



**UNIVERSIDAD  
MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE,  
BIOTECNOLOGÍA**

**Aplicación de herramientas bidosimétricas para la caracterización del efecto biológico de rayos X pulsados emitidos por un dispositivo de plasma focus**

Christoph Alexander Janicek Schwarz

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Santiago - Chile  
2022



UNIVERSIDAD  
**MAYOR**

para espíritus emprendedores

Facultad de Ciencias

**ESCUELA DE  
BIOTECNOLOGÍA**

**Aplicación de herramientas bidosimétricas para la caracterización del efecto biológico de rayos X pulsados emitidos por un dispositivo de plasma focus**

Christoph Alexander Janicek Schwarz

Proyecto de Tesis para optar al título de Biotecnólogo

Tutora: Valentina Alejandra Verdejo Parada, MSc.

Co-tutores: Felipe Allende, Mag.; José Moreno, PhD.

Santiago - Chile

2022

*Para Godfried Janicek, mi socio*

*Sé que en alguna parte estas sonriendo porque por fin llegue a puerto*

SOLO USO ACADÉMICO

## Agradecimientos

Agradezco:

A mi tutora Valentina Verdejo MSc., por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis en una nueva área que permitió expandir mi visión científica, por la paciencia y constante ayuda y apoyo en todo momento y por hacer esta una experiencia enriquecedora.

A Analía Radl Lcda., por su experiencia y apoyo cuando las cosas se entrampaban, por siempre estar ahí con una sonrisa y una palabra de aliento y por todas las piedras que pateamos de una u otra forma.

A mis cotutores José Moreno PhD. y Felipe Allende Mag., por su apoyo en todo el proceso y por permitirme ver nuevas áreas de la ciencia de otra forma.

A la Comisión Chilena de Energía Nuclear, por otorgarme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis en sus instalaciones y por todas las personas que forman parte de la institución, que siempre tuvieron conmigo la mejor disposición, amabilidad y colaboración profesional.

A mis profesores y académicos que me entregaron los conocimientos y herramientas para llegar a este paso final con todo lo necesario y más para poder llevarlo a cabo y terminar así mi proceso de formación de pregrado.

Por supuesto, a mi familia, amigos y otros que estuvieron presentes en cada paso de este largo proceso de formación, apoyándome incondicional y desinteresadamente, en especial en esta última etapa del trabajo de mi tesis

## INFORMACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN

### Centros de investigación

Laboratorio de Dosimetría Citogenética (LABDOCI), perteneciente a la Sección Vigilancia Radiológica Individual, de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN).

El LABDOCI, tiene como misión realizar los análisis de estimación de dosis absorbida por personas presuntamente sobreexpuestas a radiación ionizante. Para ello el laboratorio utiliza la técnica de dicéntricos y anillos céntricos. Este ensayo permite realizar una evaluación dosimétrica inmediata de exposiciones agudas, a todo o gran parte del cuerpo, por irradiación externa y/o incorporación interna de radio nucleídos con distribución uniforme en el organismo.

Además, el laboratorio realiza las siguientes actividades de investigación:

- Proyecto CRP E35010: “Applications of Biological Dosimetry Methods in Radiation Oncology, Nuclear Medicine, Diagnostic and Interventional Radiology (MEDBIODOSE)”.
- FONDECYT Regular 1190677: “Experimental Characterization of Pulsed Radiations and Particles Generated by Low Energy Plasma Focus Devices and Study of Theirs Effects on Matter”.

Centro de Investigación en la Intersección de Física de Plasma, Materia y Complejidad, P2mc.

El "Centro de Investigación en la Intersección de Física de Plasma, Materia y Complejidad, P2mc", es un centro con un enfoque tanto experimental como teórico, que se centra en el desarrollo y estudio de plasmas continuos de baja temperatura y densidad, de interés en aplicaciones, y de plasmas pulsados de alta temperatura y densidad, caracterizado por un comportamiento complejo fuera del equilibrio y capaz de inducir reacciones de fusión nuclear, formación de estructuras de plasma de alta densidad de energía, haces intensos de corta duración de partículas cargadas y radiación electromagnética en un amplio espectro.

### Fuente de financiamiento

FONDECYT Regular 1190677: “Experimental Characterization of Pulsed Radiations and Particles Generated by Low and Very Low Energy Plasma Focus Devices and Study of Theirs Effects on Matter”

## ABREVIATURAS

**AC:** Aberraciones Cromosómicas

**ACI:** Aberraciones Cromosómicas Inestables

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**BrdU:** Bromo Desoxiuridina

**CBMN:** Micronúcleos con Bloqueo de Citocinesis

**DCA:** Técnica de Dicéntricos y Anillos céntricos

**DSB:** Quiebre de Doble Hebra

**FISH:** Hibridación in situ con Sondas Fluorescentes

**IC 95%:** Intervalo de Confianza del 95%

**IM:** Índice Mitótico

**Indel:** Lesión de Inserción o Delación

**IRSN:** Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

**LET:** Tránsferencia Lineal de Energía

**miARN:** Micro Ácido Ribonucleico

**OIEA:** Organismo Internacional de Energía Atómica

**OSL:** Cristales de Luminiscencia de Estimulación Óptica

**PCC:** Condensación Prematura de Cromosomas

**PFD:** Equipo de Plasma Focus

**RI:** Radiación Ionizante

**RIC:** Radiación Ionizante Continua

**RIP:** Radiación Ionizante Pulsada

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**SBF:** Suero Bovino Fetal

**SSB:** Quiebre de Hebra Simple

**TLD:** Cristales Termoluminiscentes

## **i. ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b> Conceptos generales de la radiación ionizante	1
<b>1.2</b> Efectos biológicos de la radiación ionizante	3
<b>1.3</b> Dosimetría	8
<b>1.3.1</b> Dosimetría externa	8
<b>1.3.2</b> Dosimetría biológica	10
<b>1.4</b> Radiación continua y radiación pulsada	12
<b>1.4.1</b> Fases de descarga	14
<b>1.4.2</b> Generación de rayos X	15
<b>1.5</b> Estado actual de aplicación de PFD	15
<b>1.6</b> Posibles aplicaciones biotecnológicas de PFD en radio medicina	17
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b> Medios de cultivo y soluciones	20
<b>3.2</b> Equipo de plasma focus	21
<b>3.3</b> Tamaño muestral	22
<b>3.4</b> Irradiación de muestras con fuente continua	22
<b>3.4.1</b> Digitalización de metafases de muestras de radiación continua	22
<b>3.5</b> Obtención de muestras biológicas	22
<b>3.5.1</b> Separación de linfocitos y formación de monocapa	23
<b>3.6</b> Ensayo de radiación en fuente pulsada de rayos X (PF-2kJ)	24
<b>3.6.1</b> Cultivo de linfocitos y procesamiento de muestras irradiadas	25
<b>3.7</b> Irradiación de cristales TLD-100	26
<b>3.8</b> Criterio de análisis de metafases	26
<b>3.8.1</b> Criterio de aceptación o rechazo	27
<b>3.8.2</b> Índice mitótico	28
<b>3.9</b> Análisis de datos	29

<b>4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b> Análisis de efecto biológico de radiación pulsada	30
<b>4.2</b> Confección de curva de dosis-respuesta de rayos X de fuente continua	32
<b>4.3</b> Comparación de herramientas dosimétricas utilizadas para evaluar dosis y efecto Biológico en PFD	34
<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b> Análisis de efecto biológico de radiación pulsada	36
<b>5.2</b> Curva de dosis-respuesta de radio X de fuente continua	38
<b>5.3</b> Comparación de herramientas dosimétricas para evaluar dosis y efecto biológico En PFD	39
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS</b>	<b>41</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>43</b>

SOLO USO ACADÉMICO



## ii. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Aplicaciones de la RI, se clasifican según su área asociada y se ejemplifica la fuente de RI más común.	3
<b>Tabla 2:</b> Comparación de pruebas citogenéticas.	10
<b>Tabla 3:</b> Distribución, frecuencia, Índice de dispersión (D), Índice de Papworth (U) e índice mitótico de ACI en muestras irradiadas con una fuente pulsada de rayos X, emitida por PFD.	30
<b>Tabla 4:</b> Distribución, frecuencia, Índice de dispersión (D), Índice de Papworth (U) e índice mitótico de ACI en muestras irradiadas con una fuente pulsada de rayos X, emitida por PFD. Valores extraídos de tabla 1.	31
<b>Tabla 5:</b> Resultados del recuento de metafases válidas en muestras irradiadas con una fuente continua de rayos X	33
<b>Tabla 6:</b> Promedio de dosis equivalente obtenida de la irradiación de TLD-100 con RIP emitida por PFD a diferentes números de pulsos.	34
<b>Tabla 7:</b> Comparación de la frecuencia de ACI “interpolada” desde la curva de y la frecuencia de ACI “experimental”	34

### iii. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espectro Electromagnético.	2
<b>Figura 2:</b> Ilustración de los tipos de efectos de la RI por sobre el ADN	5
<b>Figura 3:</b> Daño producido por RI al ADN	6
<b>Figura 4:</b> Formación de ACI (cromosoma dicéntrico)	7
<b>Figura 5:</b> Esquema de funcionamiento de cristales termoluminiscentes TLD	9
<b>Figura 6:</b> Observación al microscopio de una metafase del cultivo in Vitro de linfocitos de sangre periférica	11
<b>Figura 7:</b> Ilustración de los diseños de PFD.	13
<b>Figura 8:</b> Esquemas de PF-2kJ, de configuración Mather, de CEN La Reina de CCHEN	14
<b>Figura 9:</b> Esquema de la secuencia lógica de pasos seguidos en la metodología de esta tesis	20
<b>Figura 10:</b> Montaje y posicionamiento de la muestra de linfocitos de sangre periférica sobre la ventana de irradiación de polietileno de PF-2kJ.	24
<b>Figura 11:</b> Campo de observación al microscopio con aumento de 16X, tinción FPG, flechas indican metafases que deben ser observadas a 160X para su validación.	26
<b>Figura 12:</b> Metafases en aumento de 160x, tinción FPG	28
<b>Figura 13:</b> Frecuencia de ACI obtenido en diferentes ensayos con RIP	32
<b>Figura 14:</b> Curva de dosis-respuesta de rayos X emitidos de una fuente continua	33
<b>Figura 15:</b> Comparación de herramientas dosimétricas	35

#### iv. RESUMEN

En la presente tesis, se realizó la caracterización de un equipo de plasma focus (PFD) de 2 kJ (PF-2kJ), mediante la aplicación de herramientas de dosimetría biológica. A la fecha la caracterización de la radiación pulsada de rayos X mediante la utilización de este tipo de equipamiento se ha hecho únicamente mediante la aplicación de dosimetría física, y la utilización de herramientas de dosimetría biológica se ha hecho crucial para poder observar y caracterizar el efecto biológico de la radiación ionizante (RI) de manera directa. Para esto, muestras de linfocitos de sangre periférica previamente aislados fueron irradiadas con rayos X pulsados emitidos por el PFD en 10, 20 y 40 pulsos. La consiguiente cuantificación de aberraciones cromosómicas inestables (ACI), mediante la técnica de dicéntricos y anillos céntricos (DCA), mostró que a mayor cantidad de pulsos se observa un mayor efecto biológico. Se inició la confección de una curva de dosis respuesta para rayos X de baja energía (40 keV), con ésta fue posible comparar los resultados obtenidos mediante la identificación y cuantificación de ACI y los resultados de cristales termoluminiscentes (TLD) en ensayos de irradiación con PFD. Tras la comparación, se determinó que ambas técnicas poseen resultados similares, con la diferencia que la técnica de DCA, evidenció un mayor efecto biológico a bajo número de pulsos, en relación a lo estimado por TLD, esto se podría asociar a una subestimación de dosis de TLD a bajo número de pulsos. La correcta caracterización de estos equipos es crucial, ya que estos podrían ser aplicados en las áreas de la radiobiología y biomedicina, dentro de esta última teniendo una potencial aplicación como tratamiento alternativo a la radioterapia convencional, con la ventaja de poder obtener resultados similares a menores dosis. Esta tesis muestra que es posible caracterizar la emisión de rayos X de forma pulsada por equipos de PFD utilizando herramientas de dosimetría biológica, y que la aplicación de éstas permite visualizar los efectos biológicos que no estarían evidenciados utilizando otras técnicas dosimétricas. Los resultados obtenidos en esta tesis, por lo tanto, abren una ventana a la futura exploración de la utilización de radiación ionizante pulsada como una fuente alternativa de radiación en áreas de la radiobiología o biomedicina.

## **v. SUMMARY**

The present thesis makes a characterization of the biological effects observed in live tissue irradiated with a source of pulsed energy from a 2 kJ (PF-2kJ) plasma focus device (PFD), using biological dosimetry as the main tool. Previous to this thesis, the characterization of PFD has involved only the use of physical dosimetry and because of that, the need to apply biological dosimetry tools has become crucial, allowing us to observe and characterize the biological effects in a direct way. To achieve this, samples of peripheral blood lymphocytes previously isolated, were irradiated with pulsed X-rays emitted by PFD at 10, 20 and 40 pulses. The ensuing quantification of unstable chromosomal aberrations (ACI) using the dicentric and centric rings technique (DCA) showed a higher level of biological effect correlated with a higher quantity of pulses. An initial dose-response curve for low energy X-Ray (40 keV) was made, this curve made it possible to compare the results obtained using DCA technique and the results of previously irradiated TLD crystals with a PFD device. After the comparison, it was determined that both techniques present similar results, with the difference that the DCA technique, showed a higher biological effect at lower number of pulses, in comparison to the estimated values obtained from TLD crystals. This result could be associated to an underestimation of doses when using TLD crystals in a scenario of pulsed radiation. The correct characterization of PFD is a crucial step towards the application of these devices in the areas of radiobiology and biomedicine, especially regarding the last one, where it has shown the potential to be used as an alternative therapy to conventional radiotherapy, with the added possibility to obtain similar results at lower doses. This thesis shows that it is possible to characterize pulsed X-rays emitted by PFD using biological dosimetry tools and that the application of these enables us to visualize in a direct way biological effects that cannot be detected using other techniques. The results obtained in this theses, open a window to the further exploration and utilization of pulsed ionized radiation as an alternative source of radiation in the areas of radiobiology and biomedicine.

## 1. INTRODUCCIÓN

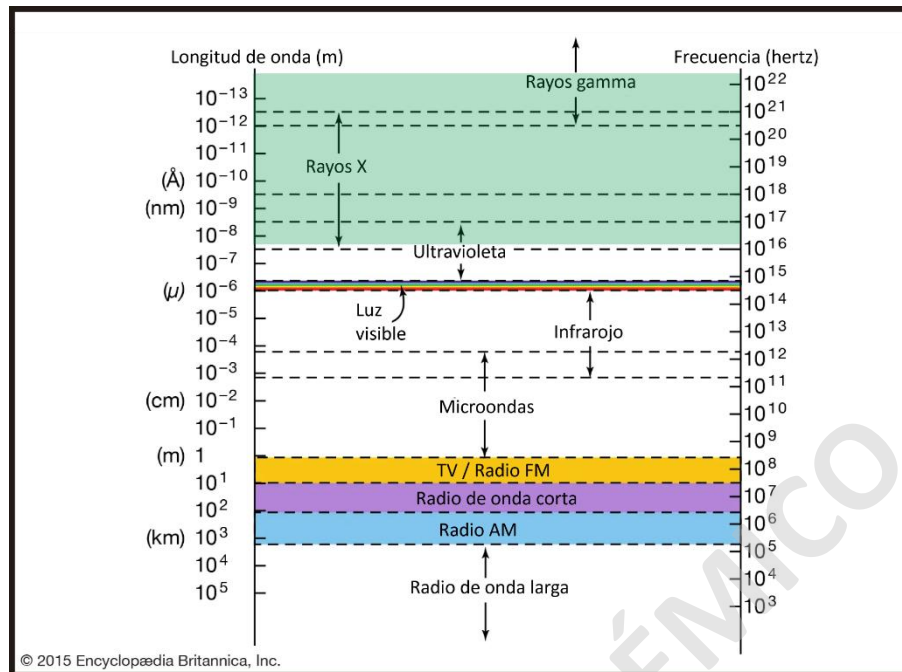
La primera fotografía tomada con rayos X fue realizada por Wilhelm Röntgen en 1896. Ese mismo año Elihu Thomson fue una de las primeras personas en presentar síntomas adversos relacionados con rayos X. Durante las siguientes décadas, múltiples científicos llevaron a cabo experimentos y crearon nuevas formas de utilizar y generar radiación ionizante (RI), pero al no entender los riesgos asociados a ésta, muchos de ellos murieron por causa directa de los efectos negativos de ésta. Las muertes asociadas a RI, llevaron a la creación de la radiobiología y a un entendimiento de los riesgos asociados al uso de ésta (1).

Actualmente el uso de RI forma parte de la vida moderna, y gracias a los experimentos de los pioneros en el área, hoy en día su uso sigue el lema *“tan bajo como sea razonablemente posible”* (2), cuyo principio es evitar la exposición a la RI si ésta no tiene un efecto beneficioso independientemente de lo bajo de la dosis, en consecuencia se ha llegado a utilizar la RI de manera segura en la actualidad. A pesar de esto, siempre hay espacio para mejorar los sistemas que utilizan RI, perfeccionando su uso, mediante la optimización de dosis, mejorando la forma de entrega y/o mejorando los sistemas de seguridad y protección física.

### 1.1 Conceptos generales de la radiación ionizante

La RI es un tipo de energía liberada por átomos (3), que se caracteriza por su capacidad de excitar e ionizar átomos y moléculas con las cuales interactúa, esta forma parte íntegra y constante de nuestro universo, por lo que todo ser vivo está en constante exposición a este tipo de radiación, siendo así que la exposición promedio anual para un ser humano proviene en un 50% de fuentes naturales como son la radiación cósmica de fondo, la radiación solar y múltiples minerales que poseen elementos radiactivos(4).

La RI puede ser clasificada en partículas subatómicas (partículas alfa, beta, protones y neutrones) o fotones (rayos X y rayos  $\gamma$ ) (5), estos últimos perteneciendo a la sección de mayor frecuencia y corta longitud de onda del espectro electromagnético (6), como se observa en la figura 1.



**Figura 1:** Espectro Electromagnético; el área verde, denota la sección del espectro que corresponde a las radiaciones ionizantes. Dentro de éstas se encuentra radiación UV lejana, rayos X, rayos gamma y radiación cósmica de fondo. Adaptado y traducido de Encyclopædia Britannica 2015 (7).

La RI emitida en forma de fotones al igual que la emitida en forma de partículas subatómicas tiene la capacidad de impartir energía a las moléculas con las cuales interactúan ionizándolas, esta interacción se divide en ionización directa e ionización indirecta. La ionización directa, es generada solamente por las partículas subatómicas alfa y beta, se produce como efecto directo de la interacción de las cargas que poseen estas partículas por sobre la materia, la cual perderá uno o más electrones debido a que estos son “arrastrados” por las partículas subatómicas. La ionización indirecta, por otro lado, involucra a fotones (rayos X y  $\gamma$ ) y neutrones, estas partículas tienen en común no poseer carga, por lo que la ionización de las moléculas con las cuales interactúan se producen por una transferencia de energía que al ser recibida por la molécula “blanco” genera en ésta un aumento energético que resulta en el salto de electrones del orbital, con su posible pérdida, dependiendo del nivel de energía impartido (8,9).

Una magnitud que permite determinar la calidad de la radiación incidente es la transferencia lineal de energía (LET), la cual se define como la energía media que una partícula cargada imparte a la materia por unidad de longitud a medida que la atraviesa, su unidad es Joule/metro (J/m), pero también se puede ver expresada en keV/ $\mu\text{m}$  y se divide en dos grupos, alta LET y baja LET. Partículas alfa, protones y neutrones son de alta LET, debido a que poseen una capacidad de ionización muy alta; por otra parte,

partículas beta y la radiación ionizante de fotones, presentan una baja LET, lo que en consecuencia genera una dispersión mayor al momento de irradiar materia, resultando en un patrón de distribución azaroso de las ionizaciones generadas (10). Estas diferencias, son importantes tenerlas en cuenta al momento de observar los efectos que tiene la RI por sobre la materia, ya que la irradiación de un determinado tipo de tejido, órgano u organismo, con iguales valores de dosis absorbida pero con diferentes tipos de radiación o formas de entrega de ésta, provoca efectos biológicos de diversa intensidad (11).

En la actualidad, la RI posee múltiples usos listados en la tabla 1, en ámbitos tan variados como la investigación científica, el área industrial, usos militares y en el área médica y de diagnóstico.

**Tabla 1:** Aplicaciones de la RI, se clasifican según su área asociada y se ejemplifica la fuente de RI más común.

Área	Aplicación	Tipo de Fuente
Industrial	Generación de energía	Fisión Nuclear
	Descontaminación de aguas servidas	Haces de electrones / $^{60}\text{Co}$ (12)
	Gammagrafía	$^{60}\text{Co}$ (13) / $^{192}\text{Ir}$
Ciencias Biológicas	Densitometría nuclear	$^{137}\text{Cs}$ (14)
	Marcado de biomoléculas	$^3\text{H}$ , $^{14}\text{C}$ , $^{35}\text{S}$ , $^{32}\text{P}$ , $^{125}\text{I}$ (15,16)
Medicina	Diagnóstico	Lámpara de rayos X
	Radioterapia	Acelerador lineal de partículas (Rayos X) (17)

Todas estas aplicaciones se basan en la interacción de la radiación con la materia, mediante la utilización de tecnologías que tienen la capacidad de producir RI desde una fuente artificial como una lámpara de rayos X, o utilizando fuentes naturales de RI. Independientemente del tipo de fuente utilizada o aplicación, todos los ejemplos anteriores poseen en común utilizar radiación ionizante continua (RIC) para cumplir su función.

## 1.2 Efectos biológicos de la radiación ionizante

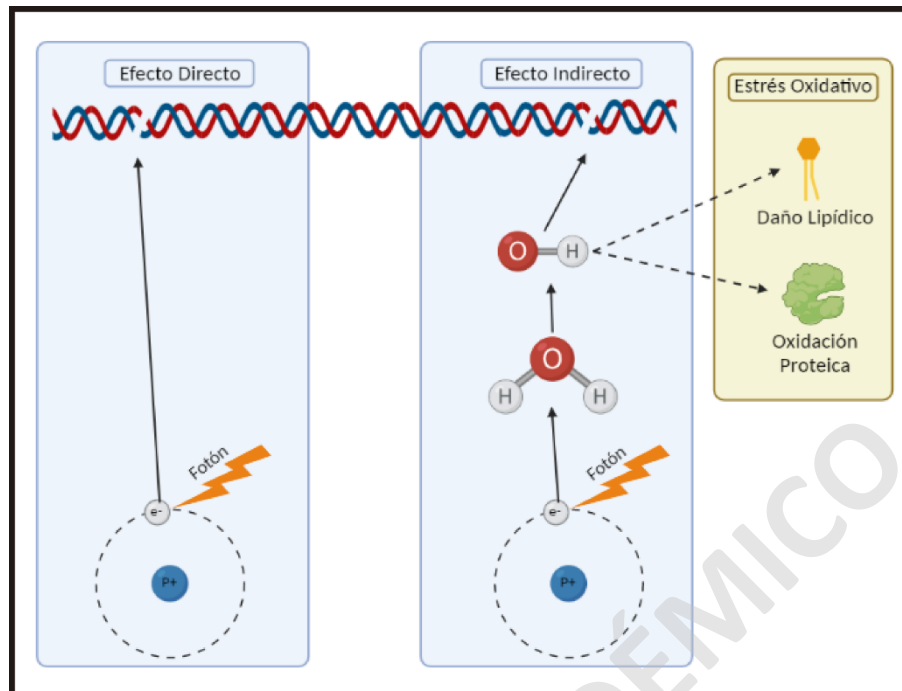
La materia viva es susceptible a la ionización y la interacción con RI puede llevar a la muerte celular programada, apoptosis (18), o a necrosis (19) dentro de los tejidos. Desde un punto de vista molecular y debido a la complejidad y a la especificidad estructural y funcional de las biomoléculas, éstas muchas veces al ser ionizadas pierden su función biológica debido a que la ionización de éstas genera cambios drásticos y fundamentales en su estructura, haciendo que pierdan total o parcialmente su función (20).

Se ha observado que todas las biomoléculas pueden ser dañadas independientemente de su función y posición dentro de la célula, esto ocurre mayormente por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan a partir de la radiólisis del agua dentro de las células. De las ROS generadas, la más común es el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el cual genera daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), daño lipídico y oxidación de proteínas, entre otros efectos, como se ilustra en la figura 2.

El blanco principal de las RI es la macromolécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), que constituye el material genético de todos los organismos vivos. Esta molécula formada por cuatro bases nitrogenadas distintas, estructuradas en una cadena de doble hebra, es la principal responsable de los efectos biológicos observados tras la exposición de la célula a RI (21,22). Los efectos biológicos de las RI se observan principalmente en forma de mutaciones, que pueden ser expresadas en forma de proteínas aberrantes, perfiles de expresión alterados o como aberraciones cromosómicas; estas últimas fueron descritas por primera vez por Müller en 1927 (23), el cual mientras conducía sus experimentos genéticos, notificó de la existencia de éstas, atribuyendo su generación a la interacción de rayos X, estos datos fueron confirmados luego por Painter y Müller (24).

Los efectos de la interacción de la RI con las biomoléculas, pueden clasificarse en dos grupos: efectos directos y efectos indirectos ilustrado en la figura 2. En los efectos directos la RI ioniza directamente la molécula "blanco" y se asocia con la presencia de radiación de alta LET. Los efectos indirectos, se caracterizan en que la RI genera la radiólisis del agua que rodea la molécula "blanco", generando así especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo éstas, las que interactúan finalmente con la molécula "blanco". Cabe destacar que el área de acción de este mecanismo es del orden de los nanómetros alrededor del sitio de radiólisis del agua. Este mecanismo se asocia fuertemente con la radiación de baja LET, observándose que el 65% de los efectos observados en radiación de baja LET corresponden a este mecanismo (25).

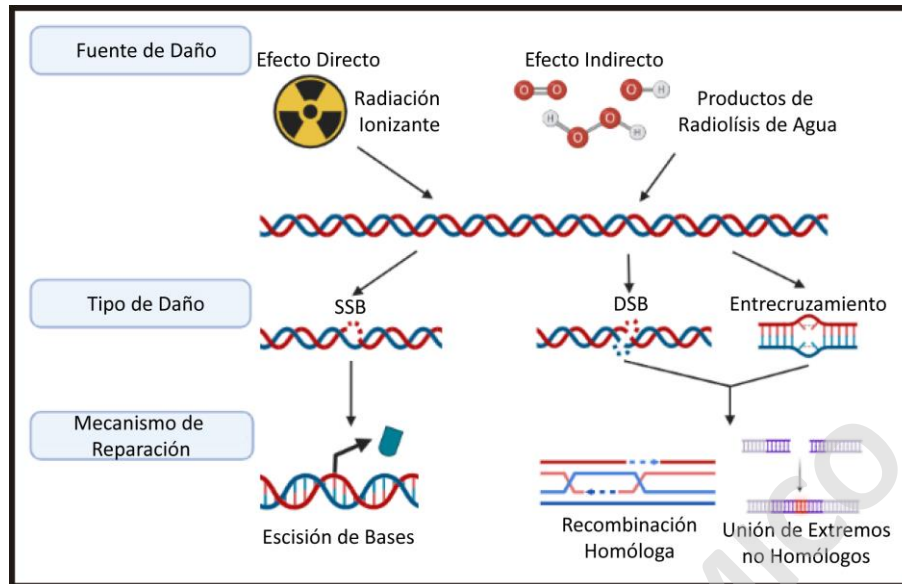




**Figura 2:** Ilustración de los tipos de efectos de la RI por sobre el ADN. Los efectos directos (izquierda) se caracterizan por la separación directa de los electrones de las bases nitrogenadas del ADN, generando daño en éste. Los efectos indirectos (centro) se caracterizan por la separación de electrones de la molécula de agua, radiólisis, que a través de ROS genera daño al ADN. Las ROS generadas por la radiólisis del agua también generan estrés oxidativo generalizado (derecha) dentro de la célula que lleva a daño lipídico y oxidación proteica. Creado con BioRender.com.

Cuando la RI interacciona con el ADN, independiente de cuál es el efecto dominante, se pueden generar múltiples tipos de daños como ruptura de una o ambas hebras, alteración de bases, alteración de los azúcares de las bases o formación de entrecruzamiento (26). El daño más frecuente es la ruptura de hebras, ya sea en una de sus hebras (SSB) o en ambas (DSB), estas rupturas se generan a partir del daño en las desoxirribosas por una ataque directo de  $OH^\cdot$ , o por la alterada actividad de enzimas de unión al ADN (27). Para que ocurra un DSB del ADN, se requiere que dos moléculas de  $OH^\cdot$  interaccionen con las desoxirribosas en sitios cercanos (20).

Estos daños al ADN generan una cascada de señales que activan la maquinaria de reparación molecular del ADN. Dependiendo del daño, distintos mecanismos de reparación pueden ser activados (28) (figura 3). Para el caso de DSB, los mecanismos más comunes son la unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga (29).



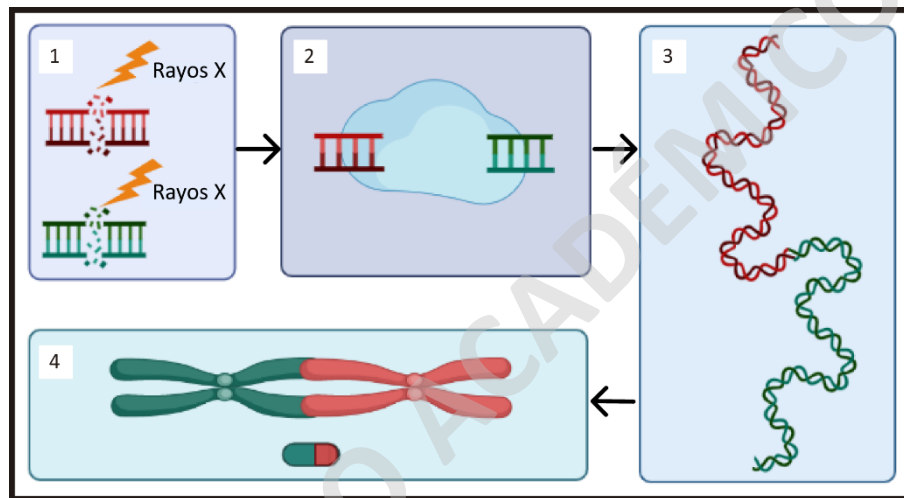
**Figura 3:** Daño producido por RI al ADN, independientemente si es ocasionado por efecto directo o indirecto, puede conducir a formación de SSB, DSB o entrecruzamiento. SSB son reparados mediante la escisión de bases, mientras que DSB y entrecruzamiento son reparados comúnmente por unión de extremos no homólogos o por recombinación homóloga al momento de generarse la replicación del ADN. Creado con BioRender.com.

El mecanismo más común, debido a que puede actuar en todas las fases del ciclo celular, es la unión de extremos no homólogos, mientras que la recombinación homóloga es el mecanismo que comúnmente actúa al momento en que la célula ingresa a la fase G1 (30).

Este proceso de reparación, involucra diversas cascadas de señalización y se encuentra altamente regulado, por lo general es efectivo, sin embargo, existe la posibilidad de ocasionar errores al momento de efectuarse la reparación. En el caso de la recombinación homóloga, se ha observado que el llevar a cabo este proceso es 1000 veces más propenso a generar mutaciones que el proceso de replicación del ADN (31). Así mismo, el proceso de unión de extremos no homólogos es propenso a errores de inserción o deleción (indel), translocaciones (32), o la formación de aberraciones cromosómicas inestables (ACI) (33,34). Esta formación de errores en la reparación, en particular la formación de ACI, se encuentra directamente relacionada con la interacción de la RI con la molécula de ADN, por lo que es usada como indicador de daño, y a la vez permitiendo estimar la dosis absorbida (Gy).

Las ACI son un tipo de aberración que provoca un daño que impide que las células finalicen la etapa de mitosis, induciéndose la muerte celular. Las ACI corresponden a cromosomas dicéntricos y anillos céntricos; los cromosomas dicéntricos resultan del intercambio entre dos cromosomas, conformando un cromosoma con dos centrómeros y en algunos casos excepcionales más de 2 centrómeros, y los

anillos céntricos, se forman por medio de una fusión intracromosómica observándose como un cromosoma unido a sí mismo en forma circular y que posee un solo centrómero. Estas estructuras se forman al momento de producirse una errónea reparación, en casos donde se generan dos o más quiebres de doble hebra en secciones no aledañas de la cromatina (figura 4) (35). Debido a las características de la formación de estas ACI, al momento de unirse 2 cromosomas distintos o al formarse un anillo céntrico, quedará material genético libre, el cual se unirá, formando una sola estructura, la cual se observa como 2 cromátidas sin centrómero, esta estructura es conocida como fragmento acéntrico.



**Figura 4:** Formación de ACI (cromosoma dicéntrico) a partir de la errónea reparación de dos DSB en el ADN por la interacción de RI. **1;** Rayos X ocasionan dos DSB en 2 sectores no asociados del ADN (rojo y verde) **2;** la maquinaria de reparación actúa reparando erróneamente en los sitios de daño, mediante unión no homóloga dos secciones de cromatina no asociados (rojo y verde) **3;** el producto final del proceso de reparación es una nueva cromatina formada a partir de dos secciones no relacionadas **4;** al momento de replicarse y condensarse la cromatina, se genera un cromosoma con dos centrómeros (dicéntrico) y un fragmento acéntrico.

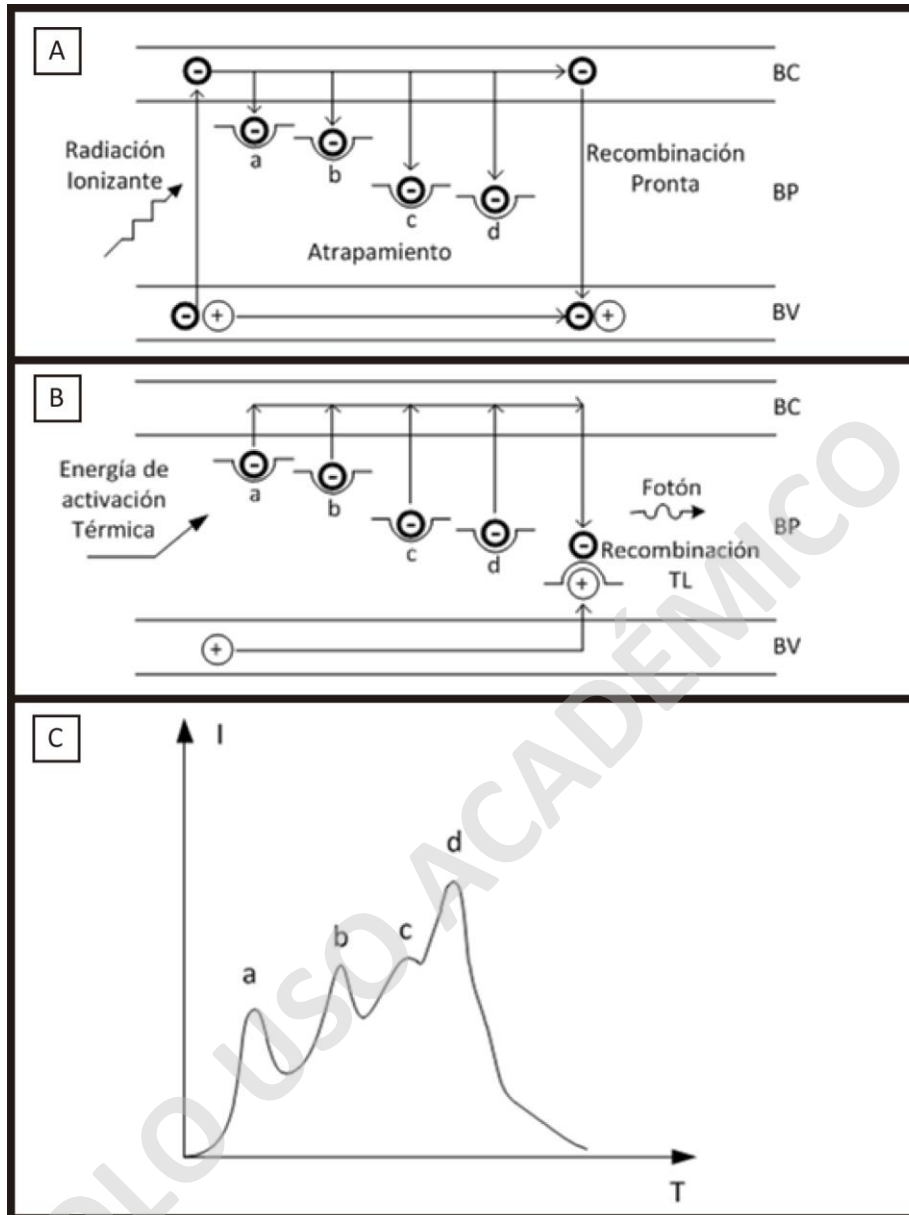
### 1.3 Dosimetría

La dosimetría nace debido a la necesidad de poder cuantificar la radiación recibida por un individuo, información que es indispensable para evitar y controlar los efectos negativos que tiene la RI para la salud y se ha desarrollado por los últimos 120 años (36). El objetivo de la dosimetría es calcular la cantidad de energía absorbida por unidad de masa, esta dosis absorbida tiene por unidad el Gray (Gy) (37), que se expresa como J/kg (38). Para lograr estimar una dosis, la dosimetría cuenta con múltiples herramientas y técnicas que pueden ser usadas, en esta tesis se abordara el uso de la dosimetría externa, mediante el uso de cristales termoluminiscentes (TLD) y la dosimetría biológica y citogenética, mediante el uso de la técnica de dicéntricos y anillos céntricos.

#### 1.3.1 Dosimetría externa

Esta área de la dosimetría se basa en el uso de sustancias no orgánicas, capaces de modificar sus características químicas y físicas de manera permanente ante la presencia de radiación ionizante. Estos cambios son luego utilizados para poder calcular la dosis absorbida (Gy) por la sustancia y mediante técnicas estandarizadas (39), se puede a partir de esta dosis, obtener una dosis tejido equivalente (cuya unidad es el Sievert, (Sv)). Hoy en día la sustancia más comúnmente utilizada son cristales TLD, pero también existen láminas de film fotográfico o cristales de luminiscencia de estimulación óptica (OSL).

Los cristales termoluminiscentes TLD, están formados de fluoruro de litio dopados con magnesio y titanio (LiF:Mg, Ti). Este cristal tiene la característica de ser no conductor y poseer todos sus electrones confinados en una banda de valencia. Estos cristales poseen además una banda de conducción que se encuentra separada de la banda de valencia por imperfecciones. Al momento de interactuar con RI, los electrones de la banda de valencia se liberan con suficiente energía para poder saltar a la banda de conducción, pero debido a las imperfecciones del cristal estos quedan atrapados en trampas de electrones que les impiden volver a su banda de valencia (figura 5-A). La aplicación de calor al cristal (mediante gas nitrógeno calentado) permite a los electrones atrapados volver a su banda de valencia, emitiendo luz en el proceso (figura 5-B). La cantidad de luz emitida por el cristal depende de la temperatura impartida al nitrógeno que es cercana a los 300 C° y la cantidad de electrones atrapados (40). Esta característica es la que se usa para poder determinar una dosis equivalente por el cristal mediante el uso de una curva de calibración de brillo (figura 5-C).



**Figura 5:** Esquema de funcionamiento de cristales termoluminiscentes TLD; **A:** Se observa como electrones de la banda de valencia (BV) son excitados a la banda de conducción (BC) por medio de la interacción de radiación ionizante (RI), al volver naturalmente a la BV, los electrones quedan atrapados en las imperfecciones de la banda BP que separa BV de BC. **B:** la aplicación de energía termina genera el salto de electrones de la banda BP a la banda de conducción (BC), al momento de volver a la banda de valencia (BV), lo electrones emiten fotones que pueden ser detectados como luz visible. **C:** la luz emitida por los electrones al volver de BC a BV, es detectada y puede ser convertida a dosis mediante una cura de calibración. Adaptado desde Gutiérrez 1999 (41)

### 1.3.2 Dosimetría biológica

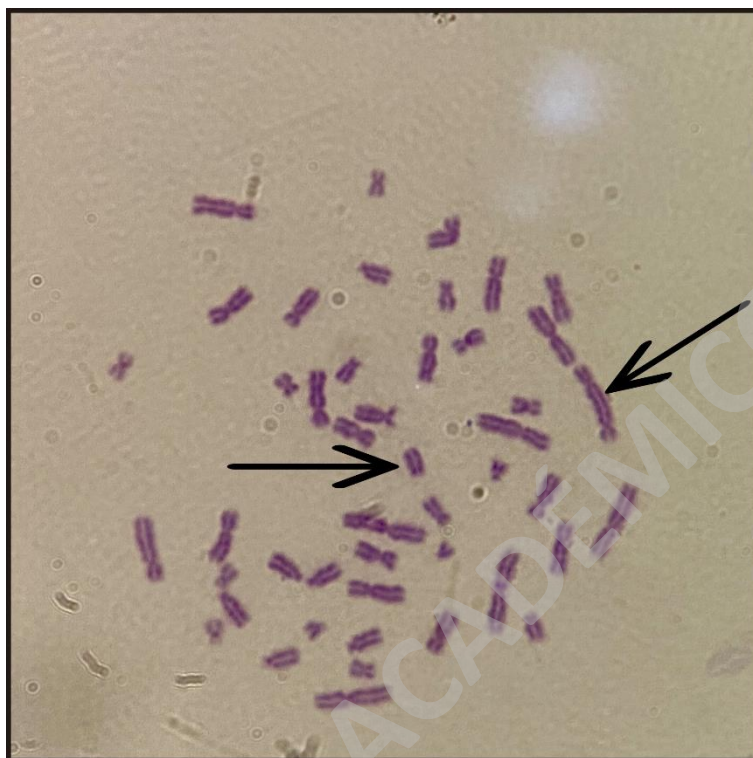
Esta área de la dosimetría, que nace en la década de 1960 (42), se asocia fuertemente a la radiobiología, y se caracteriza por evaluar y cuantificar el efecto biológico generado en la materia viva al momento de entrar en contacto con radiación ionizante. Esto se logra mediante la utilización de biomarcadores, los cuales permiten cuantificar el efecto generado, así como también estimar una dosis asociada al evento de irradiación. Es importante destacar que la mayor experiencia en dosimetría biológica se ha obtenido con las técnicas citogenéticas que permiten la detección de aberraciones cromosómicas (AC) microscópicamente visibles en linfocitos de sangre periférica (30). Estos linfocitos, que son fácilmente obtenibles, se encuentran distribuidos homogéneamente en el cuerpo y son de fácil cultivo *in vitro*, y evidencian el daño cromosómico radioinducido. El área de la dosimetría biológica que emplea métodos citogenéticos se denomina dosimetría citogenética y es especialmente útil cuando se tienen dificultades para interpretar los datos obtenidos mediante la dosimetría externa (43).

Esta rama de la dosimetría biológica posee en la actualidad múltiples herramientas y técnicas que permiten estimar la dosis absorbida, así como también observar el efecto biológico asociado a la interacción de la RI con la materia viva. Éstas, evalúan el daño en la molécula de ADN, basándose en el recuento de las AC. Las AC se consideran dosímetros biológicos, ya que su identificación, cuantificación y cálculo de frecuencia permite la estimación de dosis absorbida a cuerpo entero utilizando una curva de calibración dosis-respuesta. Dentro de estas técnicas (tabla 2), la técnica que es considerada el “gold standard”, además de estar estandarizada por las normas ISO 19238 y 21243(44,45), es la técnica de dicéntricos y anillos céntricos (DCA).

**Tabla 2:** Comparación de pruebas citogenéticas.

	Pruebas citogenéticas			
	Condensación prematura de cromosomas (PCC)	Dicéntricos y anillos (DCA)	Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	Micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN)
Aberraciones cuantificadas	Anillos	Dicéntricos y anillos (DCA)	Translocaciones	Micronúcleos
Rango de estimación de dosis (Gy)	0,2-20	0,1-5	0,25-4	0,3-4
Estandarización	NA	ISO 19238 y 21243	ISO 20046	ISO 17099

La técnica de DCA, se basa en la identificación y recuento de ACI del tipo dicéntricos o anillos céntricos en linfocitos de sangre periférica en el estadio de metafase, como se observa en la figura 6.



**Figura 6:** Observación al microscopio de una metafase del cultivo *in vitro* de linfocitos de sangre periférica en tinción FPG a la derecha la flecha señala una ACI del tipo dicéntrico, mientras que la flecha central apunta a un fragmento acéntrico.

Considerando que la tasa de aparición de ACI es directamente proporcional a la energía depositada, es posible determinar la dosis absorbida, en donde por interpolación de la frecuencia de ACI observada, es posible obtener la dosis media absorbida. Las curvas de calibración, o dosis respuesta, deben ser construidas bajo los mismos criterios de recuento de ACI. La técnica de DCA es altamente utilizada, debido no sólo a su estandarización por normas ISO, sino que también por tener la capacidad de observar directamente cual es el efecto de la radiación por sobre la célula. Asimismo, las ACI, solamente se presentan o se forman al momento de interaccionar con RI y su aparición espontánea en personas sanas es de alrededor de 0,5 - 1,0 por cada 1000 linfocitos (30,46), siendo esta frecuencia independiente de edad y sexo (47). Adicionalmente la técnica posee un límite de detección de 0,1 Gy para radiaciones de baja LET y el rango de estimación de dosis se encuentra entre 0,1 Gy a 5 Gy (30).

Son estas características: la estandarización de la técnica, la capacidad de observar un efecto biológico directo, la especificidad de su formación (ACI se generan casi exclusivamente por interacción de la RI

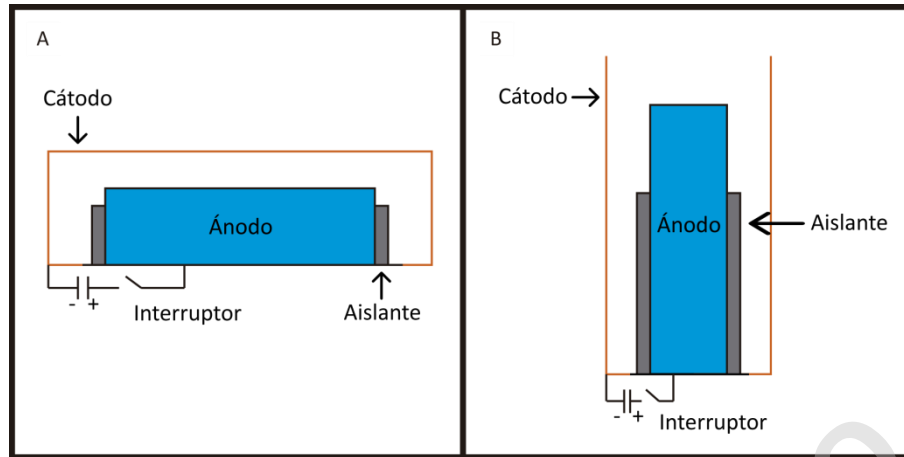
sobre el ADN), su amplio rango y bajo límite de detección, las que permiten seleccionar esta técnica como la adecuada para poder caracterizar el efecto que posee una nueva forma de entrega de RI como lo es RIP emitida por dispositivos de plasma focus.

#### **1.4 Radiación continua y radiación pulsada**

A la fecha toda la dosimetría descrita ha sido caracterizada y aplicada a distintas fuentes de RIC. Una alternativa emergente al uso de la RIC es la radiación ionizante pulsada (RIP), ésta se caracteriza por generar pulsos de radiación ionizante de corta duración, que se encuentran en un rango de los nanosegundos a milisegundos (ms). Esta nueva forma de poder generar y entregar RI permite obtener pulsos de alta potencia, a partir de radiación electromagnética. Esto es posible debido a que, a pesar de que la energía eléctrica requerida para generar RI es baja (2kJ), la rápida y total entrega de esta energía en sólo ms, genera que se obtenga un pulso de RI alta potencia. Este efecto se puede ilustrar, al momento de comparar una ampolleta incandescente con un flash fotográfico. El flash fotográfico es una fuente de luz, de baja energía, pero que es capaz de iluminar una pieza al punto de enneguecer a una persona, pero solo por unos segundos, por el otro lado una ampolleta incandescente, puede permanecer encendida durante un largo periodo, pero si se quiere obtener una cantidad de luz comparable a la de un flash fotográfico (al punto de encandilar a una persona) se requiere de una ampolleta de muy alta energía. Para el caso de la RIP -flash fotográfico- y RIC -ampolleta incandescente de alta energía- sucede lo mismo.

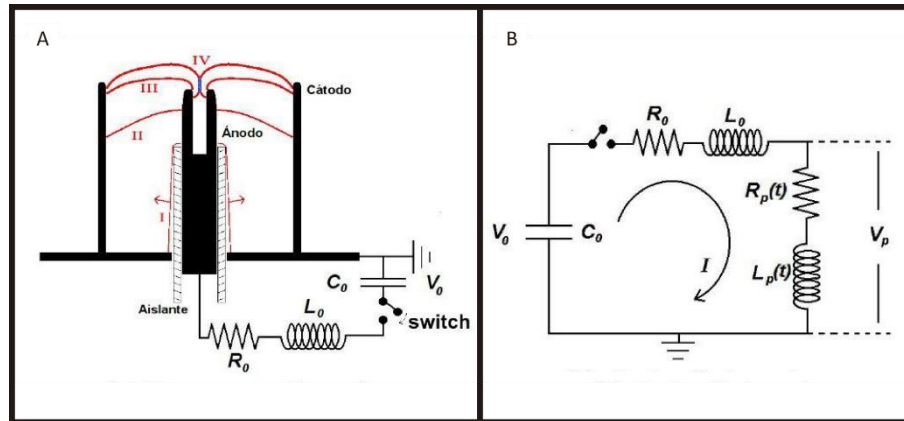
Actualmente una de las formas de generar RIP es mediante el uso de equipos de descarga pulsada de plasma, dentro de los cuales se encuentran los equipos de plasma focus (PFD), éstos, dependiendo de su configuración y optimización pueden emitir rayos X, haces de electrones, haces de neutrones (cuando se utiliza deuterio como gas) y jets de plasma (48). PFD pueden presentarse en dos diseños distintos Filippov (USSR) o Mather (USA) (49), que se diferencian entre sí, por la relación del radio por sobre el largo del electrodo central, como se ilustra en la figura 7.





**Figura 7:** Ilustración de los diseños de PFD. **A:** Diseño de Filippov, se puede observar como la relación entre el radio y el largo del ánodo central es mayor a 1. **B:** diseño de Mather, se puede observar como la relación entre el radio y el largo del ánodo central es menor a 1.

En esta tesis el equipo de plasma focus PF 2KJ utilizado, perteneciente a la CCHEN, presenta la configuración Mather. Esta configuración coaxial, que se representa esquemáticamente en la figura 8-A, consta de dos electrodos cilíndricos, que poseen un extremo cerrado y otro extremo abierto. El electrodo central (ánodo) se encuentra parcialmente cubierto con un material aislante (una camisa cerámica en el caso de PF-2kJ), la sección superior, no cubierta por el material aislante del ánodo se le denomina distancia efectiva. Tanto ánodo como cátodo, se encuentran conectados, por la base de estos, a un banco de capacitores, a través de, un interruptor gaseoso de alta velocidad y alta corriente (49). Esta estructura se pone dentro de una cámara de vacío, que se llena de un gas o conjunto de gases específicos, a algunos milibares de presión y la selección de éstos determinarán el tipo de RI emitida por el equipo, en el caso de esta tesis se usa hidrógeno, para la emisión de rayos X. El equipo, al estar apagado es un circuito abierto, el cual se cierra al momento de generarse la descarga eléctrica a través del gas, formando un plasma que conecta ambos electrodos, descargando el potencial eléctrico de los capacitores a tierra, como se ve esquematizado en el diagrama eléctrico en la figura 8-B. Esta descarga eléctrica generará un potencial eléctrico ( $V_p$ ), resistencia ( $R_p$ ) e inductancia ( $L_p$ ) dentro del plasma, los cuales varían en el tiempo debido a la progresión de la descarga del equipo en sus diferentes fases.



**Figura 8:** Esquemas de PF-2kJ, de configuración Mather, del Centro de Estudios Nucleares (CEN) La Reina de CCHEN. **A:** esquema del interior del equipo PF-2kJ, externamente del equipo se diagraman el banco de capacitores (de capacitancia  $C_0$ ) conectados a un interruptor y a los electrodos.  $R_0$  y  $L_0$  representan los valores de resistencia e inductancia propios de la configuración y materiales del equipo. Se ilustran las fases de descarga en rojo: **I** Fase de ruptura; **II** Fase de aceleración; **III** Fase de compresión o pinch y **IV** Fase shock o jet. **B:** circuito eléctrico equivalente asociado a la descarga del equipo, el circuito se cierra mediante la conducción de energía eléctrica a través del plasma generado. La resistencia ( $R_p$ ), inductancia ( $L_p$ ) y potencial dentro del plasma varían con el tiempo. Voltaje en el plasma ( $V_p$ ) es medido entre ánodo y cátodo. Se observa por último la direccionalidad de la corriente ( $I$ ), la cual descarga la energía del banco de capacitores a tierra.

#### 1.4.1 Fases de descarga

La descarga o activación del equipo sucede en 4 fases distintivas (50,51) esquematizadas en rojo y enumeradas con números romanos en la figura 8-A:

##### I. Fase de ruptura

La descarga de los capacitores, a través del interruptor gaseoso (Spark-Gap) que une el banco con la cámara produce la ionización del gas que se encuentra entre el ánodo y el cátodo, transformando el gas en plasma que se comienza a formar desde el extremo cerrado de los electrodos y se deposita inicialmente sobre el material aislante, formando una lámina de corriente de plasma que conecta ánodo y cátodo.

##### II. Fase de aceleración

La conexión establecida por el plasma entre los dos electrodos genera un flujo de corriente de baja resistencia a tierra, este flujo genera un campo magnético polarizado, el cual al interactuar con el campo eléctrico distorsionado a su alrededor generado por la presencia del material aislante entre los electrodos, comienza a despegarse, crecer y moverse en la dirección del extremo abierto de los

electrodos, formando una estructura parabólica de plasma, esto debido al actuar de las fuerzas de Lorentz presentes en la descarga.

### III. Fase de compresión o pinch

Cuando la estructura parabólica de plasma sobrepasa la distancia efectiva (el área no aislada del ánodo), éste colapsa hacia su interior en el punto de simetría de la parábola en un área de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  denominado “focus” o “pinch”.

### IV. Fase shock o jet

Habiendo completado el “pinch”, se generan inestabilidades en el plasma, haciendo que éste deje de existir, produciendo la emisión de partículas y radiación.

#### **1.4.2 Generación de rayos X**

En la fase de compresión o pinch, específicamente en el punto pinch se ha observado que los equipos de PFD, emiten de forma pulsada, rayos X, partículas cargadas y neutrones (51), estos últimos solamente en el caso de utilizar deuterio como gas dentro del equipo. En particular, se ha documentado que la emisión de rayos X de alta energía se genera en la fase pinch, ya que los electrones presentes en el plasma son acelerados hacia la base del ánodo central, donde por el fenómeno de frenado o bremsstrahlung (52) se producen los rayos X.

#### **1.5 Estado actual de la aplicación de PFD**

Existen estudios donde se evalúa el efecto biológico que tiene la aplicación de RIP emitida por PFD sobre distintos tejidos en condiciones *in vitro* (48,53,54). Más aun Virelli et al. plantea el uso de éstos equipos como una herramienta alternativa a las convencionalmente utilizadas en la radioterapia (11).

Se ha observado que al momento de irradiar con una fuente pulsada de rayos X líneas de cáncer de melanoma radioresistentes (SK-Mel28 y A375) con una alta tasa de dosis, se produce un aumento en la tasa de muerte celular no asociada a apoptosis, una interrupción en la distribución de la división celular del tejido y un aumento en la cantidad de quiebres de doble hebra marcados con gH2AX. Este fue un análisis comparativo respecto a los efectos observado al irradiar el mismo tejido con una fuente de

rayos x continua (53). Asimismo, al momento de irradiar líneas celulares de cáncer colorectal (DLD-1) con una fuente pulsada de radiación a bajas dosis, se observó un aumento significativo en la generación de quiebres de doble hebra medidos por g-H2AX, respecto a lo observado al irradiar con una fuente continua (48).

Por otra parte, se han documentado patrones de expresión diferencial de miARN para células de cáncer colorectal (DLD-1) al momento de irradiarse con RIC a bajas dosis (0,6Gy) (55). Este patrón diferencial se asoció con un aumento de la tasa de apoptosis de las células, estableciéndose así la existencia de células sensibles a bajas dosis. Este mismo fenómeno de sensibilidad a bajas dosis fue observado en DLD-1 al ser irradiado con RIP emitida por PFD a 10, 20 y 40 pulsos (0,025Gy por pulso), observándose que a 20 y 40 pulsos, la tasa de muerte celular aumento 3 veces más que lo esperado de una fuente convencional de RIC utilizando 2 veces más dosis de radiación. En el mismo experimento se irradian líneas celulares de cáncer colorectal (HCT-116) y mamario (MCF-7), los cuales mostraron poseer una sensibilidad a bajas dosis de radiación, que previamente no se había descrito en estas líneas al ser irradiadas con RIC (54).

Los resultados anteriores muestran evidencia de que existe la posibilidad de utilizar equipos de PFD en radio medicina, obteniendo efectos biológicos equivalentes respecto RIC, pero a menores dosis. Sin embargo, los escasos estudios muestran que es necesario continuar en esta área de investigación asociada a los efectos biológico de la RIP y la caracterización de estos equipos en diversos modelos biológicos. Hasta la fecha sólo se han caracterizado los efectos observando a nivel celular, utilizando marcadores moleculares o se ha realizado una caracterización de la emisión de RI mediante dosimetría física (TLD-100 y film GAFCHROMIC) (56), no obstante no existen estudios del efecto directo sobre el ADN utilizando marcadores citogenéticos.

Teniendo en consideración estos resultados preliminares, y las características de los equipos de PFD, tales como: ser compactos, capaces de emitir RIP de bajas dosis, emitir RI en pulsos de corto tiempo, pero de alta potencia, y la capacidad de generar múltiples pulsos en un corto tiempo; es que podrían ser evaluado como una herramienta alternativa a las convencionales utilizadas en la radioterapia.

## 1.6 Posibles aplicaciones biotecnológicas de PFD en radio medicina

Actualmente alrededor del 50% de los pacientes con cáncer reciben radioterapia como único tratamiento o en conjunto con quimioterapia y/o tratamientos quirúrgicos (57–59). A pesar de que en los últimos años los avances en la radioterapia han sido significativos, todavía hay un alto número de pacientes sobrevivientes de cáncer que desarrollan radio-resistencia y recurrencia del cáncer (53). Además de los múltiples efectos secundarios inmediatos o tardíos que genera la radioterapia que afectan negativamente la calidad de vida del paciente (60). Es por estos motivos que se está en constante búsqueda de alternativas a la radioterapia convencional, que permitan reducir la dosis entregada y enfocar el área de irradiación de mejor forma, esto con el objetivo de poder disminuir o eliminar la aparición de cánceres recurrentes y radioresistentes, así como también mejorar la calidad de vida de los pacientes durante y después del tratamiento. Ensayos preliminares han mostrado que utilizar equipos de PFD como fuentes alternativas de RI, muestran resultados positivos, observándose efectos similares, en cuanto a muerte celular y daño del ADN, utilizando dosis más bajas que en los sistemas convencionales.

Para poder evaluar la posibilidad de utilizar PFD como una fuente alternativa de RI en radio medicina, se requiere de una acabada caracterización de este tipo de equipos; lo cual involucra determinar y estandarizar las condiciones de uso del mismo. Para esto se deben realizar ensayos a múltiples niveles, desde celular in vitro culminando en sistemas biológicos complejos. Este paso es importante, ya que es fundamental una caracterización a nivel dosimétrico, de estos equipos, con el objetivo de determinar la magnitud y el efecto que posee esta nueva forma de entrega de RI cuando se deposita sobre la materia viva, pudiendo así evaluar su factibilidad de uso y posibles aplicaciones en las áreas de la radiobiología y la biomedicina. Cabe destacar que la caracterización no es la única arista para determinar la aplicabilidad del equipo, se deben resolver múltiples problemas de ingeniería y electrónica, relacionados a la construcción de un equipo que cumpla las características para ser utilizado en un ambiente clínico.

En la presente tesis, se lleva a cabo un estudio del efecto biológico de la RI emitida por PFD en linfocitos de sangre periférica, utilizando herramientas de dosimetría citogenética y dosimetría física, debido a la emergente necesidad de poder observar y caracterizar el efecto biológico de manera directa con herramientas citogenéticas. Se analizaron muestras de linfocitos de sangre periférica irradiadas en tres condiciones de 10, 20 y 40 pulsos emitidos por PFD y un control a 0 pulsos. Las frecuencias de ACI

obtenidas de estas muestras fueron comparadas con datos de TLD-100 irradiados en las mismas condiciones previamente a este estudio.

El objetivo de esta tesis por lo tanto es, caracterizar los efectos biológicos de las radiaciones pulsadas de rayos X emitidas por PFD, mediante la aplicación de herramientas biodosimétricas, con la finalidad de poder obtener información indispensable en cuanto a los efectos de RIP emitido por PFD, permitiendo así avanzar en el desarrollo de esta tecnología en el área de la radio medicina.

SOLO USO ACADÉMICO

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Es posible caracterizar el efecto biológico generado por la emisión de rayos X pulsados provenientes de un PFD utilizando la cuantificación de aberraciones cromosómicas inestables como técnica biosimétrica.

**Objetivo general:** Caracterizar el efecto biológico, de la emisión de rayos X en un equipo de PFD, sobre la molécula de ADN, mediante la aplicación de herramientas biosimétricas en muestras de linfocitos de sangre periférica.

- **Objetivo específico 1**

Cuantificar el efecto biológico de radiación pulsada, mediante la identificación y recuento de aberraciones cromosómicas inestables en ensayos de irradiación con una fuente pulsada de rayos X emitidos por PFD.

- **Objetivo específico 2**

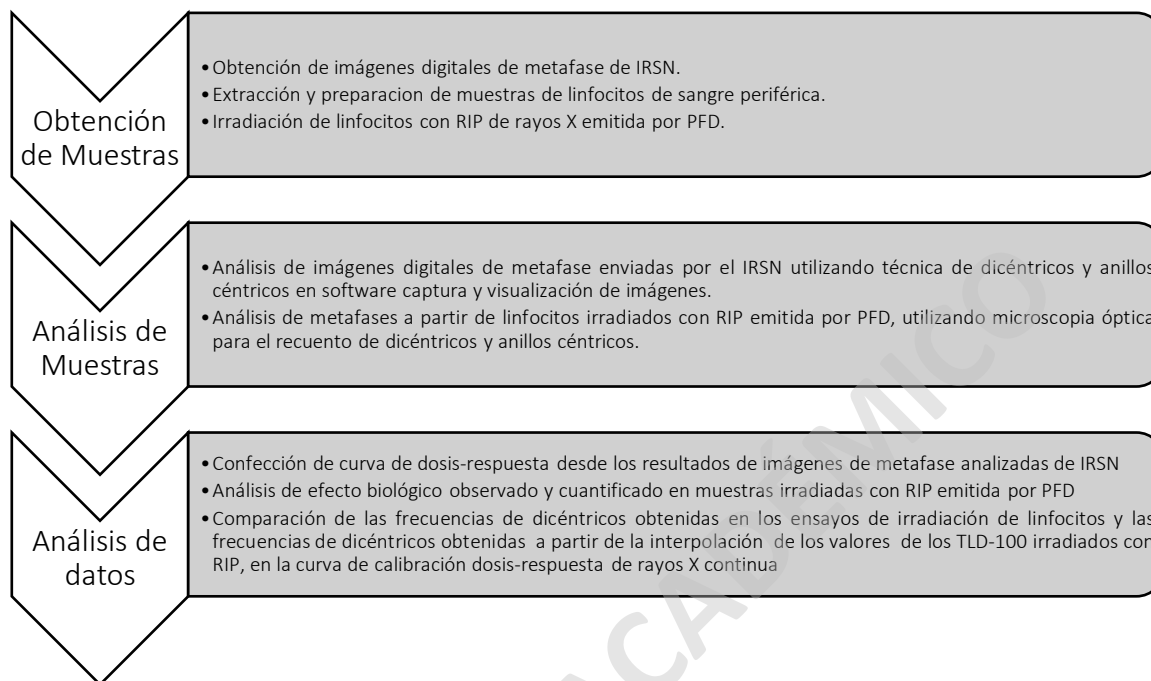
Construcción de una curva de calibración dosis-respuesta de rayos X a partir de una fuente continua de radiación (40Kev) mediante el análisis de imágenes digitales de metafases.

- **Objetivo específico 3**

Evaluar dosis y efecto biológico en un PFD mediante la comparación de herramientas dosimétricas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada siguió la secuencia lógica de pasos detallada en el esquema de la figura 9



**Figura 9:** Esquema de la secuencia lógica de pasos seguidos en la metodología de esta tesis

#### 3.1 Medios de cultivo y soluciones

##### I. Cultivo de linfocitos de sangre periférica

Para el cultivo de linfocitos de sangre periférica se utilizó 4 mL de medio RPMI 1640, (1x suplementado con L-glutamina y HEPES 25 mM, (Gibco), 0,1 mL de fitohematoglutina (Gibco), 1 mL de Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado por calor (Gibco), y 0,5 mL de 5'Bromo 2'deoxiuridina (BrdU) 0,64mg/mL (Merck)). Cumpliéndose las 45 horas de cultivo se adicionaron 100 µL de KarioMax Colcemid (GIBCO) (concentración final 10 µg/mL).

##### II. Solución de Carnoy

Solución de metanol y ácido acético glacial en proporción 3:1. La solución se enfría a -20°C previo a su uso.



### III. Solución Hoechst

Se preparó la solución Hoechst a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilizando Hoechst 33258 (Sigma Aldrich), habiéndose diluido ésta en agua destilada. La solución se mantuvo almacenada a  $-20^\circ\text{C}$ .

### IV. Buffer Mcllvaine

El buffer se preparó a partir de 92 mL de di-sodio hidrógeno fosfato anhídrido ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a 0,2 M y 8 mL de ácido cítrico 0,1 M, el pH fue ajustado a pH 8.

### V. Buffer Sorensen

La solución se preparó utilizando volúmenes iguales de una solución de fosfato sódico dihidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0,06M y fosfato dipotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,06 M, el pH fue ajustado a pH 6,8

### VI. Tinción Giemsa

La solución de tinción se preparó diluyendo Giemsa (Merck) al 5% en buffer Sorensen pH 6.8

### VII. Buffer SSC 2X

El buffer, se preparó a partir de una solución de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) 3 M y una solución de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) 300 mM y el pH fue ajustado a pH 7

## 3.2 Equipo de plasma focus

El equipo de plasma focus PF-2kJ (figura 7-A y 10-A), perteneciente al Centro de investigación en la intersección de Física de Plasma, Materia y Complejidad, P2mc de la CCHEN, posee la capacidad de generar pulsos de rayos x de entre 8-10 keV. Para esta tesis, el equipo fue configurado con un ánodo de un diámetro de 25 mm, cuyo largo efectivo fue es de 40 mm. El banco de capacitores (8  $\mu\text{F}$ ) fue cargado con  $17 \pm 1\text{kV}$  y conectado al equipo mediante un interruptor de alto voltaje y velocidad. El interior de la cámara fue presurizado con hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) a una presión de trabajo de 6 mbar, y la cámara fue sellada con una tapa que posee una ventana de polietileno de 0,8 mm de espesor y una hendidura externa diseñada para posicionar una placa Petri de 35 mm y permitir el paso de RI a través de la apertura de polietileno. A 140 cm por sobre la apertura de polietileno se instaló un fotomultiplicador (Hamatsu R1828-1) en conjunto con centellador (CB-408,  $100\text{keV} < E < \text{MeV}$ ), estos sensores permitieron detectar y contabilizar los pulsos de rayos X emitidos por el equipo.

### **3.3 Tamaño muestral**

Para la confección de la curva dosis-respuesta, se utilizaron muestras de sangre periférica que fueron irradiadas con una fuente continua de rayos X, a cuatro puntos de dosis (0; 0,5; 1 y 2 Gy). Para la identificación, cuantificación y obtención de la frecuencia de cromosomas dicéntricos y anillos céntricos, se analizaron un mínimo de 1000 células válidas para cada punto de dosis.

Para los ensayos de irradiación con RIP emitida por PFD, la identificación y cuantificación de cromosomas dicéntricos y anillos céntricos se realizó en tres ensayos de irradiación a 10, 20 y 40 pulsos, con su respectiva condición control a 0 pulsos. Para la obtención de la frecuencia de cromosomas dicéntricos y anillos céntricos en cada ensayo, se analizaron la totalidad de las muestras fijadas o bien hasta analizar 500 células válidas, en estado de metafase.

### **3.4 Irradiación de muestras con fuente continua**

Las muestras fueron irradiadas por el “Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire” (IRSN, Paris), utilizando una fuente continua de rayos X calibrada (40 keV; 0.997 Gy/min), siguiendo las recomendación de OIEA (30).

#### **3.4.1 Digitalización de metafases de muestras de irradiación continua**

Las muestras irradiadas en IRSN fueron procesadas y fijadas siguiendo el protocolo de la OIEA (30). La detección y digitalización de las metafases fue llevada a cabo utilizando la plataforma Metafer (MetaSystems). Las metafases fueron inicialmente identificadas por el sistema en un aumento de 10X y luego la captura de imágenes se realizó en un aumento de 100X, estas fueron luego convertidas a imágenes en escala de grises y guardadas en formato jpg.

### **3.5 Obtención de muestras biológicas**

Las muestras requeridas para los ensayos de irradiación, provienen de sangre periférica, siendo obtenidas desde un voluntario sano, no fumador de 54 años y sin antecedentes de haberse expuesto a RI en los seis meses previos a la toma de muestra. La manipulación de dichas muestras se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y en cumplimiento con el plan de bioseguridad del laboratorio y tras obtener el consentimiento informado del voluntario, personal del laboratorio habilitado, procede a

extraer las muestras en las instalaciones de CCHEN, se utilizó como agente anticoagulante heparina litio. Las muestras son utilizadas de manera inmediata para los ensayos de irradiación y cultivo celular.

### 3.5.1 Separación de linfocitos y formación de monocapa

La separación de linfocitos a partir de una muestra de sangre se llevó a cabo mediante la centrifugación aplicando un gradiente de densidad. En un tubo cónico de 15 mL se adicionaron 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma Aldrich) y 3 mL de sangre heparinizada. Los tubos fueron centrifugados por 30 minutos a 400 g a temperatura ambiente, descartándose la fase superior. La segunda fase, fue trasferida a otro tubo cónico de 15 mL adicionando 6 mL de medio RPMI 1640 (1x suplementado con L-glutamina y HEPES (25 mM) (Gibco)), y 1 mL de FBS (Gibco). Tras homogenizar la solución, ésta se centrifugó por 15 minutos a 400 g. El sobrenadante fue descartado y el pellet se lavó en 6 mL de medio RPMI 1640 (Gibco), luego la solución fue centrifugada por 15 minutos a 400 g. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 2mL de medio RPMI 1640 (Gibco).

Con el objetivo de obtener una irradiación homogénea de las muestras, para el montaje experimental en los ensayos de irradiación en el equipo de PFD, se utilizó una monocapa de linfocitos aislados a partir de sangre periférica. Esta se preparó utilizando una solución de linfocitos de una concentración máxima de  $6,13 \cdot 10^6$  células/mL o para concentraciones menores adicionando un máximo de 2 mL de solución, a una placa Petri de diámetro interior de 35mm. La concentración de células en la solución, se obtuvo utilizando una cámara de Neubaheuer (Brand), en la cual se realizó el recuento de células de cada muestra de linfocitos aislados previamente y se calculó la concentración de linfocitos aplicando la ecuación 1.

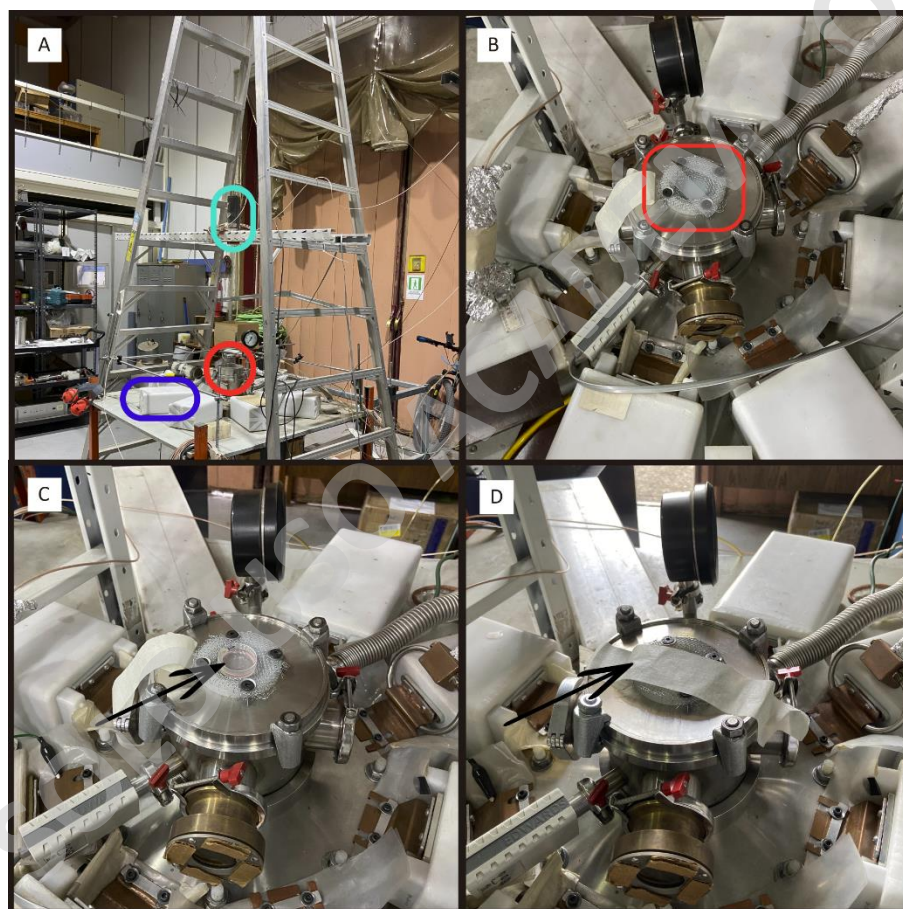
**Ecuación 1:** Utilizada para el cálculo de la concentración de células en una solución mediante la cuantificación de estas por cámara de Neubaheuer

$$\text{Concentración de células (cel/ml)} = \frac{\text{Células contadas}}{1,56 \times 10^{-5} * \text{Factor de dilución}}$$

Las placas Petri sembradas con la solución de linfocitos se mantuvieron en reposo durante 30 minutos antes de ser irradiadas con el objetivo de que las células precipiten y formen una monocapa en la base de la placa Petri.

### 3.6 Ensayo de irradiación en fuente pulsada de rayos X (PF-2kJ)

La placa de Petri con la monocapa de linfocitos fue posicionada en la ventana de polietileno del PF-2kJ y fijadas usando cinta adhesiva en su parte superior como se observa en la figura 10. Se procedió luego a cargar el equipo e irradiar la muestra con la cantidad de pulsos correspondientes (10, 20 o 40 pulsos). Cada evento de irradiación se compuso de una placa Petri control (0 pulsos), una placa irradiada con 10 pulsos, otra con 20, y otra a 40 pulsos. El orden de irradiación de las muestras fue ascendente, partiendo por 10 pulsos y finalizando en 40 pulsos.



**Figura 10:** Montaje y posicionamiento de la muestra de linfocitos de sangre periférica sobre la ventana de irradiación de polietileno del PF-2kJ. **A:** Se muestra el equipo PF-2kJ utilizado, demarcado en calipso se observa el fotomultiplicador; en rojo se destaca la posición de la cámara de vacío agrandada en la sección B; en azul se destaca 1 de los 8 capacitores del equipo. **B:** Se observa la hendidura en la ventana de polietileno (cuadrado rojo) para posicionar una placa de 35 mm de diámetro. **C:** Placa de 35mm posicionada sobre la hendidura o ventana de irradiación (flecha) con muestra de linfocitos de sangre periférica. **D:** La muestra es fijada con cinta adhesiva (flecha) para evitar cualquier disrupción de la monocapa formada.

### 3.6.1 Cultivo de linfocitos y procesamiento de muestras irradiadas

Tras haber completado las irradiaciones, en condiciones de esterilidad las muestras fueron transferidas a un tubo cónico de 15 mL. Las células fueron lavadas, adicionando medio RPMI 1640 (Gibco) y centrifugando a 700 g durante 10 minutos. Se llevaron a cabo dos lavados y en el último, se eliminó el sobrenadante dejando un volumen final de 500  $\mu$ L en el cual se resuspendió el pellet de células.

El concentrado de células obtenido anteriormente fue inoculado en un tubo cónico de 15 mL con 4 mL de medio RPMI 1640 (Gibco) y 1 mL de FBS. Con el objetivo de permitir que los mecanismos de reparación propios de las células entren en acción se incubó a 37°C durante 2 horas. Luego, se adicionó 0,1 mL de fitohematoglutina (inductor mitótico), y 0,05 mL de BrdU. A las 45 horas de cultivo se aplicó KarioMax Colcemid (GIBCO) a los cultivos para detener el ciclo celular en el estadio de metafase y se procedió con la incubación hasta cumplir las 48 o 50 horas correspondientes.

Luego de las 48-50 horas de cultivo, las muestras se agitaron en vórtex hasta obtener una solución homogénea. Los tubos fueron centrifugados a 700 g por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 5 mL de solución de KCl 0,075M (Gibco) y se incubó en baño termo regulado a 37°C por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 700 g por 7 minutos, y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Al pellet obtenido, se le adicionaron 6 mL de solución de Carnoy y se incubó a 4°C por 15 minutos. Las muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 700 g y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado 2 veces más con 6 mL de solución de Carnoy y centrifugado a 700g por 5 minutos. Por último, el pellet obtenido fue resuspendido en aproximadamente 0,5 mL de solución de Carnoy restante de los lavados y se gotearon un máximo de 3 gotas en un portaobjeto previamente lavado. Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche.

La tinción de las muestras previamente fijadas en el portaobjetos se realizó aplicando la técnica de FPG (Fluorescence plus Giemsa). Los portaobjetos se lavaron inicialmente en solución de Hoechst por 15 minutos, se enjuagaron en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 2 gotas de buffer McIlvaine y se cubrieron con un cubreobjetos. Estas muestras fueron expuestas a luz UV por 35 minutos. Las muestras se lavaron en agua destilada, eliminado el cubreobjetos y se sumergieron en solución SSC 2X incubándolas por 10 minutos a 60° C. Los portaobjetos fueron lavados en agua destilada y sumergidos en solución Giemsa 5% por 10 minutos.

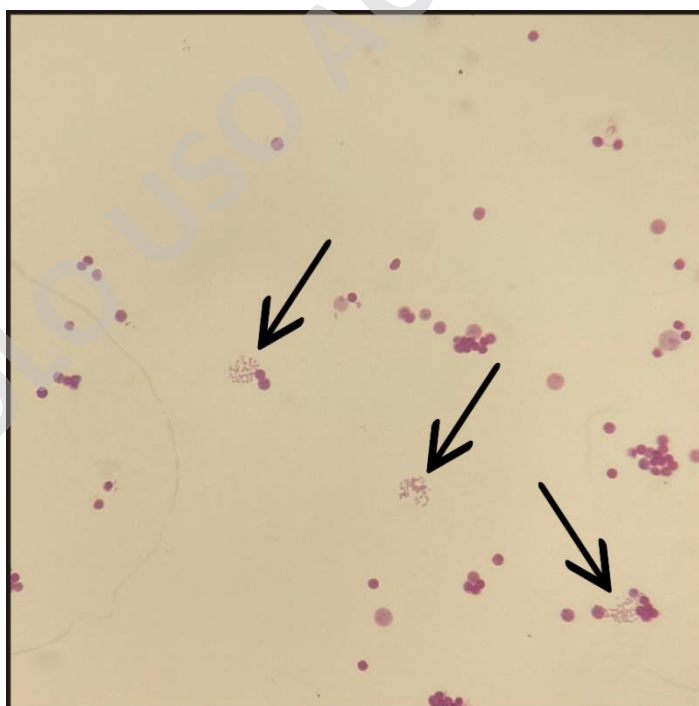
Las muestras se dejaron reposar por 2 días antes de sellar el portaobjeto con Entellan (Merk) y un cubreobjetos

### 3.7 Irradiación de cristales TLD-100

En placas Petri de 35 mm seccionados en 4 sectores se colocaron cristales de TLD-100 (Rados [LiF:Mg, Ti]). Estas placas fueron irradiadas manteniendo las condiciones de irradiación al igual que las muestras biológicas. La estimación de dosis con TLD-100 se realizó para ensayos de irradiación a 10, 20 y 40 pulsos. El análisis y los resultados de dosis de los cristales fueron realizados por la Sección Vigilancia Radiológica Individual en la unidad de Dosimetría Personal Externa de la CCHEN.

### 3.8 Criterios de análisis de metafases (imágenes digitales y observación al microscopio óptico)

El portaobjetos sellado es observado al microscopio. En aumento 16X se realiza la búsqueda de metafases (figura 11), y luego el análisis de cada metafase se realiza en aumento 160X, ilustrado en la figura 12.



**Figura 11:** Campo de observación al microscopio con aumento de 16X, tinción FPG, flechas indican metafases que deben ser observadas a 160X para su validación.

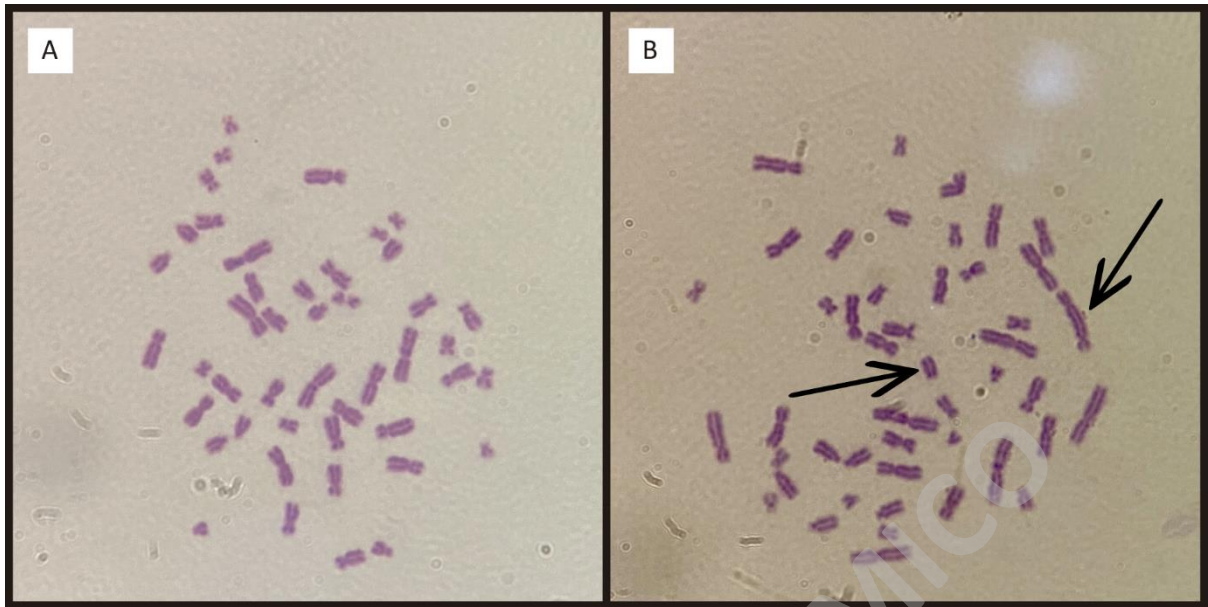
### 3.8.1 Criterios de aceptación o rechazo

Las células observadas a 160X tienen que cumplir los siguientes criterios para poder ser consideradas válidas:

Metafasas aceptadas:

- 1- Existencia de 46 centrómeros sin presencia de dicéntricos y/o anillos céntricos o fragmentos acéntricos
- 2- Existencia de 46 centrómeros sin presencia de dicéntricos y/o anillos céntricos, pero con fragmentos acéntricos
- 3- Existencia de 46 centrómeros con presencia de dicéntricos y/o anillos céntricos con sus fragmentos acéntricos asociados y con exceso de fragmentos acéntricos.

En vista de esto, el primer criterio siempre debe ser verdadero; metafases que cumplen con los criterios 1 y 2, se consideran válidas y sin ACI (figura 12-A). El cumplimiento del primer y tercer criterio, indica la existencia de una metafase válida con ACI (figura 12-B). Al momento de haber identificado correctamente una metafase que posee ACI y es válida, esta fue reconstruida, mediante la realización de un cariograma, para así determinar cuáles pares cromosómicos se encuentran involucrados en la formación del cromosoma dicéntrico o anillo céntrico y por la visualización y confirmación de otro operador del laboratorio. Metafasas que no cumplan estas condiciones, como por ejemplo que no tengan 46 centrómeros, posean una morfología inadecuada o sea difícil de identificar los cromosomas, así como la existencia de cromosomas dicéntricos o anillos céntricos, sin sus correspondientes fragmentos acéntricos, se consideran inválidas y no son contabilizadas.



**Figura 12:** Metafases en aumento de 160x, tinción FPG. **A:** ejemplo de una metafase normal, se cuentan 46 centrómeros y no se observan fragmentos. Adicionalmente la morfología observada concuerda con una morfología normal esperada. **B:** Ejemplo de una metafase con ACI. Las flechas indican al cromosoma dicéntrico (derecha) y a su fragmento acéntrico (centro). La metafase se considera válida, debido a que se contabilizan 46 centrómeros, se identifica un cromosoma dicéntrico con su correspondiente fragmento acéntrico y la morfología de la metafase se encuentra dentro de lo esperado

### 3.8.2 Índice mitótico

Para evaluar la viabilidad de los cultivos llevados a cabo, se calculó el índice mitótico (IM) de estos, según el protocolo de OIEA (30), al observar al microscopio en aumento 64X se contaron de manera separada los blastocitos inducidos (excluyendo células apoptóticas y no inducidas), y metafases visibles. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular el porcentaje de metafases generada en el total de linfocitos inducidos a partir de la ecuación 2

**Ecuación 2:** Porcentaje de índice mitótico (IM)

$$IM = \frac{(\#metafases) * 100}{\#metafases + \#blastocitos}$$



### 3.9 Análisis de datos

Para la confección de la curva de dosis respuesta de RIC se calculó la frecuencia de ACI para cada punto de dosis; se calculó el índice de dispersión; y con la distribución de las ACI, se calculó el índice U de Papworth. Estos análisis se llevaron a cabo en paralelo utilizando la herramienta Biodose Tools (Ver. 2019.10.15-beta) (61) y GraphPad Prism 6 (Ver. 6.00) (62). La curva se grafica utilizando la herramienta Biodose Tools, utilizando el parámetro de modelo cuasi-Poisson.

Con la distribución de ACI obtenida de los ensayos de irradiaciones con fuente pulsada se calculó índice de dispersión y la prueba U usando GraphPad Prism 6 y Excel (2016 MSO Ver. 16.0.4266.1001). Además, se calculó el IM, considerando como criterio de exclusión un 2,5% (63). Los datos obtenidos fueron luego graficados con GraphPad Prism 6 y utilizados para evaluar el efecto biológico ocasionado por RIP emitida por PFD.

Para obtener el daño citogenético asociado a los resultados de dosis estimados por TLD, se estimó “la frecuencia de aberraciones cromosómicas interpolada”. Esta corresponde al resultado de la frecuencia obtenida utilizando la ecuación de la curva dosis respuesta confeccionada para RIC. Intervalos de confianza del 95% (IC 95%) fueron estimados utilizando la tabla 8 del manual de respuesta a emergencias radiológicas de OIEA (30). Los resultados fueron graficados utilizando GraphPad Prism 6.

## 4. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 Análisis del efecto biológico de la radiación pulsada

Las irradiaciones de linfocitos de sangre periférica utilizando el PF-2kJ correspondieron a 9 eventos de irradiación distintos. Luego del cultivo de linfocitos irradiados y preparación de muestras fijas, se analizó un total de 2.764 muestras de células en metafase al microscopio. La tabla 3 muestra, para cada punto de irradiación, la cantidad de ACI observadas en cada metafase válida (distribución de ACI), el total de células analizadas, el total de ACI identificadas, la frecuencia de ACI (total de ACI/total de célula), el índice de dispersión (D), el índice de Papworth (*U*) y el índice mitótico (porcentaje de células inducidas a metafase).

**Tabla 3:** Distribución, frecuencia, Índice de dispersión (D), Índice de Papworth (*U*) e índice mitótico de ACI en muestras irradiadas con una fuente pulsada de rayos X, emitida por PFD.

Nombre	N° Pulsos	Distribución de ACI				Total de Células	Total ACI	Frecuencia ACI	D= $\sigma^2/y$	<i>U</i>	Índice Mitótico
		ACI									
		0	1	2	3						
0	0	500	0	0	0	500	0	0,000	NA	NA	9,72
10-01	10	230	1	0	0	231	1	0,004	1,000	NA	5,77
10-02	10	104	1	0	0	105	1	0,010	1,000	NA	2,31
10-03	10	486	13	1	0	500	15	0,030	1,110	1,67	5,2
20-01	20	77	3	0	0	80	3	0,038	0,975	-0,195	1,94
20-02	20	487	13	0	0	500	13	0,026	0,976	-0,395	5,23
20-03	20	476	22	2	0	500	26	0,052	1,100	1,650	4,7
40-01	40	99	8	4	1	118	19	0,161	1,589	4,631	0,41
40-02	40	210	14	6	0	230	26	0,113	1,400	3,800	1

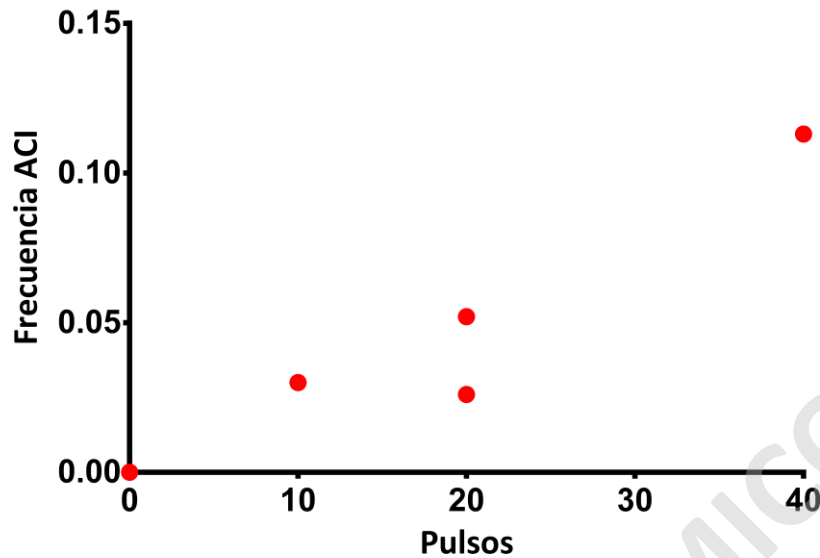
Con el objetivo de caracterizar el efecto biológico generado por RIP emitida por un PFD, se analizan los datos de la tabla 3, donde podemos observar que la frecuencia de ACI tiene una tendencia general a aumentar, mientras que el IM tiene una tendencia general a disminuir. Como fue mencionado anteriormente, los datos deben seguir una distribución de Poisson. Para su determinación se ocupa el valor del Índice de Papworth (*U*) (rango de -1,96 a 1,96), con este se valida si la muestra se ajusta a la distribución requerida (30). Así mismo, se establece que la muestra debe estar por encima del umbral de 2,5% de IM (63) y tener un mínimo de 500 metafases validas contabilizadas (30), esto con el propósito de que estas muestras presentan la fuerza estadística requerida. De los 9 ensayos realizados,

4 (10-01; 10-02; 20-01; 40-01 y 40-02, ver tabla 3) deben ser descartados, por estar fuera de las restricciones impuestas. Sin embargo, como el objetivo de este experimento es caracterizar el efecto biológico y no establecer la dosis de cada uno de los puntos irradiados, se decide no descartar la muestra 40-02, ya que es la muestra que mayor peso estadístico tiene de los 2 ensayos de irradiación realizados a 40 pulsos.

Considerando lo anterior, es que se seleccionan 5 ensayos, que se muestran en la tabla 4 y se confeccionó un gráfico de dispersión (figura 13) para el análisis de los puntos.

**Tabla 4:** Distribución, frecuencia, Índice de dispersión (D), Índice de Papworth (U) e índice mitótico de ACI en muestras irradiadas con una fuente pulsada de rayos X, emitida por PFD. Valores extraídos de tabla 1.

Nombre	N° Pulsos	Distribución de ACI				Células Contadas	Total ACI	Frecuencia ACI	D= $\sigma^2/y$	U	Índice Mitótico
		ACI									
		0	1	2	3						
0	0	500	0	0	0	500	0	0,0000	NA	NA	9,72
10-03	10	486	13	1	0	500	15	0,0300	1,110	1,67	5,2
20-02	20	487	13	0	0	500	13	0,0260	0,976	-0,395	5,23
20-03	20	476	22	2	0	500	26	0,0520	1,100	1,650	4,7
40-02	40	210	14	6	0	230	26	0,1130	1,400	3,800	1



**Figura 13:** Frecuencia de ACI obtenida en diferentes ensayos con RIP emitida por PF-2kJ, gráfico confeccionado a partir de los datos de la tabla 4; la frecuencia de ACI aumenta al aumentar el número de pulsos, indicando un mayor efecto biológico a mayor cantidad de pulsos; n = 500 metafases para los puntos en 0, 10 y 20 pulsos; n = 230 metafases en 40 pulsos.

Al observar los datos de la tabla 3 y la figura 13, se evidencia que la frecuencia de ACI se incrementa a medida que el número de pulsos aumenta, evidenciando que el efecto biológico asociado a RIP aumenta con el número de pulsos emitidos por PF-2kJ. Adicionalmente se observa que el IM para las muestras analizadas va disminuyendo a medida que el número de pulsos aumenta, esto también da cuenta del efecto de la RIP sobre las células.

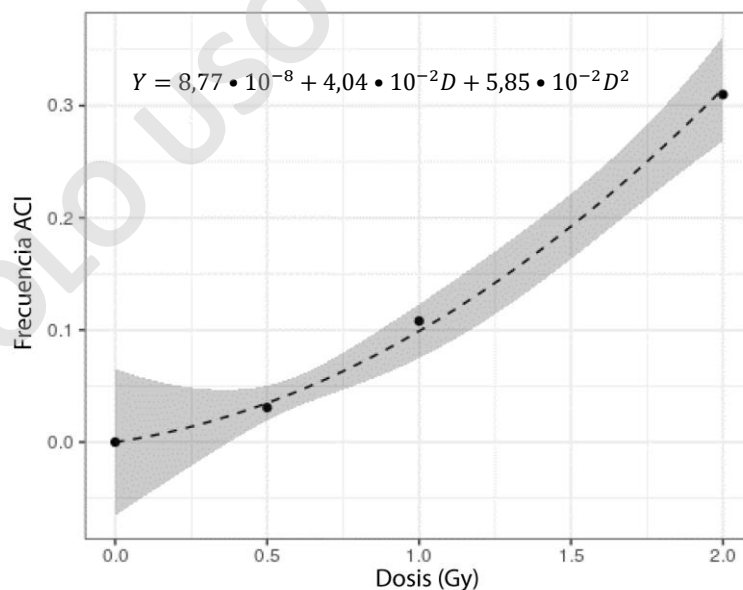
#### 4.2 Confección de curva de dosis-respuesta de rayos X de fuente continúa

La confección de la curva de dosis-respuesta con una fuente continua de rayos X fue obtenida luego del análisis de 8.552 imágenes de metafases, de las cuales, 3.987 fueron validadas correctamente, según los criterios expuestos en Materiales y Métodos sección 3.8.1. En la tabla 5 se puede observar para cada punto de dosis; el número total de células evaluadas, el número total de ACI observados, la distribución de ACI, el índice de dispersión (D) y el índice de Papworth (U).

**Tabla 5:** Resultados del recuento de metafases válidas en muestras irradiadas con una fuente continua de rayos X. Para cada punto de dosis se muestra el total de metafases analizadas, el total de ACI y su distribución, además del cálculo del índice de dispersión (D), índice de Papworth (U) y la frecuencia de ACI.

Dosis (Gy)	Distribución de ACI					Total de Metafases	Total ACI	Frecuencia ACI	D= $\sigma^2/\mu$	U
	0	1	2	3	4					
0	1008	0	0	0	0	1008	0	0	NA	NA
0,5	1009	30	1	0	0	1040	32	0,031	1,033	0,758
1	904	84	12	0	0	1000	108	0,108	1,115	2,590
2	711	173	48	6	1	939	291	0,310	1,186	4,039

Utilizando la herramienta Biodose Tools se confeccionó la curva dosis-respuesta (figura 14). Esta curva de dosis-respuesta, se confeccionó utilizando un modelo de regresión quasi-Poisson, debido a que los puntos de dosis de 1 y 2 Gy, se encuentran sobredispersos. Esta sobredispersión, se observa en los valores del test U de Papworth, que para los puntos de dosis de 1 y 2 Gy presenta los valores de 2,590 y 4,039, respectivamente, encontrándose fuera del límite aceptado de 1,96 (30) e indicando que estos valores no se ajustan a la distribución de Poisson. La curva obtenida, tiene las características de una curva lineal cuadrática ascendente, cuyo coeficiente "C" es  $8,77 \cdot 10^{-8}$  ( $\pm 2,34 \cdot 10^{-2}$ ), el coeficiente lineal ( $\alpha$ ) es  $4,04 \cdot 10^{-2}$  ( $\pm 5,13 \cdot 10^{-2}$ ), y el coeficiente cuadrático ( $\beta$ ) es  $5,85 \cdot 10^{-2}$  ( $\pm 2,18 \cdot 10^{-2}$ ) (figura 14).



**Figura 14:** Curva de dosis-respuesta para rayos X, construida a partir del análisis de las metafases digitalizadas en IRSN y analizadas en CCHEN. Se muestra la ecuación de la regresión cuadrática, donde Y corresponde a la frecuencia de ACI (total de ACI/total de células) y D a la dosis absorbida, (Gy). La línea discontinua representa la función ajustada a la distribución de quasi-Poisson a partir de los datos obtenidos. El área en gris representa IC del 95% ( $p < 0.05$ ).

### 4.3 Comparación de las herramientas dosimétricas utilizadas para evaluar dosis y efecto biológico en PFD

Utilizando cristales TLD-100 se realizaron un total de 37 ensayos de irradiación en PFD a diferentes números de pulsos, la tabla 6 muestra los resultados de dosis promedio y la desviación estándar.

**Tabla 6:** Promedio de dosis equivalente obtenida de la irradiación de TLD-100 con RIP emitida por PFD a diferentes números de pulsos.

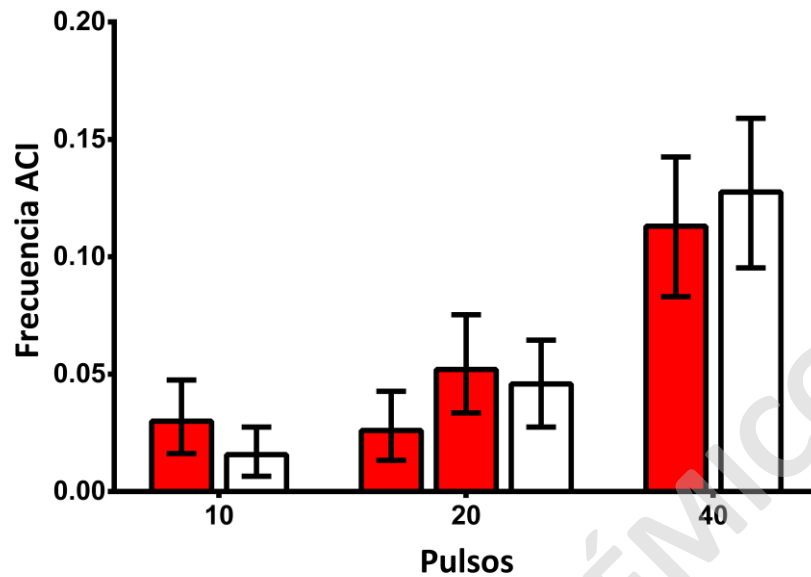
N° de Pulsos	Dosis (Sv)	DE (Sv)	N° de ensayos
10	0,276	0,079	19
20	0,605	0,135	8
40	1,171	0,26	10

Para comparar los resultados obtenidos por la dosimetría física (TLD-100), con los obtenidos mediante marcadores biodosimétricos (ACI); se calculó el efecto biológico asociado a las dosis promedios de la tabla 6 utilizando la curva dosis-respuesta confeccionada en este trabajo (figura 14). Estos resultados se denominaron “frecuencia interpolada”, y se resumen en la tabla 7. En la misma tabla se muestran las frecuencias “experimentales,” que corresponden a los resultados obtenidos para los ensayos de irradiación a 10, 20 y 40 pulsos y el control a 0 pulsos (extraídos de la tabla 4)

**Tabla 7:** Comparación de la frecuencia de ACI “interpolada”, y la frecuencia de ACI “experimental” observada en muestras irradiadas con RIP emitida por PFD, junto son los intervalos de confianza correspondientes.

Pulsos	Frecuencia interpolada	IC 95%		Frecuencia experimental	IC 95%	
		Lim Inf	Lim Sup		Lim Inf	Lim Sup
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,016	0,007	0,028	0,030	0,016	0,048
20	0,046	0,028	0,065	0,026	0,013	0,043
40	0,128	0,095	0,160	0,113	0,084	0,143

La comparación de los valores interpolados contra los experimentalmente se visualizan en la figura 15; éstos muestran que los resultados obtenidos por dosimetría física como por dosimetría citogenética se sobreponen, evidenciando que desde estas dos aproximaciones se obtienen resultados similares. Sin embargo, se puede destacar que a menor cantidad de pulsos se observa una mayor diferenciación entre los resultados de frecuencia interpolada y experimental; siendo la frecuencia experimental mayor a la interpolada.



**Figura 15:** Comparación de herramientas dosimétricas, frecuencia experimental (en rojo) y frecuencia interpolada (en blanco con borde negro) a diferentes números de pulsos. Las barras corresponden a los intervalos de confianza del 95% para cada punto. Se observa el aumento de la frecuencia de ACI para ambos grupos a medida que aumentan los pulsos.

SOLO USO ACADÉMICO

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los equipos de PFD son una novedosa y emergente tecnología, la cual posee un potencial para ser aplicado en la radiobiología y radio medicina debido a que la emisión pulsada de radiación presenta como principales características, la entrega de RI de baja energía a una alta potencia y capacidad de enfoque del haz en comparación con una fuente de radiación continua. A la fecha los pocos estudios en estas áreas han caracterizado estos equipos mediante el uso de la dosimetría física, y su aplicación biológica se ha limitado a la irradiación de líneas celulares de cáncer. Para evaluar qué posibilidades existen de utilizar la radiación pulsada emitida por estos equipos en las ciencias biomédicas, la utilización de marcadores capaces de evidenciar el efecto directo de la radiación pulsada sobre los sistemas biológicos y además de poder correlacionar estos resultados con una magnitud resultan un pilar fundamental en el proceso de caracterización de éstos. En este trabajo se utilizaron las aberraciones cromosómicas inestables (ACI) como marcadores biológicos para evidenciar, evaluar y cuantificar el daño directo sobre el ADN asociado a radiación pulsada. Con ello fue posible caracterizar el efecto a diferentes condiciones de irradiación (número de pulsos), y además fue posible comparar estos resultados con los obtenidos por otra herramienta dosimétrica con el fin de comparar los resultados obtenidos desde diferentes aproximaciones.

### 5.1 Análisis de efecto biológico de radiación pulsada

Los resultados observados al momento de analizar la frecuencia de ACI en células irradiadas con RIP emitida por PFD, indica que a una mayor cantidad de pulsos aumenta el efecto biológico observado, asociado a la directa observación de una mayor frecuencia de ACI. Esto concuerda con lo descrito en la bibliografía, donde utilizando dosimetría física se observa un aumento de la dosis a un mayor número de pulsos emitidos por el equipo (56). Estos son los primeros resultados de su tipo, indicando que la técnica de DCA es capaz de determinar el efecto biológico que tiene PFD por sobre la materia viva.

Los resultados obtenidos al irradiar con 20 pulsos presentan una dispersión elevada, con una diferencia aproximada al 50% en su frecuencia de ACI (0,026; 0,052). A pesar de que el esfuerzo de muestreo fue el apropiado (se contabilizaron 500 células en cada caso), y los indicadores de dispersión, homogeneidad (U test) e índice mitótico se encuentran dentro de los rangos aceptados (30,63). Conocer o entender esta anomalía y dilucidar si esta es parte inherente del comportamiento del equipo es clave para poder determinar la viabilidad de la aplicación de esta tecnología en áreas biomédicas, ya



que un comportamiento inestable no deseable para este tipo de aplicaciones, es pertinente por lo tanto llevar a cabo otro ensayo en estas condiciones de irradiación para determinar el origen de este comportamiento.

En este trabajo, además de identificar y cuantificar las ACI, se realizó una cuantificación de las células según su estadio celular, con el objetivo de calcular el índice mitótico (IM). Este índice evidencia el porcentaje de células inducidas a mitosis (63). Dentro del ciclo celular, existen puntos de control, los cuales condicionan si las células continúan o no a la siguiente etapa del ciclo celular (64,65). Para iniciar la mitosis existe el punto de control del ciclo G2/M, si la célula presenta daño en su material genético no podrá pasar este punto de control. Cuando la célula interactúa con la RI, el ADN es un blanco que producto de la interacción puede dañarse y no necesariamente ser reparado de manera efectiva (66). El control del daño al ADN sucede debido a la activación de p53 (67,68), esta bloquea el avance a mitosis y por tanto, no puede proseguir con su división celular, resultando en una célula que no iniciará la etapa de mitosis. Al observar una disminución significativa en la cantidad de células inducidas mitosis, al aumentar el número de pulsos, se puede asumir que el daño generado por sobre las células fue mayor, impidiendo así que estas prosigan del punto de control de G2/M y entren en mitosis. De esta forma, los porcentajes significativamente menores de IM obtenidos, 9 % a 0 pulsos respecto de 1 % a 40 pulsos, es otro indicador de que la radiación pulsada tiene consecuencias en el desarrollo del ciclo celular de los linfocitos, y que este efecto aumenta a medida que incrementa el número de pulsos. Un efecto similar fue observado en líneas celulares de cáncer colorectal (DLD-1) que mostraron una menor supervivencia celular a medida que aumentan los pulsos efectuados sobre las muestras (48). Al comparar este efecto con RIC en células somáticas, se observa que este también se presenta de manera similar, con un menor número de células viables al aumentar la dosis de radiación observado como una disminución del IM a medida que aumentan los pulsos, esto se ha atribuido mayormente al daño generado por la radiación, el cual genera muerte celular o un retraso del proceso de mitosis, debido a problemas de reparación del daño efectuado. (69,70). Por otro lado, tener entendimiento de este fenómeno podría brindar información para optimizar el proceso con la intención de la aplicación de RIP emitida por PFD como alternativa terapéutica.

## 5.2 Curva de dosis-respuesta de rayos X de fuente continua

Para la estimación de dosis, a partir de una frecuencia de ACI, es recomendable que cada laboratorio posea su propia curva de dosis-respuesta (30,43). Las razones de estas recomendaciones se asocian principalmente a la utilización de diferentes reactivos para las etapas de cultivo, preparación y fijación de las muestras, además de los criterios de validación que cada laboratorio aplica al analizar al microscopio. Teniendo esto en cuenta, es que se confeccionó una curva de dosis respuesta mediante el análisis de imágenes de metafases obtenidas a partir de ensayos de irradiación de sangre con una fuente continua de rayos X de 40kV (0,997 Gy/min). Utilizando la herramienta Biodose Tool, se obtuvo la función  $Y=8,77 \times 10^{-8} + 4,04 \times 10^{-2}D + 5,85 \times 10^{-2}D^2$ . Se debe considerar que la confección de la curva dosis-respuesta en este trabajo incluyó 4 puntos de dosis (0; 0,5; 1 y 2 Gy), por lo que estos resultados debiesen ser considerados preliminares, ya que las recomendaciones sugieren incluir al menos 10 puntos de dosis (30). A pesar de ello, considerando que las magnitudes de dosis obtenidas por TLD se encuentran dentro del rango abarcado por la curva dosis-respuesta confeccionada en este trabajo (0 Gy a 2 Gy), la utilización de ésta para poder estimar la “frecuencia interpolada” y así poder comparar las dos herramientas dosimétricas es apropiada. La distribución de ACI en los puntos de dosis 1 Gy y 2 Gy no se ajustan a la distribución de Poisson ( $U$  test 2,590 y 4,039 respectivamente), posiblemente debido a que demanda un mayor esfuerzo de muestreo, que requiere contar con mayor número de imágenes de células analizadas.

En el trabajo de Alsbeih et al 2020 (71) se muestra la confección de una curva dosis respuesta, considerando múltiples parámetros (diversidad de donantes, tipo de análisis de imágenes manual o automatizados), además de comparar sus resultados con la literatura. Como se evidencia en esta publicación, si bien todas las curvas dosis-respuesta tienen el mismo propósito (estimar dosis absorbida) existe una gran diversidad, todas estadísticamente válidas, pero que se diferencian en la energía de la fuente de rayos X, tasa de dosis, criterios de recuento (qué ACI se consideran en el recuento) y tipo de análisis al microscopio (manual o automatizado) (72–74). Puesto que el PFD utilizado en esta tesis emite rayos X de baja energía 8-10 keV, se lleva a cabo la confección de una curva de calibración propia, que presente un rango energético similar 40 keV y que es realizada en el mismo laboratorio donde se lleva a cabo todo el estudio utilizando las mismas técnicas y criterios de análisis, brindándonos una curva de calibración con el mejor ajuste a las condiciones experimentales para el análisis de muestras irradiadas con PF-2kJ.

### 5.3 Comparación de las herramientas dosimétricas para evaluar dosis y efecto biológico en PFD

Dado los pocos estudios referentes a la irradiación de materia viva con RIP emitida por PFD y que la caracterización de estos equipos ha sido mayormente utilizando técnicas de dosimetría física o bien observaciones de comportamiento de líneas celulares de cáncer, se hace necesario tener un acercamiento integral de las técnicas usadas y compararlas. Al hacer esto entre la frecuencia de ACI interpolada a partir de TLD-100 y la frecuencia observada experimentalmente, podemos visualizar que ambas poseen un comportamiento similar (figura 15), con ambos juegos de datos solapándose en el IC 95% del otro y con una tendencia al aumento de la frecuencia de ACI al aumentar la cantidad de pulsos. Cabe destacar que la aplicación de un análisis estadístico comparativo, como ANOVA o T-test no fue posible, debido a como fueron diseñados los ensayos de irradiación y a que los resultados obtenidos se encuentran fuera de las restricciones de estos análisis.

A pesar de estas limitaciones, se observa mayores diferencias entre las frecuencias interpoladas y experimentales a medida que la cantidad de pulsos disminuyen, observándose en el punto de 10 pulsos que la frecuencia experimental es mayor a la frecuencia interpolada, lo cual solo se observa en este punto. Existen antecedentes en la literatura donde se ha observado un mayor efecto biológico a baja dosis en comparación con RIC, esto se ha denominado “hipersensibilidad a bajas dosis” (54) y la diferencia observada a 10 pulsos podría estar ligada a este fenómeno.

Teniendo en cuenta lo anterior, se observa que ambas herramientas pueden ser aplicadas para la caracterización de la emisión y del efecto biológico de RIP emitida por PFD, destacando que la medición mediante TLD-100, podría estar subestimando dosis a bajo número de pulsos. De este modo la técnica de DCA se plantea como la técnica más adecuada a utilizar al momento de caracterizar estos equipos, en particular a bajo número de pulsos o dosis.

La diferencia de efecto biológico observada a bajas dosis y la posible vinculación con el fenómeno de hipersensibilidad a bajas dosis debe ser explorado a futuro, en particular con herramientas de dosimetría citogenéticas, con el objetivo de esclarecer este fenómeno, permitiendo una correcta caracterización de estos equipos en cuanto a los efectos biológicos inmediatos.

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados observados indican que la aplicación de herramientas biodosimétricas permite caracterizar un equipo de PFD ya que se evidenció el daño biológico asociado a la irradiación de las muestras con RIP emitida por PFD incluso observándose una tendencia de encontrar mayor daño a mayor cantidad de pulsos realizados por el equipo.

Considerando que el marcador biológico utilizado es, casi, evidencia exclusiva del efecto directo de la RI sobre el ADN, es posible decir que la RIP genera un efecto biológico sobre las células que se caracteriza por tener un comportamiento ascendente, en relación a las ACI observadas a medida que aumentan los pulsos. Esto además se complementa con los resultados de IM, donde se observa una disminución del porcentaje de células inducidas a una mayor cantidad de pulsos.

Mediante la confección de una curva de dosis-repuesta, fue posible comparar resultados de dos herramientas dosimétricas (TLD-100 y ACI). Sin embargo, siguiendo las recomendaciones del OIEA (30), esta curva requiere de un mayor número de metafases analizadas para aumentar la fuerza estadística de cada punto, así como una mayor cantidad de puntos de dosis, con el objetivo de aumentar la precisión de esta. No obstante, su utilización fue requerida ya que es la curva más apropiada para realizar las comparaciones entre la información obtenida por marcadores citogenéticos y la información dosimétrica obtenida por TLD.

La comparación de las frecuencias de ACI experimentales e interpoladas, indican que ambas aproximaciones tienen un comportamiento similar y se encuentran dentro del IC 95% de cada uno. A pesar de esto, las mayores diferencias observadas entre los datos fueron a menor cantidad de pulsos. Este resultado concuerda con la hipótesis de hipersensibilidad a bajas dosis (54) y evidencia una posible subestimación de dosis a baja cantidad de pulsos al usar TLD.

El conjunto de resultados obtenidos, por lo tanto, permiten caracterizar el equipo PF-2kJ de CCHEN, el cual genera un efecto biológico que se observa como un aumento no lineal del daño observado en el ADN a medida que aumentan la cantidad de pulsos. La comparación de dosimetría biológica y física muestra que a menor cantidad de pulsos el daño biológico evidenciado por los marcadores citogenéticos es mayor a lo que se reporta por un sistema de dosimetría física.

## 7. IMPLICANCIAS, RECOMENDACIONES Y/O PROYECCIONES FUTURAS

La utilización de la RIP en el campo de las ciencias biomédicas, radio medicina es una proyección que requiere del estudio a diferentes niveles de investigación y desarrollo asociado al estudio de los PFD. A conocimiento nuestro, no existen estudios donde se apliquen herramientas biodosimétricas para el estudio y caracterización del efecto de la RIP emitida por PFD, siendo CCHEN el lugar pionero en ello. Esta tesis corresponde a una de las primeras publicaciones asociadas este tipo de investigación y los resultados de ésta, validan el uso de la dosimetría citogenética, en particular la técnica DCA, para la caracterización de los efectos biológicos generados por RIP emitida por PFD. Este primer paso en la aplicación de técnicas de dosimetría citogenética en RIP, es un aporte a la caracterización de manera integral de los equipos de PFD, con el objetivo de avanzar con la investigación de aplicaciones en el ámbito de la radiobiología, así como la radio medicina. Tener una caracterización adecuada de los efectos biológicos que posee la emisión de estos equipos es crucial para poder avanzar en estas áreas, y a la fecha sólo se han utilizado herramientas de dosimetría física, las cuales no permiten observar de manera directa el efecto biológico causado por RIP, por lo que la introducción de herramientas de dosimetría citogenética se hace crucial. A largo plazo, este tipo de equipos que poseen la capacidad de emitir RIP, podrían ser utilizados en el tratamiento de cánceres, brindando al paciente un tratamiento efectivo y equivalente, pero con una disminución de los efectos secundarios asociados a la radioterapia convencional. Esta proyección se basa en los resultados obtenidos a la fecha, donde se ha reportado un aumento de la tasa de muerte celular al impartir bajas dosis de RIP en comparación con RIC comparable.

El fenómeno observado y denominado hipersensibilidad a la radiación a bajas dosis (54,55) ha sido reportado en múltiples estudios (11,48,53) y por lo tanto podría ser identificado como un punto de unión entre éstos. Aplicaciones en el área biomédica, pueden aprovechar este fenómeno, con la idea de poder obtener un resultado terapéutico similar, pero a una menor dosis, disminuyendo así los efectos secundarios inmediatos y a largo plazo para el paciente. El entendimiento y caracterización de este fenómeno parece ser el próximo paso y es clave para poder proseguir con la investigación y futura aplicación de esta tecnología. Adicionalmente, un área que debe ser explorada es el efecto biológico a largo plazo. A la fecha todos los estudios han observado el efecto biológico a corto plazo o inmediato, pero la utilización de RI de forma terapéutica tiene efectos que pueden ser observados a largo plazo. Existen técnicas de dosimetría biológica tal como la técnica de FISH, que permite identificar y cuantificar las translocaciones y aberraciones cromosómicas que podrían evidenciar tales efectos.

La exitosa aplicación de herramientas biodosimétricas para la caracterización de un equipo de PFD, y las características de estas técnicas, llevan a sugerir el uso de una aproximación integral a la caracterización de estos equipos, utilizando distintas herramientas de dosimetría biológica, dosimetría física e instrumentos de medición, con el objetivo de poder aprovechar las ventajas de cada una y tener un entendimiento más completo del efecto biológico que estos equipos producen sobre la materia viva, ya que para una aplicación clínica, se requiere tener un profundo conocimiento del funcionamiento y efectos de la aplicación de esta tecnología.

SOLO USO ACADÉMICO

## 8. REFERENCIAS

1. Britannica. Radiation - Historical background [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/radiation/Historical-background>
2. CDC. Radiation Studies - CDC: ALARA [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/nceh/radiation/alara.html>
3. WHO. Ionizing radiation, health effects and protective measures [Internet]. [citado 24 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures>
4. Laura G (IAEA). La radiación cósmica: Por qué no debería ser motivo de preocupación [Internet]. 2021 [citado 9 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.iaea.org/es/newscenter/news/radiacion-cosmica-por-que-no-deberia-ser-motivo-de-preocupacion-en-ingles>
5. OSHA. Ionizing Radiation - Background | Occupational Safety and Health Administration [Internet]. [citado 24 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.osha.gov/ionizing-radiation/background>
6. Tippens PE. Física, Conceptos y aplicaciones. 7ª ed. Del Campo RM, editor. Santiago, Chile: McGraw-Hill Interamericana; 2007. 782 p.
7. Stark G. X-ray. En: Encyclopedia Britannica [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.britannica.com/science/X-ray>
8. Jones J, Bell D. Ionising radiation. Radiopaedia.org [Internet]. 25 de marzo de 2018 [citado 24 de noviembre de 2021]; Disponible en: <http://radiopaedia.org/articles/59177>
9. Alderighi M, Casini F, Gerardin S, Paccagnella A, Violante M. Long Duration Balloon flights for the evaluation of radiation effects on electronic systems. Mem della Soc Astron Ital [Internet]. 2008;79(Figure 1):883. Disponible en: <http://sait.oat.ts.astro.it/MSAI790308/PDF/2008MmSAI..79..883A.pdf>
10. ICRU. ICRU Report 86, Quantification and Reporting of Low-Dose and Other Heterogeneous Exposures. 1986; Disponible en: <https://www.icru.org/report/quantification-and-reporting-of-low-dose-and-other-heterogeneous-exposures-icru-report-86/>
11. Virelli A, Zironi I, Pasi F, Ceccolini E, Nano R, Facchetti A, et al. Early effects comparison of X rays delivered at high-dose-rate pulses by a plasma focus device and at low dose rate on human tumour cells. Radiat Prot Dosimetry. 2015;166(1-4):383-7.

12. Swinwood JF, Waite TD, Kruger P, Rao SM. Radiation technologies for waste treatment: a global perspective. *IAEA Bull.* 1994;36(1):11–5.
13. Jiménez MT, Ermacora M. Assessment of the Main Deviations Found during Regulatory Inspections in Industrial Gamma Radiography in Argentina. *Aut Regul Nucl.* 1997;1–10.
14. Falahati M, Vaziri MRR, Beigzadeh AM, Afarideh H. Design, modelling and construction of a continuous nuclear gauge for measuring the fluid levels. *J Instrum.* 2018;13(2).
15. Cone RE. Radiolabeling. *Encycl Immunol.* 1998;2053–5.
16. Ullman EF. Homogeneous Immunoassays. *Immunoass Handb.* 2013;67–87.
17. External radiation therapy | Canadian Cancer Society [Internet]. [citado 1 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://cancer.ca/en/treatments/treatment-types/radiation-therapy/external-radiation-therapy>
18. Ferlini C, Amelio RD, Scambia G. Apoptosis Induced by Ionizing Radiation. *Phospholipid Metab Apoptosis* [Internet]. 7 de enero de 2004 [citado 9 de abril de 2022];171–86. Disponible en: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47931-1\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-47931-1_9)
19. Ryan JL. Ionizing Radiation: The Good, the Bad, and the Ugly. *J Invest Dermatol.* 1 de marzo de 2012;132(3):985–93.
20. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules - mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxidants Redox Signal.* 2014;21(2):260–92.
21. Han W, Yu KN. Ionizing Radiation , DNA Double Strand Break and Mutation. *Adv Genet Res.* 2010;4:1–13.
22. Elgazzar AH. The pathophysiologic basis of nuclear medicine. *Pathophysiol Basis Nucl Med.* 2015;1–753.
23. Müller H. Artificial trasmutation of the gene. *Science (80- ).* 1927;66(1996):84–7.
24. Painter TS, Müller H. Parallel Cytology an Genetics of Induced Traslocations and Deletions in *Drosophila.* *J Hered.* 20(6):287–98.
25. Reuvers AP, Greenstock CL, Borsa J, Chapman JD. Studies on the mechanism of chemical radioprotection by dimethyl sulphoxide. *Int J Radiat Biol.* 1973;24(5):533–6.
26. Duncan Lyngdoh RH, Schaefer Henry F. III. Elementary Lesions in DNA Subunits: Electron, Hydrogen Atom, Proton, and Hydride Transfers. *Acc Chem Res* [Internet]. 2009;42(4):563–72. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar800077q%5Cnpapers2://publication/doi/10.1021/ar80>



0077q

27. Breimer LH. Ionizing radiation-induced mutagenesis. *J Cancer*. 1988;57:6–18.
28. Helena JM, Joubert AM, Grobbelaar S, Nolte EM, Nel M, Pepper MS, et al. Deoxyribonucleic acid damage and repair: Capitalizing on our understanding of the mechanisms of maintaining genomic integrity for therapeutic purposes. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
29. Thompson LH. Recognition, signaling, and repair of DNA double-strand breaks produced by ionizing radiation in mammalian cells: The molecular choreography. *Mutat Res - Rev Mutat Res* [Internet]. 2012;751(2):158–246. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.06.002>
30. OIEA. Dosimetría citogenética: Aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas. *Org Int Energía Atómica*. 2014;231.
31. Deem A, Keszthelyi A, Blackgrove T, Vayl A, Coffey B, Mathur R, et al. Break-induced replication is highly inaccurate. *PLoS Biol*. 2011;9(2).
32. Rodgers K, McVey M. Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):15–24.
33. Sax K. Chromosome Aberrations Induced By X-Rays. *Genetics*. 1938;23(5):494–516.
34. Lea DE, Catcheside DG. The Mechanism of the induction by radiation of chromosome aberrations in *Tradescantia*. *J Genet*. 1942;44(2):216–45.
35. Obe G, Pfeiffer P, Savage JRK, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, et al. Chromosomal aberrations: Formation, identification and distribution. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2002;504(1–2):17–36.
36. Rühm W, Ainsbury E, Breustedt B, Caresana M, Gilvin P, Knežević, et al. The European radiation dosimetry group – Review of recent scientific achievements. *Radiat Phys Chem* [Internet]. 2020;168:108514. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2019.108514>
37. Dose, Absorbed | NRC.gov [Internet]. [citado 17 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/glossary/dose-absorbed.html>
38. Gray (Gy) | NRC.gov [Internet]. [citado 17 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.nrc.gov/reading-rm/basic-ref/glossary/gray-gy.html>
39. ICRP Publication 60. Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. 1991.
40. Kron T. Thermoluminescence dosimetry and its applications in medicine--Part 1: Physics,

- materials and equipment. *Australas Phys Eng Sci Med.* 1994;17(4):175–99.
41. Gutiérrez JLM. Métodos Experimentales de Dosimetría Postal para el Control de Calidad en Radioterapia basados en LiF : Mg , Ti ( TLD-100 ) y LiF : Mg , Cu , P ( GR-200 ). Aplicación de Métodos Numéricos al Análisis de las Curvas de Termoluminiscencia [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 1999. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/3281/1/T23220.pdf>
  42. IAEA. *Biological Dosimetry: Chromosomal Aberration Analysis for Dose Assessment.* 1986.
  43. Lusiyanti Y, Syaifudin M, Budiantari T, Purnami S, Ramadhani D. Development of dose-response calibration curve for dicentric chromosome induced by X-rays. *Genome Integr.* 2019;10(1):2.
  44. Radiation Protection-Performance Criteria for Service Laboratories Performing Biological Dosimetry by Cytogenetics. En: ISO 19238. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.
  45. Radiation Protection-Performance Criteria for Laboratories Performing Cytogenetic Triage for Assessment of Mass Casualties in Radiological or Nuclear Emergencies-General Principles and Application to Dicentric Assay. En: ISO 21243. Geneva: International Organization for Standardization; 2008.
  46. Lloyd DC, Purrott RJ, Reeder EJ. The incidence of unstable chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from unirradiated and occupationally exposed people. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 1980;72(3):523–32.
  47. Vallegra MB. Estudio de la Dosimetría en Pacientes con Carcinoma Diferenciado de Tiroides Tratados con Iodo - 131. Universidad de Buenos Aires; 2008.
  48. Jain J, Moreno J, Andaur R, Armisen R, Morales D, Marcelain K, et al. Hundred joules plasma focus device as a potential pulsed source for in vitro cancer cell irradiation. *AIP Adv* [Internet]. 2017;7(8):1–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4994655>
  49. Bernard, Alan et al. Scientific status of plasma focus. *Journal-Moscow Phys Soc.* 1998;8(January):93–170.
  50. Elisa Ceccolini. Development and performance assessment of a Plasma Focus electron beam generator for Intra-Operative Radiation Therapy. *Alma Mater Studiorum. Università di Bologna*; 2012.
  51. Jain J, Moreno J, Davis S, Bora B, Pavez C, Avaria G, et al. Experimental measurements of high-energy photons in X-rays pulses emitted from a hundred joules plasma focus device and its interpretations. *Results Phys* [Internet]. 2020;16(December 2019):102915. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102915>

52. Neog NK, Mohanty SR, Borthakur TK. Time resolved studies on X-rays and charged particles emission from a low energy plasma focus device. *Phys Lett Sect A Gen At Solid State Phys.* 2008;372(13):2294–9.
53. Buontempo F, Orsini E, Zironi I, Isolan L, Cappellini A, Rapino S, et al. Enhancing radiosensitivity of melanoma cells through very high dose rate pulses released by a plasma focus device. *PLoS One.* 2018;13(6):1–21.
54. Jain J, Araya H, Moreno J, Davis S, Andaur R, Bora B, et al. Hyper-radiosensitivity in tumor cells following exposure to low dose pulsed x-rays emitted from a kilojoule plasma focus device. *J Appl Phys.* 2021;130(16):164902.
55. Andaur R, Tapia JC, Moreno J, Soto L, Armisen R, Marcelain K. Differential miRNA expression profiling reveals miR-205-3p to be a potential radiosensitizer for low- dose ionizing radiation in DLD-1 cells. *Oncotarget.* 2018;9(41):26387–405.
56. Ceccolini E, Rocchi F, Mostacci D, Sumini M, Tartari A, Mariotti F. EBT2 dosimetry of x-rays produced by the electron beam from a Plasma Focus for medical applications. *J Appl Phys.* 2012;112(5).
57. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M. The role of radiotherapy in cancer treatment: Estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer.* 2005;104(6):1129–37.
58. Bhide SA, Nutting CM. Recent Advances in Radiotherapy. *BMC Med.* 2010;8(1):1–5.
59. Baumann M, Krause M, Overgaard J, Debus J, Bentzen SM, Daartz J, et al. Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2016;16(4):234–49. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.18>
60. Bourgier C, Lacombe J, Solassol J, Mange A, Pèlegri A, Ozsahin M, et al. Late side-effects after curative intent radiotherapy: Identification of hypersensitive patients for personalized strategy. *Crit Rev Oncol Hematol [Internet].* 2015;93(3):312–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.11.004>
61. A. Hernández, D. Endesfelder, J. Einbeck, P. Puig, A. Benadjaoud, M. Higuera, E. Ainsbury, G. Gruel, U. Kulka LB& JFB. Biodose Tools: An R Shiny Application for Biological Dosimetry [Internet]. 2020. Disponible en: <https://biodosetools-team.github.io/biodosetools/>
62. GraphPad Prism 6 [Internet]. La Jolla California: GraphPad Software; 2012. Disponible en: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)

63. Joint IAEA P and W. Shipment of biological samples for biodosimetry assessment. En: EPRBioDose 2010 International Conference. France;
64. Clarke DJ, Giménez-Abián JF. Checkpoints controlling mitosis. *BioEssays*. 2000;22(4):351–63.
65. Chin CF, Yeong FM. Safeguarding Entry into Mitosis: the Antephase Checkpoint. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):22–32.
66. Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003;22(37 REV. ISS. 3):5834–47.
67. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*. 2001;20(15):1803–15.
68. Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*. 1999;18(53):7644–55.
69. Lloyd DC, Purrott RJ, Dolphin GW. Chromosome aberration dosimetry using human lymphocytes in simulated partial body irradiation. *Phys Med Biol*. 1973;18(3):421–31.
70. Lloyd DC, Dolphin GW, Purrott RJ, Tipper PA. The effect of x-ray induced mitotic delay on chromosome aberration yields in human lymphocytes. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* [Internet]. 1977;42:401–11. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(77\)80045-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(77)80045-6)
71. Alsbeih GA, Al-Hadyan KS, Al-Harbi NM, Bin Judia SS, Moftah BA. Establishing a Reference Dose–Response Calibration Curve for Dicentric Chromosome Aberrations to Assess Accidental Radiation Exposure in Saudi Arabia. *Front Public Heal*. 2020;8(December).
72. Lloyd DC, Edwards AA, Prosser JS. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro acute X and gamma radiation. Vol. 15, *Radiation Protection Dosimetry*. 1986. p. 83–8.
73. Schröder H, Heimers A. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro and in vivo X-rays. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2002;517(1–2):167–72.
74. Beinke C, Braselmann H, Meineke V. Establishment of an x-ray standard calibration curve by conventional dicentric analysis as prerequisite for accurate radiation dose assessment. *Health Phys*. 2010;98(2):261–8.