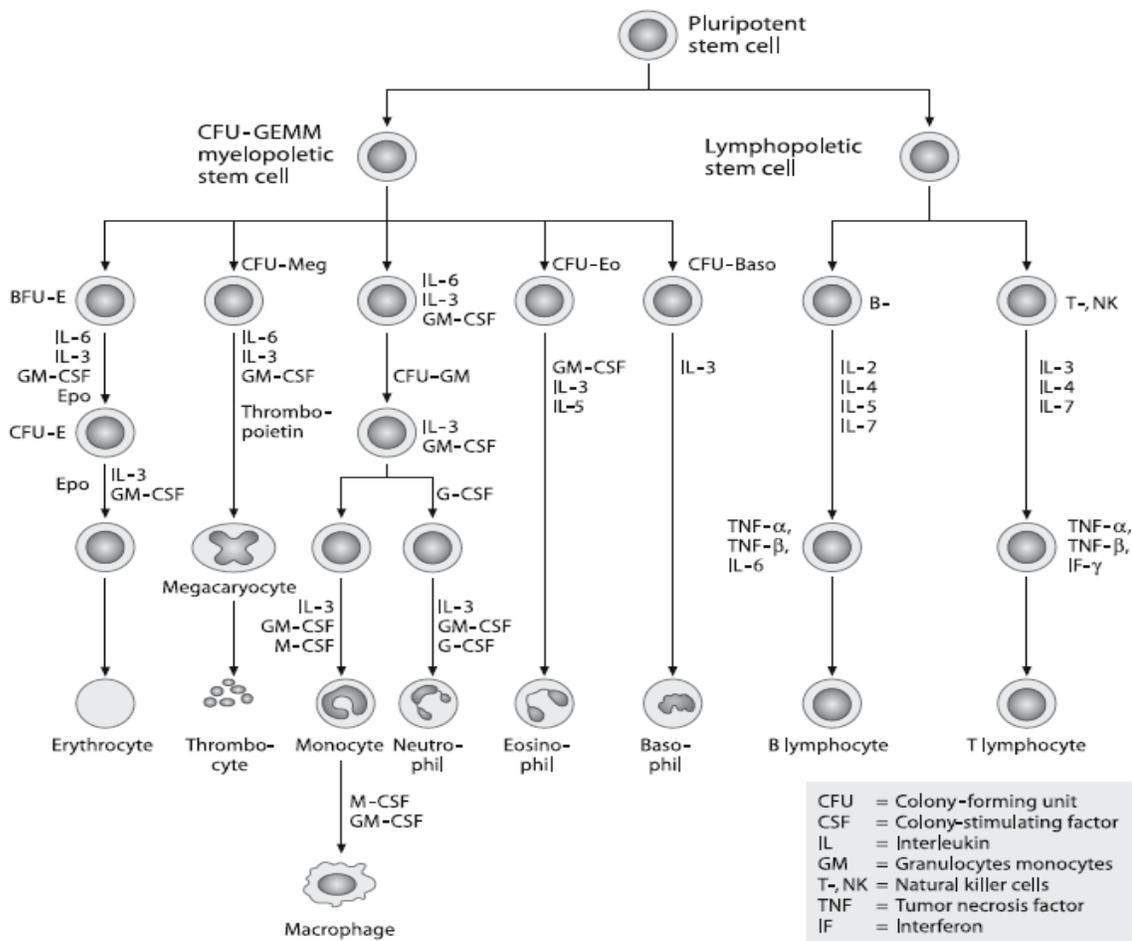


Fig. 12 Evolución de una célula sanguínea. Una célula madre sanguínea pasa por varias etapas para convertirse en un glóbulo rojo, una plaqueta o un glóbulo blanco

2.5.4.2 Función de los leucocitos y monocitos

La función principal de los linfocitos es la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa (o específica), reaccionando frente a materiales extraños (microorganismos, células tumorales o antígenos en general).

Se diferencian en tres líneas de células reactivas: los linfocitos T que se desarrollan en el timo y que participan en la respuesta inmunitaria celular; los linfocitos B, que se desarrollan en la médula ósea y luego migran a diferentes tejidos linfáticos, que son las encargadas de la respuesta inmunitaria humoral, transformándose en plasmocitos que producen anticuerpos; y las células NK (natural killer) que destruyen células infectadas. Los linfocitos T y B presentan receptores específicos, las asesinas naturales (NK) no.

Los monocitos tienen como principal función la de fagocitar, comerse a diferentes microorganismos o restos celulares. Para fagocitar (rodear con los pseudópodos) se tienen en cuenta diversos factores como la presencia de antígenos.

2.5.4.3 Radiosensibilidad biológica

La radiosensibilidad es la sensibilidad que tienen los diferentes tejidos y células a las radiaciones ionizantes. Y se clasifican de la siguiente manera:

- a) Células muy radiosensibles: Son las células que se reproducen mucho: linfocitos, linfoblastos, espermatogonias, y mieloblastos.
- b) Células relativamente radiosensibles: mielocitos, células basales de la epidermis, células de las criptas intestinales.
- c) Células de radiosensibilidad intermedia: células endoteliales, osteoblastos, espermatozoides.
- d) Células relativamente radiorresistentes: granulocitos, espermatozoides.

- e) Células muy radorresistentes: fibrocitos, condrocitos, células musculares y nerviosas

Donde destacan los linfocitos como células altamente radiosensibles.

2.5.5 Proteínas

Las proteínas son un tipo de macromoléculas que se encuentran en todos los sistemas biológicos, desde procariontas inferiores hasta eucariotas superiores. Ocupan un lugar destacado en las células vivas, tanto cuantitativa y cualitativamente, lo que explica el origen de su nombre, derivado del griego protos, que significa “primer grado de importancia”. Cuantitativamente, las proteínas son la clase más abundante de biomoléculas ya que representan más del 50% del peso seco de las células, mucho más que otros biopolímeros importantes tales como ácidos nucleicos, carbohidratos o lípidos. Cada organismo contiene una gran variedad de proteínas específicas, de acuerdo con el número de los correspondientes genes presentes en los cromosomas. Este número varía desde unos cientos en ciertas especies bacterianas a miles en animales y el hombre (Alain J Cozzone).

2.5.5.1 Proteínas de choque térmico (hsp)

Las proteínas de choque térmico (Hsp's) son un grupo de proteínas que funcionan como chaperonas moleculares intracelulares en condiciones normales, y se regulan positivamente en respuesta a las tensiones fisiológicas para proteger a la célula del daño (Hunter-Lavin, 2004). Las HSP son un grupo importante de proteínas dependientes de ATP, que se encuentran tanto en células eucariotas como procariontas. Están involucrados en una amplia gama de procesos celulares, como ayudar al plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas mal plegadas, modulando las vías de señalización y regulando las respuestas inmunes. La naturaleza multifuncional de las proteínas de choque térmico les permite desempeñar papeles críticos en la regulación de la homeostasis de proteínas y la supervivencia celular (fig.13) (Yu et al., 2015).

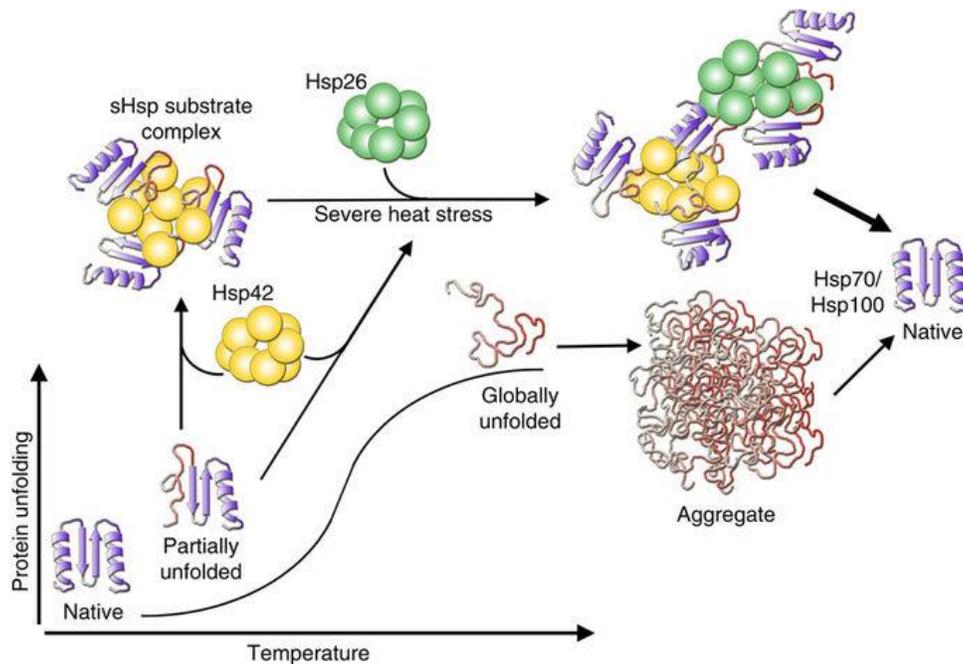


Fig. 13 Mecanismo de acción de las hsp's

2.5.5.2 p53

La p53 es una proteína supresora de tumores. Su nombre hace referencia a su masa molecular aparente característica de 53 KDa en un SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Su función principal es la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S o G2/M mediada por p53 (**fig. 14**), cuando se reconoce algún daño en el ADN, para evitar su replicación. Puede considerarse la respuesta principal cuando se produce daño en el ADN.

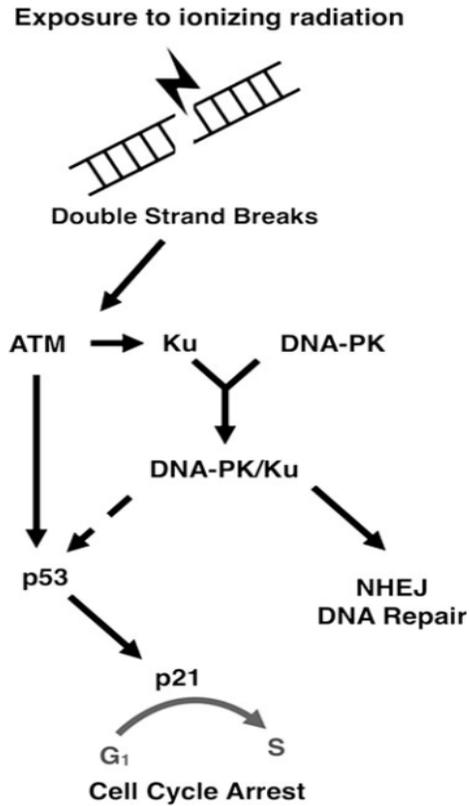


Fig. 14. Modelo que representa el control de NHEJ por DNA-PK. La activación de DNA-PK / Ku por daño de ADN da como resultado la regulación positiva de la reparación de NHEJ y la detención del ciclo celular en el punto de control G1 / S a través de p53 y p21. NHEJ, unión final no homóloga; DNA-PK, proteína quinasa dependiente de ADN.

P53 es estimulado por el estrés celular como la radiación ionizante, la hipoxia, los carcinógenos y el estrés oxidativo. Los patrones de expresión de los genes de la familia p53 pueden ofrecer información pronóstica en varios tumores malignos. Restauran la función pro-apoptótica de p53 de tipo salvaje y se ha demostrado que rompen la resistencia a la quimioterapia. p53 regula el ciclo celular, induce la apoptosis y promueve diferenciación celular (fig. 15).

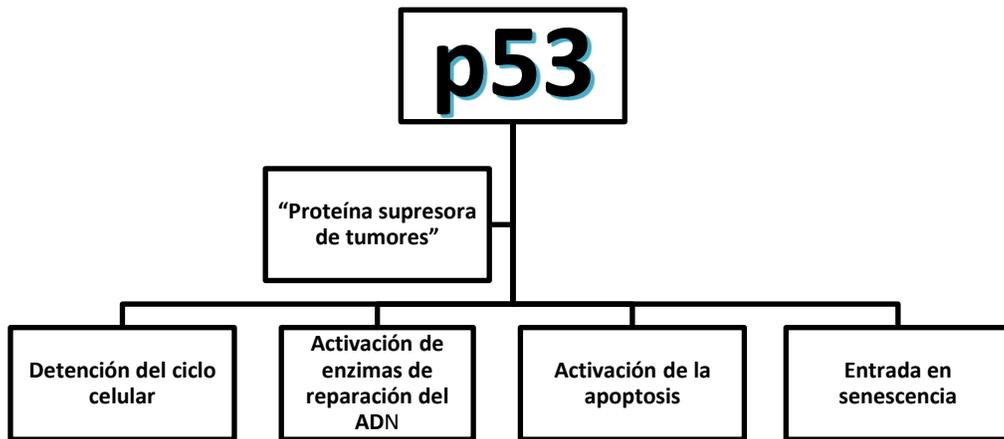


Fig. 15 Esquema representativo de las funciones más importantes de la proteína p53

Para el diagnóstico clínico y la determinación de exposición a la radiación ionizante se ha vuelto una necesidad el desarrollo de herramientas biosimétricas que sean críticas en la evaluación para un tratamiento inmediato o a largo plazo (Jackson and Bartek, 2009; Braithwaite et al., 2005).

Por lo que en el presente estudio se observaron y determinaron 2 proteínas que funcionan como biosímetros o biosensores de estrés por radiación como son hsp70 y p53.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Caracterizar leucocitos mononucleares humanos de sangre periférica a partir de la muestra obtenida.

3.1.1 Obtención del material biológico

Las muestras de sangre venosa periférica (venopunción antebraquial), aproximadamente 15 mL, dispuestas en 5 tubos al vacío marca BD Vacutainer® con 7.2 mg de EDTA K2 de 4 mL fueron colectadas de una persona sana del género masculino de 30 años de edad (**fig. 16**), con previo historial clínico completo, sin historial de radioterapia ni consumo de alcohol, tabaco y medicamentos, y sin presentar síntomas y signos de enfermedad al momento de la toma de la muestra, con exámenes clínicos en sangre, heces y líquidos corporales tales como: biometría hemática completa (BHC), química sanguínea de 24 elementos (QS24), examen general de orina (EGO) y Coproparasitoscópico serie de 3 (CPS3), necesarios para obtener la información para valorar el estado de salud del donante. Para lo cual se hizo constar por una autoridad competente y certificada por el sector salud que el donante es clínicamente sano. La extracción de sangre se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Celular y Neurobiología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas a cargo del Dr. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez de acuerdo a la técnica de punción venosa convencional y de acuerdo a la NOM-253-SSA1-2012, para la disposición de sangre humana y sus componentes para fines terapéuticos e investigación, de acuerdo a la parte bioética. Una biometría hemática completa se llevó a cabo de forma inicial para cuantificar componentes sanguíneos mediante la utilización de un sistema CELLDYN 1600 con previa inversión del tubo (de 8 a 10 veces) para asegurar la homogeneización del anticoagulante con la sangre. De esta manera, se aseguró que la muestra de sangre cumple con la proporción estándar linfocítica del 16-45% (**Anexo A**), después se procedió a medir viabilidad linfocítica del control.



Fig. 16 Obtención de tejido sanguíneo (punción venosa).

3.2 Aislamiento de linfocitos por ficoll-histopaque

Principio. Histopaque®-1077 es una solución estéril de polisacarosa y diatrizoato de sodio, sometida a pruebas con endotoxinas, ajustada a una densidad de 1.077 g / ml. Este medio facilita la recuperación rápida de linfocitos viables y otras células mononucleares a partir de pequeños volúmenes de sangre completa. También se puede emplear en la preparación de suspensiones de linfocitos puros para cultivos celulares y ensayos de citotoxicidad (Amos & Pool, 1976).

Procedimiento. Los linfocitos fueron separados del paquete globular utilizando el medio de separación Histopaque con una densidad de 1.077 g/mL compuesto de una solución acuosa de Ficoll (57 g/L), y Diatrizoato de Sodio (90 g/L), de acuerdo al protocolo del fabricante en un tubo cónico de polipropileno de 15 mL, donde se colocaron 7 mL de Ficoll-paque TM y 7 mL de sangre total (1:1), ambos previamente atemperados a 37°C. Posteriormente se centrifugó la mezcla a (400G) 2200 RPM por 30 minutos. Se procedió a aspirar con una pipeta Pasteur la capa superior (plasma sanguíneo) para descartarla y obtener directamente la capa de leucocitos, donde cuidadosamente se transfirió la interfase a un tubo cónico fresco. Los linfocitos se lavaron con solución buffer fosfato salino (PBS) y se suspendieron con RPMI a aproximadamente 2×10^5 células / mL. Las células se suspendieron en un volumen total de 11 mL y fueron distribuidos en 13 alícuotas de 840 uL cada una como se muestra en la **figura 17**. Una de las alícuotas (control) fue sometida a análisis de viabilidad celular en ese momento y el resto de

las alícuotas fueron dispuestas en baño maria a 37 ° C mientras fueron transportadas a la Unidad Académica de Odontología (UAO) para ser expuestas a rayos X a diferentes dosis.

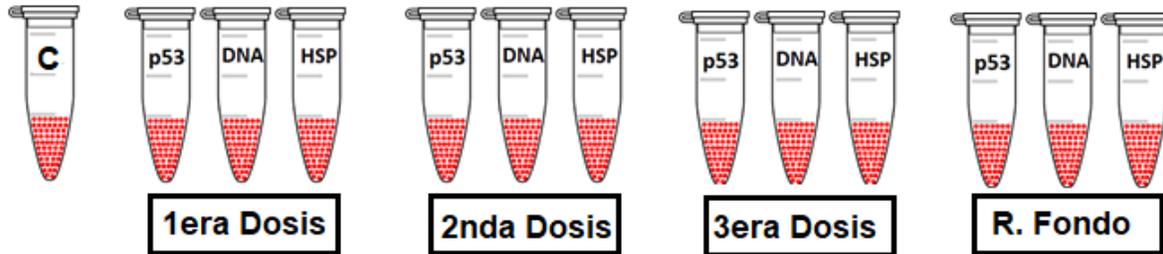


Fig. 17 Distribución de las células linfoides en alícuotas para su proceso.

3.3 Determinación de la viabilidad celular por ensayo de exclusión de azul tripano

Principio. La viabilidad celular se cuantificó con el método de exclusión del azul de tripano. Este compuesto es una amina orgánica, con una carga negativa neta que no penetra al interior de las células que presentan sus membranas intactas, mientras que las células dañadas rápidamente lo incorporan al citoplasma. El azul de tripano no es necesario para realizar conteos simples de células pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras ([Freshney, 1987](#)).

Procedimiento. La viabilidad celular se efectuó al 4% como colorante supra vital. Se transfirieron 10 μ L del azul de tripano al 4% a la suspensión de los linfocitos en un tubo eppendorf de 1.5 mL, homogeneizando con pipeteo suave (8-10 veces). Después de reposar la mezcla 5 min, se llenó por capilaridad (10 μ L) en el hemocitómetro o cámara de Neubauer (Spencer Bright-line) y se cubrió con cubreobjetos. Las células se contaron en un microscopio óptico con un rango de magnificación de 40x (**fig. 19**), tomando en cuenta para el conteo el cuadro central de 1 mm² que se encuentra compuesto por 25 cuadros de 0.04 mm² (en verde). Dada la profundidad de la cámara de tan solo 0.1 mm, cada una de estas

unidades corresponde a volúmenes fijos conocidos, según se ilustra en la **figura 19** (SOP, 2013).



Fig. 18 Microscopio óptico y cámara de Neubauer.

<u>Cuadrícula</u>	<u>Color</u>	<u>Área</u>	<u>Volumen</u>
3x3	Blue	1 mm ²	100 nl
4x4	Red	0.0625 mm ²	6.25 nl
4x4	Green	0.04 mm ²	4 nl
1x1	Black	0.0025 mm ²	0.25 nl

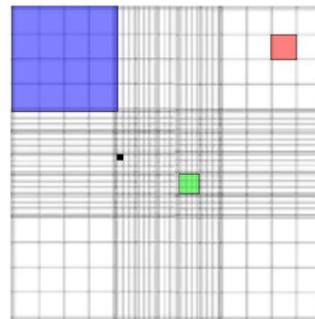


Fig. 19 Dimensiones del área de conteo celular del hemocitómetro.

Una vez llevado a cabo el conteo celular, se realizó el cálculo correspondiente a la concentración celular usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \text{Cuenta de células vivas} \div 100 \times \text{factor de dilución} \times 10,000.$$

Para calcular viabilidad celular expresada en porcentaje de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{V.C.} = \frac{\text{Número total de células vivas (blancas)}}{\text{Número total de células vivas y muertas (tanto blancas como azules)}} \times 100$$

3.4 Exposición celular a rayos X

La exposición de los linfocitos fue realizada con una fuente de rayos X marca Corix® 70 plus-USV de 70 KVp – 8 mA, con número de serie: A30852 y con un tiempo de exposición de 0.15 s a cuatro dosis distintas (2.3, 4.6, 9.1 y 13.7 mGy) y una más equivalente a la radiación de fondo, en la Unidad Académica de Odontología de la Universidad Autónoma de Zacatecas (Guadalupe, Zacatecas) a cargo del Dr. Eduardo Medrano. Las exposiciones fueron llevadas a cabo de forma independiente según los disparos a realizar, distribuidos 3 viales (tubos eppendorf) para cada dosis (**fig. 20**). La dosis absorbida fue determinada usando TLD's (detectores termoluminiscentes) en las mismas condiciones usadas para las muestras. Con respecto a la tasa de incertidumbre del Kerma fue del 4%. Después de la irradiación ex vivo, las muestras celulares fueron incubadas a 37 ± 5 °C durante 60 minutos y se procedió a medir sus respectivas viabilidades celulares.

3.4.1 Arreglo experimental

El arreglo geométrico experimental que se utilizó para el proceso de conservación y transporte de células y de irradiación de muestras, las cuales se mantuvieron a temperatura de 37 °C y en condiciones homeostáticas se muestra en la siguiente figura:



Fig. 20 Arreglo experimental para transporte de células y de ensamble en equipo de Rayos X.

3.4.2 Curva de calibración dosis-respuesta

Se obtuvo una curva de calibración dosis-respuesta empleando un detectores TLD-100 monitor de área de dosis absorbida, midiendo la dosis por disparo (uGy/nC) (**tabla 2**) a una distancia de 20 cm de la fuente de un equipo de Rayos-X de 70 Kv, 8 mA y tiempo de exposición 0.15 s (**fig 21**). Se introdujeron 2 TLD's en cada eppendorf por cada dosis de tal manera que la dosis absorbida utilizada fue la promediada de los 2 detectores (**fig 22**).

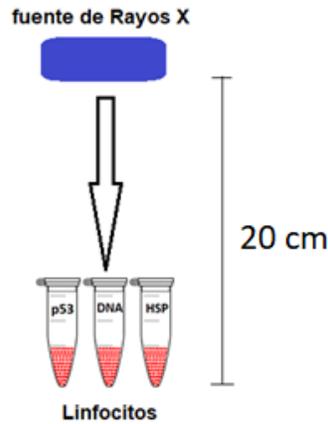


Fig. 21. Esquema del arreglo experimental para exposición de células a Rayos X.

Tabla 2. Relación de dosis absorbida-respuesta y numero de disparos en equipo de Rayos-X de 70 Kv, 8 mA y tiempo de exposición 0.15 S.

DISPAROS	$R_{TLD} \pm \sigma R_{TLD}$ [nC]	DOSIS ABSORBIDA (D) [mGy]
0	0.0000 ± 0.0540	0.0000 ± 0.0000
5	16.5500 ± 1.0210	2.2821114 ± 0.0456422
10	30.9400 ± 1.2860	4.5642228 ± 0.0912845

20	61.0600 ± 1.4810	9.1284456 ± 0.1825689
30	99.0200 ± 4.5600	13.6926684 ± 0.2738534

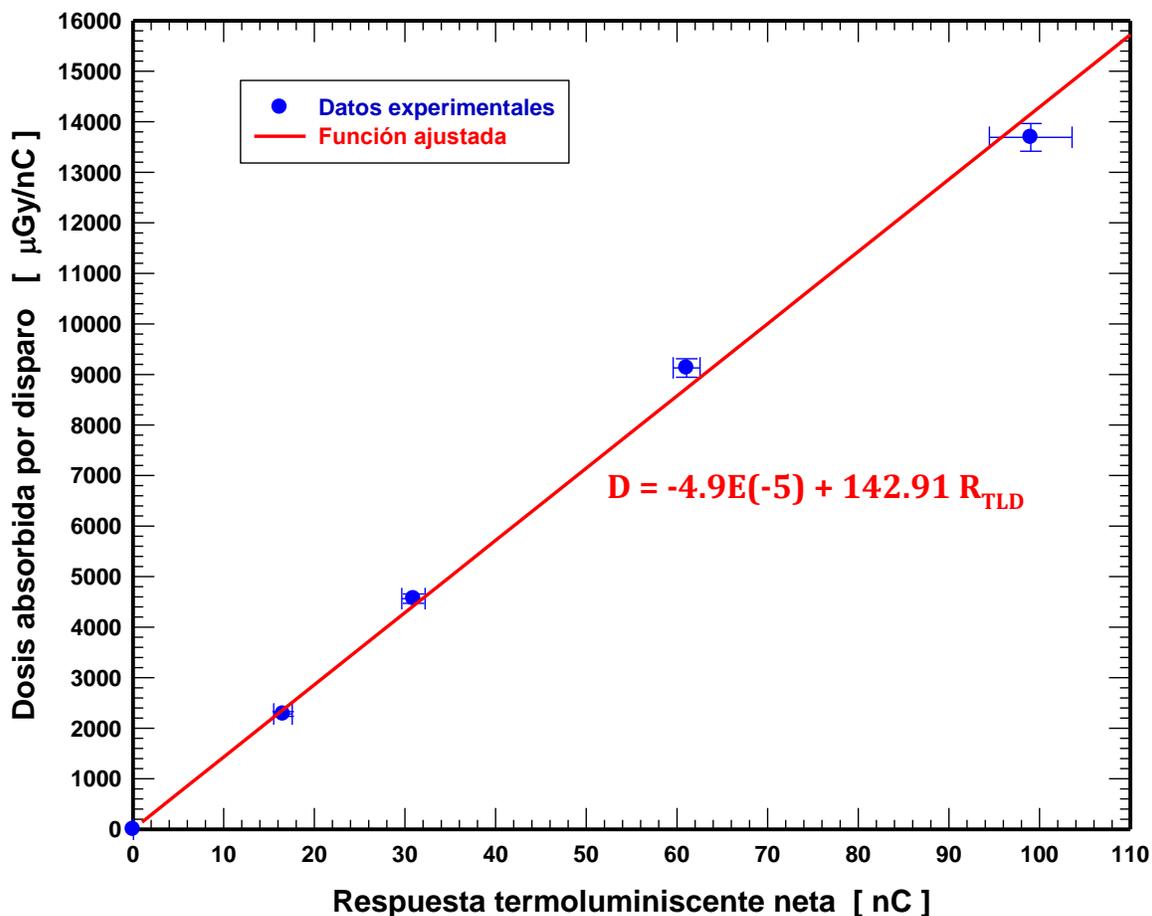


FIG. 22 Curva de calibración dosis absorbida-respuesta TLD en equipo de Rayos-X de 70 Kv, 8 mA y tiempo de exposición 0.15 S. cuyo coeficiente de correlación (r^2) fue de 0.9987

3.5 Lisis celular

Principio. Este procedimiento permite liberar las proteínas contenidas en el interior de los linfocitos y sus organelos.

Procedimiento. Después de la exposición a radiación X, a los tubos se adicionaron 500 μl de buffer de lisis a 4°C (PBS 150 mM NaCl, 2mM KCl, KH₂PO₄

y Na₂HPO₄, Protease Inhibitor Cocktail Tablets in glass vials), dejándolos en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C durante 10 minutos con una microcentrífuga (Eppendorf), el sobrenadante se colectó y se eliminó el botón. Se inspeccionó el lisado en el microscopio óptico para asegurarse que la lisis sea completa y se procedió a la determinación proteica por el método de Bradford.

3.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Principio. El ensayo se basa en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250, principalmente a los residuos de aminoácidos aromáticos, especialmente a arginina. Dicha unión genera un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm y es el incremento en la absorción a 595 nm lo que se monitorea. El ensayo es reproducible y rápido, completando la reacción de unión del colorante a la proteína en un máximo de 2 min y es estable hasta por 1 hora (Bradford, 1976).

Procedimiento. El ensayo se llevó a cabo en 15 tubos Eppendorf. Primero se realizó una curva estándar de BSA. Se preparó una solución stock de BSA (1 mg/ml). Se colocaron en 9 tubos frescos 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20 µl de BSA (MicroBradford) y se completaron los volúmenes hasta 100 µl con NaCl 0.15 M (**tabla 3**). Después se añadieron 900 µl de reactivo Bradford a cada tubo. En los siguientes 5 tubos (dosis 1, dosis 2, dosis 3, control negativo, control positivo y radiación de fondo) se añadieron 10 µl de muestra problema, 90 µl de NaCl 0.15 M y 900 µl de reactivo Bradford, respectivamente. Se usó como blanco 100 µl de NaCl 0.15 M. Se llevó a cabo la lectura de las absorbancias mediante un espectrofotómetro a 595 nm (**fig 23**). Una vez llevadas a cabo las mediciones se calcularon las cantidades necesarias para cargar en SDS-PAGE en base a la ecuación de la línea recta obtenida en la calibración (**Tabla 4**).

Tabla 3. Procedimiento para hacer la curva de calibración.

BSA (µl)	NaCl 0.15 M (µl)	Reactivo Bradford (µl)
0	100	1000
2.5	97.5	1000
5	95	1000
7.5	92.5	1000
10	90	1000
12.5	87.5	1000
15	85	1000
17.5	82.5	1000
20	80	1000
PROBLEMA 5	95	1000

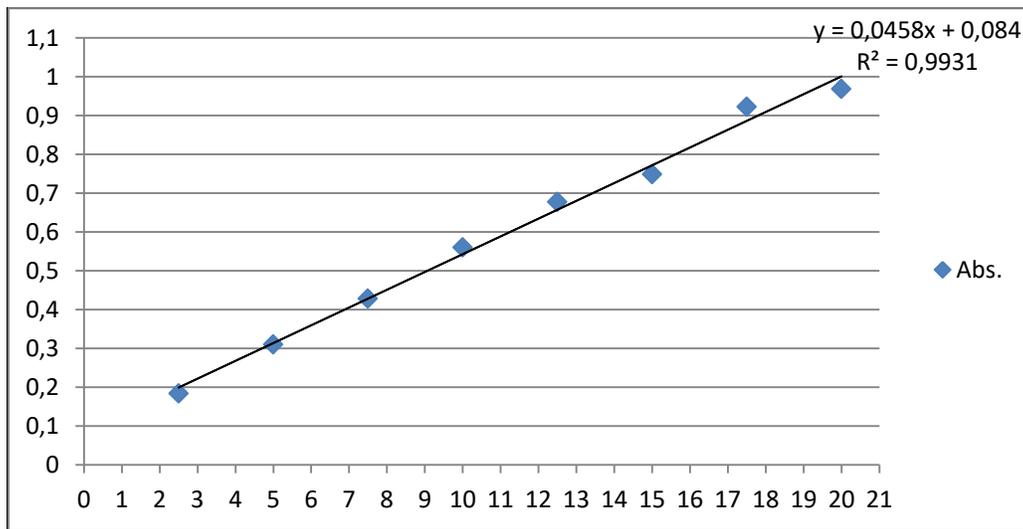


Fig 23. Curva de calibración para Bradford

Tabla 4. Cantidad de proteína calculada para cargar SDS-PAGE

ABS	ug de prot	uL para 15 ug	x5	+ 50 buffer c
c 0.374	8.10225303	18.513369	92.5668449	142.566845

b	0.431	9.09012132	16.5014299	82.5071497	132.50715
1	0.37	8.03292894	18.6731392	93.3656958	143.365696
2	0.439	9.2287695	16.2535211	81.2676056	131.267606
3	0.462	9.62738302	15.5805581	77.9027903	127.90279

3.7 Determinación de niveles proteínicos de hsp-70 y p53 por western blot

Principio. El objetivo de esta técnica es separar proteínas de acuerdo al peso molecular y la carga de estas. Las proteínas se logran separar por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Posteriormente son transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde se pueden identificar a través del uso de anticuerpos específicos contra la proteína de interés ([Towbin et al., 1979](#)).

Procedimiento. La preparación de la muestra, de acuerdo con la concentración de proteína total de las muestras problema que fueron cuantificadas por el método de Bradford, se tomaron 30 µg de proteína y se adicionó solución amortiguadora para muestras 5X, la cual contiene β-mercaptoetanol como agente reductor. Las muestras fueron desnaturalizadas en un baño de agua en ebullición por 5 min. Para la separación electroforética, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% utilizando buffer de electroforesis. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y a voltaje entre 120 V y 130 V hasta llegar al límite inferior (aprox. 1.5 horas) como se muestra en la **figura 24**.

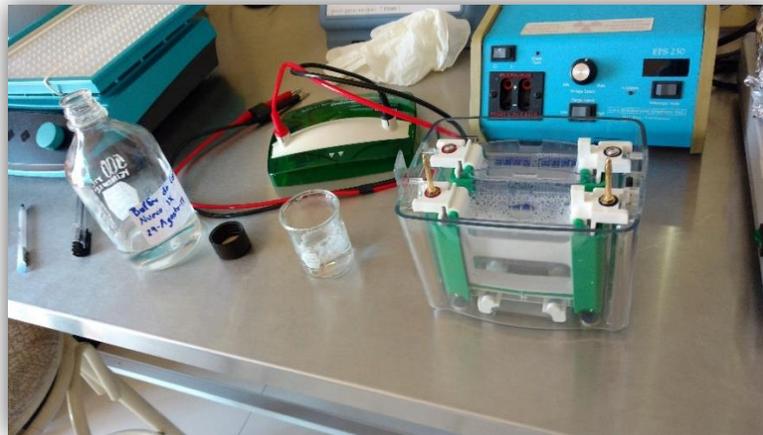


Fig. 24. Corrimiento de proteína en SDS-PAGE

A continuación, se llevó a cabo la electrotransferencia. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando buffer para transferencia semi-seca (semi-dry transfer) como se muestra en la **figura 25**. La transferencia se realizó a 500 mA durante 25 min. Finalizada la transferencia, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau, por aproximadamente 2 min para evaluar la eficiencia de la misma. Posteriormente, la membrana se lavó con solución PBS 1X para eliminar el exceso de colorante y se bloqueó durante 24 h a 4°C con solución bloqueadora (PBS leche).

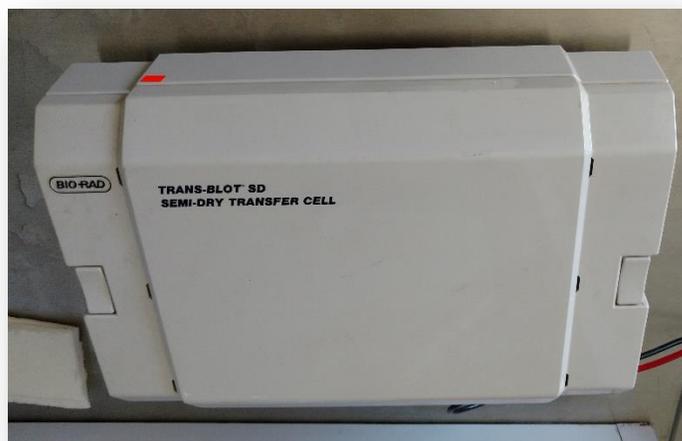


Fig. 25 Transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa por vía semi-seca

Al final se realizó la inmunodetección, para esto la membrana se expuso al anticuerpo primario (anti HSP-70) de ratón a una dilución de 1:300, por 1 h a T.A. con agitación constante. Después se procedió a realizar los lavados de la membrana de nitrocelulosa 5 veces alternando con solución de lavado PBS y PBS-Tween 0.1% (5 min cada uno a TA y con agitación). A continuación, Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) acoplado a peroxidasa, con una dilución 1:1000 por 1 h a T.A. con agitación constante; finalizado el tiempo, la membrana se lavó nuevamente 6 veces siguiendo el mismo esquema **(figura 26)**. El mismo procedimiento anterior se llevó a cabo para p53 con la diferencia de que las membranas p53 se incubaron con anticuerpos anti-p53. Para revelar la membrana de p53, fue expuesta a una mezcla a una solución de DAB (diaminobenzidina) preparada, filtrada y activada con 20 uL de peróxido de hidrogeno. Se dejó 30 minutos revelando y se colocó sobre hojas de papel para su secado. Para el caso de la membrana de hsp-70 se reveló con ECL TM prime western blotting detection reagent.



Fig. 26 Lavado de membrana de nitrocelulosa

3.8 Cuantificación de ADN

Se llevó a cabo la cuantificación del ADN en cada vial postexposición **(tabla 5)** para comprobar que se tenga la muestra en concentraciones ideales para su

corrimiento. La medición se llevó a cabo en un espectrómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ (fig. 27) a 260 y 280 nm.

Tabla 5. Concentraciones de DNA (ng/mL) determinadas en espectrómetro para controles y distintas dosis.

Muestra	Concentración ng/mL	A260 / 280	Volumen (μL)	Volumen normalizado (μL)
CONTROL -	600.7	2.31	10	4.74
CONTROL	533.9	2.29	10	4.92
+ FONDO	296.1	2.43	10	9.62
1er DOSIS	306.5	2.32	10	9.48
2do DOSIS	285.6	2.26	10	10
3er DOSIS	287.5	2.30	10	9.9
4to DOSIS	345.7	2.37	10	9.28

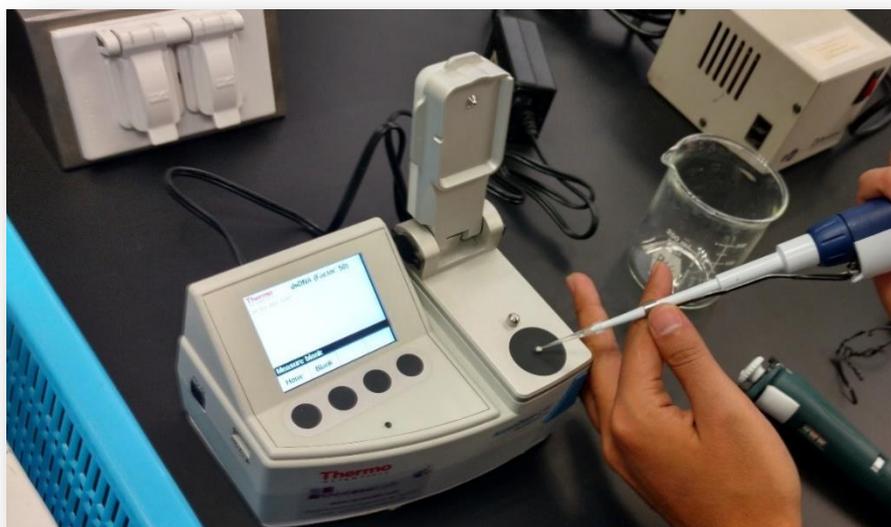


Fig. 27 Medición de las concentraciones de DNA en espectrómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™

3.9 Evaluación de fragmentación al ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

Una vez preparado y polimerizado el gel de agarosa al 0.8% (**fig 28**) se procedió a cargar con las cantidades calculadas para carga en 6 pozos para cada dosis y controles, y uno más para peso molecular, colocando el buffer de corrida y procediendo a inducir entre 80 y 100 V durante 1 hora (**fig. 29**).



Fig. 28 Preparación de gel de Agarosa

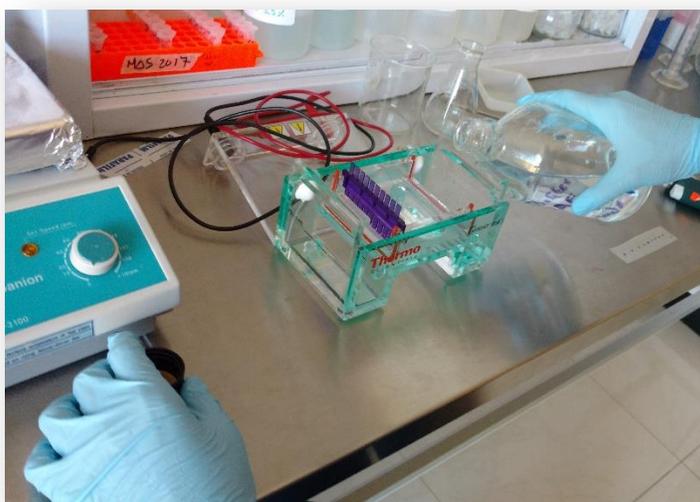


Fig. 29 Preparación de gel de Agarosa

3.10 Análisis de gel de agarosa

Después del corrimiento en la cámara de electroforesis, se procedió a observar el gel en la lámpara UV para corroborar de manera rápida la integridad del ADN o presencia de fragmentación en nuestras muestras control y problema (**fig. 30**) y continuamos con la lectura por medio de un fotodocumentador Chemidoc™ de BioRad™ (**fig 31**).

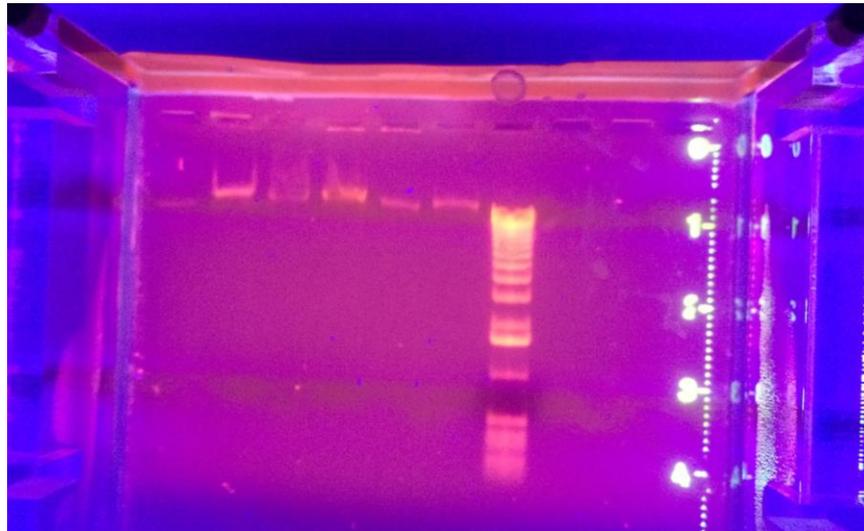


Fig. 30 Gel de agarosa en lámpara de UV



Fig. 31 Fotodocumentador Chemidoc™ BioRad™

3.11 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre las muestras control y las muestras problemas se determinaron usando la prueba t-student (SigmaPlot 11.0). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

IV. RESULTADOS

4.1 Supervivencia celular a distintas dosis de rayos X

Se evaluó la cantidad de LMHSP a distintas dosis de rayos X (radiación de fondo = 0.0 mGy, 2.2 mGy, 4.6 mGy, 9.1 mGy y 13.7 mGy), utilizando un control negativo (muestra a 37°C/1h), un control positivo (muestra a 44°C/1h). De los resultados obtenidos se observa un comportamiento general de un decremento significativo en la supervivencia celular con referencia a un incremento lineal para cada dosis de exposición. Así mismo, se observa el valor mínimo de 46×10^3 células para la dosis de 13.7 mGy, en contraste con el control (0 mGy) donde el valor fue de 86×10^3 células como se muestra en la siguiente figura:

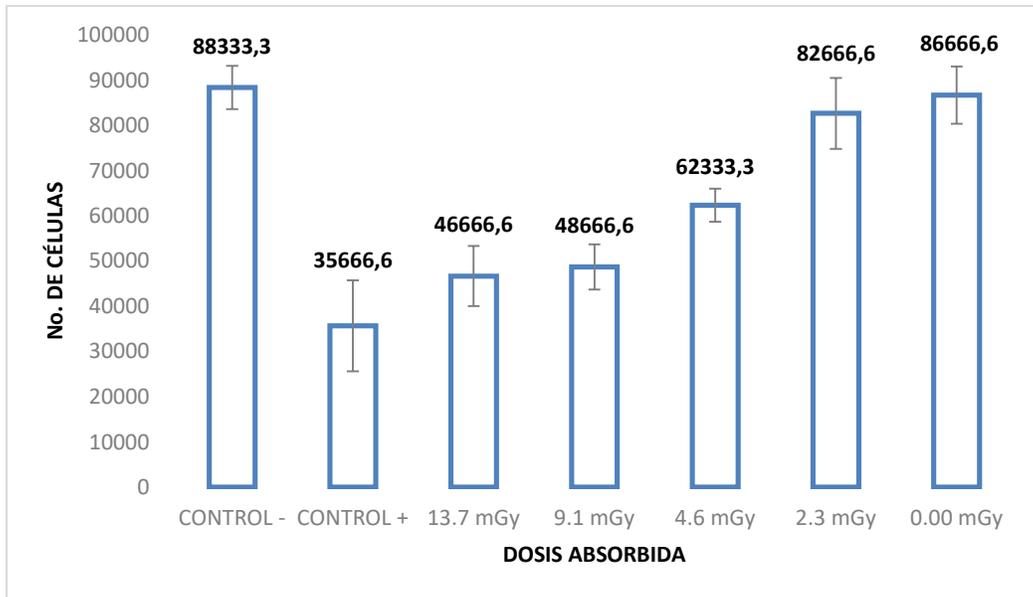


Fig 32. Supervivencia celular a distintas dosis de rayos X (fuente de rayos X de 70 KVp – 8 mA y un tiempo de exposición de 0.15 s).

4.2 Viabilidad de LMHSP expuestos a distintas dosis de rayos X

Se evaluó la viabilidad celular después de la exposición a distintas dosis de radiación X (radiación de fondo = 0.0 mGy, 2.2 mGy, 4.6 mGy, 9.1 mGy y 13.7 mGy), utilizando un control negativo (muestra a 37°C/1h), un control positivo (muestra a 44°C/1h). De los resultados que se obtuvieron se observó un decremento significativo con respecto control en las dosis de 2.3, 4.6 y 9.1 mGy. Donde el valor de menor viabilidad fue del 80.33 ± 2.361 % a una dosis de 4.564 ± 0.0912 mGy en contraste con el control con una viabilidad de 100 ± 0.0 % a una dosis de 0 mGy como se muestra en la siguiente figura:

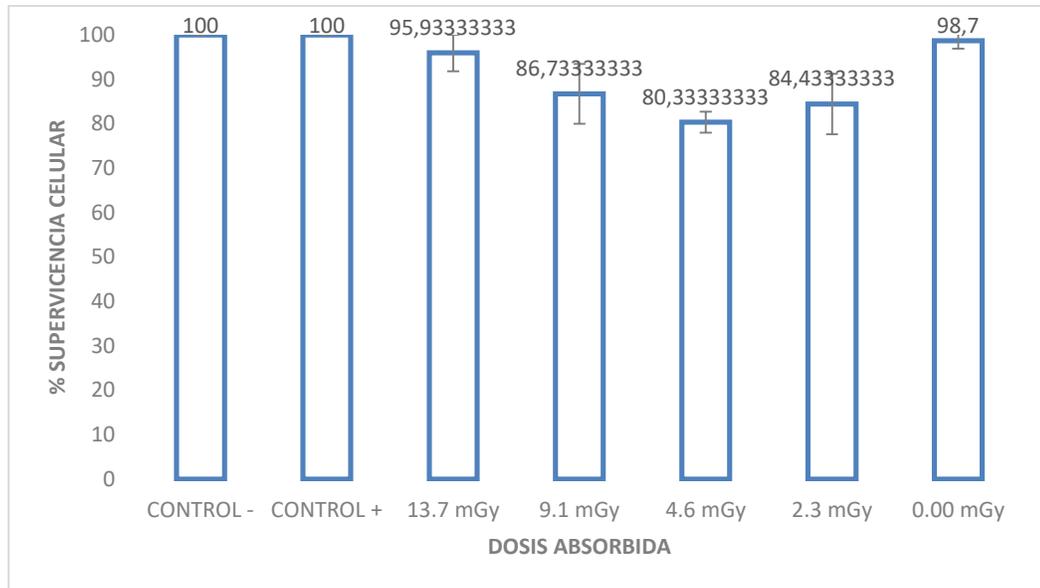


Fig. 33 Viabilidad celular frente a distintas dosis de exposición a Rayos X (fuente de Rayos X de 70 KVp – 8 mA y un tiempo de exposición de 0.15 s)

4.3 Relación del número de células y viabilidad de distintas muestras frente a dosis.

En la siguiente tabla se muestran los datos concretos sobre la supervivencia celular y viabilidad de las distintas muestras a las distintas dosis de exposición:

MUESTRA	DOSIS ABSORBIDA [mGy]	No. de Células/mL	% Viabilidad
Control Negativo 37°C	0.0000 ± 0.0000	88,333.3 ± 4784.2	100 ± 0.0
Control R. Fondo	0.0000 ± 0.0000	86666.6 ± 6342.1	98.7 ± 1.8384
1era Dosis	2.2821114 ± 0.0456422	82666.6 ± 7845.7	84.43 ± 6.7810
2nda Dosis	4.5642228 ±	62333.3 ±	80.33 ± 2.3612

	0.0912845	3681.7	
3era Dosis	9.1284456 ± 0.1825689	48666.6 ± 4988.8	86.733 ± 6.723
4ta Dosis	13.6926684 ± .2738534	46666.6 ± 6649.9	95.933 ± 4.112
Control Positivo 42°C	0.0000 ± 0.0000	35666.6 ± 10077.4	100 ± 0.0

Tabla 6. Relación de No. de células y viabilidad de distintas muestras frente a distintas dosis.

4.4 Análisis de la integridad o fragmentación de ADN en LMHSP expuestos distintas dosis de rayos X.

La integridad o fragmentación del ADN se observó mediante electroforesis en geles de agarosa y se encontró el siguiente patrón en cada corrida (**figura 34**), en el cual se observan amplias fragmentaciones en las muestras expuestas a la 3era y 4ta dosis (9.1 mGy y 13.7 mGy respectivamente), así como una fragmentación muy discreta en las muestras expuestas a la 1era y 2da dosis (2.2 mGy, 4.6 mGy respectivamente), así como a la radiación de fondo. Sin embargo, existe un patrón de disminución entre las dosis absorbidas en cada una de las muestras celulares.

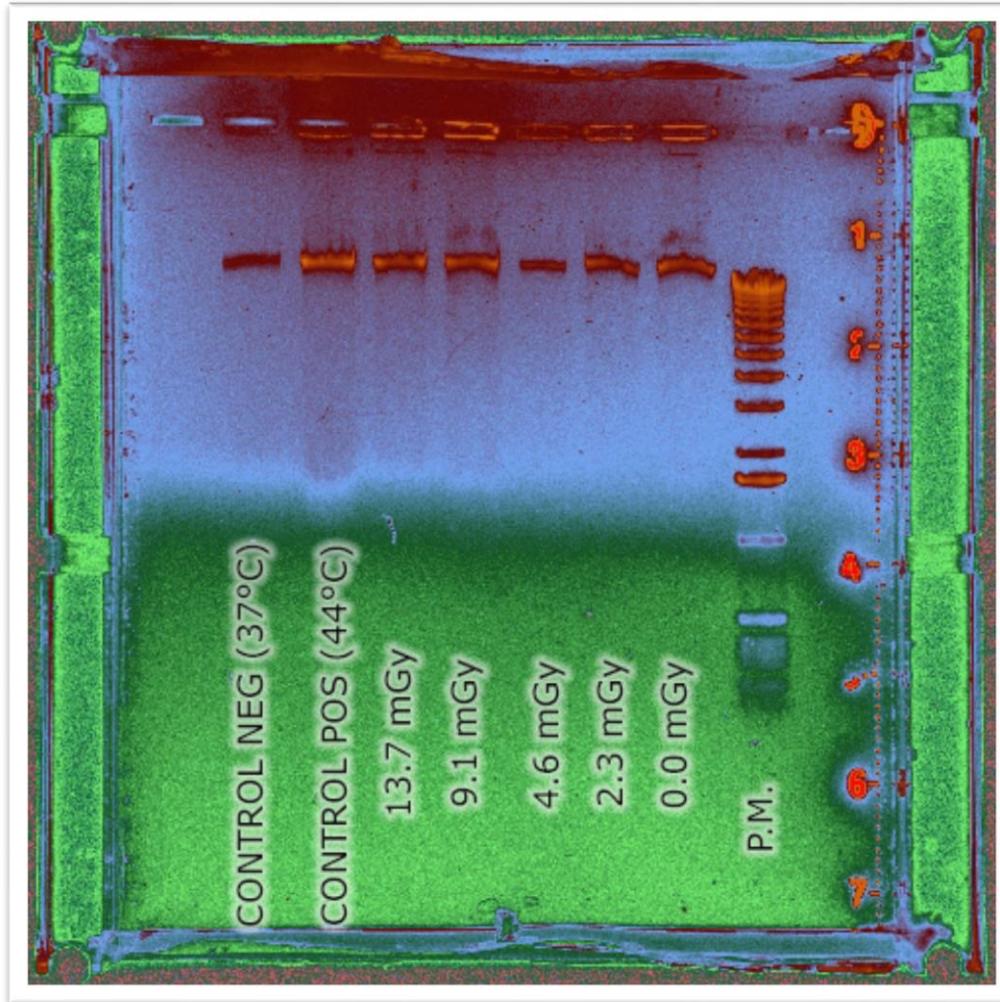


Fig. 34 Fragmentación del DNA de leucocitos mononucleares humanos expuestos a distintas dosis de rayos X (fuente de rayos X de 70 KVp – 8 mA y un tiempo de exposición de 0.15 s)

4.5 Expresión de Hsp70 y p53 en linfocitos humanos expuestos a rayos X

Se observó una expresión basal de Hsp70 en el control negativo (37°C/1hr), y una sobreexpresión en las dosis 3 y 4 (9.1 y 13.7 mGy), así como en el control + (44°C/1hr), como se muestra en la figura (**figura 35**). De manera similar, se observó una expresión basal de p53 en el control negativo (37°C/1hr), y una

sobreexpresión en las dosis 3 y 4 (9.1 y 13.7 mGy) , así como en el control + (44°C/1hr), como se muestra en la figura (figura 36).

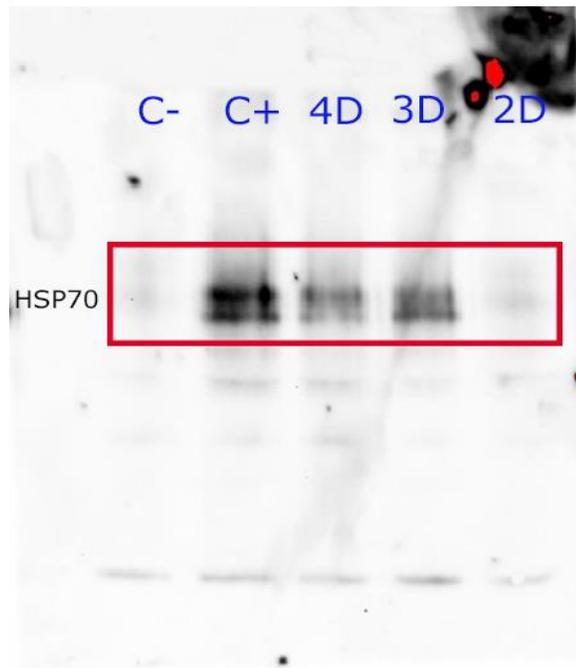


Fig. 35. Expresión de Hsp70 en LHMSF expuestos a rayos X

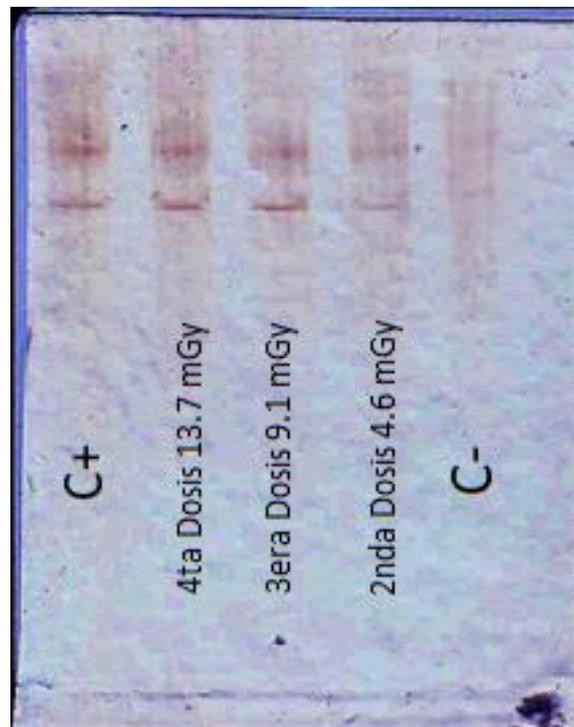


Fig. 36. Expresión de p53 en LHMSF expuestos a rayos X

V. DISCUSIÓN

Diversos estudios han contribuido a demostrar los efectos de la radiación ionizante a nivel celular, así como el daño que implican periodos prolongados de exposición a ciertas dosis. Las ventajas del uso de rayos X en el radiodiagnóstico y los reportes de los efectos colaterales dieron pie al inicio de la protección radiológica. Con el paso de los años ha mejorado el entendimiento sobre la interacción sobre los mecanismos y su interacción entre los rayos X y la materia, así como sus efectos a nivel celular y molecular los cuales se proyectan a la salud de los organismos vivos. El número de procedimientos de radiología de diagnóstico realizados en México continúa creciendo cada año, siendo este una preocupación existente para la exposición. Las dosis de radiación recibida deben centrarse en ser las más bajas como sea razonablemente posible. Así, este último es el principio establecido en el reglamento básico de las radiaciones ionizantes.

En el presente trabajo se buscó elucidar el efecto de la radiación ionizante a nivel celular, particularmente a nivel molecular (ADN) así como, la sobreexpresión de proteínas relacionadas (p53 y la hsp70) con la respuesta celular al daño. De los resultados obtenidos para el comportamiento general, se observó un decremento significativo en la supervivencia celular, con referencia a un incremento lineal para cada dosis de exposición, se puede explicar debido a que existe un límite permitido de exposición reportado en la literatura [ICRP, 2007](#) el cual establece dosis de 20 mSv/año para POE y 100 mSv para 5 años sin superar 50 mSv en un año determinado. En los resultados del presente estudio la máxima dosis de exposición fue de 13.7 mGy, considerado así un valor aproximado al antes mencionado la norma además, este dato se considera un hallazgo importante en protección radiológica debido a que representa para una sola exposición la dosis recibida de 30 disparos consecutivos del equipo de rayos X.

La medición del porcentaje de células vivas (viabilidad) en los LMHSP nos permitió observar que fue más significativo en la dosis de 4.6 mGy que provocó un decremento de la viabilidad de $\approx 20\%$ en comparación con el control a dosis de 0.0

mGy y el 100% de viabilidad, este porcentaje de viabilidad fue idóneo porque fueron ligeramente superiores en comparación a otros trabajos reportados como los de [Weinberg et. al, 2000](#)). Además es importante enfatizar que la técnica en fresco con ficoll permitió conseguir el incremento en el porcentaje de viabilidad como el trabajo reportado por [Ruitenberg et. al, 2006](#) que se utilizó como guía para el experimento. Experimentos anteriores del proceso de estandarización demostraron que el número de células decrece según el incremento en la dosis de exposición a rayos X, sin embargo, en los datos para viabilidad no se evidencia esta relación, así mismo se puede atribuir al proceso de apoptosis, que de igual manera este comportamiento ha sido reportado por el trabajo de [Ferlini et. al., 1996](#). Además, demuestra que la viabilidad no fue modificada significativamente (ya que no es posible visualizar las células muertas), no obstante, la población celular si disminuye.

Por otra parte, el ADN dañado, si no se repara adecuadamente, es una fuente de mutación e interfiere con muchos mecanismos celulares, como la replicación, la transcripción y el ciclo celular. La fragmentación del ADN se observó de manera significativa para las muestras expuestas a dosis de 9.1 y 13.7 mGy sin embargo, para ambas la respuesta cualitativamente no presenta diferencia alguna, estas se contrastan con la muestra control donde se puede observar que no hubo fragmentación. Trabajos reportados en la literatura para mediciones biodosimétricas en exposición a la radiación ionizante, han incluido el análisis de alteraciones cromosómicas inducidas por la radiación en linfocitos de sangre periférica, para personas que han sido expuestas así mismo, demuestran que a dosis menores de 20 mGy se produce un daño significativo molecular en la integridad del ADN como lo reporta [Rothkamm et. al. 2007](#). Además, se establece que los LMHSP son bioindicadores sensibles idóneos para bajas dosis de rayos X tomando en consideración que “dosis bajas” es relativo a la toma de decisión del investigador, pero si tomando como referencia la normatividad.

Por otra parte de los resultados para la expresión de p53 se observó una expresión basal de p53 para el control negativo (37°C/1hr), esto explica el comportamiento homeostático de la respuesta en expresión de la misma que se tomó como referencia cualitativamente para las muestras problema. Así mismo se demuestra que para dosis de 9.1 y 13.7 mGy la sobreexpresión fue identificada y significativamente evaluada, para este mismo comportamiento se contrasta con lo reportado en la literatura por [Lowe et al., 1993](#) sin embargo, las dosis y fuente de radiación para el anterior fue de 5 Gy por rayos gamma de una fuente de Co-60.

Por otra parte de los resultados para la expresión de hsp70 se observó una expresión basal de hsp70 para el control negativo (37°C/1hr), esto explica el comportamiento homeostático de la respuesta en expresión de la misma que se tomó como referencia cualitativamente para las muestras problema. Así mismo se demuestra que para dosis de 9.1 y 13.7 mGy la sobreexpresión fue identificada y significativamente evaluada, para este mismo comportamiento se contrasta con lo reportado en la literatura por [Park et. al., 2000](#), considerando para el anterior la dosis 1.3 Gy/min proveniente de una fuente de rayos gamma de Cs-137.

VI CONCLUSIONES

Se evaluó el daño al ADN así como la expresión de p53 y hsp70 en leucocitos mononucleares humanos expuestos a diferentes dosis de rayos X y con base a la evidencia mostrada los principales hallazgos de este trabajo son los siguientes:

1. Existe un decremento significativo en la población celular por exposición a rayos X, lo cual indica que son células radiosensibles en las cuales se pueden evaluar como biomarcadores celulares de exposición a dosis bajas (<1Gy) de radiación ionizante.
2. La medición del porcentaje de células vivas (viabilidad) en los LMHSP fue más significativo en la dosis de 4.6 mGy que provocó una disminución de la viabilidad de $\approx 20\%$, en dosis más altas no hubo tal decremento ya que las células optaron posiblemente por la vía apoptótica.
3. Entre el rango de las dosis 4.6-9.1 mGy por rayos X la respuesta de exposición en LMHSP fue evaluada y establecida como umbral para el daño en la integridad del ADN.
4. Los LMHSP presentan radiosensibilidad para bajas dosis de rayos X (< 20 mGy) por consiguiente, son considerados como buenos bioindicadores de exposición para rayos X.
5. A partir de 9.1 mGy existe sobreexpresión de hsp70 y p53 en LMHSP, esta respuesta molecular permite utilizar a estas proteínas como biomarcadores de elección para exposición a dosis bajas (<1Gy) de radiación ionizante.

6. Los hallazgos permitieron estimar una respuesta de daño molecular que se puede utilizar como bioindicador por exposición para usuarios de equipos de rayos X con esas características, y asume una importancia significativa en protección radiológica.

VII PERSPECTIVAS

1. Evaluar viabilidad celular por métodos más precisos como el ensayo de reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT).
2. Evaluar viabilidad y daño celular por exposición a radiación gamma.
3. Determinar daño al ADN a distintos tiempos de exposición a radiación.
4. Determinar la dosis umbral para daño de ADN y sobreexpresión de p53 y hsp70.
5. Evaluar procesos apoptóticos por exposición a rayos X

REFERENCIAS

- AINSBURY, E. A., BOUFFLER, S. D., DORR, W., GRAW, J., MUIRHEAD, C. R., EDWARDS, A. A. & COOPER, J. 2009. Radiation cataractogenesis: a review of recent studies. *Radiat Res*, 172, 1-9.
- AL., C. E. 2001. Evaluation of Chromosomal Aberrations, Micronuclei, and Sister Chromatid Exchanges in Hospital Workers Chronically Exposed to Ionizing Radiation.
- ALAIN J COZZONE, I. O. B. A. C. O. P., CNRS, LYON, FRANCE
<cozzone2002.pdf>.
- ALBERTS, B. 2008 A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter
Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, , New York, NY.
- AMOS, D.B., AND POOL, P., "HLA typing" in Manual of Clinical Immunology, Rose, N.R., and Friedman, H., eds., American Society for Microbiology, (Washington, DC: 1976) pp. 797-804.
- ANDISCO, D., BLANCO, S. & BUZZI, A. E. 2014. Dosimetría en radiología.
Revista Argentina de Radiología, 78, 114-117.
- ATAM, P.A., E. Alyn and Bacon 1971 Fundamentals of Atomic Physics
- AZORIN J.& AZORIN-VEGA J.C. (2010). Protección Radiológica. México, D.F.:
Universidad Autónoma Metropolitana.
- BASHEERUDEEN, S. A. S., KANAGARAJ, K., JOSE, M. T., OZHIMUTHU, A.,
PANEERSELVAM, S., PATTAN, S., JOSEPH, S., RAAVI, V. & PERUMAL,
V. 2017. Entrance surface dose and induced DNA damage in blood lymphocytes of patients exposed to low-dose and low-dose-rate X-irradiation during diagnostic and therapeutic interventional radiology procedures. *Mutat Res*, 818, 1-6.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

- BRAITHWAITE, A. W. & PRIVES, C. L. 2006. p53: more research and more questions. *Cell Death Differ*, 13, 877-80.
- BRENNER, D. J., DOLL, R., GOODHEAD, D. T., HALL, E. J., LAND, C. E., LITTLE, J. B., LUBIN, J. H., PRESTON, D. L., PRESTON, R. J., PUSKIN, J. S., RON, E., SACHS, R. K., SAMET, J. M., SETLOW, R. B. & ZAIDER, M. 2003. Cancer risks attributable to low doses of ionizing radiation: assessing what we really know. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13761-6.
- BROOKS AL, KHAN MA, JOSTES RF, ET AL (1993). Metaphase chromosomal aberration as markers of radiation exposure and dose. *J Toxicol Environ Health*, 40, 277-88.
- CARDOSO, R., TAKAHASHI-HYODO, S., PELTI JR, P., GHILARDI-NETO, T., & SAKAMOTO-HOJO, E. T. (2001). Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*, 21(6), 431-439.
- CEMBER, H., JOHNSON, T. E. 2008. Introduction to Health Physics: Fourth Edition McGraw Hill Companies, Inc., New York, NY.
- CHEKI, M., SHIRAZI, A., MAHMOUDZADEH, A., BAZZAZ, J. T. & HOSSEINIMEHR, S. J. 2016. The radioprotective effect of metformin against cytotoxicity and genotoxicity induced by ionizing radiation in cultured human blood lymphocytes. *Mutat Res*, 809, 24-32.
- CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1 (2008).
- DE GONZÁLEZ, A. B. & DARBY, S. 2004. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *The Lancet*, 363, 345-351.
- DOBZYNSKA, M. M., PACHOCKI, K. A., GAJOWIK, A., RADZIKOWSKA, J. & SACKIEWICZ, A. 2014. The effect occupational exposure to ionizing radiation on the DNA damage in peripheral blood leukocytes of nuclear medicine personnel. *J Occup Health*, 56, 379-86.
- DUNN, P. M. 2001. Wilhelm Conrad Roentgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 84, F138-9.

- DURHAM, J. 2006. Concepts, quantities, and dose limits in radiation protection dosimetry. *Radiation Measurements*, 41, S28-S35.
- FAZEL, R., KRUMHOLZ, H. M., WANG, Y., ROSS, J. S., CHEN, J., TING, H. H., SHAH, N. D., NASIR, K., EINSTEIN, A. J. & NALLAMOTHU, B. K. 2009. Exposure to low-dose ionizing radiation from medical imaging procedures. *N Engl J Med*, 361, 849-57.
- HUNTER-LAVIN, C., DAVIES, E. L., BACELAR, M. M., MARSHALL, M. J., ANDREW, S. M., & WILLIAMS, J. H. (2004). Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(2), 511-517.
- IAEA (2007). Dosimetry in diagnostic radiology an international code of practice. Technical reports series No. 457, international Atomic Energy Agency. pp 32-40.
- IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, & INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (2002). *Non-ionizing Radiation: Static and extremely low-frequency (ELF) electric and magnetic fields* (Vol. 80). World Health Organization.
- ICRP (1991) Recommendations of the international commission on radiological protection. ICRP publication 60. *annals of the icrp* 21: 1-120.
- ICRP-103 VON BOETTICHER, H., LACHMUND, J., LOOE, H. K., HOFFMANN, W., & POPPE, B. (2008, MAY). 2007 recommendations of the ICRP change basis for estimation of the effective dose: what is the impact on radiation dose assessment of patient and personnel?. In *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren* (Vol. 180, No. 05, pp. 391-395). © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart· New York.
- JACKSON, S. P. & BARTEK, J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071-8.
- LOMAX, M. E., FOLKES, L. K. & O'NEILL, P. 2013. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 25, 578-85.

- LOWE, S. W., SCHMITT, E. M., SMITH, S. W., OSBORNE, B. A., & JACKS, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362(6423), 847.
- MARSHALL, G., & KEENE, S. (2007). Radiation safety in the modern radiology department: a growing concern. *The Internet Journal of Radiology*, 5(2), 1-6.
- MAHANEY, B. L., MEEK, K. & LEES-MILLER, S. P. 2009. Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*, 417, 639-50.
- MAHMOUD PASHAZADEH, A., AGHAJANI, M., NABIPOUR, I. & ASSADI, M. 2014. Annual effective dose from environmental gamma radiation in Bushehr city. *J Environ Health Sci Eng*, 12, 4.
- MITCHELL, D., WILLERSLEV, E. & HANSEN, A. Damage and repair of ancient DNA. *Mutat Res.* **571**, 265–276 (2005).
- MCCARTHY, J.F., AND SHUGART, L.R. *Biomarkers of environmental contamination*. United States: N. p., 1990. Web.
- NAKAMURA, A., ITAKI, C., SAITO, A., YONEZAWA, T., AIZAWA, K., HIRAI, A., SUGANUMA, H., MIURA, T., MARIYA, Y. & HAGHDOOST, S. 2017. Possible benefits of tomato juice consumption: a pilot study on irradiated human lymphocytes from healthy donors. *Nutr J*, 16, 27.
- NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION, Science Mission Directorate. (2010). Introduction to the Electromagnetic Spectrum. Retrieved [*insert date - e.g. August 10, 2016*], from NASA Science website: http://science.nasa.gov/ems/01_intro
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos (modifica a la NOM-003-SSA2-1993, publicada el 18 de julio de 1994).
- ROOS, W. P. & KAINA, B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, 12, 440-50.
- ROOTS, R. & OKADA, S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiat Res* **64**, 306–320 (1975).

- RUITENBERG, J. J., MULDER, C. B., MAINO, V. C., LANDAY, A. L., & GHANEKAR, S. A. (2006). VACUTAINER® CPT™ and Ficoll density gradient separation perform equivalently in maintaining the quality and function of PBMC from HIV seropositive blood samples. *BMC immunology*, 7(1), 11.
- ROTHKAMM, K. & LOBRICH, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5057-62.
- ROTHKAMM, K., BALROOP, S., SHEKHDAR, J., FERNIE, P., & GOH, V. (2007). Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology*, 242(1), 244-251.
- SANTIVASI, W. L. & XIA, F. 2014. DAÑO AL ADN Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal*, 21, 251-9.
- SHIMURA, T., YAMAGUCHI, I., TERADA, H., OKUDA, K., SVENDSEN, E. R. & KUNUGITA, N. 2015. Radiation occupational health interventions offered to radiation workers in response to the complex catastrophic disaster at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *J Radiat Res*, 56, 413-21.
- TANG, F. R. & LOKE, W. K. 2015. Molecular mechanisms of low dose ionizing radiation-induced hormesis, adaptive responses, radioresistance, bystander effects, and genomic instability. *International Journal of Radiation Biology*, 91, 13-27.
- THORSBY, E., AND BRATLIE, A., "A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions." *Histocompatib*
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TSOULFANIDIS, N. (1995) *measurement and detection of radiation*. Taylor and Francis, Fourth Edition, Washington, DC.
- UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE ON THE EFFECTS OF ATOMIC RADIATION. (2014). UNSCEAR 2013 Report Volume I. Report to the general assembly scientific annex A: Levels and effects of radiation

exposure due to the nuclear accident after the 2011 great east-Japan earthquake and tsunami.

VEGA-CARRILLO, H. R., GUERRA-MORENO, J. A., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R., PINEDO-SOLÍS, A., SALAS-LUÉVANO, M. A., RIVERA-MONTALVO, T., & AZORÍN-NIETO, J. (2011). Niveles de dosis en radiología convencional. *Rev. med. nucl. Alasbimn j*, 13(52).

VON BOETTICHER, H., LACHMUND, J., LOOE, H. K., HOFFMANN, W., & POPPE, B. (2008, MAY). 2007 recommendations of the ICRP change basis for estimation of the effective dose: what is the impact on radiation dose assessment of patient and personnel?. In *RöFo-Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren* (Vol. 180, No. 05, pp. 391-395). © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart· New York.

WEINBERG, A., ZHANG, L., BROWN, D., ERICE, A., POLSKY, B., HIRSCH, M. S., ... & LAMB, K. (2000). Viability and functional activity of cryopreserved mononuclear cells. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7(4), 714-716.

WINCHESTER, R.J., AND ROSS, G., "Methods for enumerating lymphocyte populations" in *Manual of Clinical Immunology*, Rose, N.R., and Friedman, H. eds., American Society for Microbiology, (Washington, DC: 1976) pp. 64-76.

YU, A., LI, P., TANG, T., WANG, J., CHEN, Y. & LIU, L. 2015. Roles of Hsp70s in Stress Responses of Microorganisms, Plants, and Animals. *Biomed Res Int*, 2015, 510319.

ZAMANIAN, A. & HARDIMAN, C. 2005. Electromagnetic Radiation and Human Health: A Review of Sources and Effects.

ANEXOS

8.1 Biometría hemática completa mediante citometría de flujo



LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS CONDESA
 TELS: 4921648613 o 1648683
 E-MAIL: condesalab@gmail.com
 www.facebook.com/laboratoriicondesa

Laboratorio Bioquímico Condesa

NOMBRE: **DIEGO CANO SANCHEZ**
 SEXO: **MASCULINO** EDAD: **31 AÑOS**
 MEDICO: **A QUIEN CORRESPONDA**
 FECHA: **20 DE FEBRERO DE 2018**

ANÁLISIS: BIOMETRÍA HEMÁTICA COMPLETA (BHC)

ESTUDIO	RESULTADO	V. REFERENCIA
FÓRMULA BLANCA		
LEUCOCITOS:	4.8 X103/mm3	4.5 - 9.5 X103/mm3
LINFOCITOS:	36 %	15 - 46 %
MONOCITOS:	2 %	0 - 10 %
NEUTRÓFILOS:	60 %	50 - 70 %
EOSINÓFILOS:	2 %	0 - 6 %
BASÓFILOS:	0 %	0 - 1 %
BANDAS:	1 %	0 - 5 %
SEGMENTADOS:	59 %	47 - 70 %
FÓRMULA ROJA		
ERITROCITOS:	5.92 X106/mm3	M=4.04 - 5.48 X106/mm3 H=4.69 - 6.13 X106/mm3
HEMOGLOBINA:	17.4 gr/dL	M=12 - 16 gr/dL H=14 - 18 gr/dL
HEMATOCRITO:	47.1 %	M=38 - 48 % H=42 - 54 %
VCM:	92 fL	80 - 100 fL
HCM:	30.3 pg	27 - 34 pg
MCHC:	31.9 gr/dL	30 - 36 gr/dL
RDW:	32.4	11 - 14 %
PLAQUETAS:	242 000/mm3	150 - 450 000/mm3

METODO: CITOMETRIA DE FLUJO, MICROSCOPIA E IMPEDANCIA

ATENTAMENTE

Q.F.B. Diana Cecilia Reyes Moreno
 Universidad Autónoma de Zacatecas
 CED. PROF. 7005581

Métriz: AV. BARONES 110-B COL SPAUAZ, GUADALUPE, ZAC. Suc.: LUIS MOYA 1000F COL. GONZALEZ ORTEGA ZACATECAS, ZAC.

8.2 Soluciones utilizadas en la determinación de los niveles proteínicos de p53 y hsp70

Solución amortiguadora de muestra 5X

Tris 1M pH 6.8	0.6 mL
Glicerol 50%	5 mL
SDS 10%	2 mL
Azul de Bromofenol 1% (p/v)	1 mL
β -mercaptoetanol 0.288 M	0.5 mL
Aforo (agua Milli Q)	10 mL
- Solución de acrilamida 30%	
Acrilamida	29.2 g
Bis-acrilamida	0.8 g
Aforo (agua Milli Q)	100 mL
pH	7.0
- Solución del gel separador (10%)	
Acrilamida 30%	3.3 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5 mL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%	0.1 mL
Persulfato de amonio (APS) 10%	0.1 mL
TEMED	0.004 mL
Aforo (agua Milli Q)	10 mL
- Solución del gel concentrador (5%)	
Acrilamida 30%	0.67 mL
Tris 1.0 M pH 6.8	0.5 mL
SDS 10%	0.04 mL
APS 10%	0.04 mL
TEMED	0.004 mL
Aforo (agua Milli Q)	4 mL
- Solución de electroforesis 5X	

Tris	15.14 g
Glicina	93.84 g
SDS	5 g
Aforo (agua MilliQ)	1 L
pH	8.3
- Solución de transferencia	
Tris	5.82 g
Glicina	2.93 g
Metanol	200 mL
Aforo (agua Milli Q)	1 L
- Solución bloqueadora	
Leche descremada	0.4 g
BSA	0.1 g
Aforo (solución TBS pH 8.0)	20 mL
- Solución TBS	
Tris	2.4 g
NaCl	8 g
Aforo (agua Milli Q)	1 L
pH	8.0
- Solución TBS-Tween 0.1%	
Tween	1 mL
Aforo (solución TBS pH 8.0)	

8.3 Soluciones empleadas en los ensayos de viabilidad celular

- **Azul de tripano al 0.4%**

CURRICULUM VITAE

Diego Cano
Sánchez

Q.F.B.



qfbcano@gmail.com

492-164-8683

Real del Edén 78 Col. Condesa, Zacatecas, Zac., México

20 December, 1985

EXPERIENCIA LABORAL

Químico Analista

LABCON Laboratorio Bioquímico Condesa

01/2011 – Presente *Guadalupe, Zacatecas*

Químico Analista en las áreas de Hematología, Inmunología, Uroanálisis, Serología, Química sanguínea y Toma de muestra. Responsable Sanitario y Gerente.

Contact: *condesalab@gmail.com – 492-164-8613*

Docente Nivel Medio Superior

Colegio del Centro (Promotora de Educación A.C.)

01/2011 – 07/2016 *Zacatecas, Zac.*

Materias Impartidas: Química I,II,III y IV, Biología I y II, Física I,II,III y IV, Ciencias Experimentales, Bioquímica I y II y Ciencias de la salud I y II, así como sus respectivos Laboratorios.

Contact: *• Domicilio Donato Guerra 148, Marianita, 98060 Zacatecas - 92-2-60-39*

Químico Analista

SSZ- LESP (Laboratorio Estatal de Salud Pública)

02/2008 – 10/2009

Achievements/Tasks

- Área de Serología (Inmunología), Id & Dx de Virus Respiratorios (Influenza A y B, Parainfluenza tipo 1, 2, y 3, Adenovirus y VSR) Brucella, Hepatitis, Sífilis. • Importante participación Dx Influenza cepa H1N1 brote Abril-Julio 2009. Análisis muestral por técnica de inmunofluorescencia Indirecta.

FORMACIÓN ACADÉMICA

Maestría en Ciencias Nucleares

UAEN Universidad Autónoma de Zacatecas

08/2016 – 07/2018 *Zacatecas, Zac. México*

Enfoque Terminal en Ingeniería Nuclear

- Participación "VISUALIZACIÓN DE PARTÍCULAS CARGADAS IONIZANTES" XVII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SOLID STATE DOSIMETRY, Santo Domingo, República Dominicana, 2017
- Participación "VISUALIZACIÓN DE PARTÍCULAS IONIZANTES" LX Congreso Nacional de Física, Monterrey, NL, 2017
- Ponencia "EVALUACIÓN DE DAÑO AL DNA MEDIANTE LA SOBREEXPRESIÓN DE HSP70 Y P53 EN LINFOCITOS EXPUESTOS A RAYOS X Y NEUTRONES" Seminario UAEN Zacatecas, Zac. 2017
- Participación "PARTÍCULAS CARGADAS IONIZANTES" Jornadas de Investigación UAZ-2017, Zacatecas, Zac.
- Participación "EL CALOR Y LA LUZ UV INDUCEN DAÑO AL ADN EN LEUCOCITOS HUMANOS" Jornadas de Investigación UAZ-2017, Zacatecas, Zac.
- Participación ponencia "VISUALIZACIÓN DE PARTÍCULAS CARGADAS IONIZANTES" Seminario de investigación UAA, Aguascalientes 2017
- Participación "ALTERACIÓN EN LA VIABILIDAD CELULAR, DAÑO AL ADN Y CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE HSP 70 EN LEUCOCITOS HUMANOS EXPUESTOS A LUZ UVA Y CALOR" V SIMPOSIO NACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS BIOLÓGICAS, 2017

Químico Farmacéutico Biólogo

UACQ Universidad Autónoma de Zacatecas

07/2005 – 10/2010 *Zacatecas, Zac. México*

HABILIDADES

Experiencia Docente

Determinaciones cualitativas y cuantitativas en materiales orgánicos e inorgánicos

Dominio de técnicas de Biología Molecular

Determinaciones en Análisis Clínicos especializados

Primeros Auxilios Básicos

PROYECTOS PERSONALES

Llevar a cabo práctica docente en nivel licenciatura

Consolidación de Laboratorio Bioquímico

LANGUAGES

Inglés



INTERESES

Práctica docente e Investigación